



HAL
open science

Développement et caractérisation *in vivo* de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire

Juliette Mérian

► **To cite this version:**

Juliette Mérian. Développement et caractérisation *in vivo* de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P614 . tel-00747071

HAL Id: tel-00747071

<https://theses.hal.science/tel-00747071>

Submitted on 30 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
(ED 436 : De la molécule à la clinique)

Spécialité
Pharmacologie

Présentée par
Mlle Juliette MERIAN

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Sujet de la thèse :

Développement et caractérisation *in vivo* de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire

Soutenue le 26 Septembre 2012 à Paris

Devant le jury composé de :

M. Bertrand TAVITIAN	Directeur de thèse
Mme Isabelle TEXIER-NOGUES	Co-encadrante de thèse
M. Eric ALLEMANN	Rapporteur
M. Daniel FAGRET	Rapporteur
M. Xavier DECLEVES	Examineur
M. Jean-Manuel PEAN	Examineur

*« Le Monde est un livre,
et ceux qui ne voyagent pas
n'en lisent qu'une page »*

Augustus Sanctus

(IV^{ème} siècle après JC)

Remerciements

Ceux qui me connaissent savent que j'ai plutôt vadrouillé pendant ma thèse et qui dit « vadrouille » dit « rencontres » et qui dit « rencontres » dit beaucoup de remerciements !!

Je remercie **Christine Peponnet** de m'avoir intégrée au sein de son service. Merci à **Françoise Vinet** de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Fonctionnalisation et Chimie des Microsystèmes (LFCM) devenu le Laboratoire de Chimie des Matériaux et Interfaces (LCMI) depuis 2012 repris par **Gilles Marchand**.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le **Pr. Bertrand Tavitian**, directeur du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire d'Orsay (LIME) pour m'avoir suivie, épaulée et encouragée tout au long de cette thèse. Il a su parfaitement allier les rôles de mentor, de conseiller et de critique, nous permettant de trouver un équilibre constant qui, à mes yeux, n'a jamais été ébranlé au cours de ces 3 années malgré la distance physique qui séparait les 2 laboratoires. Je lui souhaite beaucoup de succès dans ses nouvelles fonctions à l'hôpital Georges Pompidou.

Un grand merci à ma co-encadrante de thèse, que je considère pleinement comme mon second directeur de thèse, **Isabelle Texier-Nogues** du LCMI Grenoble, pour son investissement pendant ces années. Malgré des caractères opposés aux premiers abords, et des disciplines de base légèrement différentes, cette complémentarité nous a porté et a été la source d'échanges permanents. Merci d'avoir respecté mes idées, de m'avoir laissée exprimer mes opinions et d'avoir corrigé avec autant d'attention mon manuscrit 😊 (bien qu'il ait eu envie de partir en vacances découvrir la Belgique !). Je pense que tu m'as appris une certaine forme de patience, de la rigueur et des outils afin de mieux exprimer mes pensées, donc un grand merci.

Je remercie **Eric Allemann** et **Daniel Fagret** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à **Jean-Manuel Péan** et **Xavier Déclèves** d'avoir accepté sans hésiter et avec enthousiasme de participer à cette thèse.

Commençons notre premier arrêt dans l'une des plus belles villes du monde : Paris.

Je souhaite remercier tout particulièrement **Raphaël Boisgard**, du SHFJ, pour son temps et son investissement dans ce projet pour lequel il n'avait pas postulé au départ ! Ta présence pendant ces journées interminables d'injections (ô combien réussies !), dissections et pesées d'organe m'a été indispensable afin de ne pas finir momifier dans la cave du SHFJ. Merci pour la rigueur que tu m'as apprise lorsqu'il s'agit d'expérimenter *in vivo*, ce qui a abouti à autant de résultats. Tu as également été le premier à me soutenir quand je suis tombée malade et je t'en remercie. Merci pour tous les « à côté », les discussions, les bons moments, les tartes au citron, les mélanges d'eau et de céréales dégustées au soleil et n'oublions pas nos amis de la communauté des poulpes. Ne pense pas que me faire traverser la Manche m'empêchera de continuer à t'embêter par mail ☺.

Un immense merci au **personnel du SHFJ** pour leur accueil chaleureux et souriant, merci de m'avoir fait me sentir comme chez moi au sein de votre établissement. Merci d'avoir cru en moi et investi dans mon travail.

Merci particulièrement à **Amel Petit-Renaud**, qui m'a autorisée à manipuler des nanoparticules au sein de son installation, **Christine Coulon**, **Stephane Le Helleix**, **Karima Ait Aissa**, **Nicolas Tournier**, **Anikitos Garofalakis** et **Sébastien Goutal**. Un grand merci à **Benoit Thézè** pour m'avoir appris à utiliser son si beau microscope, conseillé dans les protocoles d'histologie, implanté les tumeurs en temps et en heure pour que mes conditions d'expérimentations une fois ma venue sur Paris soient optimales et tout simplement merci pour les bons moments passés à l'aile C.

Je souhaiterais également remercier **Jinzi Zheng** pour la force et l'énergie qu'elle a pu me donner afin de toujours me surpasser, son accueil à Toronto et à Québec. Merci

également à **Alexandra Winkeler** pour nos discussions qui ne manquaient jamais d'intérêt, nos bons moments passés à Paris, Leiden et Cologne.

Tant que nous sommes géographiquement à Paris, je souhaite remercier mon école doctorale, l'ED 436 dirigée par **Christiane Garbay**, pour son implication dans le suivi de ses étudiants et la qualité des modules proposés. La journée mensuelle des thésards a toujours été pour moi une bouffée d'air frais car elle permet de rencontrer d'autres thésards de thématique similaire, nous rassure et nous motive à ne pas lâcher. Grâce à l'ED, j'ai pu participer aux Doctoriales Sorbones Paris Cité 2011 qui a simplement été une semaine extraordinaire d'un point de vue scientifique et humain. J'ai ainsi pu rencontrer **Manal Sarkis** et **Clémentine Perrière**, du « clan très private des sugar baby love ». J'ai également pu participer au Nouveau Chapitre de la Thèse en association avec l'Intelligence qui m'a permis d'apprendre à mettre en avant mes compétences.

Faisons ensuite un petit détour par la faculté de pharmacie de Paris Descartes pour remercier **Xavier Déclèves**, qui n'a pas hésité une seule seconde pour dire oui lorsque je lui ai demandé de l'aide pour traiter mes données expérimentales de pharmacocinétique.

Prenons notre chère SNCF (point toujours ponctuelle) pour redescendre sur Grenoble. Je souhaite remercier de tout mon cœur les 3 drôles de dames de l'open space du bas. **Emilie Heinrich**, alias Ma Milie ou encore co-équipière de paillasse. Il est difficile de se mentir, ça va être dur de te quitter !!!! On aurait escaladé l'Himalaya toute les deux, ça aurait été la même chose. Merci pour tout, merci d'être ce que tu es et merci de m'avoir épaulée pendant tout ce temps et ce, malgré les dures embuches que tu as traversées. Merci pour le zinc, pour le margaux... (bref une page entière ne suffirait pas !). **Véronique Mourier**, alias Ma Véro, ou Wonder Woman, tu es la grande sœur que je n'ai jamais eue. Telle ma bonne étoile ou la petite fée qui s'est penchée sur mon berceau (tu as le choix, tu peux également prendre les deux options), tu as été mon pilier pendant ses 3 années, toujours droite, de bon conseil et impartiale. Quelques soient mes questions, mes angoisses, mes états d'âme, tu as répondu présente et je t'en remercie car je sais que j'ai toujours pu

compter sur toi. Et n'oublions pas que le petit Lucas a été le premier nourrisson à passer son après-midi à roupiller sur mon épaule (ou un peu plus bas ☺). Et enfin, **Marie Escude**, alias Ma Marie, notre mère à toutes. « Oh Marie, si tu savais, je suis venue te dire que je m'en vais », je sais que ma douce voix te chantant ses merveilleuses chansons va te manquer (si tu es sage je t'enverrai des CD enregistrés). Merci pour tout, pour ton oreille attentive, pour les confidences entre les colonnes et le rotavap et ton sens de l'humour. Et merci pour les commandes, système abstrait fait de tableur Excel et « d'erreur » : Marie Reine des commandes qui solutionne tous nos problèmes en un coup de fil !!

Prenons le bus qui nous amène au bout du centre du CEA de Grenoble et arrêtons-nous au C5. Un grand merci à **Pierre Alain Bayle** et **Michel Bardet**, de l'INAC (Institut des nanosciences de Grenoble). Pierre Alain, tu as eu la lourde tâche de m'apprendre à faire des RMN, et heureusement que tu étais dévoué et pourvu d'un bon sens de l'humour car ça a toujours été un plaisir de venir travailler chez vous.

Retournons vers Nanobio en passant par le bâtiment C3. Je souhaite remercier **François Boulay** pour m'avoir autorisée à réaliser mes synthèses radioactives dans son laboratoire.

Dernier stop chez Fluoptics, merci à **Stéphanie Guillermet**, **Pascal Gayet** et toute l'équipe pour leur disponibilité et leurs échanges autour de la Fluobeam.

De retour à Nanobio. Je souhaite remercier **Anne-Claude Couffin**, pour m'avoir permis de réaliser des expériences au sein de l'université de Montréal et pour l'excellent restaurant Japonais où elle m'a emmené qui reste à ce jour le meilleur Japonais que j'ai mangé.

Merci également aux secrétaires, sans qui nous ne sommes que peu de choses : **Daphné Fendler**, **Véronique Birkenheier** et **Véronique Estève** avec lesquelles j'ai passé de très bons moments et avec lesquelles j'ai beaucoup ri !

Reprenons notre route pour nous arrêter près de Genève. Un grand merci à l'entreprise AAA (Advanced Accelerator Application) et tout particulièrement à **Davide**

Camporese et **Cédric Bouteiller**. Votre entrepreneuriat et votre joie de vivre ont toujours ensoleillées les réunions NanoEno !

Enfin, notre dernier arrêt sera l'hôpital d'Angers. Merci à **Samuli Hirsjarvi** pour les expériences SPECT réalisées, au-delà l'aspect scientifique, j'ai mangé Subway pour la première lors de ce séjour et j'ai appris que le coca pouvait se mettre sous forme de sirop.

La revue des personnes avec qui j'ai collaboré pendant ces 3 ans me semblant complète je souhaite à présent remercier les personnes n'étant pas directement liées à mon travail de thèse.

Tout d'abord un grand merci à mon lovely grand frère, le Dr **Pierre Mérian** (docteur la même année, que demande le peuple !!). Merci surtout pour ses blagues pourries et ses jeux de mots à la « mord moi le nœud » mais toujours efficaces en cas de coup de mou 😊.

Merci à mes amis de longues dates qui ont toujours été présents : **Selma Hadamer, Mélanie Malfériol, Claire Gendre, Alexia Cerni, Sandrine Gosling et Camille Destombes**. Merci également aux nouveaux, **Laure Hélène Guillemot, Carole Sauer et Hélène Marie**, qui ont toujours eu une oreille attentive. Leur présence a été essentielle, qui mieux qu'un thésard peut comprendre un autre thésard ! Merci également à **Karine Gombert, Camille L'épine, Thomas Delmas, Tarek Fathallah, Aurélien Lambert et Régis Barratin** pour leur bonne humeur.

Un grand merci à la **famille James** et notamment **Lydie** qui m'a toujours accueillie lorsque j'étais sans toit parisien. Merci pour les bons moments, les sorties et les délicieux petits plats qui m'attendaient tout prêts, tout beaux, tout chauds (et toujours ceux que je préférais) lorsque je rentrais le soir.

Merci également à **David**, mon propriétaire de Paris, qui a fait de son appartement mon nouveau chez moi pendant quelques mois.

De manière peu banale, je remercie mon médecin qui m'a soigné pendant 3 ans et à qui j'ai donné du fil à retordre et la preuve que c'est un bon médecin est que je suis encore vivante !

Enfin je souhaite remercier mes parents **Cathy & Joël** pour m'avoir donné accès à l'éducation et d'avoir essayé tant bien que mal de suivre nos thèses respectives !!!!

Résumé

La nanomédecine est un secteur d'activité en plein essor depuis le développement des liposomes, nanovecteurs permettant d'encapsuler des molécules hydrosolubles ou amphiphiles pour la délivrance de médicament. Les nouveaux agents thérapeutiques synthétisés étant de plus en plus lipophiles, le développement de nouveaux vecteurs nanoparticulaires permettant leur transport constitue aujourd'hui un enjeu majeur.

Les lipidots, nanoparticules lipidiques solides biocompatibles de 50 nm de diamètre, composées d'un mélange d'huile, de cire et de lécithine stabilisées par une couronne de surfactants pegylés, permettent de transporter des composés hautement hydrophobes en leur cœur. Des agents nucléaires pour la tomographie à émission monophotonique et des agents de fluorescence ont pu y être encapsulés pour l'évaluation de la biodistribution de ces nanoparticules chez la souris saine ainsi que dans différents modèles tumoraux. Un peptide de ciblage, le cRGD a également été greffé à la surface des lipidots afin d'adresser préférentiellement, dans les 3 premières heures après injection, les nanoparticules vers les tumeurs surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Une biodistribution particulière des lipidots dans les organes stéroïdiens (surrénales, ovaires) a été observée avec une localisation spécifique dans les zones synthétisant les hormones stéroïdiennes (le corps jaune pour les ovaires, la zone corticale pour les surrénales). Cette affinité unique a été mise à projet pour cibler des tumeurs hormono-dépendantes, ainsi que pour encapsuler des hormones ovariennes pour le traitement hormonal substitutif ou le contrôle de la procréation.

Mots-clés : Nanoparticule, biodistribution, fluorescence, radioactivité, ICG, SPECT

Abstract

Nanomedicine is a fast growing field since the development of liposomes, nanovectors able to encapsulate in their core or phospholipid bilayer hydrophilic or amphiphilic molecules for drug delivery purposes. Nowadays, most of the new synthesized therapeutic compounds are hydrophobic, necessitating the development of new types of nanocargos.

Lipidots, 50 nm diameter biocompatible solid lipid nanoparticles, composed of a mixture of oil, wax and lecithin stabilized by a shell of pegylated surfactants, are used to encapsulate highly hydrophobic compounds in their core for vectorization purpose. Nuclear agents for simple photon emission tomography, or near infrared fluorescent dyes, have been encapsulated in the lipidot core, to assess the biodistribution of these nanoparticles in healthy mice as well as in a large range of tumor models. A targeting peptide, the cRGD motif, was also grafted on the surface of lipidots to vectorize preferentially the nanoparticles to tumors overexpressing $\alpha\beta3$ integrins. An unexpected lipidot biodistribution in steroid organs (adrenal, ovary) was observed, with a specific localization in areas of steroid hormones synthesis (*corpus luteum* in ovaries, cortex for adrenals). This unique lipidot affinity was used to target hormono-dependent cancer cells, as well as to encapsulate ovarian hormones, like estradiol or ethynil estradiol, for hormone substitution therapy or birth control.

Key words: Nanoparticle, biodistribution, fluorescence, radioactivity, ICG, SPECT

Liste des abréviations

ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

AP : Acide Palmitique

BHE : Barrière Hémato Encéphalique (BBB pour « Blood Brain Barrier » en anglais)

BSA : Albumine Sérique Bovine (Bovine Serum Albumin en anglais),

CH: Cholestérol

CHE: Ether de cholestéryle et hexadécyle (Cholesteryl Hexadecyl Ether en anglais),

CHO: Oléate de Cholestéryle (Cholesteryl Oleate en anglais)

CHST: Stéarate de Cholestéryle (Cholesteryl STearate)

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC pour « High Pression Liquid Chromatography » en anglais)

cRAD: cRADfK(Ac-S-CH₂CO)

cRGD: cRGDfK(Ac-S-CH₂CO)

DiD: Perchlorate de 1,1'-Dioctadécyl-3,3,3',3'-Tétraméthylindodicarbocyanine

DPPC: Diphosphatidylcholine

DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL: 1,2-distéaroyl-*sn* - glycéro - 3 - phosphoéthanolamine - N - [maléimide (polyéthylène glycol)-5000]

DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂ : 1,2-distéaroyl-*sn*- glycéro-3-phosphoéthanolamine- N- [amino (polyéthylène glycol)-5000]

EMA : European Medicines Agency

EPR: « Enhanced and Permability Retention » en anglais

FDA: Food and Drug Administration (aux USA)

HAS: Albumine Sérique Humaine (“Human Serum Albumin” en anglais)

ICG: Vert d'indocyanine, (“IndoCyanine Green” en anglais)

IRM: Imagerie à Résonance Magnétique

NIRF: Proche Infra-rouge (“Near InfraRed Fluorescence” en anglais)

NLC : Cargo Lipidique Nanostructuré (« Nanostructured Lipid Carrier » en anglais),

PBPK: Pharmacocinétique Basée sur la Pharmacologie (“Pharmacology Based Pharmacokinetics” en anglais)

PBS : Tampon Phosphate (« Phosphate Buffer Saline » en anglais)

PDI: PolyDispersité

PDT : Thérapie photo dynamique (« PhotoDynamicTherapy » en anglais)

PEG: Poly Ethylène Glycol

PFA: Para formaldéhyde

PL: Phospholipide

PLGA: Poly(acide lactique-coglycolique), (“Poly(Lactic-co-Gglycolic Acid” en anglais),

RES : Sytemème Réticulo Endothélial (« Reticulo Endothelial System » en anglais)

RMN : Résonance à Magnétique Nucléaire

ROI : Région d’intérêt (« Region Of Interest » en anglais)

SLN : Nanoparticule Lpidique Solide (« Solid Lipid Nanoparticle » en anglais)

TEMP: Tomographie à Emission Monophotonique de Positons (SPECT en anglais pour « Single Positons Emission Computed Tomography »)

TEP: Tomographie à Emission de Positons (PET en anglais pour « Positons Emission Tomography »)

UV: UltraViolet

ϕ : Rendement quantique de fluorescence

Sommaire

Introduction Générale

Chapitre I : Nanomédecine, des premiers essais jusqu'à la clinique

A. Nanomédecine : définition et objectifs.....	33
A.1. Définition.....	33
A.2. Avantages de la taille nanométrique : exemple de nanovectorisation	34
A.3 Des nanoparticules désignées pour les applications médicales	36
A.3.1 Trois générations de nanoparticules	36
A.3.2 Nanoparticule et ciblage passif	37
A.3.3 Nanoparticule et ciblage actif	39
B. Développement de nano-objets	40
B.1. Les nanoparticules inorganiques.....	40
B.2. Les nanoparticules organiques.....	43
B.3. Les systèmes lipidiques depuis les années 2000.....	47
B.4 Conclusion	48
C. Nanoparticules et Imagerie de fluorescence	49
A.1 Intérêt de l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge.....	50
A.2 Nanoparticules et imagerie <i>in vivo</i> de fluorescence	51
A.2.1. Modalité d'incorporation d'un fluorophore à un nanovecteur.....	51
A.2.2. Les différents systèmes en développement	52
D. Les nanoparticules lipidiques développées au CEA : « Lipidots ».....	54
D.1. Le système des nanoparticules lipidiques : Lipidots	54
D.2 Connaissance préliminaire du système	56
E. Conclusion	57

Chapitre II : Devenir *in vivo* des Lipidots

A. Caractérisation <i>in vivo</i> : les outils disponibles	62
A.1. Caractérisation des vecteurs <i>in vivo</i> : paramètres fondamentaux de pharmacocinétique et de biodistribution.....	62
A.1.1 Les paramètres fondamentaux de pharmacocinétique.....	62
A.1.2 Les modèles de pharmacocinétique.....	62

A.1.2.a <i>La pharmacologie classique</i>	63
A.1.2.b <i>Les modèles PBPK</i>	64
A.2. Les paramètres fondamentaux de biodistribution	65
A.2.1 <i>L'absorption</i>	66
A.2.2 <i>La distribution</i>	66
A.2.3 <i>La métabolisation</i>	68
A.2.4 <i>L'élimination</i>	68
A.3 Tracer les nano-objets : techniques de marquage à disposition	68
A.3.1 <i>Suivi d'une nanoparticule par dosage chimique</i>	69
A.3.2 <i>Suivi d'une nanoparticule par radiomarquage</i>	69
A.3.3 <i>Suivi d'une nanoparticule par fluorescence</i>	71
B. Synthèse des lipidots marqués	72
B.1 Identification de traceurs représentatifs de la nanoparticule	72
B.1.1 <i>Formulation et caractérisation des lots radiomarqués ³H / ¹⁴C :</i>	73
B.1.2 <i>Evaluation in vivo</i>	74
B.1.3 <i>Conclusion sur le choix des traceurs</i>	77
B.2 Synthèse et caractérisation d'un vecteur triplement marqué : l'apport combiné de la fluorescence et du radiomarquage.....	78
B.2.1 <i>Choix des traceurs</i>	78
B.2.2 <i>Synthèse et caractérisation du vecteur triplement marqué</i>	79
C. Administration et suivi <i>in vivo</i> des Lipidots	82
C.1 Modèle animal retenu et plan expérimental	82
C.1.1 <i>Choix du modèle animal</i>	82
C.1.2 <i>Plan expérimental</i>	82
C.2 Etude de pharmacocinétique	85
C.2.1 <i>Modélisation et détermination des paramètres de pharmacocinétique</i>	86
C.2.2 <i>Discussion</i>	88
C.3 Etude de la biodistribution.....	88
C.3.1 <i>Biodistribution des traceurs libres chez la souris femelle FVB</i>	89
C.3.2 <i>Biodistribution des nanoparticules triplement marquées chez la souris femelle FVB</i>	91
C.3.3 <i>Evaluation de la biodistribution des Lipidots triplement marqués chez la souris mâle FVB/N</i>	95
C.4 Etude à l'échelle tissulaire.....	97
C.5 Discussion.....	100
C.5.1 <i>Choix des traceurs</i>	100

C.5.2 Pharmacocinétique	101
C.5.3 Biodistribution.....	102
C.5.4 Modulation du ciblage spontané par modification de la formulation.....	106
C.5.4.a Formulations enrichies cholestérol ou stéarate de cholestérol.....	106
C.5.4.b Caractérisation des formulations enrichies en cholestérol ou stéarate de cholestérol.	108
C.5.4.c Influence de la composition sur le ciblage ovarien <i>in vivo</i>	108
C.5.4.d Discussion et conclusion	110
E. Discussion	111
E. Conclusion générale sur le devenir <i>in vivo</i> des lipidots.....	115

Chapitre III : Design d'agents de contraste pour l'imagerie de fluorescence ou l'imagerie nucléaire en clinique

Partie I : Vers l'Imagerie de fluorescence.....	121
A. Le vert d'indocyanine (ICG).....	121
A.1 Intérêt de la molécule	121
A.2 L'ICG en clinique.....	122
A.2.1 L'identification du ganglion sentinels	122
A.2.2 Autres applications	122
A.3 Les limites de l'ICG libre	123
A.4 L'ICG et les nanoparticules.....	124
B. ICG, lipidot et milieu biologique	126
B.1 Encapsulation de l'ICG.....	127
B.1.1 Influence de la taille.....	127
B.1.2 Influence du taux de dopage.....	128
B.1.3 Etude comparative avec le-DiD.....	130
B.1.4 Discussion.....	131
B.2 Devenir <i>in vivo</i> de l'ICG encapsulé dans les lipidots	132
B.3 Discussion sur la biodistribution de l'ICG encapsulé dans les lipidots.....	136
C. Lipidot-ICG et lipidot-DiD : localisation du fluorophore et comportement en présence de protéines plasmatiques	138
C.1 Localisation des fluorophores dans la nanoparticule	138
C.1.1 Principe de l'effet nucléaire Overhauser.....	138
C.1.2 Spectres RMN ¹ H des lipidots et des fluorophores seuls.....	140

C.1.3 Expérience de Diffusion de nOe	144
C.1.4 Conclusion	146
C.2 Mise en place d'un « pré-test » <i>in vivo</i> : devenir des lipidots ICG et DiD	147
C.2.1 « Pré-test » <i>in vivo</i>	147
C.2.2 Influence de la taille	148
C.2.3 Influence du taux de dopage en fluorophore	150
C.2.4 Influence de la concentration en lipides	151
C.3 Discussion	154
D.Stratégie de rétention de l'ICG dans la nanoparticule	158
D.1 Modification du cœur et de la coquille	158
D.1.1 Formulations testées	158
D.1.2 Caractérisations des nouvelles formulations	160
D.1.2 Fuite de l'ICG	161
D.2 Co-encapsulation de l'ICG	162
D.3 Discussion	164
Partie II : Vers l'imagerie nucléaire	166
E.Encapsulation du ^{99m} Tc	167
E.1 Synthèse des lipidots ^{99m} Tc	167
E.2 Caractérisation des lots synthétisés	168
E.3 Evaluation de la distribution <i>in vivo</i>	169
E.4 Discussion	170
F.Greffage du ¹⁹ F	173
G.Conclusion	175

Chapitre IV : Lipidots et imagerie tumorale

A. Séquence RGD et accumulation tumorale	180
A.1 Angiogénèse, Intégrine et Séquence RGD	180
A.2 RGD et cancer	181
A.3 Présentation du RGD à la tumeur	182
A.4 RGD et imagerie <i>in vivo</i>	183
A.5 RGD et nanoparticule	185
A.6 RGD et transfert clinique	186

B. Accumulation des lipidots dans différents modèles tumoraux : choix d'un modèle d'étude	186
B.1 Présentation des modèles tumoraux	187
B.2 Résultats expérimentaux avec les modèles d'Angers	189
B.3 Résultats expérimentaux avec les modèles du SHFJ	190
<i>B.3.1 Le modèle du gliome</i>	190
<i>B.3.2 La lignée cellulaire MCF7</i>	191
<i>B.2.3 La lignée cellulaire MDA-MB231</i>	192
<i>B.2.4 La lignée cellulaire PyMT</i>	193
<i>B.2.5 La lignée cellulaire PyMT implantée chez la souris FVB</i>	194
B.4. Discussion et choix du modèle d'étude	195
B.5. Statut du RGD vis-à-vis du modèle FVB implanté PyMT	197
<i>B.5.1 Biodistribution des peptides libres</i>	197
<i>B.5.2 Biodistribution de l'Angiostamp®</i>	199
<i>B.5.3 Discussion</i>	201
C. Etude de l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs PyMT chez les souris FVB	202
C.1 Introduction.....	202
C.2 Préparation des particules, peptides et caractérisations.....	203
<i>C.2.1 Préparation des nanoparticules et réaction de couplage</i>	203
<i>C.2.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules fonctionnalisées</i>	204
<i>C.2.2.a Caractérisation de la nanoparticule</i>	204
<i>C.2.2.b Caractérisation du nombre de peptides greffés</i>	205
C.3 Résultats	206
<i>C.3.1 Biodistribution des particules nues</i>	206
<i>C.3.2 Apport de la fonctionnalisation des lipidots</i>	208
C.4 Quantification ex vivo et histologie.....	211
C.5 Discussion.....	212
D. Conclusion sur le ciblage des lipidots pour de la vectorisation tumorale	213

Chapitre V : Lipidots et dérégulation hormonale

A. Nanoparticules et thérapie hormonale	218
A.1 Les hormones ovariennes	218
A.2 Les traitements hormonaux.....	219

A.3 Délivrance hormonale.....	221
B.Encapsulation d’hormones stéroïdiennes	224
B.1 Encapsulation d’Œstradiol et d’éthynil œstradiol.....	224
B.2 Efficacité d’extraction.....	228
B.3 Relargage hormonal dans un milieu aqueux.....	230
B.4 Discussion.....	233
C.Conclusion sur les lipidots pour la délivrance d’hormone.....	234

Chapitre VI : Partie Expérimentale

A. Préparation et caractérisation des nanoparticules.....	237
A.1 Produits chimiques.....	237
A.2 Synthèse et purification	238
A.2.1 Formulation « standard » (50 nm, 100 mg / mL en lipides, 75 % cire et 25 % huile)	238
A.2.2 Formulation de nanoparticules de diamètre compris entre 30 nm et 120 nm.....	241
A.3 Caractérisation des particules.....	242
A.3.1 Taille, polydispersité et potentiel zêta.....	242
A.3.2 Rendement d’encapsulation des fluorophores	242
A.3.3 Caractérisation de fluorescence et rendement quantiques.....	243
A.3.4 RMN et localisation des fluorophores DiD et ICG	244
A.3.4.a Acquisition des spectres (DiD, lipidot-DiD, ICG et lipidot-ICG).....	244
A.3.4.b Pulse sélectif pour l’observation des pics de résonance associés aux fluorophores	244
A.3.4.c Expérience de transfert de NOE.....	245
A.4 Fonctionnalisation des lipidots	246
A.4.1 Thiol - maléimide	247
A.4.2 NHS – NH ₂	247
A.4.3 Caractérisation des particules après couplage.....	248
A.4.3.a Caractérisation des lipidots fonctionnalisées par les cRGD et cRAD.....	248
A.4.3.b Caractérisation des lipidots fonctionnalisées par le [¹⁹ F]SFB.....	251
A.5 Dosage CLHP de molécules encapsulées	252
A.5.1 Mise au point de la méthode de dosage CLHP	252
A.5.2 Dosage des hormones encapsulées dans les lipidots.....	253
A.5.3 Quantification du relargage des hormones au cours du temps	253
A.6 Interaction nanoparticules et protéines plasmatiques.....	254

B.	Modèle animaux, culture et implantation des cellules tumorales.....	255
C.	Comptage des échantillons radiomarqués.....	257
C.1	Rappel sur le procédé de scintigraphie	257
C1.1	Principe fondamental	257
C1.2	Notion de masquage	258
C.2	Protocole de calibration du compteur	258
C.2.1	Lecture des radiotraceurs purs.....	258
C.2.2	Influence du volume de liquide à scintillation.....	259
C.2.3	Influence de la coloration.....	259
C.2.4	Sensibilité de la détection	259
C.3	Protocole de traitement des échantillons biologiques	260
D.	Imagerie de fluorescence	261
D.1	Méthode de prélèvement et de traitement des organes.....	262
D.2	Détermination de la fluorescence « corps entier »	262
D.3	Quantification	262
E.	Histologie.....	264
E.1	Choix du protocole de fixation	264
E.2	Protocole de coloration.....	265
E.3	Protocole d'acquisition des images.....	265

Conclusion Générale

Annexes

Annexe 1 : Formules de pharmacocinétiques

Annexe 2 : Liste des publications et communications

- *Fluorescent Nanoprobes Dedicated to In Vivo Imaging: from Preclinical Validations to Clinical Translation*

- *Synthetic lipid nanoparticles targeting steroid organs (soumise)*

Introduction générale

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un axe majeur de développement en médecine avec notamment les domaines du diagnostic, de l'imagerie, de la délivrance de médicament, du suivi thérapeutique et de l'ingénierie tissulaire. L'administration de produits non injectables sous leur forme libre ou bien possédant une toxicité élevée, peut être facilitée par l'utilisation de nanovecteurs, modifiant leur distribution. Cela permet de réduire les doses administrées, limiter les effets secondaires et amener préférentiellement le contenu du vecteur (agent de contraste, drogue) vers un organe cible ou une tumeur, en présentant à la surface de celui-ci des molécules de ciblage de ces zones spécifiques.

Ces travaux de thèse ont pour but d'évaluer le devenir *in vivo* des lipidots, nanoparticules lipidiques biocompatibles développées en tant que nanovecteur au CEA / LETI / DTBS, afin de définir leurs organes d'accumulation et leurs modes d'élimination de l'organisme. Pour cela, différentes techniques vont être utilisées, notamment l'imagerie de fluorescence et l'imagerie nucléaire. A partir des données obtenues, différents domaines d'applications potentielles pour les lipidots seront déterminés.

Le Chapitre I s'intéresse aux différentes nanoparticules biocompatibles développées à ce jour et à la place de l'imagerie de fluorescence dans la recherche clinique.

Le Chapitre II évalue le devenir *in vivo* des lipidots chez la souris saine via un triple marquage fluorescent et radioactif. L'importance du choix des traceurs et leurs impacts sur la formulation des nanoparticules sont également évalués.

Le Chapitre III explore l'utilisation des lipidots comme traceur fluorescent pour l'imagerie peropératoire, donc destiné à un usage clinique, en essayant d'encapsuler le vert d'indocyanine, unique fluorophore dans le proche infrarouge autorisé à l'injection chez l'homme. De même, un traceur pour l'imagerie nucléaire (tomographie à émission monophotonique) est développé pour obtenir un agent de contraste pour le diagnostic non invasif sur corps entier.

La Chapitre IV s'intéresse au secteur de l'oncologie avec l'accumulation passive des lipidots dans les zones tumorales via l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Cette accumulation est évaluée sur plusieurs modèles tumoraux puis comparée à une stratégie de ciblage actif. Dans cette perspective, un peptide de ciblage, le cRGD, spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur surexprimé dans certain type de cancers, est greffé sur la couronne des lipidots et la biodistribution des nanoparticules fonctionnalisées est étudiée dans un modèle de souris avec un modèle de cancer mammaire murin.

Enfin, suite à l'obtention d'une biodistribution spécifique des lipidots dans les organes stéroïdiens (ovaires, surrénales, Chapitre II), la preuve de concept de l'utilisation des lipidots pour de la délivrance d'hormones ovariennes (œstradiol, éthinil œstradiol) est étudiée Chapitre V.

Chapitre I :

Nanomédecine,

des premiers essais jusqu'à la clinique

Ce chapitre a pour objectif de décrire la place actuelle des nano-objets dans la recherche clinique. L'intérêt et l'utilité des nanovecteurs seront explicités, ainsi que leur utilisation en médecine, notamment pour le diagnostic, la thérapie, ou la combinaison des deux, appelée théragnostique. Puis, seront décrits les différents nano-objets ayant été développés pour des applications *in vivo*, ainsi que les évolutions subies par ces vecteurs afin d'améliorer leurs propriétés au contact des milieux biologiques. L'utilisation de l'imagerie de fluorescence, technique de choix utilisée dans cette thèse pour suivre le devenir *in vivo* de nanoparticules sera explicitée. Enfin, les nanoparticules lipidiques développées au laboratoire, les lipiodots, étudiées au cours de cette thèse, seront présentées, ainsi que les données connues au démarrage de ce travail concernant leur stabilité et leur toxicité.

A. Nanomédecine : définition et objectifs

A.1. Définition

Les nanoparticules sont utilisées depuis de nombreux siècles (nanoparticules de cuivre dans les tessons gallo-romains pendant l'antiquité, nanocristaux d'argent et de verre dans les vases ou encore nanoparticules d'or pour sublimer les couleurs des vitraux) mais le terme et sa signification physique n'ont été définis qu'au XX^{ème} siècle. Le Lipiodol®, mélange d'acide gras et d'huile iodée utilisé comme agent de contraste en radiologie, développé par le Dr. Guerbet à Paris en 1901 (toujours utilisé aujourd'hui), se présentait déjà sous une forme nanoparticulaire. Richard Freymann, lors de sa lecture du 29 décembre 1959 lors du congrès de la Société Américaine de Physique, «*There's plenty of room at the bottom*», prédisait déjà l'essor du monde des nanoparticules dans les décennies qui ont suivies.

L'emploi du terme « nanoparticule » est apparu au début des années 1960 avec la formulation de liposomes (découverte en 1961, publiée en 1964)¹⁻³. Le concept de « **nanomédecine** » a été introduit bien après, avec les premiers essais dans le domaine médical et les premières publications dans les années 2000^{4,5}.

D'après l'institut national de recherche et de sécurité (INRS)^{6,7}: « une **nanoparticule** (ou particule ultra-fine) est définie par la norme ISO TS/27687 comme étant un nano-objet dont les trois dimensions (longueur, diamètre, épaisseur) sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre est inférieur à 100 nm environ ». Une définition

plus large de « **nano-objet** » englobe les objets dont au moins une des dimensions se situe à l'échelle nanométrique.

A.2. Avantages de la taille nanométrique : exemples de nanovectorisation

Il existe de nombreux moyens de caractériser une molécule thérapeutique. Dans un premier temps ses propriétés **physico-chimiques** « *in vitro* » (à savoir dans un tampon) sont étudiées. Les caractéristiques les plus importantes sont la charge de surface (qui peut moduler la complexion de la molécule avec d'autres molécules de charges opposées ou encore jouer sur l'internalisation de la molécule dans la cellule), le poids moléculaire, la solubilité, la stabilité nécessaire pour être sûr de la nature de la molécule injectée et ne pas introduire de produits de dégradation⁸.

Dans un second temps, le profil **pharmacologique** est étudié, à savoir le devenir *in vivo* de la molécule après administration, la mettant en contact avec le milieu vivant. Les paramètres à évaluer sont la toxicité, la stabilité biologique, les pharmacocinétiques et biodistributions (termes expliqués plus longuement Chapitre II), la capacité à passer les barrières biologiques ou encore sa capacité à se lier aux protéines plasmatiques (un taux de liaison élevé réduit la biodisponibilité du produit). Les données pharmacologiques varient suivant la voie d'administration du produit (voie orale, intraveineuse, intradermique, aérosols...). En effet, la molécule ne sera pas exposée aux mêmes barrières biologiques, qu'elles soient physiques (passage de l'épiderme, passage de la membrane gastro-intestinale, passage des membranes alvéolaires pulmonaires, perméabilité de certaines membranes..), biochimiques (dégradation enzymatique dans l'estomac par exemple) ou chimiques (pH acide au sein d'une tumeur ou encore pH acide de l'estomac ; hydrophobie du composé le rendant impropre à l'injection).

Un point essentiel est la **toxicité** de ces molécules après administration. En effet leur accumulation non souhaitée dans certains organes, ou encore un temps de présence trop long dans l'organisme, peuvent entraîner des effets toxiques très importants appelés « effets secondaires » ou indésirables. L'activité intrinsèque de certaines molécules, notamment les anticancéreux qui ont pour but de détruire les cellules tumorales, peut entraîner des effets indésirables très importants en dehors de leur cible biologique. Une pharmacocinétique défavorable peut également entraîner une augmentation de la dose administrée afin

d'obtenir la dose souhaitée sur le site d'action biologique ciblé, augmentant davantage les effets secondaires du produit.

Même si certaines modifications structurales de molécules permettent de changer leurs propriétés chimiques ou physico-chimiques pour améliorer leur comportement *in vivo*, certaines molécules thérapeutiques ou de diagnostic sont inutilisables telles quelles en raison de contraintes liées au milieu biologique^{9, 10}. L'encapsulation de ces molécules thérapeutiques ou de diagnostic dans des vecteurs de taille nanométrique est une solution pour acheminer ces molécules vers leur cible thérapeutique *in vivo*. L'encapsulation agit à quatre niveaux différents :

(1) En **protégeant la molécule encapsulée** des différentes barrières biologiques, mais également et plus généralement en la protégeant de l'environnement extérieur (tampon aqueux de stockage dans lequel elle peut se dégrader par exemple).

(2) En **modulant le ciblage** de la molécule d'intérêt par les propriétés de la nanoparticule, objet réputé plus maniable que la molécule thérapeutique. Dans ce cas, ce n'est plus la pharmacologie de la molécule qui gouverne la biodistribution mais la pharmacologie du nano-objet transporteur¹¹. Par exemple, l'encapsulation de petites molécules qui seraient très rapidement éliminées de l'organisme par voie rénale à cause de leur petit poids moléculaire, permet d'augmenter la taille physique des molécules encapsulées donc leur temps de présence dans l'organisme et favorise ainsi leur action thérapeutique. Un second exemple est l'utilisation de la taille nanométrique des nanoparticules pour le ciblage passif des tumeurs (notion plus détaillée dans le sous chapitre suivant)¹². Enfin, une nanoparticule peut être utilisée comme une plateforme sur laquelle des ligands dit « de ciblage » peuvent être greffés (anti-corps, peptides, sucres..) afin d'amener préférentiellement la nanoparticule vers une cible spécifique dans l'organisme.

(3) En **protégeant les tissus sains** des effets toxiques de la molécule grâce au ciblage préférentiel vers les organes cibles.

(4) En **améliorant l'efficacité** de la molécule par des moyens directs ou indirects. Encapsuler une molécule permet de préserver ses propriétés originales en limitant ou diminuant sa dégradation par les fluides biologiques (diminution de la dose); améliorer sa solubilité et moduler sa cinétique *in vivo* (diminution des doses, diminutions des effets toxiques, multi choix du mode d'administration). Concernant le domaine de l'imagerie, le contraste intrinsèque d'une molécule traceur peut être amélioré par son encapsulation. Par

exemple, l'encapsulation de fluorophores organiques dans les lipidots permet d'améliorer leur rendement quantique de fluorescence grâce à une augmentation de la microviscosité locale limitant ainsi les pertes d'énergie par émission non radiative¹³. L'utilisation de nanovecteurs permet également d'acheminer un nombre plus important de traceurs dans une zone spécifique, augmentant le contraste des images.

A.3 Des nanoparticules désignées pour les applications médicales

A.3.1 Trois générations de nanoparticules

Trois générations de nanoparticules pour applications médicales ont été développées, plus communément appelées nanoparticules simples, furtives ou ciblées (Figure 1). Les premiers objets dits « **simples** » tels que les liposomes composés d'une simple bicouche membranaire de phospholipides sont rapidement repérés par le système immunitaire et dégradés par l'organisme. Après l'entrée des nanoparticules dans le sang, les opsonines, incluant les immunoglobulines IgG et IgM, des protéines comme les compléments (C3, C4 et C5), s'adsorbent à la surface des particules et servent de médiateurs dans la reconnaissance des particules par les macrophages (processus appelé opsonisation). D'autres protéines plasmatiques comme l'albumine, la fibronectine et les apolipoprotéines E s'adsorbent à la surface des nanoparticules et jouent le rôle d'opsonines en initiant une réponse phagocytaire par les macrophages. L'adsorption peut se faire par des forces attractives comme des interactions électrostatiques, des interactions de type van der Waal ou des interactions hydrophile / hydrophobe. Afin d'éviter ce phénomène d'opsonisation, des nanoparticules recouvertes d'une « enveloppe » hydrophile composée le plus souvent de polymères tels que le poly-éthylène-glycol (PEG, biocompatible et approuvé par la FDA) ou encore le dextran (polymère saccharidique) ont été développées. L'enveloppe a pour but de limiter l'adsorption des protéines sur la surface des nanoparticules, évitant ainsi la reconnaissance de l'objet par les cellules du système réticulo endothélial (Reticulo Endothelial System « RES » en anglais est un ensemble de cellules qui joue un rôle dans l'épuration de corps étrangers présents dans l'organisme)¹⁴. Les nanoparticules recouvertes de cette enveloppe hydrophile limitant l'adsorption des protéines ont un temps de circulation plasmatique augmenté : ce sont des nanoparticules dites « **furtives** ». Enfin, le besoin d'adressage de la nanoparticule vers une cible spécifique a entraîné le développement de nanoparticules dites « **ciblées** ». Sur la couche furtive de polymères sont

greffées des molécules connues pour interagir avec une cible biologique, par exemple des anti-corps, des sucres ou des peptides¹⁵.

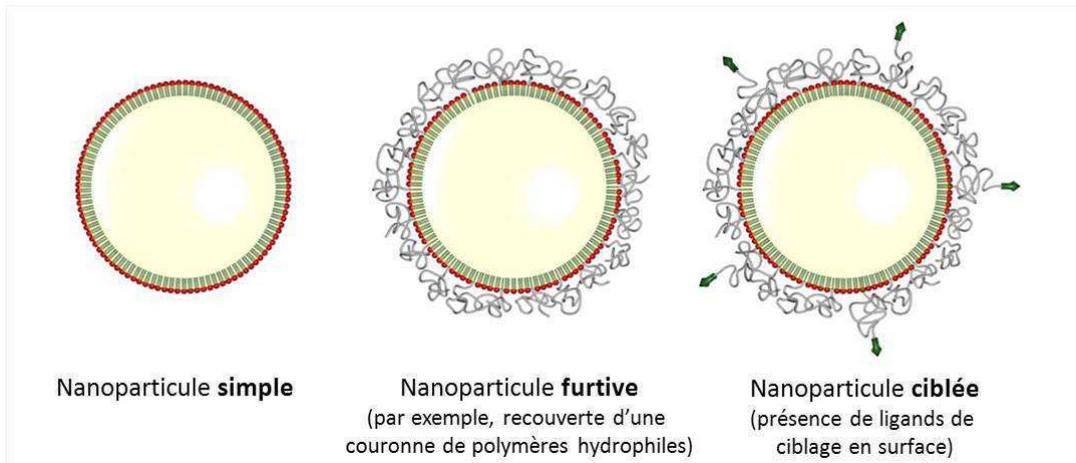


Figure I-1 : Différentes générations de nanoparticules.

A.3.2 Nanoparticule et ciblage passif

En oncologie, la taille nanométrique joue un rôle important dans le ciblage et l'accumulation passive de vecteurs dans les tumeurs. Un bref rappel de la structure des tumeurs est présentée ici.

Au cours du processus tumoral, la cancérogénèse induit une prolifération cellulaire anarchique qui conduit au développement d'une masse tumorale¹⁶. Lorsque la tumeur atteint une taille de 1 à 2 mm de diamètre, elle induit la construction d'un système d'apport sanguin appelé angiogenèse. Cette étape est capitale dans la transition d'une tumeur de stade bénin à un stade malin capable d'envahir et de métastaser les autres organes. L'angiogenèse est régulée par la tumeur elle-même via la sécrétion de facteurs de croissance qui se fixent de manière spécifique à des récepteurs présents à la surface des cellules, induisant la formation de capillaires se développant autour et au sein de la masse tumorale. Ces néovaisseaux qui alimentent la tumeur peuvent également fusionner avec le système vasculaire sain.

Les néovaisseaux tumoraux présentent de nombreux défauts en comparaison des vaisseaux sains en particulier une déficience en pericytes (cellules de Rouget), la formation d'une membrane basale aberrante et une proportion élevée de cellules endothéliales prolifératives. Le débit sanguin est souvent irrégulier, avec la formation de shunts dans les vaisseaux. Les tissus sains, dont les capillaires sont non fenestrés, sont composés d'une

couche simple de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. En revanche, les vaisseaux présents au sein de la tumeur sont de constitution fragile, dû à des jonctions inter-cellulaires endothéliales très faibles, un nombre important de fenestrations et de canaux, et une membrane basale absente ou discontinue¹⁷⁻¹⁹ (Figure 2).

Une pression hydrique élevée est souvent retrouvée dans les tumeurs solides. Cette pression élevée est le résultat direct d'un drainage lymphatique défaillant, dû au fait que la masse tumorale induit une lymphogénèse déficiente^{16, 20, 21}.

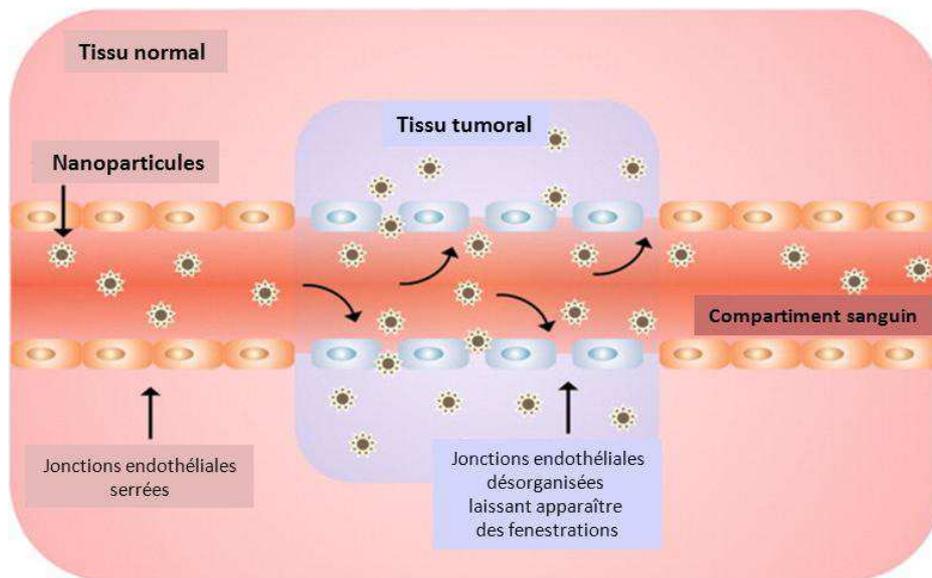


Figure I-2 : Représentation schématique de nanoparticules prenant avantage de l'effet EPR dans les amas tumoraux d'après Prakash²².

L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et la baisse du drainage lymphatique aboutissent à une accumulation « passive » des nanoparticules au sein de la masse tumorale. Il explique en partie le succès de l'utilisation de nanoparticules dans la détection et le traitement du cancer et repose sur deux caractéristiques physiques : la taille nanométrique de la nanoparticule et la disrégularité des néovaisseaux tumoraux. Ce ciblage dit passif est appelé **effet EPR** (Enhanced Permeation and Retention en anglais)^{16, 20, 23-25}.

La durée élevée de circulation sanguine des nanoparticules est mise à profit pour augmenter leur probabilité de passer les fenestrations de l'endothélium tumoral et s'accumuler au sein de la tumeur. La présence d'une couronne de PEG à l'extérieur de la nanoparticule lui permet d'être furtive vis-à-vis du système réticulo endothélial et accroît son temps de circulation plasmatique. Les nanoparticules furtives dont la taille est inférieure

à environ 200 nm peuvent donc s'accumuler facilement dans des tumeurs bien vascularisées via des fenestrations au sein de l'endothélium, s'y accumuler et être retenues dans l'interstitium tumoral pendant une période prolongée.

Pour récapituler, quatre facteurs expliquent l'accumulation d'une nanoparticule dans une tumeur, qui se fonde sur l'effet EPR : (1) la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique élevée du nanosystème ; (2) la perméabilité des vaisseaux ; (3) la taille nanométrique (typiquement 5 – 200 nm) ; et (4) le faible drainage lymphatique au sein de la tumeur.

A.3.3 Nanoparticule et ciblage actif

Le ciblage passif par l'effet EPR dépend des caractéristiques physiques de la tumeur ainsi que de la taille et du temps de circulation prolongée du nanosystème dans le sang. L'effet EPR varie beaucoup d'une espèce de tumeur à l'autre. A contrario, le ciblage dit actif fait intervenir des ligands, greffés en surface des nanoparticules, qui ont pour objectif d'amener de manière préférentielle la nanoparticule vers sa cible. Des peptides, des anticorps ou encore des sucres peuvent être utilisés. Ils permettent une *reconnaissance* par les récepteurs exprimés à la surface des cellules, et éventuellement l'*endocytose* des nanoparticules. Dans le cas des nanoparticules PEGylées, les ligands de ciblage sont souvent greffés sur les extrémités des chaînes de polymères présentes à la surface des nanoparticules²⁶, afin que le ligand soit présenté au-delà de la couronne de PEG. Il risquerait sinon d'être masqué ou incorporé dans la couche de polymère, ce qui rendrait sa présence inutile.

Comme exemple de récepteurs très étudiés pour les applications en oncologie, les récepteurs aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont surexprimés dans les néovaisseaux pendant l'angiogenèse²⁷⁻²⁹. La séquence peptidique RGD reconnaît le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et cible les zones tumorales surexprimant les récepteurs à cette intégrine. Une autre molécule utilisée pour le ciblage en oncologie est le folate (dérivé de la vitamine B9) en raison des cancers, notamment ovariens, qui sur-expriment ses récepteurs³⁰ (Figure 3).

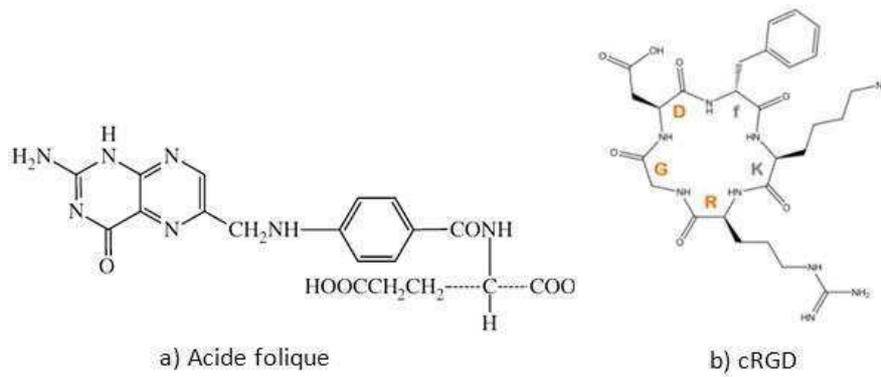


Figure I-3 : Exemples de structure de ligands fréquemment utilisés pour fonctionnaliser les nanoparticules et favoriser leur ciblage vers les cellules cancéreuses. a) L'acide folique est un ligand utilisé par exemple pour cibler les récepteurs folate des tissus ovariens³¹. b) Le peptide cyclique cRGD a été utilisé pour cibler les intégrines $\alpha v\beta 3$, qui sont surexprimées dans les vaisseaux tumoraux^{32, 33}.

B. Développement de nano-objets

Ce sous-chapitre a pour but de présenter de manière rapide les différents types de nanoparticules existant, qui se répartissent en trois catégories : les nanoparticules inorganiques, les nanoparticules polymériques et les systèmes lipidiques avec la description de chaque type de nanoparticule, suivi des données qui les caractérisent *in vivo*.

B.1. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules métalliques, comme les nanoparticules d'oxyde de fer, les nanostructures d'or ou encore les nanoparticules de semi-conducteur (notamment celles possédant des propriétés d'émissions de fluorescence : les « quantum dots »), sont des nano-objets possédant des propriétés optiques ou magnétiques intrinsèques intéressantes pour les applications médicales (Figure 4).



Figure 1-4: Représentation schématique des nanoparticules d'or, d'oxyde de fer et des boîtes quantiques^{34,35}

Le Tableau 1 liste le type de nanoparticules inorganiques étudiées à ce jour, leurs principales caractéristiques, leurs données *in vivo* et leur stade d'avancement dans le transfert clinique.

Les nanoparticules inorganiques			
Nature	Caractéristiques / Formulation	Données <i>in vivo</i>	Transfert clinique
Nanoparticules d'or ³⁶	<p>Cœur d'or ou noyau de silice recouvert d'une fine pellicule d'or,</p> <p>Fonctionnalisation par des thiolates,</p> <p>Absorbance à une λ spécifique de la lumière, dépendante de l'épaisseur de la coquille (proche IR) ou du diamètre du cœur (bande de plasmon visible*).</p>	<p>- Taille de 5 à 25 nm³⁷,</p> <p>- 10 nm : répartition non spécifique sang, foie, rate, cœur, rein, testicules, cerveau, poumon, excrétion urinaire³⁸,</p> <p>- 25 nm : augmentation du taux de globules blancs, accumulation dans le foie dans la rate³⁹,</p> <p>- Toxicité : signal dans le foie et la rate jusqu'à 2 mois.</p>	<p>Inertie du métal, inoxydable, biocompatible</p> <p>Proche du stade clinique</p>
Oxydes de fer ^{40, 41}	<p>SPIO* : diamètre de 50 nm, détection des lésions du foie et pathologie du tube digestif,</p> <p>USPIO** : diamètre < 50 nm, détection des cancers, des maladies dégénératives, inflammatoires et cardiovasculaires.</p> <p>Oxyde de fer encapsulé dans coquille de dextran pour augmenter la biocompatibilité^{43, 44}.</p>	<p>- Taille de 20 à 110 nm</p> <p>- Disparition rapide du système sanguin ($t_{1/2}$ vie < 1h),</p> <p>- < 20 nm, se distribuent dans le foie, les reins, la rate⁴²,</p> <p>- > 20 nm, accumulation majeur dans la rate puis le foie et les poumons,</p> <p>- Toxicité : signal persistant dans le foie jusqu'à 17 jours après injection⁴².</p>	<p>Certaines formulations approuvées par l'EMA comme agent de contraste pour l'IRM</p> <p>Stade clinique</p>
Quantum dots (boîtes quantiques) ⁴⁵	<p>Nanocristaux semi-conducteurs, propriétés uniques dues à leurs tailles nanométriques (2 - 10 nm) et la prédominance des effets quantiques à cette échelle,</p> <p>Spectre de l'UV au NIRF modulée par la taille et la composition de l'objet,</p> <p>Cœur recouvert d'une coque de sulfure de zinc afin de protéger la surface et stabiliser les propriétés optique,, couche de polymère, ou de ligands organiques</p> <p>Couples : cadmium / selenium, cadmium / tellure, indium / arsenic, indium / phosphore</p>	<p>- Premiers organes d'accumulation: sang, poumons, foie⁴⁶,</p> <p>- Puis duodénum, signaux constants dans le foie, les reins et la rate⁴⁷⁻⁴⁹.</p> <p>- Toxicité : difficulté à être éliminé de l'organisme (signaux constants dans le foie de 1 h à 168 h après injection)^{50, 51},</p> <p>- Diminution de la toxicité: (1) synthèse de QD de taille est < à 5 nm, éliminée de manière rénale⁵². (2) greffage de surfactants PEGylés⁴⁹, (3) encapsulation des QD dans des émulsions, micelles de co-polymères, micelles de phospholipides⁴⁸.</p>	<p>Agent d'imagerie très performant, l'utilisation de métaux lourds ou d'élément toxique sont des freins pour le développement clinique</p> <p>Stade de développement</p>

Tableau I-1 : Description des nanoparticules d'or, d'oxyde de fer et des boîtes quantiques

*Bande de plasmon = bande d'absorption optique du matériau.

Nous pouvons donc conclure que d'une manière générale, les nanoparticules inorganiques sont caractérisées par leur accumulation dans le foie, la rate et parfois les reins suivant leur taille (les nanoparticules < 5 nm sont éliminées par voie rénale). Pour l'ensemble de ces composés, la non élimination des particules et ce jusqu'à 2 mois après injection reste un handicap majeur pour une utilisation clinique.

B.2. Les nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques sont utilisées essentiellement pour leur rôle de transporteur. En effet, contrairement aux nanoparticules inorganiques, elles ne possèdent pas de propriétés optiques ou magnétiques intrinsèques. Ces nanoparticules sont des systèmes de cargos dans lesquels sont encapsulées des molécules d'intérêt, que ce soit des agents de contraste pour de l'imagerie, des molécules thérapeutiques pour la délivrance de médicaments ou une combinaison des deux, dans une approche théranostique. La nanovectorisation a pour but dans ce cas de modifier la pharmacologie du produit encapsulé et de faciliter son adressage dans l'organisme ou encore de réduire sa toxicité.

Deux grandes familles de nanoparticules organiques existent. La première regroupe l'ensemble des **nanoparticules à base de polymères naturels ou de synthèse** comme les micelles polymériques ou les nanoparticules de PLGA (acide poly(lactiqueglycolique)) (Figure 5).

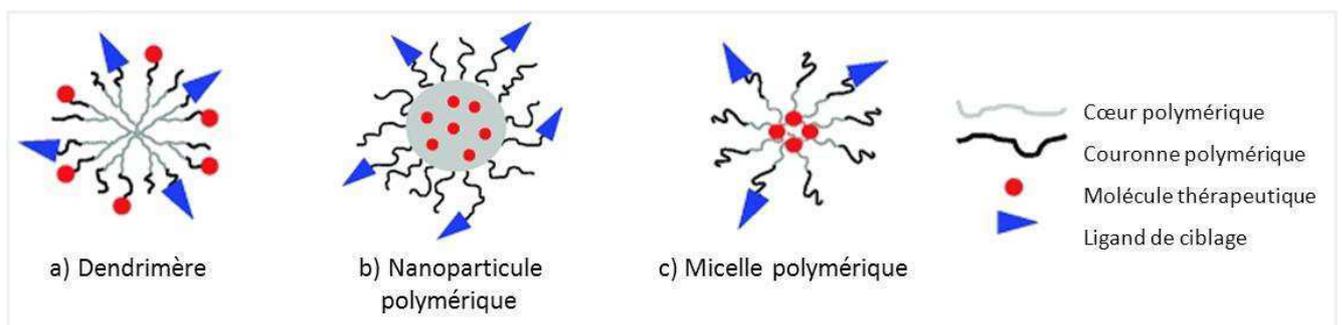


Figure I-5 : Représentation schématique de 3 exemples de nanoparticules à base de polymère⁵³.

La deuxième représente l'ensemble **des systèmes lipidiques** qui sont des systèmes organiques composés de phospholipides, glycérides, cholestérol ou de tout autre corps gras biocompatible et biodégradable (Figure 6). Peuvent être cités dans cette catégorie les liposomes, les nano-émulsions, les nanocapsules, les nanosphères et les nanoparticules lipidiques solides (SLN).

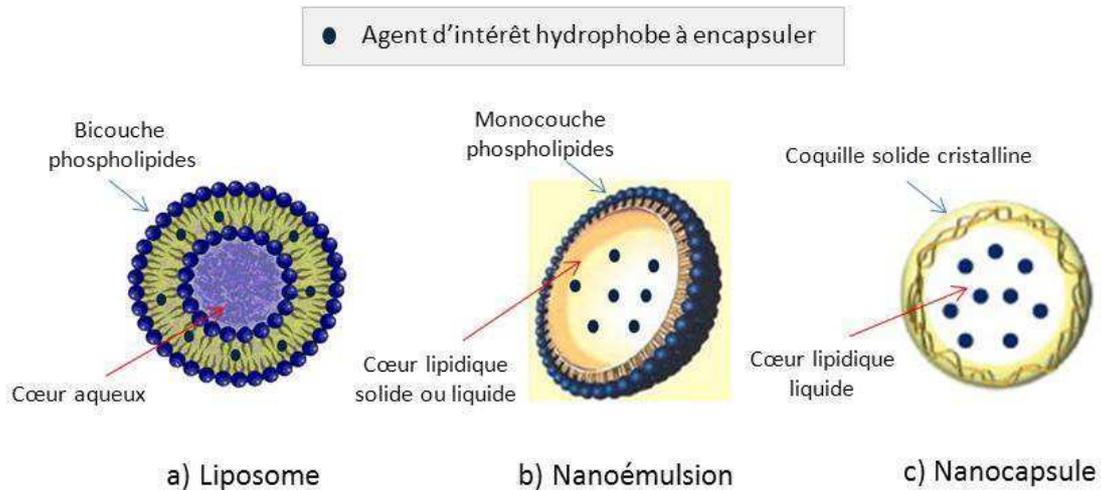


Figure I-6 : Représentation schématique de différents exemples de particules lipidiques.

Le Tableau 2 suivant détaille les vecteurs les plus aboutis déjà utilisés en clinique aujourd'hui (polymère, liposome), quelques caractéristiques de formulations et leur devenir *in vivo*.

Les nanoparticules organiques			
Nature	Caractéristiques / Formulation	Données <i>in vivo</i>	Transfert clinique
Nanoparticules polymériques	<ul style="list-style-type: none"> - De source naturelle^{54, 55} (chitosan, gélatine, alginate) ou synthétiques⁵⁶ (PLA, PLGA, PCA, PCL*), - 10 nm < diamètre < et 1 µm, - Systèmes vésiculaires : nanocapsules⁵⁷, - Systèmes matriciels : nanosphères^{58, 59}, - Principal avantage : contrôle du relargage, chimie de surface - La présence de PEG à la surface permet de diminuer l'adsorption des protéines / La présence de Tween® 80 permet le passage de la barrière hémato-encéphalique⁶². 	<ul style="list-style-type: none"> - Biodistribution variable suivant le poids moléculaire (< 12 kDa, accumulation dans le rein; > 50 kDa, accumulation dans le foie)⁶⁰, - Les nanoparticules de PLGA de diamètre entre 60 et 120 nm, s'accumulent dans le foie et la rate⁶¹, - La PEGylation permet d'augmenter le temps de circulation sanguine mais ne change pas les organes d'accumulation, - Adsorption de protéines plasmatiques à la surface après injection (IgG, albumine, apolipoprotéines E, partie C3 du complément)⁶³⁻⁶⁵. 	<p><i>Point négatif :</i> utilisation de solvants organiques pendant la préparation,</p> <p><i>Point positif :</i> l'utilisation de polymères biodégradables approuvés par l'EMA** (PLGA) permet d'envisager un transfert clinique proche,</p> <p>Un produit sur le marché à ce jour, le Lupron-Depot® (cancer de la prostate /sein).</p>
Les liposomes	<ul style="list-style-type: none"> - Vésicules sphériques composés d'une bicouche lipidique naturelle (phospholipides, phosphatidyléthanolamine d'œuf, lécithine de soja) ou synthétique (dioléoylphosphatidyléthanolamine)^{66, 67, 68}, - La structure se veut similaire à celle de membranes cellulaires, - Rigidification de la membrane de phospholipides par l'ajout de cholestérol pour limiter le relargage du contenant^{74, 75}, - Plusieurs structures (Figure 7)***: vésicules multilamellaires MLV (> 500 nm), petites vésicules SUV unilamellaires, (20 nm < diamètre < 100 nm) et grand vésicules unilamellaires LUV (> 100 nm)⁶⁹. 	<ul style="list-style-type: none"> - Charge neutre : toxicité plus faible^{68, 69}, - Les liposomes simples s'accumulent dans le foie et la rate sans être retenus par les autres organes, - La PEGylation des liposomes augmente le temps de circulation plasmatique (48 h versus 4 h) mais ne modifie pas la biodistribution⁷⁰⁻⁷³. - Interaction des liposomes avec les cellules suivant 4 mécanismes : (1) endocytose par les cellules du RES, (2) adsorption à la surface cellulaire par des interactions faibles ou spécifiques, (3) fusion de la membrane avec la membrane de la cellule, (4) transfert des lipides sans association ni relargage du contenant⁶⁹. 	<p>Plusieurs produits actuellement sur le marché :</p> <p>Ambisone® (liposome-amphotericine B) et Myocet® (liposome-doxorubicine) par exemple pour les liposomes simple,</p> <p>Doxil® ou Carlyx® (liposome-PEG-doxorubicine) pour les liposomes furtifs.</p>

Tableau I-2 : Description des nanoparticules polymériques et des liposomes

*PLA: poly(acide lactique), approuvé pour l'injection ou pour l'ingénierie tissulaire par l'EMA ; PGA : poly(acide D,L-glycolique) ; PLGA : copolymère glycolique / lactique⁷⁶ ; PCA : le poly (cyanocrylate) ; PCL : le poly (ϵ -caprolactone)⁶³

** EMA : European Medicines Agency équivalent Européen de la FDA

*** Les liposomes peuvent être préparés par simple agitation, par sonication (soit avec un embout à sonication directement plongé dans la solution ou par un bain de sonication), par inversion de phase ou par lyophilisation à partir de liposomes préformés. Suivant le type de procédé utilisé, il pourra être obtenu des vésicules multilamellaires (MLV en anglais pour « Multiple Lamellar Vesicles ») d'une taille > 500 nm, des petites vésicules unilamellaires (SUV en anglais pour « Small Unilamellar Vesicles ») de diamètres compris entre 20 et 100 nm contenant une seule bicouche de phospholipides et enfin de grands vésicules unilamellaires (LUV en anglais pour « Large Unilamellar Vesicles ») de taille > 100 nm et étant de composition très hétérogène⁶⁹ (Figure 7).

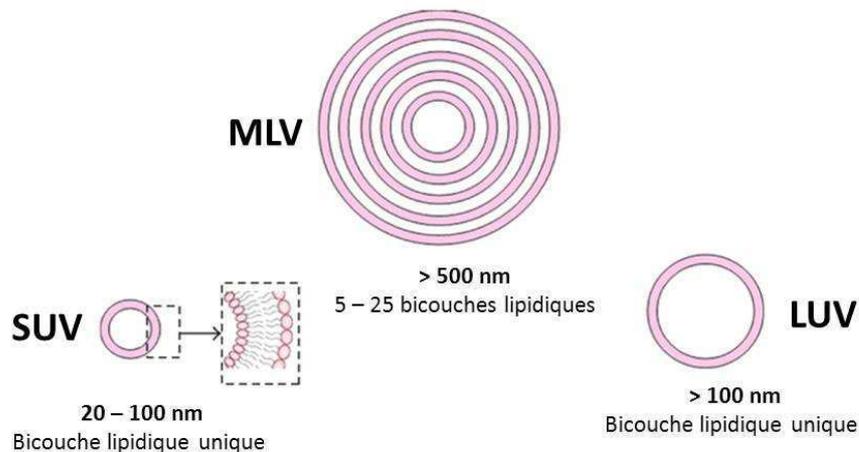


Figure I-7 : Représentation des différents systèmes liposomaux⁷⁷.

Il est à noter que les liposomes ont été les premiers nanoobjets à être marqués radioactivement pour réaliser de l'imagerie nucléaire (comme la TEMP: Tomographie à Emission MonoPhotonique, le TEP : Tomographie à Emission de Positons)⁷⁸. Plusieurs techniques de radiomarquage ont été développées : (1) l'incubation des liposomes avec le radioligand (aboutissant généralement à un couplage instable) ; (2) l'encapsulation du radioligand dans la phase aqueuse, et (3) la conjugaison du ligand à un chélateur lipidique

incorporé dans la bicouche du liposome préformé^{79, 80}. Il peut être cité pour l'¹¹¹In, le chélate DTPA (l'acide pentaacétique diéthylènetriamine) conjugué à la phosphatidyléthanolamine (PE). L'ensemble de ces méthodes ont permis le suivi *in vivo* des liposomes après injection, de manière non invasive.

B.3. Les systèmes lipidiques depuis les années 2000

De nombreux nanovecteurs dont le cœur est à base de lipides ont vu le jour depuis les années 2000. Ils se distinguent des liposomes par leur cœur lipidique hydrophobe alors que ces derniers ont un réservoir aqueux pour cœur. Les deux types de particules ont une coquille de surfactants le plus souvent des phospholipides, en double couche (ou plus) pour les liposomes, monocouche pour les particules lipidiques. La Figure 8 et le Tableau 3 décrivent les nanoparticules solides lipidiques (SLN), les nanoparticules lipidiques structurées (NLC) et les nanocapsules lipidiques (LNC) développées par l'équipe de JP. Benoit. Elles présentent toutes des similarités mais également des différences de compositions et de structure avec les lipidosomes.

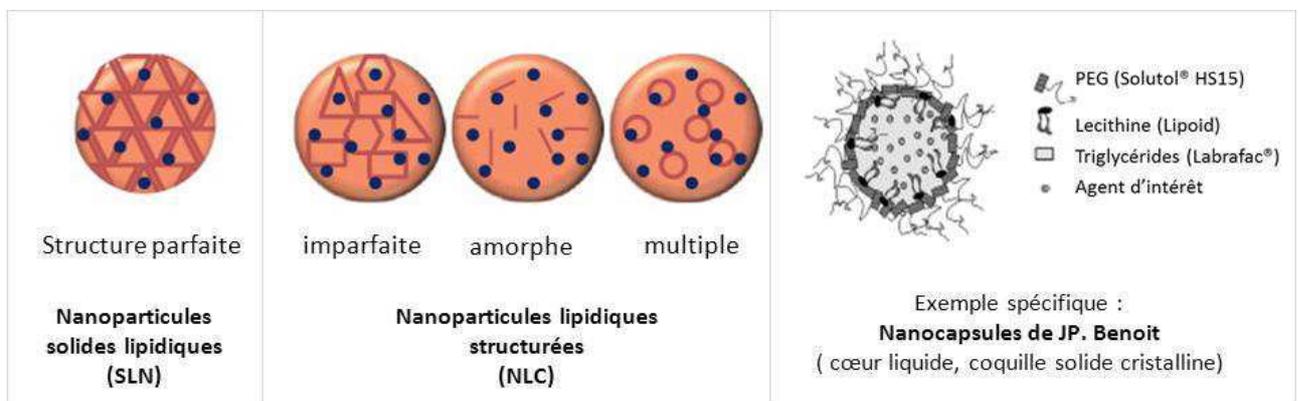


Figure I-8 : Représentation schématique d'une nanoparticule solide, d'une nanoparticule lipidique nanostructurée et des nanocapsules développées par JP. Benoit⁸¹.

Les nanoparticules organiques : les systèmes lipidiques depuis les années 2000			
Nature	Caractéristiques / Formulation	Données <i>in vivo</i>	Transfert clinique
Nanoémulsions lipidiques ⁸²	- Développées dans les années 50 pour la nutrition parentérale ⁸³ (utilisation d'huile, de phospholipides et d'acide gras), détournées dans les années 2000 pour l'encapsulation de molécules hydrophobes ⁸⁴⁻⁸⁶ .	- Dû à leur similarité de structure , la biodistribution de ces différentes nanoparticules est proche, - 25 nm < diamètre < 250 nm,	Intralipid® , Oliclinomel® , Clinoleic® , pour la nutrition parentérale Diazepam-lipuro® , pour les traitements psychiatriques
Les nanoparticules lipidiques solides (SLN)	- Cœur composé de lipides à l'état solide , contrairement aux huiles généralement utilisées. - Meilleur contrôle du relargage du principe actif (baisse de la mobilité moléculaire) ⁸⁹⁻⁹¹ .	- Potentiel zêta variable suivant le type de phospholipides utilisés (entre -20 mV et -30 mV), - Nanocapsules PEGylées :	<i>En développement</i>
Les vecteurs lipidiques nanostructurés (NLC)	- Possède un cœur amorphe contrairement aux SLN, dont le cœur cristallin est organisé. Un cœur amorphe limite la fuite de composés encapsulés lors du stockage en milieu aqueux ⁹² .	$t_{1/2}$ vie plasmatique de 45 min, accumulation cœur, foie et rate (24 h) ⁸⁷ , - SLN (85 nm, -20 mV) peuvent franchir la BHE, accumulation foie, rate, poumons (48 h) ⁸⁸ ,	<i>En développement</i>
Les nanocapsules lipidiques ⁹³⁻⁹⁵ (LNC)	- Cœur huileux, entouré par une membrane semi-rigide de tensioactifs - Taille < 100 nm, stabilité sur 18 mois	- $t_{1/2}$ vie plasmatique prolongé pour les NLC par rapport aux SLN (11 h contre 6,7 h), accumulation principale dans le foie, faible signal dans poumons, cœur, rate et reins ⁷¹ .	<i>En développement</i> (encapsulation d'anti-cancéreux) ^{94, 96}

Tableau I-3 : Description des nanoémulsions, des nanoparticules lipidiques solides, des vecteurs lipidiques nanostructurés et des nanocapsules lipidiques.

B.4 Conclusion

Beaucoup de nanoparticules inorganiques sont utilisées pour des applications médicales (nanoparticules d'argent, d'or, d'oxyde de fer, quantum dots). Ces nanoparticules sont très stables et donc difficiles à métaboliser, entraînant des temps de rétention importants dans l'organisme et donc un risque de toxicité potentiellement élevé. De nouvelles générations de nanoparticules préparées en utilisant des polymères naturels (gélatine, chitosan), des composés biodégradables (huile, cire, cholestérol) ont été

développés. La modification de la surface des nanoparticules est souvent réalisée pour modifier ses propriétés de surface et donc son profile ADME (Administration, Distribution, Métabolisation et Elimination). Par exemple, les nanoparticules métalliques sont généralement enrobées par un polymère naturel ou synthétique pour augmenter leur biocompatibilité, et les quantum dots peuvent, quant à eux, être incorporés dans des micelles lipidiques. Concernant les vecteurs lipidiques, de manière générale, le foie est le principal organe d'accumulation après injection intra-veineuse. Ils y sont retenus par les cellules de Kupffer, alors que les hépatocytes et les cellules endothéliales jouent un second rôle (faible internalisation). Généralement, l'accumulation dans la rate est également très élevée (la zone marginale et la pulpe rouge des macrophages sont des zones d'accumulations majeures), mais peut être réduite en recouvrant la nanoparticule d'une couche polymérique réduisant sa captation.

Ces nanoparticules, suivant leur composition et leur devenir *in vivo*, sont des vecteurs de choix pour le ciblage des zones tumorales. En effet, leur plateforme est idéale pour greffer ou encapsuler des molécules thérapeutiques ou à visée diagnostic. Le paragraphe suivant présente un bref état de l'art de l'avancée de l'imagerie de fluorescence et des systèmes actuellement développés à ce jour pour l'imagerie des tumeurs à l'aide de nanoparticules.

C. Nanoparticule et Imagerie de fluorescence

Si certaines nanoparticules inorganiques peuvent être suivies par des techniques d'imagerie telles que l'IRM (oxydes de fer) ou la spectrométrie par torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse (« ICP-MS ») (quantum dots, particules métalliques), les particules organiques sont plus difficiles à suivre et nécessitent leur marquage par un traceur, par exemple un radionucléide. L'imagerie de fluorescence, associée aux techniques de microscopie, est une technique très couramment utilisée pour déterminer les fonctions des protéines, l'expression des gènes ou encore suivre des cellules. Elle permet également d'évaluer le devenir *in vivo* de nanoparticules, organiques comme inorganiques.

A.1 Intérêt de l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge

L'imagerie de fluorescence *in vivo* est en pleine expansion depuis une dizaine d'années, grâce au développement de dispositifs d'imagerie per-opératoire et de systèmes d'imagerie optique très sensibles qui permettent d'explorer les tissus plus profonds⁹⁷⁻¹⁰⁸. L'imagerie de fluorescence *in vivo* présente certains défis techniques (comme l'absorption des photons) qui ont pu être résolus en travaillant dans le proche infrarouge (NIRF en anglais pour « Near-InfraRed Fluorescence »), à savoir les longueurs d'ondes comprises entre 650 nm et 900 nm. En effet, dans cette fenêtre optique, l'absorption et la diffusion de la lumière par les tissus est réduite, et l'autofluorescence minimale^{98, 109, 110}. La lumière infrarouge peut traverser la peau sans endommager les tissus, avec une autofluorescence minimale par l'eau, des lipides, ou des tissus chromophores contenant de grandes quantités d'oxy- et de désoxy- hémoglobine ou encore de mélanine. En effet, plus l'autofluorescence est faible, meilleure est le rapport signal sur bruit et le contraste des images (ou la profondeur de tissus que l'on pourra explorer).

L'imagerie de fluorescence a été surtout utilisée à l'origine pour réaliser des marquages histologiques ou cellulaires à des longueurs d'ondes comprises entre 350 nm et 650 nm, en utilisant des fluorophores de type fluorescéine ou rhodamine. L'association d'une modalité d'imagerie fonctionnelle donnant des informations anatomiques comme la TEMP, la TEP ou encore l'IRM avec l'imagerie de fluorescence, s'est également développée pour suivre le devenir de nanoparticules *in vivo*¹¹¹. La fluorescence dans le domaine visible, représente surtout une modalité supplémentaire pour l'étude des biopsies ou des tissus *ex vivo* ou pour confirmer une structure cellulaire¹¹² découlant des données anatomiques. Cependant, les techniques d'imagerie nucléaire étant coûteuses tant pour l'achat du matériel (compter 1 million d'euros pour une caméra TEP) que par les traceurs qui leur sont associés (compter 500 euros pour une synthèse de ¹⁸F-FDG), l'imagerie de fluorescence apparaît comme une modalité à part entière pour obtenir des informations directement *in vivo*. Les fluorophores organiques absorbant / émettant dans le proche infrarouge sont souvent hydrophobes, et enclins à l'agrégation en milieu aqueux, ce qui éteint leur signal de fluorescence¹¹³. De faible poids moléculaire, ils présentent également un temps de vie plasmatique très court laissant peu de chance au fluorophore de s'accumuler dans le tissu souhaité. L'utilisation de nanoparticules pour améliorer la stabilité et modifier la pharmacocinétique de ces fluorophores est donc un recours de choix pour le design de

nanosondes fluorescentes pour les applications *in vivo*. Le marquage de nanoparticules par des fluorophores organiques peut également fournir avec des techniques d'imagerie peu contraignantes des informations sur leur devenir *in vivo*, de l'échelle du petit animal jusqu'à l'échelle subcellulaire, avec un même traceur.

A.2 Nanoparticules et imagerie *in vivo* de fluorescence

A.2.1. Modalité d'incorporation d'un fluorophore à un nanovecteur

Le fluorophore peut être localisé à différents endroits dans la nanoparticule. En effet deux ou trois choix de localisation sont possibles suivant le type de plateforme choisie. Le fluorophore peut se trouver **conjugué à la surface de la nanoparticule**, en contact avec l'environnement avec un greffage le plus souvent réalisé de manière covalente grâce à la présence de résidus d'acide aminés ou de la partie terminale d'un polymère. La conjugaison implique l'utilisation d'une chimie de couplage et le rendement de greffage est dépendant du nombre de fonctions disponibles pour la réaction¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Le fluorophore peut être inclus dans la coquille de la nanoparticule si elle en possède une (comme la bicouche de phospholipides des liposomes), ou si elle possède des propriétés amphiphiles (comme l'utilisation de lipoprotéines^{117, 118}). Ce mode d'incorporation, appelé **intercalation**, est de réalisation facile via une incubation des deux composants¹¹⁹⁻¹²¹.

La dernière technique, appelée **encapsulation**, consiste à incorporer au cours de la synthèse le fluorophore dans le cœur de la nanoparticule. Ce procédé permet d'incorporer un grand nombre de fluorophores dans le cœur du vecteur, et de les protéger de l'environnement extérieur^{109, 122-125}.

Un double marquage fluorescent peut être réalisé afin d'évaluer la dissociation de l'objet, avec généralement un greffage par liaison covalente d'un fluorophore hydrophile sur la coquille de la nanoparticule et l'encapsulation d'un second fluorophore hydrophobe dans son cœur. Il est nécessaire d'avoir une différence suffisante dans les longueurs d'onde d'émission et d'absorption entre les deux fluorophores afin d'obtenir des signaux distincts¹²⁶.

Comme pour les nanovecteurs à visée thérapeutique, deux familles de nanoparticules peuvent être distinguées pour le design de nanosondes dédiées à l'imagerie de fluorescence : (1) les nanoparticules à base de polymère comme les micelles^{109, 112, 127, 128}, les

systèmes polymériques^{125, 126, 129-133} notamment à base de PLGA¹³⁴⁻¹³⁶ ou de dextran¹³⁷, les polymersomes^{126, 138-142}, ou encore les dendrimères^{115, 122-124}, et (2) les nanoparticules lipidiques comme les vecteurs à base de lipoprotéines^{117, 118, 143, 144}, les liposomes^{111, 121, 145}, les micelles à base de lipides^{113, 116} ou encore les nanoparticules solides lipidiques¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

A2.2. Les différents systèmes en développement

De manière générale, les systèmes polymériques, le plus souvent synthétiques, présentent l'avantage de structures chimiquement bien contrôlées et bien définies. Suivant la structure, le fluorophore peut être chimiquement conjugué à la surface de la nanoparticule, ou incorporé dans son cœur¹²⁹.

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'hydrophobicité du fluorophore, donné par son logP (le LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. $\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{Oct}}/C_{\text{eau}})$; il permet de définir le caractère hydrophile ou lipophile du composé ; plus le logP est élevé, plus le composé sera hydrophobe). En effet, des colorants amphiphiles comme le NileRed (logP = 3,8) présentent une élimination rapide de la circulation sanguine après injection *in vivo* du système dû au phénomène appelé « burst release », à savoir une sortie rapide du produit hors de l'objet, tandis que des fluorophores comme le DiR (logP = 17,4) présentent un signal stable dans le sang jusqu'à 6 h après injection, favorisant son accumulation dans une zone tumorale¹³⁴. Cet effet a été décrit par l'équipe de Tong qui a couplé le fluorophore Cy5 au PLA, et incorporé le tout dans des nanoparticules polymériques, réduisant le relargage de l'agent fluorescent dans les milieux biologiques¹³⁵. Des systèmes amphiphiles sont également en développement pour encapsuler simultanément des fluorophores lipophile et hydrophile comme l'ICG¹³² ou l'IR820¹³³.

