



**HAL**  
open science

# Délivrance par ultrasons de chimiothérapie encapsulée dans des liposomes sono-sensibles : contrôle et dosage de la cavitation inertielle ultrasonore

Lucie Somaglino

## ► To cite this version:

Lucie Somaglino. Délivrance par ultrasons de chimiothérapie encapsulée dans des liposomes sono-sensibles : contrôle et dosage de la cavitation inertielle ultrasonore. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10004 . tel-00771305

**HAL Id: tel-00771305**

**<https://theses.hal.science/tel-00771305>**

Submitted on 8 Jan 2013

**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 L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale : EDISS

**DIPLOME DE DOCTORAT**

**Spécialité : Instrumentation biomédicale**

Soutenue publiquement le 7 Janvier 2011

par

**Lucie SOMAGLINO**

## **Délivrance par ultrasons de chimiothérapie encapsulée dans des liposomes sono-sensibles : Contrôle et dosage de la cavitation inertielle ultrasonore**

Directeur de thèse : Cyril Lafon

Jury de thèse composé de :

M. Bertrand DUBUS	Rapporteur	IEMN, Lille
M. Ayache BOUAKAZ	Rapporteur	INSERM U930, Tours
M. Charles DUMONTET	Examineur	INSERM U590, UCBL
M. Michael TANTER	Président	Institut Langevin, Paris
M. Jean-Louis MESTAS	Examineur	INSERM U556, UCBL
M. Cyril LAFON	Directeur de thèse	INSERM U556, UCBL



*A mon père.*

*A Ghilès.*



---

**RESUME en français**

L'application d'ultrasons sur une tumeur, où des liposomes se sont accumulés, permet potentiellement de libérer le médicament mais aussi d'en favoriser l'absorption dans les cellules. La cavitation inertielle ultrasonore est le phénomène pressenti pour la libération sous ultrasons de médicament encapsulé dans de petits liposomes solides. Elle est très dépendante des conditions expérimentales et peut-être intense et imprévisible. L'objectif principal du travail réalisé dans le cadre de cette thèse est de contrôler et quantifier la cavitation inertielle, pour induire le largage de médicaments encapsulés dans des liposomes. Dans cette optique, une dose de cavitation inertielle (DC), basée sur le filtrage du bruit large bande émis lors de ce régime de cavitation, est mise au point *in vitro* pour suivre le largage de médicament encapsulé. Sous divers régimes d'ultrasons pulsés, la DC a été validée en dosant chimiquement les radicaux hydroxyles générés lors de l'implosion des bulles. Les tests menés sur diverses formulations de liposomes contenant de la doxorubicine (dox) ont montrés une haute corrélation entre le taux de largage de dox et la DC permettant de conclure que la cavitation inertielle est impliquée dans ce largage. Le rôle de la température sur la production de radicaux hydroxyles et la libération de dox a également été exploré. Les expériences réalisées ont permis de sélectionner les formulations les plus sensibles aux ultrasons pour les tester sur des rats implantés avec des tumeurs prostatiques. Après plusieurs expériences *in vivo* menées avec différents dispositifs ultrasonores et formulations de liposomes, le bénéfice du traitement combiné a pu être démontré.

---

**TITRE en anglais**

Ultrasonic delivery of chemotherapy encapsulated in sono-sensitive liposomes : Control and dosage of ultrasonic inertial cavitation

---

**RESUME en Anglais**

The sonication of a tumor, where liposomes have been accumulated, allows potentially to release encapsulated drug and to promote its absorption in cells. Ultrasonic inertial cavitation is supposed to be implicated in the release of drug encapsulated in small solid liposomes under ultrasonic exposure. Inertial cavitation is strongly dependent on experimental conditions and can be very intense and unpredictable. The main objective of this thesis was to control and quantify inertial cavitation in order to induce drug release from liposomes. In this purpose, an inertial cavitation dose (CD), based on broadband noise emission associated with inertial cavitation, was defined to monitor *in vitro* encapsulated drug release. The CD was chemically validated with the dosing of hydroxyl radicals generated by bubbles collapses under various pulsed ultrasound exposures. A high correlation between doxorubicin (dox) release rate from liposomes and CD was de-

monstrated for all liposomes formulations tested and under different pulsed ultrasound exposures. The role of temperature on hydroxyl radical production and dox release was also investigated. The performed experiments allowed selecting the liposomes formulations that are the most sensible to ultrasound in order to test them on rats implanted with prostatic tumors. After several campaigns of *in vivo* experiments performed with various ultrasonic setups and liposomes formulations, the benefit of the combined treatment was demonstrated.

---

**DISCIPLINE**

Instrumentation biomédicale

---

**MOTS-CLES**

Dose de cavitation, Liposome, Cavitation inertielle, Ultrasons pulsés, Sonochimie, Chimiothérapie, Tumeur, Radicaux hydroxyles.

Cavitation Dose, Liposome, Inertial cavitation, Pulsed ultrasound, Chemotherapy, Tumor, Hydroxyl radical.

---

**LABORATOIRE**

INSERM U556 151, cours Albert Thomas 69424 Lyon Cedex 03

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Contexte médical et physique</b>	<b>5</b>
1.1 Le cancer : tour d’horizon et traitements . . . . .	6
1.1.1 Introduction . . . . .	6
1.1.2 Le cancer . . . . .	7
1.1.3 Les traitements . . . . .	9
1.2 L’encapsulation de la chimiothérapie . . . . .	12
1.2.1 Les vecteurs de médicaments . . . . .	12
1.2.2 Mécanismes d’accumulation et de délivrance du médicament encapsulé . . . . .	19
1.3 Ciblage actif et déclenchement du largage de médicament . . . . .	25
1.3.1 Le ciblage actif . . . . .	25
1.3.2 Le déclenchement du largage de médicament encapsulé . . . . .	27
1.3.3 La délivrance de médicament encapsulé déclenchée par ultrasons . . . . .	28
1.4 Mécanismes potentiels de délivrance par ultrasons . . . . .	37
1.4.1 La génération de chaleur . . . . .	37
1.4.2 La pression de radiation et le courant acoustique . . . . .	38
1.4.3 La cavitation ultrasonore . . . . .	39
1.5 Conclusion et positionnement de la thèse . . . . .	56
<b>2 Dosage de la cavitation inertielle <i>in vitro</i></b>	<b>59</b>
2.1 Introduction . . . . .	61
2.2 Contexte scientifique et orientations de l’étude . . . . .	61
2.3 Définition et validation d’une dose de cavitation . . . . .	64
2.3.1 Matériel et méthodes . . . . .	64
2.3.2 Résultats . . . . .	70
2.3.3 Discussion . . . . .	74
2.3.4 Conclusion . . . . .	86
2.4 Libération de médicament contrôlé par la dose de cavitation . . . . .	87
2.4.1 Matériel et méthodes . . . . .	87



2.4.2	Résultats . . . . .	89
2.4.3	Discussion . . . . .	91
2.5	Conclusion générale . . . . .	93
<b>3</b>	<b>Nouvelle dose de cavitation et influence de la température</b>	<b>95</b>
3.1	Introduction . . . . .	96
3.2	Description et validation de la nouvelle dose de cavitation . . . . .	96
3.2.1	Description du dosage de la cavitation inertielle . . . . .	96
3.2.2	Evaluation de la nouvelle dose de cavitation . . . . .	103
3.3	Libération de doxorubicine encapsulée . . . . .	107
3.4	Influence de la température . . . . .	110
3.4.1	Influence de la température sur la concentration de HTA . . . . .	110
3.4.2	Influence de la température sur la libération de doxorubicine liposomale . . . . .	114
3.5	Conclusion . . . . .	116
<b>4</b>	<b>Première campagne d'expériences <i>in vivo</i></b>	<b>119</b>
4.1	Introduction . . . . .	122
4.2	Etude de sensibilité à la doxorubicine du modèle tumoral . . . . .	122
4.2.1	Modèle tumoral . . . . .	122
4.2.2	Etude <i>in vitro</i> . . . . .	123
4.2.3	Etude <i>in vivo</i> . . . . .	126
4.3	Première étude de bio distribution . . . . .	131
4.3.1	Introduction . . . . .	131
4.3.2	Etude préliminaire . . . . .	131
4.3.3	Etude principale de cinétique sanguine et de bio distribution . . . . .	134
4.3.4	Conclusion . . . . .	139
4.4	Seconde étude de bio distribution . . . . .	140
4.4.1	Matériel et méthodes . . . . .	140
4.4.2	Résultats et discussion . . . . .	141
4.4.3	Conclusion . . . . .	143
4.5	Première preuve de concept <i>in vivo</i> . . . . .	144
4.5.1	Introduction . . . . .	144
4.5.2	Matériel et Méthodes . . . . .	144
4.5.3	Résultats et discussion . . . . .	151
4.5.4	Conclusion . . . . .	161
4.6	Seconde preuve de concept <i>in vivo</i> . . . . .	161
4.6.1	Introduction . . . . .	161
4.6.2	Matériel et méthodes . . . . .	162
4.6.3	Résultats et discussion . . . . .	163

4.6.4	Conclusion . . . . .	170
4.7	Conclusion générale . . . . .	171
<b>5</b>	<b>Seconde campagne d'expériences <i>in vivo</i></b>	<b>173</b>
5.1	Introduction . . . . .	175
5.2	Etude de bio distribution . . . . .	175
5.2.1	Introduction . . . . .	175
5.2.2	Matériel et méthodes . . . . .	176
5.2.3	Résultats et discussion . . . . .	177
5.2.4	Conclusion . . . . .	182
5.3	Détermination des conditions d'exposition ultrasonores . . . . .	183
5.3.1	Introduction . . . . .	183
5.3.2	Description du dispositif de traitement . . . . .	183
5.3.3	Etude des effets induits sur la tumeur par différentes conditions d'exposition ultrasonores. . . . .	187
5.3.4	Etude sous IRM du largage induit par les conditions d'expositions ultrasonores. . . . .	193
5.3.5	Conclusion . . . . .	198
5.4	Etude d'efficacité de la délivrance par ultrasons . . . . .	199
5.4.1	Introduction . . . . .	199
5.4.2	Matériel et méthodes . . . . .	199
5.4.3	Résultats et discussion . . . . .	200
5.4.4	Conclusion . . . . .	208
5.5	Conclusion générale . . . . .	209
	<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>211</b>
	<b>Glossaire</b>	<b>217</b>
	<b>Annexe 1 : Analyses statistiques</b>	<b>223</b>
	<b>Annexe 2 : Représentations statistiques</b>	<b>225</b>
	<b>Publications et congrès</b>	<b>227</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>229</b>



# Introduction

De nombreuses avancées ont été réalisées dans le traitement de diverses formes de cancer, cependant, la chimiothérapie reste le principal traitement utilisé en cas de cancer à un stade avancé. Les médicaments de chimiothérapie touchent les cellules cancéreuses, mais aussi les cellules saines, ce qui peut provoquer de nombreux effets secondaires souvent difficiles à supporter par le patient. Par ailleurs, le bénéfice de la chimiothérapie pour les cancers les plus communs tels que le cancer de la prostate ou du sein, reste marginal pour les cancers déjà avancés.

Le ciblage de la chimiothérapie est par conséquent un des sujets de recherche les plus importants dans le domaine du traitement du cancer ces dernières années. Une des méthodes de ciblage consiste à encapsuler des médicaments chimio-thérapeutiques dans des microparticules ou nanoparticules tels que les liposomes. Ces liposomes s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs grâce à la haute perméabilité des vaisseaux tumoraux et permettent ainsi de réduire les effets secondaires liés à la chimiothérapie classique. Cependant, l'accumulation des liposomes sur le site visé ne garantit pas un traitement efficace. Il faut d'une part, que le médicament soit libéré en quantité suffisante et d'autre part, qu'il puisse être internalisé par les cellules pour avoir une réponse thérapeutique importante.

Des méthodes actives de déclenchement de médicaments encapsulés ont alors été mise en œuvre. Parmi ces méthodes, le ciblage par ultrasons est une technique très prometteuse qui fait l'objet de nombreux travaux. Potentiellement, l'application d'ultrasons sur une tumeur, après accumulation des liposomes à l'intérieur de celle-ci, permet non seulement de libérer le médicament mais aussi d'en favoriser l'absorption dans les cellules tumorales.

Le phénomène de cavitation ultrasonore est un des principaux mécanismes impliqués dans la délivrance de médicaments par ultrasons. La cavitation ultrasonore est la création, l'oscillation et éventuellement l'implosion des bulles sous l'action des ondes ultrasonores. Le régime de cavitation dit "inertielle" associé à l'implosion des bulles de cavitation, est le régime de cavitation supposé pour la libération de médicament encapsulé dans de petits liposomes ne contenant pas de gaz. En régime de cavitation "inertielle", l'implosion des bulles induit, entre autres, la création d'ondes de choc de haute vitesse et pression, une importante élévation de température et des réactions chimiques induisant

la production de radicaux libres. Si la bulle implose près d'une paroi, elle peut produire un microjet de liquide se déplaçant à la vitesse du son. De fortes contraintes de cisaillements capable d'ouvrir des liposomes sont aussi générées. La cavitation inertielle est un phénomène fortement dépendant des conditions expérimentales qui peut-être intense et imprévisible. Aussi, le contrôle et la quantification de la cavitation seraient une avancée dans la délivrance de médicaments encapsulés par ultrasons.

Le premier objectif de cette thèse est le dosage de la cavitation inertielle de façon à contrôler et quantifier le largage du contenu des liposomes *in vitro*. Les formulations de liposomes les plus sensibles aux ultrasons (sono-sensibles) parmi celles fabriquées par nos partenaires pourront ainsi être sélectionnées. Le second objectif est d'induire *in vivo* une délivrance par ultrasons de chimiothérapie encapsulée qui constitue un traitement plus efficace qu'une unique injection de liposomes.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous situons le contexte médical de cette étude et donnons les éléments clés des phénomènes physiques associés au ciblage et à la délivrance de médicaments encapsulés à la lumière de la littérature.