Le principal avantage des nanoparticules naturelles ou issues de composés présents dans la nature, est avant tout leur biodégradabilité et leur biocompatibilité (le risque d'immunogénicité est à contrôler). En effet, les composés utilisés pour élaborer ces systèmes sont naturels (utilisation de lipides, d'huile, de triglycérides, de protéines ou de virus) et sont potentiellement non immunogènes et biodégradables¹¹⁷ (Figure 9). Une

stratégie développée est l'utilisation d'apolipoprotéines naturelles, type LDL (Low Density Lipoproteins) ou HDL (High Density Lipoprotein) et leur fonctionnalisation par des fluorophores pour le diagnostic tumoral ou la détection de ganglions sentinelles¹¹⁸. L'utilisation de bactériophages¹¹⁴ dont la surface est revêtue d'une couche épaisse de protéines, présente de nombreux groupes amines disponibles pour la conjugaison de fluorophores (environ 400 – 500 / bactérie). La bactérie est alors utilisée comme une nanoplateforme présentant à sa surface, par exemple, un fluorophore sensible au pH (Hcy-646) et en son cœur un fluorophore non pH-dépendant (Cy5)¹¹⁴. En effet, un déséquilibre acido-basique est observé dans les zones tumorales, ce type de système permet de mettre en évidence l'hypoxie tumorale via la variation du signal du fluorophore pH-dépendant, un second fluorophore permettant la localisation de la tumeur.

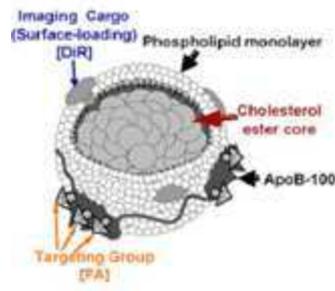


Figure I-9. Préparation d'un nanosystème à base de LDL greffé avec du folate et comportant un fluorophore proche infrarouge, le DiR, en son cœur.

La localisation du fluorophore dans la membrane ou le cœur de la nanoparticule permet de laisser des fonctions réactives à l'extérieur du système pour réaliser des greffages de peptides ou d'anticorps afin de réaliser un ciblage spécifique de la tumeur (voir sous-chapitre A.4).

D. Les nanoparticules lipidiques développées au CEA : « Lipidots »

Depuis 7 ans, le LCMI, Laboratoire de Chimie des Microsystèmes et Interfaces (anciennement LFCM, Laboratoire de Fonctionnalisation, Chimie et Microsystèmes) développe un système de nanoparticules appelées lipidots™. Ces nanovecteurs ont été imaginés dans un premier temps pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles^{150, 13, 148} pour créer des agents de contraste fluorescents performants, puis ont vu ensuite leur domaine d'application s'étendre à la délivrance de médicaments¹⁵¹. Ce système est à présent envisagé pour construire des nanoparticules destinées à l'imagerie multimodale, notamment l'imagerie nucléaire alliée à l'imagerie de fluorescence. Le mot lipidot sera décliné au féminin dans ce mémoire, pour désigner la nanoparticule.

D.1. Le système des nanoparticules lipidiques : Lipidots

Cette nanoémulsion, fabriquée par ultrasons, est composée d'un cœur lipidique, mélange de mono-, di- et triglycérides à longues chaînes (C_{16} – C_{18} principalement, Figure 10), stabilisé par une monocouche de surfactants amphiphiles composée de phospholipides (lécithine de soja, dénomination commerciale Lécithine S75), et de surfactants PEGylés (stéarate de PEG2000, dénomination commerciale MyrjS40) (Figure 11). Ces derniers confèrent notamment une grande stabilité colloïdale au système^{152, 153}.

Composition de l'huile de soja		Composition de la Suppocire®NC	
Nature des acides gras	Pourcentage	Longueur de la chaîne carbonée des glycérides	Pourcentage
C_{16}	8,0 à 13,3 %	C_8	0,1 à 0,9 %
$C_{16} : 1$	< 0,2 %	C_{10}	0,1 à 0,9 %
C_{18}	2,4 à 5,4 %	C_{12}	25 à 50 %
$C_{18} : 1$	17,7 à 26,1 %	C_{14}	10 à 24,9 %
$C_{18} : 2$	49,8 % à 57,1 %	C_{16}	10 à 24,9 %
$C_{18} : 3$	5,5 à 9,5 %	C_{18}	10 à 24,9 %

Figure I-10 : Composition des chaînes grasses présentes dans le cœur des lipidots.

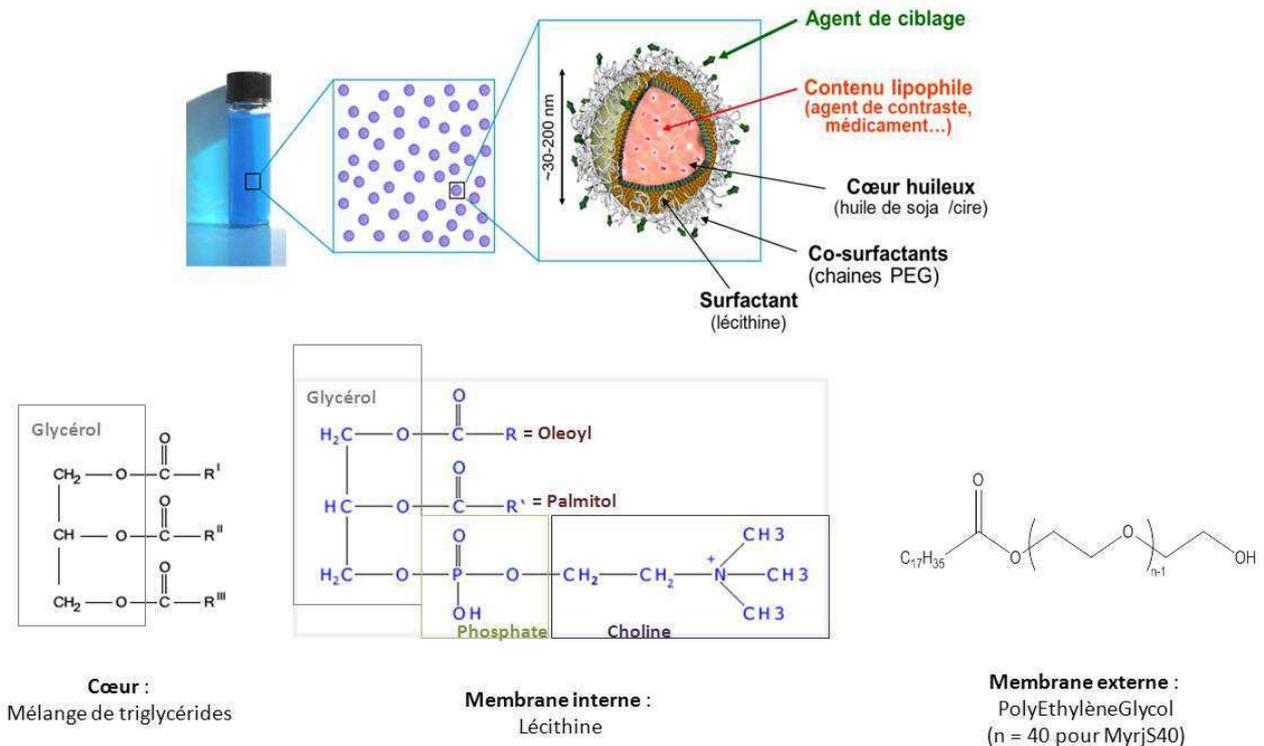


Figure I-11: Représentation schématique de la nanoparticule.

La taille des nanoparticules obtenues est modulable. En effet, en modifiant les quantités de chacun des ingrédients, il est possible de synthétiser de manière reproductible des nanoparticules de 30 nm à 120 nm de diamètre. Il est également possible de moduler les propriétés du cœur en modifiant le ratio cire / huile afin d'ajuster sa viscosité¹⁵². La surface spécifique des lipidots est de 66 m² / nanoparticule, son poids moléculaire d' ≈ 8000 kDa et sa masse de 1,32 10⁻⁸ ng / particule. Les lipidots sont stables plus de 1 an à température ambiante, et résistent à des pH compris entre 2 et 11¹⁵².

La lipidote est une nanoparticule biocompatible (l'ensemble des produits utilisés dans la formulation sont autorisés par les autorités de santé), biodégradable, dont tous les composés, principalement à base de lipides, peuvent être éliminés par l'organisme. Le cœur hydrophobe permet d'encapsuler des composés hautement lipophiles, qui ne pourraient pas être administrés sous forme libre par voie intraveineuse. La surface à base de surfactants PEGylés permet d'envisager les greffages de molécules ou de biomolécules d'intérêt à l'extérieur des lipidots, comme des peptides¹⁵⁴ ou des anticorps.

D.2 Connaissance préliminaire du système

Le système lipidot a été développé il y a plus de 6 ans pour l'encapsulation de fluorophores, dans le but de réaliser l'imagerie de fluorescence *in vivo* de tumeurs chez le rongeur (1^{ère} génération de lipidots). L'encapsulation de fluorophores au sein du système permet d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques favorisant des rendements quantiques de fluorescence élevés^{13, 147}. Le passage à des formulations dont les composants sont entièrement de grade pharmaceutique a été réalisé il y a 3 ans (seconde génération de lipidots).

Après injection systémique du vecteur de première génération (30 nm de diamètre), les lipidots présentent une accumulation passive par effet EPR dépendante du type de tumeur étudié¹⁵⁴. La fonctionnalisation de ces nanoparticules par un cRGD permet la fixation et l'internalisation des nanoparticules par les cellules surexprimant le récepteur associé à ces ligands : les intégrines $\alpha\beta3$ ¹⁵⁴. Cette étude a mis en évidence le potentiel des lipidots pour le ciblage tumoral.

Concernant les lipidots de deuxième génération, des essais de toxicité cellulaire ont montré la faible cytotoxicité des particules ($IC_{50} = 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$ de lipides sur la lignée de fibroblastes 3T3, ainsi qu'une faible captation des lipidots par les cellules myéloïdes (fibroblastes 3T3 et macrophages J774A), pas d'internalisation dans les macrophages après 5 h d'incubation). Des études de tolérance chez le rat, après administration intraveineuse d'une dose unique de 150 mg / kg de lipidots de diamètre 50 nm, ont montré que l'ensemble des animaux ont survécu au moins 6 semaines normalement avec prise de poids et consommation alimentaire et hydrique normales. Des essais immunologiques permettant de mettre en évidence l'activation ou non du complément en présence de lipidots ont été réalisés sur 24 h. Aucune induction d'inflammation (dosage des interleukine-1 β , interleukines-6 et TNF- α) ou d'activation du complément n'ont été observées.

Ces données ont mis en évidence la pertinence de ces nanoparticules pour la vectorisation *in vivo* de molécules d'intérêt (drogue, agent de contraste).

Ces premiers résultats nous ont encouragés à continuer le développement des lipidots et à proposer dans ce travail d'étudier la biodistribution et la pharmacocinétique de ces nanoparticules, ainsi que leurs potentialités d'applications cliniques.

E. Conclusion

La nanomédecine est en évolution constante depuis ces 40 dernières années afin de développer des objets plus performants, plus biocompatibles et moins toxiques. Les nanoparticules permettent d'encapsuler des composés sensibles à l'environnement, que ce soit des fluorophores pour de l'imagerie de fluorescence, ou des composés thérapeutiques pour la délivrance de médicaments. Les nanoobjets ont vu leur structure évoluer au cours du temps afin d'améliorer leurs propriétés de vectorisation *in vivo*. Peuvent être citées notamment, la couronne de surfactants hydrophiles permettant d'augmenter la demi-vie plasmatique du vecteur après injection ou encore le couplage de molécules d'adressage à la surface des objets permettant une délivrance ciblée du vecteur et de son contenu. Les nanoobjets deviennent ainsi des plateformes de plus en plus sophistiquées permettant de créer des objets bi-ou trimodaux. L'objectif final reste avant tout l'obtention d'une autorisation d'administration chez l'homme par les autorités de santé. C'est pourquoi, à ce jour, les composés à bases de molécules et de lipides naturels restent en tête de file des produits utilisés en clinique.

Cette thèse a pour premier objectif de mieux comprendre le comportement des lipidots après administration chez l'animal en déterminant leur pharmacocinétique et, leur(s) voie(s) de métabolisation et d'élimination (Chapitre II). La localisation des particules à l'échelle de l'organe et des tissus a été étudiée en deuxième lieu. L'utilisation des lipidots comme agent de diagnostic pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie nucléaire a également été exploré (Chapitre III). Aux vues des données de biodistribution obtenues, différentes applications cliniques potentielles des lipidots (pour le diagnostic et la délivrance de médicaments) ont été explorées : l'oncologie et la délivrance d'hormones (Chapitre V et Figure 12). Enfin l'accumulation passive des lipidots dans différents modèles tumoraux a été quantifiée et l'apport d'un peptide de ciblage à la surface de la nanoparticule évalué (Chapitre IV).

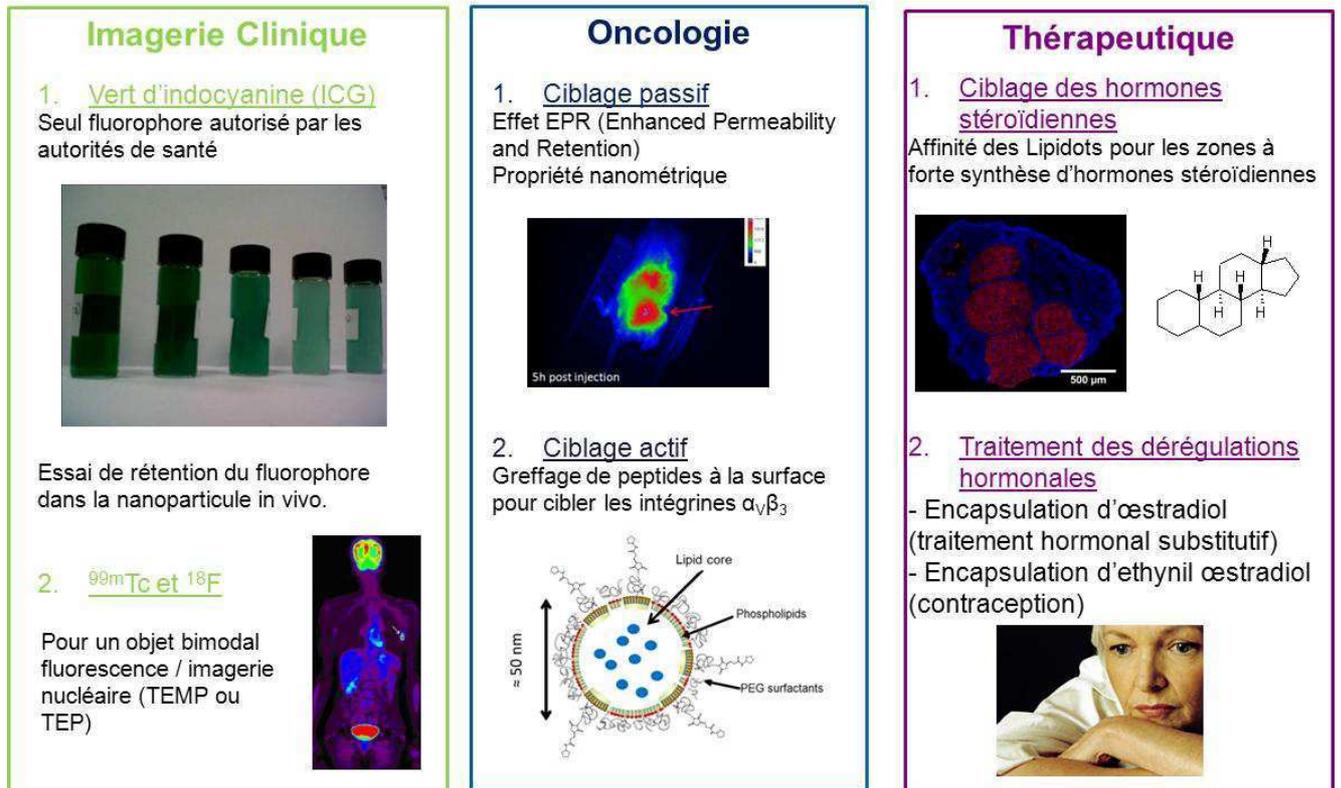


Figure I-12 : Applications développées au cours de cette thèse avec les lipidots.

Chapitre II :

Devenir *in vivo* des Lipidots

Ces dernières années, le développement des nanoparticules pour des applications médicales comme la délivrance thérapeutique ou l'imagerie a connu une expansion rapide¹⁵⁵. Il est donc devenu important de disposer d'outils pour évaluer le comportement de ces nanoparticules dans le corps. Après injection *in vivo*, ce comportement dépend de leur biodistribution, leurs voies de métabolisation et d'élimination. Cependant, il est difficile de comparer la littérature tant les types de nanoparticules différent (composition, taille, chimie de surface...) et les moyens de les étudier également (modèle animal, voie d'administration, organes cibles, durée de l'expérimentation). La complexité des scénarios expérimentaux cause des difficultés dans la comparaison des données expérimentales d'une étude à une autre. Néanmoins, des comparaisons peuvent être faites à partir de paramètres de base comme la pharmacocinétique ou en monitorant l'accumulation des nanoparticules dans certains organes spécifiques.

Dans ce chapitre, la pharmacocinétique et la biodistribution des lipidots étudiées par radiomarquage et imagerie de fluorescence seront présentées et discutées.

La partie A rappelle les paramètres fondamentaux de pharmacocinétique et de biodistribution avec la présentation du modèle ADME (Administration, Distribution, Métabolisation et Elimination)^{156, 157}, puis, les différentes techniques de marquages disponibles à ce jour pour suivre les nanoparticules *in vivo*. La partie B présente la synthèse des lipidots triplement marquées, la partie C, les résultats obtenus après leur administration *in vivo* et enfin les parties D et E forment respectivement la discussion et la conclusion de ce chapitre.

A. Caractérisation *in vivo* : les outils disponibles

A.1. Caractérisation des vecteurs *in vivo* : paramètres fondamentaux de pharmacocinétique et de biodistribution

A.1.1 Les paramètres fondamentaux de pharmacocinétique

La pharmacocinétique se définit comme « l'étude de l'évolution dans le temps des concentrations de médicament (principes actifs et métabolites) dans les liquides biologiques » et fait intervenir des paramètres mathématiques caractéristiques de la distribution dans les tissus et de l'élimination de l'organisme.

Les plus connus sont la biodisponibilité et les valeurs de distributions. La **biodisponibilité** représente le pourcentage de la dose administrée qui atteint la circulation générale (la biodisponibilité est de 100 % lorsque l'administration se fait par voie sanguine). Le **volume de distribution** représente un volume fictif dans lequel le médicament devrait être réparti pour être à la même concentration que dans le plasma, et traduit la capacité du produit à diffuser dans l'organisme¹⁵⁶.

Concernant l'élimination, le **temps de ½ vie plasmatique** représente le temps nécessaire pour observer une diminution de 50 % de la dose initialement injectée. C'est un paramètre de référence pour évaluer la furtivité d'une nanoparticule dans l'organisme. La **clairance totale** représente quant à elle le débit quantifiant la capacité de l'organisme à éliminer la molécule¹⁵⁷.

Enfin un paramètre considéré comme paramètre global, est le **temps de présence moyen** qui comme son nom l'indique représente le temps moyen pendant lequel une molécule reste dans l'organisme après administration.

A.1.2 Les modèles de pharmacocinétique

Il existe deux approches pour réaliser les études de pharmacocinétique. Tout d'abord, la pharmacocinétique que l'on appelle « classique », fait référence à des compartiments empiriques « fictifs », et fait intervenir des modèles simplifiés. Les modèles « PBPK » (Physiologically based Pharmacokinetic en anglais)^{155, 158}, modèles complexes étudiant la pharmacocinétique de la molécule dans chaque organe, proposent quant à eux une modélisation dans laquelle les « compartiments » ont une identité anatomique et physiologique et des significations relatives propres.

A.1.2.a La pharmacologie classique

Pour calculer les paramètres définis précédemment, la pharmacocinétique classique doit définir ce qu'on appelle un « modèle » qui par définition est une expression mathématique décrivant la réponse d'un système pour une entrée donnée. Par conséquent le modèle d'étude diffère pour une administration par voie intraveineuse (biodisponibilité de 100 % de la molécule dans le sang) et pour une administration par voie orale au cours de laquelle la molécule subit d'abord le premier passage hépatique (biodisponibilité plus faible). Dans l'approche dite « compartimentale », l'organisme est considéré comme une succession de compartiments dans lesquels le médicament se distribue et diffuse de l'un à l'autre.

Le modèle dit « non compartimental » propose des équations mathématiques plus simples permettant une approche descriptive des phénomènes. Pour des études plus approfondies, des modélisations pharmacocinétiques plus sophistiquées peuvent être réalisées via l'établissement de modèles mono, bi ou tri compartimentaux (Figure 1). Le choix du modèle le plus adapté au traitement de données expérimentales peut être déterminé en traçant la courbe de la concentration plasmatique du médicament ou de la molécule d'intérêt en fonction du temps sur une échelle semi-log et en déterminant les points d'inflexions de la pente. Chaque point d'inflexions traduit une phase différente de la cinétique de distribution et conduit à faire intervenir un compartiment supplémentaire.

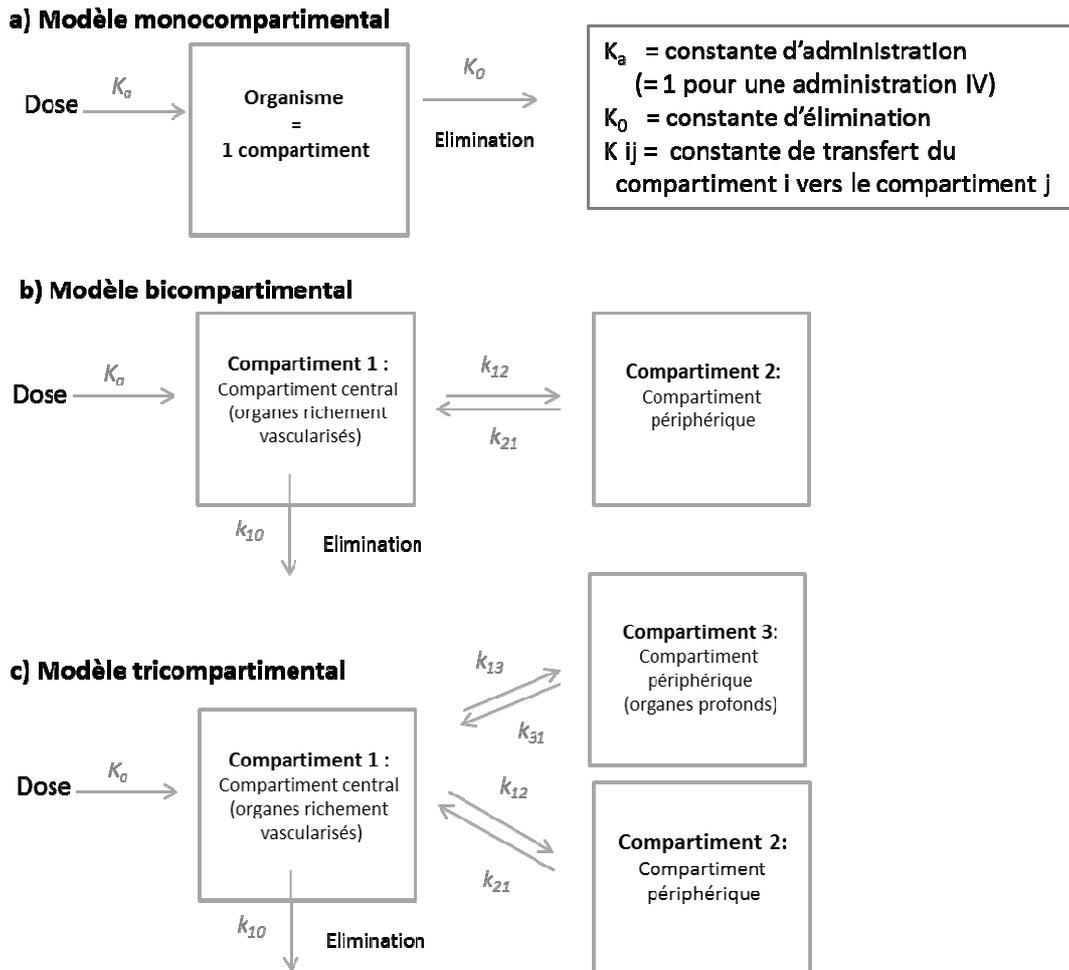


Figure II-1 : Présentation des modèles pharmacocinétiques classiques à a) un compartiment, b) deux compartiments ou c) trois compartiments et les valeurs paramétriques qui leur sont associées. Le compartiment central est souvent assimilé au système sanguin et aux organes « consommateurs » (foie), le compartiment périphérique aux organes de métabolisation ou d'élimination (reins, intestin) et le troisième compartiment correspond plutôt aux organes dits profonds comme une tumeur.

A.1.2.b Les modèles PBPK

Les modélisations dites « PBPK » sont plus avancées dans le sens où l'on essaie d'associer à chaque « compartiment » une identité anatomique et physiologique (chaque compartiment représente un organe). Ces modèles sont utilisés pour décrire des profils d'accumulation de molécules dans des tissus ou organes de manière individuelle (chaque organe est donc modélisé) ainsi que dans le sang ou le plasma. C'est un outil bien plus puissant que ceux utilisés en pharmacocinétique classique car il décrit la relation entre les organes et permet de meilleures prédictions.

Un autre avantage est l'extrapolation possible des données expérimentales entre les espèces, les tissus, les voies d'administration et les doses. Ce modèle est utilisé depuis peu pour les nanoparticules et la littérature reste pauvre sur ce sujet. Le premier article sur la PBPK pour prédire la concentration et les profils des boîtes quantiques (quantum dots) chez la souris a été publié en 2008 par le groupe de Li¹⁵⁵. Ce modèle peut également constituer un bon outil pour prévoir par exemple la toxicité d'une nanoparticule. Néanmoins, il faut rester vigilant pour les données obtenues avec les nanoparticules car certains organes ne sont pas bien représentés alors qu'ils peuvent jouer un rôle très important (comme le système lymphatique)^{155, 159}. Il est donc pour le moment conseillé d'utiliser plutôt ce type de modèle pour comparer entre elles un même type de nanoparticules.

Les principales limites à ce jour à l'utilisation des modèles PBPK pour les nanoparticules sont la quantité importante de données expérimentales nécessaires (paramètres physiologiques des animaux et humains, des données sur l'interaction des nanoparticules avec le corps ou les cellules ainsi que la connaissance de l'ADME de la nanoparticule). Le manque d'homogénéité des résultats obtenus entre les équipes constituent également un problème, dû à la reproductibilité des synthèses des nanoparticules ou encore à la variété des modèles animaux utilisés. De plus, le nombre important d'animaux nécessaire pour réaliser de telles études entre en contradiction avec les normes de l'éthique animale. Une autre limitation pratique concerne le laboratoire et l'équipe elle-même. En effet, le développement de modèles de pharmacocinétique nécessite un travail multidisciplinaire qui demande beaucoup de compétences dans des domaines d'expertises différents, tels que la caractérisation des nanoparticules, de l'ADME nanoparticulaire, la nanotoxicité, les mathématiques et l'informatique.

A.2 Les paramètres fondamentaux de biodistribution

Après l'étude des nano-objets dans le système sanguin, leur comportement dans l'organisme est décrit par quatre paramètres, souvent appelés par l'acronyme ADME pour absorption, distribution, métabolisation et élimination¹⁵⁵. Ces quatre étapes (Schéma 1) et les facteurs les modulant sont détaillés dans les paragraphes suivant avec un accent sur la distribution.

A.2.1 L'absorption

L'absorption est le procédé par lequel la nanoparticule passe de son site d'administration dans le milieu intérieur, en pratique le plasma sanguin. L'absorption varie principalement suivant la voie d'administration et les différentes barrières que doit franchir la nanoparticule : voie orale (premier passage hépatique, enzymes gastriques), pulmonaire (passage à travers les alvéoles), intraveineuse, nasale, dermique (diffusion à travers la barrière cutanée), oculaire (évacuation lacrymale), intravaginale (muqueuse), et intratumorale (acidité). La biodisponibilité de la nanoparticule (à savoir le pourcentage de la dose administrée qui rejoint le compartiment sanguin) est de 100 % uniquement pour la voie intraveineuse. Cette voie est donc souvent adoptée lors de la première phase d'étude de molécules thérapeutiques chez l'animal.

A.2.2 La distribution

La distribution correspond à l'arrivée des nanoparticules dans les différents tissus ; les plus étudiés sont le système vasculaire, le système réticulo-endothélial (RES), le système lymphatique, puis, de manière générale les autres tissus.

Le système vasculaire est un tissu complexe pour lequel trois paramètres peuvent jouer de manière considérable sur la nanoparticule. Tout d'abord, les nanoparticules peuvent se lier aux protéines plasmatiques (appelé processus d'**opsonisation**), et ce de façon instantanée dès que la nanoparticule est au contact du sang. Cette complexation modifie les propriétés physico-chimiques de la nanoparticule de départ et représente la première étape de reconnaissance du nano-objet par les macrophages aboutissant à leur phagocytose. Ce phénomène justifie la synthèse de nanoparticules furtives (par exemple comportant une couronne de poly(éthylène)glycol à leur surface) réduisant l'opsonisation et donc augmentant le temps de présence des nanoparticules dans le compartiment sanguin.

La **nature de l'endothélium des vaisseaux sanguins** joue également un rôle important selon que les vaisseaux sont continus ou discontinus, facilitant ou non l'extravasation des nanoparticules vers ces tissus. Par exemple, l'endothélium discontinu est caractéristique du foie, de la rate, et des os avec des pores de 50 à 100 nm. L'apport en sang des tissus, leur perfusion rapide ou lente, est également un facteur déterminant pour la distribution du nano-objet.

Le **système reticulo endothelial** (RES), aussi appelé système phagocytaire mononucléaire, représente un groupe de cellules capables d'ingérer un grand nombre de particules d'origine inconnue afin de les éliminer de l'organisme. Le RES comprend les monocytes circulants dans le sang, les cellules de Kupffer du foie, les cellules réticulaires dans les ganglions, la moelle osseuse, la rate et les macrophages présents dans certains tissus ou circulants librement dans le sang. Beaucoup d'efforts visent à éviter l'accumulation des nanoparticules dans le RES en les fonctionnalisant et ainsi faciliter leur accumulation dans d'autres tissus.

Les vaisseaux lymphatiques se trouvent dans l'ensemble du corps à l'exception du cartilage de la cornée, du cristallin et du système nerveux central. La nature même de la morphologie de l'endothélium (avec de grands espaces) et la fragilité de l'attachement des jonctions intracellulaires permet l'entrée des nanoparticules dans la circulation lymphatique. Le fluide lymphatique est filtré à travers les nœuds lymphatiques en lien avec les macrophages qui phagocytent les agents particuliers étrangers.

Les poumons et le tractus gastro-intestinal peuvent être des sites d'accumulation des nanoparticules, surtout s'ils sont la voie d'administration. A cause de la barrière hémato-encéphalique, peu de nanoparticules sont retrouvées dans le cerveau. Les reins, importants organes excréteurs, peuvent accumuler des doses importantes de nanoparticules, surtout si celles-ci sont hydrophiles et de petite taille. L'accumulation dans le cœur est généralement étudiée à cause de son importance physiologique. Le muscle est peu regardé car c'est un organe de très faible accumulation bien qu'il représente 43 % du poids du corps chez la souris. La peau et les os sont en général regroupés sous le terme de carcasse. La tumeur est un organe spécial avec ses caractéristiques propres. Les vaisseaux des tumeurs sont fragiles, tortueux, dilatés et les cellules endothéliales y ont une morphologie aberrante avec une membrane basale souvent anormale. Leur densité et leur fragilité vasculaire élevée, ainsi qu'un drainage lymphatique déficient favorisent la perméabilité et la rétention des nanoparticules via l'effet EPR (Enhanced and Permeability Retention, Chapitre I).

A.2.3 La métabolisation

La métabolisation inclue tous les processus biologiques qui altèrent les propriétés physiques et chimiques des nanoparticules et est propre à la composition de chaque nano-objet. Certaines nanoparticules sont métabolisées dans les lysosomes des macrophages du RES après avoir été internalisées, d'autres subissent une hydrolyse dans l'environnement aqueux. De nombreuses nanoparticules, notamment métalliques, ne sont pas métabolisées par l'organisme et s'accumulent dans le corps, ce qui favorise leur toxicité.

A.2.4 L'élimination

Suivant la composition des nanoparticules, l'excrétion peut se faire sous forme modifiée (métabolites) ou sous forme inchangée. Le foie et les reins sont les principaux organes responsables de l'excrétion des nanoparticules. Concernant l'élimination rénale, surtout retrouvée pour les nanoparticules de petite taille (< 5 nm) ou hydrophiles, les nanoparticules passent dans les urines suite à leur filtration glomérulaire. En dehors de sa fonction métabolique, le foie est également une voie majeure d'excrétion pour les nanoparticules, notamment si elles sont à base de lipides. L'excrétion se fait à travers les hépatocytes via la voie de production de la bile. D'autres voies d'excrétion existent comme les poumons, le lait ou la sueur.

A.3 Tracer les nano-objets : techniques de marquage à disposition

Il existe différents moyens pour suivre *in vivo* la distribution d'une nanoparticule. Les techniques utilisées diffèrent suivant l'information qui est recherchée et suivant la nature de la nanoparticule utilisée. On dispose encore de peu de caractérisations complètes de nanoparticules en tant que vecteurs. Les études menées aujourd'hui consistent, notamment pour une drogue, à évaluer son efficacité après injection sur sa cible thérapeutique. Les liposomes sont certainement les objets qui ont été les plus étudiés depuis les années 1980. Dans la partie suivante, les différentes techniques utilisées pour suivre *in vivo* les nanoparticules vont être évoquées (dosage chimique, fluorescence, radiomarquage) et illustrées avec différents types de nanoparticules.

A.3.1 Suivi d'une nanoparticule par dosage chimique

La littérature est riche pour ce qui concerne, non pas la biodistribution du vecteur nanoparticulaire en lui-même, mais plutôt le devenir d'une molécule d'intérêt encapsulée dans ce système. En effet, c'est davantage l'effet « nano-encapsulation » qui est en général évalué en comparant la biodistribution de la drogue seule (à savoir non encapsulée) et de la drogue encapsulée dans le vecteur. Il est alors possible de doser la molécule d'intérêt par CLHP (chromatographie liquide à haute pression) après son extraction des tissus. C'est ce qui a été réalisé par Jia⁸⁷ après encapsulation de la silibyn dans une nanocapsule, Bargoni⁸⁸ avec la tobramycin ou encore Xu¹⁶⁰ avec la tétracycline, toutes deux encapsulées dans une nanoparticule lipidique solide. Le dosage CLHP est conseillé s'il existe une méthode de dosage de référence dans la pharmacopée européenne (notamment si un développement pharmaceutique est souhaité), si le composé peut facilement être extrait des tissus dosés et, de préférence, si le composé élué à des temps de rétention relativement courts afin de faciliter la logistique des expériences. Il est également possible de doser des métaux comme l'or ou le fer via des techniques telles que l'ICP / MS (en français : spectrométrie par torche à plasma couplée à une spectrométrie de masse).

A.3.2 Suivi d'une nanoparticule par radiomarquage

Le suivi de nanoparticules *in vivo* via l'utilisation de composés radiomarqués est une technique courante d'étude. C'est à l'heure actuelle la méthode de référence, en comparaison avec la technique de fluorescence, utilisée depuis quelques années seulement. Deux modes de suivi peuvent être distingués : (1) **les méthodes d'imagerie** nécessitent des détecteurs spécifiques pour les radiations émises par des nucléides, principalement des émetteurs gamma. Les composés d'étude sont souvent à courte durée de vie (de l'ordre de l'heure) à savoir le ¹¹C, ¹⁸F, ⁶⁸Ga pour la TEP (Tomographie à émission de positons, PET en anglais) et le ^{99m}Tc, le ⁹⁹Tc, ¹²⁵I, ¹³¹I ou encore l'¹¹¹In pour la TEMP (Tomographie à émission monophotonique de positons ou SPECT en anglais) qui ont des temps de demi-vie plus longs (de l'ordre du jour) ; (2) **les méthodes de comptage** utilisant l'incorporation de traceurs à plus ou moins longue durée de vie, lus par un compteur à scintillation (¹⁴C, ³H, ³²P).

De très nombreux travaux ont été publiés à ce jour ; on peut citer un double marquage cœur et coquille avec l'¹¹¹In et du ¹²⁵I par Mougins-Degraef⁷¹ pour évaluer l'importance de la pegylation sur des liposomes, ou encore un double marquage ^{99m}Tc, à

élimination plutôt rénale, et ^{125}I à élimination plutôt hépatique, pour des liposomes par Awasthi ¹⁶¹. Tiwari ¹⁶² a utilisé le ^{99}Tc pour comparer des nanoparticules lipidiques solides à des vecteurs lipidiques nanostructurés. Les nanoparticules polymériques étant faciles à fonctionnaliser, différents types de marquages sont retrouvés comme le ^{18}F par Allmeroth ⁶⁰ qui étudie l'influence de la présence de copolymère et de monomère, le ^{125}I par Sadekar ¹⁶³ ou Chen ¹¹⁹ qui étudient l'influence du poids moléculaire de leur système nanoparticulaire sur leur devenir *in vivo*, ou encore le ^{131}I par Kucka ¹⁶⁴ qui a évalué, jusqu'à 42 jours après injection, la toxicité d'un polymère. Un double marquage ^{18}F et boîtes quantiques a également été réalisé par Ducongé ⁴⁶ pour étudier le devenir de quantum dots dans des micelles de phospholipides. Le principal inconvénient de ces techniques est tout d'abord leur coût (coût des traceurs en eux même et de la synthèse évaluée à environ 500 euros pour un traceur au ^{18}F dont la $\frac{1}{2}$ vie est de 2 h, et du coût des caméras, allant parfois jusqu'au million d'euros pour une caméra TEP), les dispositifs nécessaires de sécurité vis-à-vis des rayonnements gamma, et enfin pour certains traceurs leur courte durée de vie, ce qui exclut toute évaluation du traceur à des temps longs.

Le marquage au ^3H ou ^{14}C a été couramment utilisé pour l'étude des liposomes, mais seuls quelques rares exemples concernant des nanoparticules lipidiques ⁷³ ou dendrimères ¹⁶⁵ ont été décrits à ce jour. Ces radiomarqueurs peuvent être réalisés seuls ou en association ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$ par exemple). La première stratégie consiste à marquer un ou plusieurs composants intrinsèques du nanovecteur (couronne marquée par de la lécithine ou du cholestérol radioactif par exemple, cœur lipidique marqué par un triglycéride) ^{70, 166, 167}. La nature chimique du radiotraceur est importante si un mécanisme particulier doit être étudié. Par exemple, la mobilité et la capacité d'une couronne à créer des interactions avec le milieu environnant peuvent être étudiées en utilisant un double marquage $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ avec deux traceurs très proches chimiquement (un métabolisable et un non métabolisable par exemple) ^{70, 155, 167, 168}. De manière générale, le radiomarquage des dérivés de cholestérol et des lipides formant le cœur des nanoparticules sont des techniques très utilisées ⁷³. Il n'est pas rare également de faire appel à un double marquage, d'une part d'un des composants du nanovecteur, et d'autre part de la drogue d'intérêt encapsulée afin d'évaluer des co-profils de distribution ⁷³. Le radiomarquage a plusieurs avantages, comme le coût relativement faible des radiotraceurs (environ 300 euros pour 250 μCi) et le grand choix de

molécules proposées par les fournisseurs (PerkinElmer, Biotrend). De faibles doses de radioactivité sont nécessaires pour obtenir une bonne détection permettant entre autre des études sur le long terme. Aucune caméra coûteuse n'est nécessaire, la lecture de la radioactivité se faisant grâce à un compteur à scintillation liquide. Les radiations de ces traceurs étant moins fortes en comparaison des émissions gamma, le système de sécurité est également moins cher. Les principaux inconvénients sont que cette technique est une technique invasive nécessitant le sacrifice de l'animal afin d'en extraire les organes, et que le processus de préparation des échantillons biologiques en vue du comptage est long.

A.3.3 Suivi d'une nanoparticule par fluorescence

Les techniques d'imagerie de fluorescence *in vivo* sont des techniques plus récentes, dont le développement et l'utilisation vont croissant depuis l'arrivée de dispositifs dédiés à l'imagerie du petit animal. Il est possible de suivre le devenir d'une nanoparticule par fluorescence via deux techniques. La première consiste à **encapsuler un fluorophore** à l'intérieur de la nanoparticule et suppose de vérifier l'hypothèse que le devenir du fluorophore correspond au devenir de la nanoparticule. Pour cela, la biodistribution du fluorophore seul devra être étudié, et l'absence de fuite du fluorophore à travers la nanoparticule vérifiée. Par exemple, Sasatsu⁶¹ a utilisé un fluorophore lipophile, le DiD pour évaluer la biodistribution de deux types de formulations polymériques. La deuxième technique consiste à suivre une nanoparticule qui a des **caractéristiques fluorescentes en elle-même**, ce qui est souvent le cas des nanoparticules inorganiques comme les nano cristaux semi-conducteurs luminescents (quantum dots). Il est également possible, en plus du suivi du signal de fluorescence, de doser l'un des métaux constitutifs, le cadmium par exemple, par ICP-MS, afin de compléter les données par des résultats quantitatifs (la fluorescence étant plutôt considérée comme une technique semi-quantitative). C'est le procédé qu'a choisi Boyer⁴⁸ pour évaluer la biodistribution de quantum dots lorsqu'elles sont encapsulées dans des micelles lipidiques. La méthode du suivi de fluorescence a l'avantage d'être une technique très simple, qui peut être non invasive à condition d'avoir une profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus suffisante, comme c'est le cas dans le proche infrarouge (650 – 900 nm). Néanmoins, son manque de quantification précise reste une limite importante. Cette technique est donc souvent associée à une autre technique quantitative comme les techniques de radiomarquages.

En conclusion, de nombreuses techniques de marquage sont à notre disposition. La meilleure technique est celle qui donnera les meilleures réponses à la problématique posée : par exemple la radioactivité pour des expériences nécessitant des résultats quantitatifs, l'utilisation de la fluorescence pour des résultats plus qualitatifs mais visuels.

B. Synthèse des Lipidots marqués

Il a été choisi de travailler dans ce chapitre avec des nanoparticules de 50 nm de diamètre. En effet, les nanoparticules ayant une taille inférieure à 100 nm montrent des propriétés intravasculaires intéressantes, comme (1) la réduction de la captation par les macrophages du système réticulo-endothélial; (2) une extravasation possible via la fenestration des endothéliums et (3) une meilleure internalisation dans les cellules¹⁶⁹. Il est également important d'avoir une taille autorisant un réservoir de taille suffisante pour encapsuler une quantité convenable de molécules.

Le choix de radiomarquer les lipidots via des traceurs à émetteurs β à longue durée de vie (^{14}C et ^3H) a été fait pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'un point de vue de la réalisation technique, les nanoparticules étant fabriquées à Grenoble avant d'être envoyées à Paris, le choix de radiotraceurs à longue durée de vie est un atout. Cela nous permet également de fabriquer un lot de nanoparticules radiomarquées qui nous servira pour l'ensemble des manipulations dont la durée moyenne est de 6 semaines et de réaliser des biodistributions sur une longue durée (jusqu'à 7 jours après injection).

B.1 Identification de traceurs représentatifs de la nanoparticule

Une étude préliminaire a été menée à l'université de Montréal, dans le laboratoire de Jean Christophe LeRoux avec la collaboration de Nicolas Bertrand et l'aide d'Anne Claude Couffin, afin de définir le choix des radiomarqueurs utilisés dans la suite de ce travail. La première option choisie pour marquer la nanoparticule était un double marquage membrane / cœur. L'objectif était d'obtenir des informations à la fois sur le devenir des produits encapsulés au niveau du cœur mais également sur la couronne de la particule et son potentiel de furtivité.

Lors de cette étude préliminaire, 3 radiotraceurs (Figure 2) ont été évalués :

- la [^3H]DPPC (DiPalmitoylPhosphatidylCholine), un phospholipide susceptible de s'insérer dans la membrane des lipidots ;

- le [^{14}C] acide palmitique (acide gras saturé avec une chaîne grasse en C_{16}) et le [^{14}C]CHO (oléate de cholestéryl, dérivé de cholestérol avec une chaîne grasse en C_{18}), représentatifs des triglycérides du cœur de la nanoparticule.

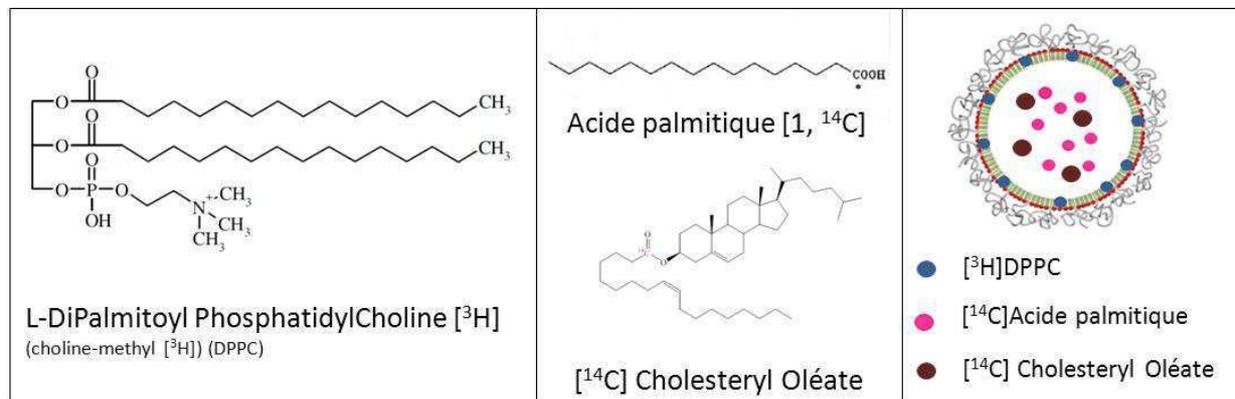


Figure II-2 : Formules chimiques du [^3H]DPPC et du [^{14}C]acide palmitique suivi de leur emplacement théorique dans la lipidot.

B.1.1 Formulation et caractérisation des lots radiomarqué $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$:

Les lipidots ont été préparées suivant le protocole détaillé dans le Chapitre VI, partie expérimentale A. Brièvement, les radiotraceurs, en solution dans le toluène ou l'éthanol, sont ajoutés au premix huileux (huile de soja, suppocire, phospholipides) et les solvants organiques sont évaporés sous flux continu d'argon. La phase aqueuse (stéarate de PEG₄₀ (MirjS40™) et glycérol pour viscosifier le mélange) est ajoutée à la phase huileuse, puis le mélange est soniqué. Le lot de nanoparticules, de taille avoisinant les 50 nm de diamètre, est ensuite purifié par dialyse pour éliminer tout constituant non incorporé, puis dilué afin d'obtenir une concentration en lipides de 15 mg / mL. La formulation est ensuite stérilisée sur membrane 0,22 μm .

Deux lots ont été utilisés, un comportant le mélange [^3H]DPPC / [^{14}C]AP et un autre le mélange [^3H]DPPC / [^{14}C]CHO. Pour chaque lot, le ratio [^3H] / [^{14}C] est important à déterminer. En effet, le ^3H est un émetteur β de faible énergie (plage d'énergie de 0 à 12 keV) et le ^{14}C est un émetteur β d'énergie moyenne (plage d'énergie de 12 à 156 keV). Pour obtenir une bonne détection du ^3H par rapport au ^{14}C , il est donc recommandé d'utiliser un rapport [^3H] / [^{14}C] d'environ 4.

L'intégrité du double marquage a été vérifiée par colonne d'exclusion stérique Sephadex® G50 (élution des 2 traceurs au même moment avant et après dialyse et absence

de pics à des temps d'éluions élevés correspondant à des radiotraceurs libres). Après comptage de l'eau du bain de dialyse, aucune fuite des radiotraceurs n'a été détectée. Les lots ont été suivis par mesure de la taille des nano-objets jusqu'à 10 jours après injection pour vérifier leur stabilité.

B.1.2 Evaluation in vivo

Une dose de 20 mg de lipides / kg est injectée à des rats mâles Wistar de 300 g environ (soit environ 6 mg de lipides / rat). Pour avoir une bonne détection en radioactivité, une dose de 10 μCi / kg en [^3H] (soit environ 3 μCi / animal) et une dose de 3 μCi / kg de [^{14}C] (soit environ 0.9 μCi / animal) sont nécessaires. La pharmacocinétique est réalisée sur 24 h (temps de prélèvements : 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h et 24 h) puis l'animal est sacrifié, les organes prélevés (cœur, poumon, rein, intestin, foie, rate, cerveau, muscle et graisse) et la radioactivité est évaluée par comptage à scintillation. Pour le lot comportant le [^{14}C]CHO, une dose d'environ 0,5 μCi en [^{14}C] et 2 μCi en [^3H]DPPC est injectée chez le rat (n = 3).

Les courbes de pharmacocinétique obtenues sont représentées Figure 3. Les concentrations en traceurs sont exprimées en % de dose injectée (le volume sanguin d'un rat de 280 g est estimé à 19,2 mL).

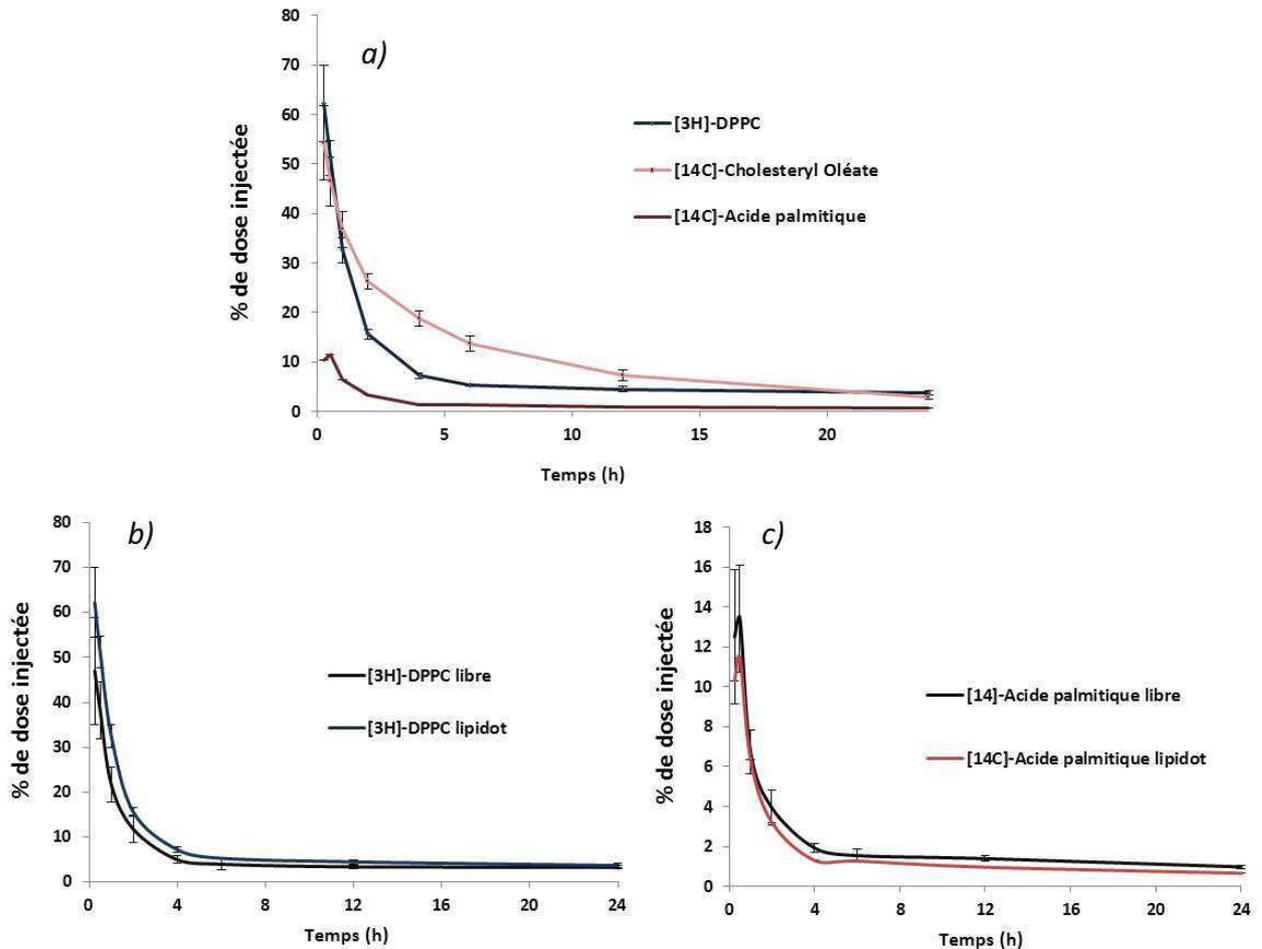


Figure II-3 : Courbes de pharmacocinétique du $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$, $[^3\text{H}]\text{DPPC}$, $[^{14}\text{C}]\text{AP}$ libres ou encapsulés dans les lipidots. a) Traceurs encapsulés dans les lipidots ; b) Comparaison $[^3\text{H}]\text{DPPC}$ libre et encapsulé ; c) Comparaison du $[^{14}\text{C}]\text{AP}$ libre et encapsulé.

Ces courbes fournissent plusieurs informations. Tout d'abord, que ce soit avec le couple $[^3\text{H}]\text{DPPC}$ / $[^{14}\text{C}]\text{AP}$ ou avec le couple $[^3\text{H}]\text{DPPC}$ / $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$, aucune des courbes des trois traceurs ne sont superposables, suggérant un comportement différents des traceurs en présence de fluides biologiques. Le temps de $\frac{1}{2}$ vie plasmatique est quasiment indéterminable pour le $[^{14}\text{C}]\text{AP}$ et la $[^3\text{H}]\text{DPPC}$ sort rapidement du compartiment sanguin ($t_{1/2} = 53$ min). De plus, il est observé une bonne superposition des courbes entre les traceurs $[^3\text{H}]\text{DPPC}$ et $[^{14}\text{C}]\text{AP}$ libres ou encapsulés dans les lipidots. Le temps de présence dans le sang le plus élevé est obtenu avec le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ ($t_{1/2} = 105$ min). Malheureusement, la vérification du comportement *in vivo* du traceur libre n'a pas été effectuée dû au temps limité pour ces expériences.

Les organes ont été prélevés et comptés 24 h après injection (Figure 4). Un balayage rapide des organes pouvant jouer un rôle majeur dans la métabolisation de la nanoparticule a été réalisé : (1) le foie, premier organe d'épuration de l'organisme, en particulier des composés lipophiles ; (2) les reins, excréteurs des molécules plutôt hydrophiles ; (3) la rate, organe faisant partie du système réticulo-endothélial et donc de l'élimination des composés étrangers ; (4) les adipocytes, les lipidots étant un vecteur lipidique, et enfin (5) les organes qui assurent des fonctions vitales dans l'organisme (cœur, poumon, cerveau...).

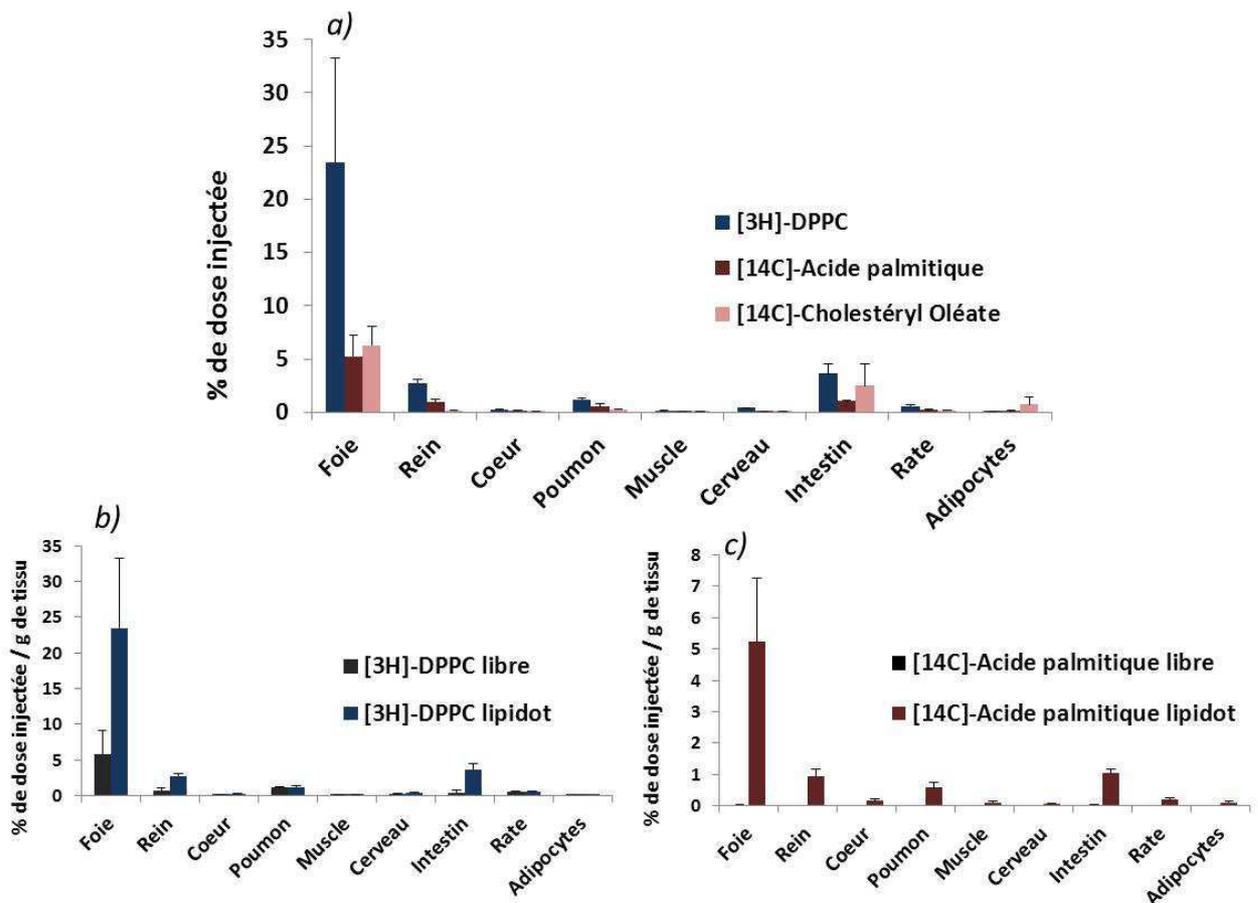


Figure II-4 : Biodistribution des $[^{14}\text{C}]$ CO, $[^3\text{H}]$ DPPC, $[^{14}\text{C}]$ AP libres ou encapsulés dans les lipidots 24 h après injection. a) Traceurs encapsulés dans les lipidots ; b) Comparaison $[^3\text{H}]$ DPPC libre et encapsulé ; c) Comparaison $[^{14}\text{C}]$ AP libre et encapsulé.

La Figure 4 met en évidence une différence de biodistribution entre les traceurs libres et les traceurs encapsulés (Figure 4b) et 4c)), ce qui indique qu'il existe un effet nanoparticulaire pour les traceurs $[^3\text{H}]$ DPPC / $[^{14}\text{C}]$ AP. D'autre part, l'organe principal de métabolisation des traceurs encapsulés dans les lipidots est le foie, alors qu'aucun signal n'est observé dans la rate, un des organes principaux du système réticulo endothélial. Un

faible signal est observé dans les intestins, lieu de réabsorption des lipides, mais aucun signal n'est observé dans la masse graisseuse. Un faible signal est également observé dans les reins et les poumons. Le [^{14}C]CHO possède une biodistribution quasi identique à celle de l'acide palmitique, à savoir une accumulation dans le foie et un léger signal dans l'intestin.

B.1.3 Conclusion sur le choix des traceurs:

Trois traceurs ont été utilisés au cours de ces expériences et trois profils différents de pharmacocinétique ont été obtenus, plus ou moins similaires aux profils des traceurs non encapsulés. Ceci suggère fortement que la particule pourrait se dissocier instantanément après injection ou bien, ou bien se réorganiser suite à la fuite de certains composés.

Concernant la biodistribution, l'accumulation dans les organes à 24 h après injection des traceurs encapsulés dans les lipidots est différente de celle des traceurs libres. Ces données mettent en avant l'effet nanoparticulaire. Le signal de radioactivité observé pour le [^3H]DPPC ou le [^{14}C]AP libre est faible, voire quasi inexistant pour le [^{14}C]AP. Les traceurs encapsulés sont principalement accumulés dans le foie, organe faisant partie du RES mais avant tout organe de métabolisation des lipidots. De plus, aucun signal n'est observé dans la rate, organe principal d'accumulation des nanoobjets non furtifs.

Cela laisse supposer que si la particule ne se dissocie pas complètement, il y a néanmoins (1) des fuites possibles des composés du cœur, ce qui expliquerait les cinétiques plasmatiques différentes entre l'acide palmitique et l'oléate de cholesteryl et / ou (2) des fuites possible au niveau de la couronne, avec la possibilité d'un échange actif des phospholipides avec le milieu environnant ou une réorganisation de la structure lipidot suite à la fuite ou à l'échange d'au moins un composé.

Le double radiomarquage est inspiré d'études effectuées sur les liposomes dans les années 1980, qui utilisaient des traceurs de type dérivés de cholestérol ou phospholipides pour étudier les échanges membranaires. Dans notre cas, la coquille semble s'échanger de manière active avec le milieu extérieur ou se dissocier du reste de la nanoparticule lorsqu'elle est en contact avec les protéines plasmatiques, ce qui est confirmé par la non superposition des profils pharmacocinétiques entre les molécules ^3H et ^{14}C . La présence de porosités dans la nanoparticule après injection *in vivo* est également suggérée par une fuite instantanée du [^{14}C]AP dans le sang. Il est à noter qu'aucune fuite dans du tampon n'avait été observée pour l'ensemble des traceurs, et que ce phénomène est donc bien dû à une

modification du comportement des lipidots après administration *in vivo*. Le choix de ce traceur, une chaîne grasse en C₁₆ ([¹⁴C]AP) montre que malgré son caractère lipophile et sa stabilité dans le cœur de la particule en milieu aqueux, sa fuite hors de la nanoparticule après injection est instantanée. Ce type de traceur n'est donc pas un bon traceur pour étudier la nanoparticule. Un radiotraceur plus lipophile et moins « linéaire » a été encapsulé, un dérivé de cholestérol avec une chaîne grasse à caractère très lipophile. Après injection, le système possède un temps de vie plasmatique plus élevé que celui du [³H]DPPC même si sa ½ vie reste courte pour des nanoparticules considérées comme furtives car pégylées.

Le choix de bons traceurs radio-marqués pour suivre la nanoparticule, si elle reste intacte, n'est pas un choix facile. Trois traceurs ont été testés avec trois profils complètement différents. Dans la suite de ce travail, nous avons choisi de nous réorienter vers des traceurs de type CHO (Cholesteryl Oléate) qui sont mieux ancrés dans les lipidots, comme montré par l'étude de pharmacocinétique qui met en évidence une élimination plus lente. Dans cette perspective, le suivi de ces traceurs refléterait le devenir *in vivo* du cœur lipidique de la nanoparticule, lieu d'encapsulation des molécules d'intérêt de ces nanovecteurs.

B.2 Synthèse et caractérisation d'un vecteur triplement marqué : l'apport combiné de la fluorescence et du radiomarquage

B.2.1 Choix des traceurs

Un triple marquage du cœur de la nanoparticule a donc été choisi afin d'évaluer son devenir *in vivo* : un double marquage radioactif ¹⁴C / ³H dont un des composés est le [¹⁴C]CHO associé à un marquage par un fluorophore hydrophobe, le DiD. Le double radiomarquage est inspiré d'études effectuées sur les liposomes dans les années 1980 qui utilisaient régulièrement le [¹⁴C]CHO et le [³H]CHE pour étudier les mouvements de la bicouche phospholipidique des liposomes. Les deux composés choisis ont des structures identiques, à savoir un groupe cholestérol et une chaîne grasse en C₁₆ (CHE) ou C₁₈ (CHO). La principale différence réside dans la liaison entre le cholestérol et la chaîne grasse. Pour le composé [¹⁴C]-Cholesteryl-Oléate ([¹⁴C]CHO), la liaison est de type ester (Figure 5), c'est donc une liaison hydrolysable par des enzymes présentes dans l'organisme donnant deux molécules, le cholestérol d'un côté et le [¹⁴C]-acide oléique de l'autre. Pour le composé [³H]-Cholesteryl-Hexadecyl-Ether ([³H]CHE), la liaison entre le cholestérol et la chaîne grasse est

une liaison éther, non métabolisable. Le $[^3\text{H}]\text{CHE}$, s'il est retenu dans le cœur de la nanoparticule, pourra donc mettre en évidence les organes d'accumulation des lipidots, puisqu'une fois relargué dans la cellule, il restera inchangé sous forme de cholesteryl éther.

Enfin, un traceur fluorescent lipophile, présentant deux cyanines porteuses de chaînes grasses en C_{18} , encapsulé dans le cœur est ajouté (la localisation de ce fluorophore dans le cœur des lipidots est décrit par RMN Chapitre III). Il ne pourra fournir qu'une information qualitative sur la biodistribution, mais qui ne nécessite pas le sacrifice de l'animal, et pourra surtout être utilisé pour obtenir des données histologiques, la présence d'un fluorophore étant idéale pour faire de la microscopie confocale des coupes d'organes prélevées.

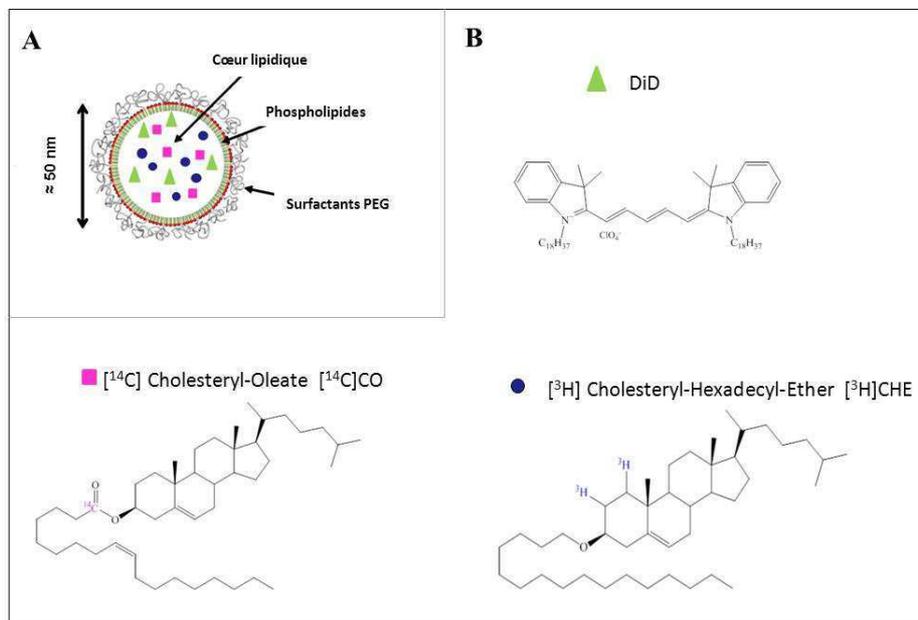


Figure II-5 : Représentation schématique des 3 traceurs utilisés : $[^3\text{H}]\text{CHE}$, $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ et DiD et leur localisation théorique dans la nanoparticule.

B.2.2 Synthèse et caractérisation du vecteur triplement marqué

Pour obtenir une bonne détection du ^3H par rapport au ^{14}C , comme pour les manipulations réalisées chez le rat, il est recommandé un rapport $[^3\text{H}] / [^{14}\text{C}] \approx 4$.

Les trois traceurs sont incorporés dans la nanoparticule avec le premix huileux, avant d'ajouter la phase aqueuse contenant les surfactants PEGylés. L'ensemble des solvants est évaporé sous argon. Le rendement d'encapsulation est évalué en dosant la radioactivité avant et après dialyse et en dosant également l'eau du bain de dialyse. L'intégrité du triple

marquage est évaluée en passant la nanoparticule sur colonne d'exclusion stérique (type Sephadex G25).

Le Tableau 1 regroupe les caractéristiques des nanoparticules préparées pour injection chez l'animal.

Caractéristiques des lipidots à l'injection	
Taille (nm)	55
Polydispersité	0,191
Stabilité chimique et colloïdale	> 20 semaines
Nombre de particules / mL	$1,2 \cdot 10^{13}$
Concentration en lipides (mg / mL)	11,5 mg
Dose [^3H]CHE (μCi / mL)	1,33
Dose [^{14}C]CHO (μCi / mL)	0,38
Nombre de molécules de DiD / nanoparticule	519
$\lambda_{\text{absorbtion}} / \lambda_{\text{emission}}$ DiD (nm)	645 / 665

Tableau II-1 : Caractéristiques de la dispersion de nanoparticules triplement marquées puis injectées chez l'animal.

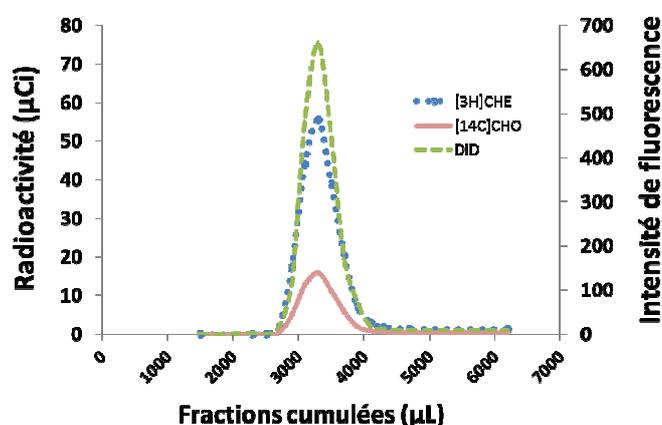


Figure II-6 : Elution de la lipidot triplement marquée sur colonne Sephadex G25.

La taille des particules obtenue après synthèse est de 55 nm avec une polydispersité inférieure à 0,2. Malgré la présence d'un grand volume de solvant organique à évaporer dans la phase huileuse, aucun problème de formulation n'a été observé, que ce soit pendant la synthèse ou concernant la stabilité de la nanoparticule dans le temps (suivie pendant 20

semaines). La dose en lipides a été ajustée afin d'obtenir une concentration de 11,5 mg / mL après purification (soit une dose à injecter par animal de 1,15 mg de lipides).

Le rapport [^3H] / [^{14}C] initialement incorporé était de 4. Les radiotraceurs, solubilisés dans du toluène, ont été prélevés avec une pipette pasteur en plastique. L'affinité du solvant pour le plastique a entraîné une perte en radioactivité de 23 % de la dose pour le [^3H] et de 11 % de la dose pour le [^{14}C]. Après dialyse, la dose retrouvée dans l'échantillon est de 99% pour le [^3H] et de 98,3 % pour le [^{14}C]. Ces mesures sont corrélées avec le comptage de l'eau du bain de dialyse dont 0,4 % ont été retrouvés pour le [^3H] et 0,9 % pour le [^{14}C]. La perte totale estimée au cours de la synthèse est de 23,5 % pour le [^3H] et de 12 % pour le [^{14}C], perte principalement due à l'affinité des solvants organiques pour le plastique. Le rapport [^3H] / [^{14}C] initialement de 4 est passé à 3,5. Ce rapport reste très convenable pour une bonne détection en double comptage.

La perte à l'injection (liquide restant dans l'aiguille, collage à la seringue, erreur sur le pipetage) est évaluée à 11 % pour le [^3H] et à 13 % pour le [^{14}C] (perte équivalente pour les deux), ce qui nous amène à injecter une dose de 1,33 μCi en [^3H] / animal et une dose de 0,38 μCi / animal pour le [^{14}C]. Quant au DiD, les nanoparticules sont dopées à la limite de l'autoquenching du fluorophore afin d'obtenir un bon signal malgré la dilution importante imposée par la radioactivité. Environ 519 molécules de DiD sont retrouvées dans chaque nanoparticule de la solution, permettant une injection de 9,2 nmol de DiD / animal.

Le premix huileux (huile, cire, phospholipides) représente 5,4 % de la formulation de la nanoparticule et les traceurs incorporés représentent 0,68 % de la formulation totale (0,45 % pour le [^3H], 0,15 % pour le [^{14}C] et 0,08 % pour le DiD. La coélution des 3 traceurs sur la colonne d'exclusion stérique (1000 - 5000 DA), après le volume mort de la colonne indique la colocalisation des 3 traceurs dans la nanoparticule (Figure 6).

En conclusion la synthèse de ces lipidots triplement marqués a été réalisée et l'ensemble du lot a été caractérisé d'un point de vue physico-chimique, permettant de poursuivre l'étude chez l'animal.

C. Administration et suivi *in vivo* des Lipidots

L'objectif de cette étude est d'évaluer le devenir *in vivo* des lipidots triplement marqués décrites ci-dessus, après leur injection intraveineuse chez la souris saine femelle ou mâle. Pour ce faire, le devenir *in vivo* des traceurs libres ou encapsulés dans les lipidots est étudié : leur devenir dans le sang (étude de la pharmacocinétique), leur devenir dans les organes (étude de la biodistribution) ainsi que leur répartition à l'échelle tissulaire (histologie).

Les nanoparticules ont été synthétisées à Grenoble, puis expédiées à Orsay où a été réalisé l'ensemble de l'étude *in vivo* avec l'aide de Raphaël Boisgard et Benoit Thezé pour les essais d'histologie.

C.1 Modèle animal retenu et plan expérimental

C.1.1 Choix du modèle animal

Le modèle utilisé pour l'étude est la souris saine FVB/N. C'est une lignée très utilisée en laboratoire car robuste et caractérisée par un taux de fécondité élevé. C'est une lignée homozygote, facile à obtenir (ce qui en réduit le coût) et qui ne développe pas de tumeur dans le temps. Cette lignée a également été choisie par comparaison par rapport à la lignée *Nude* car elle présente un système immunitaire fonctionnel. De plus, un modèle tumoral de cancer du sein a été développé au laboratoire SHFJ sur cette lignée. Le principal inconvénient du choix de ce modèle est l'épilation de la souris nécessaire pour réaliser une image corps complet afin de détecter la fluorescence. Des femelles ont généralement été utilisées, mais suite aux résultats obtenus, des essais supplémentaires sur des mâles ont été réalisés.

C.1.2 Plan expérimental :

L'étude, est divisée en 4 phases :

- injection des traceurs libres ($[^3\text{H}]$ et $[^{14}\text{C}]$ d'un côté, et DiD de l'autre) ;
- injection des nanoparticules triplement marquées chez la souris FVB femelle ;
- injection des nanoparticules triplement marquées chez la souris FVB mâle ;
- injection de nanoparticules « froides » dopées en DiD et supplémentées en cholestéryl stéarate (pour travailler avec la composition la plus proche possible de celle des nanoparticules triplement marquées) chez la souris FVB femelle pour l'étude histologique.

Brièvement, une étude pharmacocinétique est réalisée sur 24 h pour les traceurs libres et la nanoparticule triplement marquée. La voie de prélèvement est le sinus rétro-orbital, les temps de prélèvements sont 1 min, 2 min, 5 min, 8 min, 10 min, 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h 30, 8 h, 24 h. Les prélèvements étant réalisés sur le même animal pendant 24 h, le volume de sang prélevé n'excède pas 10 % du volume sanguin total, n'entraînant pas de modulation physiologique chez l'animal. Le volume prélevé (10 μ L), trop faible pour envisager une séparation du plasma et des globules rouges, permettra seulement le comptage de la radioactivité : la fluorescence ne peut se détecter que sur plasma (les globules rouges masquant le signal). Des données pharmacocinétiques sont aussi extraites de l'étude de biodistribution (le sang étant prélevé à chaque temps de sacrifice). Les profils de concentration plasmatique des 3 traceurs peuvent être comparés.

Pour l'étude de biodistribution, différents organes et fluides sont prélevés. Un balayage rapide des organes a été réalisé afin de caractériser au mieux les lipidots. Sont représentés : les organes de métabolisation (foie, intestin, rein), les organes du système réticulo-endothélial (rate, foie), les organes vitaux (cœur, cerveau avec passage éventuel de la barrière hémato-encéphalique), le muscle (qui sert de référence comme « organe neutre ») et les organes intervenant dans le métabolisme des lipides (comme le tissu adipeux, les ovaires et surrénales qui sont les lieux de synthèse des hormones stéroïdiennes) (Tableau 2).

Organes de métabolisation / élimination	Foie* Intestin Poumon Rate* Rein
Organes utilisant des composés lipidiques	Tissu adipeux Ovaire Surrénales Uterus
Divers	Cerveau Cœur Muscle Pancreas Glandes salivaires
Fluide	Sang total Eléments figurés du sang (cellules) Plasma Urine** Bile**

Tableau II-2 : Liste des différents organes étudiés au cours de la biodistribution. * Organes du système RES, ** données qualitatives (absence ou présence de signal), en raison des temps de prélèvement variables dans une journée et du comportement alimentaire propre à chaque animal.

Aux temps définis, les organes sont prélevés et la fluorescence est évaluée grâce à la Fluobeam™ 700 (Fluoptics®). A la longueur d'onde d'étude (665 nm), il existe une fluorescence propre des tissus (autofluorescence). Cette autofluorescence doit être évaluée sur des souris non injectées puis soustraite du signal de fluorescence des souris injectées avec le traceur DiD. C'est le signal corrigé de l'autofluorescence uniquement dû au DiD libre ou encapsulé dans la nanoparticule qui est représenté dans l'ensemble des graphiques de la thèse.

Une fois les images de fluorescences réalisées, chaque organe est pesé et placé dans une fiole à scintillation afin de subir le procédé de dissolution permettant le comptage de la radioactivité (Chapitre VI, protocole expérimental C)

Concernant l'étude histologique, des nanoparticules non radioactives encapsulant du DiD sont formulées et, pour assurer l'homogénéité de l'étude, les 0,6 % en masse occupés par le [^{14}C]CHO et le [^3H]CHE dans les nanoparticules « chaudes » sont remplacés par du cholesteryl-stéarate en même proportion. Le cholesteryl stéarate est, comme les radiotraceurs, un cholestérol relié à une chaîne grasse (C_{18} , liaison ester). Cette nanoparticule est injectée chez l'animal et 24 h après-injection, les organes sont imagés puis fixés pour être stockés à -80°C avant d'être préparés en coupes de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur pour l'étude histologique.

C.2 Etude de pharmacocinétique

C.2.1 Résultats expérimentaux

Les essais de pharmacocinétiques des traceurs injectés libres ont mis en évidence une clairance instantanée du [^3H]CHE et du [^{14}C]CHO du compartiment sanguin. En effet, même aux temps courts (15 min), aucune radioactivité n'a été retrouvée dans le sang. En revanche, après administration des nanoparticules triplement marquées, un profil cinétique spécifique à première vue d'un modèle bi-compartimental, caractérisé par deux pentes différentes sur les courbes représentant le logarithme de la dose en fonction du temps ($\log(\text{dose}) = f(t)$) a pu être observé (Figure 7). De plus, il est observé une superposition des deux traceurs contrairement aux expériences réalisées avec d'autres traceurs chez le rat (Figure 3).

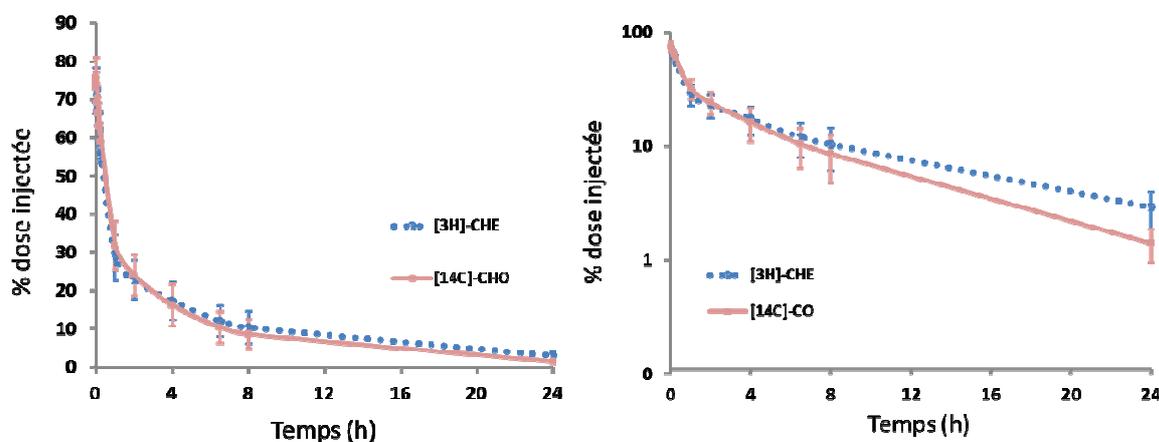


Figure II-7 : Profil de cinétique sanguine des deux radiotraceurs encapsulés dans la lipidot chez la souris femelle FVB.

Les données cinétiques sur plasma issues des biodistributions montrent un profil cinétique similaire pour les 3 traceurs (Figure 7). Les analyses pharmacocinétiques sur ces données sont difficiles à réaliser car, contrairement à la cinétique réalisée précédemment sur 24 h ou chaque point provenait du même animal, dans cette étude chaque point représente 3 animaux différents. La puissance statistique n'est donc pas suffisante, le facteur inter-individu entre chaque point étant une variable supplémentaire. Néanmoins il est observé une même allure de courbe pour les 3 traceurs, et pour les profils [³H]CHE et [¹⁴C]CHO, un résultat similaire à celui de la Figure 8.

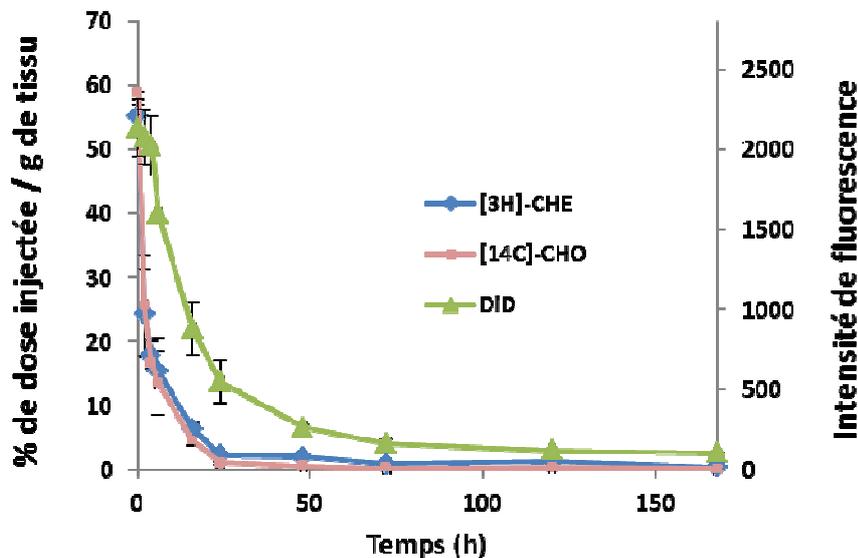


Figure 11-8 : Profil de cinétique plasmatique de la lipidot sur 168 h faisant intervenir les trois radiotraceurs chez la souris femelle FVB.

C.2.2 Modélisation et détermination des paramètres de pharmacocinétique

Les courbes $C_{\text{plasmatique}} = f(t)$ de la Figure 11 peuvent être ajustées par une équation de type $C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$. Dans un tel modèle, les paramètres (A, α) sont caractéristiques de la phase de distribution, les paramètres (B, β) sont caractéristiques de la phase d'élimination. La première phase représente la distribution du produit dans l'organisme et la seconde phase son élimination.

Le logiciel de pharmacocinétique Winolin® a été utilisé pour valider le modèle choisi et calculer les différents paramètres. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr X. Declèves de Paris V, qui m'a donné accès au logiciel.