Dans le second chapitre, nous définissons une dose de cavitation inertielle, basée sur le filtrage analogique du bruit large-bande émis lors de ce régime de cavitation, afin de suivre *in vitro* le largage de médicament encapsulé. La validité de cette dose est tout d'abord testée, en régime d'ultrasons pulsés, par un dosage chimique (dosimètre téréphtalate) des radicaux hydroxyles émis lors de l'implosion des bulles. L'influence de divers paramètres ultrasonores pulsés sur la production de radicaux hydroxyles est étudiée et comparée avec la littérature.

Ensuite, en utilisant la dose de cavitation définie, des tests sont menés sur diverses formulations de liposomes contenant de la doxorubicine. La relation existant entre la libération de médicament et la dose de cavitation est étudiée pour les différentes formulations de façon à comprendre l'impact de la cavitation inertielle sur cette libération, et comparer les diverses formulations testées.

Dans le troisième chapitre, des améliorations sont apportées au dosage de la cavitation par la mise au point d'un système de filtrage numérique plus souple permettant aussi la sauvegarde simultanée des signaux bruts acquis durant les insonifications. Cette nouvelle dose est aussi testée avec le dosimètre téréphtalate avant d'être utilisée principalement pour étudier l'influence de la température initiale de l'échantillon insonifié sur la production de radicaux libres et la libération du contenu des liposomes.

Dans le quatrième chapitre, des expériences *in vivo* sont menées sur des rats implantés avec des tumeurs prostatiques sous cutanées. Après avoir étudié la bio distribution des liposomes sélectionnés chez le rat pour divers dosages, des expériences sont menées afin d'étudier l'efficacité de la combinaison d'un traitement ultrasonore et d'une injec-

tion de doxorubicine liposomale en comparaison avec d'autres traitements. Pour cela, un dispositif ultrasonore permettant le traitement de la tumeur suivi par la dose de cavitation est conçu.

Enfin, le cinquième chapitre présente les résultats d'une nouvelle campagne d'expériences *in vivo* menées avec des formulations de liposomes très sono-sensibles et dans un dispositif d'irradiation confocal. Des études complètes sont menées *in vivo* pour déterminer les conditions d'exposition ultrasonores adéquates n'affectant pas la croissance tumorale et permettant potentiellement la délivrance de doxorubicine liposomale dans la tumeur. Pour finir, une étude d'efficacité du traitement ultrasonore sélectionné en combinaison avec l'injection de doxorubicine liposomale est réalisée.



# Chapitre 1

## Contexte médical et physique

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Le cancer : tour d’horizon et traitements . . . . .</b>	<b>6</b>
1.1.1	Introduction . . . . .	6
1.1.2	Le cancer . . . . .	7
1.1.3	Les traitements . . . . .	9
<b>1.2</b>	<b>L’encapsulation de la chimiothérapie . . . . .</b>	<b>12</b>
1.2.1	Les vecteurs de médicaments . . . . .	12
1.2.2	Mécanismes d’accumulation et de délivrance du médicament encapsulé . . . . .	19
1.2.2.1	Influence de la taille des particules sur l’accumulation dans les tissus . . . . .	21
1.2.2.2	Influence des propriétés de surface des nanoparticules sur la capture par les macrophages . . . . .	22
1.2.2.3	Délivrance des médicaments aux cellules . . . . .	23
<b>1.3</b>	<b>Ciblage actif et déclenchement du largage de médicament</b>	<b>25</b>
1.3.1	Le ciblage actif . . . . .	25
1.3.2	Le déclenchement du largage de médicament encapsulé . . . . .	27
1.3.3	La délivrance de médicament encapsulé déclenchée par ultrasons	28
<b>1.4</b>	<b>Mécanismes potentiels de délivrance par ultrasons . . . . .</b>	<b>37</b>
1.4.1	La génération de chaleur . . . . .	37
1.4.2	La pression de radiation et le courant acoustique . . . . .	38
1.4.3	La cavitation ultrasonore . . . . .	39
1.4.3.1	La cavitation non-inertielle . . . . .	41
1.4.3.2	La cavitation inertielle . . . . .	47
<b>1.5</b>	<b>Conclusion et positionnement de la thèse . . . . .</b>	<b>56</b>

---



## 1.1 Le cancer : tour d’horizon et traitements

### 1.1.1 Introduction

Le cancer est devenu le problème de santé majeur du 21ème siècle. En 2008, selon le centre international de recherche contre le cancer (CIRC [BL08]<sup>[1]</sup>), 7 millions de personnes sont décédées du cancer dans le monde et 12 millions de nouveaux cas ont été détectés, portant à 25 millions de personnes vivant avec un cancer. Entre 1970 et 2000 le nombre de malades a doublé. En 2030, les prévisions indiquent qu’il pourrait y avoir 17 millions de morts, 27 millions de nouveaux cas diagnostiqués et 75 millions de personnes vivant avec le cancer 5 ans après son diagnostic (c.f figure 1.1).

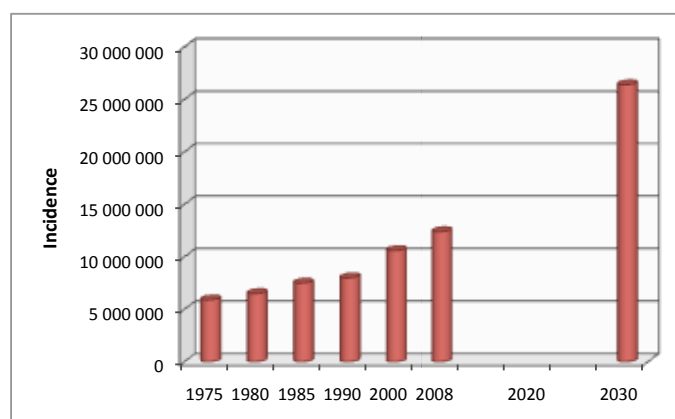


FIGURE 1.1 – *Estimation du poids du cancer dans le monde : nombre de nouveaux cas par an [BL08]*

Le cancer n’est pourtant pas une maladie moderne. Granville ([Gra25]<sup>[2]</sup>) a disséqué des momies égyptiennes et a trouvé des preuves indiscutables de cancers sur plusieurs d’entre elles. Des écrits traitant du cancer ont été retrouvés chez les civilisations anciennes des égyptiens, grecs, romains, perses et dans des textes médiévaux. Pourquoi une telle progression de la maladie aujourd’hui ?

Premièrement, la population mondiale a fortement augmenté avec un allongement très important de la durée de vie en comparaison avec le siècle précédent. Or, le cancer est une maladie qui touche plus largement les personnes âgées que les jeunes, ce qui explique en grande partie la progression de la maladie.

Deuxièmement, il y a une amélioration considérable dans les moyens de diagnostic clinique qui permettent une détection quasi systématique des cancers, ce qui était loin d’être le cas il y a seulement quelques dizaines d’années.

[1] P. Boyle and B. Levin. *World Cancer Report 2008*. IARC Nonserial Publication, 2008.

[2] Augustus Bozzi Granville. *An essay on Egyptian mummies: with observations on the art of embalming among the ancient Egyptians*. 1825.

Enfin, les modes de vie moderne et la modification de l'environnement avec l'industrialisation, l'agriculture intensive, les nouvelles technologies, favorisent la formation de cellules cancéreuses. En effet, les cellules peuvent muter quand elles sont exposées à des radiations, à des mutagènes chimiques, à des virus, à l'alcool, au tabac, au soleil...

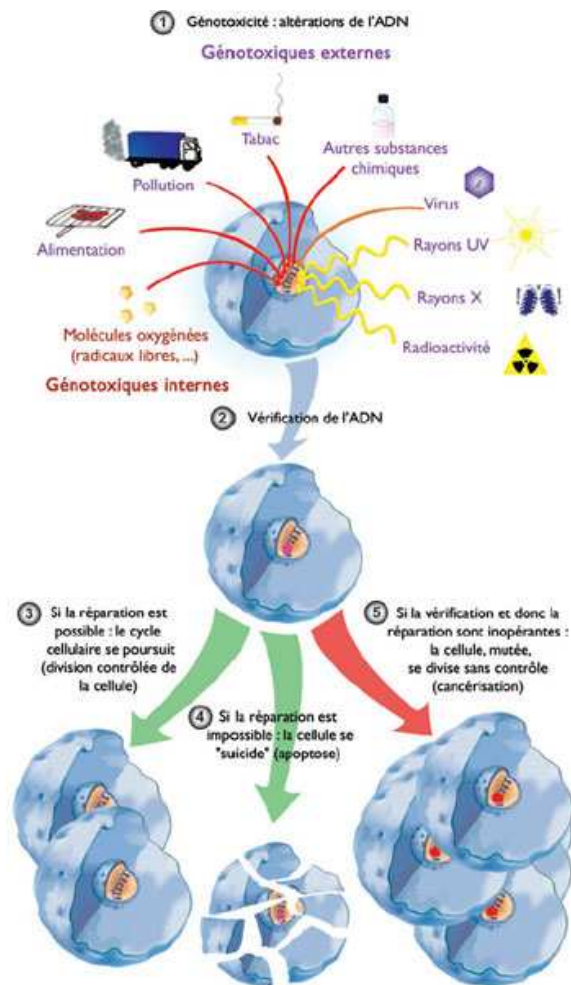


FIGURE 1.2 – Mécanisme de formation d'une cellule cancéreuse après altération génétique. Source : <http://www.arc-cancer.net/> (brochure cancer).

### 1.1.2 Le cancer

L'être humain est constitué d'environ 100 000 milliards de cellules. Ces cellules se multiplient en se divisant et meurent par apoptose ("suicide cellulaire" programmé génétiquement). Des mutations génétiques peuvent survenir pendant leur division, soit par erreur (1 sur 1 million), soit par l'action d'agents mutagènes extérieurs encore appelés "génomotoxiques", soit parce qu'ils ont été transmis par un parent. La plupart sont sans gravité et peuvent être réparées ou conduire à la mort de la cellule, d'autres en revanche échappent à ces mécanismes et deviennent des cellules cancéreuses (c.f figure

1.2). Ces cellules ont la caractéristique de se diviser sans mourir, ce qui conduit à une prolifération et à la naissance d'un regroupement de ces cellules. A ce stade, le système immunitaire peut encore contrôler ce regroupement voire le détruire. Si son nombre de cellules atteint les 100 000, on parle de la formation d'une tumeur localisée. Elle se forme au détriment des tissus et des organes sains avoisinants. Pour se développer davantage, la tumeur produit des substances amenant les vaisseaux sanguins à l'alimenter en énergie : c'est l'angiogenèse qui conduit à la néovascularisation de la tumeur. En passant dans le sang ou dans le système lymphatique, les cellules tumorales peuvent s'implanter dans d'autres parties de l'organisme pour y former de nouvelles tumeurs appelées métastases. Le cancer devient alors invasif.

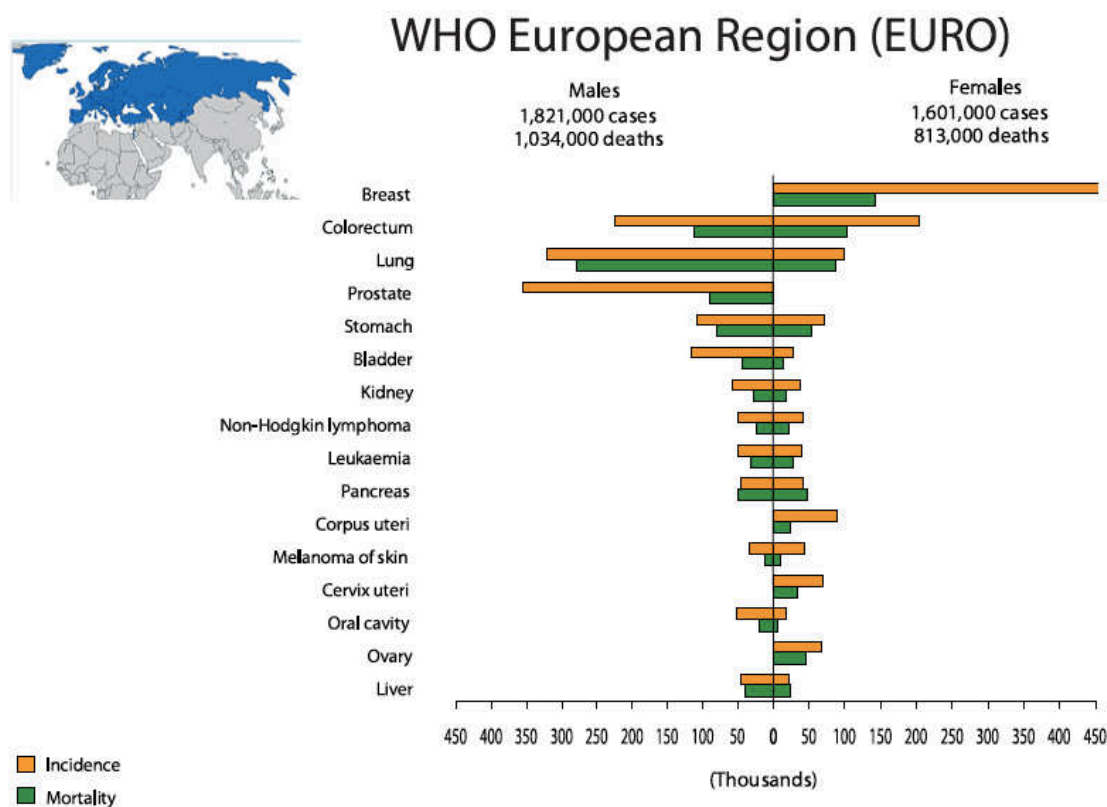


FIGURE 1.3 – Répartition en Europe des nouveaux cas de cancer (orange) et des décès (en vert) en 2008 selon le type de cancer et le sexe.[BL08]

Il existe des centaines de types de cancer, que l'on peut regrouper en 4 grandes familles :

- ◇ **Les carcinomes** : ce sont les plus fréquents (plus de 85 %). Ils se développent à partir des tissus de revêtement interne ou externe de l'organisme (poumon, sein, peau, côlon, prostate...).
- ◇ **Les sarcomes** : ils apparaissent dans les tissus de soutien de la structure de l'organisme (os, muscles...).

- ◇ **Les lymphomes** : ils se développent à partir des cellules du système immunitaire, le plus souvent dans les ganglions lymphatiques.
- ◇ **Les leucémies** : elles désignent les cancers des cellules qui, dans la moelle osseuse, produisent les globules blancs.