Dans un premier temps, il a été vérifié que les données soient bien exploitables statistiquement en vérifiant la reproductibilité entre les souris, en vérifiant que les aires sous courbes extrapolées soient inférieures à 20 % de l'aire sous la courbe totale ($AUC_{ext} = 5\%$ pour le $[^3H]CHE$ et $AUC_{ext} = 12\%$ pour le $[^{14}C]CHO$) et enfin que l'aire sous la courbe extrapolée représente au moins 3 demi-vies d'élimination. L'ajustement des courbes expérimentales par le modèle bicompartimental donne les valeurs regroupées Tableau 3 pour les paramètres ($A, \alpha = 1 / t_{1/2 \text{ distribution}}$) et ($B, \beta = 1 / t_{1/2 \text{ d'élimination}}$).

	Distribution		Elimination	
	A ($\mu\text{ci} / \text{mL}$)	t $\frac{1}{2}$ distribution* (h)	B ($\mu\text{ci} / \text{mL}$)	t $\frac{1}{2}$ d'élimination** (h)
$[^3H]-CHE$	0,467 \pm 0,084	0,413 \pm 0,051	0,212 \pm 0,071	7,93 \pm 0,32
$[^{14}C]-CHO$	0,14 \pm 0,03	0,502 \pm 0,131	0,065 \pm 0,028	5,834 \pm 0,438

Tableau II-3 : tableau représentant les différents paramètres pharmacocinétiques de la lipidot concernant la distribution et l'élimination des traceurs suivant un modèle bi compartimental.

* soit $1 / \alpha$, ** soit $1 / \beta$.

A partir des valeurs du Tableau 3, les paramètres d'intérêt de pharmacocinétique sont calculés par le logiciel suivant les équations présentées Annexe 1:

	^{14}C	3H
t $\frac{1}{2}$ distribution (h)	0,50 \pm 0,13	0,41 \pm 0,05
t $\frac{1}{2}$ élimination (h)	5,8 \pm 0,4	7,9 \pm 0,3
Temps de résidence moyen (h)	7,0 \pm 0,5	10,2 \pm 0,8
V distribution (mL)	4,3 \pm 0,8	5,2 \pm 1,0
Clairance (mL / h)	0,6 \pm 0,1	0,52 \pm 0,14

Tableau II-4 : Tableau représentant les différents paramètres pharmacocinétiques des lipidots suivant un modèle bi compartimental.

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel *R*[®] afin d'évaluer si les deux traceurs ont une pharmacocinétique identique. Un test de student bilatéral apparié avec un seuil d'acceptabilité à 0,05 (α) a été établi. La valeur p obtenue pour la $\frac{1}{2}$ vie de distribution est de 0,23 ($> 0,05$), ce qui signifie que la différence entre les deux traceurs n'est pas statistiquement différente. Le $[^{14}C]CHO$ et le $[^3H]CHE$ se distribuent de manière identique, ce

qui laisse présager qu'ils sont présents dans le même environnement, la nanoparticule. Concernant la $\frac{1}{2}$ vie d'élimination, la valeur $p = 0,012 (< 0,05)$, ce qui signifie que la différence entre les deux traceurs est statistiquement différente. Cela signifie que les deux traceurs ont des pharmacocinétiques d'élimination différentes.

C.2.2 Discussion

Les résultats mettent en évidence trois points importants. (1) Une courbe de pharmacocinétique a pu être établie pour les radiotraceurs encapsulés dans lipidots alors que pour les traceurs libres, aucun signal dans le sang n'a été détecté, ce qui indique qu'il existe bien un effet « nanoparticule » qui protège les traceurs. Cet effet n'avait pas été observé avec l'acide palmitique et le DPPC lors de l'étude préliminaire. (2) Les profils de pharmacocinétique des deux radiotraceurs sont similaires, supposant que le [^3H]CHE et le [^{14}C]CHO sont soit encore dans la nanoparticule, soit qu'ils ont le même comportement. (3) Le profil des courbes laisse transparaître une élimination assez rapide des traceurs encapsulés du compartiment sanguin (concentration sanguine des traceurs $< 10\%$ à 8 h après injection). La $\frac{1}{2}$ vie de distribution est courte pour les deux traceurs (de l'ordre de 30 minutes), ce qui signifie qu'ils sont rapidement extravasés ou pris en charge par des molécules présentes dans le sang. La $\frac{1}{2}$ vie d'élimination est quant à elle plus longue (environ 6 h pour le ^{14}C et 8 h pour le ^3H). La nature propre des composés (métabolisable pour le [^{14}C]CHO et non métabolisable pour le [^3H]CHE) est mise en évidence lors de la phase d'élimination : en effet le composé non métabolisable a une $\frac{1}{2}$ vie d'élimination plus élevée que le composé métabolisable, ce qui traduit sa rétention dans l'organisme. Cette observation est également vraie pour les temps de résidence moyens.

C.3 Etude de la biodistribution

L'étude de la biodistribution des lipidots permet d'identifier les organes de métabolisation, d'élimination ou encore d'accumulation des particules. Cela donne également des indications de la toxicité du produit. Puisque ce sont en réalité les différents traceurs incorporés dans la nanoparticule qui sont suivis, leur biodistribution doit être comparée à celle des traceurs libres injectés en solution pour mettre en évidence l'effet dû à la nanovectorisation par la particule lipidique.

C.3.1 Biodistribution des traceurs libres chez la souris femelle FVB

L'étude a été divisée en deux parties, la première consistant à évaluer la biodistribution des traceurs radioactifs [¹⁴C]CHO et [³H]CHE et la seconde à évaluer la biodistribution du fluorophore DiD. Les radiotraceurs purs sont vendus dans des solvants organiques type toluène / éthanol (maximum toléré de solvant organique à l'injection de 10 %). Les concentrations en radiotraceurs injectées sont identiques à celles choisies pour l'étude des lipidots, à savoir pour chaque animal 0,5 µCi en [¹⁴C]CHO et 2 µCi en [³H]CHE dans 93 % de PBS 1 X et 7 % de solvant organique.

En revanche, le DiD est un composé très hydrophobe qui ne peut pas être injecté tel quel par voie intraveineuse car il pourrait former des agrégats et boucher les artères. Pour le formuler, un surfactant est ajouté, le Tween® 80, afin de former des micelles encapsulant et solubilisant le DiD. Le DiD représente 1,2 % de la formulation, le Tween®80 1,5 % et PBS 1X, soit 97 %. La taille des micelles obtenues est de l'ordre de 16 nm avec une polydispersité de 0,3. Une mesure de stabilité réalisée 100 jours après indique une taille de 17 nm avec une polydispersité de 0,3. La concentration en DiD dans les micelles est identique à la concentration en DiD dans les nanoparticules.

Pour faciliter la lecture graphique, les résultats concernant le [³H]CHE sont toujours représentés de couleur bleue, le [¹⁴C]CHO de couleur rose et le DiD de couleur verte. Les résultats des biodistributions obtenues après injection des radiotraceurs seuls et après injection du DiD, sont représentés Figure 9.

Pour les radiotraceurs, l'organe principal d'accumulation, que ce soit pour le [³H]CHE ou pour le [¹⁴C]CHO, est le poumon, avec un pic d'accumulation 16 h après injection à plus de 120 % de dose injectée / g de tissu pour le [³H]CHE et plus de 250 % de dose injectée / g de tissu pour le [¹⁴C]CHO. Un signal est également observé dans le foie pour les deux radiotraceurs, (pic à 7 % de dose injectée / g de tissu pour le [¹⁴C]CHO et à 12 % de dose injectée / g de tissu pour le [³H]CHE) 16 h après injection; ainsi que dans la rate (maximum à 11 % de dose injectée / g de tissu 24 h après injection pour le [³H]CHE et maximum à 5 % de dose injectée / g de tissu 16 h après-injection pour le [¹⁴C]CHO). Les deux radiotraceurs sont quasiment éliminés du corps 24 h après injection.

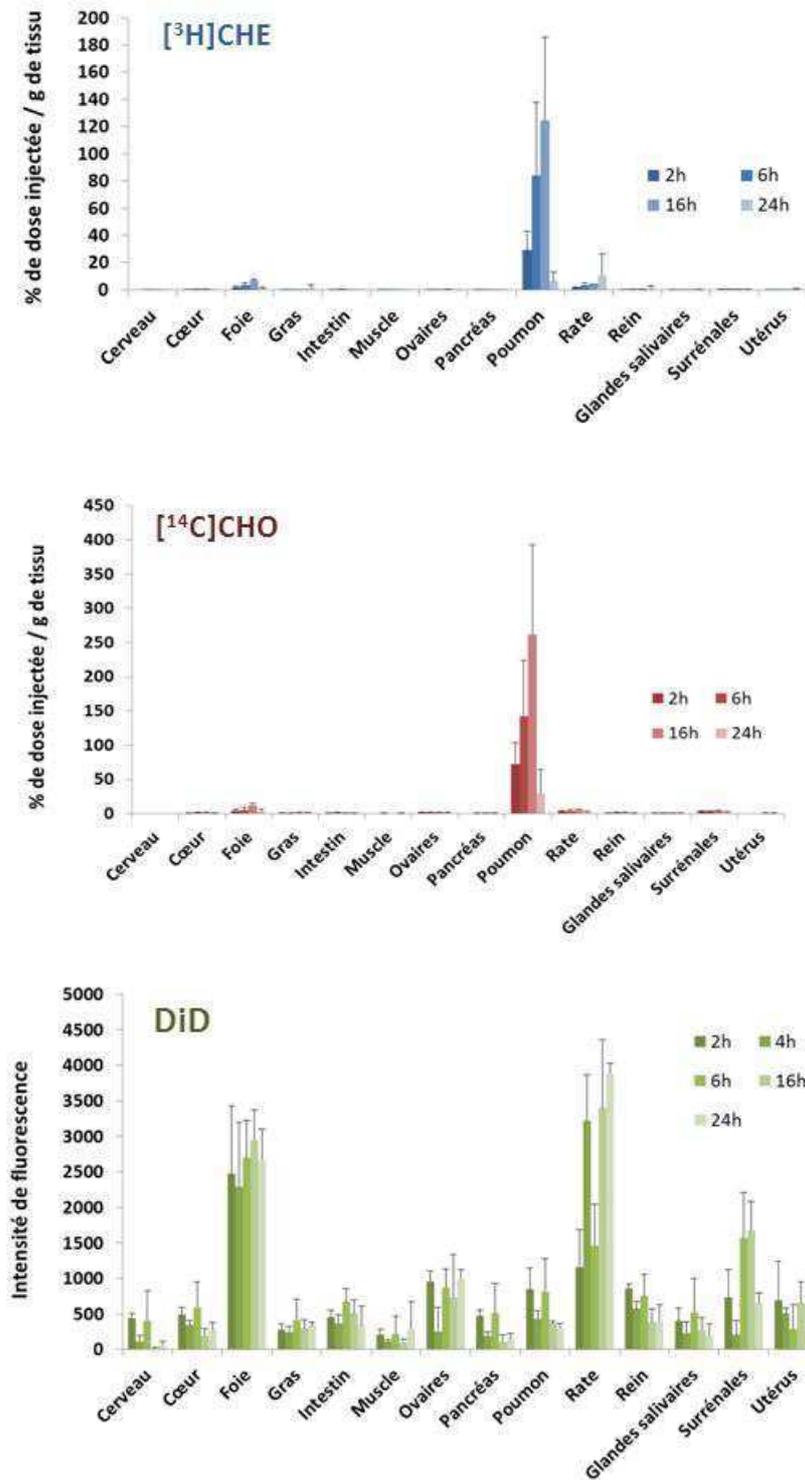


Figure II-9 : Biodistribution des trois traceurs libres ($[^3\text{H}]\text{CHE}$ en bleu, $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ en rose et DiD en bleu) chez la souris femelle FVB de 2 h à 24 h après injection.

La fluorescence est une technique semi-quantitative qui possède un bruit de fond beaucoup plus important que la radioactivité. Ce bruit de fond est mis en évidence Figure 13 par le non-retour à la ligne de base de la fluorescence, et par des écarts type plus grands qu'avec la radioactivité. Une accumulation du traceur fluorescent est observée dans le foie sans pic maximum (signal constant pendant 24 h). Un fort signal est observé dans la rate avec un maximum d'intensité de fluorescence à 24 h après injection. Les autres organes présentent un signal dans le bruit de fond et / ou bien des écarts types élevés. Aucun signal, qu'il soit fluorescent ou radioactif, n'a été retrouvé dans les urines.

C.3.2 Biodistribution des nanoparticules triplement marquées chez la souris femelle FVB

Les résultats de biodistribution des 3 traceurs encapsulés dans les lipidots sont regroupés Figure 10.

Les trois graphiques ($[^3\text{H}]\text{CHE}$ en bleu, $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ en rose et DiD en vert) mettent en évidence que les 3 traceurs encapsulés dans la particule sont présents au même moment dans trois organes qui sont le foie, les ovaires et les glandes surrénales. La nature intrinsèque des traceurs est également retrouvée : le composé métabolisable, à savoir le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ est très vite éliminé de l'organisme (dans les 48 h après injection), tandis que le composé non métabolisable ($[^3\text{H}]\text{CHE}$) est retrouvé dans les organes même 7 jours après injection (Figure 15). Le DiD semble quant à lui suivre le même comportement que le composé tritié. Si nous prenons l'exemple du foie, organe de métabolisation des lipides, le maximum est atteint pour le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ 2 h après-injection avec une valeur de 20 % de dose injectée / g de tissu tandis que pour le $[^3\text{H}]\text{CHE}$ et le DiD, le maximum est observé 48 h après injection avec un maximum de 59 % de la dose injectée / g de tissu pour le $[^3\text{H}]\text{CHE}$. Au temps d'observation le plus long, à savoir 168 h après-injection, le % de dose injectée / g de tissu du $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ est de 0,28 alors qu'il reste encore 33 % de la dose injectée / g de tissu pour le $[^3\text{H}]\text{CHE}$ dans le foie. L'accumulation dans le foie du $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ avait également été observée chez le rat dans l'étude préliminaire (Figure 4) avec 6 % de dose injectée / g de tissu à 24 h après injection.

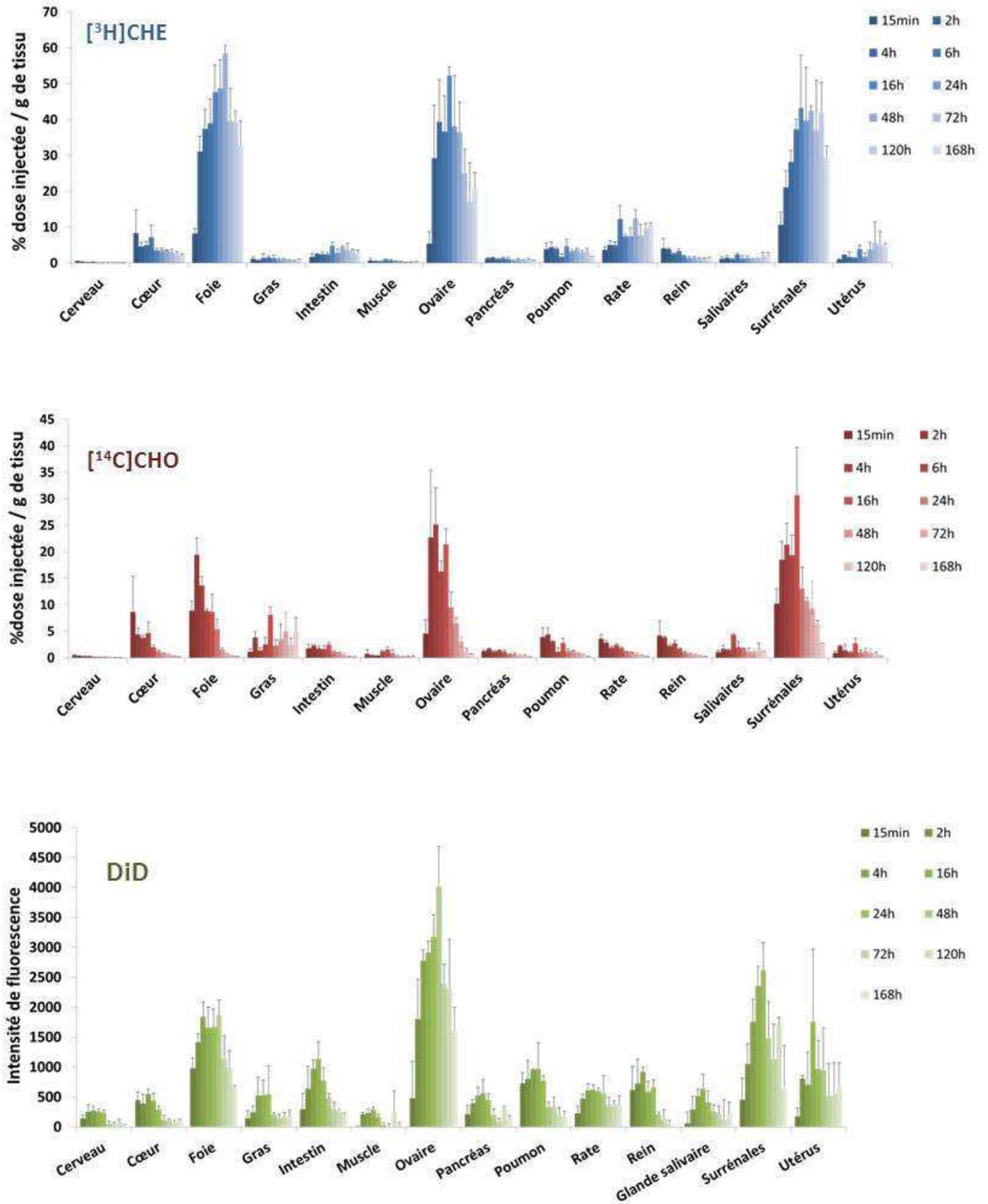


Figure II-10 : Biodistribution des trois traceurs encapsulés ($[^3\text{H}]\text{CHE}$ en bleu, $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ en rose et DiD en bleu) dans la lipidot chez la souris femelle FVB de 15 min à 168 h après injection.

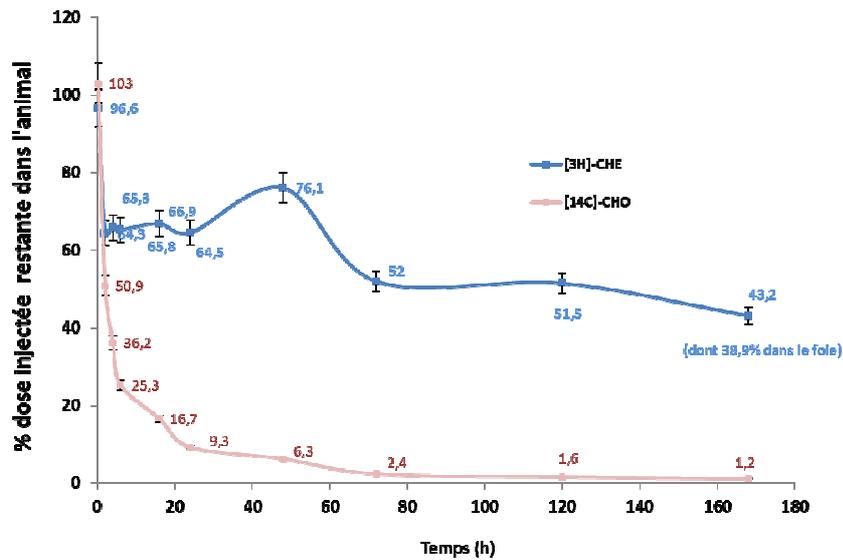


Figure II-11 : Dose de radioactivité restante dans l'animal au cours du temps.

Une bioaccumulation particulière est observée dans les ovaires et les surrénales où de très fortes concentrations sont retrouvées. Les doses maximales atteintes dans les ovaires sont de 25 % de dose injectée / g de tissu, 52 % de dose injectée / g de tissu et 4018 en intensité de fluorescence pour respectivement le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ 4 h après injection, le $[^3\text{H}]\text{CHE}$ 16 h après injection et le DiD 48 h après injection. Il en est de même avec les surrénales avec une accumulation 16 h après injection de 43 % de dose injectée / g de tissu pour le $[^3\text{H}]\text{CHE}$ et 30 % de dose injectée / g de tissu pour le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$. Il est également à noter qu'aucun signal n'a été retrouvé dans la rate en ce qui concerne les lipidots triplement marquées.

Par ailleurs, aucun signal n'a été retrouvé dans les urines ou dans les globules rouges. Un important signal a été retrouvé dans la bile lorsqu'il était possible de la prélever, ce qui est en accord avec la forte présence des traceurs dans le foie.

Les résultats d'analyse *ex vivo* des organes sont confirmés visuellement par imagerie de fluorescence *in vivo* et *ex vivo* après sacrifice de l'animal après injection de nanoparticules froides (Figure 12).

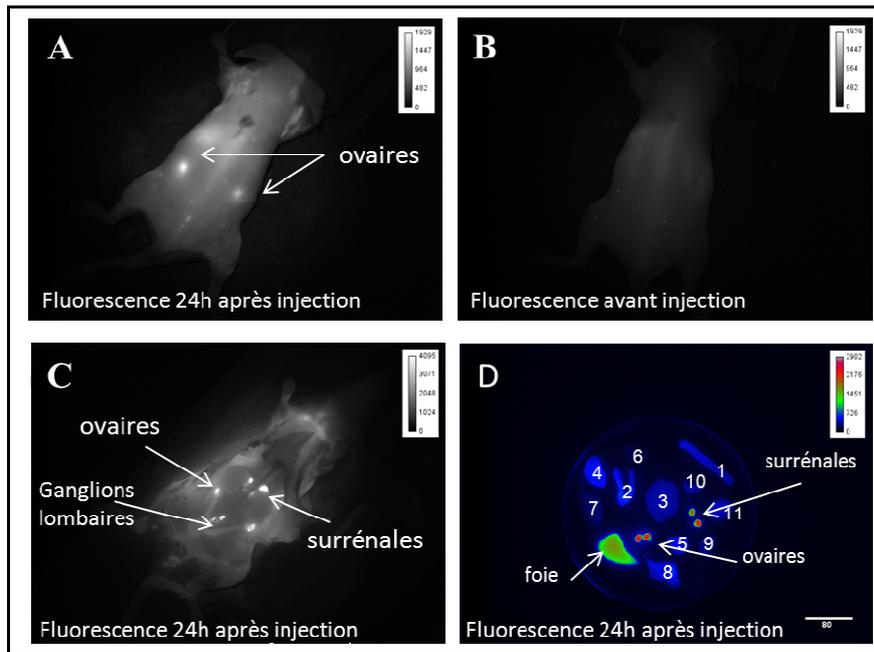


Figure II-12. Imagerie par fluorescence des organes stéroïdiens 24 h après injection de $1,2 \cdot 10^{13}$ nanoparticules dopées en DiD chez la souris femelle saine (le temps d'exposition est de 100 ms pour toutes les photos). A) Imagerie *in vivo* des ovaires 24 h post injection. B) Photo de fluorescence du dos de la souris avant injection (autofluorescence). C) Fluorescence des organes stéroïdiens et des ganglions lombaires après laparotomie. D) Image de fluorescences des principaux organes *ex vivo*. 1 : intestin; 2 : utérus (conformation normale); 3 : cerveau; 4 : rein; 5 : rate ; 6 : poumon; 7 : glandes salivaires; 8 : pancréas; 9 : muscle; 10 : tissu adipeux; 11 : cœur.

Ces clichés mettent en évidence une accumulation des lipidots dans les organes stéroïdiens et dans certains ganglions. L'observation sur la Figure 12D, représentant l'ensemble des tissus *ex vivo* 24 h après injection, d'un signal moyen (couleur verte sur l'échelle des couleurs) dans le foie, d'un signal intense dans les ovaires et surrénales (couleur rouge sur l'échelle des couleurs) et d'une absence de signal dans les autres organes (couleur bleue sur l'échelle des couleurs) confirment les résultats obtenus précédemment. L'accumulation importante dans les ovaires, qui sont des organes proches de la peau au niveau du dos, permet de les visualiser *in vivo* directement à travers la peau (Figure 12 A). Les surrénales, qui sont des organes plus profonds, ne sont pas visibles directement. Après laparotomie de l'animal (Figure 12C) et résection du système digestif, il devient facile de distinguer les surrénales et les ovaires. Les ganglions lombaires sont également intensément fluorescents (Figure 12C). Un signal dans d'autres ganglions comme les ganglions brachiaux, axillaires, rénaux et sciatiques a déjà été observé. Un comptage radioactif a également été réalisé sur quelques prélèvements : le taux de radioactivité exprimé en % de dose injectée /

g de tissu était très élevé (aucune valeur chiffrée ne peut être donnée car il est très aléatoire de déterminer le poids exact pour les des ganglions à cause de leur petite taille).

Une modification morphologique de l'utérus a parfois été observée après dissection de l'animal (dans 1 cas sur 5): l'organe était gonflé avec l'apparition de stries accompagné en général d'une très forte fluorescence, d'où l'importance des barres d'erreur (Figure 10). L'autofluorescence évaluée sur les utérus de souris non injectées avait une conformation normale. On sait que l'apport en hormone est variable suivant le type de souris et son cycle. Les coupes histologiques réalisées sur ces organes ont montré qu'il n'y avait pas de trace de fluorescence de DiD (Figure 14). Ce fort signal peut donc être dû à un afflux hormonal, présentant une forte autofluorescence à cette longueur d'onde. La figure 16 représente une biodistribution de souris dont la morphologie de l'utérus est normale et qui ne présente pas de fluorescence importante.

C.3.3 Evaluation de la biodistribution des Lipidots triplement marqués chez la souris mâle FVB/N

La biodistribution des 3 traceurs encapsulés dans la lipidot chez la souris mâle FVB/N a également été étudiée. En effet, même si la plupart des organes sont communs avec la femelle, la similarité des biodistributions est à vérifier. De plus, les organes cibles des hormones stéroïdiennes sont différents chez les mâles et les femelles. Le même lot de nanoparticules que celui utilisé chez la femelle a été injecté avec une quantification dans les organes aux temps de 2 h, 4 h, 6 h, 16 h, 24 h, 48 h, et 72 h après injection. Les organes analysés sont les organes de métabolisation et d'élimination des particules étrangères, à savoir le foie, l'intestin, les poumons, la rate et les reins et les organes sexuels ou utilisateurs de lipides à savoir le tissu adipeux, les testicules, les vésicules séminales ou encore les surrénales (Figure 13).

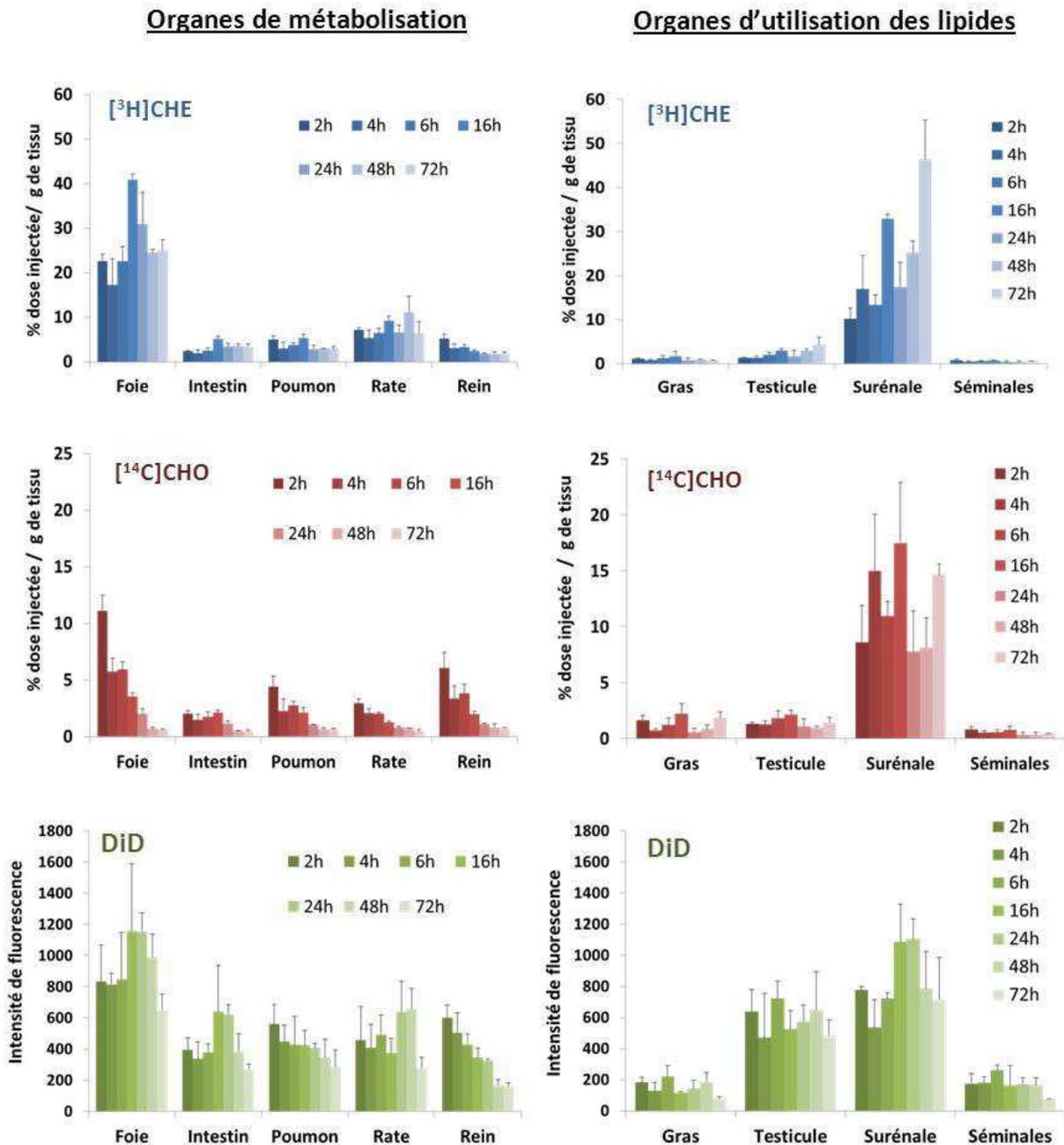


Figure II-13 : Biodistribution des lipidots triplement marqués chez la souris mâle FVB.

Un signal important est observé dans le foie, avec une persistance pour le traceur non métabolisable [³H]CHE. Un fort taux des trois traceurs est également retrouvé dans les surrénales, comme observé précédemment chez la femelle. En revanche, aucun signal radioactif n'est observé dans les testicules alors que le signal est observé en fluorescence de manière constante et reproductible. Aucun signal, ni fluorescent, ni radioactif n'est observé dans les vésicules séminales.

Un signal de fluorescence (et absence de radioactivité) avait été observé dans l'utérus chez la femelle, mais de manière moins constante que celui observé dans les testicules chez le mâle.

C.4 Etude à l'échelle tissulaire

Afin d'évaluer la biodistribution fine au sein des organes accumulant les nanoparticules, des études histologiques ont été réalisées avec l'aide de B. Thézè, Ingénieur d'étude au SHFJ. Seuls les organes d'intérêt ont été étudiés à savoir les ovaires, les glandes surrénales, le foie, la rate, le rein et l'utérus.

Le DiD est un fluorophore sensible aux méthodes traditionnelles de fixation, donc le protocole utilisé au cours de cette étude a été optimisé et est présenté Chapitre VI, Protocole expérimental E. Après avoir fixé et coupé les organes à une épaisseur de 5 μm , un marquage des noyaux cellulaires au DAPI est réalisé (Chapitre VI, Protocole expérimental E). La longueur d'émission du DAPI (461 nm) est différente de celle du DiD (725 nm), ce qui permet leur détection simultanée avec le microscope confocal. Des coupes sont également colorées par l'hématoxyline-éosine afin d'évaluer la morphologie structurale.

La Figure 14 présente les coupes de foie, de rein, de rate et d'utérus obtenues à partir d'organes prélevés 24 h après injection des lipidots dopés par le DiD.

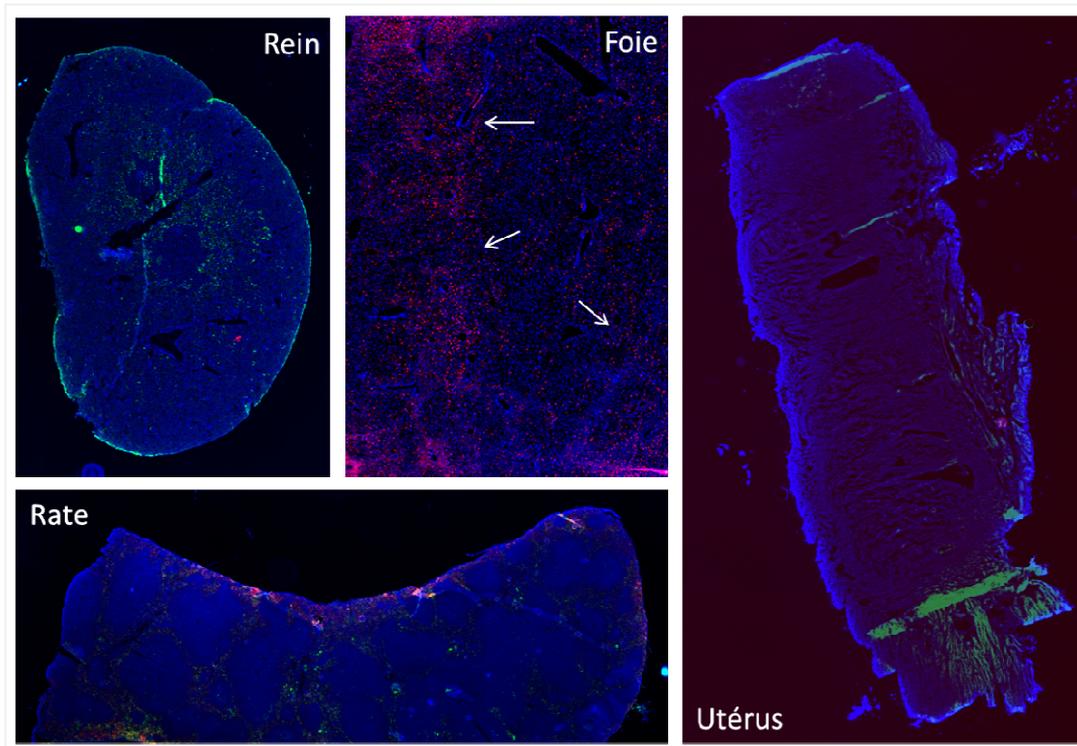


Figure II-14 : Coupes histologiques du rein, du foie, de la rate et de l'utérus 24 h après injection de la lipidot supplémentée en cholestéryl stéarate et dopées en DiD chez la souris FVB femelle.

Comme observé avec la Fluobeam® 700, aucun signal n'est observé dans le rein ou la rate. Un signal est observé dans le foie avec une répartition assez homogène du signal dans l'ensemble de l'organe.

Une attention particulière a été portée sur les organes stéroïdiens, ovaires et surrénales (Figure 15).

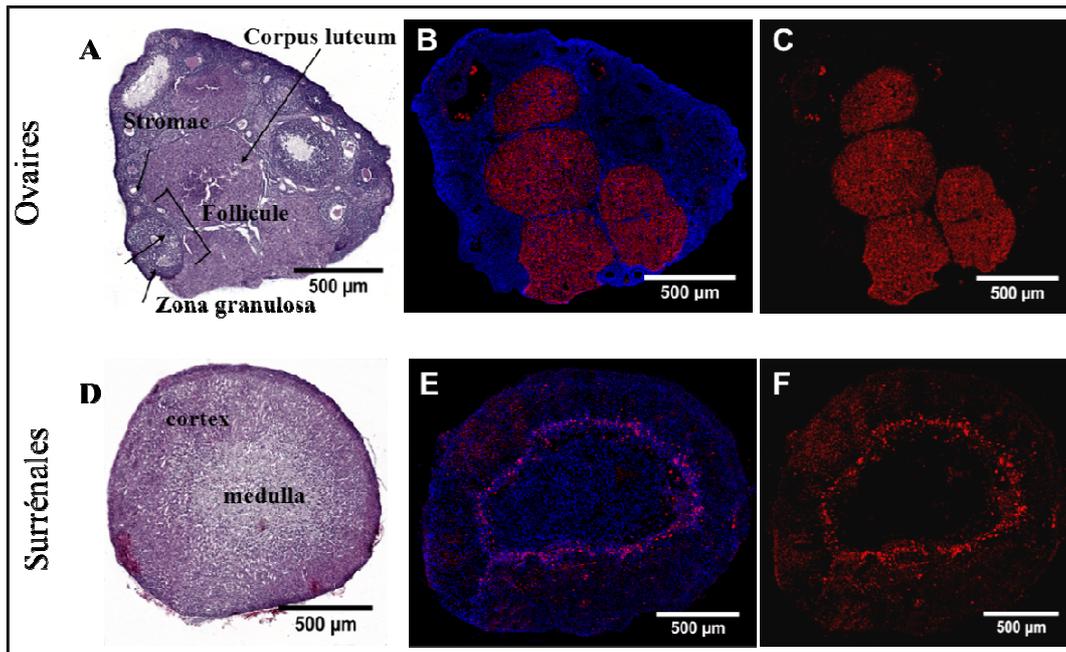


Figure II-15 : Analyse histologique des ovaires et des surrénales. A et D) Coloration à l'hématoxyline éosine des ovaires et des surrénales. B et E) superposition des images de fluorescence sur des coupes marquées au DAPI (coloration bleue des noyaux) avec le signal du DiD (rouge) des nanoparticules. C et F) Images de fluorescence du DiD.

Concernant les ovaires, l'accumulation des lipidots se fait exclusivement dans le *corpus luteum* ou corps jaune. Le corps jaune se forme pendant la seconde partie du cycle de l'ovaire (appelée phase lutéale) et recrute des lipides pour synthétiser et sécréter de la progestérone sous contrôle d'une hormone hypophysaire, la LH (hormone lutéale). La progestérone a pour rôle de maintenir la muqueuse utérine apte à accueillir l'embryon lors de la nidation

Concernant les surrénales, la localisation est retrouvée uniquement dans la zone corticale des surrénales. Cet organe est divisé en deux parties majeures, la medulla (centrale) et le cortex. La zone corticale a pour caractéristique d'être divisée en zones bien définies d'un point de vue cellulaire, chaque zone synthétisant un type précis d'hormone. Une localisation globale dans une de ces trois couches du cortex (la zone glomérulée, contenant principalement l'aldostérone ; la zone fasciculée, contenant principalement le cortisol et la zone réticulée, contenant principalement les gonadotropines) est observée avec une accumulation supérieure dans la zone réticulée.

C.5 Discussion

C.5.1 Choix des traceurs

Le choix de traceurs capables de décrire au mieux le devenir *in vivo* de la nanoparticule n'a pas été simple. En effet, lors des premiers essais réalisés chez le rat, l'acide palmitique, localisé à priori dans le cœur de la lipidot grâce à sa longue chaîne lipophile avant injection, a été éliminé très rapidement du plasma après injection, à la même vitesse que le traceur libre en solution. La phosphatidylcholine ($[^3\text{H}]\text{DPPC}$), traceur à base de phospholipides, souvent étudié dans des expériences sur la mobilité de la couronne des liposomes, est connue pour avoir une interaction très importante avec le milieu environnant, créant des échanges actifs avec des protéines plasmatiques et plus particulièrement les HDL^{167, 168, 170-172}. Ce traceur semble avoir également la même pharmacocinétique, qu'il soit injecté libre ou encapsulé dans les lipidots. Néanmoins, une différence de biodistribution des traceurs libres par rapport aux traceurs encapsulés est observée pour ces deux traceurs, montrant peut être un « effet nanoparticule » mais très fugace dans le temps. En contact avec les protéines plasmatiques, la lipidot semble donc être un système qui peut laisser fuir des molécules présentes initialement dans le cœur de la particule de façon stable. La couronne de phospholipides de la particule semble également interagir très activement avec son milieu environnant, certainement par échange de phospholipides entre la couronne des lipidots et les protéines plasmatiques (notamment les HDL¹⁷²).

Au vu des résultats préliminaires obtenus chez le rat montrant une durée de vie plasmatique prolongée du traceur $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ après injection, pouvant refléter le comportement du cœur de la nanoparticule, il a été choisi de marquer triplement la lipidot par des traceurs similaires. Deux dérivés de cholestérol couplés à une chaîne grasse ont ainsi été utilisés en espérant leur conférer un bon ancrage dans le cœur de la nanoparticule. Dans des conditions physiologiques, le cholestéryl oléate (CHO) est capté et hydrolysé dans les deux heures suivant injection¹⁷¹. Après cette hydrolyse, la partie cholestérol est ajoutée à la réserve du cholestérol libre et la partie oléate est réutilisée pour la synthèse de phospholipides en majeure partie, mais également de tryacylglycérol¹⁷¹. Ce marqueur permet donc de mettre en évidence la métabolisation des lipidots. Le cholesteryl hexadecyl ether $[^3\text{H}]\text{CHE}$ est un dérivé de cholestérol relié à la chaîne grasse hexadecyl par une liaison éther non métabolisable, ce qui en fait un marqueur inerte et non échangeable. Il est considéré comme un traceur de référence pour l'étude des membranes des liposomes^{70, 167,}

¹⁷¹. Le DiD est un fluorophore de nature très lipophile, avec une tête cyanine légèrement polaire et deux chaînes en C₁₈. Déjà utilisé dans d'autres études du laboratoire, il a montré de bonnes propriétés de fluorescence en milieu lipidique, mais une absence de fluorescence dans l'eau¹⁴⁶. De plus, nous montrerons au Chapitre III par RMN, que sa localisation très probable est dans le cœur des lipidots. Ainsi nous disposons d'un traceur dont la localisation au sein de la particule a été identifiée. Une bonne corrélation entre la technique de fluorescence et la technique de radiomarquage permettrait à l'avenir de n'utiliser que l'imagerie de fluorescence, non radioactive et moins lourde à mettre en place.

Pour augmenter les chances de suivre la lipidote et non le traceur encapsulé, une nanoparticule triplement marquée au niveau du cœur a donc été construite avec du [¹⁴C]CHO, du [³H]CHE et du DiD. En jouant sur les techniques de marquage et la composition chimique des traceurs, plusieurs informations peuvent être récoltées. Le rapport entre ces composés permet de déterminer à quel moment la nanoparticule commence à perdre son intégrité et à être métabolisée. La nature de la liaison chimique entre le cholestérol et la chaîne grasse qui lui est associée permet également d'obtenir des informations sur la métabolisation des lipidots grâce au [¹⁴C]CHO et sur les organes d'accumulation avec le [³H]CHE.

C.5.2 Pharmacocinétique

La similarité de profil entre les 3 traceurs, et le fait que ces profils soient différents de ceux des traceurs libres, semble démontrer que les 3 traceurs restent associés, certainement dans le cœur de la nanoparticule (où est très probablement localisé le DiD lors de la préparation des particules, comme montré Chapitre III), et ce jusqu'à 16 h après injection. Une phase de distribution et une phase d'élimination sont clairement visibles et un modèle bicompartimental a été retenu pour l'analyse quantitative des données. Ce modèle suggère que la totalité de la nanoparticule est éliminée 24 h après injection. Néanmoins, le signal des 3 traceurs reste présent au moins jusqu'à 48 h après injection et ces signaux sont notamment retrouvés dans les organes stéroïdiens. Une hypothèse est que ces organes seraient considérés comme des organes profonds qui relargueraient de façon infime des composants de la nanoparticule, permettant de maintenir le signal radioactif à un niveau très bas dans le plasma. Nous serions donc face à un modèle de pharmacocinétique

tricompartimental et non bicompartimental. Nous avons tenté de valider cette hypothèse en utilisant les données plasmatiques issues de la biodistribution sur 168 h, mais la force statistique était trop faible, ce qui a rendu l'exploitation des résultats impossible, et n'a pas permis de valider l'hypothèse émise.

C.5.3 Biodistribution

La Figure 16 fait ressortir les éléments essentiels à retenir de l'étude de biodistribution à l'échelle des organes. Sur les graphiques de gauche sont représentés la biodistribution des traceurs libres et sur les graphiques de droite, celle des traceurs encapsulés dans la lipidot.

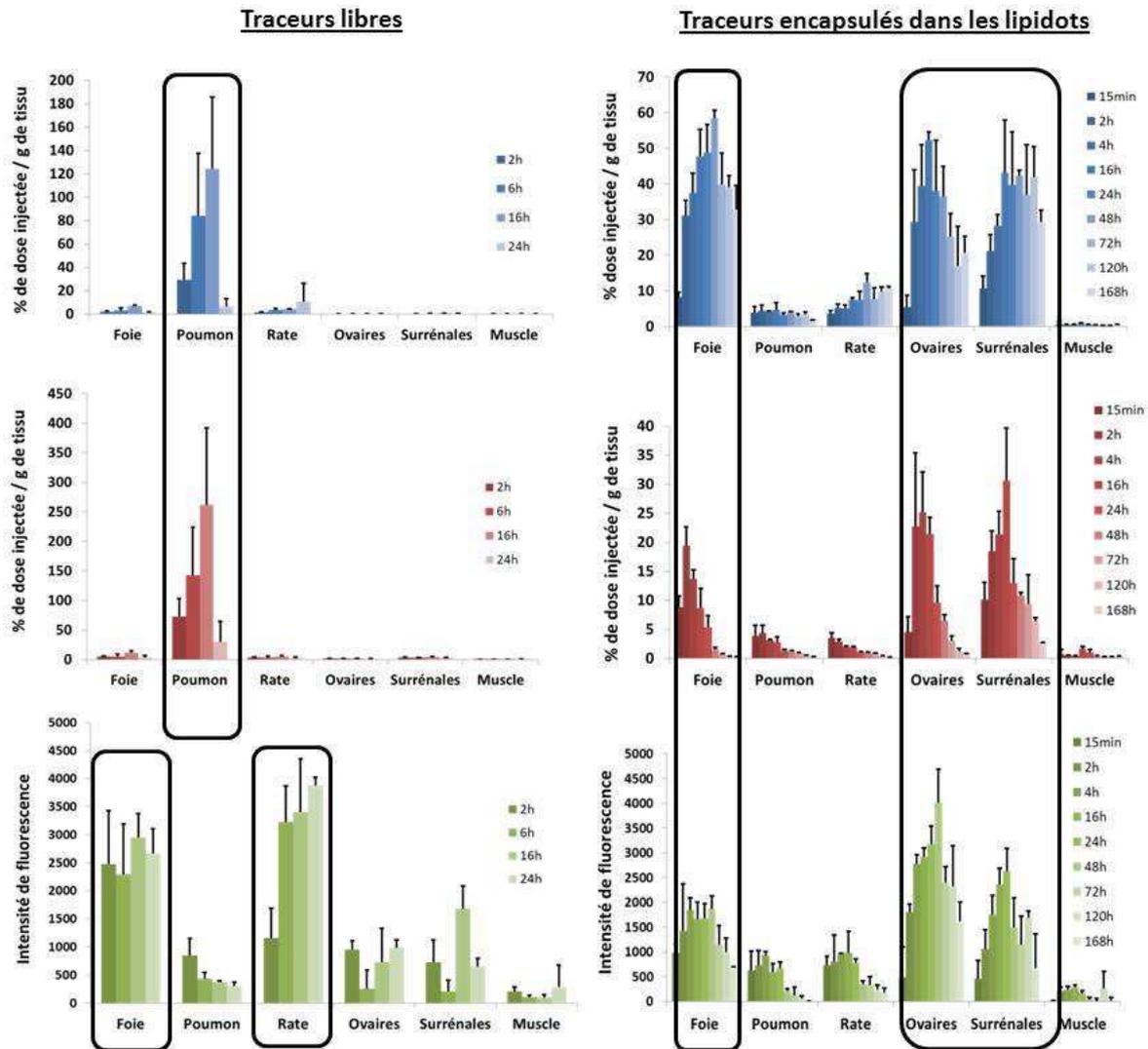


Figure II-16 : Récapitulatif des distributions des traceurs libres chez la souris FVB et des traceurs encapsulés dans la lipidot après injection intra veineuse chez la souris femelle FVB.

De manière générale, la Figure 16 met en évidence qu'il existe **(1)** un effet « nanoparticule » : la biodistribution des traceurs seuls est différente de celle des traceurs encapsulés dans la lipidot. En effet, les traceurs libres radioactifs s'accumulent principalement dans les poumons et un peu dans le foie alors que le DiD s'accumule dans le foie et la rate⁶¹. A contrario, lorsque ces traceurs sont encapsulés dans les lipidots, ils sont retrouvés tous les trois dans les mêmes organes, à savoir le foie, les ovaires et les surrénales. Cette biodistribution particulière n'avait pas été observé chez le rat car les surrénales n'avaient pas été prélevées. **(2)** La voie de métabolisation des lipidots est la voie hépato-biliaire, voie classique pour les molécules lipidiques. **(3)** Aucune accumulation n'a été

observée dans la rate contrairement à la plupart des systèmes lipidiques connus notamment les liposomes⁷¹. La lipidot semble donc se présenter comme une nanoparticule furtive vis-à-vis des organes du RES. **(4)** Les organes vitaux comme le cœur ou les poumons n'accumulent pas les lipidots, et la lipidot ne semble pas passer la barrière hématoencéphalique intacte. **(5)** L'utilisation de traceurs métabolisables représentatifs de l'ensemble des composés biodégradables de la nanoparticule met en évidence une élimination rapide du vecteur par l'organisme (plus de 90 % éliminés après 24 h et 100 % à 48 h après injection), suggérant une absence de toxicité due à une rétention de nanoparticules sur le long terme, comme celle observée avec les boîtes quantiques ou les nanoparticules d'or^{39, 48}.

Le temps de début de la métabolisation des lipidots dans les organes où elles se distribuent peut être évalué par le temps au bout duquel la décorrélacion de signal entre les deux traceurs radioactifs commence à être observée. Elle débiterait ainsi dans le foie 2 h après injection (Figure 17). Concernant les ovaires, la dissociation du signal est plutôt observée entre 16 h et 24 h après injection et seulement à partir de 24 h après injection pour les surrénales. Le rapport entre les concentrations du [¹⁴C]CHO et du [³H]CHE (Figure 18) met en évidence les comportements différents des deux traceurs dans l'organisme, avec une élimination rapide du traceur ¹⁴C éliminé par clivage entre la partie cholestérol et la partie acide gras.

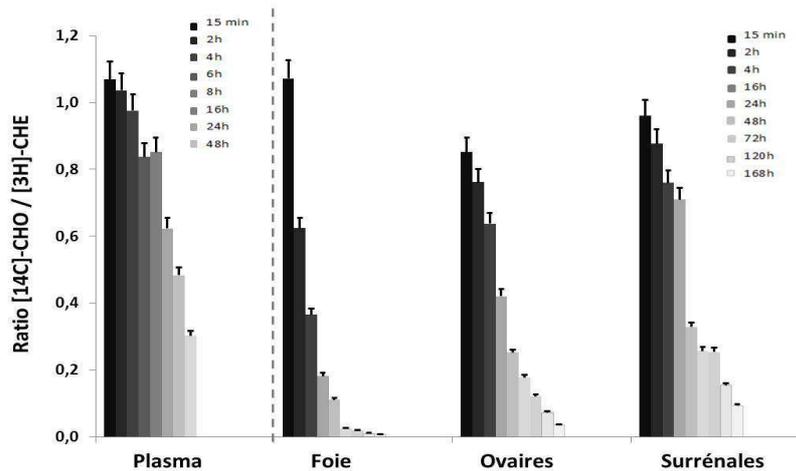


Figure II-17: Ratios entre les deux radiotraceurs [¹⁴C]CHO et [³H]CHE dans le plasma et dans les organes faisant intervenir des lipides.

Le ratio DiD / ^3H (Figure 18) reste constant dans les 3 organes jusqu'à 7 jours après injection, ce qui nous permet de confirmer que le DiD présente le comportement d'une molécule non métabolisable par l'organisme.

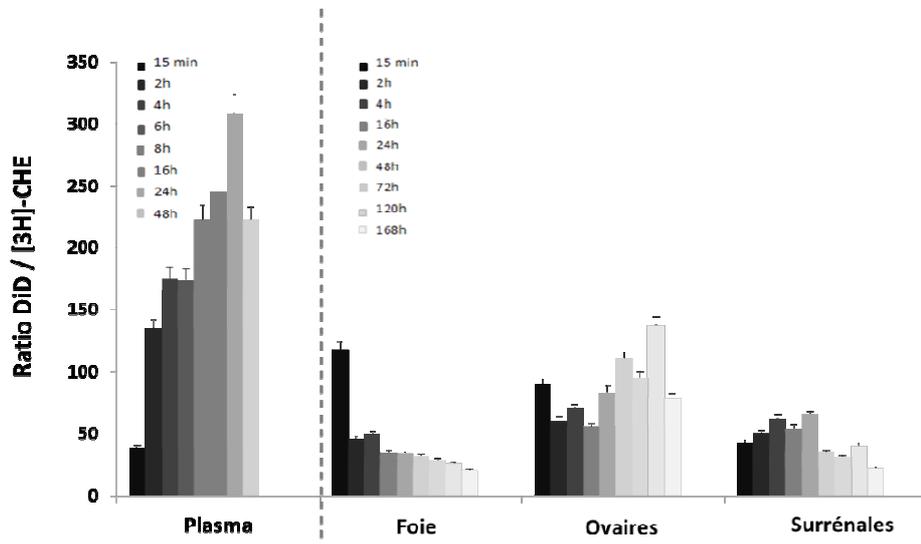


Figure II-18 : Ratios entre le DiD et le ^3H CHE dans le plasma et dans les organes faisant intervenir des lipides.

Il a été observé une biodistribution particulière des nanoparticules dans les organes stéroïdiens, pour lesquels les lipidots semblent avoir une affinité. L'hypothèse émise est que la nanoparticule pourrait mimer une source de précurseurs d'hormones stéroïdiennes du fait de sa composition en lipides, acide gras et huile. La localisation spécifique observée en histologie montre une accumulation massive dans le corps jaune des ovaires, lieu de synthèse de la progestérone, et dans la zone corticosurrénale des surrénales, lieu de la synthèse de la cortisone, du cortisol et de la DHEA en particulier. Il est à noter que cette accumulation n'est pas neutre, en effet les ovaires font parti des organes reproducteurs et l'interférence de la présence de nanoparticules sur son activité doit être étudiée ainsi que les effets tératogènes possibles. L'accumulation du vecteur dans le foie et dans les surrénales a bien été retrouvée chez la souris mâle. En revanche, aucune accumulation dans les testicules ou vésicules séminales n'a été observée, bien qu'il s'agisse de lieux de synthèse des hormones stéroïdiennes masculines.

C.5.4 Modulation du ciblage spontané par modification de la formulation

Suite à la biodistribution inattendue des lipidots dans les organes stéroïdiens, l'influence des traceurs incorporés a été étudiée. En effet, la composition de base des lipidots initialement développée, n'inclut pas le cholestérol ou ses dérivés. De plus les hormones stéroïdiennes présentent dans leur structure un noyau stérol comme le cholestérol. L'accumulation des nanoparticules encapsulant les traceurs radioactifs [^3H]CHE et [^{14}C]CHO dans les organes stéroïdiens pourrait donc être fortuite, liée à la présence même des traceurs. Une étude consistant à enrichir la formulation de base (huile, cire, lécithine, stéarate de PEG) des lipidots dopées en DiD (non radioactives) avec des quantités croissantes de cholestérol ou de stéarate de cholestérol a donc été réalisée. La faisabilité technique de telles formulations, la stabilité physico-chimique ainsi que leur biodistribution *in vivo* ont donc été étudiées, et comparées avec celles de la formulation de base des nanoparticules.

C.5.4.a Formulations enrichies cholestérol ou stéarate de cholestérol

La proportion des radiotraceurs dérivés de cholestérol (à chaîne grasse en C_{16} et C_{18}) incorporés dans la lipidot triplement marquée représente 0,6 % de la formulation en masse. Différentes formulations avec une supplémentation en cholestérol ou cholestéryl stéarate ont été réalisées (Tableaux 5 et 6). Le cholestéryl stéarate est structurellement très semblable aux radiotraceurs utilisés, alors que le cholestérol ne présente qu'une courte chaîne lipophile (Figure 19).

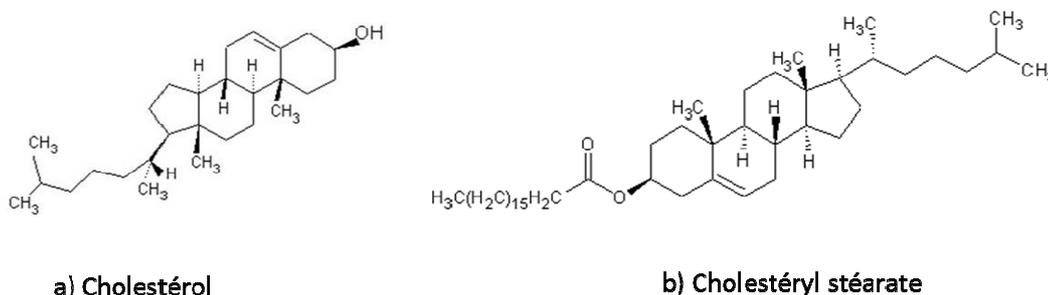


Figure II-19 : Formules chimiques a) du cholestérol et b) du cholestéryl stéarate.

Le cholestéryl stéarate, à de fortes concentrations, se dissout difficilement dans la premix huileux. A partir de 3 % en supplémentation, des difficultés de formulation sont

observées, notamment l'apparition d'une double population en taille. Pour cette raison, une supplémentation maximale de 2 % est retenue pour les formulations testées.

	Matière première	Quantité (lot 2ml)	% en masse de la formulation totale
Premix huileux	LipoidS75™	17 mg	0,85
	Suppocire	68 mg	3,4
	Huile de soja	23 mg	1,15
Supplémentation	Cholestéryl-stéarate	1,2 mg	0,6
		4,0 mg	2,0
Phase aqueuse	MyrjS40™	92 mg	4,6
	PBS 1X	1800 µL	90

Tableau II-5: Formulations supplémentées en cholestéryl stéarate testées.

Le cholestérol, contrairement au cholestéryl stéarate, se dissout très bien dans la phase huileuse, ce qui permet des taux d'encapsulation très élevés allant jusqu'à 10 % (m / m).

Formulation (dopage en cholestérol)	0,6% CH	2% CH	5% CH	10% CH
LipoidS75™	17 mg (0,85 %)			
Suppocire	68 mg (3,4 %)			
Huile de soja	23 mg (1,15 %)			
Cholestérol	1,2 mg (0,6 %)	4 mg (2 %)	10 mg (5 %)	20 mg (10 %)
MyrjS40™	92 mg (4,6%)			
PBS 1 X	1800 µL			

Tableau II-6: Formulation supplémentées en cholestérol testées.

C.5.4.b Caractérisation des formulations enrichies en cholestérol ou stéarate de cholestérol

Les deux formulations enrichies en cholestéryl stéarate (CHST) à 0,6 % et 2 %, présentent des gouttelettes de diamètre \approx 55 nm avec une polydispersité comprise entre 0,15 et 0,17 et un potentiel zêta compris en -7 mV et -9 mV (plutôt neutre). Pour les trois formulations enrichies à 0,6 %, 2,0 % et 5,0 % en cholestérol (CH), le diamètre obtenu est d'environ 50 nm avec une polydispersité comprise entre 0,15 et 0,17 et un potentiel zêta compris entre -2 mV et -4 mV. Les caractéristiques physico-chimiques sont donc bien similaires à celle des lipidots non supplémentée.

La stabilité des nanoparticules a été évaluée pendant 135 jours (Figure 20).

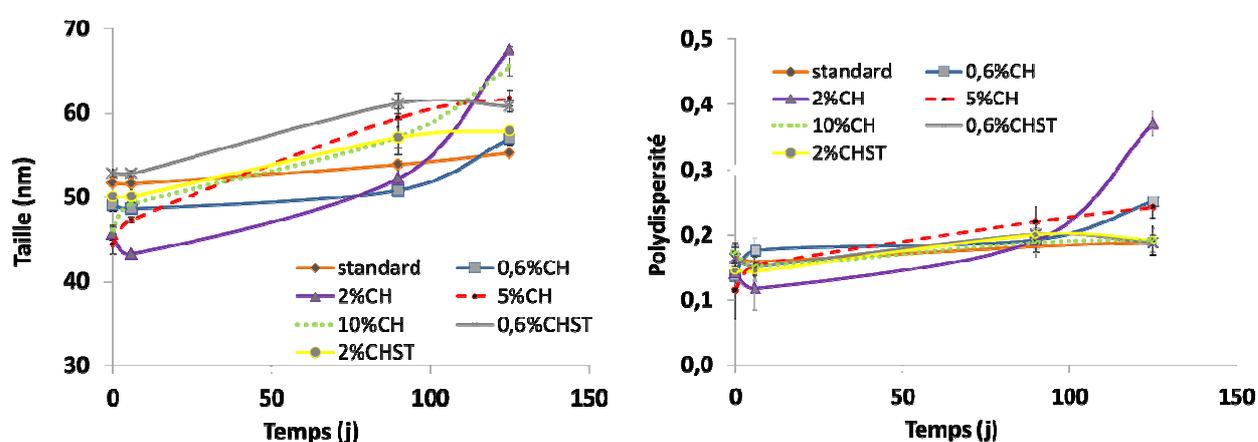


Figure II-20: Stabilité des différents lots enrichis en cholestérol (CH) ou en cholestéryl stéarate (CHST) jusqu'à 130 jours après formulation.

Les formulations enrichies en cholestéryl stéarate restent stables dans le temps, tandis qu'au bout de 90 jours, il est observé une déstabilisation des lipidots ayant de forts taux de dopage en cholestérol (> 5 %). Cela est mis en évidence par une augmentation de la taille et de la polydispersité.

C.5.4.c Influence de la composition sur le ciblage ovarien *in vivo*

L'objectif de cette manipulation est d'évaluer si la présence de cholestérol ou de dérivés de cholestérol peut avoir une influence sur l'accumulation du vecteur dans les ovaires et donc, dans un certain domaine, favoriser leur ciblage. Pour cela, les formulations de nanoparticules dopées en DiD et enrichies à 0,6 % ou 2,0 % en cholestéryl stéarate ou 0,6

%, 2,0 %, 5,0 % ou 10 % en cholestérol sont injectées chez la souris saine FVB/N femelle par voie intraveineuse et suivies par fluorescence grâce à l'incorporation du DiD. Les formulations sont injectées chez la souris dans les 15 jours suivant leur formulation afin d'éviter toute déstabilisation du système (voir paragraphe précédent). La dose injectée en fluorophore ainsi qu'en lipides est identique à celle utilisée dans l'expérience lipidot triplement marquée.

Les animaux sont sacrifiés 4 heures après injection. Le signal de fluorescence est quantifié dans les différents organes et les ratios organes / muscle sont calculés, permettant de s'affranchir des faibles différences de fluorescence entre les lots qui ne sont pas issus d'une même synthèse. Ces lots sont comparés à une formulation non enrichie (formulation « standard ») et à ceux obtenus avec la formulation des lipidots triplement marqués.

Aucune différence n'est observée dans l'ensemble des organes (dont le foie et les surrénales), sauf au niveau des ovaires. La Figure 21 présente donc les résultats obtenus sur ces organes.

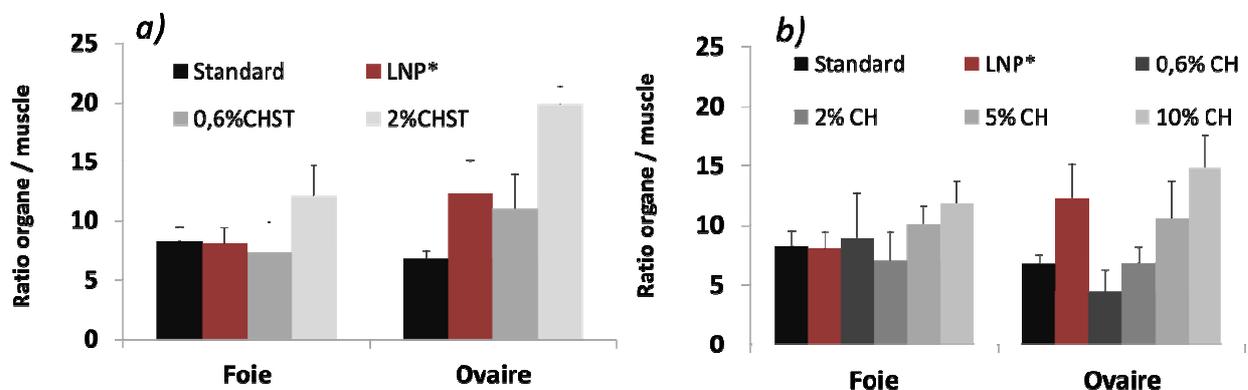


Figure II-21 : Représentation du rapport de fluorescence organe / muscle après injection des différentes formulations enrichies chez la souris femelle FVB. A) Formulations enrichies en cholestéryl stéarate (CHST) 0,6 % et 2 % ; B) Formulations enrichies en cholestérol (CH) 0,6 %, 2 %, 5 %, 10 %. Les LNP* représentent les lipidots triplement marquée. Le standard représente la formulation classique (cire, huile, lécithine, stéarate de PEG)

Il est observé qu'à 0,6 % en CH, l'accumulation dans les ovaires est inférieure à celle d'une lipidot normale. Il faut une supplémentation de 2,0 % en CH pour obtenir une accumulation identique à la formulation standard. A des taux plus élevés en

supplémentation comme 5,0 % et 10 %, une accumulation de + 58 % et de + 121 % est observée respectivement par rapport au signal des lipidots « nues ». Néanmoins, il est à rappeler que ces formulations sont peu stables (voir paragraphe précédent).

Il est observé une accumulation croissante du signal dans les ovaires lorsque la lipidot est supplémentée en cholestéryl stéarate. Une accumulation de + 62 % est observée avec le lot enrichi à 0,6 % en CHST par rapport au lot standard et de + 197 % pour le lot supplémenté à 2 % en CHST. Les résultats obtenus avec les lipidots triplement marquées (LNP*) et les nanoparticules supplémentées à 0,6 % en cholestéryl stéarate (son équivalent en traceur froid) sont donc bien identiques.

C.5.4.d Discussion et conclusion

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces expériences. La première est que l'ajout de traceur peut moduler la biodistribution d'un vecteur et qu'il n'est jamais neutre d'incorporer un radiotraceur ou un fluorophore dans une nanoparticule, même en faible concentration. Dans notre cas, les lipidots « nues » à savoir non supplémentées en cholestérol ou en dérivé de cholestérol, possèdent un tropisme pour les ovaires. Ce tropisme est cependant accentué en ajoutant des dérivés de cholestérol à chaînes grasses dans la nanoparticule, et ce de manière dose-dépendante. Ce type de composé est préféré au cholestérol simple pour favoriser ce ciblage. En effet, non seulement les formulations enrichies en cholestérol sont moins stables d'un point de vue physico-chimique, mais leur supplémentation n'améliore le tropisme ovarien qu'à des taux d'encapsulation très élevés de cholestérol (> 5%). L'hypothèse émise est que le cholestérol, amphiphile à courte chaîne lipophile, est plutôt localisé au niveau de la coquille de la particule, contrairement au cholestéryl stéarate qui doit être plus ancré dans le cœur de la lipidot grâce à sa chaîne grasse en C₁₈. Le cholestérol, localisé potentiellement dans la membrane, pourrait fuir de la nanoparticule, la déstabiliser, et être métabolisé différemment du cholestéryl stéarate.

La chaîne en C₁₆ ou C₁₈ semble être un paramètre important concernant la stabilité du produit encapsulé dans le cœur de la lipidot. En effet, elle permet d'assurer à la fois une bonne encapsulation du produit (> 95 % dans le cas du DiD, CHO et CHE) et la stabilité de l'encapsulation dans le temps. Ainsi des nanoparticules supplémentées avec du cholestérol montrent une déstabilisation colloïdale au bout de 90 jours, tandis que des nanoparticules

supplémentées en cholestéryl stéarate ne montrent pas d'évolution en taille ou en polydispersité et ce jusqu'à 130 jours à +4°C (arrêt du suivi). Le cholestérol étant un composant membranaire des cellules, l'hypothèse peut être émise que le cholestérol se situerait au niveau de l'interface de la nanoparticule, tandis que la présence des chaînes grasses en C₁₆ ou C₁₈ des stéarates de cholestérol permettrait d'ancrer le produit (cholestérol stéarate) dans le cœur de la lipidot.

D. Discussion

Trois traceurs ont été incorporés dans la nanoparticule afin d'évaluer sa biodistribution et sa pharmacocinétique après injection chez la souris saine FVB. Les traceurs radioactifs permettent une analyse quantitative précise des traceurs contrairement au DiD, fluorophore, qui donne des informations plus qualitatives concernant la biodistribution et permet de réaliser de l'histologie sur les organes. Le DiD a été localisé dans le cœur de la nanoparticule avant injection *in vivo* (voir Chapitre III).

Il faut insister sur le fait que ce sont les traceurs (à savoir le ³H, le ¹⁴C et le DiD) qui sont suivis et non la lipidot. Un traceur ne devrait pas modifier la biodistribution de la nanoparticule. Or, dans notre cas, il a été mis en évidence qu'une supplémentation en cholestéryl stéarate à 0,6 % en masse (correspondant à la quantité de radiotraceurs incorporés) permet d'améliorer le ciblage dans les ovaires sans pour autant modifier la distribution dans les autres organes.

Utiliser la co-encapsulation de traceurs métabolisable et non métabolisable permet d'obtenir des informations concernant les organes de métabolisation et les organes d'accumulation. On peut émettre l'hypothèse que si les trois traceurs se retrouvent au même moment au même endroit, la probabilité est forte qu'ils soient présents au sein de la nanoparticule sous une forme inchangée ou modifiée après injection.

Aucune corrélation entre les signaux des deux radiotraceurs (³H]CHE, [¹⁴C]CHO) n'est observée dans le plasma sur 24 h; en revanche, les signaux du tritium et du ¹⁴C se décroissent dans les organes, notamment dans le foie, dès deux heures après injection. Le [³H]CHE possède une liaison non métabolisable entre le noyau cholestérol et la chaîne grasse, ce qui en fait un composé inerte, non métabolisable par l'organisme permettant de faire ressortir les organes dans lesquels la nanoparticule est passée et s'accumule¹⁶⁷. Le DiD présente les mêmes profils que le [³H]CHE, suggérant que c'est un composé non

métabolisable¹³. En revanche, le [¹⁴C]CHO possède une liaison ester métabolisable entre le cholestérol et l'acide oléique dont la dissociation apparaît dans les 2 h après injection¹⁷¹. Utiliser le [¹⁴C]CHO permet donc de mettre en avant la manière dont la nanoparticule est métabolisée et éliminée après sa distribution dans les organes.

Les traceurs encapsulés dans la nanoparticule peuvent être suivis jusqu'à 24 h dans le plasma ($2,9 \pm 1,1$ % de dose injectée / g de tissu pour le [³H]CHE et $1,4 \pm 0,5$ % pour le [¹⁴C]CHO à 24 h après injection). Le temps de vie plasmatique est assez court, de l'ordre de 30 minutes. De nombreux travaux montrent que l'ajout de PEG à la surface de nanoparticules permet de prolonger le temps de circulation plasmatique en diminuant l'absorption des protéines plasmatiques à leur surface et leur rapide captation par les macrophages¹⁶⁶. Dans notre cas, les PEG permettent de donner aux lipidots une très grande stabilité colloïdale dans le temps et de leur conférer une charge neutre, reconnue pour prolonger le temps de circulation¹⁵². Malgré une certaine furtivité de la nanoparticule (absence d'accumulation dans la rate), elle est éliminée très rapidement du compartiment sanguin pour s'accumuler dans le foie puis les ovaires et les surrénales. En effet, bien que la lipidot soit pégylée, la furtivité de la nanoparticule est discutable vu son temps de $\frac{1}{2}$ vie plasmatique plutôt court. Les échanges de phospholipides au niveau de la couronne des nanoparticules pourrait rendre l'action des surfactants PEG nulle, résultant en une extravasation rapide des lipidots vers le foie afin d'y être métabolisés. Des temps de circulation plus longs sont généralement observés pour les liposomes pégylés (< 48 h) et pour les nanoparticules lipidiques de type capsule comportant les même PEG à leur surface (< 5 h)¹⁶⁶. La principale différence est que les nanocapsules sont composées d'une couronne de phospholipides cristallins et que leur cœur est composé d'un mélange d'huile à courte et moyenne chaînes grasses. Les lipidots ont, quant à elles, un cœur amorphe et ne sont composées que de mono, di et triglycérides à longues chaînes.

Les lipoprotéines permettent le transport des lipides, cholestérol, esters de cholestérol ou de manière plus générale des molécules hydrophobes dans le sang⁴¹. Les lipoprotéines sont classées en 4 familles : les HDL pour lipoprotéines de haute densité (5 – 12 nm), les LDL pour les lipoprotéines de basse densité (18 – 25 nm), les VLDL pour les lipoprotéines de très basse densité (30 – 80 nm) et enfin les chylomicrons (75 – 1200 nm).

Toutes sont riches en triglycérides. Les lipoprotéines de petites tailles ont des temps de circulation plasmatique élevée allant du jour pour les HDL à l'heure pour les LDL. En examinant de près les VLDL et les chylomicrons, on note de grandes similitudes avec les lipidots^{173, 174}. En effet, les chylomicrons sont composés de 63 % de phospholipides et 35 % de cholestérol pour la surface, et de 95 % de triglycérides et 5 % d'ester de cholestérol pour le cœur. Les VLDL quant à elles, contiennent un peu moins de triglycérides et de cholestérol. De plus, leur temps de vie plasmatique est de l'ordre de 20 minutes. Les VLDL et les chylomicrons sont associés à des apolipoprotéines notamment les apolipoprotéines B48, B100 et E respectivement. Il a été montré d'autre part que les apolipoprotéines ancrées à leur surface sont les principales protéines qui interfèrent avec des nanoparticules lipidiques pégyllées après injection intra veineuse^{175, 176}.

On a donc des caractéristiques assez similaires entre les chylomicrons ou VLDL et les lipidots : une forte concentration en phospholipides et en triglycérides, une durée de vie plasmatique inférieure à la ½ heure, et une forte présence dans le foie. Il ne serait donc pas exclu que les lipidots soient reconnues par l'organisme comme des chylomicrons ou des VLDL « artificielles », soient recouvertes de lipoprotéines, et amenées rapidement vers le foie, ce qui pourrait expliquer la clairance rapide des particules.

Les traceurs encapsulés dans la lipidot sont rapidement accumulés dans le foie. En revanche, aucun signal n'est observé dans la rate qui est un organe majeur du RES, riche en macrophage. La plupart des nanoparticules, qu'elles soient organiques ou inorganiques de taille supérieure à 20 nm, pegylées ou non, s'accumulent dans la rate alors que les nanoparticules de petite taille, < 5 nm, sont éliminées par le rein. Le foie est l'organe de métabolisation et d'accumulation des molécules hydrophobes^{14, 166, 177} et notamment des nanoparticules à base de lipides. Différentes études montrent que les nanoparticules s'accumulent dans les hépatocytes ou dans les cellules de Kupffer qui font partie du RES. Les VLDL et les chylomicrons sont rapidement captés par le foie avec une cinétique rapide (50 % de dose injectée au bout de 20 minutes)⁴¹. De plus, ces lipoprotéines sont internalisées par les hépatocytes via les apolipoprotéines et non par les cellules de Kupffer. Le fait que les lipidots ne soient pas présentes dans la rate suggère donc qu'elles sont métabolisées comme une lipoprotéine via les hépatocytes et non les cellules de Kupffer.

Contrairement aux autres organes, dans le foie, la décorrélation entre le [³H]CHE et le [¹⁴C]CHO apparaît très rapidement (entre 15 minutes et 2 h après injection). Il a été

démonstré que le [^{14}C]CHO est hydrolysé en moins de 2 h dans les cellules du foie¹⁷¹, tandis que le [^3H]CHE ne peut pas être éliminé de la cellule après son internalisation⁹. L'élimination rapide des lipidots par le foie met en évidence une métabolisation rapide de la nanoparticule, ce qui est un point en leur faveur pour éviter une éventuelle toxicité due à une accumulation du vecteur. La présence dans la nanoparticule de cire, d'huile, de triglycérides à longues chaînes, et d'une couche de poly(éthylène glycol) peut réduire la métabolisation des lipidots par les lipases, contrairement aux lipoprotéines qui sont rapidement métabolisées.

Outre le foie, une accumulation spécifique du DiD, ^3H et ^{14}C a été observée dans les ovaires et surrénales. Ces deux organes sont des organes stéroïdiens et sont le lieu de synthèse des hormones stéroïdiennes, à savoir la progestérone et l'œstradiol pour les ovaires, et les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les hormones androgènes pour les surrénales. Le foie et les surrénales sont connus pour surexprimer les récepteurs aux lipoprotéines¹²⁰. La corrélation entre les trois traceurs est observée jusqu'à 4 h après injection pour les ovaires et 16 h après injection pour les surrénales, ce qui laisse présumer de l'intégrité des lipidots pendant ces laps de temps. A des temps plus élevés, le [^{14}C]CHO doit s'hydrolyser et le signal du ^{14}C décroît, contrairement aux signaux du ^3H et du DiD qui restent constants. L'histologie de ces organes met en évidence une localisation spécifique du DiD dans le cortex pour les surrénales et dans le *corpus luteum* pour les ovaires. La surrénale est divisée principalement en deux parties : la médulla, située au centre de l'organe synthétise des hormones hydrophiles ; le cortex situé en périphérie, synthétise les hormones stéroïdes lipophiles. Concernant les ovaires, le *corpus luteum* aussi appelé corps jaune, se gorge de lipides et sécrète de la progestérone 2 ou 3 jours après l'ovulation. Les lipidots se concentrent dans ces organes, spécifiquement dans les zones qui synthétisent des hormones stéroïdiennes ou qui sont riches en lipides ou en hormones. Cette bioaccumulation peut être accentuée en enrichissant la nanoparticule avec du cholesteryl stéarate.

Cette accumulation inattendue n'a, à notre connaissance, jamais été rapportée dans la littérature. Il existe peu d'études concernant la biodistribution complète d'un vecteur et plus particulièrement faisant intervenir une accumulation dans les organes stéroïdiens, qui semble donc spécifique des lipidots. Cela pourrait s'expliquer par la taille nanométrique des

lipidots et leur composition spécifique en lipides qui pourrait être assimilées par l'organisme à des chylomicrons ou des VLDL, des transporteurs de cholestérol, de lipides et d'ester de cholestérol du foie vers les tissus périphériques¹⁷⁸. Les ovaires et les surrénales sont des organes qui ont besoin de lipides, de triglycérides et de cholestérol pour synthétiser les hormones. De plus, ce sont des organes qui surexpriment les récepteurs aux lipoprotéines, ce qui pourrait favoriser le ciblage des lipidots vers ces tissus. Cette hypothèse est appuyée par le fait que des nanoparticules supplémentées en cholestéryl stéarate s'accumulent de manière dose-dépendante dans les ovaires. En revanche, les lipidots supplémentées en cholestérol ne montrent pas cette accumulation préférentielle, qui pourrait donc s'expliquer par le fait que les lipoprotéines riches en cholestérol (LDL et HDL) jouent un rôle différent dans l'organisme, et n'ont pas le même comportement *in vivo*.

E. Conclusion générale sur le devenir *in vivo* des lipidots

Les lipidots sont des nanovecteurs biodégradables et plus de 90 % sont éliminés 24 h après injection, ce qui en fait des nanocargos potentiellement non toxiques car ils ne s'accumulent pas à long terme. Leur distribution rapide dans les tissus en font des vecteurs idéaux pour l'imagerie. Le design d'agents de contraste à base de lipidots pour l'imagerie de fluorescence ou l'imagerie nucléaire sera étudié au chapitre suivant.

La nature intrinsèque de la nanoparticule et la possibilité de la supplémenter en stéarate de cholestérol pour favoriser un ciblage préférentiel vers les zones à forte concentration en récepteurs aux apolipoprotéines ou les zones de synthèse d'hormones stéroïdiennes, peut présenter un fort potentiel en termes d'applications, d'une part pour l'imagerie, d'autre part pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Le Chapitre IV étudiera les applications des lipidots en oncologie, spécifiquement en imagerie des cancers hormono-dépendants. Le Chapitre V étudiera quant à lui le potentiel des lipidots pour la délivrance d'hormones.

Chapitre III :

**Design d'agents de contraste pour
l'imagerie de fluorescence
ou l'imagerie nucléaire
en clinique**

Nous avons précédemment montré que les lipidots constituaient de bons vecteurs pour le transport de composés lipophiles, et montrerons dans le chapitre suivant qu'ils peuvent s'accumuler de manière significative dans différents modèles tumoraux. Dans ce chapitre, nous présentons nos travaux cherchant à déterminer si ces propriétés de ciblage pourraient être exploitées pour la construction d'agents de diagnostic performants. Nous nous intéressons en particulier à l'imagerie de fluorescence, compte tenu que le DTBS et le SHFJ travaillent sur cette thématique (instrumentation et marqueurs), ainsi qu'à l'imagerie nucléaire (tomographie à émission de positons, la TEP, ou la tomographie à émission monophotonique, la TEMP), technique déjà bien implantée en clinique notamment au SHFJ.

Dans le chapitre précédent, nous avons utilisé le DiD pour étudier la biodistribution des lipidots. Cet agent fluorescent avait déjà été utilisé au laboratoire dans différentes études^{13, 147, 154}, nous permettant d'avoir un recul suffisant sur sa physico-chimie. Néanmoins, le DiD n'émet pas dans la fenêtre optique optimale de l'imagerie de fluorescence *in vivo*. De plus, il n'est pas approuvé par les autorités de santé pour l'injection chez l'homme. Parmi les fluorophores autorisés en clinique pour l'imagerie de fluorescence, le bleu de méthylène, dérivé de la phénothiazine est utilisé pour ses propriétés colorantes par voie intra veineuse lors des parathyroïdectomies, car c'est un bon marqueur des glandes parathyroïdes¹⁷⁹. Plusieurs inconvénients peuvent être cités pour ce fluorophore, comme son faible rendement quantique et, depuis 1999, le nombre de cas croissant de toxicité recensés, notamment au niveau du système nerveux central. Un autre fluorophore absorbant et émettant dans le proche infrarouge, domaine de longueur d'onde pour lequel l'absorption de la lumière par les tissus est minimale et approuvé aujourd'hui pour usage clinique est le vert d'indocyanine (ICG, Indocyanine Green en anglais). Après avoir analysé l'état de l'art de l'utilisation en imagerie clinique de l'ICG et de son encapsulation dans différents nanosystèmes, nous avons donc examiné les possibilités d'encapsulation de l'ICG dans les lipidots pour le design d'agents de contraste fluorescents pour l'imagerie per opératoire de résection tumorale, la détection de métastases ou la localisation de ganglions sentinelles.

Dans un second temps, nous avons évalué le potentiel des lipidots pour la construction d'agents de contraste pour l'imagerie nucléaire (TEP / TEMP), imagerie non invasive faisant intervenir des éléments radioactifs. Cette technique est ultrasensible, très précisément quantitative et peut être réalisée facilement sur le corps entier compte tenu de la faible absorption par les tissus des photons γ de haute énergie utilisées par ces techniques.

Partie I : Vers l'Imagerie de fluorescence

A. Le vert d'indocyanine (ICG)

A.1 Intérêt de la molécule

L'ICG, dont la structure est représentée Figure 1, est un fluorophore d'intérêt pour l'imagerie de fluorescence car il est approuvé depuis 1959 pour l'injection chez l'homme par l'EMA et la FDA (Food and Drug Administration, l'équivalent de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament aux Etats-Unis) grâce à sa faible toxicité (due à une métabolisation principalement hépatique et à une absence d'absorption par la muqueuse intestinale). Il est utilisé pour réaliser des angiographies en ophtalmologie ou pour évaluer les fonctions cardiaque et hépatique. Les spectres d'absorption et de fluorescence de l'ICG se situent dans la région du proche infrarouge (600 – 900 nm), avec les avantages que cela comporte, comme une faible autofluorescence des tissus ou une profondeur d'imagerie plus élevée (Chapitre I). Ses propriétés optiques dépendent en grande partie du milieu dans lequel le fluorophore est dispersé, ainsi que de sa concentration. L'ICG absorbe essentiellement entre 600 et 900 nm, et émet entre 750 et 950 nm. Les valeurs maximales des spectres d'émission de fluorescence sont d'environ 810 nm dans l'eau et 830 nm dans le sang. Pour les applications médicales, l'absorption maximale est à environ 800 nm dans le plasma sanguin, dû à l'adsorption de la molécule sur les protéines plasmatiques.

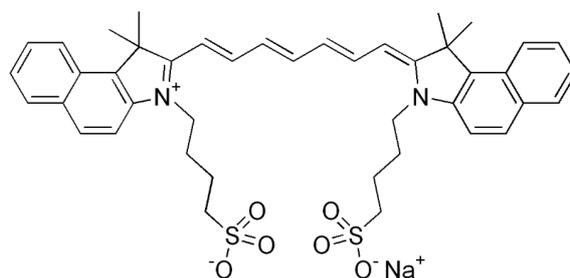


Figure III-1 : Structure de l'ICG, aussi connue sous le nom de *Cardiogreen*[®] ou d'*Infracyanine*[®].

A.2 L'ICG en clinique

A.2.1 L'identification du ganglion sentinelle

L'ICG étant l'un des rares fluorophores approuvés pour l'injection chez l'homme, il est très utilisé dans les études cliniques, notamment pour la détection des ganglions sentinelles afin de réaliser des biopsies et des lymphographies en temps réel. Il existe trois techniques pour réaliser ces biopsies : la première utilise le colorant bleu Evans, la seconde utilise un radiocolloïde à base de technétium (Tc) et la dernière est une combinaison des deux. Avec le bleu Evans, la sensibilité de détection est faible (tous les ganglions ne sont pas détectés) ainsi que la spécificité (les ganglions prélevés sont des faux positifs à hauteur d'environ 40 %) ^{180, 181} et de nombreuses réactions anaphylactiques ont été observées. L'utilisation de radio-isotopes est coûteuse et réglementée, et tous les laboratoires ne possèdent pas les installations nécessaires. La meilleure des méthodes reste à ce jour la combinaison des deux qui permet d'obtenir moins de 5 % de faux négatifs. Hutteman ¹⁸² a utilisé l'ICG pour améliorer la visualisation des ganglions lymphatiques dans le cancer du sein, et Rossi ¹⁸³ pour détecter les ganglions sentinelles des cancers de l'endomètre et des cancers cervicaux par suivi endoscopique après injection cervicale. L'ICG apparaît dès lors comme un nouveau traceur permettant la visualisation des ganglions sentinelles ainsi que du drainage lymphatique des tumeurs en temps réel. Différentes études cliniques ont été menées, notamment par Hirsch ¹⁸¹ dans le cas du carcinome du colon, qui a développé une méthode permettant la détection des ganglions dans les 3 à 10 min après injection d'ICG dans la zone péri-tumorale avec un taux de détection positive de 82 %.

A.2.2 Autres applications

Au-delà de ses applications en imagerie, l'ICG est également utilisé depuis 2004 dans le traitement par irradiation laser des mélanomes chez les patients américains ainsi que pour l'analyse de biopsies ¹⁸⁴. L'ICG est également présent dans le domaine de la neurologie pour explorer la perfusion cérébrale ¹⁸⁵. Par exemple, il permet d'évaluer la rupture de la barrière hémato encéphalique ¹⁸⁶. En effet, dans certains cas de cancer, afin que les anti-cancéreux puissent atteindre le cerveau, il est nécessaire de réaliser une ouverture osmotique de la BHE (barrière hémato encéphalique qui isole et maintient l'homéostasie du cerveau en contrôlant les échanges sang-cerveau) par l'injection de mannitol. Cette technique, très

aléatoire, entraîne de très grandes variations d'un patient à l'autre, qui ont un impact très important sur l'efficacité de la chimiothérapie. L'évaluation de l'ouverture de la BHE grâce à l'ICG permet d'adapter le traitement et la dose de médicament à administrer qui atteindra le cerveau, dans le but d'améliorer l'efficacité thérapeutique et surtout de diminuer les effets secondaires liés à un surdosage.

Il existe également des applications de photothérapie dynamique utilisant l'ICG. La photothérapie dynamique (PDT en anglais pour « photodynamic therapy ») est une technique qui permet le traitement de certaines lésions précancéreuses mais également de certains cancers cutanés superficiels, en associant une substance active (photosensibilisateur) et une irradiation lumineuse de la peau (par un laser ou une diode). La photothermie (PTT) consiste quant à elle à détruire des cellules cancéreuses en augmentant la température au sein de la zone à traiter. L'ICG peut jouer le rôle de photosensibilisateur (pour la PDT) ou d'absorbeur thermique (pour la PTT). Ce fluorophore est également utilisé pour son effet photothérapeutique dans le traitement du cancer du sein au stade d'essais cliniques à ce jour, ou encore pour évaluer l'efficacité d'un traitement PDT^{187, 188}. Van der Vost l'a utilisé pour la résection de métastases hépatiques superficielles¹⁸⁹.

A.3 Les limites de l'ICG libre

L'ICG, administré en solution aqueuse, possède deux inconvénients majeurs: **(1)** ses propriétés optiques sont instables dans le temps avec une baisse de l'absorption et de la fluorescence dues à une dégradation moléculaire et **(2)** une distribution dans le corps non spécifique, avec un temps de $\frac{1}{2}$ vie plasmatique après injection intraveineuse de 2 à 4 min. Son absorption est uniquement hépatique avec une recirculation dans les intestins via la bile¹⁹⁰. Il a été montré que l'ICG pouvait se montrer plus stable en solution aqueuse s'il était conservé à l'abri de la lumière, à basse température et de manière concentrée¹⁹¹. De plus, après injection dans le plasma, l'ICG se lie à plus de 99 % aux protéines plasmatiques, entraînant une clairance très rapide du fluorophore du compartiment sanguin (2-4 min)¹⁹². L'affinité particulière de l'ICG pour les phospholipides ou l'albumine a été étudiée en 1998 par Mordon pour ce qui concerne les phospholipides de l'endothélium vasculaire¹⁹³⁻¹⁹⁵ et par Yoneya¹⁹⁶ pour les phospholipides circulants (HDL)¹⁹⁷. Ces études montrent une interaction importante de l'ICG avec ces molécules dans le sang, probablement due à l'intégration de la

partie hydrophobe de l'ICG dans la partie hydrophobe des protéines ou la couche externe des lipoprotéines¹⁹⁸. Environ 1 à 2 molécules d'ICG sont liées par molécule de HSA (human serum albumine)¹⁹³. Ces interactions avec les protéines plasmatiques ou les phospholipides empêchent l'ICG de s'agréger et assurent ainsi sa stabilité physico chimique et optique le temps de sa présence dans le compartiment plasmatique (10 minutes au total).

A.4 L'ICG et les nanoparticules

Afin de pallier à l'instabilité chimique et photochimique de l'ICG, plusieurs équipes ont travaillé sur l'encapsulation ou l'association du fluorophore avec des nanoparticules afin d'améliorer son comportement en milieu aqueux ou après injection^{199 200}.

Hee Kim²⁰¹ a encapsulé l'ICG dans des micelles polymériques contenant du Pluronic F127 (surfactant polyol non ionique) afin d'obtenir des nanoparticules thermosensibles. Cette structure en forme de filaments (due à la présence de chaînes polymériques) a été préférée à une structure sphérique car elle permet une meilleure encapsulation de l'ICG et car la présence de Pluronic permet de stabiliser la nanoparticule à température corporelle. Afin de permettre une bonne détection tumorale, deux injections d'ICG encapsulée dans la nanoparticule ont été réalisées. La première injection permet de saturer les cellules phagocytaires, et d'obtenir, 30 minutes après la 2^{ème} injection, des taux plasmatiques de fluorescence plus élevés. 24 h après injection, même si le signal dans le foie reste le plus élevé, un signal dans la tumeur est observé ainsi que dans la rate, le cœur, les poumons et les reins²⁰¹.

Yaseen a montré que la taille de la nanoparticule polymérique dans laquelle le fluorophore est encapsulé n'a pas d'impact sur le comportement *in vivo* de l'ICG¹⁹⁰, au contraire de son revêtement de surface, notamment si celui-ci modifie la charge de la nanoparticule (passant d'un potentiel zêta neutre à un potentiel zêta négatif). Une particule chargée négativement (mésocapsule à base de fer et d'acide polyacrylique) va s'accumuler dans les poumons tandis que des nanoparticules neutres (mésocapsule à base de polylysine) vont voir leur temps de circulation plasmatique augmenter (mais il reste cependant < 1h). Un signal est observé pour toutes ces particules dans les reins et, dans une moindre mesure, le cœur et la rate. Saxena²⁰² a montré que l'encapsulation de l'ICG dans les nanoparticules

polymériques permettait d'augmenter l'internalisation cellulaire du fluorophore. L'encapsulation de l'ICG dans des nanoparticules de PLGA¹⁸² montre un taux d'encapsulation optimal du fluorophore de 74 % dans la nanoparticule et le relargage de l'ICG en milieu aqueux à 37°C en deux phases. La première phase, d'une durée de 8 h, entraîne une fuite de 78 % de l'ICG hors de la nanoparticule alors que la seconde phase consiste en un relargage très lent de 2 % de l'ICG en 16 h. L'ICG a également été encapsulé dans des liposomes²⁰³ afin d'améliorer les qualités optiques du fluorophore et d'obtenir des objets de taille nanométrique bénéficiant de l'effet EPR et capable ainsi d'atteindre la tumeur ou permettant d'utiliser le liposome comme plateforme de greffage d'anti-corps.

Des études préliminaires avaient émis l'hypothèse qu'il était préférable de réaliser un mélange d'ICG et de HSA (Human Serum Albumine) préalablement prélevée chez le patient afin d'améliorer les propriétés de fluorescence de l'ICG mais surtout d'en augmenter la taille (formation d'agrégats) et augmenter ainsi son temps de circulation dans le compartiment plasmatique¹⁸². Néanmoins, après injection transcutanée ou intratumoral, aucune différence entre les deux formulations (ICG libre ou ICG adsorbé) n'a été observée, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'ICG injecté libre s'adsorbe quasi instantanément sur les protéines dès qu'il est en milieu biologique. L'utilisation de l'ICG seul est donc conseillée dans cette utilisation précise afin de réduire les coûts.

Des nanoparticules comprenant de l'ICG ont également été étudiées pour leur effet photothermique et photochimique, parfois combinés à une détection en imagerie de fluorescence (approche théragnostique). Zheng¹⁹² a synthétisé des nanoparticules ICG-PL-PEG (nanoparticules de phospholipides comprenant en leur centre de l'ICG et à l'extérieur une couronne PEGylée) fonctionnalisées par un anticorps monoclonal greffé à l'extrémité des chaînes PEG, qui une fois dans la tumeur, sont irradiées, ce qui conduit à la lyse des cellules cancéreuses (génération de radicaux libres). Kuo²⁰⁴ a couplé l'ICG à des nanobâtonnets d'or (« nanorod » en anglais) pour la photothérapie dynamique (PDT) et à des nanoparticules d'or pour la photothérapie photothermique (PTT). Yaseen a encapsulé l'ICG dans des mésocapsules enrobées de dextran pour réaliser une photothérapie

dynamique sur des cellules cancéreuses²⁰⁵. Tang a utilisé l'ICG en combinaison avec la doxorubicine pour associer chimio et photothérapies²⁰⁶. L'efficacité de la doxorubicine s'est trouvée alors augmentée.

Le fait d'encapsuler l'ICG dans une nanoparticule modifie généralement sa biodistribution *in vivo*²⁰⁷. Avec l'ICG seul, un signal élevé dans le foie est d'abord observé, puis dans les reins, et des signaux de fluorescence plus faibles dans la rate, le cœur et les poumons, par ordre décroissant. En revanche, pour l'ICG encapsulé, de forts signaux de fluorescence ont été observés dans le foie et la rate, puis de manière plus faible les poumons, le cœur et les reins. De manière générale, l'effet nanoparticulaire ne modifie pas la pharmacocinétique plasmatique de l'ICG ou alors de manière très restreinte pendant les 2 premières heures, mais modifie d'un point de vue quantitatif la biodistribution dans les organes, à savoir que la présence du vecteur nanoparticulaire favorise une biodistribution dans les organes du RES, dont le rôle physiologique est de détecter et éliminer les molécules étrangères.

B. ICG, lipidot et milieu biologique

Des essais réalisés au laboratoire par F. Navarro avaient montré que l'encapsulation de l'ICG dans des nanoparticules lipidiques, très similaires aux lipidots, permettait d'améliorer les propriétés optiques du fluorophore, son rendement quantique et de réduire le photoblanchiment²⁰⁸. Des essais *in vivo* chez la souris *Nude* xenogreffée avaient montré une diminution du signal de fluorescence dans la tumeur plus lente avec la nanoparticule qu'avec l'ICG libre^{148, 208}, et une clairance hépatobiliaire du fluorophore chez la souris *Nude* saine²⁰⁹.

Une étude préliminaire avait également montré qu'il était possible d'encapsuler l'ICG dans les lipidots de 50 nm de diamètre, avec un rendement d'encapsulation d'environ 75 %, et que celles-ci étaient stables à 4°C dans du PBS 1X pendant au moins 60 jours d'un point de vu physico chimique et optique^{147, 210}.

Nous avons dans ce travail étendu l'étude d'encapsulation de l'ICG à différentes tailles de nanoparticules, différents taux de dopage en ICG et en travaillant également à des taux inférieurs d'ICG par rapport aux lipides.

B.1 Encapsulation de l'ICG

B.1.1 Influence de la taille

Le comportement de l'ICG encapsulé dans différentes tailles de nanoparticules a été évalué. Des formulations de 30 nm, 50 nm, 80 nm, 100 nm et 120 nm de diamètre¹⁵² ont été réalisées avec un dopage en fluorophore identique de 250 μ M. La composition des différents lots ainsi que leur formulation sont présentées Chapitre VI, partie A. Elles sont caractérisées par leur propriétés physico-chimiques, par leurs propriétés d'encapsulation et par leur propriétés optiques, comme décrit dans le Chapitre VI, partie A. L'ensemble des caractéristiques des formulations obtenues est présenté Tableau 1.

Formulation	ICG				
	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	% encapsulation	Nombre d'ICG / particule
30	26 \pm 0,54	0,2 \pm 0,01	-11 \pm 1,4	82 \pm 4,1	9 \pm 0,4
50	52 \pm 0,65	0,13 \pm 0,01	-1,2 \pm 1,3	83 \pm 4,2	65 \pm 3
80	72 \pm 0,83	0,15 \pm 0,01	-1,7 \pm 1,24	83 \pm 4,2	170 \pm 8
100	94 \pm 1,26	0,09 \pm 0,02	-6,5 \pm 0,73	72 \pm 3,6	303 \pm 15
120	114 \pm 1,45	0,077 \pm 0,01	-7,0 \pm 1,4	93 \pm 4,3	597 \pm 30

Tableau III-1 : Caractérisation physico chimique des lipidots encapsulant l'ICG. *PDI = polydispersité

Quelle que soit la taille de nanoparticules, aucune difficulté de formulation n'a été observée et les caractéristiques physico-chimiques des lots étaient identiques à celles attendues. Les tailles obtenues allaient de 26 nm à 114 nm (comme celles des nanoparticules n'encapsulant pas de fluorophores) avec une polydispersité de 0,2 à 0,077 sachant que plus la taille augmente, plus la polydispersité est faible. Le pourcentage d'encapsulation de l'ICG était compris entre 82 et 93 %.

B.1.2 Influence du taux de dopage

Afin d'évaluer si le dopage en fluorophore avait une influence sur la stabilité du système, six concentrations différentes en ICG ont été incorporées, à savoir 50 μM (52 fluorophores / particule), 100 μM (115 fluorophores / particule), 200 μM (219 fluorophores / particule), 250 μM (231 fluorophores / particule), 750 μM (612 fluorophores / particule), et 1250 μM (1020 fluorophores / particule). Les tailles obtenues étaient comprises entre $49 \pm 1,2$ nm pour les forts taux de dopage et $55 \pm 1,4$ nm pour les taux de dopages inférieurs à 200 μM . L'indice de polydispersité était compris entre 0,13 et 0,15. Le potentiel zêta était compris entre -6 et -10 mV sans aucune changement suivant le taux de dopage. Aucune modification notable de leur physico-chimie par rapport aux nanoparticules de 50 nm de diamètre sans fluorophore n'a été observée. Les taux d'encapsulation du fluorophore étaient compris entre 69 % et 85 % (Figure 2).

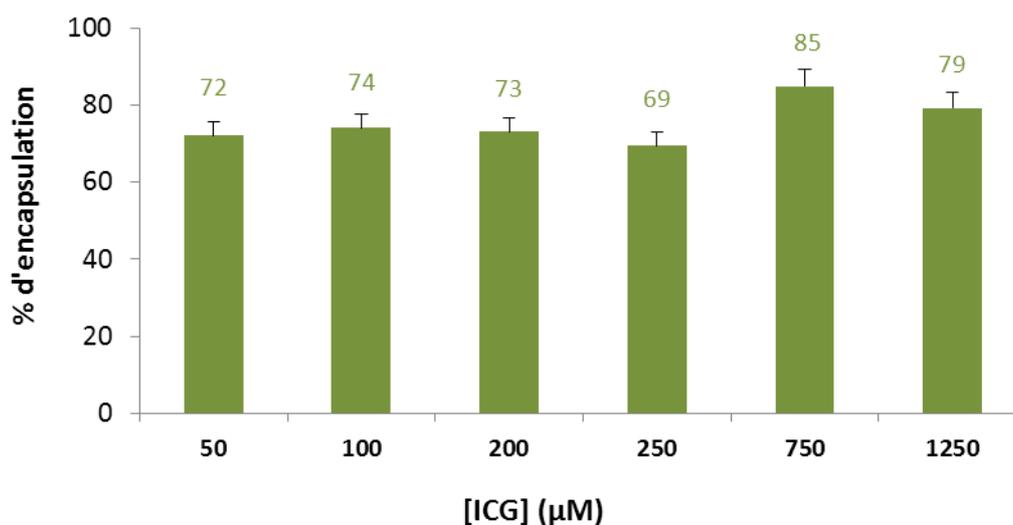


Figure III-2 : Influence du taux de dopage de l'ICG sur le pourcentage d'encapsulation dans la lipidot.

Il est important de vérifier les propriétés optiques des formulations en mesurant les spectres d'absorption et de fluorescence des fluorophores encapsulés dans les lipidots. Le rendement quantique, dont le calcul est décrit Chapitre VI, partie A, permet de déterminer l'efficacité de fluorescence du fluorophore, souvent sensible au milieu environnant (eau, pH, lumière..). Il est observé qu'à des fort taux de dopage en ICG, le fluorophore présent à l'intérieur de la nanoparticule est « auto-quenché » (« auto-extinction »), c'est-à-dire que la

proximité entre les molécules de fluorophores inhibe leurs propriétés de fluorescence (Figure 3). Le lot le plus concentré ne présentant pas de « quenching » est le lot à 250 μM en fluorophore. Au-delà, le quenching apparait et augmente avec le taux de dopage, induisant une diminution du rendement quantique de fluorescence des particules.

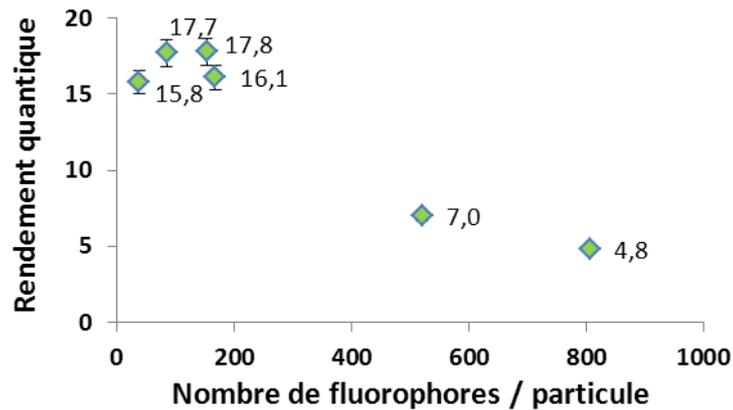


Figure III-3 : Rendement quantique de l'ICG suivant le taux de dopage

La stabilité en taille ainsi que la polydispersité des formulations sont évaluées après 60 jours à 4°C. Aucune modification de ces deux paramètres n'est observée (Figure 4).

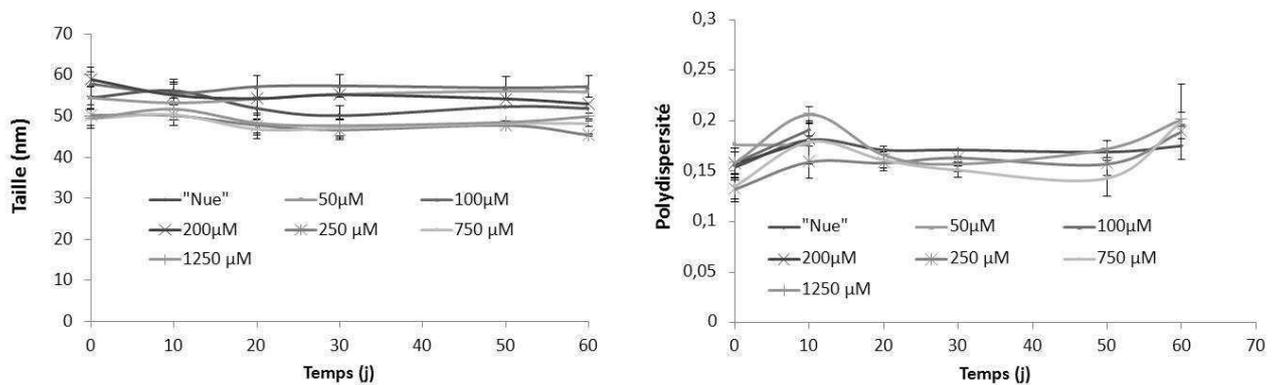


Figure III-4 : Stabilité en taille et polydispersité des lipidots encapsulant de l'ICG

La perte de fluorescence est évaluée à environ 7 % par mois, lorsque les lipidots sont conservés à l'abri de la lumière, à + 4°C.

B.1.3 Etude comparative avec le DiD

Afin d'avoir un élément de comparaison, la même étude est réalisée avec le fluorophore DiD, pour lesquels différents lots sont également préparés et caractérisés.

Des formulations de 30 nm, 50 nm, 80 nm, 100 nm et 120 nm de diamètre sont donc synthétisées avec un taux de dopage de 400 μM en DiD, dopage généralement utilisé pour les expériences *in vivo*. Les formulations obtenues ont la taille attendue entre 27 et 124 nm de diamètre, un potentiel zeta aux alentours de -10 mV et un taux d'encapsulation de 90 à 100 % (Tableau 2).

Formulation	DiD				
	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	% encapsulation	Nombre de DiD / particule
30	27 \pm 0,72	0,25 \pm 0,01	-11 \pm 1,5	90 \pm 4	10 \pm 0,5
50	56 \pm 0,70	0,13 \pm 0,01	-9 \pm 1,1	100 \pm 5	65 \pm 3,
80	71 \pm 0,95	0,15 \pm 0,01	-10 \pm 0,8	100 \pm 5	136 \pm 7
100	94 \pm 1,11	0,12 \pm 0,01	-10 \pm 1,1	100 \pm 5	250 \pm 12
120	124 \pm 1,2	0,1 \pm 0,01	-11 \pm 1,3	100 \pm 5	675 \pm 33

Tableau III-2 : Caractérisation physico chimique des formulations encapsulant le DiD.

Afin d'évaluer l'influence du taux de dopage en DiD (sur des formulations de 50 nm de diamètre), quatre concentrations de DiD sont étudiées : 100 μM (64 fluorophores / particule), 200 μM (98 fluorophores / particule), 400 μM (206 fluorophores / particule), 600 μM (276 fluorophores / particule). Les tailles de particules sont comprises entre 52 \pm 1,3 nm et 57 \pm 0,9 nm pour les plus faibles taux de dopage, avec des polydispersité de 0,16 \pm 0,01 et des potentiels zêtas compris entre -2 et -4 mV. Les taux d'encapsulation du fluorophore sont d'environ 100 \pm 5 %, hormis pour la formulation de 30 nm de diamètre, dont le rendement d'encapsulation était de 90 \pm 4 %. Dans la gamme de concentrations étudiées avec le DiD, aucun auto-quenching n'a été observé (Figure 5).

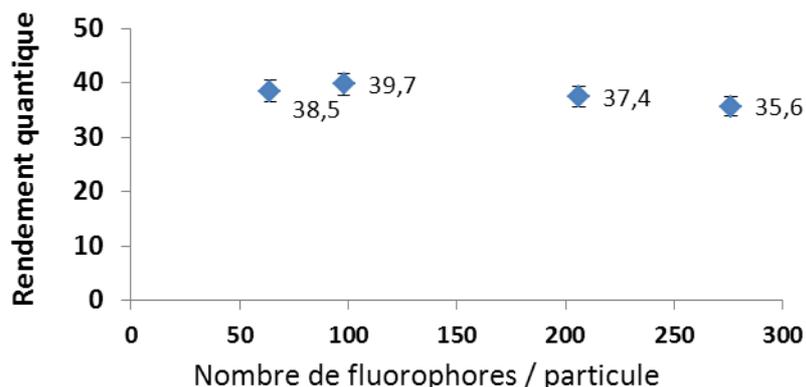


Figure III-5 : Rendement quantique de l'ICG suivant le taux de dopage

Ces lots ont été suivis en stabilité jusqu'à 60 jours après fabrication et aucune modification de leurs propriétés physico chimiques n'a été observée.

B.1.4 Discussion

Le vert d'indocyanine est encapsulé à environ 75 % dans les nanoparticules et ce quelle que soit la taille de la nanoparticule ou la quantité de fluorophore incorporée à la synthèse. Néanmoins, il est préférable de travailler à des concentrations < à 400 μM afin d'éviter tout « auto-quenching » du fluorophore. Concernant le DiD, le taux d'encapsulation est supérieur à celui de l'ICG, probablement à cause de la lipophilicité différente des deux fluorophores. L'ICG présente une perte à l'encapsulation d'environ 25 % pouvant être expliquée par sa nature amphiphile ($\log P = 1,8$) tandis que le DiD, de nature très lipophile ($\log P = 8$) aurait plus d'affinité avec le cœur cireux de la nanoparticule.

En conclusion, les deux fluorophores, ICG et DiD, sont encapsulés de manière quantitative et stable dans la lipidot et conduisent à des agents de contraste très brillants. Encapsuler l'ICG dans la nanoparticule permet d'améliorer considérablement son rendement quantique, de 4 à 6 % lorsque l'ICG est libre dans l'eau contre 17 % dans les lipidots. De plus, l'ICG libre perd toute fluorescence en quelques heures en milieu aqueux alors que l'ICG encapsulé dans les nanoparticules, stockées dans du tampon PBS 1X, ne perd que 12 % de son intensité de fluorescence au bout de 60 jours.

B.2 Devenir *in vivo* de l'ICG encapsulé dans les lipidots

Afin d'évaluer le devenir *in vivo* de l'ICG encapsulé dans les lipidots dans le modèle animal retenu au cours de ce travail, la souris FVB, un lot de nanoparticules de 50 nm de diamètre doublement marquées (radioactivité et fluorescence) est réalisé, en encapsulant de l'ICG et du [¹⁴C]Cholestéryl Oléate ([¹⁴C]CHO) dans le cœur de la nanoparticule. L'hypothèse est que ce radiotraceur permettra de comparer la biodistribution de ce lot avec les résultats *in vivo* de la lipidot triplement marquée (Chapitre II), et de définir si l'ICG, comme précédemment le DiD, suit la même biodistribution.

Un lot de lipidots doublement marquées à l'ICG et au [¹⁴C]CHO est synthétisé suivant le même protocole que celui utilisé pour les nanoparticules triplement marquées décrites précédemment (Chapitre VI, Annexe A). Le lot est ensuite dilué afin d'obtenir une concentration en ICG de 345 μM et une dose en [¹⁴C]CHO de 5 μCi / mL pour une concentration en lipides de 23 mg / mL. La taille obtenue pour les nanoparticules est de 51 nm avec une polydispersité de 0,15. En un mois, le lot a perdu 7 % de son intensité de fluorescence sans modification du spectre d'émission.

Le comportement de l'ICG encapsulé dans les lipidots est comparé à celui de l'ICG libre chez la souris femelle FVB. Les injections sont réalisées par bolus dans la veine caudale sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane à 2,5 %. Aux temps définis, les animaux sont sacrifiés et les organes prélevés (protocole identique à celui utilisé pour les lipidots triplement marquées, Chapitres II et VI, partie expérimentale A), passés sous le dispositif d'imagerie Fluobeam™ 800 afin d'évaluer leur fluorescence, puis pesés et préparés pour être comptés en radioactivité suivant le protocole précédemment décrit (Chapitres II et VI, partie expérimentale C). L'ensemble des caractéristiques du lot prêt à l'injection sont regroupées Tableau 3. La dose d'ICG libre injectée est de 23 nmol / animal.

Taille (nm)	51,3
Polydispersité	0,15
[¹⁴C]CHO (μCi / mL)	4,9
% d'encapsulation du [¹⁴C]CHO	99
% d'encapsulation de l'ICG	74
Perte à la dialyse du [¹⁴C]CHO (% de dose)	1
Nombre d'ICG / nanoparticule	134
Concentration en lipides (mg / mL)	23
nmol d'ICG / 100 μL de lipidots	17
λ_{absorption} / λ_{émission} (nm)	800 / 835

Tableau III-3 : Caractérisation du lot doublement marqué ICG – [¹⁴C]CHO prêt à l'injection

La biodistribution des lipidots-ICG-[¹⁴C]CHO après injection est représentée Figure 6. Une décorrélation entre les signaux de radioactivité et de fluorescence, et ce même à des temps très courts après injection, est observée. La biodistribution du [¹⁴C]CHO est identique à celle obtenue dans l'expérience de triple marquage de la nanoparticule (Chapitre II), à savoir une accumulation dans le foie, les surrénales et les ovaires. En revanche le signal de fluorescence s'accumule principalement dans le foie, les reins et l'intestin (Figure 6).

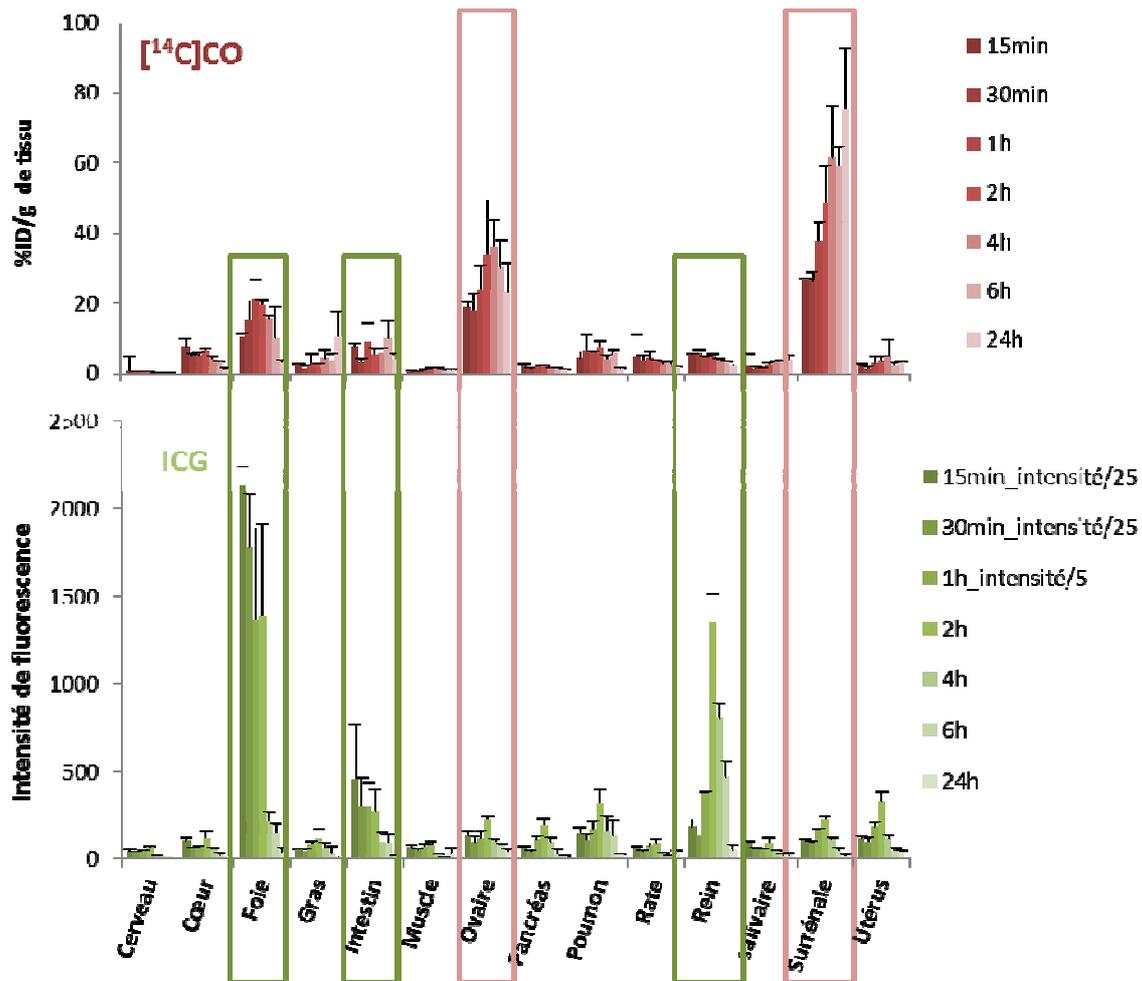


Figure III-6: Biodistribution des lipidot-ICG- $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ chez la souris saine FVB. Le graphique du haut représente la radioactivité et le graphique du bas la fluorescence dans les différents organes après prélèvement aux temps indiqués. Temps d'exposition de 100 ms.

Les biodistributions de fluorescence mesurées après injection d'ICG libre ou d'ICG encapsulé dans les lipidots sont représentées Figure 7. Ces graphiques mettent en évidence que les organes de biodistribution de l'ICG encapsulé dans la lipidot sont identiques à ceux de l'ICG libre avec une forte accumulation dans le foie, l'intestin et les reins. De même, les cinétiques d'accumulation et d'élimination dans ces organes sont similaires pour les deux formes d'ICG (Figure 8).

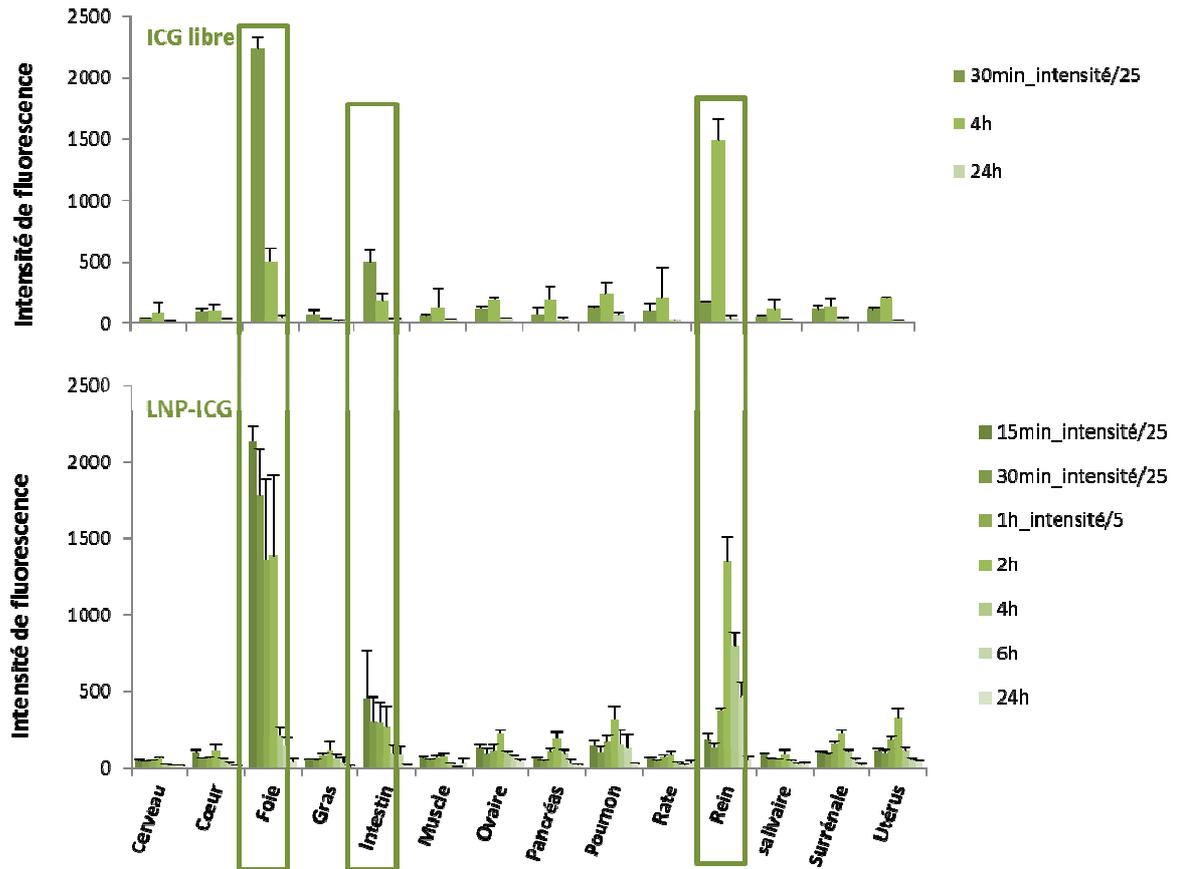


Figure III-7 : Comparaison des biodistributions de l'ICG libre par rapport à l'ICG encapsulé dans la nanoparticule. L'ensemble des photos sont réalisées avec la Fluobeam™ 800, 100 ms d'exposition.

Cette première expérience met en évidence que la lipidot ne joue pas le même rôle de vecteur pour l'ICG que pour le DiD. En effet, il est observé une décorrélation des signaux radioactifs et fluorescents dès 15 minutes après injection et des organes d'accumulations différents pour le [¹⁴C]CHO (foie, ovaires, surrénales) et l'ICG (foie, intestin, rein). Aucune différence n'est observée entre les distributions après injection de l'ICG libre ou d'ICG encapsulé (Figures 7 et 8). Dès les premiers temps de cinétique (15 minutes ou 30 minutes après injection), le signal plasmatique observé est déjà très faible.

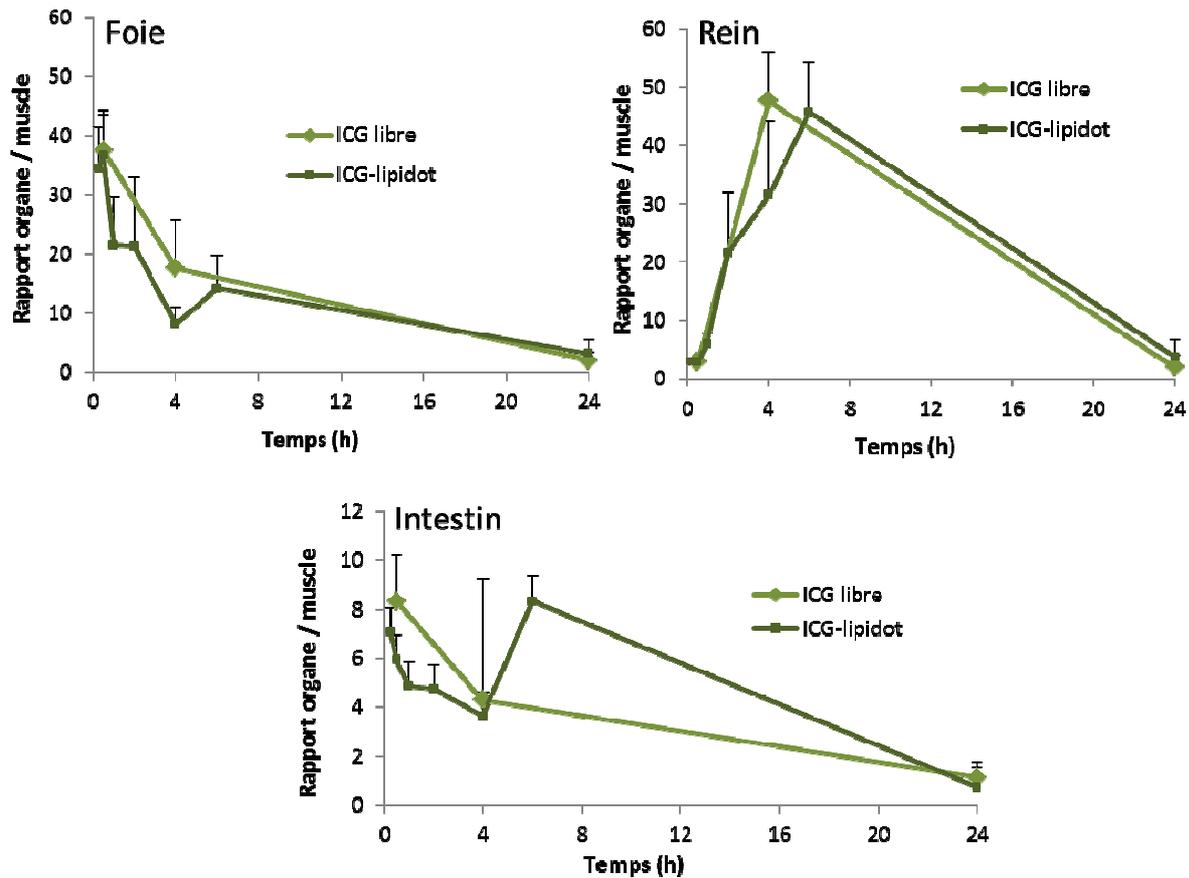


Figure III-8 : Comparaison des cinétiques de distribution dans les organes de l'ICG libre ou encapsulé dans les lipidots dans le foie, les reins et l'intestin

B.3 Discussion sur la biodistribution de l'ICG encapsulé dans les lipidots

Les résultats obtenus Chapitre II, et en particulier la colocalisation du $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ avec les deux autres traceurs $[^3\text{H}]\text{CHE}$ et DiD pendant les premières heures suivant l'injection, nous avaient fait conclure à l'intégrité du cœur de la particule pendant ce laps de temps *in vivo*. Néanmoins, ces résultats ne sont pas retrouvés lorsque l'ICG et le $[^{14}\text{C}]\text{CHO}$ sont co-encapsulés, ce qui amène à plusieurs réflexions concernant le comportement de la lipidot après injection. **(1)** Les essais d'encapsulation de l'ICG dans la lipidot, leurs caractéristiques physico-chimiques, ainsi que leur stabilité en tampon aqueux montrent une encapsulation < 75 % du fluorophore sans modification du système et une stabilité dans du PBS 1 X d'au moins 60 jours. Or, malgré ces données indiquant une bonne stabilité en milieu tamponné, l'ensemble des expériences réalisées dans ce chapitre montrent qu'après injection, l'ICG encapsulé possède le même profil de biodistribution que l'ICG libre et un profil différent de

celui du [^{14}C]CHO, qui est, lui, identique à celui obtenu dans les expériences du Chapitre II. **(2)** Les premières expériences menées à Montréal avec le radiotracteur DPPC montraient un probable échange actif des phospholipides de l'interface de la particule avec le milieu environnant. **(3)** Il existe *in vivo* des interactions fortes entre l'ICG et les protéines plasmatiques ; ce fluorophore est notamment connu pour avoir un taux de liaison aux protéines plasmatiques, dont l'albumine, de plus de 99 %, ce qui modifie son devenir au sein du compartiment sanguin. Müller a montré le rôle important joué par l'adsorption des protéines plasmatiques (notamment les apolipoprotéines) sur les nanoparticules lipidiques solides (SLN), et la modification qu'elles entraînaient sur la biodistribution *in vivo* des nano-objets, notamment lorsqu'il s'agit de cibler le cerveau grâce à l'ApoE par exemple^{175, 176, 211, 212}. De plus, un effet « burst release » est observé pour de nombreuses drogues et particules après leur administration *in vivo*^{211, 213, 214}. Le « burst release » est une sortie rapide des composants encapsulés dans des nanoparticules suite à leur mise en contact avec un grand volume aqueux ou le système sanguin, dû au phénomène de diffusion. Si ce phénomène existe avec l'ICG, ce qui est probable puisque ce fluorophore possède une affinité particulière pour les protéines plasmatiques, cela pourrait expliquer qu'il puisse fuir de la particule après injection dans le compartiment sanguin, s'adsorber sur les protéines circulantes, et suivre *in fine* la même distribution que l'ICG libre.

De plus, la nature amphiphile de l'ICG et lipophile du DiD suggère que leur localisation au sein des lipidots puisse être différente. Dans la suite de ce chapitre, nous allons décrire les expériences menées pour vérifier ces hypothèses et comparer le comportement *in vivo* du DiD et celui de l'ICG.

C. Lipidot-ICG et lipidot-DiD : localisation du fluorophore et comportement en présence de protéines plasmatiques

L'objectif est ici de comparer le système lipidot-DiD qui est stable après injection, au système lipidot-ICG. Suite aux résultats de biodistributions différentes des lipidots suivant l'utilisation de l'ICG ou du DiD comme fluorophore, une étude de localisation de ces deux molécules au sein de la nanoparticule a été réalisée. Afin d'essayer de prévoir le comportement *in vivo* et la fuite potentielle de ces molécules encapsulées, un « pré-test » *in vivo* a été mis en place faisant intervenir l'albumine. Puis, une étude comparative des différentes tailles de nanoparticules et des différents taux de dopage en ICG et DiD a été réalisée en appliquant le « pré-test » *in vivo*.

C.1 Localisation des fluorophores dans la nanoparticule

C.1.1 Principe de l'effet nucléaire Overhauser

Peu de techniques permettent d'obtenir des informations structurales à l'échelle nanométrique et elles sont difficiles à mettre en œuvre (diffusion de rayons X, rayonnement synchrotron pour obtenir des données sur la cristallinité de la structure, microscopie à force atomique qui peut permettre de visualiser en 3D la surface d'une nanoparticule par exemple). Nous utiliserons, au cours de ces expériences la technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) : sous des conditions appropriées, un échantillon dans un champ magnétique, peut absorber des radiations électromagnétiques dans la gamme des radiofréquences. Seuls les noyaux de spin $\frac{1}{2}$ entier présents dans la molécule (par exemple ^1H) donneront lieu à une résonance, qui dépendra de l'environnement chimique dans la molécule.

La RMN fournit aussi des informations sur la proximité spatiale entre 2 atomes en utilisant des techniques basées sur l'effet nOe (effet nucléaire Overhauser). Cette technique donne une information spatiale, notamment sur les distances internucléaires. Elle met en évidence les interactions dipolaires entre deux spins géométriquement proches mais non forcément liés (Figure 9). Ainsi, dans cette étude, elle permet d'évaluer de manière **qualitative** la localisation du fluorophore dans la nanoparticule sur la base d'un transfert ou

non d'aimantation entre protons d'une molécule (le fluorophore) à une autre (un composé de la nanoparticule).

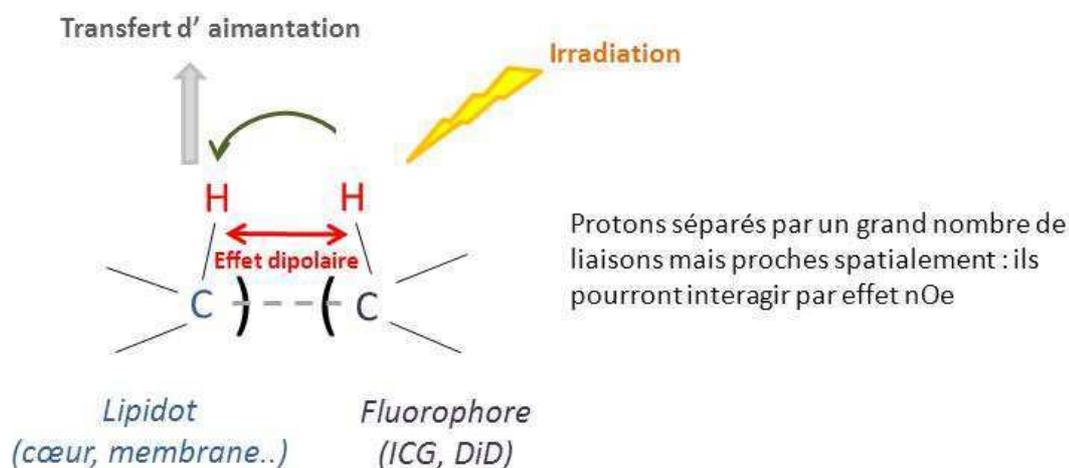


Figure III-9 : Représentation schématique de l'utilisation de l'effet nOe.

Au cours d'une collaboration avec le laboratoire RMN l'Institut des Nanosciences et Cryogénie du CEA Grenoble, nous avons précédemment montré qu'il était possible de réaliser des analyses RMN des lipidots, et d'obtenir des informations sur l'état moléculaire du cœur des particules (viscosité interne)¹⁵². La technique de nOe a permis également d'obtenir des informations sur la localisation cœur / membrane d'un fluorophore dont les propriétés optiques sont sensibles à l'environnement, le Nile Red, informations qui ont été corrélées à celles obtenues par l'étude de la fluorescence¹⁵³. De manière intéressante, la localisation du fluorophore dans la coquille des particules lipidiques était associée à un burst release (sortie du fluorophore hors des lipidots) rapide du Nile Red à 37 °C, alors que la fraction de fluorophore incluse dans le cœur ne diffusait que lentement à l'extérieur des particules, avec une cinétique gouvernée par la viscosité du cœur de la particule¹⁵³.

Dans le cas de l'ICG et du DiD, nous recherchons les interactions potentielles entre les composés de la nanoparticule (glycérides, phospholipides, PEG) et du fluorophore. Dans un premier temps, les spectres RMN ¹H des fluorophores seuls sont enregistrés pour localiser les résonances des groupements aromatiques de l'ICG et du DiD. Après avoir identifié de manière spécifique les résonances caractéristiques de chaque composé de la nanoparticule, les spectres de RMN ¹H des lipidots dopées en ICG ou en DiD ont été enregistrés avec et sans

irradiation des résonances associées à chacun des composants de la nanoparticule. Si des protons du fluorophore sont situés à proximité de ceux du composé irradié, il y aura transfert d'aimantation du proton du composé de la nanoparticule vers les protons du fluorophore qui pourra être observée en calculant la différence de spectre entre le spectre irradié et le spectre non irradié. On utilise cette méthode dans sa dimension qualitative: en effet, suivant le nombre de fluorophores et la distance à laquelle il se trouve du composé de la nanoparticule irradié, le transfert peut être plus ou moins important sans pour autant signifier que le fluorophore soit présent en plus ou moins faible quantité. Les expériences ont été réalisées en étroite collaboration avec Pierre-Alain Bayle et Michel Bardet de l'INAC, à Grenoble.

C.1.2 Spectres RMN ^1H des lipidots et des fluorophores seuls

L'attribution des résonances caractéristiques des protons des différents composants des lipidots avait été réalisée de manière classique par RMN ^1H au cours de la précédente thèse de T. Delmas en collaboration avec P-A. Bayle de l'INAC (Figure 10)¹⁵³.

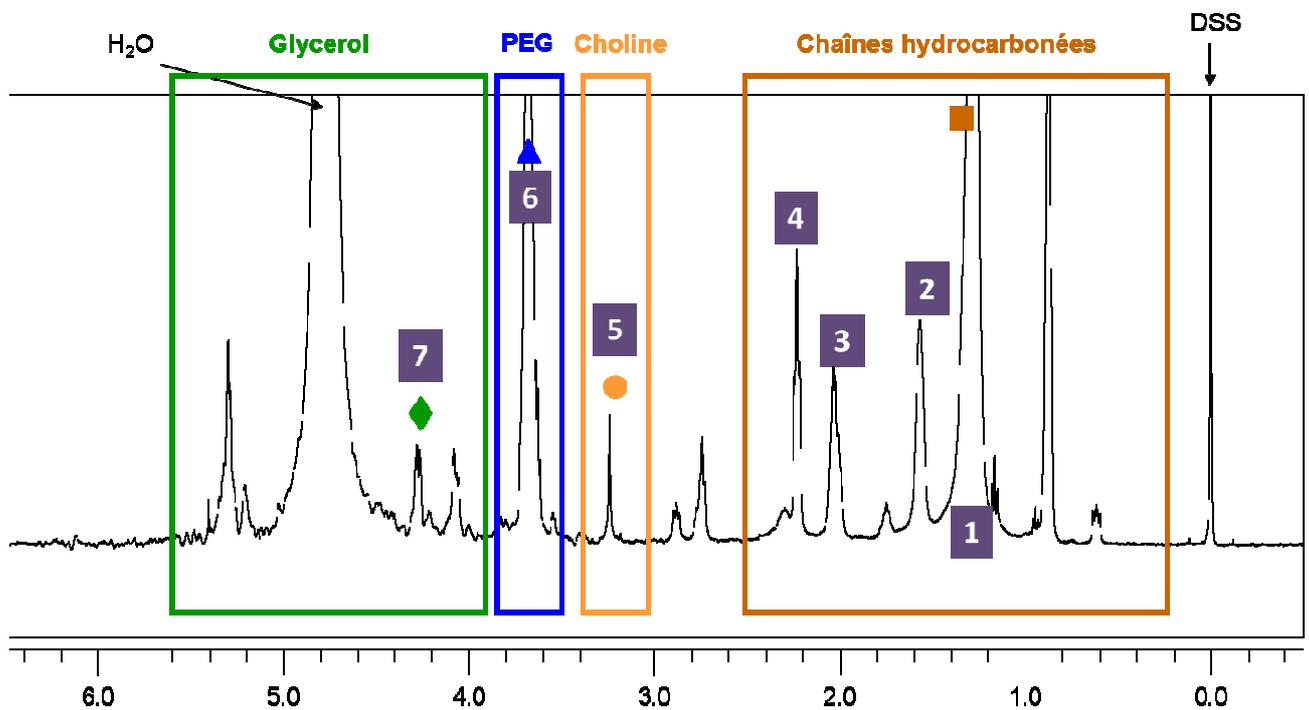
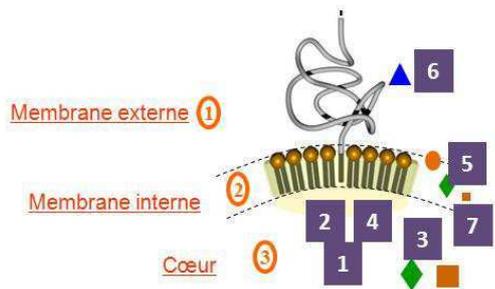
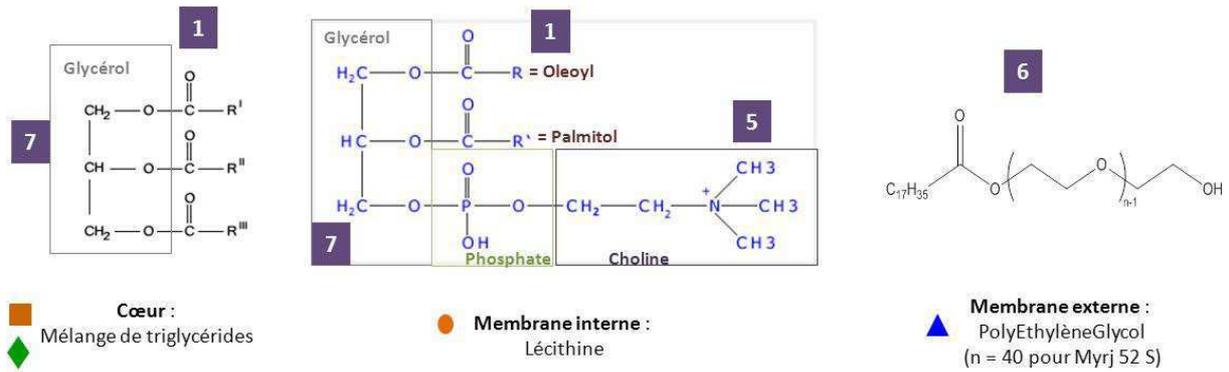


Figure III-10 : Spectre ^1H RMN de la nanoparticule vide avec identification des pics caractéristiques spécifiques des groupements glycérol, PEG, choline et des chaînes hydrocarbonées (500 MHz, Bruker).

Quatre signaux représentatifs des 3 unités structurales de la lipidot avaient été identifiés :

- Le pic à 3,7 ppm, noté par le triangle bleu et le chiffre 6 dans les Figures 10 et 11, correspond aux protons méthylènes des unités éthylène glycol de la chaîne PEG des surfactants hydrophiles. Il est associé à la **couronne hydrophile** des particules.
- Le pic à 3,3 ppm, noté par le rond orange et le chiffre 5 dans les Figures 10 et 11 est caractéristique d'un singulet spécifique des groupes méthyles de la fonction triméthyl ammonium de la choline (tête polaire de la phosphatidylcholine). Ce pic est donc caractéristique de l'interface extérieure / membrane des lipidots. L'interface membrane / cœur est également représentée par le pic à 4,3 ppm, noté par le losange vert sur les Figures 14 et 15. Ce signal correspond aux protons méthylènes des parties triglycérides de la lécithine et des lipides du cœur (huile et cire). Ces deux signaux sont associés à l'**interface membranaire** des lipidots.
- Les pics à 1,3 ppm, 1,5 ppm, 2,1 ppm et 2,3 ppm, notés par un carré marron et les chiffres de 1 à 4 dans les Figures 10 et 11, peuvent être divisés en deux parties. Le pic caractéristique à 1,3 ppm, noté 1, attribué à la résonance des protons CH₂ des chaînes d'acides gras (C₈-C₁₈), représente la partie très hydrophobe des constituants. Les chiffres de 2 à 4 représentent les groupements CH₂-O qui pourraient potentiellement se trouver plus en périphérie du centre que les groupements CH. Ces signaux sont associés **au cœur** de la lipidot.

Sept fréquences associées aux pics caractéristiques de chaque composé des lipidots sont irradiées tour à tour pour réaliser les expériences de NOE Figure 11.



7 fréquences sont irradiées :

- 4 dans les chaînes alkyles (CH_x pour le numéro 1 ou CH-O pour les numéros 2,3,4)
- 1 dans la partie choline
- 1 dans la partie PEG
- 1 dans la partie glycérol

Figure III-11 : Représentation schématique des lieux d'irradiation des différents composants de la nanoparticule et la localisation qui leur est associée au sein du système.

Dans un second temps, les spectres RMN ¹H de l'ICG et du DiD sont enregistrés. Les spectres montrent que les deux molécules possèdent des pics caractéristiques déblindés (à savoir qu'ils possèdent des déplacements chimiques supérieurs) par rapport aux pics caractéristiques des lipidots, dans la zone > à 6 ppm correspondant aux cycles aromatiques des fluorophores (Figure 12 et Figure 13).

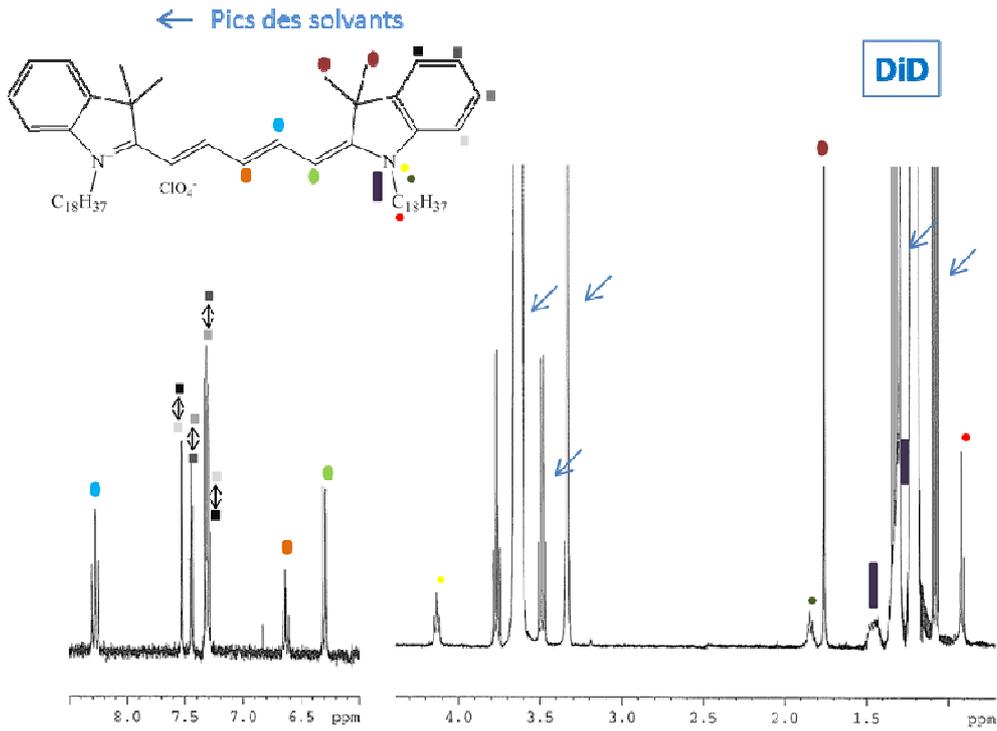


Figure III-12 : Spectre RMN ^1H du DiD

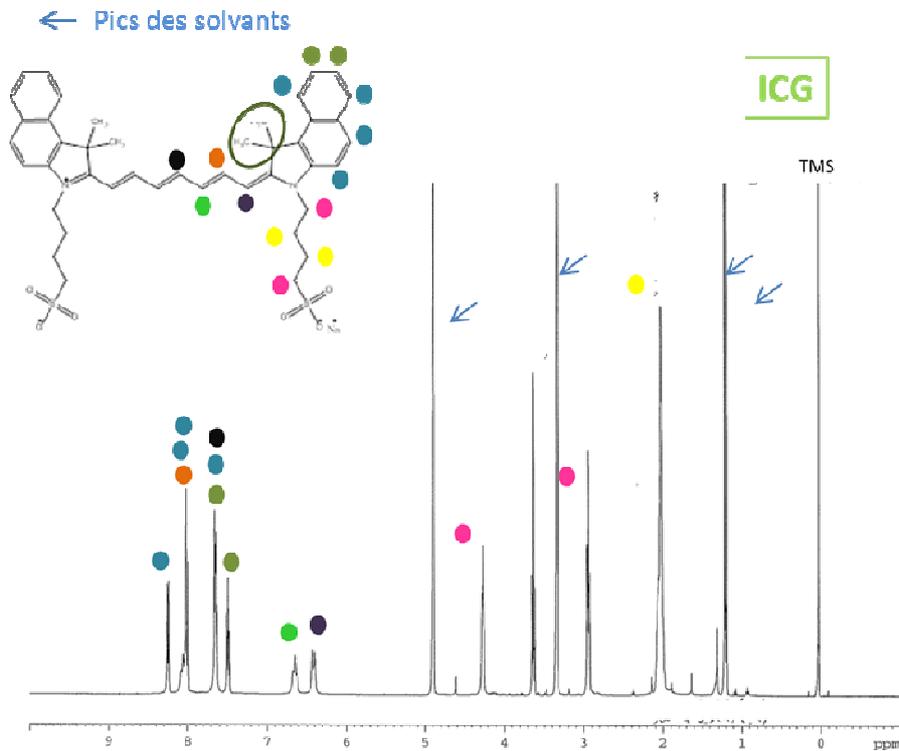


Figure III-13 : Spectre RMN ^1H de l'ICG

C.1.3 Expérience de Diffusion de NOE

Pour les échantillons de lipidots-ICG ou lipidots-DiD, les pics ^1H RMN caractéristiques des différents constituants des particules (Tableau 4), sont successivement irradiés et seule la région correspondant à la zone aromatique spécifique du fluorophore (> 6 ppm). Les différentes résonances irradiées sont résumées dans le Tableau 4. Un spectre correspondant à une irradiation dans une zone où la lipidot ne présente pas de signal (1000 Hz) est également réalisé afin d'obtenir un spectre témoin.

		Déplacement chimique du proton irradié (ppm)
1	Chaîne hydrocarbonée	1,19
2	CH ₂ -O	1,48
3	CH ₂ -O	1,95
4	CH ₂ -O	2,15
5	Choline	3,14
6	PEG	3,6
7	Glycérol	3,99
	Blanc	(Hz) -1000

Tableau III-4 : Déplacements chimiques des protons irradiés (ppm) utilisés pour les expériences de NOE sur les échantillons des lipidots dopées en ICG et dopées en DiD.

Le spectre enregistré lors de l'irradiation est ensuite soustrait au spectre témoin. Les spectres ainsi obtenus par les différentes irradiations sont présentés Figure 13 pour le DiD et Figure 14 pour l'ICG.

Pour le DiD, un effet nOe est observé à 6,4 ppm lors de l'irradiation des pics correspondant aux composés du cœur des lipidots, à savoir les chaînes hydrophobes ainsi que les CH₂-O. Lorsque ces fréquences sont excitées, il existe donc un transfert d'aimantation entre les protons de ces molécules et les molécules du DiD. En revanche, aucune différence de signal n'est observée lors de l'irradiation des PEG ou de la choline.

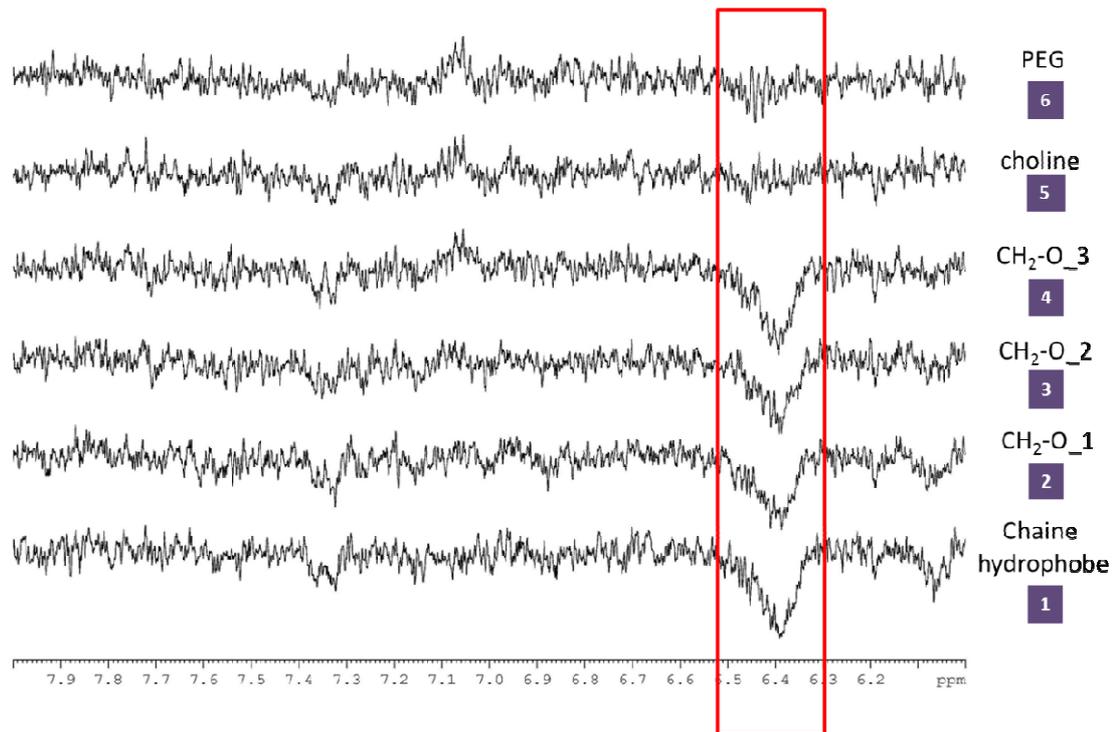


Figure III-13 : Expérience de *nOe diff* avec les lipidots-DiD en irradiant les différentes résonances ¹H spécifiques des constituants de la nanoparticule.

Pour l'ICG, il est observé deux zones de modification du signal RMN ¹H entre 7,2 et 8 ppm. Bien que les modifications soient plus ou moins prononcées, elles existent pour l'ensemble des composés irradiés de la nanoparticule.

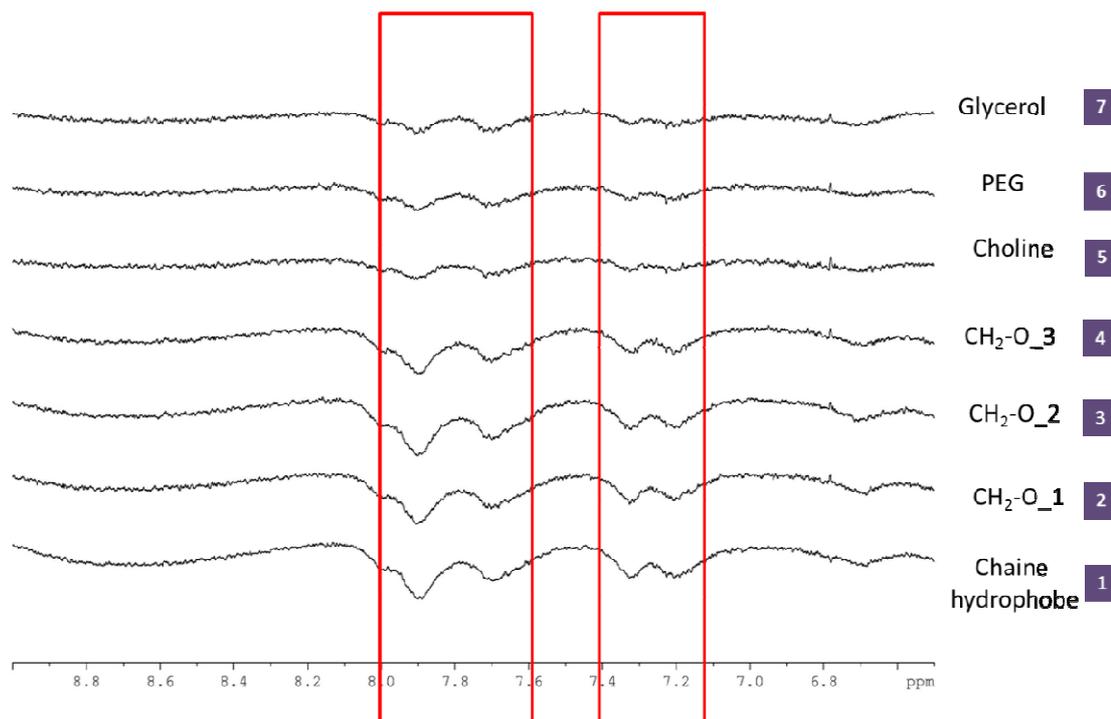


Figure III-14 : Expérience de nOe diff avec les lipidots-ICG en irradiant les différentes résonances ^1H spécifiques des constituants de la nanoparticule.

C.1.4 Conclusion

L'expérience RMN ^1H de diffusion de nOe via RMN donne des informations importantes concernant la localisation du fluorophore au sein de la nanoparticule. En effet, le DiD, molécule lipophile, semble être localisé de manière préférentielle dans le cœur de la nanoparticule tandis que l'ICG, molécule plus amphiphile, est présente dans l'ensemble de la lipidot, que ce soit le cœur ou la membrane. Cette technique n'étant pas quantitative, elle ne permet pas de déterminer si l'ICG est présent de manière préférentielle dans le cœur ou dans la membrane des particules. Néanmoins, il existe une différence de localisation entre le DiD et l'ICG qui pourrait être à l'origine de leur comportement différent après injection *in vivo*.

C.2 Mise en place d'un « pré-test » *in vivo* : devenir des lipidots ICG et DiD

Afin de prédire le comportement des lipidots en présence de protéines plasmatiques, un test de mise en contact des particules en présence de BSA est mis en place : ce « pré-test » pourrait permettre de mieux comprendre et prédire le comportement des nanoparticules après leur injection *in vivo*.

C.2.1 « Pré-test » *in vivo*

L'objectif de ce test est de créer un test intermédiaire entre la stabilité dans le temps des nanoparticules dans le PBS et celle observée après leur injection du vecteur, afin de pouvoir prédire le comportement du composé encapsulé *in vivo*.

Un volume défini (500 μ L à 50 mg / mL en lipides) de nanoparticules caractérisées et ayant été fraîchement purifiées par dialyse (seuil de coupure 12 - 14 kDa) pour éliminer la présence de tout fluorophore libre en solution, est mis en contact unique avec de la BSA (Bovine Serum Albumin) ([BSA] = 80 g / L, concentration plasmatique retrouvée chez l'homme). Une fois la BSA dissoute dans la dispersion de particules (environ 5 min, sous agitation), l'ensemble est placé en dialyse (membrane de 100 kDa afin de retenir la nanoparticule et éliminer la BSA libre) contre du PBS 1X. Puis le dialysat est prélevé et à nouveau caractérisé afin de pouvoir comparer la nanoparticule avant et après contact avec la BSA (Figure 15).

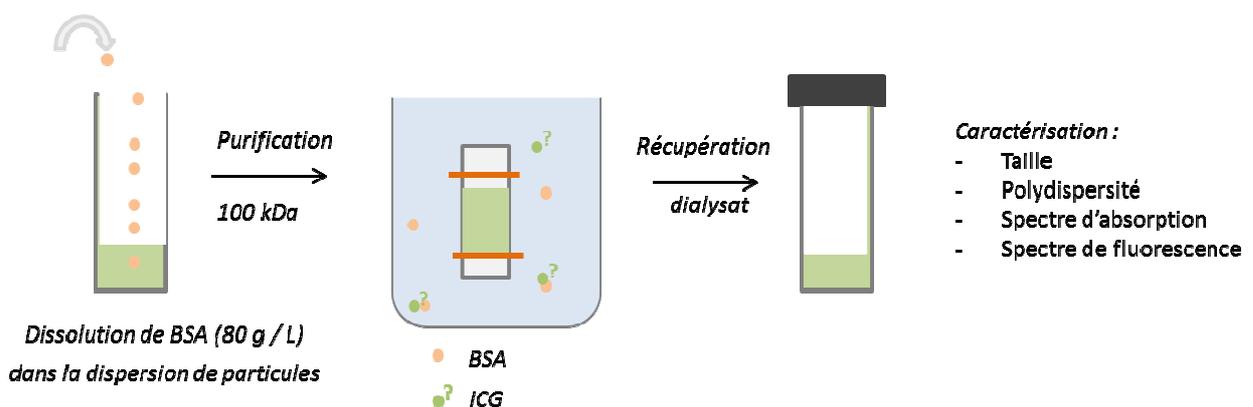


Figure III-15 : Représentation schématique du test permettant d'évaluer la fuite de l'ICG par adsorption sur l'albumine.

L'intégrité physico-chimique et la perte d'absorbance et de rendement quantique des nanoparticules sont évalués. Un essai avec un lot de nanoparticules seules (sans contact avec la BSA) est également réalisé pour servir de témoin et vérifier la non-adsorption de la nanoparticule ou du fluorophore sur les membranes de dialyse utilisées.

Il est à noter que ce test n'est pas représentatif de la totalité du compartiment sanguin. En effet, il existe de nombreuses autres protéines comme les apolipoprotéines (VLDL, HDL, chylomicrons...). L'albumine a été choisie (BSA, albumine bovine) car elle représente à elle seule 55 % des protéines plasmatiques.

Des essais avec du sérum ont également été réalisés afin d'évaluer la différence avec la BSA. Les résultats obtenus étant similaires (Figure 16), la BSA seule a été retenue à cause de son faible coût et de sa facilité d'utilisation. Différents lots de particules ont été évalués par ce « pré-test *in vivo* ».

C.2.2 Influence de la taille

Le test à la BSA est réalisé sur les lipidots dont les diamètres varient de 30 nm à 120 nm. Pour les formulations encapsulant l'ICG, les résultats présentés comparent l'utilisation de BSA ou de sérum (Figure 16). De manière générale, il est observé une diminution du nombre de fluorophores encapsulés (mesurés par absorbance des solutions) pour les lipidots dopées en ICG (de 45 % pour les 30 nm ou de 22 % pour les 50 nm par exemple) tandis qu'aucune différence n'a été observée pour les lipidots dopées en DiD, et ce quelle que soit leur taille (Figure 16).

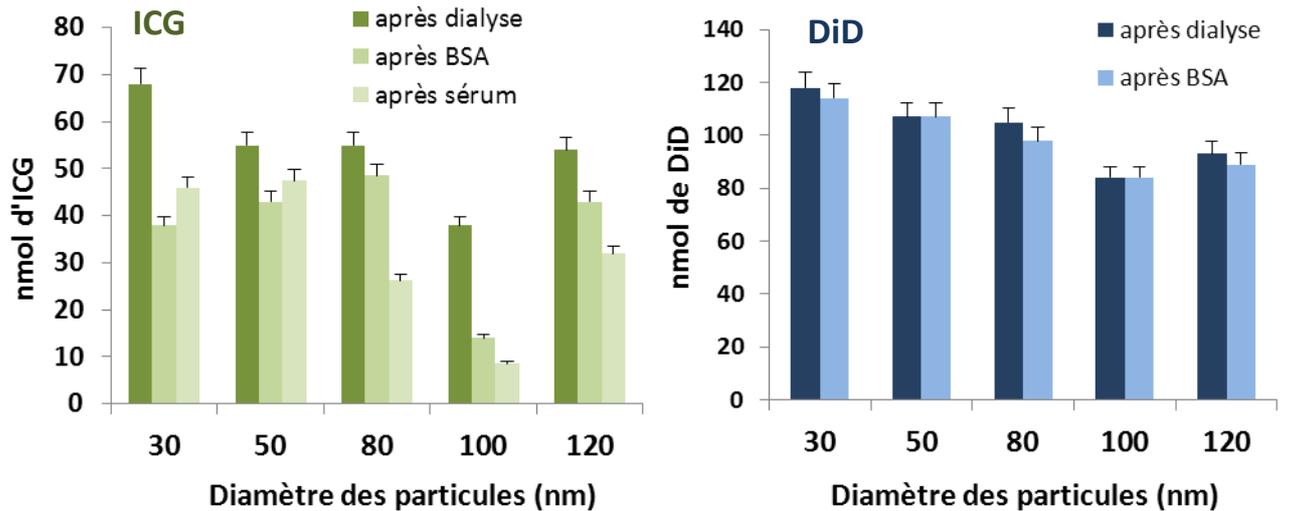


Figure III-16 : Perte d'ICG et de DiD (mesurées par absorbance) suite à la mise en contact des nanoparticules avec des protéines plasmatiques type BSA ou sérum.

La sortie potentielle de l'ICG de la nanoparticule après mise en contact avec la BSA entraîne une perte d'intensité de fluorescence importante allant de 22 à 82 % comme représenté Figure 17. Les expériences similaires avec le DiD ne montraient pas de perte.

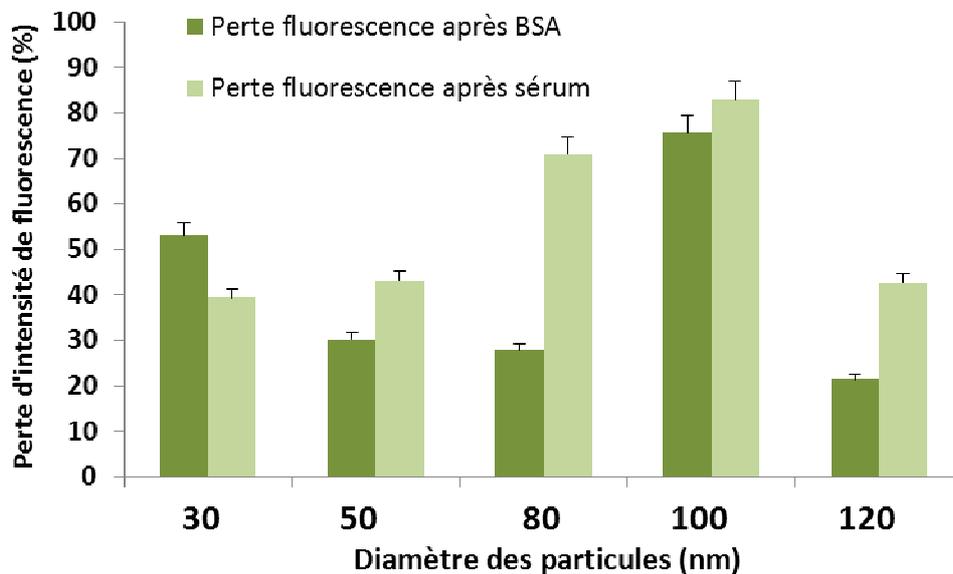


Figure III-17 : Evaluation de la perte en intensité de fluorescence suivant la taille des lipidots-ICG après leur contact avec la BSA ou le sérum.

Aucune différence significative n'étant observée avec le sérum bovin par rapport à l'utilisation de la BSA. Celle-ci sera préférée en raison de sa facilité d'utilisation (dissolution de cristaux, permettant une préparation extemporanée de la solution) et de son coût relativement faible.

C.2.3 Influence du taux de dopage en fluorophore

Le test avec la BSA est réalisé sur les lipidots dopés à concentration croissante en ICG. Une baisse de la quantité de fluorophores est observée après mise en contact de la BSA allant de 30 % à 78 % suivant les lots (Figure 18).

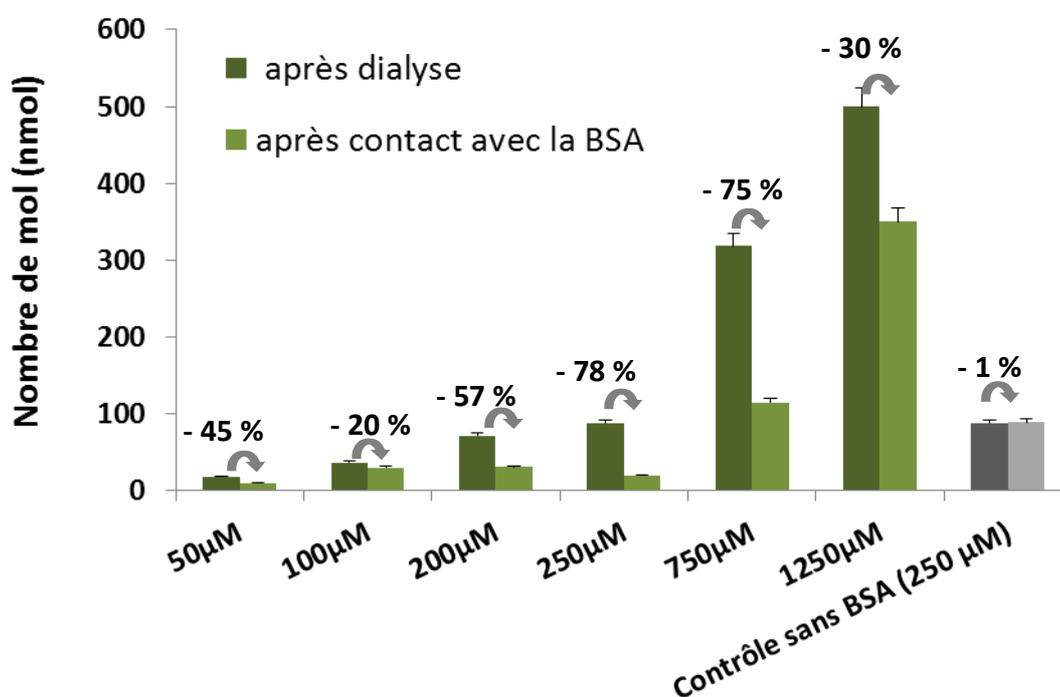


Figure III-18 : Graphique représentant la baisse de fluorescence en ICG entre la purification au moment de la synthèse puis après le test de la BSA.