Les types de cancers les plus fréquents varient suivant les pays et surtout le niveau de développement. Les cancers concentrant l'incidence la plus élevée dans le monde, c'est-à-dire le plus de nouveaux cas par an, sont le cancer des poumons, du sein et de la sphère colorectale. Ceux provoquant le plus de décès sont le cancer des poumons, de l'estomac et du foie. Dans les pays développés, c'est le cancer de la prostate qui a l'incidence la plus élevée chez l'homme, et le cancer du sein chez la femme [BL08]<sup>[1]</sup>. La figure 1.3 reflète ces tendances sur l'Europe au sens large.

### 1.1.3 Les traitements

Il existe tout un panel de traitements contre le cancer. Suivant le type de cancer et son stade de développement, un traitement ou une association de traitements est choisie par l'équipe de praticiens qui suit le patient.

Les principales formes de traitements utilisées de nos jours sont les suivantes :

- ◇ **La chirurgie** : Elle consiste à effectuer une ablation de la tumeur, des ganglions correspondants et des éventuelles métastases. Ce traitement qui a été pendant longtemps l'unique traitement des tumeurs solides, reste le plus courant aujourd'hui, en particulier pour les formes localisées de cancers diagnostiquées à un stade précoce. La chirurgie en elle-même reste un acte médical lourd et invasif, qui n'est pas sans conséquences sur l'organisme.
- ◇ **La chimiothérapie** : Traitement systémique (général) qui vise, par l'utilisation de substances chimiques, à détruire les cellules cancéreuses ou à les empêcher de se multiplier dans l'ensemble du corps. Il existe de nombreux médicaments de chimiothérapie, souvent associés entre eux pour augmenter l'efficacité du traitement. Ils peuvent être administrés par perfusion, piqûre ou sous forme de comprimés. Les médicaments de chimiothérapie touchent les cellules cancéreuses, mais aussi les cellules saines qui se divisent rapidement, ce qui peut provoquer des effets secondaires : nausées, vomissements, alopecie (perte des cheveux et parfois des poils), mucites (inflammation de la bouche), diarrhée ou constipation, baisse des globules blancs pouvant entraîner la contraction d'infections, baisse des globules rouges ou des plaquettes, fatigue, modification du poids, perte d'appétit ... Ces effets sont variables selon les médicaments et la réaction de la personne et sont souvent difficiles à supporter.

La chimiothérapie reste le principal traitement utilisé en cas de cancer à un stade

---

[1] P. Boyle and B. Levin. *World Cancer Report 2008*. IARC Nonserial Publication, 2008.

avancé.

- ◇ **La radiothérapie** : Traitement du cancer par des rayons ionisant qui détruisent les cellules cancéreuses ou stoppent leur développement en bloquant leur capacité à se multiplier. C'est un traitement locorégional des cancers. Il existe plusieurs types de radiothérapie dont les principales sont : la radiothérapie externe (irradiation par un dispositif extra-corporel) et la curiethérapie (sources radioactives implantées sur la site de la tumeur : billes, microsphères ou fils composés d'iridium ou de césium radioactif). Les rayonnements ionisants ne font pas de distinction entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Il existe donc un risque d'altération des cellules saines à proximité de la zone traitée, qui peuvent se traduire en effets secondaires plus ou moins sévères qui peuvent être spécifiques à la zone traitée. Par exemple : érythème cutané, oedème, fatigue, problèmes de fertilité, perte définitive des cheveux...
- ◇ **L'hormonothérapie** : Traitement modifiant ou bloquant la sécrétion d'hormones et entravant de ce fait la prolifération de cellules tumorales dont la croissance est stimulée par ces hormones. Ce traitement est efficace uniquement pour les tumeurs hormono-dépendantes.
- ◇ **L'immunothérapie** : Traitement qui consiste à stimuler les réactions immunitaires de l'organisme pour détruire les cellules tumorales. Le problème majeur de ce traitement est que les cellules tumorales sont peu antigéniques (reconnues par l'organisme comme étrangères). Ce traitement n'est donc jamais utilisé comme traitement dominant mais comme complément associé avec un autre traitement.

La combinaison de plusieurs traitements est très courante. Lorsqu'ils sont réalisés avant la chirurgie, ils sont dits néo-adjuvants (ou préopératoires). Leur but est notamment de faire diminuer la taille de la tumeur afin d'en faciliter l'ablation. Lorsqu'ils sont prescrits après la chirurgie, on parle de traitements adjuvants (ou post-opératoires). Leur but est notamment d'éliminer les cellules cancéreuses qui seraient encore présentes dans l'ensemble de l'organisme ou au niveau de la zone concernée par la tumeur, de façon à limiter le risque de récurrence.

L'inconvénient de la combinaison de plusieurs traitements est la multiplication des effets secondaires chez un patient souvent déjà fragilisé par le cancer. De plus, le taux de mortalité des cancers majeurs tels que ceux des poumons, du sein, de la prostate, du colon et du pancréas à des stades avancés, n'a pas changé depuis le milieu du siècle (c.f figure 1.4). Le bénéfice de la chimiothérapie pour les cancers les plus communs tels que le cancer de la prostate ou du sein, est marginal pour les cancers à un stade avancé [MBD09]<sup>[1]</sup>, [Mik05]<sup>[2]</sup>, [Lea04]<sup>[3]</sup>. Par exemple, en comparant les patientes atteintes d'un

---

[1] H Maeda, G Y Bharate, and J Daruwalla. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based

cancer du sein ayant reçu uniquement une chirurgie et les patientes ayant reçues une chirurgie combinée à une chimiothérapie, on constate que le bénéfice de l'apport de la chimiothérapie est de seulement 2 ou 3%. A savoir une survie de 2 mois supplémentaires sur une survie moyenne de 60 mois, avec des effets secondaires importants nécessitant des soins lourds et coûteux [HOP<sup>+</sup>06]<sup>[4]</sup>, [EL06]<sup>[5]</sup>. Par ailleurs, il est constaté de plus en plus de cas de résistance aux médicaments chimio-thérapeutiques, rendant indispensables de nouveaux modes de traitement et de ciblage du cancer.

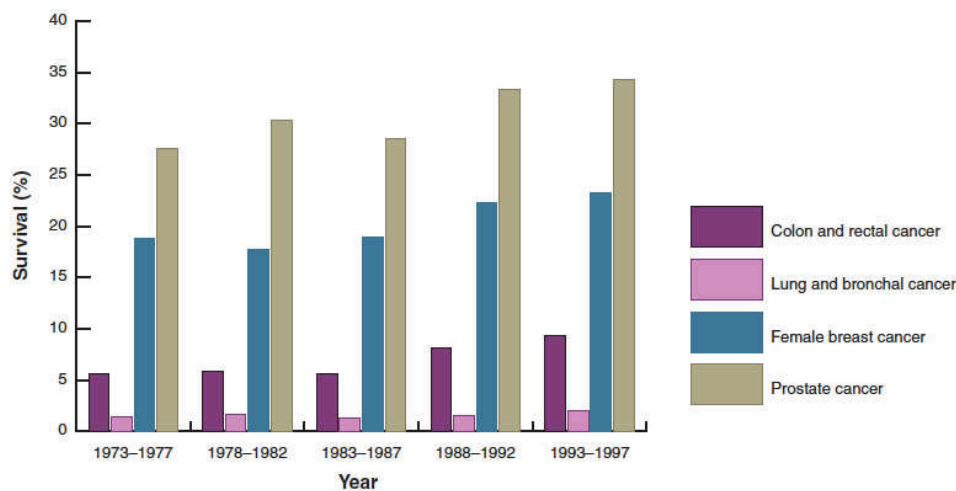


FIGURE 1.4 – Données de l'institut national du cancer de la survie à 5 ans des patients présentant des métastases distantes du cancer colorectal, des poumons, du sein et de la prostate [Mik05].

La recherche s'est approprié ce challenge et de nouvelles approches ont été développées ou sont explorées pour mettre au point des **traitements les moins invasifs et les plus ciblés possibles** :

- ◇ La recherche pharmaceutique est très active pour mettre au points de **nouvelles molécules**, en particulier des nouveaux médicaments s'attaquant à des mécanismes du cancer. Citons les anti-angiogènes, qui sont des médicaments qui s'opposent aux facteurs de stimulation de l'angiogenèse et qui sont au stade de l'étude clinique.
- ◇ L'application d'**ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU)** induisant une nécrose de coagulation dans les tissus visés permet une ablation de la tumeur

---

on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3):409-419, March 2009. PMID: 19070661.

[2] George L Gabor Miklos. The human cancer genome project: one more misstep in the war on cancer. *Nature Biotechnology*, 23(5):535-537, May 2005. PMID: 15877064.

[3] C Leaf. Why we're losing the war on cancer and how to win it. *FORTUNE*, 149(6):76, March 2004.

[4] Michael J Hassett, A James O'Malley, Juliana R Pakes, Joseph P Newhouse, and Craig C Earle. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(16):1108-1117, August 2006. PMID: 16912263.

[5] John K Erban and Joseph Lau. On the toxicity of chemotherapy for breast cancer: the need for vigilance. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(16):1096-1097, August 2006. PMID: 16912256.

en évitant une chirurgie. Des dispositifs tels que l'Ablatherm [PCR<sup>+</sup>07]<sup>[1]</sup>, qui permet le traitement localisé du cancer de la prostate par HIFU, sont maintenant opérationnels dans des hôpitaux.

- ◊ **L'encapsulation de médicaments chimiothérapeutiques** dans des microparticules ou nanoparticules s'accumulant préférentiellement dans les tumeurs permet de réduire les effets secondaires liés à la chimiothérapie classique en ciblant plus spécifiquement les cellules cancéreuses.

Cette dernière alternative est très prometteuse puisqu'elle permet non seulement d'utiliser un éventail de médicaments adaptés à de nombreux cancers, mais aussi d'éviter dans certains cas les phénomènes de résistance aux médicaments. Elle fait, par conséquent, l'objet de nombreux travaux. Ainsi, l'éditeur en chef du journal "Bioconjugate Chemistry", un journal de la société américaine de Chimie, a commenté récemment que le ciblage de médicaments était devenu le sujet le plus populaire dans son journal [SCBR09]<sup>[2]</sup>.

## 1.2 L'encapsulation de la chimiothérapie

L'encapsulation de médicaments a de nombreux avantages en comparaison avec une administration libre. En effet, de nombreux médicaments ont des propriétés physicochimiques qui ne sont pas favorables au passage à travers les membranes biologiques qui séparent le site d'administration du médicament du site à traiter. Certains médicaments se heurtent aux barrières enzymatiques, ce qui entraîne leur dégradation et une rapide métabolisation. Par conséquent, la distribution de ces médicaments dans les zones visées peut être difficile et leur accumulation dans les zones saines peut entraîner des effets toxiques très importants [SCBR09]<sup>[2]</sup>. De plus, l'encapsulation permet d'augmenter la solubilité de molécules de médicaments qui le sont très peu, ce qui augmente leur biodisponibilité\* et permet un ciblage plus efficace [RSSS06]<sup>[3]</sup>.

### 1.2.1 Les vecteurs de médicaments

Il existe une grande variété de vecteurs ou "véhicules" capables d'encapsuler des médicaments comme la chimiothérapie. Certains sont déjà commercialisés, d'autres en phase d'essais précliniques ou cliniques, ou encore en phase d'expérimentation dans des laboratoires. Leur taille peut varier de quelques nanomètres (nanoparticules) à quelques

- 
- [1] Laura Poissonnier, Jean-Yves Chapelon, Olivier Rouviere, Laura Curiel, Raymonde Bouvier, Xavier Martin, Jean Michel Dubernard, and Albert Gelet. Control of prostate cancer by transrectal HIFU in 227 patients. *European Urology*, 51(2):381–387, February 2007. PMID: 16857310.
  - [2] E Soussan, S Cassel, M Blanzat, and I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(2):274–288, 2009.
  - [3] Manju Rawat, Deependra Singh, S Saraf, and Swarnlata Saraf. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(9):1790–1798, September 2006. PMID: 16946487.

micromètres (microparticules). Il est difficile de tous les citer et même de les classer tant ils sont divers. Ainsi, Cho et al. [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[4]</sup> classe les nanovéhicules en : vecteurs de médicaments à base de polymères\* (nanoparticules polymériques, micelles, dendrimères), à base de lipides, nanoparticules virales, nanotubes de carbones. Sousan et al. [SCBR09]<sup>[2]</sup> les classe en deux grandes catégories : les matrices (micelles, émulsions, dendrimères, hydrogels, nanosphères, nanoparticules lipidiques solides) et les vésicules (polymersomes, liposomes, niosomes, vésicules cationiques). On peut qualifier ces particules de solides, liquides ou gazeuses suivant la phase macroscopique dans laquelle elles se trouvent à température ambiante [HP08a]<sup>[5]</sup>.

Les vecteurs classiques ont une membrane et contiennent généralement des médicaments sous forme liquide ou précipitée. D'autres véhicules ont été développés pour des applications spécifiques. Par exemple, des microbulles stabilisées par un surfactant à leur surface sont utilisées pour l'imagerie et pour libérer leur contenu sous l'action des ultrasons.

Dans cette section nous allons présenter uniquement les "véhicules" classiques les plus courants.