Pour l'ensemble des lots, que ce soit ICG ou DiD, la présence de BSA à 80 g / L n'a modifié ni la taille, ni la polydispersité, ni le potentiel zêta des nanoparticules. A cette concentration en lipides (50 mg / mL), le rapport BSA / ICG est de 35 : 1 pour la concentration en fluorophore de 50 µM ; de 17,5 : 1 pour 100 µM en fluorophore ; 8,75 : 1 pour 200 µM ; 7 : 1 pour 250 µM ; 1,9 : 1 pour 750 µM et enfin 1,5 : 1 pour 1250 µM. Pour

les deux lots les plus dopés en fluorophores, il y a environ 2 mol de BSA pour une mol d'ICG. Cette concentration de BSA est très faible par rapport aux lots peu concentrés. Une 2^{ème} mise en contact avec la même concentration de BSA que précédemment est réalisée avec ces deux lots. Il en résulte une déstabilisation de la nanoparticule et une destruction de la fluorescence avec diminution du rendement quantique.

C.2.4 Influence de la concentration en lipides

Lors de leur introduction dans le milieu sanguin, les nanoparticules sont diluées dans le volume plasmatique, ce qui peut modifier leur comportement ou leur organisation (dissociation des phospholipides ou des surfactants PEGylés par exemple). L'influence de la concentration en lipides sur la fuite du fluorophore a donc été évaluée, pour une même concentration en ICG ou DiD.

Les nanoparticules ont été incubées en présence de BSA à 80 g / L à des fractions massiques allant de 0,1 (soit 100 mg / mL de lipides) à 0,001 (soit 1 mg / mL de lipides). Les expériences réalisées dans les paragraphes précédents utilisaient une fraction massique de $\Phi = 0,05$. La dilution théorique des nanoparticules après injection chez l'animal dans les expériences de biodistribution du Chapitre II conduisait à une fraction massique de 0,001 environ (pour un volume total plasmatique de 1,6 mL chez la souris). Le comportement du DiD et de l'ICG a été évalué par caractérisation des nanoparticules d'un point de vue physico-chimique et optique.

La Figure 19 représente la distribution en taille de la BSA seule (8,8 nm, PDI 0,17) et des nanoparticules en fonction de leur dilution dans la solution de BSA, mesurée par diffusion de la lumière. Les lipidots dopés en ICG ou en DiD sont placés à concentration constante en fluorophore dans la BSA (80 g / L) mais à fraction massique en lipide décroissante. D'une dispersion monomodale à forte concentration (50 nm), différents pics apparaissent lorsque les particules sont diluées (le pic à 50 nm se déplace, le pic de la BSA seule apparaît). La Figure 20 résume les résultats. Pour les deux formulations, la stabilité physico-chimique est conservée pour des dilutions jusqu'à des fractions massiques en lipides $\Phi = 0,05$ (soit 50 mg / mL de lipides). Une nouveau pic, peut-être dû à une agglomération de la BSA, est observée pour des concentrations des fractions massiques en lipides $\Phi = 0,05$ à $\Phi = 0,01$ avec un pic observé au nanosizer à 8 ou 10 nm (Figure 19). En revanche à partir de Φ

= 0,005, il est observé visuellement une destruction de la nanoparticule. En effet, une séparation de phase est visible en une partie huileuse en surface et une partie aqueuse dans le culot, et confirmée par l'impossibilité de mesurer une taille réaliste au nanosizer.

Ce test met donc en évidence l'absence de différence notable de stabilité colloïdale entre les nanoparticules dopées en DiD et les nanoparticules dopées en ICG.

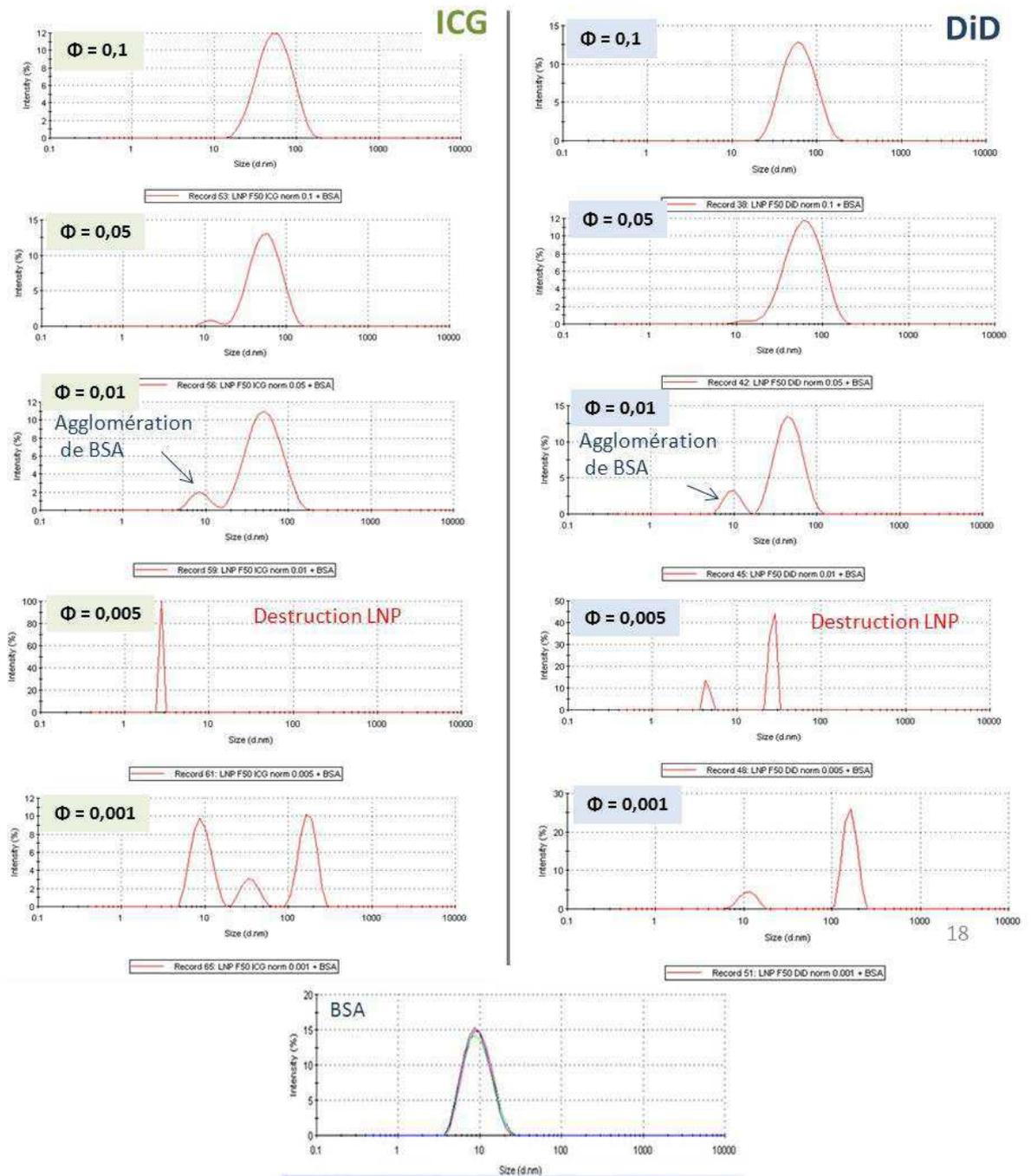


Figure III-19 : Capture des spectres d'analyse DLS pour chacune des dilutions en lipides et pour la

BSA.

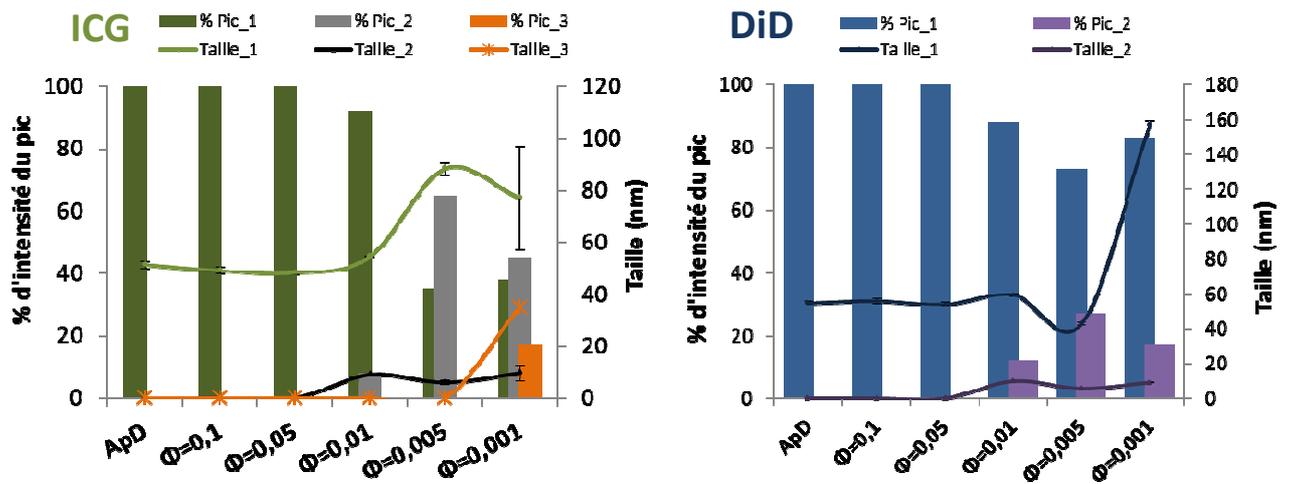


Figure III-20 : Distribution en taille des dispersions de lipidots en fonction de leur dilution dans un milieu mimant la concentration plasmatique en BSA

La Figure 21 représente la perte en intensité de fluorescence suite à la mise en contact des lipidots à différentes concentrations massiques avec un milieu à concentration constante en BSA. Ce test permet de mettre en évidence si la concentration en lipides peut avoir une influence sur la fuite du fluorophore dans le compartiment sanguin. D'un point de vue optique (spectre d'absorbance), des pertes de 44 % à $\Phi = 0,1$ et de 64 % à $\Phi = 0,01$ sont observées pour l'ICG (comme décrit précédemment) tandis que des pertes de 6 % à $\Phi = 0,1$ et de 70 % à $\Phi = 0,01$ sont observées pour le DiD. Concernant la perte en fluorescence, les nanoparticules dopées en DiD ont une perte importante en fluorescence à partir de $\Phi = 0,01$, c'est-à-dire pour la concentration à laquelle une déstabilisation des nanoparticules a été observée (Figures 19, 20). En revanche, pour l'ICG, une fuite du fluorophore est observée à partir de $\Phi = 0,1$ (comme déjà décrit dans les paragraphes C.1.1 et C.1.2). Par conséquent, la fuite du fluorophore existe même pour des concentrations massiques en lipides pour lesquelles les particules conservent leurs propriétés colloïdales.

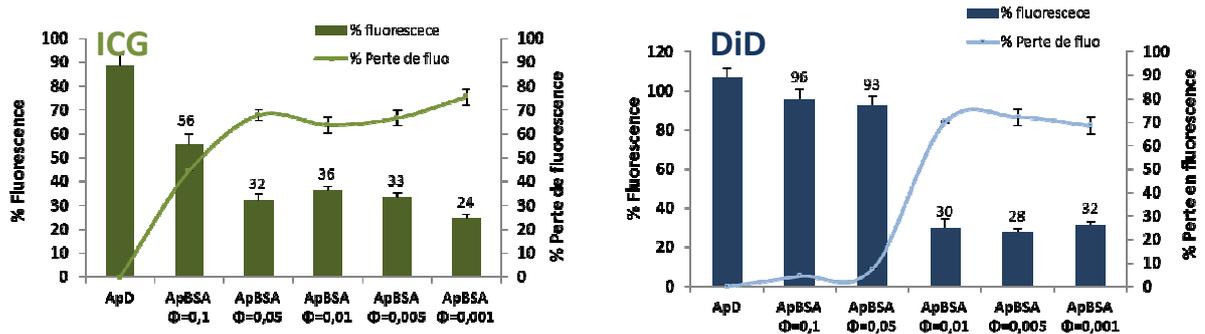


Figure III-21: Perte des caractéristiques de fluorescence des nanoparticules dopées en ICG (à gauche) ou en DiD (à droite) avec différentes concentrations en lipides mis en contact avec la BSA.

C.3 Discussion

L'ICG est une **molécule d'intérêt** dans le développement de nouveaux traceurs pour l'imagerie clinique. En effet, il est à ce jour le seul fluorophore approuvé par les autorités de santé capable d'émettre à des longueurs d'onde dans le proche infrarouge, le plus propice à l'imagerie *in vivo*. L'ICG est néanmoins un composé peu stable en milieu aqueux et dont les caractéristiques *in vivo* sont peu faciles à exploiter, avec notamment une $\frac{1}{2}$ vie plasmatique très courte et une élimination rapide de l'organisme^{190, 198}. L'ICG est un fluorophore amphiphile mais possédant une composante hydrophobe majoritaire, qui le rend peu soluble dans l'eau. Il est connu que l'ICG possède un fort taux de liaison aux protéines plasmatiques (plus de 99 %), ces interactions modifiant les propriétés d'absorbance du fluorophore (décalage de 25 nm dans le proche infrarouge lorsque l'ICG est adsorbé sur des protéines). Cette caractéristique de l'ICG montre à elle seule l'impact des protéines plasmatiques sur le comportement de ce fluorophore. Ces caractéristiques ont fait de l'ICG un candidat idéal pour l'encapsulation nanoparticulaire, bien qu'à ce jour peu de travaux traitant d'études *in vivo* aient été publiés. Plusieurs groupes ont essayé d'incorporer l'ICG dans des nanoobjets, comme Saxena et al^{215, 216} dans des nanoparticules polymériques (entre autre avec du PLGA), ou encore Yaseen et al²⁰⁵ dans des mésocapsules polymériques. A notre connaissance, l'encapsulation de l'ICG dans des particules à cœur lipidique n'avait pas encore été décrite. De bons rendements d'encapsulation de l'ICG dans les lipidots sont obtenus, similaires à ceux rapportés dans la littérature, de l'ordre de 74 % pour les nanoparticules de PLGA²¹⁵ et 90 % pour les mésocapsules²¹⁷. Des essais de relargage dans

du tampon aqueux montraient un « burst release » chez Saxena²¹⁵ avec 78 % de l'ICG relargué dans les 8 premières heures. Dans le cas de l'ICG encapsulé dans les lipidots, aucun phénomène de « burst release » n'a été observé. Les essais de diffusion de NOE par ¹H RMN ont mis en évidence que l'ICG est présent dans l'ensemble de la nanoparticule tandis que le DiD est présent uniquement dans le cœur. Des essais réalisés au laboratoire avec une molécule témoin, le Nile Red ($\log P = 3,8$)¹⁵³, amphiphile, dont les propriétés physicochimiques se rapprochent davantage de l'ICG que du DiD, avaient mis en évidence une double localisation de ce fluorophore dans la lipidot avec une présence majoritairement centrale mais également périphérique. En revanche, la mise en contact prolongée de la nanoparticule dopée au Nile Red dans un volume élevé de PBS avait mis en évidence la présence d'un burst release avec un relargage de 78 % du fluorophore dans les 8 premières heures, phénomène non observé avec l'ICG.

A ce stade d'avancement, les données dont nous disposons concernant l'encapsulation de l'ICG dans les lipidots indiquent que le système est stable en milieu tamponné pendant plusieurs mois, sans relargage de l'ICG dans le tampon, mais que dès qu'il est injecté chez l'animal, l'ICG encapsulé se comporte comme de l'ICG libre. Plusieurs hypothèses peuvent être émises, comme une localisation plus périphérique de l'ICG dans les lipidots ou encore une fuite de l'ICG par diffusion hors de la nanoparticule. Nous savons que la nanoparticule est un système « dynamique », notamment suite aux expériences menées chez le rat à Montréal, qui mettaient en avant un échange des phospholipides membranaires après injection *in vivo*, une fuite probable de l'acide palmitique de la nanoparticule, ou encore l'interaction probables des protéines plasmatiques avec la surface de la nanoparticule (Chapitre II).

L'hypothèse émise est que l'ICG, en milieu aqueux, est très stable dans la nanoparticule, le fluorophore ayant une plus grande affinité pour le cœur lipophile de la lipidot que pour l'eau qui l'entoure. En revanche, après injection dans le système plasmatique, la nanoparticule s'entoure de protéines de type albumine ou apolipoprotéine. L'ICG a alors pour « choix » ou de rester en contact avec les molécules lipophiles du cœur de la nanoparticule, ou de s'adsorber sur les protéines plasmatiques pour lesquelles il a une très forte affinité de 99 % (représentation schématique Figure 22).

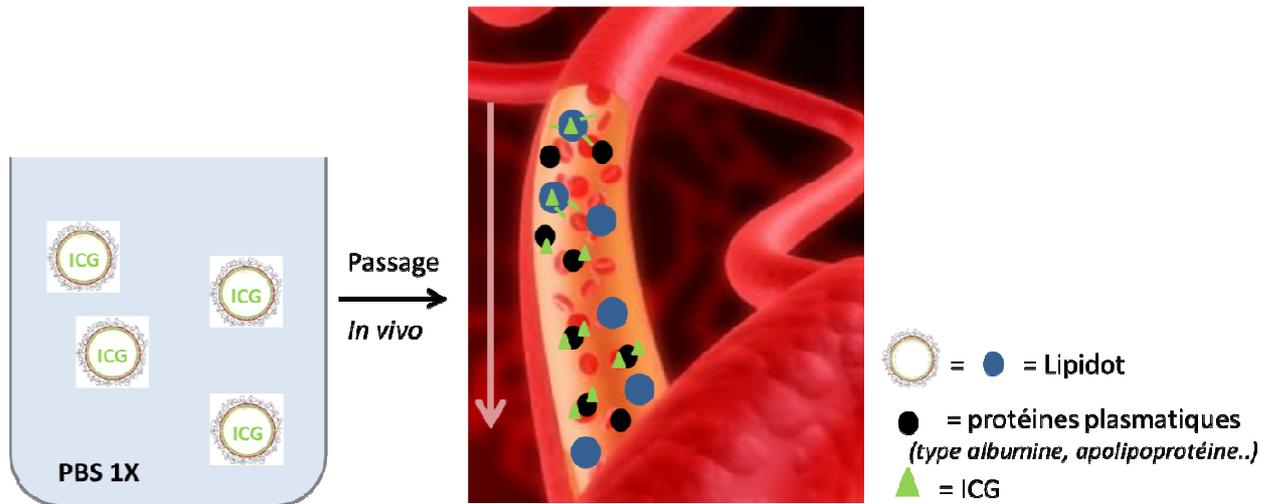


Figure III-22 : Représentation à gauche de l'ICG encapsulé de manière stable dans la lipidot en milieu aqueux ; sur la droite une représentation de cette même nanoparticule après injection *in vivo*. Au contact des protéines plasmatiques, l'ICG va diffuser de la lipidot et s'adsorber sur ces protéines. L'ICG encapsulé dans la nanoparticule adopte alors le même comportement que de l'ICG libre injecté.

Afin d'étayer cette hypothèse sur le comportement de la molécule encapsulée dans la lipidot après son injection *in vivo*, un pré test à base d'albumine a été mis en place. Ce test ne reste néanmoins qu'un outil comparatif car il ne fait intervenir qu'un seul type de protéine plasmatique et ne représente pas l'ensemble des processus qui peuvent se produire au sein du compartiment sanguin. De plus, ce test semble plus destructif que ce qui se passe *in vivo*. En effet, concernant la dilution en lipides des lipidots, une destruction complète des nanoparticules est observée à la fois pour l'ICG et pour le DiD pour des fractions massiques de 0,005. Dans les expériences menées de triple marquage (Chapitre II), la fraction massique théorique après injection était de 0,001. Une modification de structure des nanoparticules après injection peut être envisagée, avec notamment un réarrangement de la couronne phospholipidique, mais cette réorganisation permet néanmoins d'obtenir une corrélation des signaux des traceurs DiD, CHE, CHO dans les organes jusqu'à 8 h après injection.

L'information qui peut être tirée du pré-test à la BSA, lorsque l'on compare le DiD et l'ICG, est qu'une baisse de fluorescence existe pour l'ICG lorsque la lipidot est mise en contact avec la BSA, alors qu'à conditions opératoires identiques, cette baisse de fluorescence n'est pas observée pour le DiD. Il est à noter que malgré la sortie de l'ICG hors de la nanoparticule, à des fractions massiques $> 0,01$, aucune modification physicochimique de la lipidot n'est observée.

De manière générale, concernant **les données *in vivo***, il existe à ce jour peu d'études menées avec des nanoparticules dopées en ICG. Les seules études menées ont été réalisées sur des temps courts (< 4h) et mettaient en évidence une accumulation préférentielle des nanoparticules dans le foie, la rate et les poumons, contrairement à la forme libre qui s'accumule dans le foie et les reins²¹⁸. Dans notre cas, la principale surprise issue de ces expériences est l'absence de corrélation des signaux du [¹⁴C]CHO et de l'ICG, non observée avec le DiD, et les profils similaires de biodistribution (foie, rein, intestin) pour le fluorophore seul et encapsulé.

Concernant la pharmacocinétique *in vivo*, deux cas ont été observés : pour les nanoparticules à base de PLGA, le profil pharmacocinétique du fluorophore reste le même (même $\frac{1}{2}$ vie, très courte, de quelques minutes) mais il existe une ligne de base plus élevée lorsque l'ICG est encapsulé qu'avec l'ICG libre, ce qui permet de maintenir une concentration en ICG dans le compartiment sanguin 3 fois plus élevée avec la nanoparticule jusqu'à 3 h après injection²⁰⁷. En revanche, concernant les mesocapsules à base de dextran, aucune différence n'a été observée²¹⁸. Dans le cas des lipidots, le signal observé dans le sang à 15 minutes après injection est faible, suggérant une sortie rapide du fluorophore du compartiment sanguin.

Concernant la biodistribution dans les organes, de nombreuses différences entre nanoparticules vectorisant de l'ICG peuvent être citées. Concernant le suivi *in vivo*, Yaseen a mis en évidence le même phénomène observé pour les lipidots : un fort signal dans les intestins qui augmente au cours du temps. Des différences d'accumulation ont été observées selon que l'ICG est administré sous forme de solution ou sous forme nanoparticulaire^{207, 218}. Concernant le foie, le même profil est observé pour l'ICG libre ou encapsulé dans les lipidots. En revanche, Saxena a observé à 60 minutes un signal plus élevé avec la forme particulaire (x 4). De même, Yaseen a mis en évidence une différence de signal principalement dans les poumons et la rate, qui retiennent préférentiellement la forme particulaire, ainsi que le cœur de façon moindre²¹⁸. Dans notre cas, aucun signal n'est observé dans ces organes associés au RES ou à une possible agrégation du fluorophore. De manière générale, il est à noter que les études de biodistribution de l'ICG encapsulé dans une forme nanoparticulaire sont toujours réalisées sur des temps très courts (maximum 4 h), ce qui montre la difficulté d'obtenir un objet contenant de l'ICG stable sur le long terme (24 h après injection).

Après qu'un « pré-test » à la BSA a été mis en place pour essayer de comprendre le comportement de l'ICG *ex vivo*, il a été utilisé pour explorer et évaluer plusieurs stratégies de rétention du fluorophore dans la nanoparticule, ce qui est présenté dans la partie suivante.

D. Stratégie de rétention de l'ICG dans la nanoparticule

Comme il a été démontré dans le paragraphe précédent, l'ICG reste stable dans la nanoparticule en milieu tamponné aqueux. En revanche, une fois dans le système plasmatique, son affinité pour les protéines étant élevée, l'ICG sort de la nanoparticule pour s'adsorber sur les protéines et se comporte alors comme de l'ICG libre. Les stratégies explorées pour améliorer sa rétention par la nanoparticule reposent sur : (1) des modifications de la formulation des particules afin de limiter la diffusion des fluorophores vers l'extérieur en modifiant le cœur des nanoparticules ou en renforçant leur coquille ; ou (2) associer l'ICG à d'autres constituants favorisant sa rétention dans les particules via une association avec un phospholipide cationique, le DOTAP, ou via une co-encapsulation avec un composé lipophile, le DiD.

D.1 Modification du cœur et de la coquille

Cette partie a pour objectif de modifier deux aspects des lipidots. Dans un premier temps, modifier le cœur de la particule, en remplaçant une partie de la cire par du Dynasan® afin d'apporter de la cristallinité au système. Dans un second temps, un renforcement de la coquille est réalisé en remplaçant la lécithine utilisée jusqu'à présent par de la lécithine plus pure. Enfin, ces deux stratégies ont également été couplées.

D.1.1 Formulations testées

Une première possibilité de modification de la formulation consiste à **renforcer la coquille** en utilisant une lécithine avec un grade de pureté supérieur. En effet la lécithine est un mélange de différents phospholipides composés d'une choline, d'un phosphate, du glycérol et enfin de deux chaînes grasses. Habituellement, de la lécithine S75®, comportant 75 % de phosphatidylcholine saturée est utilisée. La lécithine S100®, comportant 100 % de phosphatidylcholine saturée, a été sélectionnée. La différence de composition entre les deux

lots de lécithine est présentée Tableau 5. Un essai a été réalisé en remplaçant la totalité du lipoid S75® par du lipoid S100®.

Appellation commerciale de la lécithine	Composition en phosphatidylcholine (PC) / %	Composition en phosphatidylethanolamine (PE) / %	Composition en lysophosphatidylcholine (LPC) / %
S75	68 - 73	7 -- 10	3
S100	94	0,1	3

Tableau III-5 : Comparaison de la composition des deux lots de lécithine

Le renforcement de la coquille peut être combiné à une modification de la nanoparticule consistant à rendre **crystallin** le cœur plutôt amorphe de celle-ci. Créer des cristaux au sein de la nanoparticule permettrait de piéger l'ICG dans ses mailles, comme s'il était figé, et ainsi de limiter sa diffusion et donc sa fuite. Le mélange de glycérides du cœur de la nanoparticule a été remplacé, totalement ou en partie, par un triglycéride d'acides gras saturé. Parmi les composés disponibles, le trimyristate de glycéryl (chaîne en C₁₄, Dynasan® 114, Figure 23) a été choisi pour son point de fusion relativement bas (55 °C) en comparaison du tripalmitate de glycéryle (C₁₆, Dynasan® 116, 63 °C) ou tristéarate de glycéryl (C₁₈, Dynasan® 118, 72 °C). Un point de fusion trop élevé ne serait pas compatible avec le procédé de formulation des lipidots, la lécithine pouvant notamment se dégrader à haute température (> 70 °C).

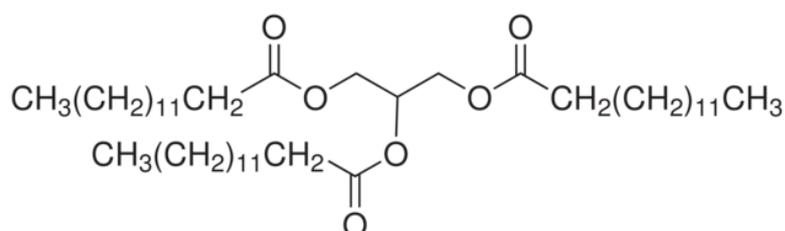


Figure III- 23 : Structure du trimyristate de glycéryle, commercialisé sous le nom de Dynasan® 114.

Deux essais ont été réalisés, le premier en remplaçant 50 % de la cire et le second en remplaçant la totalité de la cire par du Dynasan® 114. Un essai de combinaison de cristallisation du cœur et du renforcement de la coquille a été réalisé avec une formulation comportant 50 % de Dynasan® 114 et 100 % de Lipoid® S100. Un essai comportant 100 % de Dynasan® et 100 % de Lipoid® S100 a été envisagé mais la faisabilité technique n'a pas été

possible à cause de la température de fusion du premix huileux, trop élevée dans ce cas (> 85 °C).

Pour résumer, quatre nouvelles formulations dont les compositions sont résumées Tableau 6 ont été étudiées et comparées avec la formulation « standard ». L'ensemble des formulations contient la même concentration en ICG, à savoir 250 µM afin de pouvoir les comparer entre elles.

Formulation	Abréviation	Composition Cœur	Composition Coquille
Standard	Standard	75 % cire [68 mg] / 25 % huile [23 mg]	Lipoid® S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
Nouvelles formulations	DY 100% LS75	75 % Dynasan® [68 mg] 25 % huile [23 mg]	Lipoid® S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
	DY 50% LS75	37,5 % cire [34 mg] 37,5 % Dynasan® [34 mg] 25 % huile [23 mg]	Lipoid® S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
	LS100	75 % cire [68 mg] 25 % huile [23 mg]	Lipoid® S100 [17 mg] / Myrj [92 mg]
	DY 50% LS100	37,5 % cire [34 mg] 37,5 % Dynasan® [34 mg] 25 % huile [23 mg]	Lipoid® S100 [17 mg] / Myrj [92 mg]

Tableau III-6 : Formulations testées et noms abrégés utilisés dans les graphiques présentés par la suite.

D.1.2 Caractérisations des nouvelles formulations

L'ensemble des formulations ont pu être réalisées. Leurs caractéristiques physico-chimiques, le % d'encapsulation de l'ICG (évalué par absorbance des solutions avant et après dialyse) et le rendement quantique de fluorescence sont només Tableau 7. La formulation contenant 50 % de Dynasan® et le Lipoid® S100 possède une taille plus élevée que les formulations standards. Le % d'encapsulation est d'environ 75 % et le potentiel zêta reste inchangé pour l'ensemble des lots à environ -7 mV. Le rendement quantique de fluorescence est plus élevé (15 %) que pour le fluorophore seul dans du PBS 1X (5 %).

	Size (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)	% d'Encapsulation	Rendement quantique
Standard	55 ± 1,2	0,16 ± 0,01	-8,0 ± 1,2	69 ± 3	18 ± 1
DY 100% LS75	48 ± 0,9	0,18 ± 0,01	-7,3 ± 2,1	82 ± 4	17 ± 1
DY 50% LS75	58 ± 1,4	0,15 ± 0,01	-8,2 ± 1,7	79 ± 4	13 ± 0,9
LS100	50 ± 0,9	0,18 ± 0,01	-6,0 ± 1,8	78 ± 4	12 ± 0,8
DY 50% LS100	75 ± 1,7	0,15 ± 0,01	-4,9 ± 0,7	66 ± 3	16 ± 1

Tableau III-7 : Caractérisation physico-chimique des lots réalisés

D.1.2 Fuite de l'ICG

La Figure 24 représente la perte (en %) de l'ICG mesurée par absorbance suite à la mise en contact des dispersions avec la BSA (80 g / L) (à une concentration en lipides de $\phi = 0,05$ pour laquelle on sait que les nanoparticules sont stables). Le « standard » permet de comparer l'amélioration des formulations par rapport à la formulation de référence utilisée *in vivo*, et le contrôle sans BSA permet de vérifier le protocole (absence d'adsorption de l'ICG sur la membrane de dialyse utilisée pour la purification par exemple).

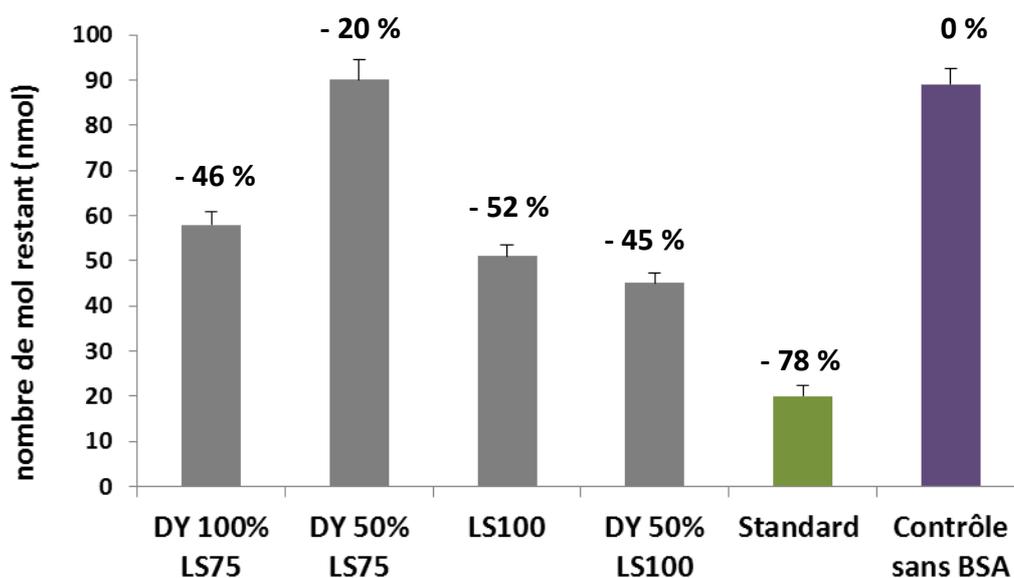


Figure III-24 : Perte d'absorbance (% de perte) de l'ICG encapsulé dans les différentes formulations après la purification et après sa mise en contact avec la BSA.

La Figure 24 met en évidence que le protocole utilisé pour réaliser le test de la BSA n'entraîne pas d'artefacts qui pourraient modifier le comportement de l'ICG (contrôle sans BSA). La formulation standard présente une perte de 78 % du fluorophore après la mise en contact avec la BSA (sans pour autant dégrader le fluorophore, le spectre d'absorption ne présentant pas de pic de dégradation). Une formulation se détache du lot, celle comportant 50 % de Dynasan® à la place de la cire. En effet, seul 20 % de la fluorescence l'ICG est perdue avec la BSA, tandis que pour les trois autres formulations, il est observé une perte moyenne de 50 % de l'absorbance.

La Figure 25 fait ressortir la perte en intensité de fluorescence après la mise en contact des lipidots avec la BSA. Ces données sont issues des spectres de fluorescence.

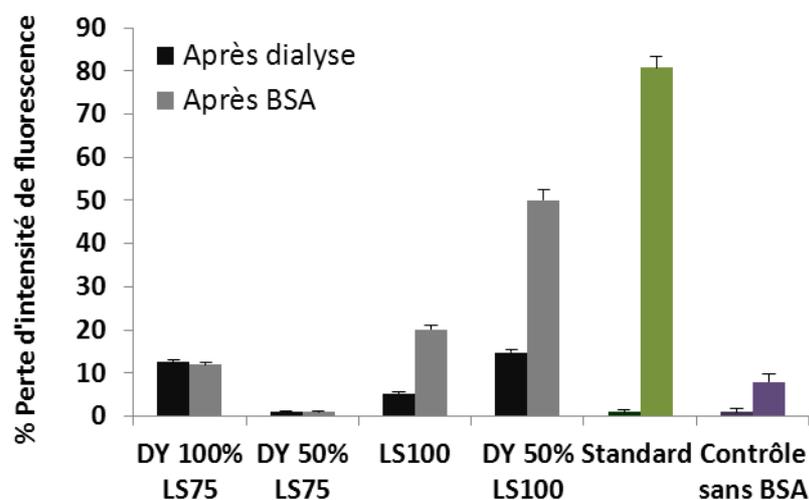


Figure III-25 : Représentation graphique de la perte d'intensité de fluorescence suite à la purification des formulations et la mise en contact de la BSA.

Ce graphique confirme les données obtenues précédemment, à savoir que la formulation standard mise en présence de la BSA conduit à une perte de l'intensité de fluorescence de 80 %. La formulation contenant 50 % de Dynasan® et le Lipoid® S100 présente une perte d'intensité de fluorescence de 50 % tandis que les deux formulations Dynasan® 100 % Lipoid® S75 et Lipoid® S100 présentent une perte comprise entre 12 % et 20 %.

La formulation contenant 50 % de Dynasan® et du Lipoid® S75 paraissant prometteuse, elle a été testée sur souris saine FVB. Malheureusement, la concentration massive d'ICG dans le cæcum après injection (saturant le signal de la caméra) montre que malgré le test de prédiction avec la BSA, le comportement de la nanoparticule et de l'ICG *in vivo* reste complexe et ne peut pas être prédit par le test simplifié de co-incubation en présence de BSA mis en place. Cette accumulation dans le cæcum avait déjà été observée lors de l'étude de la biodistribution de l'ICG encapsulé dans les lipidots.

D.2 Co-encapsulation de l'ICG

Cette série d'essais a consisté à modifier ou rajouter certains composants dans la nanoparticule afin d'y favoriser la rétention de l'ICG. Des essais de co-encapsulation ont été réalisés afin de vérifier si la présence d'un autre composé de caractère hydrophobe dans le

cœur ou la coquille des lipidots permettrait une rétention de l'ICG. En effet, des expériences réalisées au sein du laboratoire ont montré que les taux d'encapsulation de molécules d'intérêt pouvaient parfois être améliorés par cette stratégie. Les composés choisis sont le DOTAP, phospholipide cationique, le stéarate de cholestéryle à l'hauteur de 0,6 % dans la formulation, et le DiD aux concentrations de 50 μM et 125 μM .

La première stratégie consiste à complexer l'ICG, de charge nette -1, avec un **phospholipide cationique** le DOTAP (Figure 26). Des interactions pourraient alors se créer entre le fluorophore chargé négativement (et de structure plutôt amphiphile que lipophile) et le lipide chargé positivement, qui se positionnerait à l'interface.

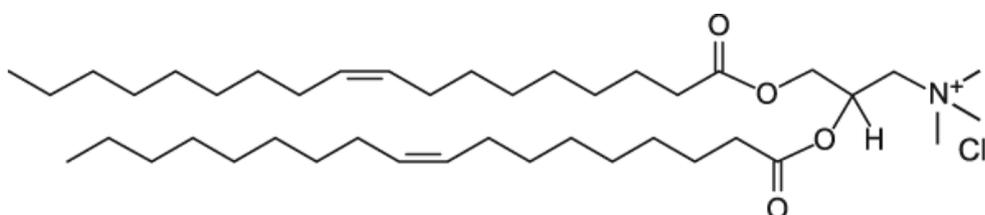


Figure III-26 : Structure du lipide cationique DOTAP (AvantiPolar, ref 890890)

Le DOTAP est introduit dans la formulation en remplaçant une partie des autres phospholipides (lécithine). Deux essais ont été réalisés, le premier en remplaçant 25 % de la lécithine par du DOTAP et le deuxième en remplaçant 50 %. Après sonication, un changement de couleur de l'ICG du vert vers le gris-noir est observé au bout de 24 h avec la formulation 50 : 50 DOTAP : lécithine et 48 h pour la formulation 25 : 50 DOTAP : lécithine. Des tests de mise en contact de l'ICG seul avec le DOTAP ont montré qu'un complexe noir se formait, éteignant la fluorescence du fluorophore, sans pour autant engendrer une nouvelle bande dans le spectre d'absorption de la dispersion. Cette stratégie a été abandonnée au vu de ce résultat préliminaire.

La deuxième stratégie a consisté à co-encapsuler du stéarate de cholestéryle ou du DiD à une concentration de 50 μM ou de 125 μM (Figure 27). La co-encapsulation n'entraîne pas de modification dans la physico-chimie des nanoparticules. L'ensemble des formulations

ont une taille de 54 nm, une polydispersité de 0,15 et un potentiel zêta compris entre -7 mV et -10 mV. Les rendements d'encapsulation de l'ICG sont compris entre 85 % et 90 %.

La Figure 27 représente la perte en intensité de fluorescence après contact avec la BSA. Même si la fuite est réduite par rapport à la formulation standard, une perte de fluorescence comprise entre 35 % et 50 % suivant les formulations est observée.

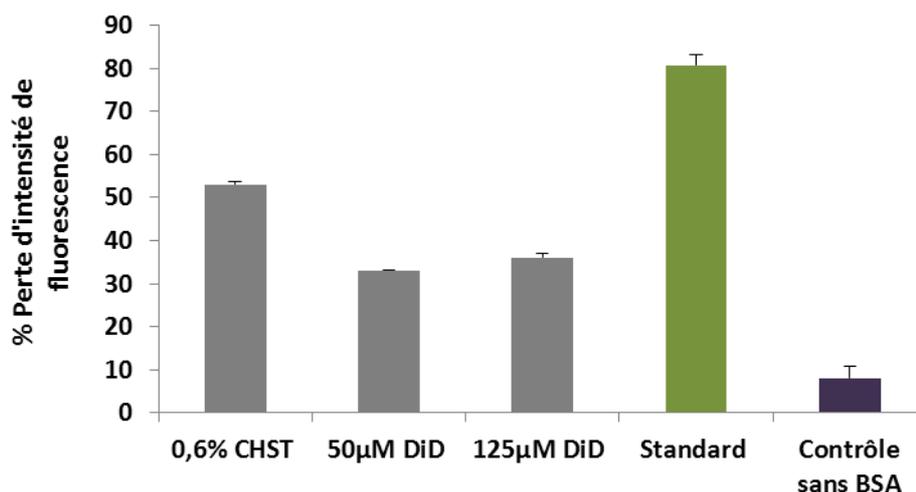


Figure III-27 : Représentation graphique de la perte de fluorescence suite à la mise en contact de la nanoparticule avec la BSA.

Un essai *in vivo* de la formulation comprenant la co-encapsulation du DiD et de l'ICG a été réalisée grâce à l'utilisation de deux Fluobeam à excitation différente (Fluobeam™700 et Fluobeam™800). Une décorrélation du signal est observée avec une accumulation dans le foie du DiD à 5 h après injection, tandis que le signal de l'ICG sature dans le cæcum, comme observé dans l'étude de biodistribution chez les souris FVB saines de l'ICG encapsulé dans les lipidots.

D.3 Discussion

Différentes modifications de formulation des lipidots ont été testées pour essayer de limiter la fuite de l'ICG en dehors des nanoparticules une fois dans le plasma, sans doute liée à la très forte affinité du fluorophore pour les protéines plasmatiques : rendre le cœur de la nanoparticule plus cristallin afin de mieux piéger l'ICG, renforcer la coquille en utilisant de la lécithine plus pure, associer le fluorophore avec un phospholipide cationique ou le co-encapsuler avec une molécule hydrophobe, ou encore coupler ces différentes stratégies. La formulation comportant 50 % de Dynasan® destiné à cristalliser le cœur en remplacement

de 50 % de la cire semble, après le test de mise en contact avec les protéines en système clos, réduire la fuite de l'ICG. Néanmoins, cela n'a pas été suffisant pour modifier la biodistribution de l'ICG après injection chez l'animal, de même que les essais de co-encapsulation avec des molécules lipophiles.

Le principal obstacle pour limiter les fuites de l'ICG en présence de protéines plasmatiques semble être le degré de lipophilie du fluorophore. Ainsi le DiD, avec deux chaînes grasses en C₁₈ dans sa structure chimique semble bien localisées dans le cœur de la nanoparticule et ne pose pas de problèmes de « fuites » *in vivo*. Une solution serait donc de synthétiser une ICG très « lipophile » via l'ajout de chaînes grasses sur la structure cyanine de base. Cela permettrait de travailler dans le proche infrarouge (au-delà de 700 nm pour l'excitation) et d'imager plus profondément les tissus. La synthèse à façon d'un fluorophore est alors indispensable. Sa stabilité et sa toxicité seront à étudier pour pouvoir demander l'autorisation auprès des autorités de santé d'administrer cette molécule chez l'homme. Un premier essai a été réalisé au laboratoire mais n'a pas abouti à des essais concluants en raison d'une mauvaise stabilité du fluorophore synthétisé.

Bien qu'aujourd'hui l'ICG ait l'avantage d'être approuvé par les autorités de santé pour l'injection chez l'homme, il nous a donc semblé préférable d'utiliser le DiD pour explorer dans le chapitre suivant l'accumulation tumorale des lipidots.

Partie II : Vers l'imagerie Nucléaire

La partie précédente était consacrée à l'utilisation des lipidots pour le design d'agents de contraste pour l'imagerie de fluorescence. Cette méthode d'imagerie peut être par exemple utilisée lors de la résection de tumeurs ou l'identification de métastases en imagerie per-opératoire. L'imagerie de fluorescence est limitée à l'exploration des tissus sur une profondeur de quelques centimètres au mieux.

Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des lipidots pour le design d'agents de contraste pour une autre technique, non invasive, l'imagerie nucléaire dont les acquisitions peuvent se faire sur corps entier. Brièvement, cette technique fait intervenir des émetteurs radioactifs de rayonnement gamma couplés à des molécules cibles, comme par exemple les dérivés de glucose. L'exemple le plus connu pour la tomographie à émission de positons (TEP) est le traceur [^{18}F]FDG (2-désoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose, analogue du glucose) pour localiser et déterminer l'agressivité des tumeurs sur la base de leur consommation en glucose de la tumeur. Les traceurs utilisés pour la tomographie à émission monophotonique (TEMP) ont l'avantage d'avoir des temps de $\frac{1}{2}$ vie plus longs que ceux utilisés en TEP. Ils sont utilisés en routine pour détecter des anomalies cardiaques ou coronariennes par exemple.

Dans cette partie, nous avons exploré successivement deux stratégies d'incorporation de radiotraceurs dans les lipidots :

(1) la stratégie **d'encapsulation du traceur** dans le cœur. Pour ce faire, l'émetteur doit posséder un temps de $\frac{1}{2}$ vie radioactive relativement long car il est nécessaire d'inclure le temps de synthèse de la formulation dans la préparation du radiotraceur. Le principal avantage est que l'émetteur se trouve a priori localisé dans le cœur de la particule dont la biodistribution est connue.

(2) la stratégie de **greffage en surface**, qui permet de travailler avec des émetteurs gamma qui ont une durée de vie plus courte. Contrairement à la stratégie précédente qui incorpore le radioémetteur pendant la synthèse du radioatraceur, ici l'émetteur est incorporé une fois la synthèse nanoparticulaire terminée via un greffage en surface des lipidots. Le principal inconvénient est que la stabilité de la membrane après injection n'a pas été entièrement démontrée. Les expériences réalisées avec le DPPC (Chapitre II) ont montré

la possibilité d'échange de ce phospholipide dans le plasma, ce qui pourrait diminuer l'efficacité de la lipidot en tant que vecteur.

Les deux sous-paragraphes suivants présentent dans un premier temps, l'encapsulation pendant la synthèse nanoparticulaire d'un traceur pour le SPECT, le ^{99m}Tc (stratégie 1). Le second exemple est la preuve de concept du greffage post synthèse nanoparticulaire d'un émetteur γ pour l'imagerie TEP, dans notre cas le ^{19}F , analogue froid du traceur chaud ^{18}F (stratégie 2).

Encapsulation du ^{99m}Tc

E.1 Synthèse des lipidots ^{99m}Tc

Le technétium est un émetteur γ dont la $\frac{1}{2}$ vie de 6 h est compatible avec son incorporation dans le cœur des lipidots lors de leur formulation. Pour favoriser son affinité et son inclusion dans le cœur des particules lipidiques, le métal est chélaté par 3 ligands à base de soufre et de phényles lipophiles pour former le complexe $\text{Tc}(\text{SSSPH})_3$ [(bis(perthiobenzoato)(dithiobenzoato)Tc], présenté Figure 30^{219, 220}. Le rendement de formation du complexe est de 78 %, il est extrait dans du dichlorométhane, compatible avec la formulation des lipidots car facilement évaporable. Cette expérience a été réalisée dans les locaux de l'équipe INSERM 1066 « Ingénierie de la vectorisation particulaire » (Université d'Angers) dirigée par Jean Pierre Benoit avec Samuli Hirsjärvi (U1066, Angers) et Sandrine Dufort (Institut Albert Bonniot de Grenoble, équipe « thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer dirigée par Jean-Luc Coll).

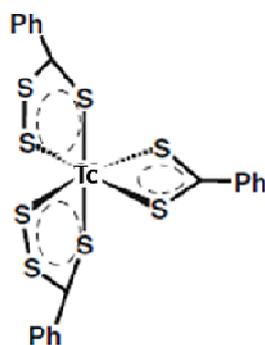


Figure III-28 : Structure du complexe lipophile de technétium encapsulé dans le cœur de la lipidot.

Les nanoparticules sont synthétisées suivant le protocole standard (Chapitre VI, Partie A). 740 MBq de ^{99m}Tc sont incorporés dans la phase huileuse au cours de la synthèse. Le lot, d'une fraction massique de 0,375 après sonication (375 mg / mL de lipides) est ensuite dilué afin d'obtenir une concentration en lipides de 134 mg / mL, soit une dose injectée de lipides de 26,8 mg par animal (volume d'injection de 200 μL / animal).

E.2 Caractérisation des lots synthétisés

Le principal inconvénient de la stratégie (1) d'encapsulation est la durée de la purification, réalisé jusque-là par dialyse (20 h), qui est difficilement compatible avec le temps restreint d'utilisation du radiotracteur limité par sa $\frac{1}{2}$ vie. Des essais ont été conduits pour évaluer le rendement d'encapsulation du Tc, d'une part après purification de la dispersion par dialyse (membrane 12 – 14 kDa, 1 nuit), sachant que cette méthode ne peut pas être utilisée avant injection *in vivo* et d'autre part, (2) par colonne d'exclusion stérique (PD-10 GE), déjà utilisée dans le Chapitre II pour vérifier la bonne encapsulation des éléments radioactifs dans les lipidots. La colonne PD-10, dans le protocole expérimental de cette manipulation, entraînait des dilutions de nanoparticules trop importantes (dilution de 3,5 après synthèse alors qu'une dilution de 2,8 était nécessaire) pour obtenir une dose correcte de radioactivité injectée. Des techniques de concentration des particules après purification existent (notamment par filtration / centrifugation) mais le matériel nécessaire à cette réalisation n'était pas disponible en pièce radioactive.

Un lot d'essai de ^{99m}Tc encapsulé dans les lipidots a été formulé et entièrement caractérisé d'un point de vue physico-chimique. Le rendement d'encapsulation étant d'environ 94 %, il a été décidé que les lots destinés à être injectés à l'animal seraient filtrés uniquement sur membrane de 0,22 μm avant d'être administrés. Une faible quantité de chaque lot a néanmoins été gardée pour chaque synthèse afin de réaliser l'ensemble des caractérisations physico-chimiques a posteriori.

Quatre synthèses ont été réalisées dont la caractérisation physico-chimiques (la taille, la polydispersité, le potentiel zêta et le % d'encapsulation) est présentée Tableau 8. Les fractions 2 à 8 (320 μL chacune) en sortie de colonne d'exclusion stérique PD10 comportent la majorité des nanoparticules, les fractions 3 à 6 sont les fractions les plus

concentrées en lipidots. La taille obtenue est comprise entre 52 et 59 nm avec une polydispersité comprise entre 0,095 et 0,102. Le potentiel zêta est d'environ - 7 mV et le taux d'encapsulation du Tc est de 94 % pour l'ensemble des lots.

	Physico-chimie			Dialyse		Colonne	
	Taille (nm)	PDI	Zeta (mV)	% encapsulé	bain	% F-2 à 8	% F 3-6
Synthèse 1	57,5 ± 0,5	0,095	-7,08	94,7	9,0	92,5	86,0
Synthèse 2	54,1 ± 0,3	0,102	-8,25	94,1	7,5	94,6	84,7
Synthèse 3	59,3 ± 0,3	0,122	-6,44	94,9	9,1	94,1	90,0
Synthèse 4	51,7 ± 0,6	0,108	-7,41	92,3	12,8	99,2	89,69

Tableau III-8 : Tableau caractéristique du ^{99m}Tc encapsulé dans les Lipidots.

E.3 Evaluation de la distribution *in vivo*

La biodistribution des lipidots chez la souris femelle *Nude* est présentée Figure 29. L'organe principal d'accumulation et de métabolisation est le foie (plus de 55 % de la dose dès 1 h après injection) et ce tout au long de l'étude. Un signal décroissant est également observé dans le sang (avec un maximum de 10 % de la dose injectée à 3 h après injection). Un signal est également observé dans la rate, signal mis d'avantage en évidence lorsque les résultats sont exprimés en % de dose injectée / g de tissu (Figure 29.b) surtout à 1 h après injection avec un maximum de 130 % de dose injectée / g de de tissu. Cette valeur décroît jusqu'à 24 h après injection pour atteindre la valeur de 22 % de DI / g de tissu. Le signal est également observé dans les surrénales avec une moyenne de 30 % de dose injectée / g de tissu et ce de 1 h à 24 h après injection. Peu de signal est observé dans les ovaires (maximum de 12 % de dose injectée / g de tissu).

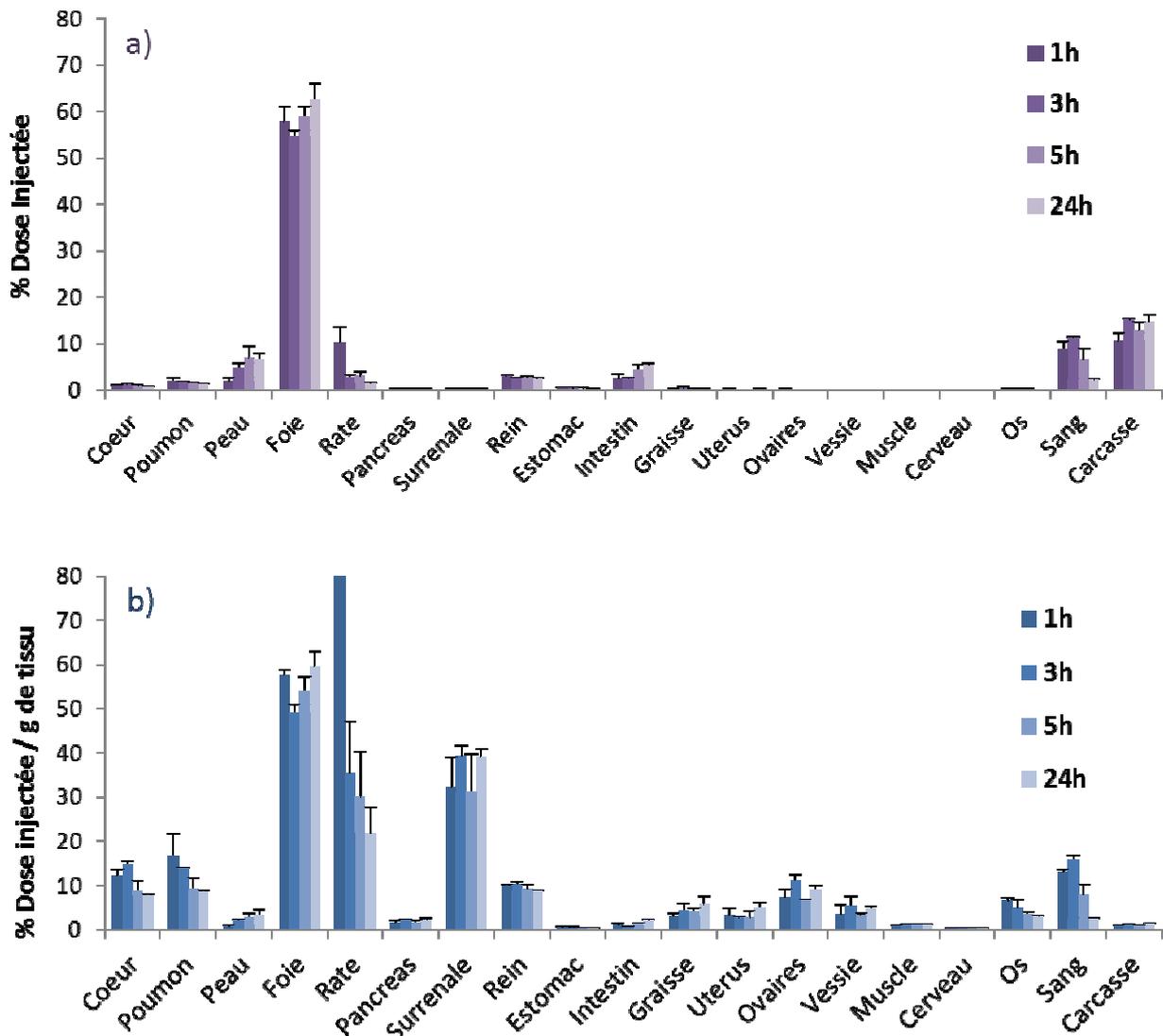


Figure III-29 : Biodistribution des lipiodots chez la souris femelle nude saine présenté en a) % de dose injectée dans le graphique et en b) % de dose injectée / g de tissu sur le graphique du bas.

E.4 Discussion

Le complexe lipophile de $[^{99m}\text{Tc}(\text{SSSPH})_3]$ a été développé par l'équipe de JP. Benoit sur le modèle du complexe $[^{188}\text{Re}(\text{SSSPH})_3]$ encapsulé dans le cœur de nanocapsules lipidiques pour de la radiothérapie dans un modèle de gliome^{219, 220}. L'incorporation de ce complexe lipophile ne modifiait pas les caractéristiques de la nanocapsule, de diamètre $55,5 \pm 11,5$ nm, avec un taux d'encapsulation du ^{188}Re de 97 % (purification par dialyse)²¹⁹. La pharmacocinétique du ^{188}Re dans les nanocapsules avait été comparée à une solution de

perrhenate de ^{188}Re . L'utilisation d'un nanovecteur permettait dans ce cas de passer d'un temps de demi-vie dans le cerveau de 7 h pour la solution de perrhéate de ^{188}Re contre un temps de demi-vie de plusieurs jours avec les nanocapsules, car seulement 10 % de la dose étaient éliminés 72 h après injection²¹⁹. Le nano-objet permettait de modifier la voie d'élimination, avec pour le chélate libre 99,4 % éliminés dans les urines, contre 75,8 % pour les nanocapsules et une élimination par les fèces de 0,6 % dans le cas du chélate de ^{188}Re , contre 24,2 % dans le cas du ^{188}Re encapsulé dans les nanocapsules²¹⁹. L'incorporation du métal dans un objet lipidique a donc permis de moduler la voie de métabolisation (hépatobiliaire pour les composés lipophiles) d'où la présence de signal dans les fèces, ce qui prouve l'effet nanoparticulaire.

Forts de ces résultats, le même procédé a été réalisé pour l'encapsulation du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, dans les nanocapsules développées par l'équipe de JP. Benoit, avec la même réaction de lipidation du métal²¹⁹. Nous avons dans ce travail montré également la faisabilité de l'encapsulation du [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{SSSPH})_3$] dans les lipidots, et ce de manière reproductible avec un % d'encapsulation d'environ 94 % et des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules inchangées.

Une comparaison des deux traceurs encapsulés ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{188}Re) dans les nanocapsules a montré un temps de demi-vie plasmatique de 21 ± 1 min pour les deux agents nucléaires, ce qui laisse supposer un temps global de présence dans le sang d'environ 2 h²¹⁹. Dans le cas des lipidots, il reste 11 % de la dose injectée 3 h après injection, ce qui laisse supposer que le temps de vie plasmatique est de l'ordre de 20 à 30 minutes, comme précédemment observé Chapitre II.

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ libre s'accumule dès 5 minutes après injection dans le foie où 90 % de la dose est retrouvée²¹⁹. Dans le cas des nanocapsules de JP. Benoit, le signal est observé dans la rate et le foie dans les premières minutes suivant l'injection puis, 24 h après injection, uniquement dans le foie²¹⁹. Ce profil de biodistribution est retrouvé pour les lipidots avec une forte accumulation dans le foie, constante pendant 24 h (60 % de la dose injectée retrouvée dans cet organe). L'accumulation dans la rate est élevée 1 h après injection (130 % de la dose injectée / g de tissu) puis décroît jusqu'à 24 h (21 % de dose injectée / g de tissu). La différence de biodistribution entre le traceur libre ou le traceur encapsulé dans les

lipidots ou les nanocapsules (notamment le temps de présence et la dose dans le foie) met bien en évidence un effet nanoparticulaire.

Une différence importante est observée par rapport à la biodistribution des lipidots chez la souris saine FVB présentée Chapitre II. En effet, dans le modèle *Nude*, une accumulation dans la rate du ^{99m}Tc est observée alors qu'elle n'a jamais été vue, ni en radioactivité ni en fluorescence, dans les expériences de triple marquage des lipidots (Chapitre II). Cette différence de biodistribution peut être expliquée par la rétention des composés étrangers dans les organes du RES chez les souris *Nude*. Le signal est retrouvé de manière constante dans les surrénales (39 % de dose injectée / g de tissu), en revanche aucun signal n'est observé dans les ovaires. Cela s'explique par (a) une différence entre souches de souris (*Nude* versus FVB), bien que des essais chez des rates Wistar aient conforté l'accumulation des lipidots dans les ovaires (résultats non décrits dans la thèse); (b) la présence du complexe de Tc peut modifier la surface des nanoparticules bien que le potentiel zêta soit inchangé.

En ce qui concerne les nanocapsules, 24 h après injection, il reste 10 % de la dose injectée²¹⁹. Dans notre cas, l'élimination semble être plus lente car on restitue, 24 h après injection, 60 % de la dose dans le foie, 14 % de la dose dans la carcasse et 5 % de la dose dans l'intestin. Il est néanmoins à noter que dans l'étude réalisée par S. Ballot²¹⁹, un nombre plus petit d'organes avaient été prélevés (8 contre 19 dans notre étude), ce qui aurait pu exclure certains organes d'élimination. Il est également observé une accumulation plus importante pour les nanocapsules dans les intestins 12 h après injection, qui perdure jusqu'à 24 h après injection, pouvant représenter la métabolisation hépatobiliaire du nanoobjet²¹⁹. Dans notre cas, le signal dans les intestins est de $2,5 \pm 0,15$ % de dose injectée dans les 3 premières heures contre $5,3 \pm 0,53$ % de la dose injectée entre 3 h et 24 h après injection.

Cette étude montre que les lipidots sont de bons vecteurs pour l'imagerie nucléaire avec le chélate lipophile de ^{99m}Tc . Les biodistributions observées corrélaient en grande partie avec les biodistributions obtenues dans le Chapitre II, laissant supposer une bonne stabilité du ^{99m}Tc encapsulé dans les lipidots après injection *in vivo*. Ces résultats suggèrent également que les lipidots pourraient servir de vecteurs pour des applications radiothérapeutiques dans lesquels un chélate similaire, mais contenant par exemple du ^{188}Rh

au lieu de ^{99m}Tc , serait encapsulé. Dans le Chapitre IV, nous nous servirons de ce traceur pour explorer l'accumulation tumorale des lipidots dans 3 modèles différents.

F. Greffage du ^{19}F

Le ^{18}F est un émetteur de positons dont la $\frac{1}{2}$ vie radioactive est de 118 min. La décroissance radioactive de ce composé est peu compatible avec le temps de synthèse des lipidots (30 min de préparation, 40 min de sonication, auxquelles il faut rajouter la purification). Un greffage post-synthèse doit alors être envisagé. Dans notre cas, nous disposons, par une collaboration avec la société AAA (projet CLARA, NanoEvo avec Davide Camporese) d'un groupement prosthétique, l'acide fluoro benzoïque (^{19}F [SFB] dans la forme froide), éventuellement activé par un groupement ester N-hydrosuccinimidyl. Afin de greffer le ^{19}F [SFB] à la surface des nanoparticules, des surfactants PEG comportant des fonctions amines à leur extrémité (DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂) ont été introduits dans la formulation, en remplacement d'une partie des surfactants PEGylés MyrjS40 (stéarate de PEG₂₀₀₀) (Chapitre 6, Partie A). La réaction de couplage est présentée Figure 30. Le ^{19}F [SFB] est mis largement en excès pour apporter la preuve de concept du greffage, les molécules non greffées sont ensuite éliminées au cours de la purification par dialyse. En revanche, lors d'essais à chaud, la quantité de ^{18}F incorporée sera moindre (concentrations mises en jeu plus faibles, temps de réaction plus court), sans doute inférieure à un émetteur par particule. Cela devrait néanmoins être suffisant pour ce type d'imagerie qui est très sensible.

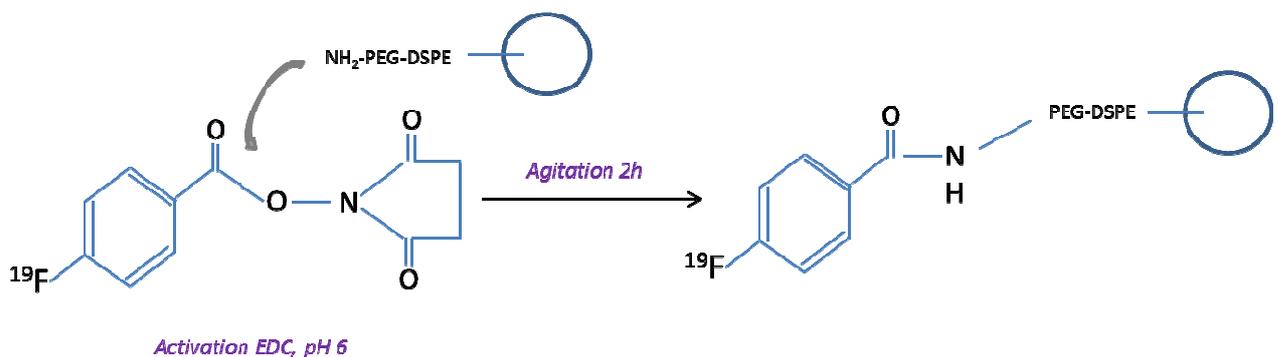


Figure III-30 : Réaction de couplage du ^{19}F sur la lipodot post-synthèse des nanoparticules

La réussite de la réaction de couplage peut être mise en évidence de manière qualitative par analyse RMN du fluor des lipidots fonctionnalisés. Le spectre du [^{19}F]SFB libre dans l'éthanol est dans un premier temps enregistré. Puis les particules après purification sont analysées dans du PBS 1X. Dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées par le ^{19}F , le spectre obtenu présente 2 pics dont le principal est à -109 ppm, et le second, de moins forte intensité, est à -110 ppm (Figure 31), alors que le SFB libre présente un pic à -103 ppm dans l'éthanol. La présence de deux pics pourrait s'expliquer par la présence du ^{19}F effectivement greffé sur la nanoparticule et du ^{19}F adsorbé ou piégé dans la couronne de PEG de la nanoparticule.

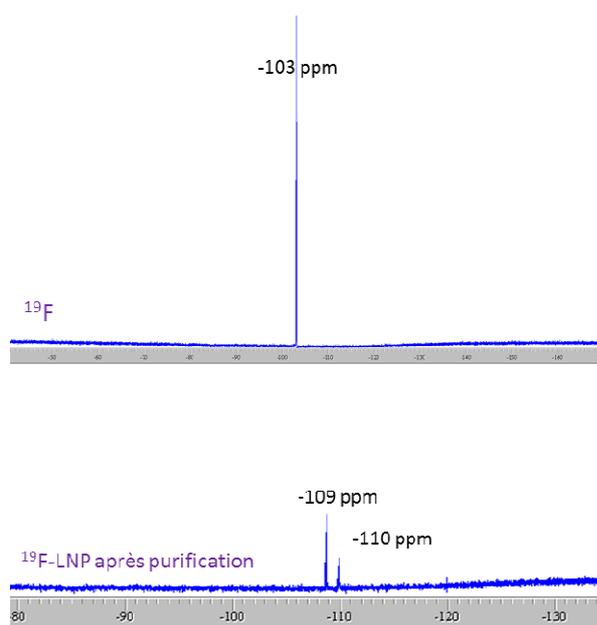


Figure III-31 : Spectres RMN du ^{19}F [SFB] dans l'éthanol et des lipidots fonctionnalisés par le [^{19}F]SFB et purifiés par dialyse.

Ces essais préliminaires montrent la faisabilité de la réaction de couplage entre les lipidots fonctionnalisés et le groupement [^{19}F]SFB. Néanmoins, une mise au point sera nécessaire pour optimiser les conditions de greffage et les conditions de purification afin de pouvoir réaliser la translation sur un automate de production avec du ^{18}F . C'est l'enjeu du projet dans le cadre du projet CLARA NanoEvo avec AAA,.

G. Conclusion

Dans ce chapitre, les potentialités des lipidots pour le design d'agents de contraste en imagerie clinique ont été évaluées, d'une part pour l'imagerie de fluorescence et d'autre part pour l'imagerie nucléaire. Concernant l'utilisation de l'ICG encapsulé dans les nanoparticules, des problèmes de stabilité du fluorophore ont été observés après injection *in vivo*. Le DiD ayant montré de bonnes caractéristiques comme agent de contraste, bien que n'absorbant et n'émettant pas dans la gamme de longueur d'onde optimale pour l'imagerie *in vivo*, sera utilisé dans le reste des études réalisées au cours de ce travail. Concernant l'imagerie nucléaire, l'encapsulation de ^{99m}Tc dans les lipidots est un succès. Concernant le ^{19}F , la preuve de concept de couplage à la surface des nanoparticules a été réalisée, mais nécessite un travail d'optimisation.

Dans le Chapitre IV, l'accumulation tumorale des lipidots-DiD et lipidots- ^{99m}Tc sera évaluée dans différents modèles.

Chapitre IV :

Lipidots et imagerie tumorale

Le Chapitre I présentait l'intérêt des nanoparticules pour la médecine en tant que transporteurs, notamment leur accès facilité à la tumeur grâce à l'effet qui exploite leur taille nanométrique afin d'acheminer des anti-cancéreux vers les zones tumorales. Les médicaments utilisés en chimiothérapie anti-tumorale présentent une toxicité importante vis-à-vis des cellules saines. Pour rappel, l'effet EPR se base sur la capacité qu'ont les nanoparticules d'une taille < 200 nm, à passer par les fenêtres des néovaisseaux tumoraux fragilisés par une construction rapide (angiogenèse). La tumeur présentant un système lymphatique défaillant, il sera difficile pour la nanoparticule d'être éliminée. Elle sera donc retenue au sein de la zone cancéreuse.

Le Chapitre II a mis en évidence la furtivité des lipidots vis-à-vis du système réticulo endothélial comme le prouve l'absence de signal dans la rate. Néanmoins, le vecteur possède un temps de circulation plasmatique relativement court, de l'ordre de 30 minutes. Or les données de la littérature suggèrent qu'un temps de circulation prolongé permettrait une accumulation tumorale accrue dans le temps via l'effet EPR.

La possibilité d'un ciblage actif, grâce à la présence de molécules greffées à la surface des nanovecteurs permettant de diriger préférentiellement la nanoparticule vers les déterminants moléculaires des tumeurs, accentue en principe le ciblage tumoral. En adressant de manière spécifique la nanoparticule vers sa cible, on réduit les effets secondaires liés au traitement et on diminue le bruit de fond et les accumulations non désirées.

Dans ce chapitre, nous avons étudié par imagerie de fluorescence l'accumulation tumorale des lipidots dans différents modèles de tumeurs, soit par effet EPR soit par ciblage actif. La partie A dresse l'état de l'art du rôle des récepteurs de type intégrines surexprimés dans certains modèles tumoraux et des ligands peptidiques de type « RGD » qui peuvent être utilisés pour cibler spécifiquement ces récepteurs. La partie B présente les résultats obtenus sur l'accumulation passive des lipidots dans différents modèles tumoraux : cette étude avait notamment pour finalité de déterminer un modèle d'étude pertinent permettant d'explorer la stratégie « EPR » et la stratégie de ciblage actif des nanoparticules. La partie C présente les résultats détaillés de l'étude de l'accumulation des lipidots dans la tumeur de manière passive ou bien de manière active grâce au greffage du RGD à la surface des nanoparticules. La partie D discute l'ensemble des résultats.

A. Séquence RGD et accumulation tumorale

A.1 Angiogenèse, Intégrine et Séquence RGD

L'**angiogenèse**, procédé permettant la création de nouveaux vaisseaux dans les tissus non vascularisés, joue un rôle clé dans plusieurs procédés physiologiques comme l'embryogénèse, les cycles de reproduction féminin, ainsi que dans plusieurs maladies comme le psoriasis, la rétinopathie diabétique ou encore la croissance tumorale et le développement métastatique. Le processus angiogénique dépend en particulier de la migration et de l'invasion des cellules endothéliales vasculaires, régulé par les récepteurs à l'adhésion cellulaire comme les intégrines. Il a été observé que la **séquence RGD** (arginine – glycine – acide aspartique) était retrouvée dans plusieurs protéines intervenant dans ce processus, comme la fibronectine ou la vitronectine.

Les **intégrines** $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_1$ jouent un rôle clé dans l'angiogenèse. Ces intégrines servent de récepteurs pour un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire comportant le motif RGD et sont à l'origine de la régulation de la migration des cellules endothéliales vers les membranes basales, régulant leur croissance, leur survie et leur différenciation²²¹.

Les intégrines constituent une famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire. Elles sont composées de deux sous-unités : une unité α et une unité β . Il existe 24 hétérodimères différents ayant chacun des ligands spécifiques. Chacune de ces sous-unités α et β est une glycoprotéine membranaire composée d'un large domaine extracellulaire, d'une hélice transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. En plus d'être impliquées dans l'angiogenèse, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont aussi présentes à la membrane de cellules tumorales d'origines diverses, associées à la présence de métastases. La séquence RGD a été identifiée comme un motif de liaison pour 7 des 24 intégrines, dont $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_1$.

La première génération de peptides contenant la séquence RGD linéaire ou un peptide cyclique souffrait d'une faible sélectivité vis-à-vis des différentes intégrines et d'une faible stabilité métabolique²²¹. Le [¹²³I]cyclo(RGDyV) a été le premier ligand radiomarqué ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ évalué *in vivo*²²². La substitution de la valine par une lysine permet

une conjugaison avec des groupes prosthétiques, des chélates ou encore des fluorophores sans modification de l'affinité pour la liaison avec le récepteur²²².

A.2 RGD et cancer

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée dans certains types de tumeurs (notamment les mélanomes, glioblastomes, cancers du sein et ovarien) ; elle représente une cible attractive pour la thérapie cancéreuse basée sur l'utilisation de la séquence peptidique RGD spécifique de ces récepteurs, afin d'inhiber l'angiogenèse. En effet, les traitements anticancéreux antiangiogéniques empêchent la création de nouveaux vaisseaux, induisent l'apoptose endothéliale, réduisent la croissance tumorale ainsi que le caractère invasif des métastases. Le premier développement du cyclo(RGD(NMe)V) par Merck, connu sous le nom commercial de Cilengitide pour le traitement du glioblastome est actuellement en phase III d'essais cliniques²²².

De nos jours la médecine personnalisée cherche à quantifier exactement le nombre d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ au sein d'une tumeur afin d'orienter éventuellement le traitement vers une thérapie anti-angiogénique. Pour cela, différents traceurs sont utilisés dont le [¹⁸F]galacto-RGD, peptide de référence, ou encore des analogues de [¹⁸F]cRGD développés par Siemens ou GE Healthcare actuellement en essais cliniques. L'avantage de ces traceurs est une élimination rénale rapide, générant un bruit de fond relativement faible dans l'ensemble des organes, idéal pour faire ressortir par contraste la zone tumorale²²¹.

L'évaluation de la taille de la tumeur est un facteur important à prendre en compte dans la réalisation des études *in vivo*. En effet, à des poids < 0,05 g, on n'observe peu d'angiogenèse au sein de la tumeur ainsi qu'un faible flux sanguin. Entre 0,1 et 0,25 g, apparaît une augmentation du nombre des microvaisseaux et de la densité des intégrines augmentent. C'est la taille optimale de tumeur pour évaluer un traceur. Au-delà de ce stade, la nécrose débute avec une baisse de la densité en intégrines. C'est pour cela que bien souvent, un signal plus faible est observé dans des tumeurs de stade avancé en comparaison des tumeurs à un stade précoce.

A.3 Présentation du RGD à la tumeur

La présentation du RGD à sa cible semble être un facteur important dans le développement de traceurs. Il peut être présenté sous forme de **dimère**, par exemple le $c(\text{RGDfK})_2$ couplé au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y ou ^{64}Cu développés par Rajopadhye²²³ ou encore le $[\text{}^{18}\text{F}]\text{RGDfE}$ dimérique développé par Poethko²²⁴ qui présentent une meilleure capacité de ciblage que la version analogue monomérique.

Des présentations sous forme de **tétramère** ou d'octamère ont également été étudiées : Boturny et al²²⁵ avec un RGD tétramérique, Kessler et al²²² avec un RGDfE cyclique tétramérique ou encore Chen et al²²⁶ avec un cRGD tétramérique ou sous forme octamérique marqué au ^{64}Cu ou au ^{18}F ont tous mis en évidence une meilleure affinité du peptide pour le récepteur, une meilleure internalisation et un meilleur ciblage tumoral de la version tétramérique en comparaison à son analogue monomérique. Il est tout de même à noter que le coût de ces ligands multimérisés est très élevé et qu'ils entraînent des signaux plus élevés dans le rein, le foie, les poumons et la rate²²⁷. Le RAFT- $c(\text{RGDfK})_4$, commercialisé aujourd'hui par la société Fluoptics® sous le nom d'Angiostamp® lorsqu'il est couplé à un fluorophore de proche infra-rouge, est une présentation tétramérique du cRGD qui permet d'améliorer le potentiel de ciblage du peptide²²⁵. Le RAFT (Regioselectively Adressable Functionalized Template) est un groupe porteur cyclique contenant des sites de liaison protégés (Figure 1). Il est constitué d'un décapeptide cyclique formé par l'enchaînement de deux séquences -Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-. Sa structure cyclique lui confère une plus grande rigidité structurale et une stabilité conformationnelle, mais aussi une résistance aux enzymes protéolytiques²²⁵. Le RAFT possède des fonctions amines libres qui permettent de greffer 4 cRGD.

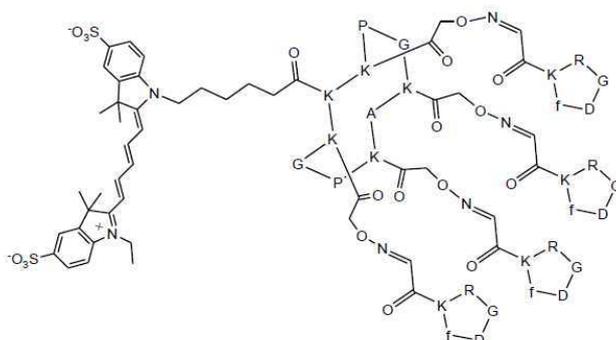


Figure IV-1 : Molécule de Cy5-RAFT- $c(\text{RGDfK})_4$

Ces études ont mis en avant l'importance de la différence entre la présentation **multimérique** et la **multivalence** du peptide. De toute évidence, la présentation multimérique induit indéniablement une hausse de la concentration en peptide au sein de la tumeur. Néanmoins, la multivalence aussi joue sur la distance entre deux séquences RGD et accroît l'efficacité de liaison. En effet, il a été mis en évidence qu'une certaine distance entre deux séquences RGD était primordiale pour la bonne fixation du peptide sur sa cible et pour éviter toute interférence entre les peptides. Un bon signal dans la tumeur va donc relever à la fois d'un nombre élevé de peptides présentés à la tumeur, mais également d'une présentation correcte du peptide sur le récepteur. Ainsi, il n'est pas plus avantageux d'utiliser un tétramère plutôt qu'un dimère si la distance entre les deux RGD n'est pas optimale pour permettre une bonne liaison au récepteur²²⁸.

A.4 RGD et imagerie *in vivo*

Les traceurs à base de RGD les plus développés à ce jour sont des traceurs marqués par les isotopes radioactifs. Sancey²²⁹ a caractérisé *in vivo* le ^{99m}Tc-RAFT-RGD, le ^{99m}Tc-RGD (contrôle spécifique) et le ^{99m}Tc-RAFT-RAD (contrôle non spécifique) dans des modèles de mélanome murin (B16FO) et des modèles de carcinome mammaire (TSA) surexprimant de manière élevée les récepteurs aux intégrines $\alpha_v\beta_3$. Une plus grande accumulation a été observée dans les tumeurs avec le ^{99m}Tc-RAFT-RGD par rapport au ^{99m}Tc-RAFT-RAD utilisé comme contrôle négatif, 1 h après injection, avec des taux d'accumulation de $2,4 \pm 0,5$ versus $1,0 \pm 0,1$ % de la dose injectée / g de tissu pour le modèle B16FO et $2,7 \pm 0,8$ versus $0,7 \pm 0,1$ % de la dose injectée / g de tissu pour le modèle TSA.

Chen²²⁶ et al ont étudié l'influence de la présence de surfactants PEGylés sur l'accumulation tumorale du peptide RGD dans un modèle de glioblastome (U87). A des temps précoces, l'accumulation du [¹²⁵I]RGD est plus importante que le [¹²⁵I]-RGD-mPEG ($8,9 \pm 1,5$ % DI/g versus $5,13 \pm 0,28$ % DI/g respectivement). Le ratio tumeur sur muscle à 2 h après injection est également en faveur du [¹²⁵I]RGD par rapport au [¹²⁵I]-RGD-mPEG avec respectivement 14 ± 3 % DI/g et 11 ± 2 % DI/g. Sur des temps courts, peu de différence de signal est observée, hormis une décroissance du [¹²⁵I]RGD entre 30 min et 2 h, tandis que le signal du [¹²⁵I]-RGD-mPEG reste constant. La principale différence entre les deux traceurs

réside dans la quantité accumulée dans les reins, plus faible lorsque le [125 I]-RGD-mPEG est utilisé.

Ces dernières années, avec l'arrivée de nouveaux dispositifs permettant la détection de la fluorescence chez la souris, de nouveaux traceurs ont été développés (Figure 2). Plusieurs équipes ont montré une bonne accumulation tumorale du c(RGDfK)-Cy5.5^{26, 226, 230, 231} dans différents modèles (mélanome, fibrosarcome, MCF7, adénocarcinome). La présentation du peptide par la plateforme RAFT a également été étudiée²³². Par exemple Jin et al²²⁷ ont comparé le Cy5-RAFT-c(RGDfK)₄ avec le Cy5-cRGD (analogue linéaire) et le Cy5-RAFT-c(RADfK)₄ (contrôle non spécifique) dans un modèle de cellules embryonnaires de rein modifiées génétiquement pour surexprimer $\alpha\beta 3$ (HEK293 $\beta 3$). Quatre heures après injection, les ratios tumeur / peau sont de $15,9 \pm 3,6$ pour le Cy5-RAFT-c(RGDfK)₄, $5,9 \pm 2,0$ pour le Cy5-cRGD, et $1,4 \pm 0,1$ pour le Cy5-RAFT-c(RADfK)₄ indiquant une meilleure accumulation du peptide présenté de manière tétramérique par rapport à sa présentation linéaire. Le même niveau est atteint dans la tumeur entre 5 et 30 min après injection, mais une différence de signal est observée entre 30 min et 4 h après injection, car le signal du cRGD linéaire décroît dans la tumeur tandis que le signal du cRGD présenté sous forme tétramérique reste constant.

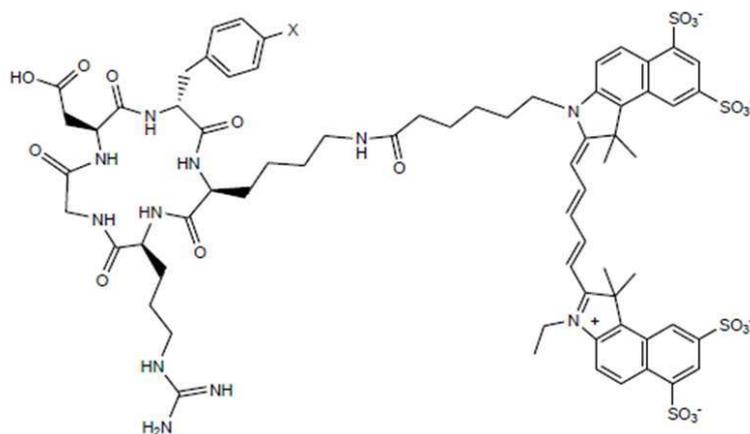


Figure IV-2 : Structure des molécules Cy5,5-c(RGDfK) (X : H) et Cy5,5-c(RADfK) (X:OH)

Hutteman et al²³³ ont utilisé l'Integrisens®680 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 675 nm, $\lambda_{\text{émission}}$: 693 nm, PerkinElmer²³⁴) pour diagnostiquer des métastases hépatiques et péritonéales (injection de 12 nmol). Un signal prolongé dans les métastases est observé avec une intensité constante de 24 à 48 h.

A.5 RGD et nanoparticule

Les nanoparticules font d'excellentes plateformes pour greffer différentes molécules (peptide(s) de ciblage, agent(s) d'imagerie). De nombreuses études montrent un temps de circulation élevé de ces nano-objets dans le sang, leur greffer un peptide de ciblage permettrait d'amener préférentiellement la nanoparticule vers l'organe cible.

Beer et al²³⁵ ont synthétisé une nanoparticule d'huile perfluorocarbonée marquée au [¹¹¹In] et fonctionnalisée avec une séquence peptidique RGD. L'accumulation dans des carcinomes pulmonaires chez le lapin a montré un signal 4 fois plus élevé à 18 h après injection en comparaison avec le peptide seul. Le nombre optimal de peptides greffés à la surface est de 10. Des nanotubes de carbones PEGylés ont également été fonctionnalisés avec du RGD et marqués au ⁶⁴Cu. Cet objet permet d'obtenir 15 % DI / g de tissu 18 h après injection dans la tumeur. Un signal est observé dans les reins, probablement dû à une déchélation du ⁶⁴Cu²³⁵.

Nasongkla et al²³⁶ ont fonctionnalisé avec du cRGD des micelles polymériques contenant de la doxorubicine afin d'améliorer le ciblage vers la tumeur et ainsi diminuer les effets secondaires toxiques de l'anti-cancéreux. Le cRGDfK est greffé à la surface des micelles polymériques (poly(ϵ -caprolactone)poly(éthylène glycol)). Pour ce faire, un block de copolymère de PEG terminés par une fonction maléimide (MAL-PEG-PCL) permettant une liaison avec le peptide remplace une partie des chaînes PEG (5, 16 ou 76 %). Le greffage a été vérifié par RMN du proton en suivant la résonance des protons phényles du c(RGDfK) à $\delta = 7,4$ ppm et la disparition du signal maléimide à $\delta = 6,74$ ppm. Le diamètre des nanomicelles est de 43 nm et aucune différence de taille n'a été observée entre micelles « nues » et fonctionnalisées.

Cressman et al³², ont fonctionnalisé des liposomes avec du c(RGDfK). Le peptide était conjugué au DSPE (distéaryl phosphatidyl-éthanolamine). Différents taux de greffage du cRGD (0,5 % à 5%) n'ont pas montré de différence de taille mais une constante d'affinité décroissante dans un modèle HUVEC tandis qu'aucune internalisation n'a été observée pour les particules ne présentant pas de peptides à leur surface.

A.6 RGD et transfert clinique

Des essais cliniques avec des agents de contraste incluant la séquence RGD ont été réalisés mais à ce jour seulement avec des ligands radiomarqués. Le premier à avoir été utilisé chez le patient est le [¹⁸F]galacto-RGD^{237, 238}, un analogue glycosilé du c(RGDfK) ; il a permis la mise en évidence *in vivo* de l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ avec un bon rapport tumeur / bruit de fond dû à une excrétion rénale élevée, diminuant le signal dans l'ensemble des organes hormis la tumeur²²¹. Récemment, un nouvel analogue du [¹⁸F]RGD a été développé par Siemens et est actuellement en phase clinique²²¹. Deux autres composés développés par GE Healthcare sont également entrés en phase d'étude clinique: un RGD marqué au ^{99m}Tc ([^{99m}Tc]NC100692) et un analogue du composé précédent, un RGD marqué au ¹⁸F, le ([¹⁸F]AH11582). Tous deux comportent un squelette avec un double cycle peptidique basé sur le RGD-4C avec un Cterminal PEGylé. Le marquage au ^{99m}Tc ou au ¹⁸F est réalisé via une lysine. Ces traceurs pour le TEMP (^{99m}Tc, ¹⁸⁸Rh) et par la TEP (¹⁸F, ⁶⁴Cu) sont à ce jour seulement étudiés dans le cancer du sein. Des résultats préliminaires montrent des bruits de fond plus importants, notamment pour le foie, en comparaison de la référence standard, le [¹⁸F]galacto-RGD²²¹.

B. Accumulation des lipidots dans différents modèles tumoraux : choix d'un modèle d'étude

De nombreux modèles tumoraux (murins, humains) peuvent être implantés de différentes manières (sous cutanée, orthotopique) chez plusieurs souches de souris (saines, *Nude*, génétiquement modifiées).

Dans un premier temps, les nanoparticules triplement marquées [¹⁴C]CHO – [³H]CHE – DiD (Chapitre II) ou les nanoparticules encapsulant du Technécium (Tc) (Chapitre III) sont

administrées à un large panel de modèles tumoraux implantés chez la souris. Les lipidots injectés contiennent un ou deux radiomarqueurs qui permettent de définir de manière quantitative l'accumulation du vecteur au sein de la tumeur, et éventuellement un traceur fluorescent afin d'évaluer visuellement l'accumulation *in vivo* des lipidots en temps réel (cas des lipidots triplement marqués). Puis un seul modèle sera sélectionné pour une étude plus détaillée dans laquelle sera évalué l'apport bénéfique d'un ciblage actif par rapport à un ciblage passif.

B.1 Présentation des modèles tumoraux

Trois modèles de tumeurs implantées chez la souris *Nude* et développés par l'équipe de JL. Coll (IAB de Grenoble) ont été étudiés avec les lots de lipidots-^{99m}Tc synthétisés en collaboration avec l'équipe de JP. Benoit (Angers), Tableau 1.

Cancer	Cellules	Souris	Implantation	Nombre de souris / modèle
Rein (humain)	HEK β 3	Nude / femelle	dos	n = 6
Sein (murin)	TSA	Nude / femelle	dos	n = 12
Cerveau (humain)	U 87	Nude / femelle	dos	n = 13

Tableau IV-1 : Présentation des modèles tumoraux utilisés ainsi que leur mode d'implantation chez la souris (Inserm 1066 Angers, IAB Grenoble).

Différents modèles tumoraux, utilisés au SHFJ, ont été également étudiés afin d'évaluer l'accumulation passive des nanoparticules. Quatre modèles de cancers mammaires sont testés sur différentes souches de souris, avec des implantations différentes. Ce type de cancer est particulièrement intéressant à étudier au vu des résultats de biodistribution du Chapitre II. En effet, les cancers mammaires peuvent être ou non hormono-dépendants et présenter des récepteurs aux apolipoprotéines. Un modèle de gliome (cancer du cerveau) a également été retenu (Tableau 2). Le cRGD peut être un ligand de ciblage potentiel pour ces tumeurs.

Cancer	Cellules	Souris	Implantation	Nombre de souris / modèle
Gliome (murin)	9L	<i>Nude</i> / Femelle	épaule	n=6
Sein (humain)	MDA-MB231	<i>Nude</i> / Femelle	flan	n=2
	MCF7	<i>Nude</i> / Femelle	flan	n=2
Sein (murin)	PyMT	PyMT / Femelle	spontané	n=4
	FVB PyMT	FVB / Femelle - Male	4 ^{ème} glande mammaire	n=6

Tableau IV- 2 : Présentation des modèles tumoraux utilisés ainsi que leur mode d'implantation chez la souris (SHFJ).

Concernant les modèles développés par JL. Coll dans les expériences de ^{99m}Tc encapsulés dans les lipidots, la lignée cellulaire **HEK $\beta 3$** permet d'obtenir un modèle de tumeur rénale issue de cellules humaines embryonnaires de rein, modifiée pour surexprimer la partie $\beta 3$ de l'intégrine, c'est un modèle dont l'accumulation passive des nanoparticules est faible (EPR -). La lignée cellulaire **TSA** permet d'obtenir un modèle de tumeur murine mammaire non hormono dépendante exprimant l'intégrine, tumeur bien vascularisée, les nanoparticules ont tendance à s'accumuler facilement (EPR +). Le modèle **U87** est un modèle de glioblastome humain qui exprime l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et qui est un modèle EPR dit intermédiaire.

Concernant les modèles développés au SHFJ, la lignée cellulaire **9L** permet d'obtenir un modèle murin de cancer du cerveau de type gliome. Les cellules sont implantées en sous-cutané au niveau de l'épaule ou de la cuisse chez la souris *Nude*. Ce type de cellules peut également être implanté de manière orthoptique dans le cerveau pour mimer le milieu naturel de développement de ce cancer. Dans cette étude, 1 million de cellules ont été injectées en intra-dermique chez des souris *Nude* femelles. La lignée cellulaire hormono-dépendante **MCF7** permet d'obtenir un modèle humain de cancer du sein de type dépendant d'hormones, qui a besoin de la présence d'œstradiol ou de progestérone pour sa croissance. En effet les cancers hormono-dépendants représentent 60 % des cas de cancer du sein chez la femme, les cellules cancéreuses ont la capacité de produire leurs propres hormones (œstradiol et progestérone) afin de promouvoir leur croissance. Pour que ces cellules se développent chez la souris après implantation sous-cutanée, il est nécessaire d'implanter une pastille d'œstradiol à proximité de l'implantation des cellules tumorales. La pastille délivre la dose d'hormone nécessaire à la croissance des cellules. Dans cette étude, 3 millions de cellules sont injectées en intradermique au niveau du flan chez la souris *Nude*

femelle. Une pastille imprégnée d'œstradiol est placée au niveau costal non loin de la zone d'implantation des cellules. La lignée cellulaire **MDA-MB231** est au contraire une lignée humaine de cancer du sein de type non hormono-dépendant. Les cellules tumorales ne nécessitent pas d'hormones pour assurer leur croissance. Dans cette étude, 2 millions de cellules sont injectées en intradermique sur le flan de souris *Nude* femelles. La lignée cellulaire **PyMT** permet d'obtenir un modèle de développement de tumeur spontanée des glandes mammaires chez la souris de fond génétique FVB. En effet, c'est une souche de souris transgénique modifiée sur le gène du polyomavirus middle T (PyV-mT) qui développe, au cours du temps, et de manière spontanée des cancers mammaires à l'état métastatique²³⁹. Ce modèle peut être compliqué d'utilisation dû à la présence de multiples foyers tumoraux à différents sites au sein d'un même animal. Implanter la lignée cellulaire **PyMT chez la souris FVB** permet d'obtenir un modèle plus simplifié issu du modèle PyMT. En effet, les cellules cancéreuses issues du développement spontané chez la souris PyMT sont réimplantées de manière orthotopique et syngénique (implantation des cellules tumorales dans la 4^{ème} glande mammaires) chez la souris FVB mâle ou femelle. Ce modèle est plus simple d'utilisation que le modèle PyMT car il ne développe qu'un stade tumoral sur une glande mammaire et aussi est moins coûteux à produire.

B.2 Résultats expérimentaux avec les modèles d'Angers

Après avoir vérifié la biodistribution des lipidots-^{99m}Tc chez la souris saine (Chapitre III), l'accumulation des nanoparticules au sein des différents types de tumeurs est évaluée. Quatre temps sont analysés (1 h, 3 h, 5 h et 24 h) sauf pour la souche HEKβ3 (3h et 24 h) dû à une croissance tumorale difficile chez la souris de cellules humaines. Il est observé une accumulation tumorale dans l'ensemble des lignées cellulaires tumorales étudiées (Figure 3) avec un minimum d'accumulation de 2,5 % de dose injectée / g de tissu pour le HEKβ3 et un maximum de 4,4 % de la DI / g de tissu pour la lignée cellulaire TSA 24 h après injection.

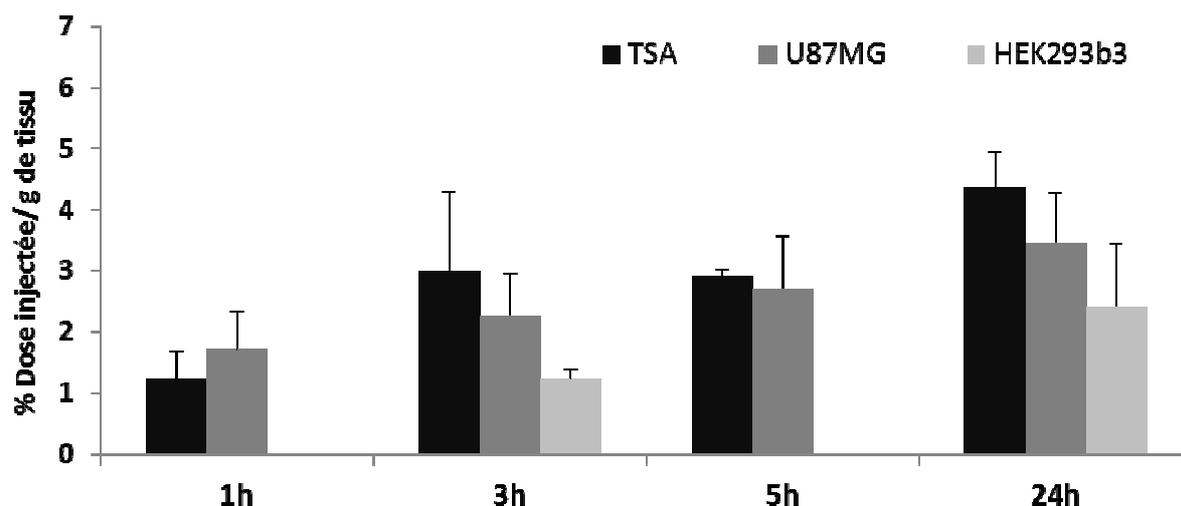


Figure IV-3 : Accumulation des lipidots dans les différents modèles tumoraux (données *ex vivo*)

B.3 Résultats expérimentaux avec les modèles du SHFJ

Le lot de nanoparticules triplement marquées décrit au Chapitre II a été utilisé pour réaliser ces expériences (9 nmol en DiD, 0,38 μCi en ^{14}C , 1,33 μCi en ^3H). L'accumulation *in vivo* a été évaluée par fluorescence grâce à l'utilisation de la Fluobeam™700. La fluorescence a également été évaluée *ex vivo*, complétée par les comptages radioactifs des tissus.

Les résultats sont à considérer dans un but plus qualitatif que quantitatif. En effet, pour certains modèles, le nombre d'animaux est faible ($n = 2$), ne permettant pas de réaliser des statistiques. Ces expériences ont permis néanmoins de choisir un modèle d'étude facile à mettre en œuvre et pertinent pour une étude plus poussée, afin d'explorer notamment l'intérêt de la fonctionnalisation de la lipidot par le RGD pour la vectorisation tumorale.

B.3.1 Le modèle du gliome

La Figure 4 représente l'accumulation de fluorescence *in vivo* des lipidots dans la lignée cellulaire 9L. La cinétique est réalisée jusqu'à 48 h après injection, temps pour lequel le plus fort signal de fluorescence est observé. En effet, les zones tumorales commencent à être définies au bout de 24 h, mais le rapport signal sur bruit est faible comparé à 48 h après injection, où le signal tumoral est vraiment net.

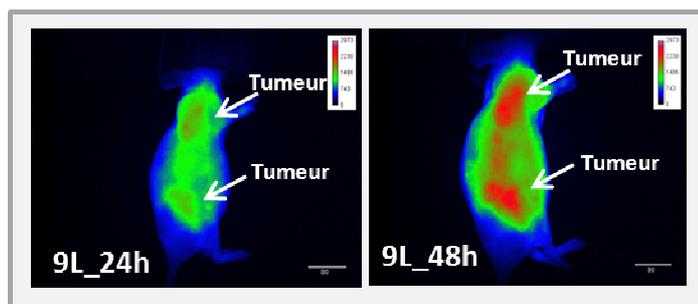


Figure IV-4 : Accumulation des lipidots par imagerie de fluorescence à 24 h et 48 h après injection.

La Figure 5 présente l'accumulation tumorale *ex vivo* des trois traceurs encapsulés dans les lipidots. Le % de DI / g de tumeur est d'environ 3,3 pour les deux radiotraceurs à 16 h ou 24 h. Le rapport tumeur / muscle en intensité de fluorescence est d'environ 5, à 16 h après injection. Que ce soit à 4 h ou à 16 h, l'accumulation tumorale est constante.

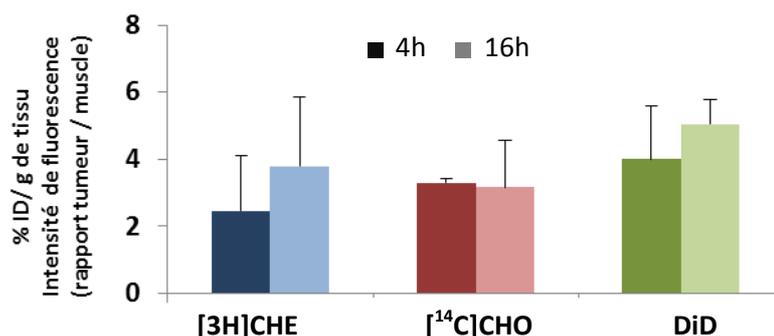


Figure IV-5 : Radioactivité et fluorescence évaluées *ex vivo* sur les tumeurs du modèle gliome (lignée cellulaire 9L).

B.3.2 La lignée cellulaire MCF7

La Figure 6 présente l'accumulation de fluorescence *in vivo* des lipidots dans la lignée cellulaire MCF7. Le signal maximum est observé dans la zone tumorale 48 h après injection mais le signal reste faible. De plus, la pastille d'œstradiol induit un artefact important sur l'image, absorbant à la longueur d'onde d'excitation et présentant une matrice à base d'hormones, molécules pour lesquelles les lipidots présentent une forte affinité (Chapitre II).

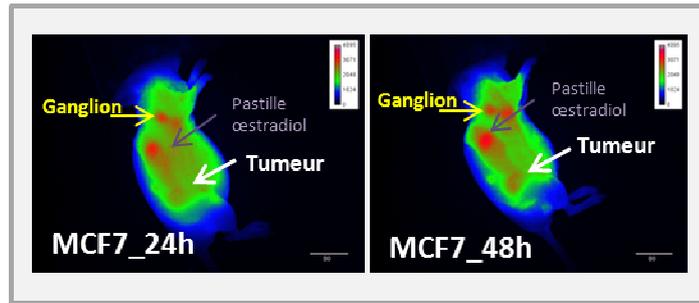


Figure IV-6 : Accumulation des lipidots par imagerie de fluorescence à 24 h et 48 h après injection.

La Figure 7 présente l'accumulation tumorale des trois traceurs encapsulés dans les lipidots mesurée *ex vivo*. Le % de dose injectée / g de tumeur est d'environ 4,2 pour les deux radiotraceurs et le rapport tumeur / muscle en intensité de fluorescence est d'environ 6,7 à 30 h après injection.

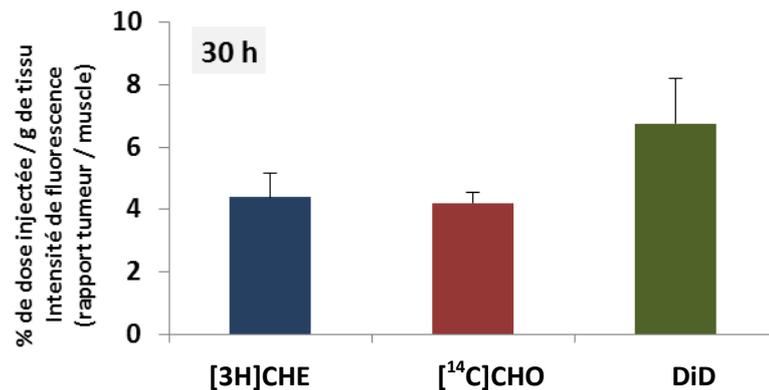


Figure IV-7 : Radioactivité et fluorescence évaluées *ex vivo* sur les tumeurs du modèle hormono-dépendant (lignée cellulaire MCF7).

B.2.3 La lignée cellulaire MDA-MB231

La Figure 8 présente l'accumulation de fluorescence *in vivo* des lipidots dans la lignée cellulaire MDA-MB231 à 24 h et 48 h après injection. Le signal dans la tumeur est maximal à 48 h après injection. La zone tumorale est définie mais le contraste tumeur sur peau est faible, surtout par rapport au signal présent dans le foie.

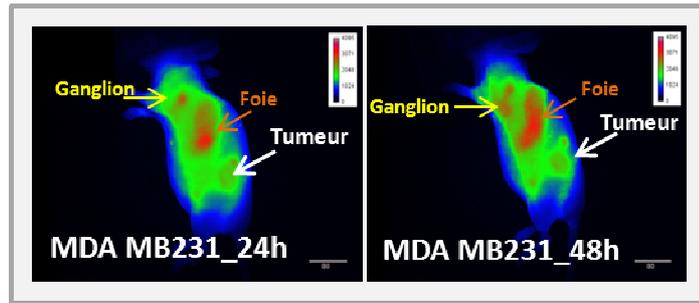


Figure IV-8: Accumulation des lipidots par imagerie de fluorescence à 24 h et 48 h après injection.

La Figure 9 présente l'accumulation tumorale des trois traceurs encapsulés dans les lipidots mesurée *ex vivo*. Le % de DI / g de tumeur est d'environ 5 pour les deux radiotraceurs (avec néanmoins des barres d'erreurs importantes), et le rapport tumeur / muscle en intensité de fluorescence est d'environ 5,7 à 30 h après injection.

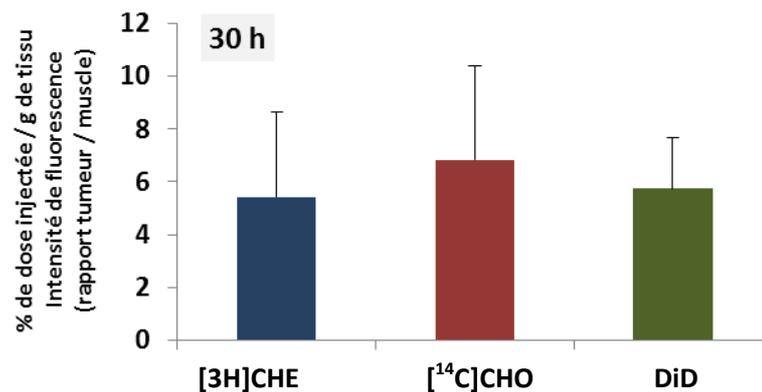


Figure IV-9: Radioactivité et fluorescence évaluées *ex vivo* sur les tumeurs du modèle de cancer du sein (lignée cellulaire MDA-MB231)

B.2.4 La lignée cellulaire PyMT

A cause du stade avancé des tumeurs au niveau des glandes mammaires, des zones nécrosées sont apparues empêchant la prise de vue en mode corps complet avec la Fluobeam™ 700. En effet, si la peau est abîmée (coupure, rougeur) ou encore si un stade nécrotique est atteint, la peau se transforme en zone absorbante noire sous la caméra. Cela n'empêche cependant pas de prélever les tumeurs et de réaliser les quantifications *ex vivo* par fluorescence et radioactivité.

La Figure 10 présente l'accumulation tumorale des trois traceurs encapsulés dans les lipidots mesurée *ex vivo*. Le % de dose injectée / g de tumeur est de 2 environ pour les deux radiotraceurs 4 h après injection, et de 5 à 16 h après injection. Le rapport tumeur / muscle en intensité de fluorescence est très élevé à 4 h après injection, à savoir 14,1 tandis qu'il n'est plus que 3 à 16 h après injection.

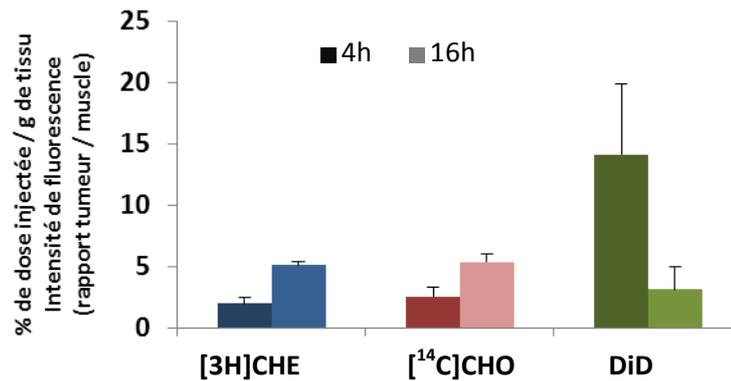


Figure IV-10 : Radioactivité et fluorescence évaluées *ex vivo* sur les tumeurs du modèle de cancer du sein (lignée cellulaire PyMT)

B.2.5 La lignée cellulaire PyMT implantée chez la souris FVB

La Figure 11 présente l'accumulation de fluorescence *in vivo* des lipidots dans le modèle FVB implanté PyMT à 5 h et 24 h après injection. Dès 5 h après injection, la zone tumorale se distingue nettement du reste du corps, malgré le signal du foie à proximité. Le signal de fluorescence spécifique est croissant jusqu'à 24 h après injection puis commence à décroître.

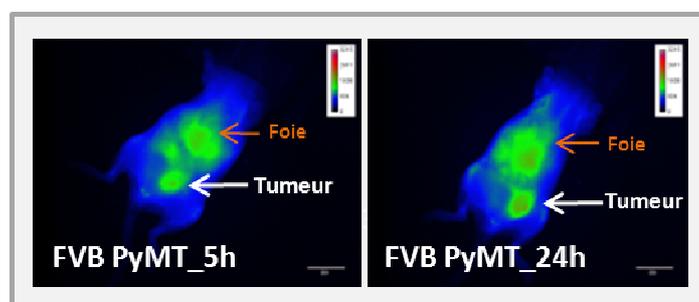


Figure IV-11 : Accumulation des lipidots par imagerie de fluorescence à 5 h et 24 h après injection dans le modèle de cancer du sein (lignée cellulaire PyMT implantée chez la souris FVB).

La Figure 12 présente l'accumulation tumorale des trois traceurs encapsulés dans les lipidots mesurée *ex vivo*. Le % de dose injectée / g de tumeur est d'environ 3 chez le mâle et 5,6 chez la femelle pour le radiotracer [^3H]CHE. Concernant le [^{14}C]CHO, l'accumulation est d'environ 1,75 pour les deux sexes. Le rapport tumeur / muscle en intensité de fluorescence est compris entre 3 et 4 à 48 h après injection.

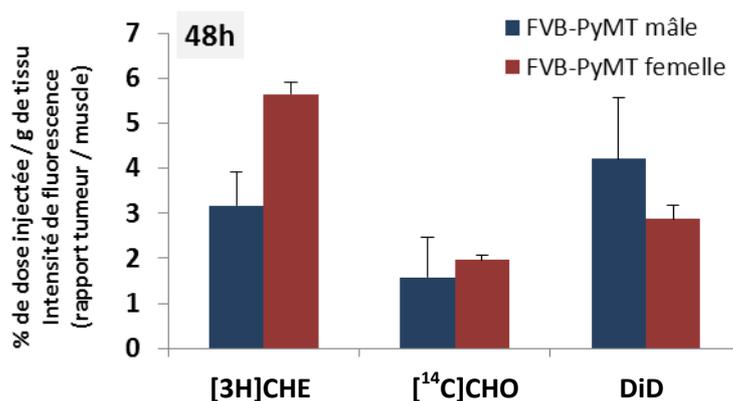


Figure IV-12 : Radioactivité et fluorescence évaluée *ex vivo* sur les tumeurs PyMT implantées chez la souris FVB femelle ou mâle.

B.4. Discussion et choix du modèle d'étude

Lors de ces expériences de « screening » de modèles tumoraux, nous avons observé que les lipidots s'accumulent plus ou moins rapidement dans l'ensemble des tumeurs étudiées. De manière générale, les quantifications *ex vivo* montrent toutes un rapport tumeur / muscle supérieur à 2 et allant jusqu'à 7, que ce soit en intensité de fluorescence ou en radioactivité. Ces données ne représentent pas les valeurs d'accumulation maximale, sachant que par exemple, pour les 9L, le temps étudié *ex vivo* est 16 h après injection alors que le maximum d'accumulation observé *in vivo* est à 48 h. De même pour les modèles FVB implantés PyMT dont le maximum d'accumulation est observé entre 21 h et 24 h après injection, alors que l'analyse *ex vivo* a été réalisée à 48 h.

Concernant l'accumulation des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]lipidots nus dans différents modèles tumoraux, 4,4 % de DI / g de tissu dans un modèle EPR positif et 3,5 % DI dans un modèle EPR moyen sont de bons résultats à 24 h après injection. En revanche, à 1 h après injection, une accumulation de 1,3 et de 1,7 % DI / g de tissu (dans respectivement le modèle TSA et U87) est retrouvée. Sancey, avec un traceur [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]RAFT-RGD a retrouvé un signal de 2,4 % de la dose injectée dans un modèle de mélanome murin et de 2,7 % de DI dans un modèle

mammaire soit le double du signal obtenu avec les lipidots nues²²⁹. Néanmoins, concernant le modèle HEK β 3, la croissance tumorale est très lente avec une modification artificielle transgénique qui en fait un modèle lourd à utiliser et peu reproductible du point de vue de la taille des tumeurs. Pour le modèle du gliome (lignée cellulaire 9L) du SHFJ, l'absorption maximale est observée à 48 h après injection avec un contraste nettement visible de la zone tumorale. Concernant le modèle MCF7, la pastille d'œstradiol donne un artéfact important à ces longueurs d'onde d'absorption et est une zone de captation de diverses molécules, ce qui rend ce modèle impropre à l'étude par fluorescence planaire. Concernant le modèle MDA-MB231, le maximum d'accumulation est également retrouvé 48 h après injection mais le bruit de fond étant élevé, le signal dans la tumeur pour ces deux modèles est moins distinct. Pour l'ensemble de ces modèles, la croissance tumorale se fait uniquement chez la souris *Nude*, souris immunodéficiente qui ne rejette pas les cellules greffées hétérologues.

Le modèle PyMT est un modèle d'étude compliqué car multistade, les différents stades tumoraux se développant sur l'ensemble des glandes mammaires, ce qui rend difficile son utilisation en imagerie de fluorescence. De plus, le prix des souris est élevé et la croissance spontanée des tumeurs reste lente (au minimum 60 euros / souris, avec l'hébergement et l'entretien de la lignée). Le modèle FVB implanté PyMT est un modèle de choix car il présente à la fois les qualités d'être simple de réalisation et présente une accumulation rapide des lipidots au sein des cellules cancéreuses. Un avantage supplémentaire est la croissance possible de ces tumeurs mammaires chez la souche FVB qui possède un faible coût (3 € / souris) par rapport aux souris *Nude* (30 € / souris).

Pour conclure, les lipidots via l'effet EPR s'accumulent dans l'ensemble des tumeurs avec une rapidité et une intensité plus ou moins élevée. Les modèles dont la croissance tumorale a été jugée trop lente ont été abandonnés (MDA-MB231, MCF7, HEK β 3), ainsi que les modèles présentent une accumulation lente des lipidots (9L) et le modèle multi-métastatique (PyMT). Le modèle FVB implanté PyMT présentant les meilleures caractéristiques a été choisi pour être le modèle d'étude. Tout d'abord, la souche utilisée (FVB) est la souche qui a été employée pour réaliser la biodistribution des lipidots chez la souris saine (Chapitre II). De plus, il faut rappeler que la souche FVB possède un système immunitaire intact contrairement à la souche *Nude*. L'implantation des cellules PyMT est réalisée de manière orthotopique et syngénique, ce qui permet de mimer au mieux le développement du cancer (croissance dans son environnement naturel). La croissance

tumorale est relativement rapide (de l'ordre de 15 jours après implantation des cellules). Ces tumeurs sont bien vascularisées ce qui permet d'obtenir un signal distinct à 24 h après injection. Le principal inconvénient de ce modèle reste l'épilation des souris nécessaire avant acquisition *in vivo* des images de fluorescence.

Un autre point important de ce travail, pour lequel nous souhaitons étudier non seulement la possibilité de vectorisation passive des lipidots vers les tumeurs, décrit dans les paragraphes B.2 et B.3, mais aussi leur vectorisation active était de déterminer quel ligand de ciblage permettrait une reconnaissance spécifique des tumeurs PyMT. Le peptide RGD a été sélectionné car connu pour être surexprimé dans certains modèles tumoraux²²¹, notamment des carcinomes mammaires. De plus, des essais de greffages sur les lipidots avaient déjà été initiés au laboratoire¹⁵⁴. Les cellules PyMT ne peuvent pas être mises en cultures « classiques » dû à une dérive rapide et importante de la lignée, ce qui rend les essais de liaisons *in vitro* impossible. De plus, les anticorps anti $\alpha_v\beta_3$ murin ne sont pas disponibles commercialement, ce qui rend le travail d'histologie difficile sur ce type de tumeur.

Afin d'évaluer le statut RGD de la tumeur, des essais d'accumulation tumorale et de biodistribution des peptides libres cRGD et cRAD (peptide négatif) couplés à un fluorophore, le Cy5, ont été réalisés chez la souris femelle FVB implantée PyMT. Dans un second temps, un composé commercial comportant le peptide RGD, l'Angiostamp® (RAFT-RGD), développé par Fluoptics a été administré chez la souris porteuse de tumeur afin d'évaluer le potentiel du ciblage actif d'un peptide ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

B.5. Statut du RGD vis-à-vis du modèle FVB implanté PyMT

B.5.1 Biodistribution des peptides libres

Le fluorophore greffé aux peptides libres cRGD et cRAD est une cyanine de type Cy5 ($\lambda_{\text{absorption}} / \lambda_{\text{émission}}$ Cy5 (nm) : 651 / 666). Les longueurs d'émission sont à la limite de la détection avec la Fluobeam™700. Les expériences vont donc être réalisées sur l'imageur de photon (Biospace, France). La concentration en Cy5 injectée par animal est de 50 μM représentant une masse de peptide de 7,5 μg / animal.

Afin d'évaluer le devenir des peptides libres cRGD et cRAD ([Cy5] = 50 μ M, 7,5 μ g de peptide soit 5 nmol) après injection, des cinétiques *in vivo* et des biodistributions *ex vivo* sont réalisées à 5 h et 24 h après injection (n = 3 souris / groupe). Il a été difficile de quantifier de manière précise les cinétiques *in vivo* par des courbes, les signaux étant très proches du bruit de fond. Une représentation en série d'image a donc été préférée (Figure 13). La présence de signal est observée dans le bas de l'abdomen 3 h après injection. Sur la souris 1 (la plus à gauche), le signal est clairement dans la vessie et non dans la tumeur, la souris en position centrale, présente également un très faible signal dans la vessie (surement vide) et la souris 3 possède un fort signal, à cheval sur la vessie et la tumeur, ne permettant de définir précisément le lieu d'émission du signal. De manière générale, hormis la souris 3, aucun signal des peptides libres n'a été observé dans la tumeur.

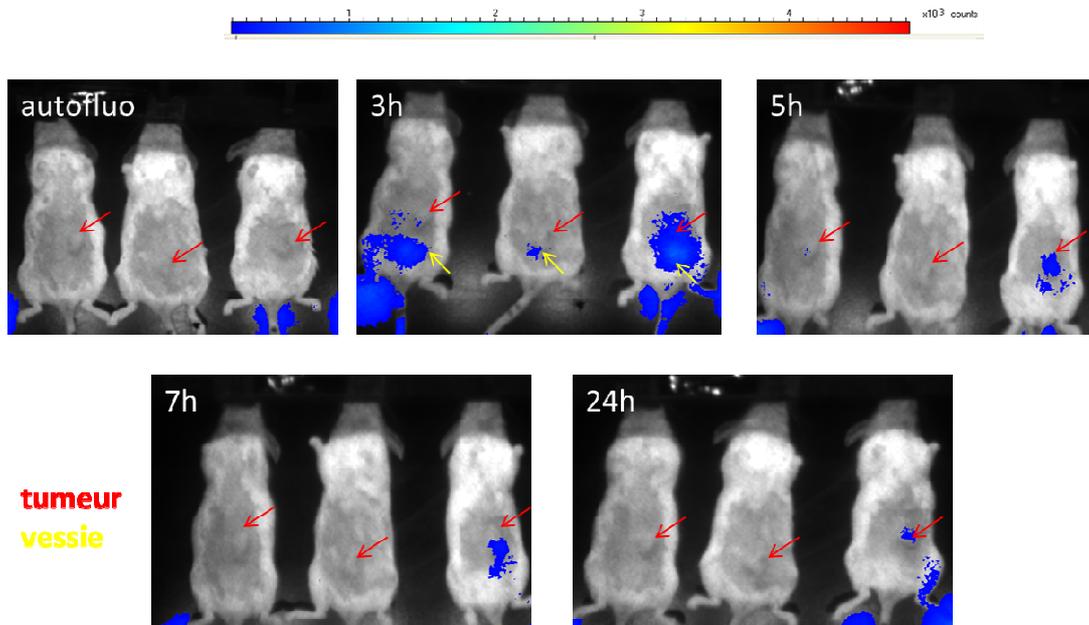


Figure IV-13 : Superpositions des photos optiques et de fluorescence après injection de 50 μ M de [Cy5]cRGD.

Les biodistributions *ex vivo* des [Cy5]cRGD et [Cy5]cRAD sont présentées Figure 14. A 5 h après injection, du signal est observé au sein de la tumeur pour le cRGD. Aucun signal n'est observé dans les autres organes à ce temps ci ou d'autres temps, de même pour le cRAD. L'élimination du peptide semble se faire par voie rénale avant 5^{ème} heure après injection car aucun signal n'est observé dans le rein à ce temps.

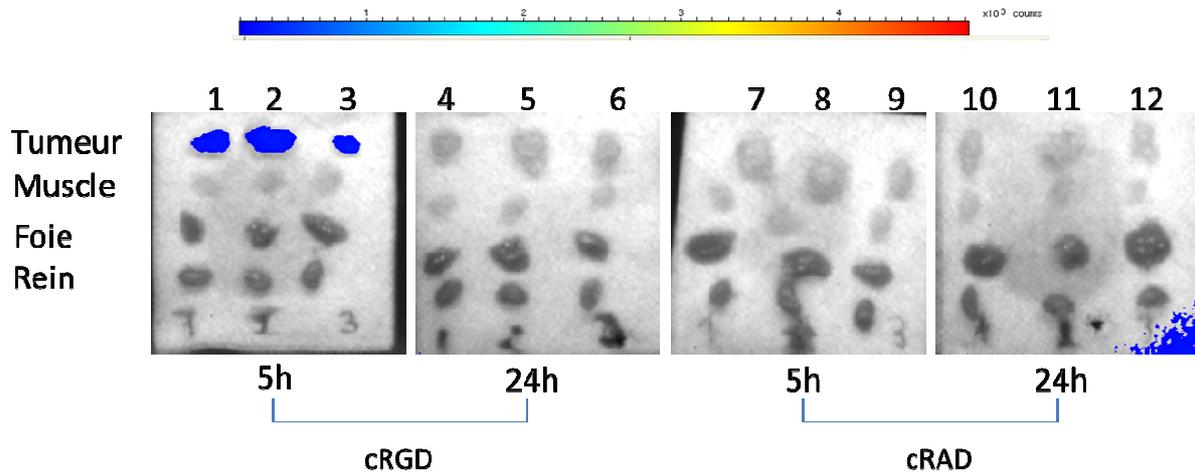


Figure IV-14 : Biodistribution ex vivo à 5h et 24 h après injection des [Cy5]cRGD et [Cy5]cRAD

Il a souvent été décrit dans la littérature que le mode de présentation du RGD avait une influence sur le taux de liaison de celui avec les récepteurs à l'intégrine. Les expériences précédentes montrant une faible accumulation dans la tumeur à 5 h avec le peptide RGD, des essais avec une présentation du peptide sous forme tétramérique via l'utilisation de la plateforme RAFT a été réalisé. Pour cela, le produit commercial, l'Angiostamp®700 a été utilisé.

B.5.2 Biodistribution de l'Angiostamp®

L'Angiostamp® ($\lambda_{\text{absorption}} / \lambda_{\text{émission}}$ (nm) : 680 / 700) est un traceur spécialement adapté à la Fluobeam™700. Il est recommandé de réaliser une acquisition 24 h après injection de 100 μM de produit. Dans cette étude nous voulions également réaliser une acquisition 5 h après injection. Afin d'éviter de saturer la caméra, une concentration de 50 μM en RAFT-RGD a été injectée par animal. La masse de peptides injectée n'est pas connue, l'Angiostamp® étant un produit commercial breveté, peu d'informations sont disponibles.

Les souris FVB femelles sont implantées avec les cellules PyMT environ 15 jours avant le début des expériences d'imagerie afin d'obtenir des tailles de tumeurs équivalentes à 40 mm^3 . Deux groupes sont réalisés, le premier dont le sacrifice se fait 5 h après injection ($n = 3$ souris) et le second dont le sacrifice se fait 24 h après injection ($n = 3$ souris). Les temps de suivi de cinétique *in vivo* sont de 1 h, 3 h, 5h, 7 h et 24 h après injection.

Il est observé un fort signal après injection dans la tumeur suivi d'une lente décroissance jusqu'à 24 h (Figure 15). Le signal de fluorescence de la peau est également élevé aux temps courts mais décroît rapidement. Le rapport tumeur / muscle met en évidence une accumulation croissante du signal dans la tumeur jusqu'à 7 h après injection (maximum 4,5) et un signal plus faible à 24 h (rapport de 3). Au niveau de la vessie, le signal de fluorescence est saturé dans les premières heures après injections.

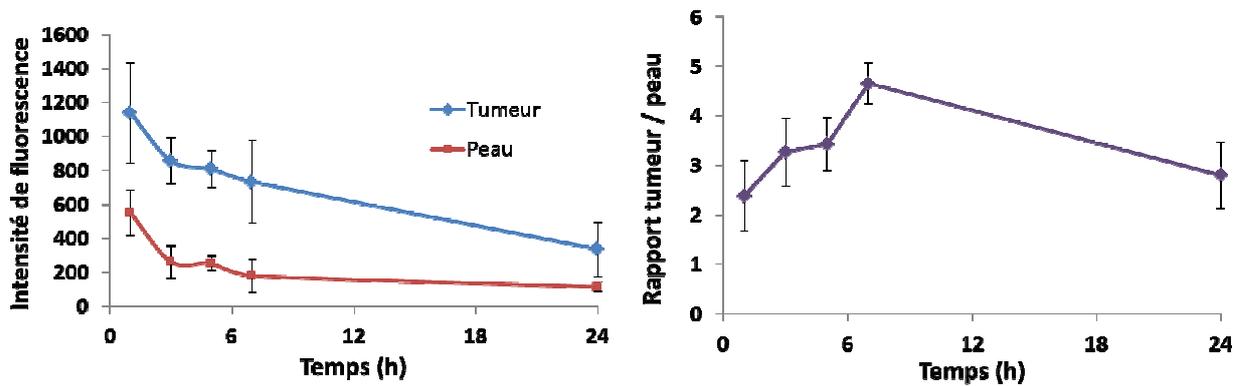


Figure IV-15 : Cinétique *in vivo* de l'accumulation de l'Angiostamp® dans la tumeur en Intensité de fluorescence (à gauche) et en rapport tumeur / muscle (à droite)

Concernant les données *ex vivo*, un fort signal est observé dans les reins 5 h après injection, dû à l'élimination rénale du peptide. Ce signal est faible 24 h après injection. Peu de signal est observé dans le foie. Le ratio tumeur / muscle est de 7 à 5 h après injection et de 11 à 24 h après injection (Figure 16).

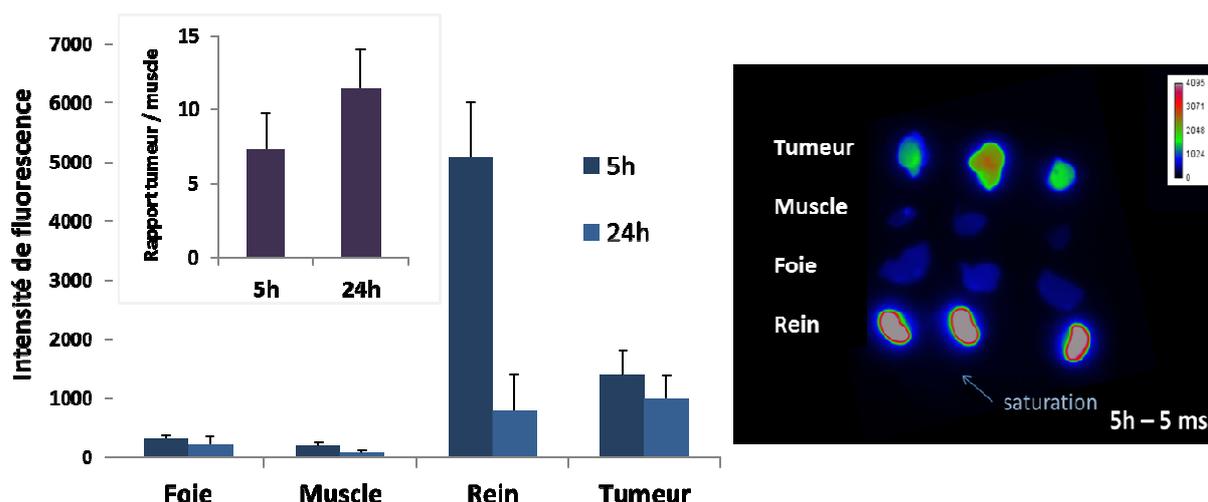


Figure IV-16 : Quantification *ex vivo* de l'accumulation de l'Angiostamp® dans la tumeur en Intensité de fluorescence et en rapport tumeur / muscle (à gauche) illustrée par une image de fluorescence 5 h après injection à droite.

Il existe des différences élevées entre le signal tumeur / peau *in vivo* (Figure 14) et le signal tumeur / muscle *ex vivo* (Figure 15). Les données de cinétiques *in vivo* en intensité de fluorescence, confirment que ce n'est pas l'accumulation du produit mais sa rétention qui produit le signal. La peau présente également une forte fluorescence non retrouvée dans le muscle, d'où les différences observées *in vivo* et *ex vivo*. L'Angiostamp® est un bon traceur d'accumulation dans la tumeur. La dose conseillée de 100 μM à l'injection, permettrait sans doute d'obtenir un signal intense 24 h après injection, cependant le temps maximal d'accumulation observé dans cette étude est de 7 h après injection.

B.5.3 Discussion

Les essais *in vivo* de cRGD-Cy5 ont mis en évidence un signal *ex vivo* dans la tumeur à 5 h, disparaissant 24 h après injection. Aucun signal n'est observé dans la tumeur avec le peptide non spécifique cRAD-Cy5. Les cinétiques *in vivo* ont mis en évidence un fort signal dans la vessie jusqu'à 3 h après injection. La voie rénale est la voie d'élimination de ce type de peptide. L'utilisation d'Angiostamp®, tétramère de cRGD a mis en évidence une accumulation rapide au sein de la tumeur, avec un maximum de signal 7 h après injection. La concentration en traceur est très élevée après injection et décroît lentement jusqu'à 24 h

après injection. Le signal dans les reins est saturant et ce dès 5 h après injection. A ce stade, il est montré que la présentation tétramérique apportée par l'Angiostamp® permet une accumulation plus prononcée du cRGD au sein de la tumeur en comparaison avec la présentation monomérique. Ce type de résultat a été retrouvé et confirmé par Sancey²²⁹ et Jin²²⁷.

Ces expériences ont démontré que le modèle PyMT est un modèle exprimant les récepteurs aux intégrines. Il va donc pouvoir être utilisé pour étudier la différence entre le ciblage passif et le ciblage actif des lipidots, lorsque la séquence RGD est greffée à la surface des nanoparticules.

C. Etude de l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs PyMT chez les souris FVB

Une étude plus approfondie de l'accumulation des lipidots dopées en DiD chez la souris FVB implantée PyMT femelle est réalisée. Afin de vérifier l'hypothèse que les tumeurs PyMT surexpriment des récepteurs de type intégrines $\alpha\beta_3$, marqueurs de l'angiogenèse, différentes études préliminaires sont réalisées. Enfin, ces mêmes peptides seront greffés sur la lipidot et leur accumulation tumorale évaluée par rapport à une particule « nue ».

Le sous chapitre C.1 présentera les peptides utilisés, le C.2 chapitre présentera la fonctionnalisation des lipidots avec les peptides et les sous chapitres C.3 et C.4 présenteront les résultats *in vivo* en concluant par une discussion sur ces résultats en C.5.

C.1 Introduction

Dans cette étude, nous avons évalué l'apport d'un ciblage actif de la nanoparticule par le cRGD. Le cRGD est un peptide (Arg-Gly-Asp) qui reconnaît les récepteurs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimés par les cellules endothéliales des néovaisseaux. Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale permet le diagnostic et le traitement des tumeurs solides. L'accumulation tumorale est évaluée *in vivo* et *ex vivo* 5 h et 24 h après injection. Des coupes histologiques sont réalisées afin d'évaluer une localisation différente potentielle des traceurs. Différents modes de présentation du RGD sont étudiés (Tableau 4, Figure 17).

	Contrôle positif	Contrôle négatif	Mode de présentation
Peptide commercial	c(RGDfK)	c(RADfK)	greffé lipidot
	c(RGDfK)	c(RADfK)	couplé à Cy5 (1:1)
Fluoptics	Angiostamp®	x	couplé à RAFT (4:1)

Tableau IV-4 : Présentation des caractéristiques des différents peptides utilisés.

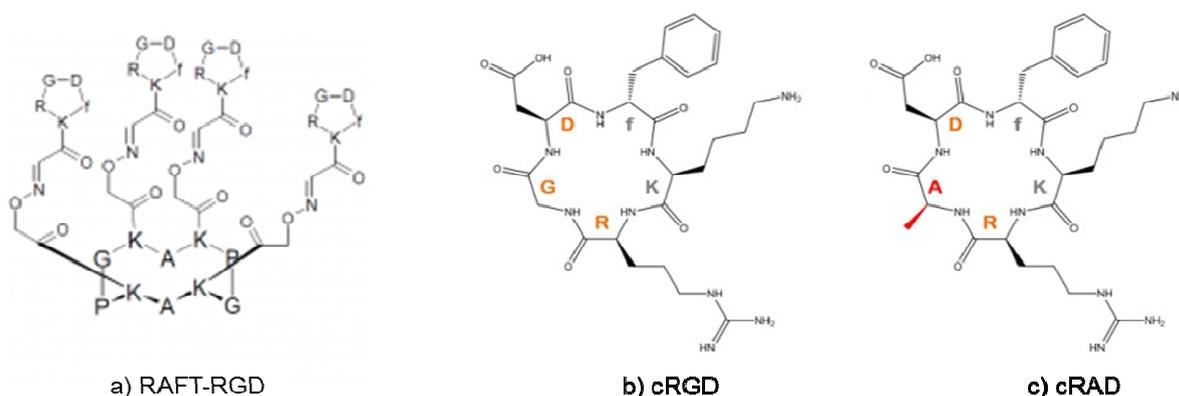


Figure IV-17 : Structure des différents RGD utilisés : a) Angiostamp®700 composé de RAFT-RGD et d'un fluorophore commercialisé par Fluoptics ; b) et c) cRGD et cRAD.

C.2 Préparation des particules, peptides et caractérisations

C.2.1 Préparation des nanoparticules et réaction de couplage

Les peptides sont greffés aux lipidots grâce à une réaction de couplage de type thiol-maléimide tel que déjà décrit¹⁵⁴. Des DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL (MAL = maléimide, 1,2-distearoyl -sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N- [amino(polyéthylène glycol)-5000] (Figure 18) remplacent à hauteur de 11 % les stéarates de PEG₂₀₀₀ au cours de la synthèse. Les DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL présentent une fonction maléimide au bout de la chaîne PEG qui réagit avec une fonction thiol présente sur le peptide. Les PEG destinés au greffage des peptides ont une chaîne plus longue (5000 motifs de polyéthylène glycol) que les PEGs utilisés pour la stabilité colloïdale des particules (2000 motifs de polyéthylène glycol) afin que le peptide se trouve bien à l'extérieur de la nanoparticule et ne soit pas entravé dans la couche de polymère, ce qui inhiberait sa fonction. Il est estimé que la nanoparticule possède environ 1071 fonctions maléimide disponibles à sa surface pour le greffage si 100 % des DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL sont incorporés. Un fluorophore, le DiD est incorporé comme précédemment, dans la nanoparticule afin de permettre son suivi *in vivo* par fluorescence.

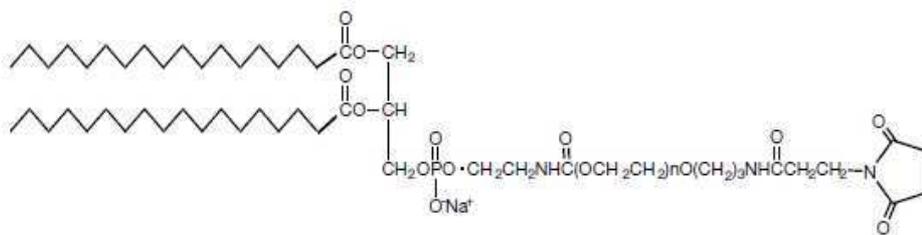


Figure IV-18 : Surfactant fonctionnalisable DSPE-PEG-MAL.

Une fois la synthèse des nanoparticules comportant les surfactants PEGylés fonctionnalisés, le lot est divisé en 3 sous lots pour la réaction de couplage. Un lot est destiné à recevoir le peptide cRGD (peptide spécifique), le second, le peptide cRAD (peptide non spécifique, qui servira de contrôle négatif « peptide ») et enfin le 3^{ème} lot sert de contrôle négatif en tant que nanoparticule nue. Au préalable, les peptides sont déprotégés avec du TCEP afin de présenter des fonctions thiols réactives aux fonctions maléimides présents sur les surfactants (Figure 19). Puis les peptides et les lipidots sont mis en contact pendant 2 h avant d'être purifiés et stérilisés. La solution est diluée afin d'obtenir une concentration en DiD de 100 μ M pour l'injection.

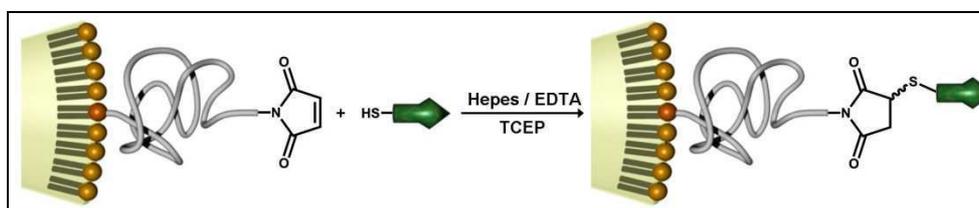


Figure IV-19 : Principe du greffage *in situ* de ligands biologiques à la surface des nanoparticules.

C.2.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules fonctionnalisées

C.2.2.a Caractérisation de la nanoparticule

Le fait d'incorporer des DSPE-PEG₅₀₀₀ entraîne une légère augmentation de la taille des lipidots (environ 10 nm supplémentaires). Aucune différence de taille n'est observée entre le lot contrôle et les lots greffés (Tableau 5). Les lots obtenus ont une polydispersité inférieure à 0,16. Le potentiel zêta est identique pour l'ensemble des lots greffés, aux alentours de -10 mV. Le nombre de mol de peptides est identique pour l'ensemble des lots (si 100 % de greffage) afin de permettre des comparaisons.

	Lipidots nues		Lipidots fonctionnalisées	
	OH	cRGD	cRAD	
Taille (nm)	65	66,6	67,3	
Polydispersité	0,145	0,153	0,125	
Potentiel zêta (mV)	-12,07	-10,9	-10,9	
Nombre de particule / mL	2,50E+14			
Concentration en lipides	≈ 25 mg / mL			
Nombre de DiD / nanoparticule	entre 280 and 300			
[DiD]	≈ 100 μM			
*Masse de peptide / 100 μL (μg)	0	62,5	62,5	
*mol peptide / 100 μL (nmol)	0	86		
$\lambda_{\text{absorption}} / \lambda_{\text{émission}}$ DiD (nm)	645 / 665			

Tableau IV-5 : Caractéristiques des LNP greffées avec différents peptides ainsi que les concentrations injectées chez l'animal. * si 100 % de greffage

C.2.2.b Caractérisation du nombre de peptides greffés

Afin d'évaluer le nombre de fonctions maléimides incorporées dans la couronne de la lipidot et dans un second temps, le nombre de fonctions ayant réagi avec les peptides, un test colorimétrique est réalisé avec du SAMSA-fluorescéine (5-((2-(and-3)-S-(acetylmercapto) succinoyl) amino) fluorescéine). Le but de ce dosage est de déterminer le nombre de fonctions maléimides en y greffant une sonde fluorescente contenant une fonction thiol réactive. Il devient alors possible de déterminer le nombre de fonctions maléimides par absorbance (Figure 20).

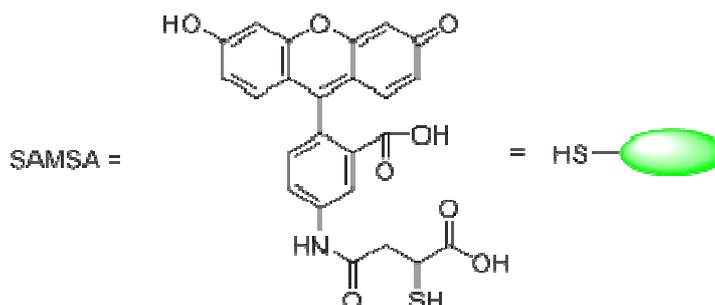


Figure IV-20: Structure chimique du SAMSA.

Après formulation des lipidots contenant 11 % de DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL, les fonctions maléimides sont dosées par colorimétrie afin de déterminer le pourcentage de PEG fonctionnalisés qui a été réellement incorporé dans la lipidot (Chapitre VI, Protocole expérimental A). Puis la réaction de greffage est réalisée et les fonctions libres maléimides n'ayant pas réagies sont dosées.

26 % des DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL sont incorporés au cours de la synthèse. Ce chiffre peut paraître faible, cependant des essais au laboratoire avaient déjà montré, pour les formulations standard (diamètre 50 nm, 375 mg / mL), que seul 50 % des PEG₂₀₀₀ MyrjS40 étaient incorporés dans la lipidot au moment de la synthèse et que leur présence sert essentiellement pour la formulation des particules.

La réaction de greffage du RGD sur les nanoparticules est de 81 %, que ce soit pour le cRGD ou le cRAD. Il est alors estimé que 226 séquences RGD sont présentées à la surface de chaque nanoparticule (Chapitre VI, Protocol expérimental A).

C.3 Résultats

C.3.1 Biodistribution des particules nues

Une étude a été réalisée afin d'évaluer l'accumulation *in vivo* dans la tumeur des lipidots nus dans les 5 premières heures après injection (n = 7 souris). Une biodistribution est ensuite réalisée à 24 h après injection et le ratio tumeur / muscle est évalué. Enfin, les données *ex vivo* et *in vivo* sont comparées à 24 h après injection afin d'évaluer si il existe une différence entre les deux types de mesures. Un lot de lipidot-DiD est réalisé avec une concentration en DiD de 92 µM soit 9,2 nmol de DiD injecté par souris.

La cinétique *in vivo* jusqu'à 5 h après injection montre un signal croissant de la fluorescence au sein de la tumeur tandis que le signal dans le muscle reste constant au cours du temps. A 5 h après injection, un ratio tumeur / peau de 3,5 est obtenu ce qui est suffisant pour permettre une bonne détection (Figure 21).

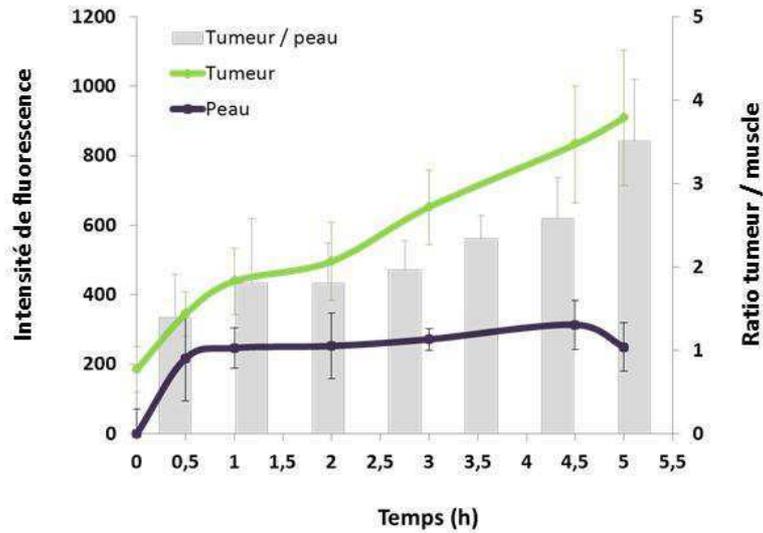


Figure IV-21 : Accumulation des lipidots dopés en DiD dans la zone tumorale des FVB implantées PyMT via l'utilisation de la Fluobeam™700.

Les biodistributions *ex vivo* à 24 h après injection montrent une accumulation dans la tumeur 9,2 fois supérieure à celle du muscle (Figure 22). La présence d'une tumeur au sein de la souris ne semble pas modifier la biodistribution des lipidots, identique à celle observée dans le Chapitre II, avec une accumulation dans le foie, les ovaires, les surrénales et à présent la tumeur.

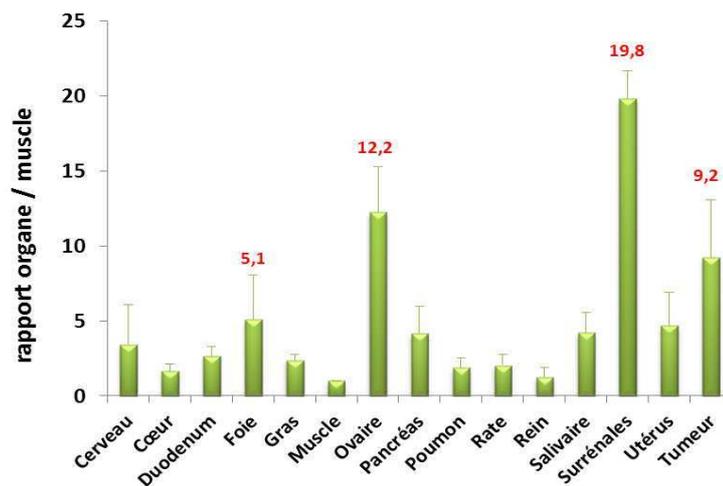


Figure IV-22 : Biodistribution 24h après injection des lipidots –DiD chez la souris FVB implantée PyMT.

Le rapport des intensités de fluorescence entre la fluorescence de la tumeur *in vivo* et la fluorescence de la tumeur est mesuré *ex vivo* 24 h après injection. Le rapport est de 1,03 avec un écart type de 0,07. A 24 h après injection, le rapport signal sur bruit est très faible (peu de fluorescence dans la peau), ce qui permet d'avoir des intensités de fluorescence identiques entre une mesure *in vivo* et *ex vivo*.

En conclusion, les lipidots dopés en DiD s'accumulent dans la tumeur via l'effet EPR dans le modèle FVB implanté PyMT et ce dès 5 h après injection avec un signal tumeur / peau d'environ 4. L'intensité de fluorescence croit jusqu'à 24 h après injection ou le rapport tumeur / peau ou tumeur / muscle atteint d'environ 9. Ces résultats indiquent que les lipidots sont de bons vecteurs d'imagerie pour détecter les zones cancéreuses par imagerie de fluorescence et ce même à des temps précoces.

C.3.2 Apport de la fonctionnalisation des lipidots

Afin d'évaluer l'apport d'un ciblage peptidique des lipidots, une étude de cinétique *in vivo* sur les 5 premières heures après injection est réalisée ainsi qu'une étude *ex vivo* à 5 h et 24 h après injection (n = 3 / groupe sauf pour le cRAD dont la biodistribution 5 h après injection n'a pas été réalisée).

Les cinétiques d'accumulation de la fluorescence *in vivo* des lipidots-cRGD et des lipidots nues pendant les 5 h suivant leur injection sont présentées Figure 23. Aucune différence n'est observée 5 h après injection, en revanche, une accumulation plus rapide est observée 3 h après injection pour les lipidots-cRGD (8,4 pour lipidot-cRGD versus 5,5 lipidot nue). Les animaux sont sacrifiés et les tumeurs prélevées 5 h après injection. Une comparaison entre les signaux observés *in vivo* et *ex vivo* est réalisée. *In vivo*, les valeurs de ratio tumeur / peau sont de $8,1 \pm 1,1$ et $6,9 \pm 0,8$ pour les lipidots-cRGD et lipidots « nues » respectivement. Concernant les données *ex vivo*, les valeurs sont $7,1 \pm 0,5$ et $4,3 \pm 1,1$ respectivement (Figure 21). L'accumulation de la lipidot-cRGD est légèrement supérieure aux deux autres formulations 5 h après injection. En revanche une augmentation de signal de 86 % est observée *in vivo* 3 h après injection. L'écart entre les données *in vivo* et *ex vivo* est

relativement faible, ce qui nous permet de confirmer que le signal de fluorescence observé dans la tumeur *in vivo* reflète la fluorescence de la tumeur dans le corps.

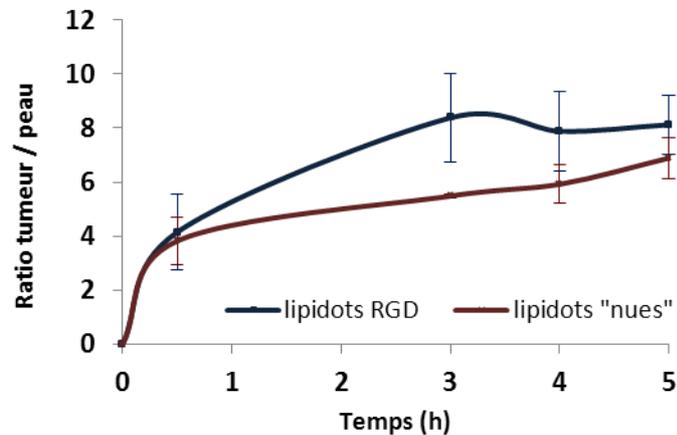


Figure IV-23 : Cinétiques d'accumulation de la fluorescence dans la tumeur dans les 5 h qui suivent l'injection.

Le signal tumeur / muscle est calculé 24 h après injection pour les nanoparticules fonctionnalisées et nues (Figure 24). Peu de différence est observée entre les lipidots nus et les nanoparticules fonctionnalisées. Ainsi, il semble que le simple effet EPR permette une accumulation importante du traceur dans la zone tumorale avec un rapport tumeur / muscle aux alentours de 15. Malgré un signal plus faible pour les nanoparticules greffées avec des peptides négatifs, il est difficile de conclure à une amélioration du ciblage tumorale par le peptide greffé sur la nanoparticule, car la nanoparticule sans aucun peptide s'accumule de la même manière dans la tumeur. Enfin l'influence de la longueur des chaînes PEG a été évaluée 24 h après injection (PEG₂₀₀₀ versus PEG₅₀₀₀). Une valeur de rapport tumeur / muscle de 15,1 a été observée pour les PEG₅₀₀₀ contre un rapport de 13,7 pour les PEG₂₀₀₀. L'incorporation de 11 % de chaîne PEG₅₀₀₀ dans la formulation ne semble donc pas changer la manière dont les lipidots s'accumulent dans la tumeur.

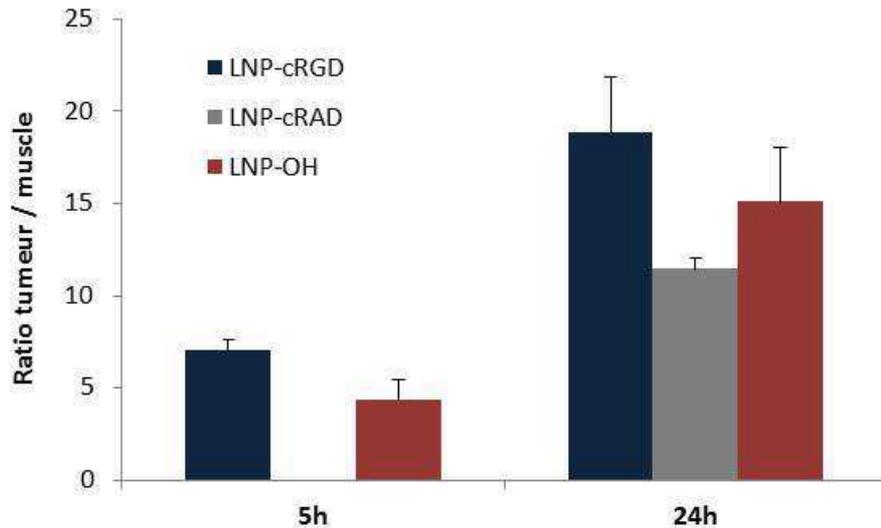


Figure IV-24 : Ratio tumeur / muscle des lipidots fonctionnalisées ou non à 5 h et 24 h après injection.

Des essais en tomographie optique 3D ont été réalisés 24 h après injection sur les lots de lipidots-cRGD et lipidots nues afin d'évaluer l'accumulation du traceur dans l'ensemble du volume tumoral et non juste en surface comme avec la Fluobeam® (avec l'aide d'A. Garofalakis). Une représentation des images d'acquisition est montrée Figure 25 pour les lipidots nues.

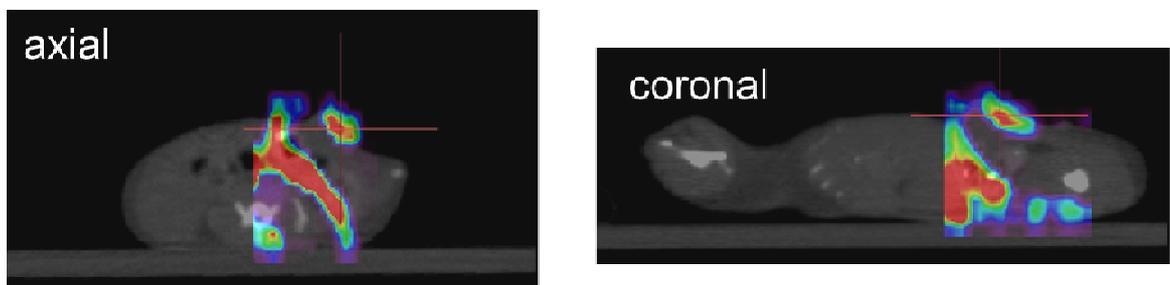


Figure 25 : Superposition des images CT et des signaux de fluorescence en position axiale et coronal.

Les résultats obtenus montrent un signal de fluorescence (unité arbitraire) dans la tumeur de $1,45 \pm 0,72$ pour la lipidot-cRGD et $1,77 \pm 0,88$ pour la lipidot nue 24 h après injection. Ces résultats confirmant que l'accumulation dans la tumeur du système greffé avec le peptide cRGD ou la lipidot nue sont identiques.

C.4 Quantification *ex vivo* et histologie

Afin d'évaluer s'il existe une différence de localisation à l'échelle tissulaire du DiD entre lipidots fonctionnalisés et lipidots nues, des coupes histologiques sont réalisées 24 h après injection suivant le protocole standard (Chapitre VI, Partie expérimentale C). Le marqueur du noyau, DAPI, est ajouté, puis les lames sont fixées et observées au microscope (Figure 26). Aucune distribution particulière n'est observée au sein de la tumeur pour les prélèvements à 24 h après injection. La fluorescence est répartie dans les cellules au sein de la tumeur sans qu'on puisse repérer une localisation définie spécifique. Une densité de signal légèrement plus élevée est observée pour la lipidot fonctionnalisée. Pour les lipidots « nues », quelques points fluorescents sont observés sur le pourtour des cellules, ce qui pourrait suggérer que les lipidots sont moins facilement internalisés lorsqu'elles ne portent pas de séquence RGD à leur surface.

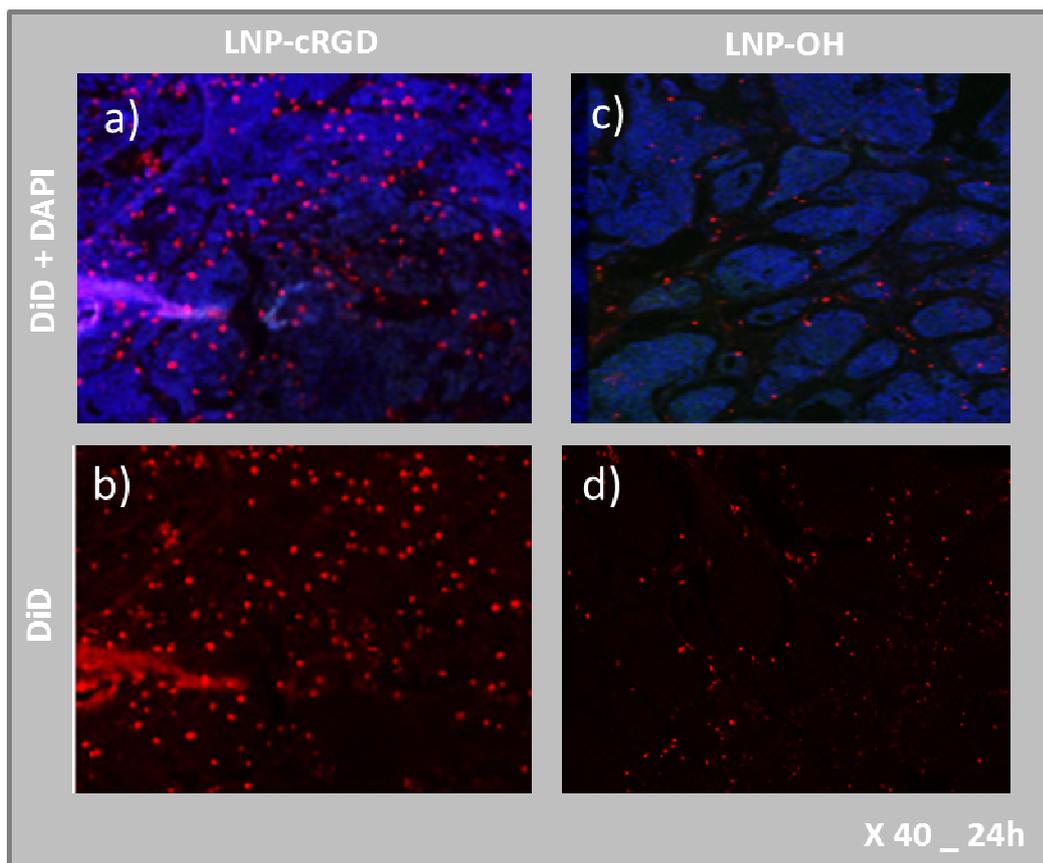


Figure IV-26 : Observations histologiques du DiD dans les tumeurs avec la représentation du DiD + DAPI et DiD seul pour les lipidots-cRGD (a) (b), pour les lipidots nues (c) (d).

C.5 Discussion

Ce chapitre a mis en évidence l'accumulation des lipidots nus grâce à l'effet EPR dans plusieurs modèles tumoraux obtenus à partir des lignées cellulaires originales de cancers mammaires, glioblastome ou rénal. Le modèle FVB implanté PyMT, cancer du sein murin, a été retenu pour sa capacité à créer des néovaisseaux, sa croissance rapide, son faible coût, et enfin car les lipidots s'accumulent rapidement dans ce modèle et ce même à des temps courts (Figure 26).

Afin d'évaluer le ciblage actif des lipidots et l'influence de la présentation de la séquence RGD aux intégrines, différents modes de présentation du peptide à la tumeur ont été étudiés : **(1) la présentation monomérique**, dans laquelle le peptide est administré tel quel, couplé à un fluorophore qui a mis en évidence une absence de signal dans la tumeur (valeurs faibles, restant majoritairement du bruit de fond) que ce soit à 5 h ou 24 h après injection; **(2) la présentation tétramérique**, en utilisant un composé commercial, l'Angiostamp®700 (Fluoptics), qui couple 4 cRGD sur un support RAFT. Le ratio obtenu 24 h après injection est de 11,4, plus faible qu'avec les lipidots, mais il est à préciser que seul 50 µM de solution ont été injectés contre 100 µM conseillés par le fournisseur pour une acquisition 24 h après injection. **(3) la présentation « multiple »** en greffant le cRGD sur le support lipidot. La fonctionnalisation des lipidots avec du cRGD par rapport aux lipidots nus n'entraîne pas de réelle différence à des temps longs (ratio tumeur / muscle de 18,8 pour les lipidots-cRGD versus 15,1 pour les lipidots nus, 24 h après injection). Dans notre étude, un rapport tumeur / muscle de 15 a été trouvé 24 h après injection. Jin et al avait quant à eux trouvé ce même ratio (15,9) à 4 h après injection dans un modèle d'accumulation du RAFT-RGD dans un cancer rénal²²⁷. Par rapport au peptide seul, l'encapsulation dans des lipidots modifie la biodistribution du peptide pour laquelle aucune accumulation rénale n'est observée mais une élimination hépatique.

En revanche à des temps plus courts (3 h après injection), une augmentation de signal de 86 % a été observée avec les lipidots fonctionnalisées. Plusieurs équipes réalisent leurs essais de ciblage sur des temps courts : 60 minutes²²⁹, 2 h²²⁶ ou au plus 4 h²²⁷ après injection. L'accumulation à 5 h après injection avec l'Angiostamp® montre un rapport tumeur / muscle identique à celui des lipidots-cRGD, le mode de présentation du cRGD, sous forme tétramérique ou multimérique (lipidots) ne semble alors pas avoir de conséquence sur l'accumulation *in vivo* de fluorescence. De plus, le temps de $\frac{1}{2}$ vie plasmatique des

lipidots étant de 30 minutes ce qui est relativement court et permet une extravasation rapide vers les organes y compris vers la tumeur²⁴⁰.

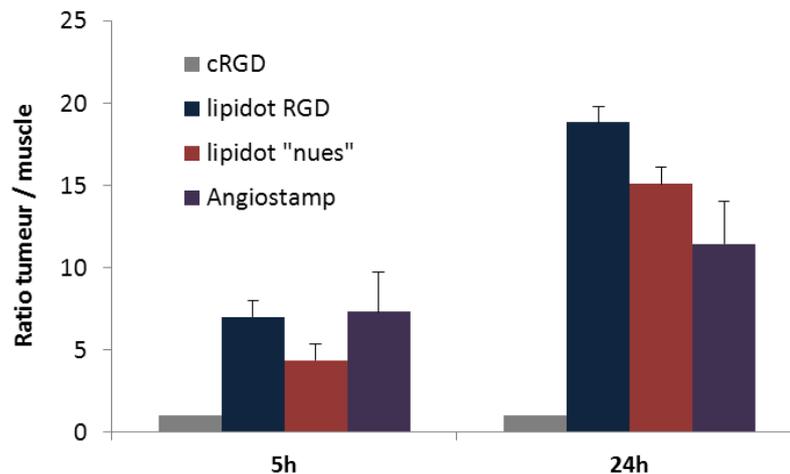


Figure IV-26 : Ratio tumeur / muscle des différents traceurs à 5 h et 24 h après injection chez la souris FVB implantée PyMT

Une étude histologique 24 h après injection met en évidence une répartition diffuse du signal au sein du tissu cancéreux avec les lipidots-cRGD tandis que les lipidots nues semblent présents dans les espaces intercellulaires.

Le ciblage préférentiel des lipidots fonctionnalisées 3 h après injection laisse la porte ouverte pour un vecteur nanoparticulaire tri modal PET-DiD-cRGD. En effet, la présence du cRGD va préférentiellement, à des temps courts compatibles avec le PET, amener la nanoparticule vers la tumeur de façon plus efficace que les particules nues.

D. Conclusion sur le ciblage des Lipidots pour de la vectorisation tumorale

Ce chapitre a mis en évidence que les lipidots sont de bons vecteurs pour une accumulation tumorale que ce soit par accumulation passive via l'effet EPR, ou par une accumulation préférentielle via la fonctionnalisation de peptide de ciblage à la surface des lipidots. Le greffage de plus de 1000 peptides RGD via une réaction thiol – maléimide sur les PEG présents à la surface de la nanoparticule permet une accumulation accrue dans la tumeur dans un modèle surexprimant les récepteurs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Chapitre V :

Lipidots et dérégulation hormonale

Ce chapitre expose les potentialités offertes par l'affinité inattendue des lipidots pour les organes stéroïdiens, et plus particulièrement le ciblage ovarien, pour la délivrance d'hormones stéroïdiennes. En effet, la plupart des hormones stéroïdiennes, qui ont toutes comme précurseur le cholestérol, présentent une lipophilie importante, ce qui pourrait favoriser leur encapsulation dans les lipidots avec de bons rendements. Comme il a été montré dans le Chapitre II, nous avons observé une affinité particulière des nanoparticules pour les organes stéroïdiens et plus particulièrement pour les zones de synthèse d'hormones stéroïdiennes lipophiles. Par exemple, une forte affinité des lipidots pour le corps jaune ovarien, lieu de synthèse de la progestérone, a été observée. En première intention nous avons étudié la capacité des lipidots à vectoriser les hormones ovariennes (et non surrénaliennes).

Le contrôle de la procréation et le traitement hormonal substitutif sont les deux domaines pharmacologiques majeurs d'application de la délivrance d'hormones stéroïdiennes, avec la chimiothérapie adjuvante des cancers hormono-dépendants (sein, ovaire, prostate) dont le ciblage tumoral a été présenté Chapitre IV.

Dans une première partie, un bref état de l'art sur l'encapsulation d'œstradiol et de progestérone dans des nanoparticules est présenté. Dans un second temps, nous décrivons les essais d'encapsulation dans les lipidots de l'œstradiol utilisé pour le traitement hormonal substitutif et de l'éthynil œstradiol utilisé pour le contrôle de la procréation, la stabilité des formulations obtenues ainsi que la cinétique de dissolution.

A. Nanoparticules et thérapie hormonale

Cette partie vise à rappeler quelques principes fondamentaux concernant les hormones ovariennes et leurs dérivés, ainsi que leur action dans l'organisme. Les deux principaux traitements hormonaux utilisés actuellement en clinique, à savoir la contraception et le traitement hormonal substitutif, seront décrits puis un bref état de l'art sur l'encapsulation d'hormones dans des nanoparticules ou dans d'autres formes galéniques sera présenté.

A.1 Les hormones ovariennes

La synthèse des hormones stéroïdiennes se fait dans le foie et dans les glandes surrénales et dans les ovaires chez la femme, les testicules chez l'homme. Les hormones sécrétées au niveau des organes stéroïdiens reproducteurs sont régulées par les hormones hypophysaires : la LH (luteinizing hormone en anglais) et la FSH (Follicle-stimulating hormone en anglais), elles même régulées en amont par la LH-RH / GnRH (Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone en anglais / Gonadotropin-Releasing Hormone en anglais). Les hormones stéroïdiennes synthétisées par les glandes surrénales sont quant à elles régulées par l'ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone en anglais).

Les deux principales gonado-hormones ovariennes appartiennent à la famille des œstrogènes dont le chef de file est l'œstradiol, et à la famille des progestérones. Les structures chimiques de l'œstradiol et de la progestérone sont présentées Figure 1.

L'œstradiol joue un rôle dans le développement et le maintien des organes sexuels féminins et dans l'induction de la ponte ovulaire. Il a également une action dans le métabolisme glucidique en augmentant les concentrations en cholestérol HDL (High Density Lipoprotein). L'œstradiol stimule l'activité ostéoblastique et également certains facteurs de la coagulation. La progestérone quant à elle, favorise la nidation de l'œuf fécondé, maintient la relaxation utérine pendant la grossesse et possède une action anti-ovulatoire par inhibition du pic de LH-FSH au cours du cycle.