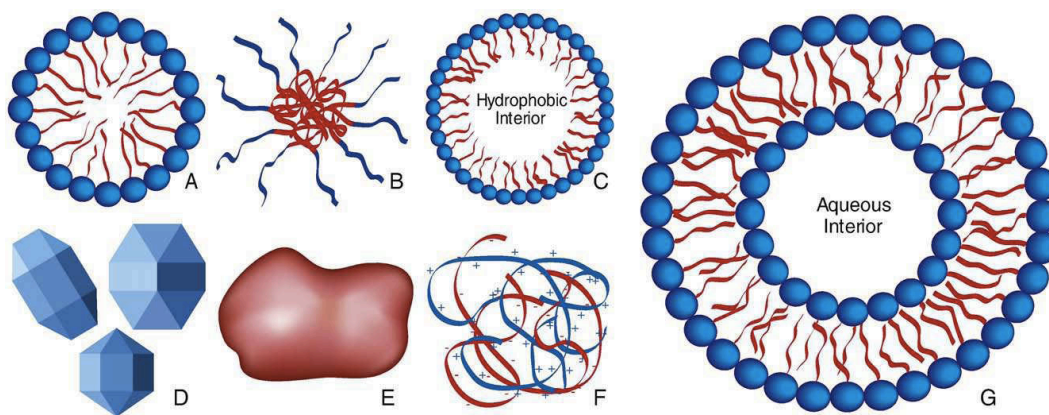


FIGURE 1.5 – Illustrations schématiques (échelle non contractuelle) de différentes nanoparticules qui peuvent être utilisées dans la délivrance de médicaments ou des gènes induite par ultrasons. A : Micelle (non-polymérique) composée de surfactants amphiphiles\*. B : Micelle polymérique composée de copolymères séquencés. C : Nanoémulsion composée d'un noyau liquide hydrophobe\* stabilisé par un surfactant. D : Nanoparticules cristallines. E : Nanoparticules polymériques amorphes\*. F : Oligomères\* ioniques condensés, comme de l'ADN condensé associé avec du polyéthylèneimine (PEI) ou des lipides cationiques. G : Liposome à paroi unique composé d'une bi-membrane amphiphile\* entourant une centre aqueux. Source : [HP08a]

[4] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5):1310–1316, March 2008.

[5] G. A. Hussein and W. G. Pitt. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10):1137–1152, 2008.



### Les nanoparticules/nanocapsules polymériques (conjugués médicaments - polymères)

Les médicaments sont conjugués\* à la chaîne latérale d'un polymère\* linéaire par une liaison clivable [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup> (c.f figure 1.6 b). Ces polymères peuvent être naturels ou synthétiques et (dans le cas général) respectivement hydrophiles\* ou hydrophobes\* [SAKR01]<sup>[2]</sup>. Ces nanoparticules ont une structure colloïdale\* et leur taille varie de 10 nm à 1  $\mu$ m selon la formulation.

Les polymères ont de nombreuses propriétés intéressantes tels que la biocompatibilité, la "modification des surfaces", et pour certains la biodégradabilité [RSS06]<sup>[3]</sup>. Les nanoparticules polymériques permettent un meilleur contrôle de la pharmacocinétique du médicament encapsulé en augmentant la stabilité du médicament, et ont la capacité de délivrer de hautes concentrations de médicaments. Toutes ces caractéristiques font des nanoparticules polymériques de bons candidats pour l'encapsulation et la délivrance de médicaments.

Des polymères naturels tels que l'albumine, le chitosan, et l'héparine sont utilisés pour la délivrance de médicaments, d'ADN ou de protéines. Récemment, une formulation de nanoparticules à base de sérum d'albumine encapsulant du paclitaxel (Abraxane), a été ajouté au panel de médicaments utilisés dans les hôpitaux pour le traitement du cancer du sein métastatique, de part son efficacité par rapport à une formulation libre de paclitaxel [GTD<sup>+</sup>05]<sup>[4]</sup>. Parmi les polymères synthétiques comme le copolymère\* N-(2-hydroxypropyle)-methacrylamide (HPMA), le copolymère anhydride polystyrène-maléique, le polyéthylène glycol (PEG), et le poly-L-glutamique acide (PGA), le PGA a été le premier polymère biodégradable à être utilisé pour une synthèse conjuguée. Plusieurs médicaments chimio-thérapeutiques de référence utilisés dans les hôpitaux ont été testés conjugués avec du PGA *in vitro* et *in vivo* et ont montré des habilités encourageantes à circonvenir aux limitations de leurs équivalents non encapsulés. Parmi eux, le Xyotax (PGApaclitaxel) et le CT-2106 (PGA-camptothecin) sont en essais cliniques [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup>. Le HPMA et le PEG sont les polymères non-biodégradables synthétiques les plus utilisés. Le PK1, qui est un conjugué de HPMA avec de la doxorubicine a été validé en phase 1 d'essais cliniques sur des tumeurs réfractaires à d'autres traitements.

- 
- [1] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5):1310–1316, March 2008.
  - [2] K S Soppimath, T M Aminabhavi, A R Kulkarni, and W E Rudzinski. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 70(1-2):1–20, January 2001. PMID: 11166403.
  - [3] Manju Rawat, Deependra Singh, S Saraf, and Swarnlata Saraf. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(9):1790–1798, September 2006. PMID: 16946487.
  - [4] William J Gradishar, Sergei Tjulandin, Neville Davidson, Heather Shaw, Neil Desai, Paul Bhar, Michael Hawkins, and Joyce O'Shaughnessy. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(31):7794–7803, November 2005. PMID: 16172456.

En dépit des nombreux avantages offerts par les nanoparticules polymériques dû à l'existence d'une grande variété de polymères, celles-ci présentent plusieurs limitations. La première est leur cytotoxicité, car leur taille nanométrique est favorable à l'internalisation dans les cellules (macrophages), et la dégradation des polymères à l'intérieur de la cellule peut conduire à des effets cytotoxiques, comme cela a été constaté pour les polymères de polyester [SIMH86]<sup>[5]</sup>. Une autre limitation est le manque de méthodes de production à grande échelle.

Par conséquent, pour obtenir une formulation efficace, beaucoup d'efforts doivent encore être faits pour synthétiser de nouveaux polymères et copolymères qui correspondent aux propriétés hydrophiles\* ou hydrophobes\* des médicaments, et qui puissent être produits à grande échelle [RSSH06]<sup>[3]</sup>.

### Les micelles

Les micelles sont des nanoparticules dont les tailles varient typiquement entre 1 nm et 100 nm. De manière générale, les micelles sont utilisées pour solubiliser les médicaments hydrophobes, les rendre biodisponibles et augmenter leur durée de biodisponibilité\* dans l'organisme. Il existe deux types de micelles :

- **Les micelles non polymériques** : Elles sont constituées de molécules de surfactant aux propriétés amphiphiles\* qui forment spontanément un agrégat sphérique au delà d'une certaine concentration de molécules dans l'eau, appelée concentration critique de micelle [SCBR09]<sup>[6]</sup>, [HP08a]<sup>[7]</sup> (c.f figure 1.5 A). Les "têtes" polaires ou hydrophiles\* sont en contact avec l'eau et les queues hydrophobes\* sont dirigées vers l'intérieur de la sphère. Les micelles peuvent donc encapsuler des médicaments hydrophobes\* dans leur centre. La taille et les propriétés géométriques des molécules déterminent la taille des micelles [RPT05]<sup>[8]</sup>.
- **Les micelles polymériques** : Elles sont constituées de copolymères séquencés amphiphiles\* (copolymères ayant alternativement des segments hydrophiles et hydrophobes) qui s'auto-assemblent pour former une structure nanométrique (c.f figure 1.5 B et figure 1.6 a). Ces polymères peuvent être bi-séquencés, tri-séquencés voire posséder des structures encore plus complexes [HP08a]<sup>[7]</sup>. Leur centre est également hydrophobe et leur surface hydrophile, les rendant solubles dans l'eau. Cette dernière propriété fait de ce type de nanoparticule le candidat approprié pour une injection en intra-veineuse [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup>. Les micelles polymériques ont

---

[5] Alan Smith and Ian M. Hunneyball. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 30(2-3):215–220, June 1986.

[6] E Soussan, S Cassel, M Blanzat, and I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(2):274–288, 2009.

[7] G. A. Hussein and W. G. Pitt. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10):1137–1152, 2008.

[8] Carlota Oliveira Rangel-Yagui, Adalberto Pessoa, and Leoberto Costa Tavares. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 8(2):147–165, 2005. PMID: 16124926.

un diamètre moyen pouvant aller de 20 à 50 nm et sont pratiquement monodisperses. Les micelles à base de polymères sont le type de micelles les plus utilisées pour la délivrance ciblée de médicaments. En effet, les micelles polymériques sont généralement plus stables que les micelles de surfactants qui ont tendance à casser sous l'effet de la dilution, et se forment à des concentrations critiques de micelles bien plus basses. Par contre la synthèse des micelles polymériques peut s'avérer parfois difficile en terme de biocompatibilité, non toxicité, dégradabilité et de précision du poids moléculaire [SCBR09]<sup>[1]</sup>. Plusieurs formulations incorporant des agents anti-cancereux sont actuellement en phase de test clinique ou préclinique tels que les NK105<sup>®</sup> (paclitaxel), NC-6004<sup>®</sup> (cisplatine), NK-012<sup>®</sup> (SN-38 : dérivé de la camptothecin) ou SP1049C<sup>®</sup> (doxorubicine) [MK09]<sup>[2]</sup>.

### Les microémulsions ou nanoémulsions

Une émulsion est constituée d'un mélange de deux liquides insolubles, l'un étant une "phase continue" entourant des vésicules/ gouttelettes discrètes constituant la "phase dispersée" (c.f figure 1.5 C). Habituellement, une émulsion est stabilisée par un surfactant pour éviter à la phase dispersée de coalescer en une phase macroscopique. La phase continue est la plus souvent une phase aqueuse, semblable à de l'eau, et la phase dispersée une phase non-aqueuse, semblable à de l'huile, on parle alors d'émulsion de type "huile-dans-l'eau" (H/E). La phase huileuse peut-être constituée d'hydrocarbures ou de fluorocarbures et transporter des médicaments hydrophobes\*. Les surfactants utilisés pour stabiliser les émulsions sont souvent les mêmes que ceux utilisés pour les micelles non polymériques (voir item précédent). Les émulsions peuvent être de taille microscopique ou nanoscopique [HP08a]<sup>[3]</sup>. Cependant, seules les microémulsions sont thermodynamiquement stables et transparentes [SCBR09]<sup>[1]</sup>, ce sont les plus utilisées pour encapsuler des médicaments. Par exemple, la vincristine est rendue soluble dans la phase huileuse de vitamine E et d'acide oléique d'une microémulsion H/E stabilisée par un mélange de surfactants constitué de cholestérol et de polyéthylène glycol. La microémulsion obtenue est très stable (7,5% de vincristine décomposée après un an de stockage) et la bio-distribution du médicament est augmentée dans la tumeur tandis que la toxicité est réduite [JTNM03]<sup>[4]</sup>.

Les émulsions peuvent également être multiples. Ainsi, les émulsions du type eau-dans-

- 
- [1] E Soussan, S Cassel, M Blanzat, and I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(2):274–288, 2009.
  - [2] Yasuhiro Matsumura and Kazunori Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*, 100(4):572–579, April 2009. PMID: 19462526.
  - [3] G. A. Hussein and W. G. Pitt. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10):1137–1152, 2008.
  - [4] Wang Junping, Kozo Takayama, Tsuneji Nagai, and Yoshie Maitani. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin e and cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics*, 251(1-2):13–21, January 2003. PMID: 12527171.

l'huile-dans-l'eau (E/H/E) permettent-elles d'encapsuler des médicaments hydrophiles\*. Higashi et al. ont encapsulé de l'épirubicine dans une microémulsion d'huile d'oeillette iodée et ont pu prouver cliniquement son efficacité chez des patients ayant un carcinome hépatocellulaire avec des nodules récurrents après hépatectomie [HS00]<sup>[5]</sup>.

Les émulsions sont des vecteurs de médicaments très flexibles, qui présentent entre autre l'avantage d'être simples à réaliser et peuvent être facilement ajustés aux besoins en changeant le rapport volumique de ces composants. De plus, elles peuvent être produites à grande échelle. Par contre, leur usage peut-être limité par une forte concentration de surfactants, en particulier pour les micro-émulsions, induisant des risques de toxicité importante. De plus, en cas d'injection en intra-veineuse, une séparation de phase de l'émulsion peut se produire, induisant un risque d'embolie chez le patient [SCBR09]<sup>[1]</sup>.

### Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées par auto association d'une ou plusieurs bi-membrane phospholipidiques et renfermant un "compartiment" aqueux (c.f figure 1.5 G et figure 1.6 c). Ce sont des structures colloïdales\* de forme sphérique. Les liposomes ont attiré l'attention de nombreux chercheurs dans des domaines variés à cause de leur membrane qui est comparable à la membrane phospholipidique des cellules vivantes [SCBR09]<sup>[1]</sup>. Ils ont le grand avantage de pouvoir encapsuler des médicaments hydrophiles dans leur centre, des médicaments hydrophobes\* dans leur bi-membrane ou encore des médicaments amphiphiles\* partiellement dans la membrane (côté hydrophobe\* de la molécule) et partiellement dans le centre ou à l'extérieur (côté hydrophile\*). Leur taille varie suivant le type de lipide utilisé et le nombre de bi-membrane lipidique qui les compose. S'ils sont constitués d'une seule bi-membrane (unilamellaires), leur taille est comprise entre 20 nm et 1  $\mu\text{m}$ . S'ils possèdent plusieurs membranes (multilamellaires), leur taille minimale est de 0,5  $\mu\text{m}$ . Les liposomes sont principalement utilisés pour solubiliser les médicaments hydrophobes difficiles à injecter sous leur forme libre [DCS08]<sup>[6]</sup> ou pour accroître la durée de vie des médicaments hydrophiles\* dans le sang, qui sont très vite éliminés par les reins. Cette encapsulation si elle est stable, a pour conséquence une bio distribution qui favorise une plus haute absorption du médicament par la tumeur qu'avec un médicament sous sa forme libre.

Une des formulations les plus connues de liposomes est le Caelyx<sup>®</sup> (nom européen) ou Doxil<sup>®</sup> (nom américain) qui sont des liposomes constitués de polyéthylène glycol (PEG) encapsulant de la doxorubicine et utilisé principalement chez certains patients atteints

---

[5] Shushi Higashi and Toshiaki Setoguchi. Hepatic arterial injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma with epirubicin aqueous solution as numerous vesicles in iodinated poppy-seed oil microdroplets: clinical application of water-in-oil-in-water emulsion prepared using a membrane emulsification technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1):57–64, December 2000.

[6] Mark E Davis, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9):771–782, September 2008. PMID: 18758474.

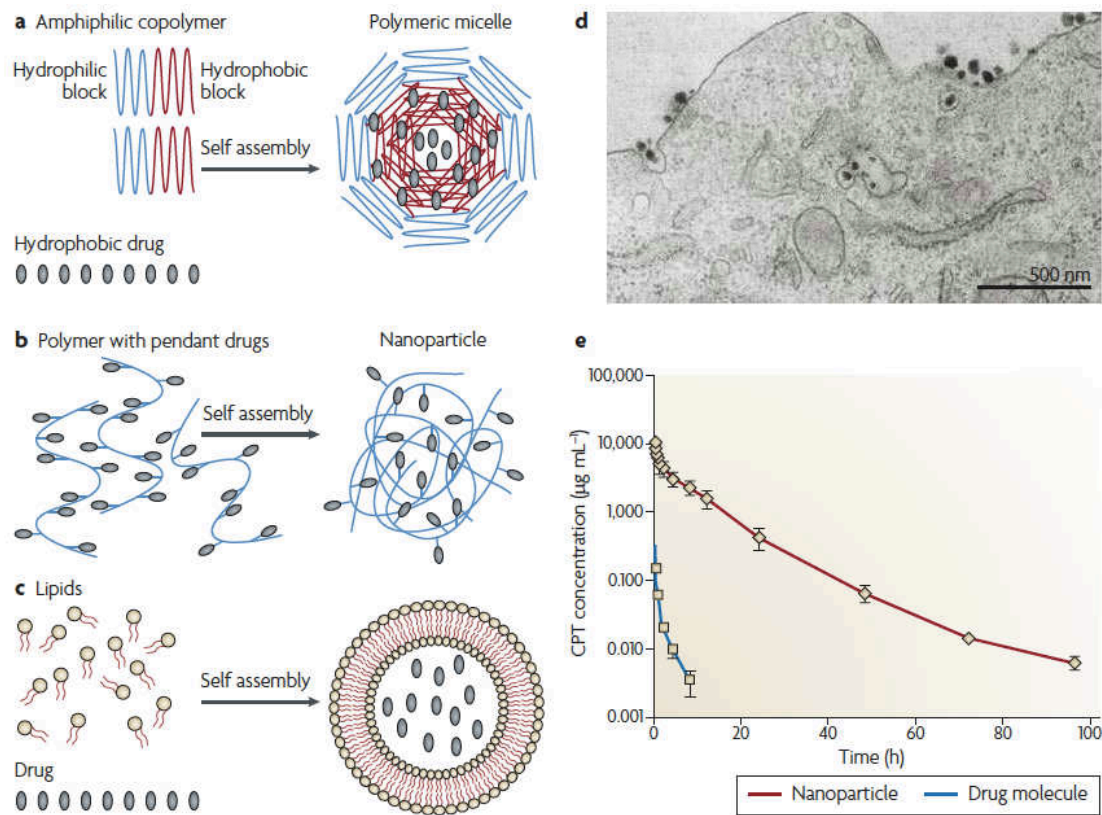


FIGURE 1.6 – Catégories principales de nanoparticules en essais cliniques et description de certaines de leurs propriétés. (a) Micelles polymériques formées à partir d'entités thérapeutiques et de copolymères séquencés. (b) Nanoparticules formées avec des conjugués polymères-médicaments. (c) Liposomes. (d) Les nanoparticules ciblées peuvent entrer dans les cellules par endocytose\*. Cette figure montre une micrographie réalisée avec un microscope électronique en transmission de nanoparticules à la surface d'une cellule cancéreuse, entrant dans la cellule ou à l'intérieur de vésicules endocytiques. (e) Les nanoparticules peuvent avoir une pharmacocinétique prolongée par rapport à l'entité thérapeutique seule. Les données présentées sont celles du CPT, un médicament constitué de petites molécules, et de nanoparticules contenant du CPT, chez le rat. Source : [DCS08].

de cancer du sein, de l'ovaire, d'un myelome multiple ou encore chez les patients atteints d'un sarcome de Kaposi à un stade avancé d'infection par le VIH. Le Daunoxome<sup>®</sup> contenant de la daunorubicine est également utilisé en traitement du sarcome de Kaposi chez des patients à un stade avancé de l'infection par le VIH. De nombreuses autres formulations sont en phase de test préclinique tels que le LE-SN-38<sup>®</sup> (SN-38), le CPX-1<sup>®</sup> (CPT-11/irinotecan, floxuridine) [MK09]<sup>[1]</sup>, le NX211(lurtotecan) (voir tableau 1.7 pour d'autres exemples et Torchilin et al. [Tor07]<sup>[2]</sup> pour d'autres exemples et leur applica-

[1] Yasuhiro Matsumura and Kazunori Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*, 100(4):572–579, April 2009. PMID: 19462526.  
 [2] Vladimir P. Torchilin. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, 9(2):E128–E147, 2007.

tions thérapeutiques).

Les liposomes sont des vecteurs de médicaments souples. Cependant leur préparation peut s'avérer complexe et doit être adaptée selon le médicament encapsulé et le site visé. Par ailleurs, certains liposomes ont une stabilité chimique assez pauvre, ce qui peut parfois entraîner un largage de médicaments avant qu'ils n'atteignent leur site d'action [SCBR09]<sup>[3]</sup>. C'est en particulier le cas pour l'encapsulation des petites molécules de médicaments hydrophiles\*/hydrosolubles, qui, si elles ne sont pas liées chimiquement ou précipitées à l'intérieur du liposome, sont très vite libérées après injection dans la circulation sanguine. Par contre, si le médicament hydrophile a une masse moléculaire importante, ou si le médicament est hydrophobe/lipophile l'encapsulation est beaucoup plus stable dans la circulation sanguine.

### 1.2.2 Mécanismes d'accumulation et de délivrance du médicament encapsulé

Idéalement, pour que les médicaments anticancéreux soient efficaces, ils doivent atteindre les tissus tumoraux en traversant les barrières de l'organisme en perdant un minimum de leur volume ou activité dans la circulation sanguine. De plus, ils doivent pouvoir détruire les cellules cancéreuses en laissant les cellules normales intactes, par un mécanisme de largage contrôlé de la substance active [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[4]</sup>. Les nanoparticules peuvent permettre d'accroître, pour les meilleures d'entre elles, les capacités des médicaments à remplir partiellement ces deux objectifs. Pour cela, les particules doivent posséder certaines caractéristiques pour déjouer les mécanismes de défense de l'organisme ou profiter de certaines propriétés des tumeurs.

Premièrement, pour pouvoir délivrer efficacement le médicament aux tissus tumoraux, il faut que les particules aient la capacité de rester longtemps dans la circulation sanguine sans en être éliminées par le système réticulo-endothélial\* (SRE) du foie et de la rate par exemple. L'élimination des particules par le SRE peut-être limité ou supprimé en ajustant la taille et les propriétés de surface des particules.

Deuxièmement, si les particules restent longtemps dans la circulation en échappant aux SRE grâce à leur taille et propriétés de surface, elles ont plus de chance d'atteindre les tissus tumoraux si leur taille est adéquate. Et ce, de part la nature même des vaisseaux tumoraux. Ces derniers ont des caractéristiques pathophysiologiques qui permettent aux macromolécules et aux nanoparticules de tailles appropriées, de s'accumuler dans les tissus tumoraux. En effet, les nouveaux vaisseaux (néovascularisation) construits par la tumeur (processus d'angiogénèse) pour s'approvisionner en oxygène et

---

[3] E Soussan, S Cassel, M Blanzat, and I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(2):274–288, 2009.

[4] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5):1310–1316, March 2008.

Nom	Formulation	Diamètre (mm)	Demi-vie (h)	Clairance (ml/min*Kg)	Commentaires
Doxorubicine (Dox)	NaCl 0.9%	Non applicable	0.8	14.4	Médicament à petites molécules
SP1049C	Micelle Pluronic® + Dox	22–27	2.4	12.6	Micelle
NK911	Micelle PEG-asparaginase + Dox	40	2.8	6.7	Micelle
Doxil	PEG-liposome + DOX	80–90	84.0	0.02	Liposome PEGylé (long temps de circulation)
Taxol (paclitaxel)	Cremophor EL®	Non applicable	21.8 (20.5)	3.9 (9.2)	Médicament à petites molécules
Genexol-PM	Micelle PEG-PLA + paclitaxel	20–50	11.0	4.8	Micelle
Abraxane	Albumin + paclitaxel	120*	21.6	6.5	Nanoparticule d'albumine avant injection; statut in vivo inconnu
Xyotax	PG + paclitaxel	Inconnu	70–120	0.07–0.12	Nanoparticule polymérique
Camptosar (promédicament du SN-38)	NaCl 0.9%	Non applicable	11.7	5.8	Promédicament à petite molécule
LE-SN-38	Liposome + SN-38	Inconnu	7–58	3.5–13.6	Liposome
Topotécan (analogue de la camptothécine)	NaCl 0.9%	Non applicable	3.0	13.5	Médicament à petites molécules
CT-2106	PG + camptothecin	Inconnu	65–99	0.44	Nanoparticule polymérique
IT-101	Cyclodextrine contenant des polymères + camptothécine	30–40	38	0.03	Nanoparticule polymérique avec durée de circulation prolongée

FIGURE 1.7 – Comparaison de la pharmacocinétique (chez l'homme) de petites molécules de médicaments avec des nanoparticules thérapeutiques. Signification des abréviations : PEG : polyéthylène glycol; PEG-PLA : copolymère séquencé de PEG et poly(L-lactic acid); PG : acide polyglutamique; SN-38 : 7-ethyl-10-hydroxycamptothécine. \*Pourrait se dissoudre dans le sang. Adapté de : [DCS08].

nutriments nécessaires à son développement, sont désorganisés et présentent de nombreux pores dilatés entre les cellules endothéliales [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup>. De plus, le système de drainage lymphatique est lui aussi affecté par la tumeur, avec une maigre clairance\* lymphatique qui augmente la rétention des macromolécules de médicaments et des particules dans les tissus interstitiels\* des tumeurs [MBD09]<sup>[2]</sup>. L'ensemble des propriétés des vasculaturisations, permettant l'extravasation et l'accumulation dans les tumeurs, est dénommé l'effet d'augmentation de perméabilité et de rétention (en anglais *EPR-effect* : *Enhanced permeability and retention effect*) et est représenté schématiquement

[1] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5):1310–1316, March 2008.

[2] H Maeda, G Y Bharate, and J Daruwalla. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3):409–419, March 2009. PMID: 19070661.

figure 1.8 ([PKH<sup>+</sup>07]<sup>[3]</sup>). Le phénomène d'”EPR” et ses mécanismes sont décrits plus en détails par Maeda et al. [MBD09]<sup>[2]</sup>.

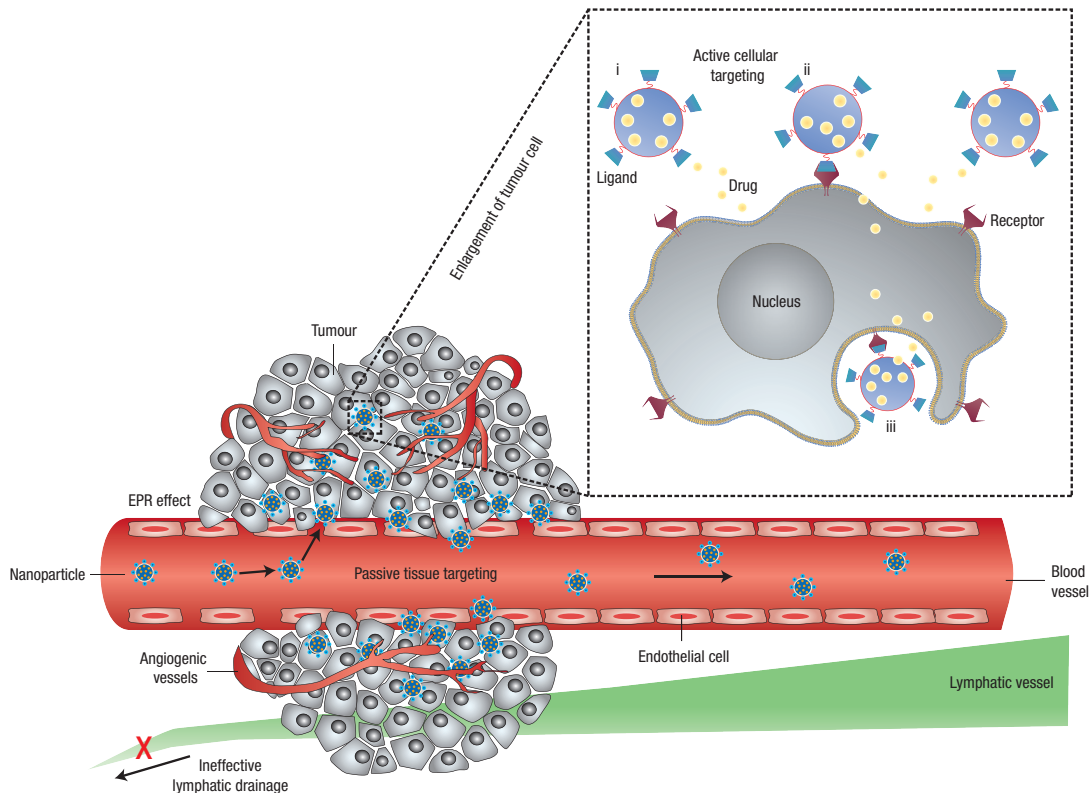


FIGURE 1.8 – Représentation schématique des différents mécanismes par lesquels les nanovéhicules peuvent délivrer des médicaments aux tumeurs. Des nanoparticules polymériques sont prises comme nanovéhicules représentatifs (cercles). L'accumulation passive dans les tissus se fait par extravasation des nanoparticules grâce à la forte perméabilité des vaisseaux tumoraux et un drainage lymphatique inefficace (effet EPR). Un ciblage actif (voir encart) peut-être réalisé en fonctionnalisant la surface des nanoparticules à l'aide de ligands qui favorisent la reconnaissance et la liaison cellulaire. Les nanoparticules peuvent (i) relâcher leur contenu à proximité des cellules visées; (ii) se fixer sur la membrane cellulaire et libérer le médicament de façon prolongée à l'extérieur de la cellule; ou (iii) être internalisées dans la cellule [PKH<sup>+</sup>07].