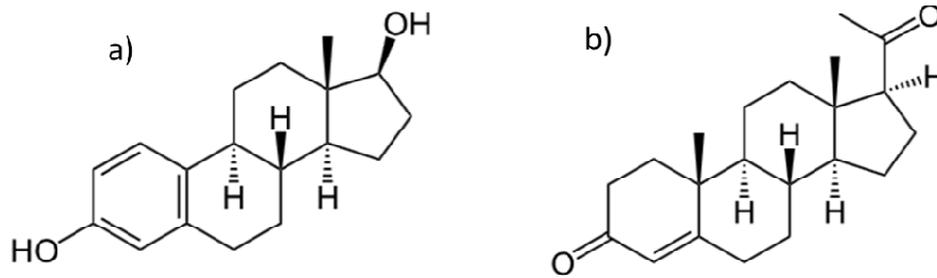


Figure V-1 : Structure chimique de a) l'œstradiol et de b) la progestérone

Les deux principaux traitements hormonaux à base de gonadostéroïdes féminins sont les pilules contraceptives et le traitement hormonal post-ménopause.

A.2 Les traitements hormonaux

Le contrôle de la procréation est basé sur l'administration soit d'une hormone progestative soit d'une hormone oestrogénique soit d'une combinaison des deux. Afin de pallier à la faible biodisponibilité de l'œstradiol, un dérivé synthétique, l'éthynil œstradiol a été développé et est à ce jour le composé le plus utilisé en contraception. Il permet d'améliorer la biodisponibilité *in vivo* de l'œstradiol et son temps de présence dans l'organisme. En effet, l'œstradiol a une $\frac{1}{2}$ vie plasmatique de 13 h contre 36 h pour l'éthynil œstradiol. Les deux composés possèdent une excrétion rénale. La comparaison des deux structures est présentée Figure 2:

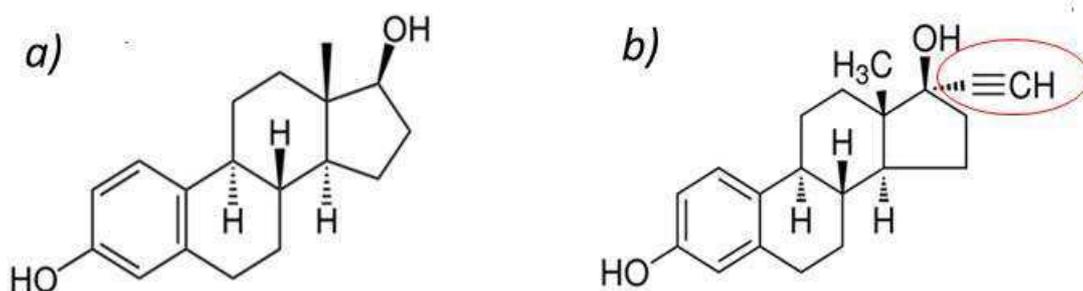


Figure V-2 : Structure chimique de a) l'œstradiol et b) l'éthynil œstradiol

La forme galénique la plus utilisée à ce jour pour la contraception est la voie orale, mais des problèmes de biodisponibilité et d'absorption des hormones ont entraîné le développement de patchs transdermiques puis d'autres formes comme des gels, implants, anneaux. Des formes à libération prolongée commencent à être développées afin de limiter les « oublis de pilules ». Des modes de délivrance plus locales par patch ou anneaux vaginaux par exemple sont également recherchés afin d'obtenir une action ciblée des hormones sur l'appareil reproducteur féminin en évitant l'effet de premier passage hépatique. Cela permet de réduire les doses d'hormones administrées et de limiter les effets secondaires.

A partir de 45 à 50 ans, la femme subit un bouleversement hormonal appelé ménopause correspondant physiologiquement à la fin des règles, la dégénérescence des follicules, et l'augmentation du taux FSH. Ces changements physiologiques sont souvent accompagnés d'effets indésirables comme des bouffées de chaleur, des épisodes dépressifs, des sueurs nocturnes, un dessèchement vaginal, mais aussi des problèmes vasomoteurs, de l'incontinence ou encore de l'ostéoporose. Ces symptômes sont très variables d'une femme à l'autre. Afin de pallier à ces effets secondaires dus à la baisse puis à la disparition d'hormones œstrogéniques, et notamment aux problèmes d'ostéoporose, un traitement hormonal substitutif (THS) a été développé. Le THS de référence est aux Etats-Unis le CEE (Conjugated Equine Estrogen) qui est un mélange de différents œstrogènes administrés sous forme orale, et en Europe, le 17- β -œstradiol, administré par voie orale, transdermique (patch), percutanée (gel), vaginale (application de crème ou d'anneaux) ou encore intranasale (spray aérosol). Les autorités de santé américaines ont aussi autorisé la progestérone pour un traitement à court terme des femmes en préménopause avec aménorrhée, mais également pour prévenir le cancer utérin. Il est à noter que cette hormone a une absorption très faible après administration orale, et possède un passage hépatique très important. Les recherches menées pour réduire les problèmes de biodisponibilité de la progestérone ont abouti au développement de l'acétate de médroxyprogestérone mais sa toxicité à long terme n'est pas bien connue à ce jour pour cette molécule²⁴¹.

Différentes études ont montré les effets bénéfiques de ce traitement hormonal substitutif sur les syndromes postménopause, mais des effets secondaires ont aussi été mis en avant, avec notamment un risque augmenté du cancer du sein et du cancer de

l'endomètre²⁴² (études : WHI : Women Health's Initiative 1 et 2 and HERS : Heart and Estrogen / progestin Replacement Study). Malgré tout, à ce jour, il n'existe pas de composé pour remplacer le traitement hormonal substitutif. Il faut donc optimiser les formulations de progestérone et d'œstrogènes pour réduire les effets secondaires et obtenir une meilleure tolérance des traitements par les patients. Le traitement hormonal post-ménopause représente à ce jour la majeure partie du développement des formulations à base d'hormones dû aux challenges scientifiques qui sont encore à surmonter et au grand nombre de prescriptions faites.

Dans le paragraphe suivant, nous ferons un bref état de l'art sur l'encapsulation de l'œstradiol ou de la progestérone dans des formulations à base de nanoparticules ou dans des formes gels.

A.3 Délivrance hormonale

Peu d'équipes académiques semblent travailler sur le sujet de l'encapsulation d'hormones stéroïdiennes dans des nanoparticules. Beaucoup de publications sont trouvées sur la progestérone, non pas dans un but de délivrance hormonale mais uniquement dans le but d'utiliser cette hormone comme molécule d'étude modèle de forte lipophilie. L'encapsulation d'œstradiol a été étudiée avec quelques travaux s'intéressant au rôle qu'il pourrait jouer pour lutter contre la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, quelques formulations de nanoparticules de polymères²⁴³⁻²⁴⁸ encapsulant l'œstradiol ont été décrites avec pour objectif d'améliorer la biodisponibilité de l'hormone ou pour la délivrer dans le cerveau afin de traiter la maladie d'Alzheimer. En effet, des nanoparticules à base de PLGA (acide poly-glycolique) recouvertes de Tween 80 ont été synthétisées pour de l'administration d'œstradiol par voie orale. Ces nanoparticules ont été testées chez un modèle murin d'Alzheimer dans des animaux ovariectomisés, permettant de mimer les conditions de post-ménopause. Plus la couche de Tween 80 était importante (1 à 5 % en masse), plus les nanoparticules atteignaient le cerveau. A dose égale en œstradiol, le même pourcentage d'hormone était retrouvé au niveau du cerveau, que ce soit avec la forme libre injectée par voie intra musculaire ou avec la forme nanoparticule administrée par voie orale ; cela laisse présager de futures perspectives concernant le développement de

nanoparticules pour l'administration orale d'œstrogènes²⁴⁴. De l'œstradiol a également été encapsulé dans des nanoparticules de chitosan (270 nm de diamètre, potentiel zêta de 25 mV, 64 % d'encapsulation) destinées à être administrées par voie nasale dans le but d'atteindre le fluide cérébrospinal. L'administration par voie nasale, en comparaison à la voie intra veineuse du produit libre, montre un taux plasmatique d'œstradiol plus faible avec la forme nanoparticulaire mais un taux dans le fluide cérébrospinal plus élevé (2,3 fois plus)²⁰⁶.

La progestérone quant à elle, est utilisée dans des **formulations polymériques**, principalement pour son caractère très hydrophobe qui lui donne le rôle de molécule modèle.

De la progestérone, utilisée comme drogue modèle, a été encapsulée à 70 % dans des nanoparticules polymériques à base de PLA – PEG – PLA, de diamètre 335 nm. Des essais de relargage en milieu aqueux, par méthode de dialyse, montrent que 55 % de la progestérone sont relargués après 8 h²⁴⁷. Du valérate de 17- β -œstradiol dissout dans de l'huile d'olive a été encapsulé dans des micelles polymériques à base de PEG, d'environ 200 nm de diamètre. Des essais de relargage montrent que 40 % d'œstradiol est présent dans le bain à 48 h pour un faible taux de dopage en hormone (1 % en masse) et 62 % pour un taux élevé (3,6 %). Le plateau est atteint pour les particules hautement dopées à 72 h (100 % d'hormone relarguée) et à 125 h pour celles faiblement dopées (80 % d'hormone relarguée)²⁴⁸.

Des formulations à base de **lipides** ont également été décrites^{249-251 252, 253}. Du 17- β -œstradiol est encapsulé (1 % en masse) dans des solutions micellaires à base de lécithine et de triglycérides avec un rendement d'encapsulation de 97 %. Dans des tests de relargage, il est observé, à dose identique, que la forme nanoparticulaire présentait un relargage plus lent que la solution huileuse. De plus, le relargage de l'œstradiol hors des nanoparticules est plus rapide à 37 °C par rapport à 20 °C (diffusion accélérée dû à un cœur devenu plus liquide avec l'augmentation de température)²⁵².

De la progestérone a été encapsulée (rendement d'encapsulation de 70 %) dans des liposphères composées de triglycérides et de monoglycérides (cœur solide). Avec ce système, 63 % de progestérone est relarguée dans les 8 premières heures en milieu aqueux (quantification par la méthode de dialyse)²⁵³.

De la progestérone a également été encapsulée dans des NLC (nanoparticules lipidiques structurées) composées de monostéarine et d'acide stéarique comme lipides solides et, d'acide oléique comme lipide liquide (diamètre de 200 nm, environ - 40 mV de potentiel zêta, environ 65 % d'encapsulation). Le % de relargage est étudié par la méthode de dialyse (volume : 60 mL), en dosant le bain par CLHP (chromatographie liquide à haute pression). Avec une forme dispersée de la progestérone, 100 % est relargué après 7 h. Avec la forme nanoparticulaire, environ 78 % à 10 h et 80 % à 24 h sont retrouvées dans le bain. Si le taux de lipide liquide augmente, un relargage plus rapide est observé (avec 0 % d'acide oléique, 40 % de relargué à 8 h contre 60 % avec 20 % d'acide oléique au même temps). L'ajout de PEG à la surface de la nanoparticule accélère également le relargage (78 % à 8 h versus 50 % avec une nanoparticule sans PEG)²⁴⁹. Enfin, plus la nanoparticule est dopée en progestérone, plus le relargage est rapide (45 % relargué à 8 h avec 3,7 % en masse de PEG versus 70 % relargué avec 11,57 % en masse de progestérone)²⁴⁹.

En conclusion, de nombreux paramètres influencent l'efficacité d'encapsulation des hormones dans les nanoparticules lipidiques, comme la nature des lipides utilisés, la température, le taux de dopage, la présence d'une coquille PEGylée.

Une formulation de gel à base de lipides et de progestérone²⁵⁴ a également été décrite. L'utilisation du gel permet de ralentir la diffusion de la progestérone dans le cas d'injection intramusculaire pour favoriser la nidation dans les traitements d'aide à la procréation.

A la vue de (1) la biodistribution spécifique des lipidots vers les ovaires, (2) des besoins réels de nouvelles formulations dans les traitements hormonaux afin d'en limiter les effets secondaires, (3) de la nature lipophile des hormones compatibles avec une encapsulation dans les lipidots, nous avons étudié la faisabilité d'encapsulation de

l'œstradiol et l'éthinyl œstradiol pour représenter respectivement une alternative aux traitements actuels du THS et de la contraception.

B. Encapsulation d'hormones stéroïdiennes

Des essais de formulations de l'œstradiol et de l'éthinyl œstradiol ont été réalisés avec des lipidots de différentes compositions. Ces deux hormones ont été sélectionnées pour représenter respectivement une molécule pour le traitement hormonal substitutif et pour la contraception.

Le rendement d'encapsulation des hormones a été évalué par CLHP après leur extraction hors de la nanoparticule, suivant une méthode analytique décrite dans la Pharmacopée Européenne (Chapitre VI, protocole expérimental A). Les quantités d'hormones relarguées au cours du temps à température ambiante et à température corporelle ont également été dosées.

B.1 Encapsulation d'œstradiol et d'éthinyl œstradiol

La dose d'hormone retrouvée dans la plupart des prescriptions est de l'ordre de 35 µg / jour. Dans l'hypothèse éventuelle d'une encapsulation non totale, deux doses sont testées dans une formulation de lipidots à une concentration en lipides de 100 mg / mL après sonication. Une dose « basse » en hormone correspondant à environ 35 µg pour 7 mg de lipides (Formulations A et C) et une dose « haute » en hormone correspondant à environ 70 µg pour 7 mg de lipides (Formulations B et D). Une formulation ayant un cœur composé de 37,5 % de Dynasan® 114, 37,5 % de cire et 25 % d'huile (Formulation E) est réalisée avec une dose en éthinyl œstradiol de 70 µg / 7 mg de et enfin, une dernière formulation de lipidots plus concentrée en lipides avec une dose en éthinyl œstradiol de 70 µg pour 14 mg de lipides est également préparée (Formulation F).

Différentes formulations de lipidots avec œstradiol ou éthinyl œstradiol ont été synthétisées et une étude de dose et de dissolution ont été réalisées sur les deux formules les plus prometteuses. Concernant les nanoparticules, la composition des formulations est résumée Tableau 1 :

Formulation	Hormone	Dose théorique µg / 150 µL	Composition Cœur	Composition Coquille
A	Œstradiol	35	75 % cire [68 mg] / 25 % huile [23 mg]	Lipoid S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
B	Œstradiol	70	75 % cire [68 mg] / 25 % huile [23 mg]	Lipoid S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
C	Ethynil œstradiol	35	75 % cire [68 mg] / 25 % huile [23 mg]	Lipoid S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
D	Ethynil œstradiol	70	75 % cire [68 mg] / 25 % huile [23 mg]	Lipoid S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
E	Ethynil œstradiol	70	37,5 % cire [34 mg] / 25 % huile [23 mg] 37,5 % Dynasan [34 mg]	Lipoid S75 [17 mg] / Myrj [92 mg]
F	Ethynil œstradiol	70	75 % cire [255 mg] / 25 % huile [85 mg]	Lipoid S75 [65 mg] / Myrj [345 mg]

Tableau V-1 : Composition des différentes formulations de lipidots œstradiol ou d'éthynil œstradiol testées.

L'hormone, préalablement dissoute dans de l'éthanol, est ajoutée dans le premix huileux lors de la fabrication et le solvant est évaporé sous argon avant la sonication. La particule est purifiée par dialyse, dont le bain est dosé par CLHP, puis stérilisée sur filtre 0,22 µm suivant le protocole standard habituel (Chapitre VI, Protocole Expérimental A). Aucun problème de faisabilité technique n'a été observé au cours de la fabrication. Les données physico-chimiques et les rendements d'encapsulation mesurée par CLHP sont regroupés Tableau 2 pour l'œstradiol et Tableau 3 pour l'éthynil œstradiol:

Formulation	Taille (nm)	PDI	Potentiel Zeta (mV)	Rendement d'encapsulation (%)
A	53 ± 0,15	0,19	- 7,3	103 ± 5,1
B	55 ± 1,8	0,18	- 6,4	103 ± 5,1

Tableau V-2 : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des différents lots dopés en œstradiol.

Formulation	Taille (nm)	PDI	Potentiel Zeta (mV)	Rendement d'encapsulation (%)
C	56 ± 0,2	0,19	- 6,3	86 ± 4,3
D	52 ± 1,4	0,16	- 5,1	100 ± 5,0
E	63 ± 2,5	0,17	- 4,9	86 ± 4,3
F	51 ± 2,4	0,12	- 7,1	100 ± 5,0

Tableau V-3: Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des différents lots dopés en éthinil œstradiol.

Aucune différence physico-chimique n'est observée entre les lots hormis une légère augmentation de la taille des particules pour la formulation E contenant du Dynasan®, déjà observée à plusieurs reprises pour ce type de cœur lipidique (Chapitre III). Le rendement d'encapsulation pour l'œstradiol est de 100 %. Pour l'éthinil œstradiol, il est compris entre 87 % et 100 %. Le potentiel zêta reste inchangé, à savoir compris entre -2 mV et -6 mV. Ces lots sont suivis en taille pendant deux mois (Figures 3 et 4).

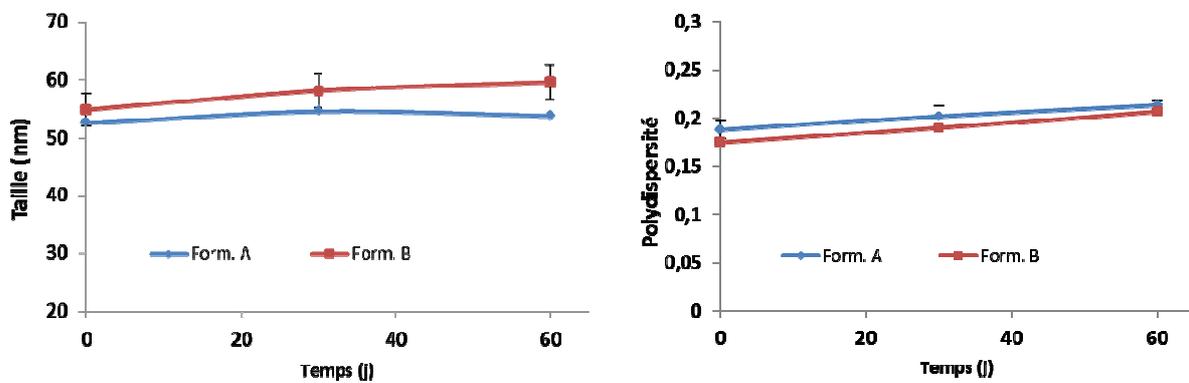


Figure V-3: Stabilité physico-chimique sur 2 mois des différentes formulations dopées en œstradiol.

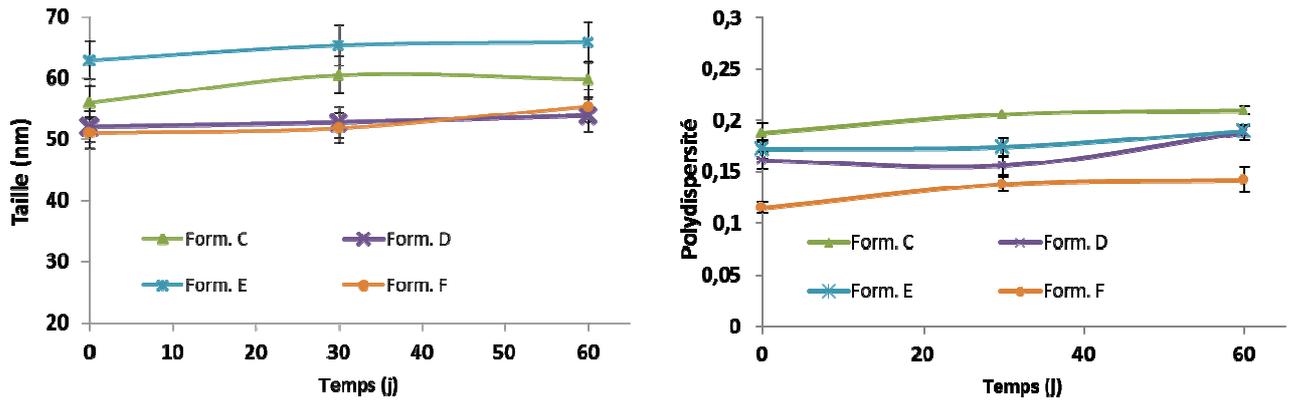


Figure V-4: Stabilité physico-chimique sur 2 mois des différentes formulations dopées en éthinil œstradiol.

Afin d'évaluer si l'hormone a tendance à sortir de la nanoparticule pendant le stockage à +4°C, 1 mois et 2 mois après formulation, le lot est à nouveau dialysé et l'hormone extraite des lipidots (Chapitre VI, protocole expérimental A) pour être dosée par CLHP (Figures 5). Les lots dopés en œstradiol montrent une bonne stabilité dans le temps avec néanmoins une diminution du dosage pour la formulation A (82 % à 30 j, 73 % à 60 j) qui pourrait être due à une fuite du produit (Figure 5). La Formulation B quant à elle présente un relargage plus lent (5 % à 30 j, 9 % à 60 j) pouvant être dû à un dopage plus élevé stabilisant davantage l'hormone au sein de la nanoparticule. Pour les lipidots dopées en éthinil œstradiol, une perte d'environ 10 % a été observée 2 mois après fabrication hormis pour la nanoparticule dont la concentration en lipide est supérieure (dose d'hormone de 70 µg / 14 mg de lipides).

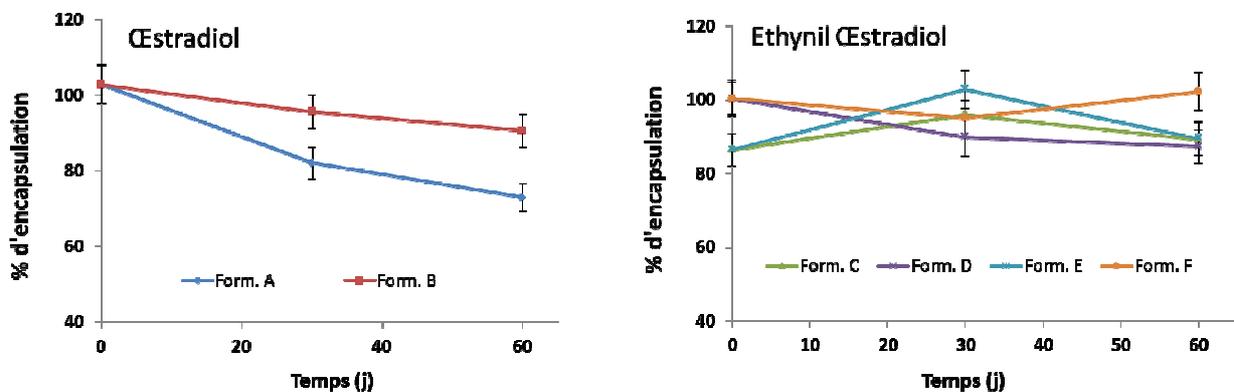


Figure V-5: Evaluation du relargage sur 60 jours des hormones hors des lipidots, stockage à 4°C.

D'une manière générale, la faisabilité technique de l'encapsulation de l'œstradiol et de l'éthynil œstradiol dans les lipidots est validée. La présence d'hormone ne modifie ni la taille ni la polydispersité des nanoparticules. Leur encapsulation est relativement stable dans le temps sur 60 jours (perte maximum de 25 % pour un lot d'œstradiol, 10 % pour le lot d'éthynil œstradiol) sachant que les dispersions sont stockées de manière diluée (50 mg / mL de lipides, ce qui n'est pas le cas le plus favorable). Les lots concentrés en lipides ou présentant un dopage en hormone plus élevé (Formulations B, D, E et F) semblent présenter un relargage plus faible lors du stockage. De plus, l'éthynil œstradiol, œstradiol modifié et légèrement plus lipophile, semble être plus stable dans les lipidots.

B.2 Efficacité d'extraction

La justesse de la dose dans un traitement médicamenteux est très importante et tout particulièrement dans le traitement hormonal dont les doses administrées sont de l'ordre du microgramme. Dans ce paragraphe, nous allons vérifier la justesse de la dose encapsulée. Nous nous concentrerons sur les formulations A, C, E et F dans un premier temps puis sur les formulations A et C, qui sont les deux formulations « standards » à être développées. Les doses théoriques encapsulées sont listées Tableau 4 :

Formulations	Hormone	Quantité théorique d'hormones (μg) / 7 mg de lipides (hors formulation F, pour 14 mg de lipides)
A	Œstradiol	$37,0 \pm 4,4^*$
C	Ethynil œstradiol	$35,0 \pm 4,2$
E	Ethynil œstradiol	$70,0 \pm 8,4$
F	Ethynil œstradiol	$70,0 \pm 8,4$

Tableau V-4 : Quantité théorique encapsulée en œstradiol ou éthynil œstradiol dans les différentes formulations. *Les écarts types correspondent à l'erreur sur la pesée (précision à ± 1 mg soit 10 % d'incertitude) et l'erreur sur le pipetage (0,8 % pour 100 μL) soit un total de 12 % d'incertitude par lot.

Les doses expérimentales trouvées dans les formulations après synthèse, purification, puis destruction des nanoparticules et extraction des hormones suivant le protocole expérimental détaillé Chapitre VI, Partie A et sont comparées à la dose théorique incorporée (Tableau 5) :

Formulations	Hormone	Dosage expérimental	Dose théorique	Ecart à la dose
A	Œstradiol	40,5 ± 8,8**	37,0 ± 4,4*	< 10 %
C	Ethynil œstradiol	33,4 ± 7,3	35,0 ± 4,2	< 10 %
E	Ethynil œstradiol	61,4 ± 16,8	70,0 ± 8,4	> 20 %
F	Ethynil œstradiol	56,5 ± 16,8	70,0 ± 8,4	> 20 %

Tableau V-5 : Comparaison des doses théoriques et des doses expérimentales retrouvées après extraction des hormones hors des lipidots. *Les écarts types correspondent à l'erreur sur la pesée (précision à ± 1 mg soit 10 % d'incertitude) et l'erreur sur le pipetage (0,8 % pour 100 µL) soit un total de 12 % d'incertitude par lot. ** L'erreur sur le dosage par CLHP est également ajoutée (10 % d'erreur sur le dosage).

Les formulations A et C (cœur composé de 75 % de cire et 25 % d'huile) ont une valeur de dose s'écartant de la valeur théorique inférieure à 10 %, ce qui en fait des formulations de référence. En revanche, les formulations E et F possèdent un écart de dose plus important dont le maximum peut aller jusqu'à 27 %. Cet écart peut être dû soit aux doses plus importantes incorporées (limite d'encapsulation) ou bien aux changements de formulations (présence de Dynasan® ou d'une quantité plus importante de lipides) qui n'améliorent pas le rendement d'encapsulation. Une autre hypothèse pour la formulation F, qui comportait un bon rendement d'encapsulation, peut être une extraction non totale d'hormone après destruction des nanoparticules due à une présence importante de lipides.

Un suivi dans le temps de la stabilité de la dose pour les formulations A et C est réalisé sur 60 jours et les graphiques sont présentés Figure 6.

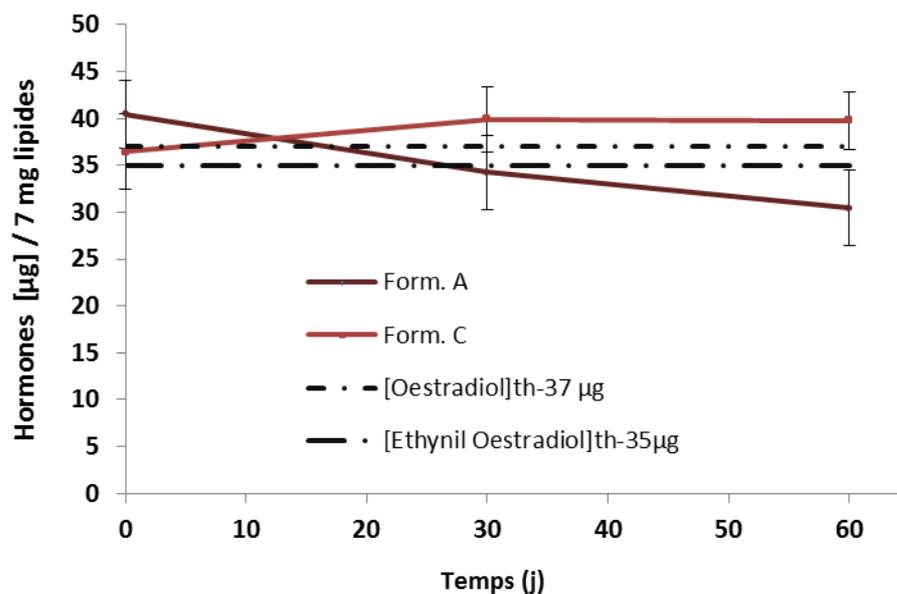


Figure V-6 : Juste de la dose au cours du temps pour les formulations A, dopée en œstradiol et C dopée en éthynil œstradiol, en comparaison avec la dose théorique incorporée. (les écarts types correspondent à l'erreur sur la mesure CLHP).

La justesse de la dose est observée dans les deux premiers mois après la synthèse (arrêt du suivi). Une légère baisse est observée pour le lot dopé en œstradiol, comme observé lors de l'étude de stabilité (Figure 5). Ces formulations néanmoins paraissant prometteuses pour la délivrance d'hormones, des essais de dissolution dans du PBS sont réalisés à 25 °C et à 37°C.

B.3 Relargage hormonal dans un milieu aqueux

Les relargages de l'œstradiol et de l'éthynil œstradiol à partir des formulations A et C en milieu aqueux à température ambiante et à température corporelle sont étudiés (Tableau 5). Les formulations A et C ont été retenues dû à la justesse de la dose retrouvée avec le protocole de dosage mis en place pour cette étude. Après synthèse, purification et caractérisation des lots, une quantité connue de nanoparticules (500 µL à 50 mg / mL de lipides, 120 µg d'hormones totales) est placée dans des boîtes de dialyse (Dialyser QuickSep, Chapitre VI, protocole expérimental A) séparées de l'environnement aqueux par une membrane de dialyse de seuil de coupure 12 – 14 kDa. Le bain de dialyse, de 50 mL, est préservé de l'évaporation par un bouchon. A chaque prélèvement du bain pour dosage de la quantité d'hormone relarguée, la quantité équivalente de PBS est ajoutée au volume de dissolution afin de conserver un volume constant (Chapitre VI, protocole expérimental A).

Les Figure 7 (pour l'œstradiol) et 8 (pour l'éthynil œstradiol) représentent **(1)** les cinétiques de relargage dans le bain de chaque composé à température ambiante et à température corporelle sur 72 h (3 jours), **(2)** le % d'hormone restant dans la nanoparticule jusqu'à 48 h (dosage après extraction de la particule), pour les essais à température ambiante, et **(3)** la somme de ce qui est retrouvé dans le bain et dans la nanoparticule. Les essais ont été conduits jusqu'à 600 h (25 jours) mais le plateau obtenu entre 48 h et 72 h reste inchangé au cours du temps.

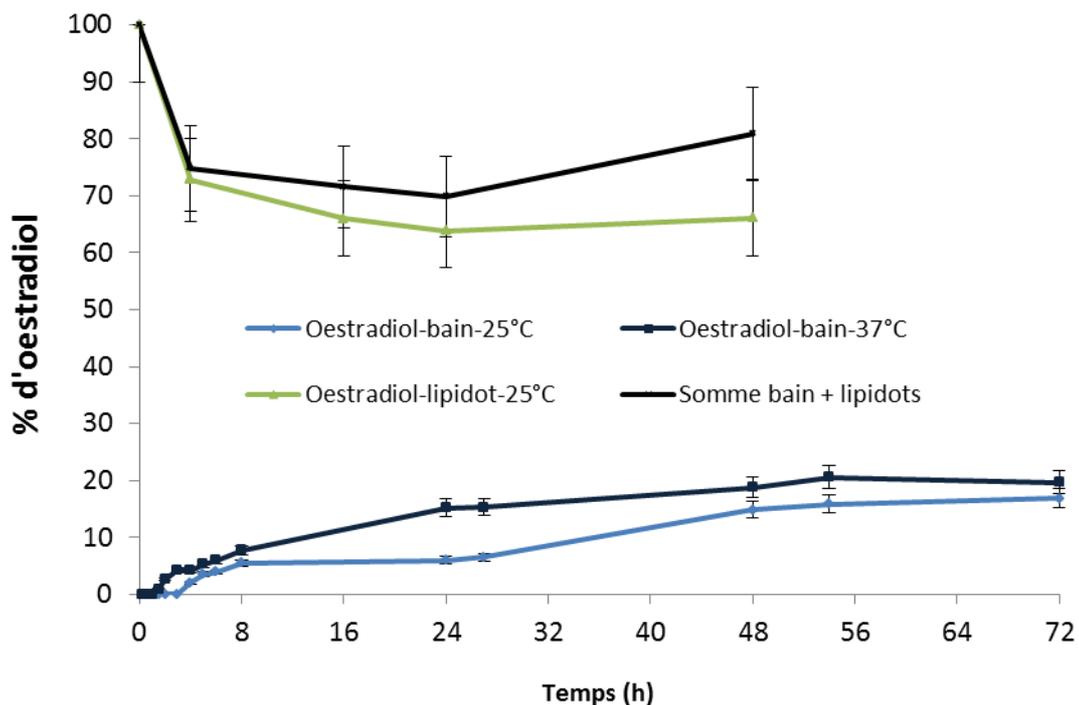


Figure V-7 : Cinétiques de relargage de l'œstradiol dans un milieu aqueux à 25°C ou 37°C.

A 24 h, 6 % de la dose en œstradiol est retrouvée dans le bain à 25 °C et 15 % à 37 °C. Une cassure dans la cinétique est observée vers 48 h avec un plateau constant jusqu'à 600 h (25 jours, fin de l'expérience). A ce temps, il est retrouvé dans le bain 18 % de la dose d'œstradiol à température ambiante et 24 % de la dose d'œstradiol à 37 °C. En ce qui concerne le dosage des lipidots, dès 4 h après la mise en dialyse, 75 % de la dose initialement incorporée dans les lipidots est retrouvée, diminuant jusqu'à 67 % à 48 h après mise en dialyse. Le dosage du bain ne présente pourtant pas une dose d'œstradiol élevée, et le total des dosages des lipidots et du bain n'atteint pas les 100 % (maximum de 81 %).

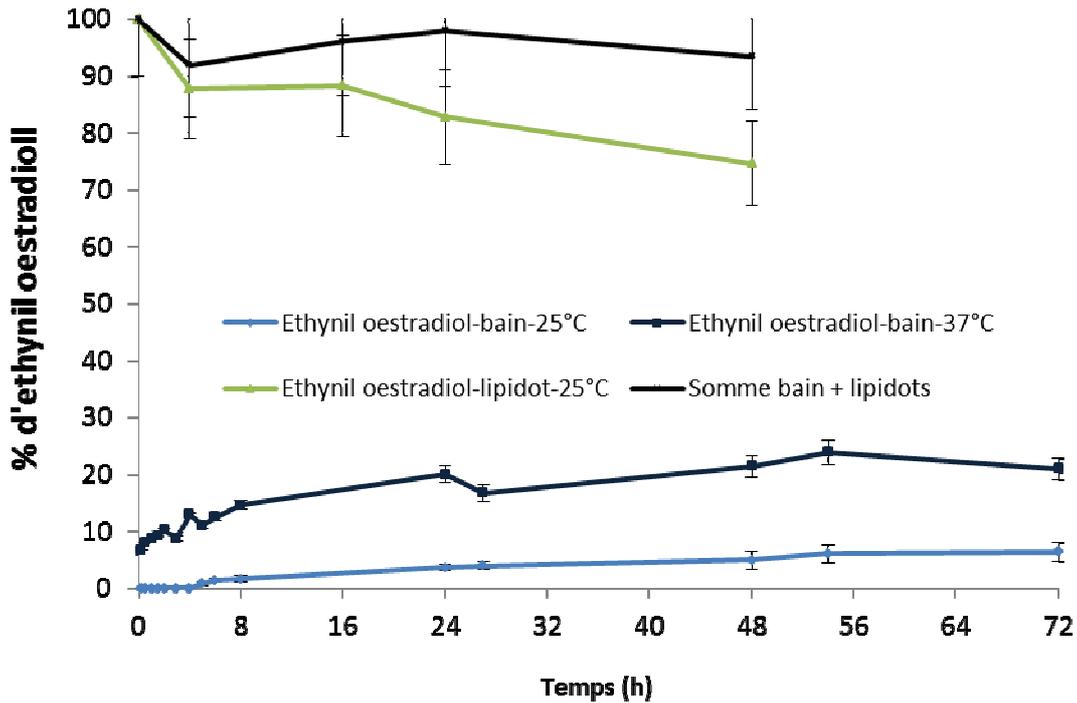


Figure V-8 : Cinétiques de relargage de l'éthynil œstradiol dans un milieu aqueux à 25°C ou 37°C.

Le relargage de l'éthynil œstradiol dans le bain à 37°C est plus rapide qu'à 25 °C. Dès 15 min après le début de la dialyse, 7 % d'éthynil œstradiol sont détectés à 37 °C alors qu'aucun relargage n'est observé à 25°C avant 5 h ; 11 % sont retrouvés dans le bain au bout de 48 h à 25 °C et 20 % à 37°C, début du plateau de cinétique. La dose d'éthynil œstradiol retrouvée dans les lipidots est de 88 % 4 h après le début de dialyse et diminue jusqu'à 75 % au bout de 48 h. En ajoutant les doses d'éthynil œstradiol retrouvées dans le bain et dans les lipidots, un total de 92 % allant jusqu'à 96 % est retrouvé.

A 37 °C, dès les premières heures, environ 10 % du produit détecté est de l'œstradiol, sûrement dû à une dégradation de l'éthynil œstradiol en œstradiol (Figure 9). L'éthynil œstradiol ne présente pas de dégradation à 25 °C.

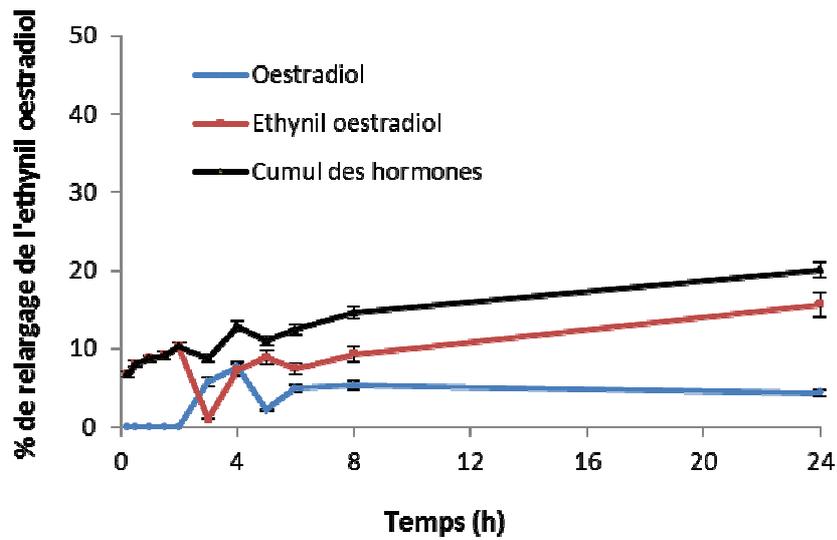


Figure V- 9 : Dissociation de l'éthynil œstradiol en œstradiol lors des essais de relargage à 37 °C.

De manière générale, l'éthynil œstradiol semble être plus sensible à l'augmentation de température que l'œstradiol et présente un « burst release » dans les premières heures à 37 °C. La présence d'un plateau après 48 h entraîne certaines interrogations **(1)** un équilibre nanoparticule – bain de dissolution peut être atteint et l'hormone ne sort plus des lipidots soit **(2)** la limite de solubilité de l'hormone libre dans l'eau est atteinte ou **(3)** la méthode de dosage n'est pas assez sensible. De plus, notamment pour l'œstradiol, lorsque la somme des quantités d'hormones retrouvées dans le bain ou dans la lipidot sont ajoutées, un total de 100 % n'est pas obtenu (maximum de 80 %), ce qui laisse entrevoir une faille sûrement dans la méthode de dosage CLHP (quantité trop faible pour être détectée) ou encore une adsorption de l'hormone sur la membrane de dialyse. En effet, si un problème de solubilité des hormones dans l'eau devait être envisagé, de forts taux seraient observés dans les premières heures puis un plateau apparaîtrait. Hors dès 4 h après mise en dialyse, une différence de 20 % est observée entre le dosage du bain et des lipidots.

B.4 Discussion

Cette première série d'expériences a mis en avant la capacité des lipidots à encapsuler des hormones stéroïdiennes ovariennes de la famille des œstrogènes. Les rendements d'encapsulation obtenus vont de 85 à 100 % suivant la formulation et l'hormone utilisée. Des rendements d'encapsulation de 97 % d'œstradiol dans des solutions

micellaires de lécithine et de triglycérides avaient précédemment été décrits²⁵¹. De l'œstradiol avait également été encapsulé dans des nanoparticules à base de PLA²⁴⁷ ; des relargages d'œstradiol de 40 % à 62 % dans le bain de dialyse à 48 h, suivant le taux de dopage en hormone avaient alors été observés. Dans le cas des lipidots, environ 35 % de l'œstradiol est relargé à 48 h et 25 % pour l'éthinyl œstradiol, un peu plus lipophile. Un effet de burst release est observé mais le relargage des hormones hors de la nanoparticule n'est pas total. Les lipidots pourraient donc être envisagées comme un vecteur à double cinétique de libération, la première rapide, effective dans les premières heures et la seconde, beaucoup plus lente, qui persisterait sur plusieurs jours. Ce mode de relargage avait déjà été observé avec le Nile Red¹⁵³ avec une cinétique rapide du fluorophore présent dans la membrane de la nanoparticule et une cinétique plus lente du fluorophore présent dans le cœur des lipidots.

C. Conclusion sur les lipidots pour la délivrance d'hormone

Le nombre de traitement hormonaux prescrits, notamment pour le THS, sont en constante augmentation. Hors ils présentent des effets secondaires importants, largement communiqués dans la presse publique. Il existe donc un réel besoin de disposer de systèmes de délivrance adaptés pour l'administration des hormones stéroïdiennes. L'encapsulation de celles-ci dans des nanovecteurs, pour atteindre une délivrance plus contrôlée spatialement et temporellement, semble une piste prometteuse à explorer. Quelques essais d'encapsulation dans différents vecteurs peuvent être cités à ce jour, sans réel aboutissement à une formule idéale pour une application clinique, notamment concernant le traitement hormonal substitutif. Les profils de relargage trouvés dans la littérature sont plus rapides que ceux observés avec les lipidots. Cela pourrait être exploité pour faire des lipidots avec une délivrance prolongée, notamment en utilisant les nanoparticules sous forme de gel, pour l'encapsulation et la délivrance d'hormone. De plus, dû au ciblage naturel des nanoparticules pour les ovaires, il peut être envisagé des patchs ou des implants de lipidots, placés dans le dos à proximité des ovaires qui diffuseraient des hormones. Les doses administrées pourraient être alors plus faibles, l'hormone ne subissant pas le premier passage hépatique de la voie orale.

Chapitre VI :

Partie Expérimentale

A. Préparation et caractérisation des nanoparticules

Un plan d'expérience mené au laboratoire avait permis précédemment de déterminer les compositions (quantités de lipides, phospholipides, PEG) optimisées pour obtenir des nanoparticules de 5 diamètres différents: 30 nm, 50 nm, 80 nm, 100 nm et 120 nm¹⁵². Ces formulations, concentrées en lipides (respectivement après sonication 300 mg / mL, 375 mg / mL, 380 mg / mL, 475 mg / mL et 430 mg / mL), n'étaient pas adaptées pour l'encapsulation de produits coûteux comme des radiomarqueurs, qui n'ont pas besoin d'être introduits en grande quantité dans les formulations. Dans le cadre de ce travail, des formulations « diluées » (100 mg / mL en lipides après sonication) par rapport à la formulation de 50 nm optimisée par le plan d'expérience ont été utilisées.

Dans un premier temps, l'ensemble des produits chimiques nécessaires à la préparation des nanoparticules sont listés, puis le protocole de fabrication décrit, les moyens de caractérisation des lipidots détaillés.

A.1 Produits chimiques

La Suppocire NCTM a été gracieusement offerte par Gattefossé (Saint-Priest, France). Le stéarate de polyéthylène glycol (MyrjS40TM) et l'huile de soja Super-refined Soybean oilTM sont approvisionnés chez Croda (Chocques, France). L'ensemble des radiotraceurs ([³H]Cholesteryl Hexadecyl Ether, [¹⁴C]Cholesteryl Oléate sont achetés chez PerkinElmer (Courtabeouf, France), le DiD (1,1'-Dioctadécyl-3,3,3',3'- Tetraméthylindodicarbocyanine, 4-Chlorobenzènesulfonate), chez Invitrogen, et l'ICG grade clinique (InfracyanineTM) chez Serb (Paris, France). Les 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)-5000] (DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂) et les 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[maléimide(polyéthylène glycol)-5000] (DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL) sont achetés chez NOF (Japon). Les peptides c(RGDfK(Ac-S-CH₂CO)) (cRGD), c(RADfK(Ac-S-CH₂CO)) (cRAD) sont synthétisés par Asynth BV Service (Pays Bas). Enfin, le Lipoid s75TM (lécithine de soja) est acheté chez Lipoid (Ludwigshaffen, Allemagne) et les autres produits chimiques proviennent de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

A.2 Synthèse et purification

Le protocole de fabrication le plus utilisé au cours de ce travail (obtention de nanoparticules de 50 nm de diamètre, avec un cœur à 75 % de cire et 25 % d'huile et une quantité de phase dispersée de 100 mg / mL en lipides totaux en fin de synthèse) est détaillé ci-dessous. Les formulations de diamètre compris entre 30 nm et 120 nm seront décrites ensuite.

A.2.1 Formulation « standard » (50 nm, 100 mg / mL en lipides, 75 % cire et 25 % huile)

Les quantités mises en jeu pour la fabrication d'un lot de nanoparticules « standard » sont résumées Tableau 1 :

	Matière première	Quantité (pour 2 mL total))	% En masse de la formulation totale	
Phase huileuse	Lipoid™ S75	17 mg	0,85	soit 5,4%
	Supocire	68 mg	3,4	
	Huile de soja	23 mg	1,15	
Phase aqueuse	Myrj S40™	92 mg	4,6	-
	PBS 1X	1800 µL	90	-
Aide à la fabrication	Glycérol	500 mg	-	-
	Phase dispersée	100 mg / mL	10%	-

Tableau VI-1 : Composition d'un lot de nanoparticules « standard ».

Brièvement, la préparation est réalisée en 5 étapes : la préparation de la phase huileuse, la précipitation de la phase aqueuse, le mélange des phases, l'émulsification et la purification.

Préparation de la phase huileuse : les composés huileux (huile, cire, lécithine) sont pesés puis mélangés avant d'être chauffés à 60°C afin d'obtenir une solution visqueuse homogène. Il peut être nécessaire d'ajouter un solvant tel que le dichlorométhane ou l'éthanol qui sera par la suite éliminé par évaporation sous vide afin de faciliter l'homogénéisation du mélange. Le premix huileux peut être conservé au congélateur (-20°C) pour utilisation ultérieure.

Si une molécule amphiphile ou lipophile doit être encapsulée, elle va être rajoutée au premix huileux. La molécule peut être dissoute directement dans le mélange hydrophobe ou bien, incorporée sous forme liquide, dissoute dans des solvants de type éthanol ou toluène, qui sont facilement évaporables sous flux d'argon (Figure 1).

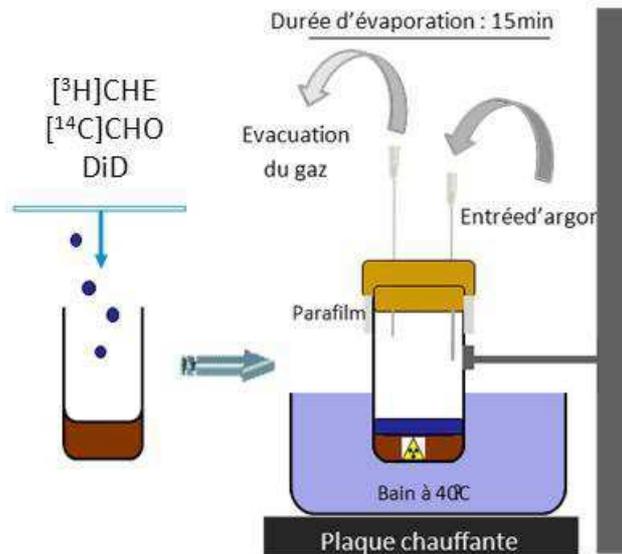


Figure VI-1 : Procédure d'incorporation des produits de dopage de la nanoparticule avant l'étape de synthèse.

Préparation de la phase aqueuse: en parallèle à la préparation de la phase huileuse, le surfactant PEGylé (MyrjS40™) et le glycérol sont dissous dans du tampon phosphate (PBS 1X : [phosphate] = 0,01 M, [NaCl] = 0,154 M, filtré à $0,2\ \mu\text{M}$, pH 7,4) dans un bain à 70°C . Le mélange doit à la fin être homogène et chaud avant le procédé de sonication. Le glycérol est ajouté pour viscosifier le mélange afin d'éviter toute projection au cours de l'émulsification. Celui-ci sera ensuite éliminé au cours de la dialyse.

Mélange des phases: la phase aqueuse, encore chaude, est mélangée au premix huileux fondu. L'embout de la sonotrode est alors soigneusement positionné dans le flacon en verre contenant le mélange comme représenté Figure 2.

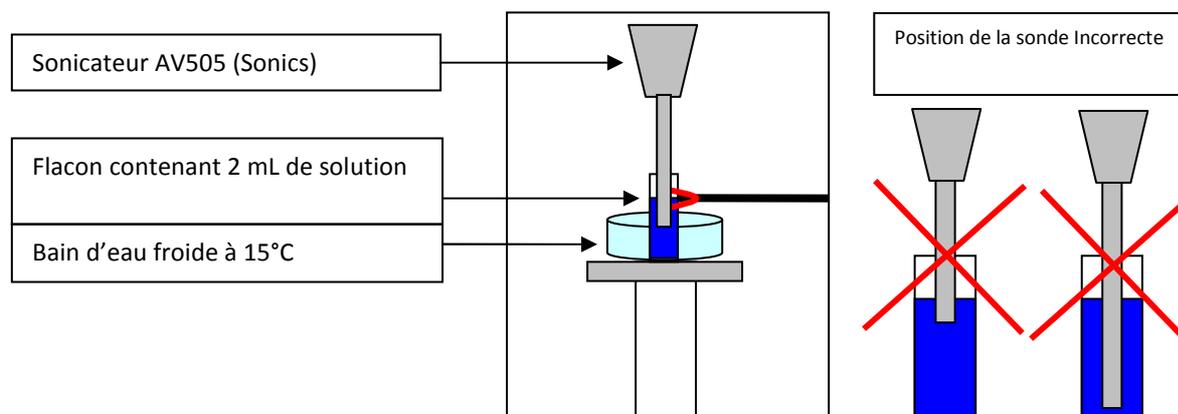


Figure VI-2 : Positionnement du pilulier avant émulsification.

Il est important que l'embout soit bien positionné pour éviter la formation de mousse, et avoir une distribution en taille des particules étroite.

Emulsification : Les nanoparticules sont préparées par un processus d'ultrasonication avec une sonotrode de 3 mm de diamètre (sonicateur AV505, Sonics, Newtown USA), selon les paramètres résumés Tableau 2. Le temps effectif de sonication est de 10 min, correspondant à un temps de manipulation de 40 min. La sonication est un procédé entraînant la création de chaleur ; afin d'éviter une augmentation trop élevée de la température au sein du mélange, un bain froid (15 °C) est placé autour du flacon en verre pendant l'émulsification et on utilise une sonication en mode pulsé.

Volume du lot	Sonde	Puissance de P_{\max}	Temps de sonication	Pulse	
				on	off
2 mL	∅ 3 mm	20%	10 min	10 s	30 s

Tableau VI-2 : Paramètres d'émulsification.

Purification : la purification de la dispersion de nanoparticules (typiquement $\frac{3}{4}$ d'un lot soit 1,5 mL) se fait par dialyse contre un grand volume de PBS 1X pendant 16 h. La membrane utilisée possède un seuil de coupure de 12 – 14 kDa (ZelluTrans/RothT4 12000-14000, 25 mm, ROTH, France) laissant passer à travers ses pores les molécules de faible

poinds moléculaire n'ayant pas été incorporées dans la synthèse (stéarate de PEG, glycérol, fluorophore) tout en gardant en son sein les lipidots.

Le processus de purification peut également se faire par chromatographie d'exclusion stérique sur colonnes Sephadex G25 prépackées (PD-10, GE Healthcare). 1 mL de solution à 100 mg / mL est déposé au sommet de la colonne et élué par du PBS 1X. Le volume mort est de 3,5 mL puis les lipidots sont récupérés dans les 3,5 mL suivants alors que les petites molécules sont retenues sur la colonne. Cette technique est plus rapide que la purification par dialyse mais entraîne une dilution plus élevée des nanoparticules (au minimum x 3,5).

Une fois purifié, l'échantillon est dilué afin d'obtenir la concentration en lipides souhaitée *in fine*, puis stérilisé par filtration sur filtre 0,22 μm (Acrodisc® Supor® - 0,2 μm , Fisher Bioblock). Les échantillons peuvent être conservés à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'à leur utilisation.

A.2.2 Formulation de nanoparticules de diamètre compris entre 30 nm et 120 nm

Le procédé de fabrication est similaire à celui décrit ci-dessus. Seules les quantités de produits incorporées au départ sont différentes, le temps de sonication plus court (5 min au lieu de 10 min, les concentrations en lipides étant plus importantes) et la température du bain de sonication est de 50 °C afin d'éviter une solidification des lipides dans la première phase de l'émulsion. Les quantités mises en jeu suivant la taille de nanoparticules souhaitée sont présentées Tableau 3.

Diamètre (nm)	Masses (mg)				
	Masse Eau PBS	Masse huile	Masse cire	Masse Lipoid™ S75	Masse Myrj™S40
30	1400	25	75	150	350
50	1250	85	255	65	345
80	1240	102,5	307,5	50	300
100	1050	144	431	50	325
120	1140	150	450	45	215
mg / mL	300	375	380	475	430

Tableau VI-3 : Quantités mises en jeu pour fabriquer des nanoparticules allant de 30 nm à 120 nm de diamètre.

Les mélanges obtenus étant visqueux, il est nécessaire de les diluer avant de les mettre en dialyse. Cette étape permet également d'homogénéiser les concentrations en lipides pour tous les lots afin d'obtenir une fraction massique de 200 mg / mL. La moitié du lot dilué (soit 2,5 mL) est mis en dialyse puis dilué par un facteur 2 pour obtenir au final une concentration de 100 mg / mL, filtré sur 0,22 µM.

A.3 Caractérisation des particules

A.3.1 Taille, polydispersité et potentiel zêta

Une fois le lot de nanoparticules purifié, il doit être caractérisé par sa taille, sa polydispersité et sa charge de surface. Ces paramètres sont déterminés par diffusion quasi-élastique de la lumière grâce à un NanoSizer ZS (Malvern, Royaume-Uni). Environ 20 µL de solution de particules (à 50 mg / mL) sont dispersés dans 980 µL de PBS 0,1X, pH 7,4. Les mesures sont réalisées à température ambiante. Un cycle de 15 mesures est réalisé en triplicata.

A.3.2 Rendement d'encapsulation des fluorophores

Si un fluorophore a été incorporé, le rendement d'encapsulation de celui-ci ainsi que son rendement quantique de fluorescence dans la nanoparticule peut être mesuré. Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre CARY 300, Varian. Le rendement d'encapsulation des fluorophores est calculé comme étant le ratio entre l'absorption de la dispersion de particules au maximum d'absorption du fluorophore avant et après purification des particules (Equation 1).

$$\% \text{ d'encapsulation du fluorophore} = \frac{\text{Abs(après purification)}}{\text{Abs(avant purification)}} \times 100$$

Equation VI-1 : Rendement d'encapsulation des fluorophore

A.3.3 Caractérisation de fluorescence et rendement quantiques

L'appareil utilisé est le spectrofluorimètre Perkin Elmer LS 50 B. Les solutions de nanoparticules sont préparées dans du PBS 1X dans une cuve en quartz.

Le rendement quantique de fluorescence représente l'efficacité relative de la fluorescence (désexcitation radiative) comparée aux autres voies de désexcitation non radiatives du fluorophore dans son état excité. En utilisant une molécule fluorescente de référence dont le rendement quantique est connu, il est possible de déterminer le rendement quantique de fluorescence du fluorophore encapsulé dans les lipidots (équation 2), ce qui nous donne des indications son comportement dans la nanoparticule.

$$\Phi_{éch} = \Phi_{réf} \times \frac{\int I_{fluo}^{éch} d\lambda}{\int I_{fluo}^{réf} d\lambda} \times \frac{1 - 10^{-Abs^{réf}}}{1 - 10^{-Abs^{éch}}} \times \frac{n_{réf}^2}{n_{éch}^2} \quad (\text{Équation VI-2})$$

Avec :

$\Phi_{éch}$: Rendement quantique de fluorescence du fluorophore étudié

$\Phi_{réf}$: Rendement quantique du fluorophore de référence

$\int I_{fluo}^{éch} d\lambda$: Intégrale du spectre de fluorescence de l'échantillon

$\int I_{fluo}^{réf} d\lambda$: Intégrale du spectre de fluorescence de référence

$Abs^{éch}$: Absorbance de la solution étudiée à la longueur d'onde d'excitation

$Abs^{réf}$: Absorbance de la solution de référence à la longueur d'onde d'excitation

$n_{éch}$: Indice de réfraction du solvant de la solution étudiée

$n_{réf}$: Indice de réfraction du solvant de la solution de référence

La molécule utilisée en tant que référence doit être excitée à la même longueur d'onde que la solution étudiée dans les mêmes conditions ; elles doivent avoir des propriétés spectrales proches. Dans le cas de l'ICG, on utilise l'IR125 dans le DMSO ($\Phi = 0,13$) et dans le cas du DiD, on utilise du Cy5 dans du PBS ($\Phi = 0,28$).

A.3.4 RMN et localisation des fluorophores DiD et ICG

Ce travail reprend celui entrepris par T.Delmas au cours de sa thèse. En effet, il avait caractérisé l'ensemble des composés de la nanoparticule par RMN ^1H permettant de définir des pics caractéristiques de chacun des composés sur le spectre des lipidots. Il avait ainsi utilisé cette technique pour avoir une information sur la viscosité du cœur des particules, ainsi que sur la localisation d'un fluorophore utilisé comme drogue modèle, le NileRed¹⁵³. La présente série d'expériences a pour but de déterminer les spectres de l'ICG et du DiD seuls, puis les spectres de chacun des fluorophores encapsulés dans les lipidots afin d'obtenir des informations sur leur localisation au sein des particules.

Les spectres de RMN ^1H sont obtenus sur un spectromètre Avance DRX 500 (Brüker, France), opérant à 500,13 MHz pour le proton. Une fois obtenus, ces spectres sont analysés avec le logiciel constructeur Bruker.

A.3.4.a Acquisition des spectres (DiD, lipidot-DiD, ICG et lipidot-ICG)

L'assignation des pics de résonance associés aux différents composés (ICG, DiD) est effectuée par des méthodes standards reposant sur l'acquisition de spectres ^1H , et l'acquisition de spectres 2D basés sur la corrélation homonucléaire ^1H - ^1H (COSY). Ces spectres ont été obtenus à température ambiante ($T \approx 25^\circ\text{C}$) dans le méthanol deutéré (> 99 %), en utilisant du tétraméthylsilane (TMS) comme référence 0 ppm.

Les spectres des fluorophores encapsulés dans les lipidots sont acquis dans de l'eau deutérée (> 75 %) en utilisant l'acide triméthylsilyl-1-propanesulfonique (DSS) comme référence à 0 ppm.

A.3.4.b Pulse sélectif pour l'observation des pics de résonance associés aux fluorophores

Sept raies caractéristiques des composants de la nanoparticule ont été identifiées et résumées Tableau 4. Chaque spectre est enregistré avec 1200 acquisitions. Par rapport à des expériences classiques de nOe diff, dans notre cas, contenu des spectres de résonance des solvants et de la nanoparticule, l'acquisition est faite sélectivement dans la zone entre 6 et 9 ppm en remplaçant les impulsions de lecture classique par des impulsions sélectives.

		Déplacement chimique du proton irradié (ppm)
1	Chaîne hydrocarbonée	1,19
2	CH ₂ -O	1,48
3	CH ₂ -O	1,95
4	CH ₂ -O	2,15
5	Choline	3,14
6	PEG	3,6
7	Glycérol	3,99
	Blanc	(Hz) -1000

Tableau VI-4 : Pics d'irradiations spécifiques de chaque composant des lipidots

A.3.4.c Expérience de transfert de nOe

Des expériences de transfert de nOe sont utilisées pour localiser, à l'échelle moléculaire, l'ICG ou le DiD dans la structure des lipidots. Pour cela, les interactions homonucléaires proton-proton sont utilisées au cours de mesures des spectres différentiels NOE du proton (spectres nOe diff). Une pré-saturation de 5 s est appliquée, puis les spectres NOE sont obtenus en irradiant les pics d'intérêt, spécifiques des constituants des lipidots, et en enregistrant le signal RMN résultant (spectre à résonance). Un pulse sélectif est appliqué afin de favoriser la détection des signaux du fluorophore comme représenté Figure 3. La même expérience est réalisée en irradiant l'échantillon à une fréquence éloignée (-1000 Hz) de toute autre résonance (zone vide de signaux du fluorophore, nanoparticule ou solvant) total du fluorophore encapsulé dans la lipidot pour obtenir le spectre contrôle (spectre hors résonance). Les spectres nOe diff sont ensuite obtenus en irradiant les différentes raisonnances d'intérêt. Les interactions du fluorophore avec les composants des lipidots peuvent être visualisées directement sur les spectres nOe diff par l'apparition de signal nOe.

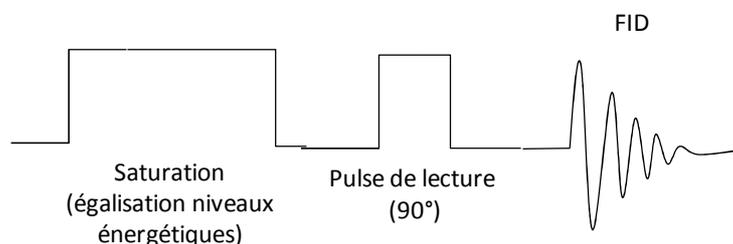


Figure VI-3 : Séquence employée pour étudier le transfert nOe entre composants des lipidots et ICG et DiD (nOe diff).

A.4 Fonctionnalisation des lipidots

Deux chimies de greffage, classiquement employées pour la fonctionnalisation de biomolécules ou de nanoparticules^{255, 256}, ont été utilisées pour la fonctionnalisation des nanoparticules. La première chimie repose sur la réactivité des groupements thiol vis-à-vis des fonctions maléimide. Elle a été employée pour greffer sur les nanoparticules des peptides de ciblage. La seconde chimie repose sur la réaction amine et ester N-hydroxysuccinimyl (NHS) pour former une liaison amide. Elle a été employée pour greffer un groupement prosthétique fluoré (Figures 4 et 5).

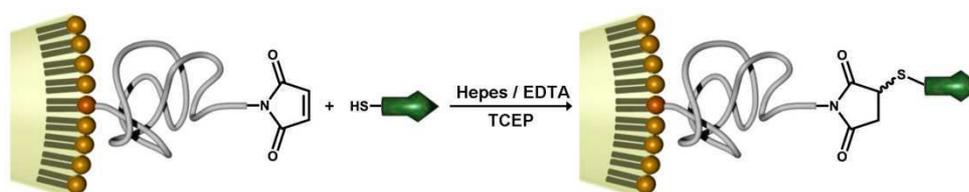


Figure VI-4 : Réaction de couplage entre les lipidots maléimides et les peptides thiols.

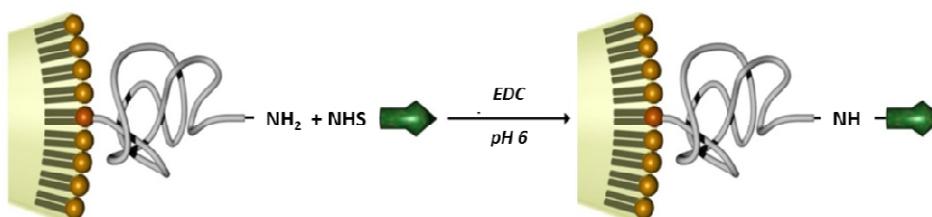


Figure VI-5 : Réaction de couplage entre les lipidots amine et les [¹⁹F]SFB porteur d'une fonction N-hydroxysuccinimyl.

Pour obtenir ces nanoparticules fonctionnalisées, deux étapes sont donc nécessaires : (1) Introduire des groupes fonctionnels réactifs dans l'eau à la surface des lipidots ; (2) Réaliser la réaction de couplage proprement dite entre les lipidots fonctionnalisés et la molécule d'intérêt à greffer.

A.4.1 Préparation des lipidots fonctionnalisés

Le greffage de ligand cRGD a déjà été réalisé au laboratoire sur les formulations concentrées en lipides (345 mg / mL)¹⁵⁴. Le protocole suivant a été adapté pour l'appliquer aux formulations diluées (100 mg / mL en lipides). Des surfactants PEGylés fonctionnels DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL (N- [(3-Maléimide-1-oxopropyl) aminopropyl polyéthylèneglycol-carbamyl] distéaroylphosphatidyl-éthanolamine) ou DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂ (N-(aminopropyl

polyéthylèneglycol) carbamyl- distéaroylphosphatidyl- éthanolamine, (NOF, Japon) sont introduits dans la formulation en remplacement partiel des surfactants stéarate de PEG₂₀₀₀ (MyrjS40) de la formulation standard. Pour cela, 82 mg de MyrjS40™ et 27 mg de DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL ou de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ sont dissous dans 1800 µL de tampon de greffage (HEPES 0,05 M / EDTA 0,01M pH = 7,4). Les autres constituants sont maintenus dans les mêmes quantités (Tableau 1). Pour obtenir des émulsions fluorescentes, du DiD à 400 µM encapsulé afin de pouvoir réaliser des imageries de fluorescence *in vivo*. La sonication se fait comme précédemment décrit (A.2.1)

A.4.2 Réaction de couplage

A.4.1 Thiol - maléimide

Une fois le lot de nanoparticules (dont 11 % des stéarates de PEG₂₀₀₀ ont été remplacés par des DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL) synthétisé, la réaction de couplage peut avoir lieu. Le lot est divisé en trois (650 µL chacun), l'un restant tel quel, servant de contrôle, l'un recevant le cRGD (peptide spécifique), l'autre le cRAD (peptide non spécifique). Les quantités de peptides mises en jeu sont listées Tableau 5.

	Masse (mg)	Masse Molaire (g/mol)	DMSO (µL)	mol (µmol)
cRGD	1,6	720	20	2,2
cRAD	1,6	735	20	2,2

Tableau VI-5 : Quantités mise en jeu pour le greffage

Les peptides approvisionnés sous forme de thioacétate sont dissous dans du DMSO, est activé avec du TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine, 50 µL à 90 mM, agitation 30min, déprotection de la fonction thioacétate en thiol), avant d'être mis en contact avec les lipidots pendant 2 h sous agitation, à l'abri de la lumière. Du β-mercapto-éthanol (1 µL) est ajouté pour bloquer les fonctions n'ayant pas réagi. Les lots sont ensuite dialysés (seuil de coupure 12 – 14 kDa) contre du PBS 1X avant d'être stérilisés sur filtre de 0,22 µm.

A.4.2. NHS – NH₂

Le lot de nanoparticules dont 11 % des stéarate de-PEG₂₀₀₀ (MyrjS40™) sont remplacés par des DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂ est divisé en deux (1300 µL et 650 µL), l'un étant mis en contact avec le ¹⁹F[SFB] et l'autre servant de contrôle.

3 mg de ^{19}F [SFB] (soit 12,7 μmol , 3,8 équivalents par rapport aux amines théoriquement présentes dans la formulation) sont dissous dans 30 μL de dichlorométhane. 13 mg d'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) sont rajoutés (71,5 μmol , 22 équivalents par rapport aux amines, dans 100 μL de PBS à pH compris entre 6 et 6,5) afin d'être sûr que les fonctions NHS soient bien activées. L'ensemble est ensuite mis en contact avec le lot de nanoparticules- NH_2 pendant 2 h à l'abri de la lumière avant d'être purifié par dialyse (seuil de coupure de 12 – 14 kDa) contre du PBS 1X et stérilisé sur filtre 0,22 μm .

Remarque : les conditions opératoires concernant le greffage du produit chaud seront différentes. En effet, le ^{18}F ayant une $\frac{1}{2}$ vie courte, le temps d'agitation pour permettre le greffage devra être raccourci à 5 min maximum. La méthode de purification devra également être purifiée.

A.4.3 Caractérisation des particules après couplage

L'ajout des DSPE-PEG₅₀₀₀ (NH_2 ou MAL) entraîne une augmentation de taille des lipidots, passant d'environ 50 nm pour une formulation standard à un diamètre compris entre 60 et 65 nm pour les nanoparticules prêtes à être fonctionnalisées. Aucune modification de la polydispersité ni du potentiel zêta n'a été observé, d'environ 0,15 et de – 7mV respectivement.

La présence des peptides cRGD, cRAD et du SFB greffés sur la nanoparticule n'entraîne pas de modification mesurable ni du diamètre, ni du potentiel zêta, ni de la polydispersité des lipidots.

A.4.3.a Caractérisation des lipidots fonctionnalisés par les cRGD et cRAD

(1) Dosage des fonctions maléimides

Pour déterminer le nombre de fonctions maléimide introduites dans la formulation, un dosage avec le SAMSA est envisagé. Le SAMSA est une sonde fluorescente contenant une fonction thiol réactive. Il devient alors possible de déterminer le nombre de fonctions maléimides introduites par fluorescence.

Cette manipulation a un double objectif : (1) doser le nombre de DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL incorporés dans les lipidots et (2) doser le nombre de DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL libres (n'ayant pas réagi) suite à la mise en contact avec le peptide-SH et ainsi déterminer le taux de greffage du cRGD et cRAD.

Le SAMSA est commercialement disponible sous forme thioacétate protégée qu'il convient de déprotéger au dernier moment pour éviter l'oxydation des thiols en ponts disulfure (Figure 6). 5 mg de SAMSA ($M_m = 521,5 \text{ g/mol}$; $9,6 \text{ }\mu\text{mol}$) sont dissous dans 0,5 mL de NaOH 0,1 M fraîchement préparée et la solution est agitée à température ambiante pendant 15 min. On ajoute alors du HCl 6 M jusqu'à ce que le SAMSA commence à précipiter (typiquement 7 μL). La redissolution du composé est obtenue par ajout de quelques μL de NaOH 0,1 M. La solution obtenue est alors reprise dans 0,7 mL de PBS. Le réactif est alors prêt à l'emploi à une concentration de 8 mM (soit 8 nmol/ μL).

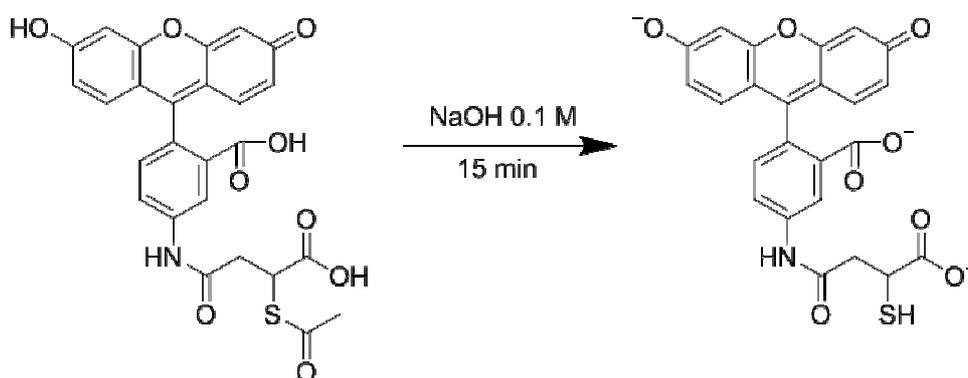


Figure VI- 6 : Déprotection du SAMSA

(2) Courbe d'étalonnage

Il est ensuite nécessaire de réaliser une gamme d'étalonnage (typiquement 5 points, de 5 μM à 25 μM par exemple, Figure 7). Les solutions sont excitées à 495 nm et lues à 520 nm.

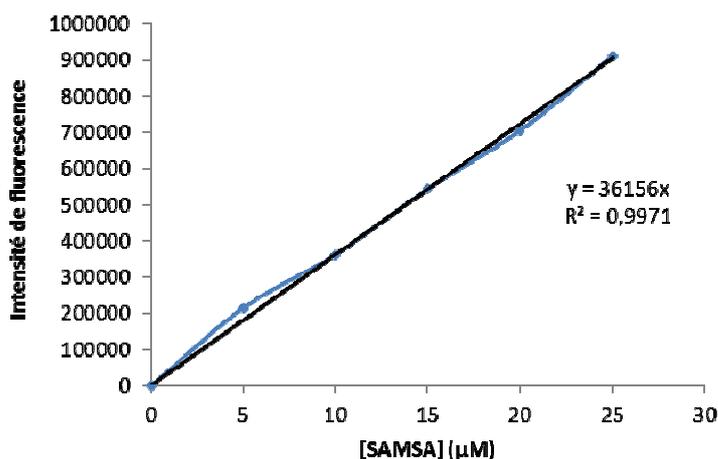


Figure VI-7 : Courbe d'étalonnage du SAMSA

(3) Dosage des fonctions maléimides incorporées dans les lipidots

Après synthèse des lipidots dont 11 % en molaire des surfactants MyrjS40™ ont été remplacés par des surfactants DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL, il est nécessaire de connaître le nombre exact de fonctions maléimides présentes à la surface des lipidots susceptibles de réagir avec les fonctions SH des peptides.

Le SAMSA est incorporé en excès (x 10) par rapport au nombre de fonctions maléimides théoriques présentes afin de s'assurer que la réaction de dosage est quantitative (Tableau 6). Les concentrations en maléimides sur la nanoparticule étant très élevées, il est nécessaire de diluer 100 fois la dispersion de particules (ce qui permet également d'utiliser moins de SAMSA et de pouvoir purifier les particules après la réaction de dosage sur colonne PD 10 sans problème).

10 µL de lipidots	Essai 1	Essai 2	Essai 3
DSPE-PEG-Mal (nmol)	25	25	25
SAMSA ajouté (nmol)	250	500	750
Ratio MAL / SAMSA	10	20	30

Tableau VI-6 : Quantités mises en jeu pour la réaction de couplage lipidots-MAL / SAMSA.

Le mélange SAMSA / nanoparticules est incubé sous agitation pendant 2 h à température ambiante à l'abri de la lumière afin de permettre le couplage. La solution est ensuite passée sur colonne PD 10 afin de séparer le SAMSA non lié et le SAMSA lié au DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL non incorporés dans les lipidots des lipidots fonctionnalisées. La fraction

purifiée de nanoparticules est récupérée et son volume ajusté à 5 mL avant lecture de la fluorescence.

De manière théorique, si le taux d'incorporation des surfactants PEG fonctionnalisés est de 100 %, il est obtenu une concentration en fonction maléimides de 2,5 mM (2,5 $\mu\text{mol} / \text{mL}$), soit un nombre de molécules DSPE-PEG₅₀₀₀-MAL de 1071 / nanoparticules (nombre de particules après sonication = $1,4 \times 10^{15} / \text{mL}$).

Sur les 5 nmol théoriques de DSPE-PEG-MAL présentes (25 nmol apportées par la solution de lipidots avec un facteur de dilution de 5 suite à la purification par colonne), 1,3 nmol de fonctions maléimides ont été retrouvées soit un taux d'incorporation de 26 % des surfactants PEGylés fonctionnalisés dans la nanoparticule soit 280 fonctions maléimides / lipidots.

(4) Dosage des fonctions maléimides libres après greffage des peptides

Une fois les peptides mis en contact avec les nanoparticules et avant que les fonctions maléimides soient neutralisées par l'ajout du β -mercaptoethanol, des nanoparticules sont prélevées et dosées de manière identique que décrit précédemment.

Il est dosé $0,245 \pm 0,02$ nmol de maléimides libres pour le couplage avec le cRAD et $0,25 \pm 0,01$ nmol de maléimides libres pour le couplage avec le cRGD. Pour les deux peptides, le rendement de couplage est de 81 % avec un nombre de peptides greffé à la surface des lipidots de l'ordre de 226.

A.4.3.b Caractérisation des lipidots fonctionnalisés par le [¹⁹F]SFB

La présence de fluor après greffage et purification des lipidots est réalisée de manière qualitative par RMN en comparant le déplacement chimique du groupement prosthétique associé au ¹⁹F et le déplacement chimique de ce même groupement associé aux lipidots.

La détermination directe de la présence ou non du ¹⁹F après couplage du groupement prosthétique SFB (Chapitre III) sur les lipidots est possible dans ce cas car la signature du fluor peut être réalisée par RMN. Ces essais de RMN du fluor ont été réalisés sur un spectromètre Varian-VXR, Unity. 28 scans sont réalisés par échantillon, le ¹⁹F pur est placé

dans de l'éthanol à 1 mg / mL, el lot de lipidots greffées purifiés dans du PBS 1X avec une concentration théorique de 0,33 mg / mL si il y avait eu 100 % de greffage.

A.5 Dosage CLHP de molécules encapsulées

Afin d'évaluer le taux d'encapsulation de l'œstradiol et de l'éthynil œstradiol dans les lipidots (Chapitre V), une méthode de dosage par CLHP (chromatographe liquide à haute pression) a été mise au point. L'appareil utilisé est une chaîne CLHP analytique Alliance (Waters, France) composée d'une pompe Alliance 2695 et d'un détecteur d'absorbance UV-visible à double canal de lecture.

A.5.1 Mise au point de la méthode de dosage CLHP

Le protocole CLHP mis en place pour l'œstradiol est adapté du protocole de référence décrit dans la Pharmacopée Européenne. L'échantillon est élué à température ambiante sur une colonne en C₁₈ en phase inverse (Waters) avec un mélange isocratique de 60 % en acétonitrile et 40 % en eau avec un débit de 1 mL / min. Les spectres d'absorbance UV de chacune des molécules ont mis en évidence deux pics caractéristiques d'absorption à 230 nm et 286 nm, qui seront utilisés pour la détection UV de la CLHP.

Dans ces conditions, l'œstradiol est élué avec un temps de rétention de 4,1 minutes et l'éthynil œstradiol avec un temps de rétention de 4,3 minutes.

Afin de pouvoir doser de manière précise les hormones, des gammes de concentrations dans l'acétonitrile sont préparées pour réaliser une courbe d'étalonnage dont la linéarité est vérifiée (Figure 8).

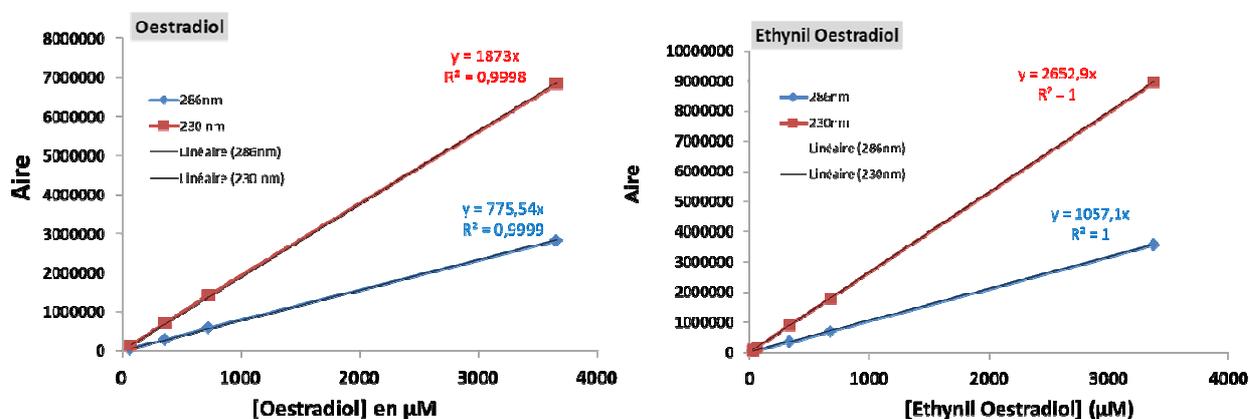


Figure VI-8 : Courbe d'étalonnage de l'œstradiol et de l'éthynil œstradiol

Ces courbes mettent en évidence la linéarité de la méthode de dosage. Une sensibilité plus grande est observée (pente la plus élevée) pour la longueur d'onde de 230 nm, qui est donc privilégiée par rapport à celle de 286 nm.

A.5.2 Dosage des hormones encapsulées dans les lipidots

Afin de doser les hormones encapsulées dans les nanoparticules lipidiques (après purification), les lipidots sont détruites afin d'extraire l'œstradiol ou l'éthynil œstradiol présentes dans la formulation. Pour cela, 75 µL de nanoparticules sont mélangées pendant une heure avec 100 µL d'acétonitrile (du THF peut également être utilisé, mais ce solvant n'est pas recommandé pour les colonnes CLHP) dans un flacon en verre afin de désassembler les nanoparticules. Puis 350 µL de méthanol sont ajoutés au mélange et l'ensemble est placé 16 h à 4°C afin de favoriser la précipitation des lipides. L'ensemble est ensuite filtré sur une membrane de nylon de 0,45 µM (5 Millex®HN Nylon, Millipore).

Afin de déterminer le taux d'encapsulation, les hormones sont extraites des lipidots avant et après purification par dialyse et une comparaison entre les deux est réalisée. Grâce aux courbes de calibration, la quantité extraite peut être déterminée en masse.

L'utilisation de tubes en plastiques par rapport à des tubes en verre a été comparée, afin de vérifier qu'aucune adsorption des hormones ne se faisait sur les parois des tubes en plastiques utilisés.

Le rendement d'extraction du protocole est de quasiment 100 % uniquement pour les formulations préparées à 100 mg / mL diluées dans ces conditions uniquement. En effet, des formulations plus concentrées en lipides (345 mg / mL), l'extraction n'est pas totale (environ 65 %). De même, une baisse du rendement d'extraction a été observée lorsque des taux importants d'hormones sont encapsulés dans la nanoparticule.

A.5.3 Quantification du relargage des hormones au cours du temps

Les lots sont synthétisés, purifiés par dialyse et stérilisés sur filtre de 0,22µm. 250 µL sont placés dans une boîte de dialyse (QuixSep, 250 µL, Orange scientifique, Belgique) équipée d'une membrane avec seuil de coupure de 12-14 kDa, dans un volume de 50 mL de PBS 1X, le tout placé sous agitation à température ambiante ou à 37°C. A des temps définis, 200 µL du bain de dialyse sont prélevés pour une analyse CLHP. Afin de maintenir le volume de dissolution constant, 200 µL de PBS 1X sont rajoutés au système après chaque

prélèvement. De plus, afin d'éviter toute évaporation, le système est fermé hermétiquement par des bouchons.

A.6 Interaction nanoparticules et protéines plasmatiques

Le test à la BSA est un test qui a été mis en place pour évaluer la fuite potentielle des fluorophores DiD et ICG hors de la nanoparticule en présence d'albumine, protéine présente à 60 % dans le compartiment sanguin (Chapitre IV).

Pour cela, un lot est synthétisé, purifié et caractérisé en taille, potentiel zêta, spectres d'absorption et de fluorescence. Puis 40 mg de BSA (Euromedex, sous forme de poudre cristalline), sont dissous dans 500 μ L de dispersion de lipidots purifiés (50 mg / ml de lipides). L'ensemble est agité jusqu'à ce que la BSA soit dissoute dans le lot de nanoparticules. Le tout est prélevé et placé dans une membrane de dialyse de 100 kDa (des essais avaient été réalisés avec une membrane de 300 kDa mais l'ICG semblait avoir de l'affinité pour la membrane, qui se colorait en vert). Le tout est mis en dialyse 16 h et le dialysat est prélevé pour être caractérisé en taille, potentiel zêta, spectres d'absorption et de fluorescence. Une comparaison est ensuite faite entre le lot purifié et le lot après contact avec de la BSA.