### 1.2.2.1 Influence de la taille des particules sur l'accumulation dans les tissus

La taille des nanoparticules est un facteur très important pour permettre une accumulation efficace dans la tumeur. Elle doit permettre de pénétrer dans les pores de l'endothélium (i.e extravaser) des vaisseaux tumoraux, qui peuvent varier de 100 à 600 nm

[3] Dan Peer, Jeffrey M. Karp, Seungpyo Hong, Omid C. Farokhzad, Rimona Margalit, and Robert Langer. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*, 2(12):751–760, December 2007.



selon Cho et al. [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup> ou de 100 à 780 *nm* selon Andresen et al. [AJJ05]<sup>[2]</sup>. De plus, leur taille doit être supérieure à celle des jonctions des tissus normaux pour ne pas y pénétrer. Cette condition ne pose habituellement pas problème vu que la taille de ces jonctions est généralement inférieure à 6 *nm* [AJJ05]<sup>[2]</sup>.

Par ailleurs, les nanoparticules, afin de rester longtemps dans la circulation sanguine et extravaser à travers les jonctions des vaisseaux tumoraux, doivent pouvoir au moins en partie échapper au SRE. Certains organes et tissus contenant des macrophages\* ont des entothéliums discontinus qui permettent de filtrer des éléments contenus dans la circulation sanguine. Le glomérule\* rénal a des jonctions de l'ordre de 40 à 60 *nm* [DMH<sup>+</sup>99]<sup>[3]</sup>. Pour ne pas être filtrées par le glomérule rénal et donc ressortir des reins, les particules doivent avoir une taille supérieure à 60 *nm*. Les jonctions des sinusoides\* de la rate et les fenêtres des cellules de Kupffer dans le foie ont des tailles pouvant varier de 150 à 200 *nm* [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup>. Pour permettre une extravasation efficace dans les tissus tumoraux, de nombreuses particules ont des tailles inférieures à 150-200 *nm*. Ces particules pénètrent donc dans le foie et la rate et ce sont les macrophages présents dans ces organes qui sont les principaux responsables de l'enlèvement des nanoparticules de la circulation sanguine. Ce sont, par conséquent, les principaux sites d'accumulation des nanoparticules, en dehors de la tumeur. Cependant, contrairement aux tissus tumoraux où les nanoparticules y sont efficacement capturées une fois qu'elles y ont pénétré, les nanoparticules entrant dans le foie et la rate peuvent en ressortir si elles parviennent à échapper aux macrophages [DMH<sup>+</sup>99]<sup>[3]</sup>. Le principal moyen d'échapper aux macrophages est d'avoir des propriétés de surfaces adéquates, ce qui est décrit dans le paragraphe suivant.

Pour résumer, la taille idéale des nanoparticules pour une accumulation passive efficace dans les tissus tumoraux se situe entre 60 et 100 *nm*. Cette affirmation est illustrée dans le tableau 1.7 où des nanoparticules de tailles différentes sont comparées. En effet, c'est le Doxil (ou Caelyx) avec des tailles de liposomes de l'ordre de 80-90 *nm*, qui a la demi-vie\* la plus longue parmi les formulations présentées.

### 1.2.2.2 Influence des propriétés de surface des nanoparticules sur la capture par les macrophages

En plus de la taille, les propriétés de surface des nanoparticules sont déterminantes sur leur durée de vie et leur sort, en particulier concernant leur capture par les macro-

- 
- [1] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5):1310–1316, March 2008.
  - [2] TL Andresen, SS Jensen, and K Jorgensen. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *PROGRESS IN LIPID RESEARCH*, 44(1):68–97, January 2005.
  - [3] D C Drummond, O Meyer, K Hong, D B Kirpotin, and D Papahadjopoulos. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews*, 51(4):691–743, December 1999. PMID: 10581328.

phages lorsqu'elles circulent dans le sang. Les nanoparticules doivent idéalement avoir une surface hydrophile\* pour échapper à la capture par les macrophages [CWN<sup>+</sup>08]<sup>[1]</sup>. Cependant, même avec une surface hydrophile, des nanovéhicules comme les liposomes sont tout de même capturés par les macrophages lorsqu'ils restent longtemps dans la circulation sanguine.

Beaucoup de tentatives sont effectuées pour imiter la surface des globules rouges en ajoutant à la surface des nanoparticules des polymères hydrophiles\* à chaînes flexibles comme le PEG ou le GM1, de façon à induire un "encombrement stérique" [DMH<sup>+</sup>99]<sup>[3]</sup>. En clair, la forme des polymères ajoutés ainsi que l'augmentation des forces répulsives à la paroi induites par l'ajout de ces molécules peuvent empêcher ou ralentir l'accès des autres macromolécules à la paroi de la nanocapsule. Par conséquent, l'accès des opsonines du plasma sanguin à la surface des nanoparticules est rendu difficile voire impossible, ce qui inhibe l'interaction entre les nanoparticules et les macrophages. En effet, les opsonines sont des protéines du plasma sanguin (éléments du complément, anticorps...) qui favorisent la phagocytose\* de particules en se liant avec elles (processus d'opsonisation). Les opsonines s'associent beaucoup plus facilement avec des molécules hydrophobes qu'avec des molécules hydrophiles ; c'est pourquoi les molécules hydrophiles ont une plus grande demi-vie\* dans la circulation sanguine. Le PEG est aujourd'hui largement utilisé en particulier à la surface des liposomes (liposomes dit furtifs) pour retarder la clairance des nanoparticules par les macrophages et donc augmenter la durée de vie des nanoparticules dans la circulation sanguine. Un bon exemple est le Caelyx ou Doxil, un liposome pégylé contenant de la doxorubicine et mentionné dans la section précédente décrivant les liposomes. La demi-vie\* du Caelyx dans la circulation sanguine est 100 fois supérieure à celle de la doxorubicine libre (c.f tableau 1.7).

La charge électrique à la surface des particules a aussi une influence sur la capture par les macrophages et l'accumulation dans la tumeur. Il est généralement préférable que ces charges soient très légèrement négatives ou positives pour minimiser les interactions. En effet, les parois internes des vaisseaux sanguins et les surfaces des cellules contiennent beaucoup de composants chargés négativement ; ce qui aura pour conséquence de repousser les véhicules fortement chargés négativement. Par ailleurs, plus la charge de surface devient élevée (positivement ou négativement), plus la capture par les macrophages s'accroît [DCS08]<sup>[4]</sup>.

### 1.2.2.3 Délivrance des médicaments aux cellules

Si une accumulation importante des nanoparticules dans les tissus tumoraux constitue une condition nécessaire pour un traitement ciblé et efficace, elle n'est cependant pas suffisante. Le médicament transporté par un "véhicule" n'est pas biodisponible et

---

[4] Mark E Davis, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9):771–782, September 2008. PMID: 18758474.

n'a pas d'activité thérapeutique tant qu'il n'a pas été relâché sous sa forme libre. Le niveau de médicament libre sur le site visé doit en plus excéder la concentration minimum cytotoxique, sinon aucune réponse thérapeutique appréciable ne sera générée. Par ailleurs, la vitesse à laquelle le médicament est libéré des véhicules peut avoir un effet considérable sur les résultats thérapeutiques. Ce processus dépend non seulement de la composition du liquide interstitiel entourant les tumeurs, ainsi que de la dégradation intracellulaire, mais aussi du type de médicament et du procédé d'encapsulation ou de conjugaison du médicament [HM08]<sup>[1]</sup>.

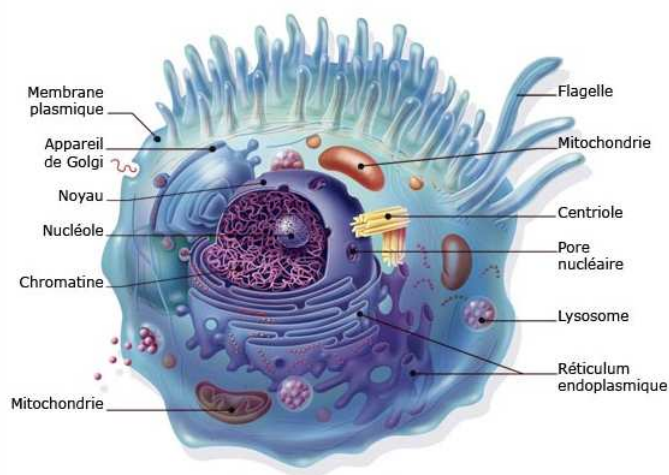


FIGURE 1.9 – Représentation schématique des éléments constitutifs d'une cellule. Les organites sont les différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme et délimitées du reste de la cellule par une membrane lipidique tels que : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les lysosomes\*, les endosomes\* (non représenté). Source : [www.santea.com](http://www.santea.com).

Le transport intracellulaire des molécules actives de médicament est également un des problèmes clés de la délivrance de médicaments. Beaucoup d'agents pharmaceutiques nécessitent une délivrance intracellulaire pour exercer leur action thérapeutique à l'intérieur du cytoplasme ou des organites (c.f figure 1.9). De plus, la délivrance intracellulaire de médicament peut permettre de surmonter certaines limitations importantes de l'action du médicament, tel que la multi-résistance aux chimiothérapies. Cependant, la nature des membranes cellulaires empêche les protéines, les peptides et les nanoparticules de pénétrer dans les cellules à moins qu'il y ait un mécanisme de transport actif; ce qui est le cas pour les peptides très courts [Tor07]<sup>[2]</sup>.

L'accumulation "passive" de nanoparticules non ciblées dans les tissus tumoraux ne garantit donc pas une action efficace du médicament sur les cellules cancéreuses condui-

- 
- [1] Islam Hamad and S Moein Moghimi. Critical issues in site-specific targeting of solid tumours: the carrier, the tumour barriers and the bioavailable drug. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(2):205–219, February 2008. PMID: 18248319.
- [2] Vladimir P. Torchilin. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, 9(2):E128–E147, 2007.

sant à la destruction de celles-ci. Divers procédés de ciblage actif et de déclenchement du largage de médicaments sont mis en oeuvre pour tenter de vaincre ces difficultés de délivrance de médicaments aux cellules.

## 1.3 Ciblage actif et déclenchement du largage de médicament encapsulé

### 1.3.1 Le ciblage actif

L'ajout de ligands de ciblage qui fournissent des interactions spécifiques entre les surfaces des nanoparticules-cellules cancéreuses peut jouer un rôle essentiel dans la localisation finale de la nanoparticule et la délivrance sélective aux cellules cancéreuses. Par exemple, les nanoparticules peuvent cibler les cellules cancéreuses si leurs surfaces contiennent des groupes caractéristiques tels que des petites molécules, des peptides, des protéines ou des anticorps. Ces fragments peuvent se lier aux récepteurs de protéines situés à la surface des cellules cancéreuses, tels que les récepteurs de la transferrine, qui sont connus pour être plus nombreux sur un large éventail de cellules cancéreuses. Ces ligands de ciblage permettant aux nanoparticules de se lier aux récepteurs de surface cellulaire et de pénétrer dans les cellules par endocytose\* (c.f figure 1.8 et figure 1.6 d). Des travaux récents comparant des nanoparticules ciblées ou non (à base de lipides [KDS<sup>+</sup>06]<sup>[3]</sup> ou à base de polymères [BSH<sup>+</sup>07]<sup>[4]</sup>) ont montré que le rôle principal des ligands de ciblage est d'améliorer l'absorption cellulaire dans les cellules cancéreuses plutôt que d'augmenter leur accumulation dans la tumeur [DCS08]<sup>[5]</sup>. Il peut cependant y avoir plusieurs problèmes liés à de tels systèmes ciblés :

1. Le ligand (anticorps, autre protéine, peptide ou glucide) fixé à la surface transporteur peut augmenter le taux d'absorption par le SRE, malgré la présence de protection stérique greffées à leur surface [Tor09]<sup>[6]</sup>.
2. Les ligands permettant une longue circulation des nano/microvéhicules dans le sang, pourraient faciliter le développement d'une réponse immunitaire non désirée (comme cela a pu être montré avec l'augmentation des anticorps anti-liposomes),

- 
- [3] Dmitri B. Kirpotin, Daryl C. Drummond, Yi Shao, M. Refaat Shalaby, Keelung Hong, Ulrik B. Nielsen, James D. Marks, Christopher C. Benz, and John W. Park. Antibody targeting of Long-Circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Research*, 66(13):6732–6740, July 2006.
- [4] Derek W. Bartlett, Helen Su, Isabel J. Hildebrandt, Wolfgang A. Weber, and Mark E. Davis. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39):15549–15554, September 2007. PMID: 17875985 PMCID: 1978218.
- [5] Mark E Davis, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9):771–782, September 2008. PMID: 18758474.
- [6] Vladimir Torchilin. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3):431–444, March 2009. PMID: 18977297.

dont l'ampleur dépend du type de ligand (de petites peptides ou fragments Fv sont moins immunogènes qu'une molécule complète d'IgG), et de la composition du véhicule [AJJ05]<sup>[1]</sup>.

3. La quantité de ligand attaché à la surface de la particule, peut être cruciale pour permettre une liaison réussie avec la cellule cible, tout en maintenant une circulation prolongée de la particule dans le sang [Tor09]<sup>[2]</sup>.
4. Lorsque des nanoparticules telles que les liposomes s'accumulent par extravasation dans l'espace interstitiel et se lient à la première ligne de cellules, les liposomes avec de fortes liaisons de ligands peuvent obstruer le passage, empêchant les autres liposomes de s'accumuler et interagir avec les cellules [AJJ05]<sup>[1]</sup>.
5. L'internalisation par endocytose\* est la stratégie normale associée à un ciblage actif. Le problème est que chaque molécule ou particule entrant dans la cellule par endocytose peut être capturée dans un endosome\*, et finir dans un lysosome\* où elle sera dégradée. Dans ce cas, seule une petite fraction de substance non affectée parvient dans le cytoplasme. Cependant, même délivrés dans le cytoplasme, les médicaments doivent encore trouver leur chemin vers des organites spécifiques liées à leur mode d'action pour exercer leur activité thérapeutique [Tor07]<sup>[3]</sup>. D'après Andresen et al. [AJJ05]<sup>[1]</sup>, la capacité du médicament à échapper à la capture par les endosomes aboutissant à une dégradation par les liposomes, dépendrait de la méthode d'encapsulation du médicament. La nature du médicament semble elle aussi importante.

Si les difficultés citées précédemment sont surmontées par un design approprié de la nanocapsule et de ses ligands, et un choix judicieux de médicaments, les nanoparticules ciblées peuvent augmenter significativement le ciblage et la destruction de cellules cancéreuses. Ainsi des nanoparticules ciblées ont été approuvées pour un usage clinique telles que le Mylotarg (Anti-CD33-Ab contenant de la Calicheamicine), le Zevalin (Anti-CD20-Ab contenant du 90Y), le Bexxar (Anti-CD20-Ab contenant du 131 I) ou sont en première phase de tests cliniques telles que le PK2 (Polymère galactose contenant de la doxorubicine), le MCC465 (Ab-liposome contenant de la doxorubicine), le MBP-426 (Transferrine-liposome contenant de l'oxaliplatine) [MK09]<sup>[4]</sup>.

- 
- [1] TL Andresen, SS Jensen, and K Jorgensen. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *PROGRESS IN LIPID RESEARCH*, 44(1):68–97, January 2005.
- [2] Vladimir Torchilin. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3):431–444, March 2009. PMID: 18977297.
- [3] Vladimir P. Torchilin. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, 9(2):E128–E147, 2007.
- [4] Yasuhiro Matsumura and Kazunori Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*, 100(4):572–579, April 2009. PMID: 19462526.

### 1.3.2 Le déclenchement du largage de médicament encapsulé

Comme nous l'avons vu précédemment, le ciblage actif de vecteurs de médicaments n'est pas toujours suffisamment au point ou pas toujours suffisant pour permettre d'augmenter l'efficacité du traitement par rapport à un ciblage passif. La poursuite du développement de nano/micro-particules pharmaceutiques avec un long temps de circulation, passe par l'ajout de fonctions sensibles à un stimulus. L'idée est que certains stimuli, provenant des propriétés de la zone pathologique ou appliqués sur cette zone, pourraient modifier les propriétés des particules conçues à cet effet. Ainsi, l'application d'un stimulus peut permettre selon les cas, de contrôler la libération de médicament, d'augmenter la pénétration du médicament dans les cellules, de contrôler le devenir intracellulaire du médicament ou même permettre une action physique sur les tissus environnants. Les principaux stimuli actuellement utilisés pour modifier le comportement des systèmes de délivrance de médicaments dans la zone cible sont décrits dans le tableau ci-après.

On peut voir que les stimuli typiques des tissus pathologiques proviennent des propriétés

<b>Stimulus</b>	<b>Localisation</b>	<b>Origine du stimulus</b>
<b>PH</b>	interne	PH faible dans les zones pathologiques, comme les tumeurs, infarctus, inflammations, en raison de l'hypoxie et la mort cellulaire massive. PH faible dans le cytoplasme cellulaire, les endosomes et des lysosomes.
<b>Potentiel redox</b>	interne	Augmentation de la concentration de glutathion* à l'intérieur de nombreuses cellules pathologiques par rapport à sa concentration extracellulaire.
<b>Température</b>	interne	Hyperthermie associée à une inflammation.
<b>Température</b>	externe	Génération de chaleur par l'application locale d'ultrasons sur des nanoparticules thermosensibles ou application locales d'ondes électromagnétiques de hautes fréquences induisant l'oscillation de nanoparticules magnéto et thermo-sensibles.
<b>Champ magnétique</b>	externe	Des champs magnétiques de gradients et profils différents appliqués sur le corps peuvent concentrer les vecteurs de médicaments magnéto-sensibles dans les zones visées.
<b>Ultrasons</b>	externe	L'insonification de la zone visée permet de la visualiser dans le cas d'agents de contrastes échogéniques. L'insonification permet un largage de médicaments ou de gènes encapsulés dans la zone visée et peut faciliter leur pénétration dans les cellules.

FIGURE 1.10 – Tableau des principaux stimuli pouvant être utilisés pour déclencher la libération de médicaments encapsulés. Tableau adapté de la review de Torchilin et al. [Tor09]

mêmes de ces tissus comme le pH ou le potentiel redox. L'utilisation d'un stimulus de température peut provenir des propriétés des tissus (une inflammation étant toujours accompagnée d'une hyperthermie locale) ou d'une application d'ondes extérieures. Les propriétés des ondes ultrasonores ou électromagnétiques, appliquées de l'extérieur du corps, sont également utilisées comme stimuli [Tor09]<sup>[2]</sup>.

### 1.3.3 La délivrance de médicament encapsulé déclenchée par ultrasons

Nous allons nous intéresser tout particulièrement à l'application d'ultrasons induisant le largage de médicaments encapsulés, qui est la thématique principale de la thèse présentée. L'application externe d'ultrasons, pour induire et contrôler la délivrance de médicaments encapsulés, est une approche relativement récente bien qu'une étude complète sur la délivrance de médicaments par des microparticules polymériques d'une centaine de  $\mu\text{m}$  ait été publiée dès 1989! [KLL89]<sup>[1]</sup>. Le concept repose sur le design de "véhicules" ou "vecteurs" de médicaments qui, sous l'action d'ultrasons appliqués sur la zone ciblée, libèrent leur contenu et peuvent éventuellement augmenter l'absorption du médicament dans les cellules.

Certains véhicules de médicaments existants tels que des micro ou nanoparticules sont utilisés, modifiés ou non, pour une délivrance activée par ultrasons. D'autres ont été créés exclusivement à cet effet ou détournés de leur fonction initiale.

Dans ce paragraphe, nous allons décrire les principaux types de véhicules utilisés pour la délivrance de médicament déclenchée par ultrasons.

#### Les microbulles

Les microbulles se distinguent des autres véhicules classiques car elles contiennent du gaz. Elles n'ont généralement pas de bi-paroi, ce sont simplement des bulles de gaz stabilisées à leur surface par un surfactant conventionnellement phospholipidique, ou des protéines telles que l'albumine ou encore des polymères [PHS04]<sup>[2]</sup>. Elles ont pour la plupart une taille comprise entre 1 et 10  $\mu\text{m}$ . Leur fréquence de résonance est par conséquent de l'ordre du MHz, ce qui explique que cette fréquence soit souvent utilisée pour l'activation de ces microbulles par ultrasons [DRM08]<sup>[3]</sup>. Actuellement, les microbulles sont commercialisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie ultrasonore tels que Alunex<sup>®</sup> et Sonovue<sup>®</sup>. Leur potentiel pour la délivrance de médicament a été remarqué et de nombreuses recherches sont menées afin de développer des microbulles pour cette application.

Les premières études réalisées consistaient à co-injecter des particules thérapeutiques avec des agents de contraste et à appliquer par la suite des ultrasons sur la zone

- 
- [1] J KOST, K LEONG, and R LANGER. Ultrasound-enhanced polymer degradation and release of incorporated substances-(controlled release drug delivery systems). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20):7663–7666, October 1989.
- [2] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.
- [3] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.

ciblée [PSKS98]<sup>[4]</sup>, [MQ00]<sup>[5]</sup>. Ainsi, l'application d'ultrasons permet d'activer les microbulles et changer la perméabilité vasculaire locale, induisant l'extravasation des agents thérapeutiques [Fer08]<sup>[6]</sup>.

Des études plus récentes utilisent des systèmes incluant des microbulles qui permettent le transport de médicaments. Plusieurs approches existent pour la conception de tels systèmes. Les médicaments peuvent être attachés à la membrane de la microbulle par des liaisons chargées non covalentes ou par des ligands inclus dans la membrane. Ils peuvent aussi être directement incorporés dans la membrane ou à l'intérieur de la microbulle [DRM08]<sup>[3]</sup>. Ces systèmes ont un double intérêt. D'une part, ils sont à la fois des transporteurs de médicaments et des activateurs de largage par ultrasons. Ils permettent ainsi la libération du médicament transporté par une destruction localisée et contrôlée des microbulles sous l'action des ultrasons. D'autre part, l'activation et la destruction des microbulles par ultrasons peut induire une augmentation de l'extravasation des substances libérées, due à la cavitation. Ces phénomènes sont décrits dans la section 1.4. Les avantages majeurs de ces microbulles comme vecteurs de médicaments sont donc une augmentation du transport de médicaments (ou de gènes) à travers les vaisseaux sanguins et aussi à travers les membranes cellulaires, résultant des oscillations proches des microbulles [Fer08]<sup>[6]</sup>.

Elles présentent cependant plusieurs inconvénients. Premièrement, la charge de substances thérapeutiques pouvant être transportée est relativement faible. Deuxièmement, leur demi-vie dans la circulation sanguine est courte (de l'ordre de quelques minutes pour une vésicule lipidique et un peu plus longue pour des vésicules polymériques) ; ce qui n'est pas propice à une accumulation efficace dans les tissus visés. Enfin, leur taille micrométrique ne leur permet pas une extravasation directe dans les tissus visés mais les cantonne à une délivrance intravasculaire.

### **Les particules de perfluorocarbone ou hydrocarbones perfluorés**

De nouveaux véhicules activables par ultrasons avec des diamètres variant de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres ont fait leur apparition. La plus petite taille de ces particules facilite notamment leur extravasation dans les vaisseaux tumoraux. Des nanoparticules contenant du perfluorocarbone liquide ont été largement utilisées pour

---

[4] RJ Price, DM Skyba, S Kaul, and TC Skalak. Delivery of colloidal, particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *CIRCULATION*, 98(13):1264–1267, September 1998.

[5] DL Miller and J Quddus. Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 97(18):10179–10184, August 2000.

[6] KW Ferrara. Driving delivery vehicles with ultrasound. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 60(10):1097–1102, June 2008.



l'imagerie IRM et ultrasonore [LWS<sup>+</sup>96]<sup>[1]</sup>, [LWF<sup>+</sup>97]<sup>[2]</sup> (notamment avec Echogen<sup>®</sup>), et plus récemment pour la délivrance thérapeutique de médicaments [DZB<sup>+</sup>06]<sup>[3]</sup>.

On parle d'émulsions colloïdales à changement de phase. Pour clarifier le concept, prenons l'exemple de Rapoport et al. [RGK07]<sup>[4]</sup>. Ils ont conçu un système sophistiqué de nano/microémulsion (20 nm - 6 μm) de perfluoropentane, stabilisé par des surfactants de copolymère séquencés biodégradables et chargés avec de la doxorubicine. Sous l'action des températures plus élevées dans les tissus tumoraux et/ou d'une insonification modérée, les "gouttelettes" se vaporisent, résultant en la formation *in situ* de microbulles chargées de médicaments [TBWC09]<sup>[5]</sup>. Les microbulles peuvent être ensuite activées par ultrasons dans les tissus tumoraux pour libérer la doxorubicine et favoriser son absorption par les cellules. L'efficacité thérapeutique de ces particules, combinées avec des micelles contenant de la doxorubicine, a pu être démontrée dans l'étude de Rapoport et al. avec la régression d'un modèle tumoral implanté chez la souris (c.f figure 1.11).

Ce qui distingue ces émulsions des microbulles, c'est leur centre liquide de perfluorocarbone et leur taille. De plus, l'introduction d'huile dans leur centre, permet de solubiliser des médicaments hydrophobes. Ces émulsions ou "nanogouttes" de perfluorocarbone sont également plus stables que les microbulles sous l'action de contraintes mécaniques ou de pression, et sont capables de transporter des charges de médicaments plus importantes. Cependant, elles sont un peu moins échogènes. Comme les microbulles, elles peuvent être encapsulées dans des enveloppes lipidiques ciblées moléculairement [DZB<sup>+</sup>06]<sup>[3]</sup>. Un review très complète de Tinkov et al. [TBWC09]<sup>[5]</sup> décrit plus en détails ces émulsions (qu'ils classifient dans les microbulles) et les autres microbulles.

Pour le moment, ces systèmes de délivrance de médicament n'en sont qu'au stade de la recherche dans les laboratoires et nécessitent un développement et des caractérisations additionnels pour montrer leur avantage par rapport aux thérapies existantes [RGK07]<sup>[4]</sup>.

- 
- [1] G M Lanza, K D Wallace, M J Scott, W P Cacheris, D R Abendschein, D H Christy, A M Sharkey, J G Miller, P J Gaffney, and S A Wickline. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*, 94(12):3334–3340, December 1996. PMID: 8989148.
- [2] G M Lanza, K D Wallace, S E Fischer, D H Christy, M J Scott, R L Trousil, W P Cacheris, J G Miller, P J Gaffney, and S A Wickline. High-frequency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 23(6):863–870, 1997. PMID: 9300990.
- [3] Paul A Dayton, Shukui Zhao, Susannah H Bloch, Pat Schumann, Kim Penrose, Terry O Matsunaga, Reena Zutshi, Alexander Doinikov, and Katherine W Ferrara. Application of ultrasound to selectively localize nanodroplets for targeted imaging and therapy. *Molecular Imaging: Official Journal of the Society for Molecular Imaging*, 5(3):160–174, July 2006. PMID: 16954031.
- [4] N Rapoport, ZG Gao, and A Kennedy. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 99(14):1095–1106, July 2007.
- [5] Steliyan Tinkov, Raffi Bekeredian, Gerhard Winter, and Conrad Coester. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(6):1935–1961, June 2009. PMID: 18979536.