B. Modèle animaux, culture et implantation des cellules tumorales

L'ensemble des études animales ont suivi les directives de l'union européenne sur l'éthique et le bien-être animal.

1. Souris FVB

Les souris FVB et *Nude* proviennent du fournisseur Janvier (CerJ, France) et sont reçues à un âge d'environ 10 semaines avec un poids compris entre 20 et 22 g. Les animaux sont hébergés au nombre maximum de 5 / cage dans une pièce ventilée, à température contrôlée de 21 °C, dédiées aux rongeurs. Elles ont à boire et à manger *ad libitum*.

2. Culture cellulaire et modèle PyMT

Le modèle PyMT est un modèle de développement de tumeur spontanée des glandes mammaires chez la souris de fond génétique FVB. Il s'agit d'une souche de souris transgénique modifiée pour le gène du polyomavirus middle T (PyV-mT) qui développe au cours du temps et de manière spontanée des cancers mammaires pouvant évoluer jusqu'à l'état métastatique l'état métastatique. Ce modèle peut être compliqué d'utilisation dû aux stades multimétastatiques au sein d'un même animal. Cette souche peut fournir des cellules qui vont être réimplantées chez la souris de souche FVB de manière orthotopique et syngénique.

Préparation des cellules : l'ensemble des tâches sont réalisées dans de la glace afin de préserver la viabilité cellulaire. Les tumeurs mammaires sont prélevées chez 15 souris PyMT et homogénéisées par broyage avant d'être immergées dans un milieu DMEM (aussi connu sous le nom de milieu Dulbecco, contenant des sels, des vitamines, des acides aminés et du glucose) enrichi à 10 % de sérum de veau fœtal et 1 % d'antibiotiques. Après la désagrégation des tissus et la dissociation cellulaire, le mélange est filtré à respectivement 500 µm, 200 µm et 70 µm (CTSV, Ref 500-50N, Ref 200-20N et Ref 070-67N respectivement). Les cellules sont ensuite centrifugées, lavées et suspendues dans du milieu DMEM et

aliquotées dans du sérum permettant la cryoconservation avant d'être congelées à - 80°C et stockées dans de l'azote liquide.

Implantation tumorale : afin de réaliser l'implantation dans les cellules graisseuses de la glande mammaire, les cellules tumorales sont décongelées et suspendues dans du milieu DMEM. Au moment de l'implantation, les souris sont anesthésiées sous isoflurane 2,5 % et environ 2 millions de cellules viables sont inoculées au niveau de la 4^{ème} glande mammaire.

Les animaux sont ensuite réveillés et replacés en animalerie. La croissance de ce modèle est de l'ordre de 12 jours afin d'obtenir un amas cancéreux d'environ 5 mm sur 7 mm sans présence de nécrose.

C. Comptage des échantillons radiomarqués

C.1 Rappel sur le procédé de scintigraphie

C.1.1 Principe fondamental :

La scintillation en milieu liquide permet de mesurer la quantité de photons émis dans un mélange scintillant suite à une décomposition radioactive. Le mélange à scintillation contient trois composantes:

- un solvant organique, généralement aromatique, capable d'absorber des radiations gamma et d'émettre des photons (toluène, xylène, dérivés du benzène).
- un scintillant primaire (ou "fluor" primaire),
- un scintillant secondaire (ou "fluor" secondaire),

La désintégration d'un radio-isotope constitue la source d'énergie ; dans notre cas, des particules β . Cette énergie est captée par le solvant du liquide à scintillation, qui lors de sa désexcitation, va émettre de l'énergie sous forme de photons qui entreront en collision avec une molécule du scintillant primaire. A son tour, le scintillant primaire alors excité, va émettre un photon de plus faible énergie lors de son retour à l'état fondamental ; photon qui va exciter le scintillant secondaire, émettant un photon faiblement énergétique (dans le violet, 300-400 nm) qui pourra alors être détecté par une photodiode.

Le compteur à scintillation est muni d'un dispositif photosensible et d'une cellule photomultiplicatrice, qui déclenche une impulsion électrique à chaque fois que des photons atteignent sa surface. Le nombre de ces impulsions (coups) peut être enregistré sur une période de temps définie permettant d'obtenir le nombre de coups par minute (CPM).

Il existe différents types d'émetteurs radioactifs β généralement classés suivant leur énergie :

- les émetteurs faibles comme le [^3H], aussi appelé émetteur « mou », dû à la faible amplitude des photons émis (à savoir un chemin parcouru court) ;
- les émetteurs modérés comme le [^{14}C], aussi appelé émetteur « dur » dû à l'amplitude moyenne des photons émis ;
- les émetteurs forts comme le [^{32}P].

C.1.2 Notion de masquage :

Le masquage (« quenching » en anglais), qu'il soit chimique ou colorimétrique, interfère avec le processus de conversion des particules β en photons enregistrables par les cellules photosensibles. Ce masquage peut diminuer la distance moyenne parcourue par les photons émis par les scintillants, allant même jusqu'à la disparition complète du signal engendré par des émissions faibles, ce qui diminue le nombre de coups obtenu.

La présence de molécules colorées dans l'échantillon interfère avec l'absorbance des photons. Ce processus est réduit en décolorant les échantillons, comme le sang ou les organes, par traitement de l'échantillon au peroxyde d'hydrogène ou par une base forte. Ce traitement chimique réduit les différences entre échantillons mais il reste néanmoins primordial de calibrer le compteur avec des courbes de masquages, établies à partir d'étalons commerciaux, propres à chaque émetteur (PerkinElmer, ref N°6008502 pour le ^{14}C et ref : N°6008501 pour le ^3H , l'agent de masquage est le nitrométhane). Cela permet au compteur d'appliquer un facteur de correction dépendant du coefficient de masquage de la solution qu'il détecte.

C.2 Protocole de calibration du compteur

Le modèle de compteur à scintillation utilisé est un Compteur TRiCarb (Packard, Liquid Scintillation Analysers, modèle 2200CA). Avant chaque série de comptages, les étalons non masqués commerciaux sont comptés (^{14}C , ^3H et le blanc, ne présentant pas de radioactivité) pour normaliser l'appareil. Dans notre cas, nous souhaitons mesurer simultanément du ^3H et du ^{14}C . Pour cela un comptage en double canal est réalisé, avec une lecture du ^3H entre 0 et 12 keV et une lecture du ^{14}C entre 14 keV et 156 keV. Comme expliqué précédemment, le ^3H étant un émetteur de faible énergie, un temps de lecture de 10 minutes est nécessaire afin de détecter suffisamment de photons.

C.2.1 Lecture des radiotraceurs purs

Dans un premier temps, la linéarité et l'exactitude du comptage des radiotraceurs purs ont été vérifiées en comptant des quantités connues et croissantes de radiotraceurs. Le coefficient de corrélation obtenu pour le ^{14}C est de 0,9997 (quatre points) et de 0,9908 pour le ^3H (trois points), permettant de vérifier la linéarité de la méthode dans un volume de 10 mL de liquide à scintillation.

C.2.2 Influence du volume de liquide à scintillation

Les protocoles standards de comptage préconisent l'ajout de 20 mL de liquide à scintillation par fiole d'échantillon. Néanmoins, dans un souci de réduction des déchets radioactifs, un ajout de 10 mL de liquide à scintillation (Hionic fluor®, PerkinElmer) a été envisagé pour le comptage. L'impact sur la détection a été mesuré en remplissant dans un premier temps les fioles avec 10 ml de liquide à scintillation, en réalisant un premier comptage, puis en ajustant le volume de scintillant à 20 mL et en réalisant un second comptage. L'écart type sur le comptage des mesures réalisées avec les deux volumes de scintillant différent est inférieur à 2 % que ce soit pour le ^{14}C ou pour le ^3H (n= 4). Un volume de 10 mL de liquide à scintillation par fiole a donc été retenu pour le protocole.

C.2.3 Influence de la coloration

Cette expérience a pour but d'évaluer si la variation de la couleur des échantillons (variable suivant les organes analysés) a une influence sur la lecture de la radioactivité. Pour cela du sang radioactif a été plus ou moins décoloré et compté (n = 5 facteurs de colorations, quantité d' H_2O_2 constant, volume de sang variable). L'écart type sur la mesure est inférieur à 0,1 %, que ce soit pour le ^3H ou le ^{14}C . L'appareil permet donc de palier aux variations colorimétriques des échantillons biologiques.

C.2.4 Sensibilité de la détection

La nanoparticule, après injection, va être plus ou moins accumulée dans certains types d'organes. Cette expérience préliminaire permet d'évaluer le seuil de détection de la radioactivité afin d'ajuster la dose à injecter à l'animal. Pour cela des dilutions de quantité connue de radioactivité sont réalisées (allant jusqu'à 1/500 ème de la dose injectée) et l'écart type entre le comptage théorique et expérimental est mesuré. L'écart sur la mesure est de l'ordre de 4 % pour le ^3H et le ^{14}C . Cette valeur reste convenable car inférieure à ± 5 %.

C.3 Protocole de traitement des échantillons biologiques

A des temps définis après injection, l'animal va être sacrifié par ponction cardiaque, ce qui permet de retirer une grande partie de son volume sanguin. Pour des temps très courts (< 2h après injection), 10 mL de NaCl à 0,07 % vont être injectés via l'aorte abdominale afin de rincer les organes de la radioactivité présente dans le sang.

Puis les organes sont prélevés. Les organes de petites tailles (les deux ovaires ou surrénales, un rein) sont placés en entier dans la fiole à scintillation (N° 6000135/5*100 ; taille avec bouchon : 59,0 mm ; diamètre bouchon : 27,3 mm ; diamètre d'ouverture : 16 mm, Perkin Elmer). Pour les organes plus volumineux (comme le foie et la rate) environ 0,5 à 1 g sont prélevés pour l'analyse. Concernant les organes mous (comme le gras ou le muscle), environ 0,5 g sont prélevés. Brièvement, les organes sont pesés, solubilisés avec du soluène® (PerkinElmer) à 60 °C pendant 16 h. Les organes sont ensuite décolorés avec du peroxyde d'hydrogène avant de rajouter le liquide à scintillation, homogénéiser et lire au compteur à scintillation liquide.

Les désintégrations par minutes (DPM ou encore coups par minutes CPM = $DPM \times \% \text{ d'efficacité de lecture du compteur}$) sont alors données par le compteur. Ces DPM sont exprimées par rapport au pourcentage de dose expérimentale injectée pour chaque traceur par gramme de tissu. Exprimer les résultats de cette manière permet de s'affranchir de la masse propre de chaque organe et ainsi mettre en avant les organes d'accumulation.

D. Imagerie de fluorescence

Les images de fluorescence *in vivo* ou des organes prélevés sont acquises avec les systèmes d'imagerie Fluobeam™ commercialisés par Fluoptics (Figure 9). Lorsque le fluorophore utilisé est le DiD, la Fluobeam™ 700 ($\lambda_{\text{excitation}}$ à 680 nm / $\lambda_{\text{émission}}$ enregistrée au-dessus de 700 nm) est utilisée. Pour l'ICG, ce sera une Fluobeam™ 800 ($\lambda_{\text{excitation}}$ à 780 nm / $\lambda_{\text{émission}}$ enregistrée au-dessus de 800 nm) qui sera employée. Cette dernière sonde a été conçue plus spécifiquement pour un usage clinique.

Le principe de l'instrumentation développée par Fluoptics comporte un système d'éclairage filtré pour supprimer les longueurs d'onde du proche infrarouge correspondant aux longueurs d'ondes d'émission du traceur éclairant la zone d'intérêt. Un laser ayant une longueur d'onde proche du maximum d'absorption des fluorophores utilisés est diffusé sur cette même zone et permet d'exciter la fluorescence du traceur. La zone d'intérêt est vue par une caméra CCD filtrée qui ne détecte que les longueurs d'ondes correspondant à cette fluorescence.



Figure VI-9 : Photographie représentant la sonde Fluobeam™, commercialisée par Fluoptics®

Le système Fluobeam™ se présente sous la forme de deux éléments :

- un boîtier de contrôle qui contient l'ensemble de l'électronique de commande du système et la source laser fibrée ;
- une tête contenant la caméra, la sortie du laser et des LEDs filtrées qui fournissent un éclairage blanc avec un IRC élevé.

Ce système est commandé par un PC.

D.1 Méthode de prélèvement et de traitement des organes

A des temps définis après injection, l'animal va être sacrifié par ponction cardiaque, ce qui permet de retirer une grande partie du volume sanguin de l'animal. Puis les organes sont prélevés et disposés sur une compresse non tissée (ne présentant pas de fluorescence aux longueurs d'onde étudiées), imbibée de sérum physiologique afin d'éviter le dessèchement des organes, le tout placé dans une boîte de pétri pour permettre un transport facile entre la pièce de sacrifice et celle de l'acquisition. L'ensemble est positionné sous la caméra. Une photo optique est réalisée, puis le laser d'excitation est allumé et différentes photos en imagerie de fluorescence avec des différents temps d'acquisitions sont réalisées (généralement 80 ms, 100 ms, 150 ms de temps d'acquisition pour la Fluobeam™ 700). Il est vérifié qu'aucun organe n'émet un signal fluorescent suffisant pour saturer la caméra aux temps d'exposition choisis. Si tel est le cas, des acquisitions supplémentaires à des temps d'exposition plus courts sont réalisées.

D.2 Détermination de la fluorescence « corps entier »

Des acquisitions « corps entier » (*in vivo* ou après sacrifice) peuvent également être réalisées sur des souris FVB épilées. Leur pelage est tondu sous anesthésie gazeuse à 1,5 % en isoflurane, puis la peau est recouverte de crème dépilatoire pendant 5 min, avant d'être rincée abondamment à l'eau tiède afin d'éviter toute brûlure cutanée.

Une arrivée d'anesthésie gazeuse est placée sous la caméra de fluorescence afin de maintenir la souris endormie durant les expériences. Suivant le type de données à obtenir, une photo optique des quatre faces de l'animal est réalisée, puis des images de fluorescence acquises avec différent temps d'exposition (80 ms, 100 ms, et 150 ms, pour la Fluobeam™ 700).

D.3 Quantification

Il est nécessaire d'évaluer le signal d'autofluorescence des organes ou de la souris avant injection des traceurs. En effet, surtout aux longueurs d'onde de la Fluobeam™ 700, il existe certains organes présentant une forte autofluorescence, tel que les surrénales. Ce signal d'autofluorescence sera soustrait du signal obtenu après injection du traceur.

La quantification du signal de fluorescence est réalisée avec le logiciel de traitement d'images ImageJ™.

Pour l'imagerie *ex vivo*, trois souris ont été préalablement sacrifiées et une moyenne des autofluorescences de l'ensemble des organes ainsi que des fluides a été réalisée. Les photos à comparer devront être prises au même temps d'exposition. Puis, le contour de chaque organe est dessiné ; la moyenne de fluorescence pour chaque organe est obtenue, valeur à laquelle l'autofluorescence est soustraite.

Pour l'imagerie *in vivo*, une photo de chacun des animaux avant injection est réalisée. Cela est important surtout pour les souris porteuses de tumeur dont l'autofluorescence au niveau de la tumeur peut varier suivant l'état de développement de la tumeur. Les images obtenues sont ensuite traitées pour quantifier le signal de fluorescence au niveau des zones d'intérêt (tumeur, avant et après injection). L'autofluorescence est soustraite du signal obtenu après injection.

E. Histologie

Les lipidots et les fluorophores qu'elles encapsulent peuvent être dégradés par les protocoles de fixation et de congélation utilisés pour la préparation des échantillons pour l'analyse histologique. Il est donc important d'utiliser un protocole de fixation compatible avec une observation ultérieure du fluorophore encapsulé dans les lipidots sans risquer d'éteindre la fluorescence. Par exemple, les lipidots ne sont pas stables à la congélation et le fluorophore DiD encapsulé n'émet pas dans l'eau. Pour cela, différents protocoles ont été testés.

E.1 Choix du protocole de fixation

Une fois l'acquisition de la fluorescence par la Fluobeam™ réalisée, les organes sont placés dans des bains de fixations afin de réaliser de la cryo-histologie. Quatre modes de fixation ont été testés :

- la congélation directe dans l'azote liquide,
- 48 h à 4°C dans un mélange PFA (paraformaldéhyde) 4 %, puis 24 h à 4°C dans du PFA 4 % - sucrose 20 % et congélation à l'azote liquide. La présence de sucrose permet d'éviter la déformation et l'altération des tissus lors de la congélation.
- 48 h à 4°C dans du fixateur à base de Zinc (Pharmingén, France), puis 24 h à 4°C dans du PFA 4 % - sucrose 20 % puis congélation ou congélation directe dans l'azote liquide.
- 48 h à 4°C dans du fixateur RCl₂® (Alphelys, France), fixateur sans formol, puis 24 h à 4°C dans du PFA 4 % - sucrose 20 %, et congélation à l'azote liquide.

La congélation directe et l'utilisation du RCl₂® entraînent une extinction du signal de fluorescence. La fixation au PFA éteint une grande partie du signal de fluorescence (temps d'exposition > 5 s avec le microscope). En revanche, le fixateur à base de zinc, qui est plus doux, permet de conserver le signal de fluorescence. Une congélation directe des tissus après fixation entraîne une grande friabilité de l'organe au moment de la coupe. Il est préférable de réaliser un bain de 24 h avec un mélange de PFA et de sucrose avant congélation. Les organes sont ensuite coupés à une épaisseur de 5 µm avec le cryostat CM3050 S, Leica, avant d'être colorés.

E.2 Protocole de coloration

Lorsque des images de fluorescence sont à acquérir, la lame est seulement recouverte d'un marqueur du noyau cellulaire, le DAPI (Invitrogen®, France), coloration bleue. L'ensemble est placé entre lame et lamelle avant d'être observé au microscope (Axio Observer Z1, Zeiss).

Les coupes peuvent aussi être analysées après une coloration à l'hématoxyline éosine (noyaux bleus, cytoplasme rouge). Brièvement, les lames sont placées dans du PBS 1X avant d'être placées dans une solution d'hématoxyline de Harris (Sigma Aldrich, France). Après avoir à nouveau été lavée dans du PBS 1X, les lames sont ensuite placées dans de l'éosine puis rincées à l'eau du robinet et successivement rincées à dose croissante avec de l'éthanol (70 %, 90 %, éthanol absolu) avant d'être fixées et observées au microscope.

E.3 Protocole d'acquisition des images

Trois longueurs d'onde sont disponibles sur le microscope à fluorescence : (1) 488 nm, permet de visualiser la coloration par le DAPI (couleur bleue) et représente les noyaux des cellules; (2) 546 nm, permet l'analyse de l'autofluorescence des tissus à cette longueur d'onde (couleur verte); (3) 680 nm, permet l'analyse du DiD (couleur rouge) et donc par analogie le signal de la nanoparticule.

Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel AxioVision (Weiss). Les photos peuvent ensuite être converties sous Image®J. L'ensemble des paramètres ont été enregistrés lors de la première acquisition et restent inchangés au cours des expériences. Les échantillons peuvent néanmoins être comparés et leur intensité de signal évalué lorsque des temps d'acquisition plus élevés sont requis pour obtenir un même signal de fluorescence.

Conclusion générale

La preuve de concept de l'utilisation des lipidots comme agent de contraste fluorescent pour la détection de tumeurs (deux modèles de xénogreffes chez la souris *Nude*) avait été réalisée au cours de précédents travaux¹⁵⁴. L'objectif de cette thèse était de déterminer de manière précise le comportement des lipidots chez l'être vivant et le temps au bout duquel la nanoparticule commence à être métabolisée dans l'organisme. Avec ces données, il a été possible de déterminer les domaines d'application les plus pertinents pour les lipidots.

Les expériences de triple marquage des lipidots ont mis en évidence que le cœur de la nanoparticule, et donc potentiellement son contenu, est stable *in vivo* 6 h après l'injection avant de commencer à être métabolisé et éliminé dans les 48 h suivant administration. La voie de métabolisation et d'élimination est principalement hépatique avec un tropisme majeur des nanoparticules pour cet organe. Il est également observé un tropisme particulier des lipidots pour les organes stéroïdiens, à savoir les surrénales et les ovaires, et plus particulièrement les zones de synthèses d'hormones lipophiles (progestérone dans le corps jaune, cortisol dans la corticosurrénale). Cette affinité est probablement due à la similarité de structure des lipidots avec les lipoprotéines sanguines comme les chylomicrons, dont le rôle est d'apporter vers les organes les lipides et le cholestérol nécessaire à la synthèse d'hormones stéroïdiennes.

Cette affinité particulière peut être exploitée en encapsulant des hormones ovariennes, de nature lipophile, donc adaptée au nanovecteur. L'encapsulation d'œstradiol ou d'éthynil œstradiol permet alors d'envisager des formes à diffusion passive d'hormones placées à proximité des organes génitaux (ovaires, utérus) qui amèneraient préférentiellement le contenu des nanoparticules, via le tropisme naturel des lipidots, vers les ovaires. Cette forme d'administration permettrait d'éviter le premier passage hépatique particulièrement destructeur pour ces hormones, et de diminuer les effets secondaires par une diminution de dose administrée grâce au tropisme préférentiel de lipidots vers l'organe cible. Un important développement sur ce sujet reste à faire, seule la preuve de concept de l'encapsulation d'hormone ayant été réalisé à ce jour.

La possible utilisation des lipidots pour le design d'agents d'imagerie nucléaire clinique a été démontré, via des essais d'encapsulation de technétium pour de la tomographie à émission monophotonique. Cela pourrait permettre par exemple, d'obtenir des agents de contraste pour la détection des maladies cardiovasculaires par exemple. Des essais d'encapsulation du vert d'indocyanine (ICG), seul fluorophore autorisé par l'EMA pour l'injection chez l'homme a été testée. La nature amphiphile de ce composé et sa grande affinité pour les protéines plasmatiques n'ont pas permis d'obtenir un nano-objet stable après injection. En revanche, avec un fluorophore plus lipophile, comme le DiD, un excellent agent de contraste en imagerie de fluorescence est développé.

L'utilisation de ce traceur permet de détecter les zones tumorales avec la simple utilisation des lipidots ou des lipidots greffées avec un peptide de ciblage sur la couronne, dans notre cas le cRGD. L'intensité de fluorescence dans la tumeur, obtenue avec ou sans peptide est identique, mais une internalisation importante des lipidots dans les cellules tumorales est observée par histologie lorsque les nanoparticules sont porteuses du peptide de ciblage. Cette localisation spécifique laisse envisager de nombreuses applications en radiothérapie et en thérapie médicamenteuse pour internaliser des agents radioactifs ou anti-cancéreux.

En conclusion, ce travail, basé sur la caractérisation complète du comportement *in vivo* des lipidots, a permis d'apercevoir l'ensemble des applications potentielles pour ce vecteur, que ce soit (1) en imagerie clinique de fluorescence pour la résection tumorale per-opératoire, (2) en imagerie nucléaire pour évaluer des paramètres physiologiques ou localiser des tumeurs, (3) pour amener préférentiellement des agents d'imagerie, de radiothérapie ou chimiothérapeutiques dans la tumeur avec une possibilité d'internalisation dans les cellules et enfin (4) exploiter le tropisme naturel des lipidots pour les zones de synthèse d'hormones stéroïdiennes pour utiliser ce vecteur dans le traitement des cancers hormono-dépendants et dans la délivrance ciblée d'hormones stéroïdiennes pour les thérapies hormonales.

Bibliographie

1. **Lawrence** AS, Capper CB, Hume K and Bingham A, Penetration of water + aqueous soap solutions into fatty substances containing one or two polar groups. *J Phys Chem* 68:3470-& (1964).
2. **Yamanaka** M, Nakai M and Ookawa N, On the lipid particle liposome in some sensitized cells. *J Electron Microsc* 13:44-44 (1964).
3. **Shlunk** FF and Lombardi B, Lipoprotein metabolism and liposome concept. *Bulletin of Pathology* 10:17-& (1969).
4. **Lei** PP, Ferrari M, Vogel V and Baker JR, The frontiers of nanotechnology and nanomedicine, in *Asis 2000: Proceedings of the 63rd Asis Annual Meeting, Vol 37, 2000*. Information Today Inc, Medford, pp. 496-496 (2000).
5. **Voss** D, Nanomedicine nears the clinic. *Technol Rev* 103:60+ (2000).
6. http://www.futura-sciences.com/fr/definition/t/technologie-2/d/nanoparticule_6478/
7. <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/16-3.pdf>
8. **Lindfors** L, Nanoparticle formulations of poorly soluble drugs. *J Pharm Pharmacol* 56:S109-S109 (2004).
9. **Moghimi** SM, Hunter AC and Murray JC, Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* 19:311-330 (2005).
10. **Liu** YY, Miyoshi H and Nakamura M, Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* 120:2527-2537 (2007).
11. **Nel** AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V and Thompson M, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8:543-557 (2009).
12. **Dreher** MR, Liu WG, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F and Chilkoti A, Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 98:335-344 (2006).
13. **Texier** I, Goutayer M, Da Silva A, Guyon L, Djaker N, Josserand V, Neumann E, Bibette J and Vinet F, Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging, in *J Biomed Opt*, pp. 11 (2009).
14. **Allen** TM, Hansen C, Martin F, Redemann C and Yauyoung A, liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half lives in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1066:29-36 (1991).
15. **Byrne** JD, Betancourt T and Brannon-Peppas L, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1615-1626 (2008).
16. **Baban** DF and Seymour LW, Control of tumour vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev* 34:109-119 (1998).
17. **Pope-Harman** A, Cheng MMC, Robertson F, Sakamoto J and Ferrari M, Biomedical nanotechnology for cancer. *Med Clin N Am* 91:899+ (2007).
18. **Cheng** MMC, Cuda G, Bunimovich YL, Gaspari M, Heath JR, Hill HD, Mirkin CA, Nijdam AJ, Terracciano R, Thundat T and Ferrari M, Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology* 10:11-19 (2006).
19. **Ferrari** M, Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161-171 (2005).
20. **Fang** J, Nakamura H and Maeda H, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 63:136-151 (2011).
21. **Iyer** AK, Khaled G, Fang J and Maeda H, Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 11:812-818 (2006).
22. **Prakash** S, Malhotra M, Shao W, Tomaro-Duchesneau C and Abbasi S, Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 63:1340-1351 (2011).

23. **Chen K**, Li ZB, Wang H, Cai WB and Chen XY, Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2235-2244 (2008).
24. **Maeda H**, Wu J, Sawa T, Matsumura Y and Hori K, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65:271-284 (2000).
25. **Seigneuric R**, Markey L, Nuyten DSA, Dubernet C, Evelo CTA, Finot E and Garrido C, From Nanotechnology to Nanomedicine: Applications to Cancer Research. *Curr Mol Med* 10:640-652 (2010).
26. **Wang M** and Thanou M, Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res* 62:90-99.
27. **Line BR**, Weber P, Wurthman S, Salgam M and Bennett JA, Intravascular targeting of tumor angiogenesis via TC-99m radiolabeled peptide antagonists of the alpha(v)beta(3) integrin. *J Nucl Med* 40:79P-79P (1999).
28. **Kumar CC**, Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets* 4:123-131 (2003).
29. **Nemeth JA**, Cher ML, Zhou Z, Mullins C, Bhagat S and Trikha M, Inhibition of alpha v beta 3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 20:413-420 (2003).
30. **Stevens PJ**, Sekido M and Lee RJ, A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm Res* 21:2153-2157 (2004).
31. **Lee RJ** and Huang L, Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem* 271:8481-8487 (1996).
32. **Cressman S**, Dobson I, Lee JB, Tam YYC and Cullis PR, Synthesis of a Labeled RGD-Lipid, Its Incorporation into Liposomal Nanoparticles, and Their Trafficking in Cultured Endothelial Cells. *Bioconjugate Chem* 20:1404-1411 (2009).
33. **Jin ZH**, Furukawa T, Galibert M, Boturny D, Coll JL, Fukumura T, Saga T, Dumy P and Fujibayashi Y, Noninvasive visualization and quantification of tumor alpha(V)beta(3) integrin expression using a novel positron emission tomography probe, Cu-64-cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Nuclear Medicine and Biology* 38:529-540 (2011).
34. http://www4.inra.fr/cepia_eng/You-are-looking-for/Results/nanoparticles
35. http://www.nanocotechnologies.com/content/library/newsandevents/articles/Material_Matters__Commercial_volumes_of_quantum_dots__controlled_nanoscale_synthesis_and_micronscales_applications/45.aspx
36. **Pham T**, Jackson JB, Halas NJ and Lee TR, Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers. *Langmuir* 18:4915-4920 (2002).
37. **Glazer ES**, Zhu CH, Hamir AN, Borne A, Thompson CS and Curley SA, Biodistribution and acute toxicity of naked gold nanoparticles in a rabbit hepatic tumor model. *Nanotoxicology* 5:459-468 (2011).
38. **De Jong WH**, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips A and Geertsma RE, Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29:1912-1919 (2008).
39. **Balasubramanian SK**, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Yu LE and Ong W-Y, Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31:2034-2042 (2010).
40. **Boyer C**, Whittaker MR, Bulmus V, Liu JQ and Davis TP, The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater* 2:23-30.
41. **Bruns O**, Ittrich H, Tromsdorf U, Beisiegel U and Heeren J, Real time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Atheroscler Suppl* 10:1 (2009).
42. **Lankveld DPK**, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost de Jong A, Noorlander CW, Van Eijkeren JCH, Geertsma RE and De Jong WH, The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 31:8350-8361 (2010).

43. **Hu JM**, Qian YF, Wang XF, Liu T and Liu SY, Drug-Loaded and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface-Embedded Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Integrated Chemotherapeutic Drug Delivery and MR Imaging. *Langmuir* 28:2073-2082 (2012).
44. **Schweiger C**, Gil P, Parak W and Kissel T, MRI contrast enhancement potential of different superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) formulations. *J Control Release* 148:E67-E68 (2011).
45. **Bera D**, Qian L, Tseng TK and Holloway PH, Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials* 3:2260-2345 (2010).
46. **Duconge F**, Pons T, Pestourie C, Herin L, Theze B, Gombert K, Mahler B, Hinnen F, Kuhnast B, Dolle F, Dubertret B and Tavitian B, Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales. *Bioconjugate Chem* 19:1921-1926 (2008).
47. **Tu CQ**, Ma XC, House A, Kauzlarich SM and Louie AY, PET Imaging and Biodistribution of Silicon Quantum Dots in Mice. *ACS Med Chem Lett* 2:285-288 (2011).
48. **Al-Jamal WT**, Al-Jamal KT, Cakebread A, Halket JM and Kostarelos K, Blood Circulation and Tissue Biodistribution of Lipid-Quantum Dot (L-QD) Hybrid Vesicles Intravenously Administered in Mice. *Bioconjugate Chem* 20:1696-1702 (2009).
49. **Choi HS**, Ipe BI, Misra P, Lee JH, Bawendi MG and Frangioni JV, Tissue- and Organ-Selective Biodistribution of NIR Fluorescent Quantum Dots. *Nano Lett* 9:2354-2359 (2009).
50. **Han Y**, Xie GY, Sun ZW, Mu Y, Han SH, Xiao Y, Liu N, Wang H, Guo CX, Shi ZX, Li YB and Huang PL, Plasma kinetics and biodistribution of water-soluble CdTe quantum dots in mice: a comparison between Cd and Te. *J Nanopart Res* 13:5373-5380 (2011).
51. **Pic E**, Bezdetnaya L, Guillemain F and Marchal F, Quantification Techniques and Biodistribution of Semiconductor Quantum Dots. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 9:295-303 (2009).
52. **Choi HS**, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, Bawendi MG and Frangioni JV, Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* 25:1165-1170 (2007).
53. <http://www.biomedsearch.com/nih/Factors-affecting-clearance-biodistribution-polymeric/18672949.html>
54. **Muller BG**, Leuenberger H and Kissel T, Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: An optimized manufacturing technique. *Pharm Res* 13:32-37 (1996).
55. **Scheffel U**, Wagner HN, Rhodes BA and Nataraja.Tk, albumin microspheres for study of reticuloendothelial system. *J Nucl Med* 13:498-& (1972).
56. **Bossy-Nobs L**, Gurny R, Buchegger F and Allemann E, Strategies for tumor targeting with polymeric nanoparticles possibilities and limitations. *Eur J Pharm Sci* 25:S7-S8 (2005).
57. **Nassar T**, Rom A, Nyska A and Benita S, A Novel Nanocapsule Delivery System to Overcome Intestinal Degradation and Drug Transport Limited Absorption of P-glycoprotein Substrate Drugs. *Pharm Res* 25:2019-2029 (2008).
58. **Cho Y**, Shi RY, Ivanisevic A and Ben Borgens R, A mesoporous silica nanosphere-based drug delivery system using an electrically conducting polymer. *Nanotechnology* 20:12 (2009).
59. **Batheja P**, Sheihet L, Kohn J, Singer AJ and Michniak-Kohn B, Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *J Control Release* 149:159-167 (2011).
60. **Allmeroth M**, Moderegger D, Biesalski B, Koynov K, Rosch F, Thews O and Zentel R, Modifying the Body Distribution of HPMA-Based Copolymers by Molecular Weight and Aggregate Formation. *Biomacromolecules* 12:2841-2849 (2011).
61. **Sasatsu M**, Onishi H and Machida Y, In vitro and in vivo characterization of nanoparticles made of MeO-PEG amine/PLA block copolymer and PLA. *Int J Pharm* 317:167-174 (2006).
62. **Muller RH**, Wallis KH, Troster SD and Kreuter J, in vitro characterization of poly(methyl-methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. *J Control Release* 20:237-246 (1992).

63. **Soppimath** KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR and Rudzinski WE, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70:1-20 (2001).
64. **Ehrenberg** MS, Friedman AE, Finkelstein JN, Oberdorster G and McGrath JL, The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30:603-610 (2009).
65. **Lundqvist** M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T and Dawson KA, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14265-14270 (2008).
66. **Gregoriadis** G, liposomes as drug carriers. *Pharmacy International* 4:33-37 (1983).
67. **Gregoriadis** G, liposomes in drug delivery - editorial. *J Drug Target* 2:349-349 (1994).
68. **Shailesh** S, Liposomes: a review, in 2009 (2009).
69. **Mufamadi** MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D and Ndesendo VMK, A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* (2011).
70. **Kawakami** S, Munakata C, Fumoto S, Yamashita F and Hashida M, Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs. *J Pharm Sci* 90:105-113 (2001).
71. **Mougin-Degraef** M, Bourdeau C, Jestin E, Sai-Maurel C, Bourgeois A, Remaud-Le Saec P, Thedrez P, Gestin JF, Barbet J and Faivre-Chauvet A, Doubly radiolabeled liposomes for pretargeted radioimmunotherapy. *Int J Pharm* 344:110-117 (2007).
72. **Helbok** A, Rangger C, von Guggenberg E, Saba-Lepek M, Radolf T, Thurner G, Andreae F, Prassl R and Decristoforo C, Targeting properties of peptide-modified radiolabeled liposomal nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2011).
73. **Khalid** MN, Simard P, Hoarau D, Dragomir A and Leroux JC, Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharm Res* 23:752-758 (2006).
74. **Park** YS, Maruyama K and Huang L, some negatively charged phospholipid derivatives prolong the liposome circulation in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1108:257-260 (1992).
75. **Farhood** H, Serbina N and Huang L, the role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1235:289-295 (1995).
76. **Kumar** G, Sharma S, Shafiq N, Khuller GK and Malhotra S, Optimization, in vitro-in vivo evaluation, and short-term tolerability of novel levofloxacin-loaded PLGA nanoparticle formulation. *J Pharm Sci* 101:2165-2176 (2012).
77. <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/673968/fig3/>
78. **Phillips** WT, Goins BA and Bao A, Radioactive liposomes. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1:69-83 (2009).
79. **Laverman** P, Dams ETM, Oyen WJG, Storm G, Koenders EB, Prevost R, van der Meer JWM, Corstens FHM and Boerman OC, A novel method to label liposomes with Tc-99m by the hydrazino nicotinyl derivative. *J Nucl Med* 40:192-197 (1999).
80. **Laverman** P, van Bloois L, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM and Storm G, Lyophilization of Tc-99m-HYNIC labeled PEG-liposomes. *J Liposome Res* 10:117-129 (2000).
81. **Weyland** M, Manero F, Paillard A, Gräfe D, Vault G, Jarnet D, Menei P, Juin P, Chourpa I, Benoit JP, Grace R and Garcion E, Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J Control Release* 151:74-82 (2010).
82. **Mason** TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB and Graves SM, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties (vol 19, pg 079001, 2007). *J Phys-Condens Matter* 19:1 (2007).
83. **Harnisch** S and Muller RH, Adsorption kinetics of plasma proteins on oil-in-water emulsions for parenteral nutrition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49:41-46 (2000).

84. **Venkataram S**, Awini WM, Jordan K and Rahman YE, Pharmacokinetics of 2 alternative dosage forms for cyclosporine - liposomes and intralipid. *J Pharm Sci* 79:216-219 (1990).
85. **Lee KC**, Maturo C, Rodriguez R, Nguyen HL and Shorr R, Nanomedicine-Nanoemulsion Formulation Improves Safety and Efficacy of the Anti-Cancer Drug Paclitaxel According to Preclinical Assessment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11:6642-6656 (2011).
86. **Chhabra G**, Chuttani K, Mishra AK and Pathak K, Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm* 37:907-916 (2011).
87. **Jia L**, Zhang D, Li Z, Duan C, Wang Y, Feng F, Wang F, Liu Y and Zhang Q, Nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80:213-218 (2010).
88. **Bargoni A**, Cavalli R, Zara GP, Fundaro A, Caputo O and Gasco MR, Transmucosal transport of tobramycin incorporated in solid lipid nanoparticles (SLN) after duodenal administration to rats. Part II - Tissue distribution. *Pharmacol Res* 43:497-502 (2001).
89. **Mehnert W** and MÄxder K, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:165-196 (2001).
90. **Schwarz C**, Mehnert W, Lucks JS and Muller RH, solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery .1. controled drug delivery. *J Control Release* 30:83-96 (1994).
91. **Muller RH**, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, Zurmuhlen A, Weyhers H, Freitas C and Ruhl D, solid lipid nanoparticles (SLN) - an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivety. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 41:62-69 (1995).
92. **Saupe A**, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C and Muller RH, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - Structural investigations on two different carrier systems. *Bio-Med Mater Eng* 15:393-402 (2005).
93. **Hureaux J**, Lagarce F, Gagnadoux F, Clavreul A, Benoit JP and Urban T, The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals. *Int J Pharm* 379:266-269 (2009).
94. **Heurtault B**, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R and Benoit JP, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 18:55-61 (2003).
95. **Cahouet A**, Denizot B, Hindre F, Passirani C, Heurtault B, Moreau M, Le Jeune JJ and Benoit JP, Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using scintigraphy and gamma counting. *Int J Pharm* 242:367-371 (2002).
96. **Hureaux J**, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Clavreul A, Roger E, Kempf M, Racineux JL, Diot P, Benoit JP and Urban T, Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73:239-246 (2009).
97. **Lasserross N**, Miyakawa H, Levram V, Young SR and Ross WN, high time resolution fluorescence imaging with a CCD camera. *J Neurosci Methods* 36:253-261 (1991).
98. **Godavarty A**, Eppstein MJ, Zhang CY and Sevick-Muraca EM, Detection of single and multiple targets in tissue phantoms with fluorescence-enhanced optical imaging: Feasibility study. *Radiology* 235:148-154 (2005).
99. **Park JM** and Gambhir SS, Multimodality radionuclide, fluorescence, and bioluminescence small-animal imaging. *Proc IEEE* 93:771-783 (2005).
100. **Longmire MR**, Gunn AJ, Morgan NY, Smith PD, Pohida TJ, Koyama Y, Kobayashi H and Choyke PL, Real-time fluorescence-enhanced imaging as an aid to surgery in ovarian cancer. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 13:1602-1609 (2007).
101. **Mieog JSD**, Vahrmeijer AL, Hutteman M, van der Vorst JR, van Hooff MD, Dijkstra J, Kuppen PJK, Keijzer R, Kaijzel EL, Que I, van de Velde CJH and Lowik C, Novel Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Camera System for Optical Image-Guided Cancer Surgery. *Molecular Imaging* 9:223-231 (2010).

102. **Boutet J**, Debourdeau M, Herve L, Laidevant A, Dinten JM, Vray D, Nguyen-Dinh A, Messineo O, Georges P, Grenier N, Morin F, Hanna M and Druon F, A bimodal fluorescence and ultrasound probe to guide prostate biopsy. *IRBM* 32:123-125 (2011).
103. **Boutet J**, Koenig A, Herve L, Berger M, Dinten JM, Josserand V and Coll JL, Optical tomograph optimized for tumor detection inside highly absorbent organs. *Opt Eng* 50:6 (2011).
104. **Herve L**, Da Silva A, Boutet J, Frassati A, Dinten JM, Peltie P and Rizo P, Non contact fluorescence optical tomography by means of numerical and analytical approaches. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A-Accel Spectrom Dect Assoc Equip* 571:203-206 (2007).
105. **Herve L**, Da Silva A, Koenig A, Dinten JM, Boutet J, Berger M, Texier I, Peltie P and Rizo P, Fluorescence tomography enhanced by taking into account the medium heterogeneity. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A-Accel Spectrom Dect Assoc Equip* 571:60-63 (2007).
106. **Koenig A**, Herve L, Da Silva A, Dinten JM, Boutet J, Berger M, Texier I, Peltie P, Rizo P, Josserand V and Coll JL, Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A-Accel Spectrom Dect Assoc Equip* 571:56-59 (2007).
107. **Koenig A**, Herve L, Gonon G, Josserand V, Berger M, Dinten JM, Boutet J, Peltie P, Coll JL and Rizo P, Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies. *J Biomed Opt* 15:8 (2010).
108. **Koenig A**, Herve L, Josserand V, Berger M, Boutet J, Da Silva A, Dinten JM, Peltie P, Coll JL and Rizo P, In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *J Biomed Opt* 13:9 (2008).
109. **Yang Z**, Zheng SY, Harrison WJ, Harder J, Wen XX, Gelovani JG, Qiao A and Li C, Long-circulating near-infrared fluorescence core-cross-linked polymeric micelles: Synthesis, characterization, and dual nuclear/optical imaging. *Biomacromolecules* 8:3422-3428 (2007).
110. **Sevick-Muraca EM**, Houston JP and Gurfinkel M, Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Current Opinion in Chemical Biology* 6:642-650 (2002).
111. **Kamaly N**, Kalber T, Ahmad A, Oliver MH, So PW, Herlihy AH, Bell JD, Jorgensen MR and Miller AD, Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjugate Chem* 19:118-129 (2008).
112. **Janjic JM**, Srinivas M, Kadayakkara DKK and Ahrens ET, Self-delivering nanoemulsions for dual fluorine-19 MRI and fluorescence detection. *J Am Chem Soc* 130:2832-2841 (2008).
113. **Wang D**, Qian J, He SL, Park JS, Lee KS, Han SH and Mu Y, Aggregation-enhanced fluorescence in PEGylated phospholipid nanomicelles for in vivo imaging. *Biomaterials* 32:5880-5888 (2011).
114. **Hilderbrand SA**, Kelly KA, Niedre M and Weissleder R, Near infrared fluorescence-based bacteriophage particles for ratiometric pH imaging. *Bioconjugate Chem* 19:1635-1639 (2008).
115. **Scutaru AM**, Kruger M, Wenzel M, Richter J and Gust R, Investigations on the Use of Fluorescence Dyes for Labeling Dendrimers: Cytotoxicity, Accumulation Kinetics, and Intracellular Distribution. *Bioconjugate Chem* 21:2222-2226 (2010).
116. **Papagiannaros A**, Kale A, Levchenko TS, Mongayt D, Hartner WC and Torchilin VP, Near infrared planar tumor imaging and quantification using nanosized Alexa 750-labeled phospholipid micelles. *Int J Nanomed* 4:123-131 (2009).
117. **Cormode DP**, Jarzyna PA, Mulder WJM and Fayad ZA, Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 62:329-338 (2010).
118. **Corbin IR**, Chen J, Cao W, Li H, Lund-Katz S and Zheng G, Enhanced cancer-targeted delivery using engineered high-density lipoprotein-based nanocarriers. *J Biomed Nanotechnol* 3:367-376 (2007).
119. **Chen B**, Jerger K, Frechet JMJ and Szoka FC, The influence of polymer topology on pharmacokinetics: Differences between cyclic and linear PEGylated poly(acrylic acid) comb polymers. *J Control Release* 140:203-209 (2009).

120. **Zheng** G, Chen J, Li H and Glickson JD, Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17757-17762 (2005).
121. **Deissler** V, Ruger R, Frank W, Fahr A, Kaiser WA and Hilger I, Fluorescent liposomes as contrast agents for in vivo optical imaging of edemas in mice. *Small* 4:1240-1246 (2008).
122. **Arunkumar** E, Forbes CC and Smith BD, Improving the properties of organic dyes by molecular encapsulation. *Eur J Org Chem*:4051-4059 (2005).
123. **Almutairi** A, Akers WJ, Berezin MY, Achilefu S and Frechet JMJ, Monitoring the Biodegradation of Dendritic Near-Infrared Nanoprobes by in Vivo Fluorescence Imaging. *Mol Pharm* 5:1103-1110 (2008).
124. **Quadir** MA, Radowski MR, Kratz F, Licha K, Hauff P and Haag R, Dendritic multishell architectures for drug and dye transport. *J Control Release* 132:289-294 (2008).
125. **Jin** YH, Ye FM, Zeigler M, Wu CF and Chiu DT, Near-Infrared Fluorescent Dye-Doped Semiconducting Polymer Dots. *ACS Nano* 5:1468-1475 (2011).
126. **Tanisaka** H, Kizaka-Kondoh S, Makino A, Tanaka S, Hiraoka M and Kimura S, Near-infrared fluorescent labeled peptosome for application to cancer imaging. *Bioconjugate Chem* 19:109-117 (2008).
127. **Kumar** R, Ohulchanskyy TY, Roy I, Gupta SK, Borek C, Thompson ME and Prasad PN, Near-Infrared Phosphorescent Polymeric Nanomicelles: Efficient Optical Probes for Tumor Imaging and Detection. *ACS Appl Mater Interfaces* 1:1474-1481 (2009).
128. **Pietkiewicz** J, Zielinska K, Saczko J, Kulbacka J, Majkowski M and Wilk KA, New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: Hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization in cancer cells. *Eur J Pharm Sci* 39:322-335 (2010).
129. **Yang** Z, Leon J, Martin M, Harder JW, Zhang R, Liang D, Lu W, Tian M, Gelovani JG, Qiao A and Li C, Pharmacokinetics and biodistribution of near-infrared fluorescence polymeric nanoparticles. *Nanotechnology* 20:11 (2009).
130. **Lee** YD, Lim CK, Kim S, Kwon IC and Kim J, Squaraine-Doped Functional Nanoprobes: Lipophilically Protected Near-Infrared Fluorescence for Bioimaging. *Adv Funct Mater* 20:2786-2793 (2010).
131. **Sun** GR, Berezin MY, Fan JD, Lee H, Ma J, Zhang K, Wooley KL and Achilefu S, Bright fluorescent nanoparticles for developing potential optical imaging contrast agents. *Nanoscale* 2:548-558.
132. **Miki** K, Oride K, Inoue S, Kuramochi Y, Nayak RR, Matsuoka H, Harada H, Hiraoka M and Ohe K, Ring-opening metathesis polymerization-based synthesis of polymeric nanoparticles for enhanced tumor imaging in vivo: Synergistic effect of folate-receptor targeting and PEGylation. *Biomaterials* 31:934-942 (2010).
133. **Masotti** A, Vicennati P, Boschi F, Calderan L, Sbarbati A and Ortaggi G, A novel near-infrared indocyanine dye - Polyethylenimine conjugate allows DNA delivery imaging in vivo. *Bioconjugate Chem* 19:983-987 (2008).
134. **Schadlich** A, Rose C, Kuntsche J, Caysa H, Mueller T, Gopferich A and Mader K, How Stealthy are PEG-PLA Nanoparticles? An NIR In Vivo Study Combined with Detailed Size Measurements. *Pharm Res* 28:1995-2007.
135. **Tong** R, Coyle VJ, Tang L, Barger AM, Fan TM and Cheng JJ, Polylactide Nanoparticles Containing Stably Incorporated Cyanine Dyes for In Vitro and In Vivo Imaging Applications. *Microsc Res Tech* 73:901-909 (2010).
136. **Melancon** MP, Wang W, Wang YT, Shao RP, Ji XJ, Gelovani JG and Li C, A novel method for Imaging in vivo degradation of poly(L-glutamic acid), a biodegradable drug carrier. *Pharm Res* 24:1217-1224 (2007).
137. **Agrawal** P, Strijkers GJ and Nicolay K, Chitosan-based systems for molecular imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 62:42-58 (2010).

138. **Lovell** JF, Jin CS, Huynh E, Jin HL, Kim C, Rubinstein JL, Chan WCW, Cao WG, Wang LV and Zheng G, Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents. *Nat Mater* 10:324-332 (2011).
139. **Ghoroghchian** PP, Frail PR, Susumu K, Blessington D, Brannan AK, Bates FS, Chance B, Hammer DA and Therien MJ, Near-infrared-emissive polymersomes: Self-assembled soft matter for in vivo optical imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2922-2927 (2005).
140. **Ghoroghchian** PP, Frail PR, Li GZ, Zupancich JA, Bates FS, Hammer DA and Therien MJ, Controlling bulk optical properties of emissive polymersomes through intramembranous polymer-fluorophore interactions. *Chem Mat* 19:1309-1318 (2007).
141. **Christian** NA, Milone MC, Ranka SS, Li G, Frail PR, Davis KP, Bates FS, Therien MJ, Ghoroghchian PP, June CH and Hammer DA, Tat-Functionalized Near-Infrared Emissive Polymersomes for Dendritic Cell Labeling. *Bioconjugate Chem* 18:31-40 (2006).
142. **Duncan** TV, Ghoroghchian PP, Rubtsov IV, Hammer DA and Therien MJ, Ultrafast excited-state dynamics of nanoscale near-infrared emissive polymersomes. *J Am Chem Soc* 130:9773-9784 (2008).
143. **Chen** J, Corbin IR, Li H, Cao WG, Glickson JD and Zheng G, Ligand conjugated low-density lipoprotein nanoparticles for enhanced optical cancer imaging in vivo. *J Am Chem Soc* 129:5798-+ (2007).
144. **Regino** CAS, Ogawa M, Alford R, Wong KJ, Kosaka N, Williams M, Feild BJ, Takahashi M, Choyke PL and Kobayashi H, Two-Step Synthesis of Galactosylated Human Serum Albumin as a Targeted Optical Imaging Agent for Peritoneal Carcinomatosis. *J Med Chem* 53:1579-1586 (2010).
145. **Terreno** E, Cabella C, Carrera C, Castelli DD, Mazzon R, Rollet S, Stancanello J, Visigalli M and Aime S, From spherical to osmotically shrunken paramagnetic liposomes: An improved generation of LIPOCEST MRI agents with highly shifted water protons. *Angew Chem-Int Edit* 46:966-968 (2007).
146. **Texier** I, Goutayer M, Da Silva A, Guyon L, Djaker N, Josserand V, Neumann E, Bibette J and Vinet F, Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 14:11 (2009).
147. **Gravier** J, Navarro FP, Delmas T, Mittler F, Couffin AC, Vinet F and Texier I, Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 16:10 (2011).
148. **Navarro** FP, Berger M, Goutayer M, Guillermet S, Josserand V, Rizo P, Vinet F and Texier I, A novel indocyanine green nanoparticle probe for non invasive fluorescence imaging in vivo, in *Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications*. Spie-Int Soc Optical Engineering, Bellingham (2009).
149. **Merian** J, Boisgard R, Declèves X, Boisseau P, Texier I and Tavitian B, Pharmacokinetics and biodistribution in FVB mice of radioactive and fluorescent triply-labeled lipid nanoparticles. *Bull Cancer* 98:S59-S59 (2012).
150. Thèse M. Goutayer, <http://www.lcmd.espci.fr/upload/goutayerphd.pdf>
151. Thèse T. Delmas, Paris VI Pierre et Marie Curie, soutenue en juin 2011.
152. **Delmas** T, Couffin AC, Bayle PA, de Crecy F, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J and Texier I, Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J Colloid Interface Sci* 360:471-481 (2011).
153. **Delmas** T, Amandine Fraichard, Pierre-Alain Bayle, Isabelle Texier, Michel Bardet, Jean Baudry, Jérôme Bibette and Anne-Claude Couffin¹, Encapsulation and Release Behavior from Lipid Nanoparticles: Model Study with the Nile Red Fluorophore. *Journal of Colloid Science and Biotechnology Vol. 1*, 1–10 (2012).
154. **Goutayer** M, Dufort S, Josserand V, Royere A, Heinrich E, Vinet F, Bibette J, Coll JL and Texier I, Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by in vivo fluorescence imaging. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75:137-147 (2009).

155. **Li M**, Al-Jamal KT, Kostarelos K and Reineke J, Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *ACS Nano* 4:6303-6317 (2010).
156. **Moghimi SM**, Hunter AC and Andresen TL, Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective, in *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 52. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 481-503 (2010).
157. **Zolnik BS** and Sadrieh N, Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 61:422-427 (2009).
158. **Yang RSH**, Chang LW, Yang CS and Lin P, Pharmacokinetics and Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10:8482-8490 (2010).
159. **Yim YS**, Choi JS, Jang SB, Kim GT, Park K, Kim CH, Cheon J and Kim DG, Pharmacokinetic properties and tissue storage of FITC conjugated SA-MnMEIO nanoparticles in mice. *Curr Appl Phys* 9:E304-E307 (2009).
160. **Xu XM**, Wang YS, Chen RY, Feng CL, Yao F, Tong SS, Wang L, Yamashita F and Yu JN, Formulation and Pharmacokinetic Evaluation of Tetracycline-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Subcutaneous Injection in Mice. *Chem Pharm Bull* 59:260-265 (2011).
161. **Awasthi VD**, Goins B, Klipper R and Phillips WT, Dual radiolabeled liposomes: Biodistribution studies and localization of focal sites of infection in rats. *Nuclear Medicine and Biology* 25:155-160 (1998).
162. **Tiwari R** and Pathak K, Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int J Pharm* 415:232-243 (2011).
163. **Sadekar S**, Ray A, Janat-Amsbury M, Peterson CM and Ghandehari H, Comparative Biodistribution of PAMAM Dendrimers and HPMA Copolymers in Ovarian-Tumor-Bearing Mice. *Biomacromolecules* 12:88-96 (2011).
164. **Kucka J**, Hruby M and Lebeda O, Biodistribution of a radiolabelled thermoresponsive polymer in mice. *Appl Radiat Isot* 68:1073-1078 (2010).
165. **Nigavekar SS**, Sung LY, Llanes M, El-Jawahri A, Lawrence TS, Becker CW, Balogh L and Khan MK, H-3 dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharm Res* 21:476-483 (2004).
166. **Hoarau D**, Delmas P, David S, Roux E and Leroux JC, Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res* 21:1783-1789 (2004).
167. **Pool GL**, French ME, Edwards RA, Huang L and Lumb RH, Use of Radiolabeled Hexadecyl Cholesteryl Ether as a Liposome Marker. *Lipids* 17:448-452 (1982).
168. **Kim JK**, Howard MD, Dziubla TD, Rinehart JJ, Jay M and Lu XL, Uniformity of Drug Payload and Its Effect on Stability of Solid Lipid Nanoparticles Containing an Ester Prodrug. *ACS Nano* 5:209-216 (2011).
169. **Decuzzi P**, Pasqualini R, Arap W and Ferrari M, Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? *Pharm Res* 26:235-243 (2009).
170. **Tomlinson S**, Taylor PW and Luzio JP, transfer of phospholipid and protein into the envelope of gram negative bacteria by liposome fusion. *Biochemistry* 28:8303-8311 (1989).
171. **Derksen JTP**, Morselt HWM and Scherphof GL, processing of different liposome markers after in vitro uptake of immunoglobulin coated of liposomes by rat liver macrophages. *Biochimica Et Biophysica Acta* 931:33-40 (1987).
172. **Wroblewska M**, Czyzewska M, Wolska A, Kortas-Stempak B and Szutowicz A, Apo A-II participates in HDL-liposome interaction by the formation of new pre-beta mobility particles and the modification of liposomes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1801:1323-1329 (2010).
173. **Ng KK**, Lovell JF and Zheng G, Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Accounts of Chemical Research* 44:1105-1113 (2011).
174. **Frias JC**, Lipinski MJ, Lipinski SE and Albelda MT, Modified lipoproteins as contrastagents for imaging of atherosclerosis. *Contrast Media Mol Imaging* 2:16-23 (2007).

175. **Goppert** TM and Muller RH, Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int J Pharm* 302:172-186 (2005).
176. **Goppert** TM and Muller RH, Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60:361-372 (2005).
177. **Ameller** T, Marsaud W, Legrand P, Gref R and Renoir JM, In vitro and in vivo biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with the pure antiestrogen RU 58668. *Int J Cancer* 106:446-454 (2003).
178. **Bricarello** DA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, German JB and Parikht AN, Reconstituted Lipoprotein: A Versatile Class of Biologically-Inspired Nanostructures. *ACS Nano* 5:42-57 (2011).
179. **Dzodic** RR, Markovic IZ, Djuricic I, Buta M, Pupic G and Milovanovic Z, Video presentation of surgical technique of sentinel lymph node biopsy in differentiated thyroid carcinoma using methylen blue dye. *Endocr J* 57:S456-S456 (2008).
180. **Aoyama** K, Kamio T, Ohchi T, Nishizawa M and Kameoka S, Sentinel lymph node biopsy for breast cancer patients using fluorescence navigation with indocyanine green. *World J Surg Oncol* 9:8 (2010).
181. **Hirche** C, Mohr Z, Kneif S, Doniga S, Murawa D, Strik M and Hunerbein M, Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green. *Int J Colorectal Dis* 27:319-324 (2011).
182. **Hutteman** M, Mieog JSD, van der Vorst JR, Liefers GJ, Putter H, Lowik C, Frangioni JV, van de Velde CJH and Vahrmeijer AL, Randomized, double-blind comparison of indocyanine green with or without albumin premixing for near-infrared fluorescence imaging of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 127:163-170 (2011).
183. **Rossi** EC, Ivanova A and Boggess JF, Robotically assisted fluorescence-guided lymph node mapping with ICG for gynecologic malignancies: A feasibility study. *Gynecol Oncol* 124:78-82 (2011).
184. **Polom** K, Murawa D and Murawa P, Near-Infrared Guided Indocyanine Green (ICG) and Indocyanine Green With Human Serum Albumin (ICG:HAS) Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma Patients. *Eur J Cancer* 47:S657-S657 (2010).
185. **Habermehl** C, Schmitz CH and Steinbrink J, Contrast enhanced high-resolution diffuse optical tomography of the human brain using ICG. *Opt Express* 19:18636-18644 (2011).
186. **Ergin** A, Wang M, Zhang JY, Bruce JN, Fine RL, Bigio IJ and Joshi S, The feasibility of real-time in vivo optical detection of blood-brain barrier disruption with indocyanine green. *J Neuro-Oncol* 106:551-560 (2012).
187. **Wyganski-Jaffe** T, Desatnik H, Alhalel A, Goldstein M, Lowenstein A and Moisseiev J, ICG angiography-guided photodynamic therapy for large pigment epithelial detachments in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 37:358-363 (2006).
188. **Hager** A, Schmidt-Erfurth U, Barbazetto I, Michels S and Laqua H, Photodynamic therapy: ICG angiographic findings. *Ophthalmology* 96:291-299 (1999).
189. **Van der Vorst** JR, Hutteman M, Schaafsma BE, Mieog JSD, Verbeek FPR, Liefers GJ, Hartgrink HH, Frangioni JV, van de Velde CJH and Vahrmeijer AL, Identification and Image-guided Resection of Occult Superficial Liver Metastases Using Indocyanine Green and Near-infrared Fluorescence Imaging. *Eur J Cancer* 47:S217-S217 (2011).
190. **Yaseen** MA, Yu J, Wong MS and Anvari B, In-vivo fluorescence imaging of mammalian organs using charge-assembled mesocapsule constructs containing indocyanine green. *Opt Express* 16:20577-20587 (2008).
191. **Saxena** V, Sadoqi M and Shao J, Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J Pharm Sci* 92:2090-2097 (2003).
192. **Zheng** XH, Zhou FF, Wu BY, Chen WR and Xing D, Enhanced Tumor Treatment Using Biofunctional Indocyanine Green-Containing Nanostructure by Intratumoral or Intravenous Injection. *Mol Pharm* 9:514-522 (2012).

193. **Desmettre** T, Devoisselle JM and Mordon S, Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv Ophthalmol* 45:15-27 (2000).
194. **Desmettre** T, Devoisselle JM, Soulie-Begu S and Mordon S, Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG). *J Fr Ophthalmol* 22:1003-1016 (1999).
195. **Desmettre** T, Mordon S and Devoisselle JM, Indocyanine green dye (ICG) fluorescence and absorption properties as a function of time. *Vision Res* 35:3325-3325 (1995).
196. **Yoneya** S, Saito T, Komatsu Y and DuvallYoung J, The binding properties of indocyanine green (ICG) significance in ICG imaging. *Vision Res* 36:2421-2421 (1996).
197. **Chang** AA, Morse LS, Handa JT, Morales RB, Tucker R, Hjelmeland L and Yannuzzi LA, Histologic localization of indocyanine green dye in aging primate and human ocular tissues with clinical angiographic correlation. *Ophthalmology* 105:1060-1068 (1998).
198. **Mordon** S, Devoisselle JM, Soulie-Begu S and Desmettre T, Indocyanine green: Physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res* 55:146-152 (1998).
199. **Gupta** S, Thenkondar K, Mehta H, Bahmani B, Vullev V and Anvari B, Effect of Nano-encapsulation on Photophysical Properties of ICG, in Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications Spie-Int Soc Optical Engineering, Bellingham (2011).
200. **Rajian** JR, Fabiilli ML, Fowlkes JB, Carson PL and Wang XD, Drug delivery monitoring by photoacoustic tomography with an ICG encapsulated double emulsion. *Opt Express* 19:14335-14347 (2011).
201. **Kim** TH, Mount CW, Dulken BW, Ramos J, Fu CJ, Khant HA, Chiu W, Gombotz WR and Pun SH, Filamentous, Mixed Micelles of Triblock Copolymers Enhance Tumor Localization of Indocyanine Green in a Murine Xenograft Model. *Mol Pharm* 9:135-143 (2012).
202. **Saxena** V, Sadoqi M, Shao J and Kumar S, Enhanced Intracellular Uptake of Indocyanine Green by Polymeric Nanoparticulate Delivery Systems. *J Biomed Nanotechnol* 1:168-175 (2005).
203. **Portnoy** E, Lecht S, Lazarovici P, Danino D and Magdassi S, Cetuximab-labeled liposomes containing near-infrared probe for in vivo imaging. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med* 7:480-488 (2011).
204. **Kuo** WS, Chang YT, Cho KC, Chiu KC, Lien CH, Yeh CS and Chen SJ, Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials* 33:3270-3278 (2012).
205. **Yaseen** MA, Yu J, Wong MS and Anvari B, Laser-induced heating of dextran-coated mesocapsules containing indocyanine green. *Biotechnol Prog* 23:1431-1440 (2007).
206. **Tang** Y and McGoron AJ, Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells. *J Photochem Photobiol B-Biol* 97:138-144 (2009).
207. **Saxena** V, Sadoqi M and Shao J, Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: Biodistribution in healthy mice. *Int J Pharm* 308:200-204 (2006).
208. **Navarro** FM, Michel Berger, Véronique Josserand, Julien Gravier, Françoise Vinet, and Isabelle Texier, Lipid Nanoparticle Vectorization of IndoCyanine Green Improves Fluorescence Imaging for Tumor Diagnosis and Lymph Node Resection. *J Biomed Nanotechnol* Vol. 8, 1–12, (2012).
209. **Navarro** FM, Michel Berger, Véronique Josserand, Julien Gravier, Françoise Vinet, and Isabelle Texier, Cell Tolerability and Biodistribution in Mice of Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* Vol. 8, 1–11, (2012).
210. **Merian** J, Navarro F, Delmas T, Heinrich E, Vinet F, Couffin AC, Tavitian B and Texier I, Development and use of vectorized lipid nanoparticles (LNP) for PET and fluorescence imaging in oncology. *Bull Cancer* 97:S16-S16 (2010).
211. **Uner** M and Yener G, Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int J Nanomed* 2:289-300 (2007).

212. **Schubert** MA and Muller-Goymann CC, Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61:77-86 (2005).
213. **Roy** A, Singh MS, Upadhyay P and Bhaskar S, Combined Chemo-immunotherapy as a Prospective Strategy To Combat Cancer: A Nanoparticle Based Approach. *Mol Pharm* 7:1778-1788 (2010).
214. **Hao** JF, Fang XS, Zhou YF, Wang JZ, Guo FG, Li F and Peng XS, Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. *Int J Nanomed* 6:10 (2011).
215. **Saxena** V, Sadoqi M and Shao J, Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int J Pharm* 278:293-301 (2004).
216. **Saxena** V, Sadoqi M and Shao J, Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *J Photochem Photobiol B-Biol* 74:29-38 (2004).
217. **Yaseen** MA, Yu J, Wong MS and Anvari B, Encapsulation of Indocyanine Green within nano-assembled capsules changes its optical properties - art. no. 644908, in *Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV*, ed by Achilefu S, Bornhop DJ, Raghavachari R, Savitsky AP and Wachter RM. *Spie-Int Soc Optical Engineering*, Bellingham, pp. 44908-44908 (2007).
218. **Yaseen** MA, Yu J, Jung BS, Wong MS and Anvari B, Biodistribution of Encapsulated Indocyanine Green in Healthy Mice. *Mol Pharm* 6:1321-1332 (2009).
219. **Ballot** S, Noiret N, Hindre F, Denizot B, Garin E, Rajerison H and Benoit JP, Tc-99m/(188)re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33:602-607 (2006).
220. **Allard** E, Hindre F, Passirani C, Lemaire L, Lepareur N, Noiret N, Menei P and Benoit JP, Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:1838-1846 (2008).
221. **Schottelius** M, Laufer B, Kessler H and Wester HJ, Ligands for Mapping alpha(v)beta(3)-Integrin Expression in Vivo. *Accounts of Chemical Research* 42:969-980 (2009).
222. **Haubner** R, Finsinger D and Kessler H, Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the alpha(V)beta(3) integrin for a new cancer therapy. *Angew Chem-Int Edit Engl* 36:1375-1389 (1997).
223. **Boerman** OC, Janssen M, Frielink C, Oyen W, Edwards S, Liu S, Rajopadhye M and Corstens F, Tumor uptake and tumor retention of a monomeric and a dimeric Tc-99m-labeled RGD-peptide. *European Journal of Nuclear Medicine* 28:1195-1195 (2001).
224. **Thumshirn** G, Hersel U, Poethko T, Rau F, Haubner R, Schwaiger M, Wester HJ and Kessler H, Multimeric cyclic RGD peptides with improved tumor uptake for tumor targeting, in *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*. Amer Chemical Soc, Washington, pp. 693-694 (2004).
225. **Garanger** E, Boturyn D, Coll JL, Favrot MC and Dumy P, Multivalent RGD synthetic peptides as potent alpha(V)beta(3) integrin ligands. *Org Biomol Chem* 4:1958-1965 (2006).
226. **Chen** XY, Conti PS and Moats RA, In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res* 64:8009-8014 (2004).
227. **Jin** ZH, Josserand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Favrot MC and Coll JL, In vivo optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* 6:9 (2007).
228. **Liu** S, Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjugate Chem* 20:2199-2213 (2009).
229. **Sancey** L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C and Vuillez JP, In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the

- alpha(v)beta(3) integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:2037-2047 (2007).
230. **Cheng** LH, Jin CM, Lv W, Ding QP and Han X, Developing a Highly Stable PLGA-mPEG Nanoparticle Loaded with Cisplatin for Chemotherapy of Ovarian Cancer. *PLoS One* 6:9 (2011).
231. **Von Wallbrunn** A, Holtke C, Zuhlsdorf M, Heindel W, Schafers M and Bremer C, In vivo imaging of integrin alpha nu beta(3) expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:745-754 (2007).
232. **Foillard** S, Sancey L, Coll JL, Boturyn D and Dumy P, Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* 7:221-224 (2009).
233. **Hutteman** M, Mieog JSD, van der Vorst JR, Dijkstra J, Kuppen PJK, van der Laan AMA, Tanke HJ, Kaijzel EL, Que I, van de Velde CJH, Lowik C and Vahrmeijer AL, Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of colorectal metastases targeting integrin alpha(v)beta(3) expression in a syngeneic rat model. *Ejso* 37:252-257 (2011).
234. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73977TCH_NEV10645-IntegriSense680-TD.pdf
235. **Beer** AJ and Schwaiger M, Imaging of integrin alpha v beta 3 expression. *Cancer Metastasis Rev* 27:631-644 (2008).
236. **Nasongkla** N, Shuai X, Ai H, Weinberg BD, Pink J, Boothman DA and Gao JM, cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. *Angew Chem-Int Edit* 43:6323-6327 (2004).
237. **Haubner** R, Kuhnast B, Mang C, Weber WA, Kessler H, Wester HJ and Schwaiger M, [F-18]Galacto-RGD: Synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconjugate Chem* 15:61-69 (2004).
238. **Weber** WA, Haubner R, Wester HJ, Vabulienė E, Pichler BJ, Ziegler SI, Senekowitsch-Schmidtke R, Chorianopoulos EK, Kessler H and Schwaiger M, In-vivo imaging of alpha v beta 3 expression using PET and F-18-galacto-RGD. *J Nucl Med* 42:126P-126P (2001).
239. **Lin** EY, Jones JG, Li P, Zhu UY, Whitney KD, Muller WJ and Pollard JW, Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163:2113-2126 (2003).
240. **Schadlich** A, Caysa H, Mueller T, Tenambergen F, Rose C, Gopferich A, Kuntsche J and Mader K, Tumor Accumulation of NIR Fluorescent PEG PLA Nanoparticles: Impact of Particle Size and Human Xenograft Tumor Model. *ACS Nano* 5:8710-8720 (2011).
241. **Ozdemir** K, Celik C, Altunkeser BB, Icli A, Albeni H, Duzenli A, Akyurek C and Gok H, Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on cardiovascular performance. *Maturitas* 47:107-113 (2004).
242. **Yoo** J-W and Lee CH, Drug delivery systems for hormone therapy. *J Control Release* 112:1-14 (2006).
243. **Mittal** G, Sahana DK, Bhardwaj V and Ravi Kumar MNV, Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release* 119:77-85 (2007).
244. **Mittal** G and Kumar MNVR, Impact of polymeric nanoparticles on oral pharmacokinetics: A dose-dependent case study with estradiol. *J Pharm Sci* 98:3730-3734 (2009).
245. **Wang** XM, Chi N and Tang X, Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70:735-740 (2008).
246. **Williamson** MR, Chang HI and Coombes AGA, Gravity spun polycaprolactone fibres: controlling release of a hydrophilic macromolecule (ovalbumin) and a lipophilic drug (progesterone). *Biomaterials* 25:5053-5060 (2004).
247. **Matsumoto** J, Nakada Y, Sakurai K, Nakamura T and Takahashi Y, Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *Int J Pharm* 185:93-101 (1999).

248. **Khoee** S and Hossainzadeh MT, Effect of O/S/W process parameters on 17 beta-EV loaded nanoparticles properties. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 75:133-140 (2010).
249. **Yuan** H, Wang LL, Du YZ, You J, Hu FQ and Zeng S, Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 60:174-179 (2007).
250. **Kuntsche** J, Westesen K, Drechsler M, Koch MHJ and Bunjes H, Supercooled smectic nanoparticles: A potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. *Pharm Res* 21:1834-1843 (2004).
251. **Friedrich** I, Reichl S and Muller-Goymann CC, Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). *Int J Pharm* 305:167-175 (2005).
252. **Friedrich** I and Muller-Goymann CC, Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56:111-119 (2003).
253. **Cortesi** R, Esposito E, Luca G and Nastruzzi C, Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 23:2283-2294 (2002).
254. Salem HF, Sustained-release progesterone nanosuspension following intramuscular injection in ovariectomized rats. *Int J Nanomed* 5:943-954 (2010).
255. **Heurtault** B, Thomann JS, Jedrzejewska J, Wells WS, Schuber F and Frisch B, Liposome-based systems for anti-tumor vaccination: Influence of lipopeptide adjuvants. *J Liposome Res* 16:205-213 (2006).
256. **Chollet** C, Chanseau C, Brouillaud B and Durrieu MC, RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomol Eng* 24:477-482 (2007).

Annexes

Annexe 1 : Formules de pharmacocinétique

Détermination des paramètres de pharmacocinétique par la méthode des résidus, pour un modèle bi compartimental :

D'après http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/Autres-Mod-Oblig/MB4/MB4_pharmacocinetique_quantitative.pdf et http://m1physio.free.fr/2005/m1sante/M1S_UE8_Parametre_PK.pdf

La concentration plasmatique d'une substance après son injection en intraveineuse, en bolus d'une solution peut être modélisée suivant la Figure 1 dans le cas d'un modèle bicompartimental.

La courbe concentration-temps accuse une rupture de pente sur une échelle semi-log entre deux phases bien distinctes (distribution et élimination). La transformation logarithmique du taux plasmatique $C(t)$ permet de linéariser les portions éloignées du point de rupture de pente. Cela permet de déterminer une demi-vie plasmatique d'élimination sur la portion distale, assimilée à son asymptote.

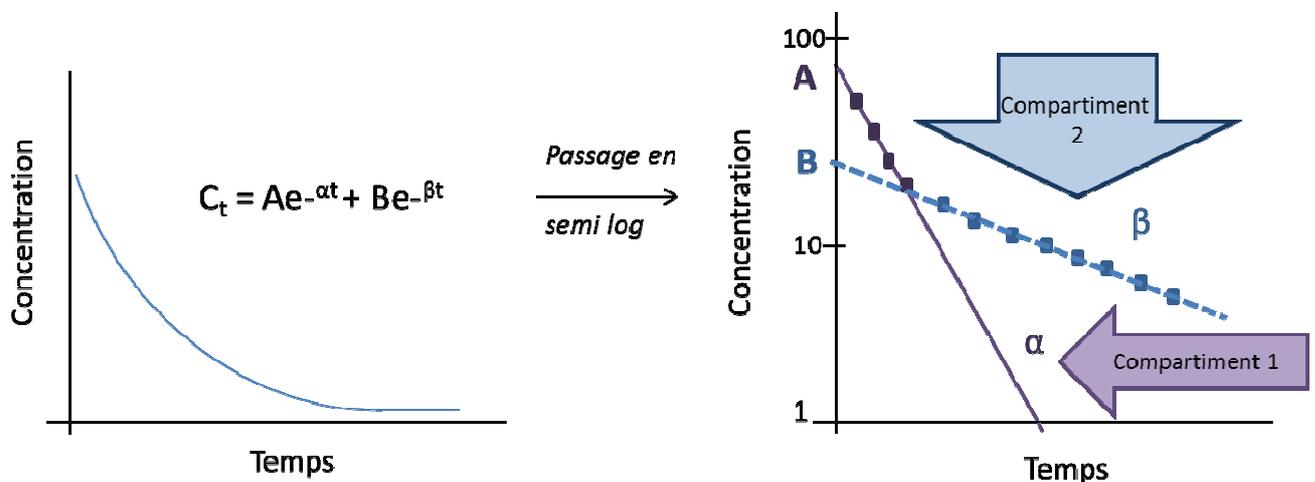


Figure 1 : Représentation schématique d'une cinétique plasmatique bicompartimentale $C = f(t)$ près injection d'un composé en intraveineux, en bolus. Le passage en semi log permet de déterminer les paramètres A , α , B , β de l'équation $C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$.

Le temps de ½ vie (obtenu avec les pentes) représente le temps au bout duquel la moitié de la dose est éliminée. Pour obtenir une élimination totale, il faut $7 \times t_{1/2}$.

Phase 1 (en violet sur le graphique) : Distribution (phase α) + élimination (phase β)

$$\alpha, t_{1/2} \alpha = \frac{0,693}{\alpha}$$

Phase 2 (en bleue sur le graphique) : Elimination (phase β pure)

$$\beta, t_{1/2} \beta = \frac{0,693}{\beta}$$

L'aire sous courbe (AUC) d'un graphique représente la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps.

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \quad (\text{soit } \frac{\text{hauteur}}{\text{pente}} \text{ pour les deux compartiments})$$

Le temps de résidence moyen (ou mean residence time en anglais pour MRT), exprime la durée moyenne de l'ensemble des phases pharmacocinétiques.

Avec, K_e = constante de vitesse d'élimination

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_e} \quad \text{soit} \quad K_e = \frac{0,693}{t_{1/2}} \quad \text{ou} \quad MRT = \frac{1}{K_e}$$

$$MRT = \frac{t_{1/2}}{0,693}$$

La clairance (Cl): La clairance indique la capacité d'un organe à épurer totalement un volume de fluide par unité de temps.

Avec D = la dose administrée

$$Cl = \frac{D}{\frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta}} \quad \text{ou} \quad Cl = K_e \cdot V_d$$

Le volume de distribution (Vd), correspond au volume fictif dans lequel le médicament devrait être réparti pour être à la même concentration que dans le plasma. Le Vd traduit l'intensité de la diffusion du médicament dans l'organisme.

$$Vd = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC} \times K_e}$$

Annexe 2 : Liste des communications et des publications

Brevets :

« *Formulation pour le traitement et le diagnostique des cancers hormonaux dépendants et des organes stéroïdiens* »

J.Mérian, R.Boisgard, B.Tavitian, I.Textier. Numéro de dépôt :N°1158991, 05/10/2011

“*Formulation pour le traitement et le diagnostique des dérégulations hormonales*”

J.Mérian, R.Boisgard, B.Tavitian, I.Textier. Numéro de dépôt : N° 12 52919 Déposé le 30 / 03 / 2012

Revue :

J. Mérian, J. Gravier, F. Navarro, I. Textier

“*Fluorescent Nanoprobables Dedicated to In Vivo Imaging: from Preclinical Validations to Clinical Translation*”

Molecules **2012**, 17, 5564-5591; doi:10.3390/molecules17055564

Publication :

J. Mérian, R.Boisgard, X. Decleves, B. Theze, F. Vinet, I.Textier, B. Tavitian

“*Pharmacokinetics and biodistribution in healthy mice of lipid nanocargos assessed by triple labeling*”.

(ACS Nano, soumission Juin 2012)

Reviewed proceeding:

“*Lipid based nano biodistribution of Lipidots® in FVB mice*”

Mérian J; Boisgard R; Decleves X; Textier I, Tavitian B

J Nanomedic Nanotechnol 3:1 (2012). doi : 10.4172/2157-7439.S1.07

“*Pharmacokinetics and biodistribution in FVB mice of radioactive and fluorescent triply-labeled lipid nanoparticles*”

Mérian J; Boisgard R; Decleves X; Textier I, Tavitian B.

BULLETIN DU CANCER 98 : S59-S59 ,MAR 2011

“*Development and use of vectorized lipid nanoparticles (LNP) for PET and fluorescence imaging in oncology*”

Mérian J; Navarro F; Delmas T, et al. Source:

BULLETIN DU CANCER 97 : S16-S16 MAR 2010

Congrès :

7^{ème} *journée du CLARA* (Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes), 20–21 Mars 2012 (poster)

TOPIM 2011 (Hot Topics in Molecular Imaging: emerging imaging methods in medicine), Les Houches, France, 16-21st January 2011. (oral)

6^{ème} *European Molecular Imaging Meeting*, Leiden, 19-21 juin 2011. (poster)

6^{ème} *journée du CLARA* (Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes), 28–29 Mars 2011 (poster), nominée pour le meilleur poster.

5^{ème} *e European Molecular Imaging Meeting*, Varsovie, Pologne, 26-29 Mai 2010. (poster)

5^{ème} *journée du CLARA* (Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes), 30–31 Mars 2010 (poster)

Divers :

- *Diplôme d'expérimentation animale* niveau I (mai 2011).

- *Les Doctoriales Sorbonne Paris Cité 2011* : Groupe gagnant du projet le plus innovant (Septembre 2011)

- *Doctorant Conseil* auprès du PRES Paris (pôles de recherche et d'enseignement supérieur), (Février –Mars 2012)

- *Le Nouveau Chapitre de la Thèse* : avec l'Intelliagence, sous la tutelle de Nathalie Nelis (Février – Juin 2012)

Review

Fluorescent Nanoprobes Dedicated to *In Vivo* Imaging: from Preclinical Validations to Clinical Translation

Juliette Mérian, Julien Gravier, Fabrice Navarro and Isabelle Texier *

¹ CEA-LETI, Minatec, Département microTechnologies pour la Biologie et la Santé, 17 rue des Martyrs, 38045 Grenoble cedex, France; E-Mail: juliette.merian@cea.fr

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: isabelle.texier-nogues@cea.fr; Tel.: +33-438-784-670; Fax: +33-438-785-787.

Received: 5 April 2012; in revised form: 6 May 2012 / Accepted: 7 May 2012 / Published: 10 May 2012

Abstract: With the fast development, in the last ten years, of a large choice of set-ups dedicated to routine *in vivo* measurements in rodents, fluorescence imaging techniques are becoming essential tools in preclinical studies. Human clinical uses for diagnostic and image-guided surgery are also emerging. In comparison to low-molecular weight organic dyes, the use of fluorescent nanoprobes can improve both the signal sensitivity (better *in vivo* optical properties) and the fluorescence biodistribution (passive “nano” uptake in tumours for instance). A wide range of fluorescent nanoprobes have been designed and tested in preclinical studies for the last few years. They will be reviewed and discussed considering the obstacles that need to be overcome for their potential everyday use in clinics. The conjugation of fluorescence imaging with the benefits of nanotechnology should open the way to new medical applications in the near future.

Keywords: fluorescence imaging; nanoprobes; *in vivo* imaging; nanoparticles; organic dyes; quantum dots; biodistribution; lymph node mapping

Synthetic lipid nanoparticles targeting steroid organs

Juliette Mérian^{1,2}, Raphaël Boisgard², Xavier Decleves³, Benoît Thezé², Isabelle Texier^{1,*}, Bertrand Tavitian^{2,4,*}

Summary

The biodistribution and pharmacokinetics in healthy FVB mice of 50 nm diameter lipid nanoparticles coated by a phospholipid/PEG surfactant shell (lipidots) was studied using ³H-cholesteryl-hexadecyl-ether, cholesteryl-¹⁴C-oleate and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine (DiD) dye tracked by radioactivity counting and fluorescence imaging, respectively. Radioactive and fluorescent tracers displayed a similar nanoparticle-driven biodistribution, indicative of lipidot integrity during the first hours post-injection. Plasma half-life was 0.50 ± 0.13 h for ¹⁴C and 0.41 ± 0.05 h for ³H. Lipidots distributed in the liver but not in the spleen, and more surprisingly, in steroid organs (adrenals, ovaries). This was confirmed by histological detection of DiD. Nanoparticle loading with cholesterol derivatives reinforced their accumulation in ovaries with a clear dose-dependent effect. This previously unreported distribution pattern is specific to lipidots and attributed to their nanometric size and lipid nature, which could confer them lipoprotein-like behavior. The specific affinity of the lipidots for steroid hormone rich areas could be used to address drugs and contrast agents to lipoprotein-receptor overexpressing cells, such as hormono-dependent cancer cells.

Keywords : lipid nanoparticles, pharmacokinetics, biodistribution, vectorization, *in vivo* imaging, lipoproteins.