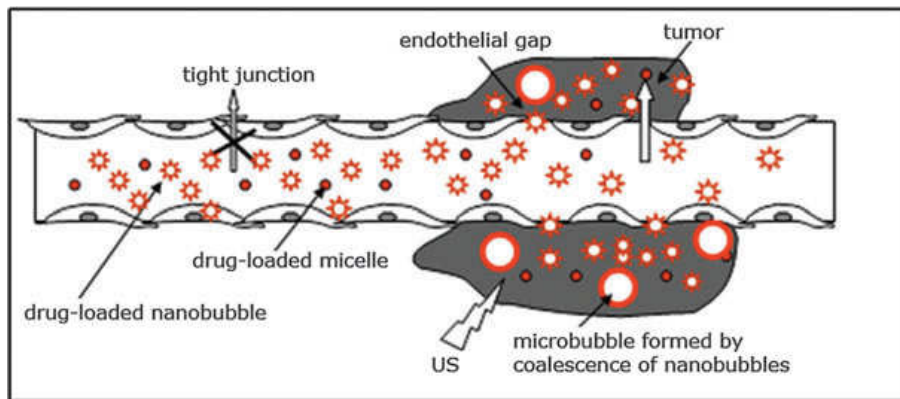


FIGURE 1.11 – Représentation schématique du ciblage de médicament avec le système de délivrance de médicament échogène de Rapoport et al. [RGK07]. Le système de délivrance est composé de micelles polymériques (petits cercles), de nanobulles (étoiles) et de microbulles (grand cercles). Les micelles sont formées de copolymères séquencés biodégradables tels que le PEG-PLLA, les bulles sont formées de perfluoropentane stabilisé par le même type de polymère. Le médicament lipophile, ici de la doxorubicine, est confiné dans le centre des micelles et dans les parois des nano/microbulles. Les lacunes entre les cellules endothéliales des vascularisations tumorales permettent aux micelles et nanobulles de s'accumuler dans l'interstitium tumoral. Au cours de l'accumulation dans les tissus, les petites nanobulles coalescent pour former des microbulles hautement échogéniques.

### Les micelles polymériques

Les micelles polymériques ont été décrites §1.2.1. Les petits vecteurs polymériques tels que les micelles, présentent l'avantage d'avoir une stabilité prolongée et un largage contrôlé *in vivo* et peuvent aussi répondre à une activation mécanique et thermique [Fer08]<sup>[6]</sup>. Leur petite taille et leur composition leur permet généralement d'échapper à la capture par les macrophages du système réticulo-endothélial des divers organes, et aussi de pénétrer dans les lacunes des vascularisations des tumeurs [DRM08]<sup>[7]</sup>. En théorie, les micelles ne sont pas actives acoustiquement si elles ne contiennent aucun gaz. Toutefois, elles peuvent être attirées puis ouvertes par cisaillement sous l'action des bulles de cavitation [PHS04]<sup>[8]</sup>.

Plusieurs études sont menées actuellement sur la combinaison des micelles et des ultrasons. Les micelles les plus fréquemment utilisées sont les micelles Pluronic<sup>®</sup> P105, formées de copolymères de type ABA avec A, segment de PEO (polyéthylène oxide), et B, segment de PPO (polypropylèneoxyde) [HCRP02]<sup>[9]</sup>. Des études *in vitro* analysent

- 
- [6] KW Ferrara. Driving delivery vehicles with ultrasound. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 60(10):1097–1102, June 2008.
- [7] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.
- [8] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMCID: 1361256.
- [9] G. A. Hussein, D. A. Christensen, N. Y. Rapoport, and W. G. Pitt. Ultrasonic release of doxorubicin from pluronic p105 micelles stabilized with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *Journal of*

le largage accru de ces micelles sous l'action des ultrasons [HRC<sup>+</sup>02]<sup>[1]</sup>, [SHP07]<sup>[2]</sup>. Cependant, sous l'effet de l'administration *in vivo*, les micelles pluronic P105 se dissocient rapidement, ce qui a pour conséquence une désintégration des micelles et un largage prématuré [PHRP00]<sup>[3]</sup>. Il est par conséquent important d'accroître leur stabilité par l'ajout d'agents stabilisants [OBB<sup>+</sup>10]<sup>[4]</sup>. Par exemple, PluroGel<sup>tm</sup> est une micelle Pluronic P105 stabilisée avec l'agent de réticulation\* N,N-diéthylacrylamide (NNDEA) [HP08b]<sup>[5]</sup>, [PHRP00]<sup>[3]</sup>.

Ainsi, la délivrance micellaire de médicaments par ultrasons de 20 kHz et 1 MHz à des intensités relativement faibles a montré une efficacité thérapeutique sur des modèles de cancer chez le rat et la souris [HP08a]<sup>[6]</sup>.

L'utilisation des micelles peut probablement être élargie et améliorée en combinaison avec d'autres stratégies telles que l'ajout de ligand de ciblage et le mélange avec des microbulles [HP08a]<sup>[6]</sup>. C'est ce qu'on fait Rapoport et al. dans l'étude rapportée dans le paragraphe précédent, en combinant des micelles et des "microbulles" de perfluoropentane.

### Les liposomes

Les liposomes ont été décrits sous leur forme "classique" dans la section 1.2.1. Les liposomes, comme les micelles, ne sont pas naturellement échogènes car ils ne contiennent *a priori* pas de gaz. Le contenu des liposomes peut-être libéré de deux façons sous l'action des ultrasons : soit par contraintes mécaniques, soit par énergie thermique.

L'utilisation d'ultrasons induisant une élévation de température (hyperthermie) permet de libérer un médicament contenu dans des particules thermosensibles fabriqués à cet effet. Nous ne nous étendrons pas sur le sujet qui n'a pas un lien direct avec l'objet de cette thèse. Succinctement, la membrane des liposomes thermosensibles a une température de transition de phase au-delà de laquelle sa perméabilité augmente et entraîne la libération

---

*Controlled Release*, 83(2):303–305, 2002.

- [1] G. A. Hussein, N. Y. Rapoport, D. A. Christensen, J. D. Pruitt, and W. G. Pitt. Kinetics of ultrasonic release of doxorubicin from pluronic p105 micelles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 24(3-4):253–264, 2002.
- [2] D Stevenson-Abouelnasr, GA Hussein, and WG Pitt. Further investigation of the mechanism of doxorubicin release from p105 micelles using kinetic models. *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES*, 55(1):59–66, March 2007.
- [3] JD Pruitt, G Hussein, N Rapoport, and MG Pitt. Stabilization of pluronic p-105 micelles with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *MACROMOLECULES*, 33(25):9306–9309, December 2000.
- [4] Chris Oerlemans, Wouter Bult, Mariska Bos, Gert Storm, J Frank W Nijssen, and Wim E Hennink. Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, August 2010. PMID: 20725771.
- [5] G. A. Hussein and W. G. Pitt. The use of ultrasound and micelles in cancer treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8(5):2205–2215, 2008.
- [6] G. A. Hussein and W. G. Pitt. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10):1137–1152, 2008.

de son contenu. Généralement, les lipides employés ont une température de transition de phase aux alentours de 42°C, de façon à être stable dans la circulation sanguine et libérer leur contenu sous l'action d'une petite élévation de température induite par hyperthermie, micro-ondes, eau de bain chauffée, etc [DRM08]<sup>[7]</sup>.

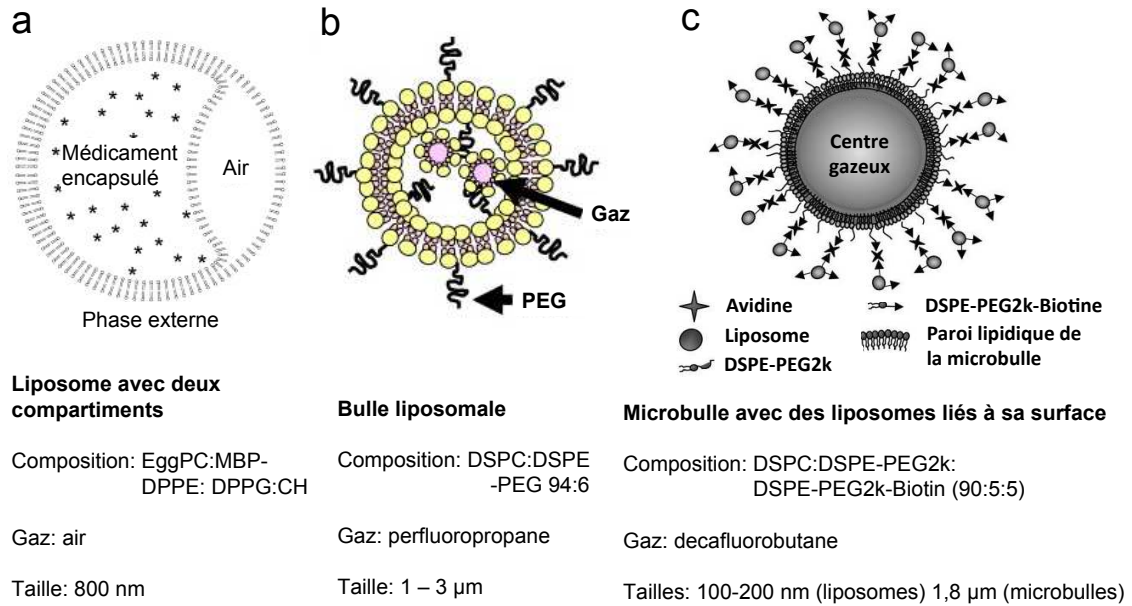


FIGURE 1.12 – Principaux types de liposomes ou structures hybrides échogènes contenant des liposomes. a). Structure suggérée de liposome acoustiquement actif à deux compartiments. Il est attendu que d'importantes hétérogénéités existent dans leurs préparations telles que les proportions de volume occupée par l'air et le compartiment aqueux contenant le médicament peuvent varier considérablement. De plus, il est peu probable que les liposomes soient unilamellaires. b). Représentation schématique de liposome PEGylé échogène contenant des microbulles. c). Image conceptuelle de microbulle transportant des liposomes liés à sa surface. La microbulle recouverte de DSPE-PEG2k 5% et de DSPE-PEG2k-Biotine 5% est conjuguée via des molécules d'avidine avec des liposomes portant de la DSPE-PEG2k-Biotine 5% et du NBD-cholestérol 5%. Le NBD-cholestérol fournit une mesure de fluorescence pour l'optimisation de la construction du véhicule hybride, pour la quantification de des liaisons et aussi pour l'internalisation cellulaire résultant de l'interaction cellule-véhicule. Les schémas a,b,c ont été adaptés respectivement des références [HM04],[STN<sup>+</sup>08],[KDL<sup>+</sup>07]. Les caractéristiques détaillées des liposomes sont issues de ces références et d'une review de Huang et al. [Hua08].

L'autre facteur de libération de substance encapsulée dans des liposomes et qui nous intéresse tout particulièrement, est l'application de contraintes mécaniques associées à l'insonification et en particulier à la cavitation comme nous le verrons ci après. En effet, tout comme les micelles, les liposomes peuvent être attirés puis ouverts par cisaillement

[7] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.

sous l'action des bulles de cavitation [PHS04]<sup>[1]</sup>. Cependant, l'absence de gaz à l'intérieur des liposomes classiques et leur petite taille ne leur permet pas de favoriser la cavitation. Il est par conséquent nécessaire d'appliquer de grandes pressions acoustiques pour initier la cavitation, ce qui peut entraîner des effets indésirables *in vivo*. C'est pourquoi les chercheurs travaillent sur des stratégies permettant de libérer plus facilement le contenu des liposomes sous l'action des ultrasons.

La première consiste à incorporer du gaz à l'intérieur des liposomes pour les rendre échogènes. En effet, contrairement aux micelles, la structure des liposomes peut permettre l'encapsulation de gaz, en utilisant des techniques appropriées d'encapsulation ou des structures designées à cet effet. Les liposomes échogènes ont tout d'abord été développés comme agents de contraste ultrasonore [DOG<sup>+</sup>97]<sup>[2]</sup> avant d'être utilisés pour la délivrance de médicaments. Il a été constaté que les liposomes échogènes gardent les caractéristiques de liposomes classiques et peuvent par conséquent être utilisés pour la délivrance de médicaments ou de gènes par co-encapsulation du gaz et de la substance active. Les études publiées à ce jour montrent que la stabilité de l'encapsulation de gaz est hautement dépendante du gaz encapsulé et des propriétés de l'enveloppe lipidique [Hua08]<sup>[3]</sup>. On distingue trois principaux types de liposomes échogènes dont les schémas et principales caractéristiques sont présentés figure 1.12. Le premier type de liposome est un liposome à deux compartiments, l'un contenant du gaz et situé dans la membrane et l'autre situé dans le centre aqueux du liposome et permettant d'encapsuler le médicament. Le second type de liposome aussi appelé bulle liposomale, est un liposome PEGylé avec un centre aqueux contenant des bulles emprisonnées dans des monoparois. Le troisième type de liposome est un "véhicule hybride" constitué d'une microbulle conjuguée avec des liposomes par l'intermédiaire d'une liaison biotine-avidine.

De part leur taille comprise entre 800 nm et 3  $\mu\text{m}$  (c.f figure 1.12) ces liposomes n'extravasent pas dans les tissus tumoraux. Se pose alors la question de leur efficacité dans la délivrance de médicaments ou de gènes dans les cellules tumorales. Suzuki et al. [STN<sup>+</sup>08]<sup>[4]</sup> ont injecté un mélange de bulles liposomales et d'ADN plasmidique codant pour la luciférase dans l'artère fémorale chez la souris et ont effectué simultanément une exposition aux ultrasons pour induire de la cavitation. Deux jours après, l'expression de

- 
- [1] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.
  - [2] S M Demos, H Onyuksel, J Gilbert, S I Roth, B Kane, P Jungblut, J V Pinto, D D McPherson, and M E Klegerman. In vitro targeting of antibody-conjugated echogenic liposomes for site-specific ultrasonic image enhancement. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(2):167–171, February 1997. PMID: 9040090.
  - [3] S. L. Huang. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10):1167–1176, 2008.
  - [4] Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, and Kazuo Maruyama. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1-2):49–55, April 2008. PMID: 18082343.

luciférase était détectée uniquement dans les tissus tumoraux. Cette étude montre que l'extravasation n'est pas forcément obligatoire pour obtenir une efficacité thérapeutique. Cependant, la substance active n'est ici pas encapsulée, et pourrait donc induire des effets toxiques dans d'autres parties du corps. De plus, l'injection est faite directement dans l'artère liée à la tumeur, ce qu'il n'est pas toujours possible de faire. Vient alors la question de la demi-vie des liposomes échogènes qui, à ma connaissance, n'a pas été investiguée et qui doit être assez faible, vue la taille importante de ces bulles liposomales. Les applications principales de ces liposomes ne pouvant extravaser sont logiquement la thrombolyse\* et le traitement de l'athérosclérose\*. Des études sont également conduites, comme mentionné précédemment, pour la délivrance de gènes ou encore de gaz bioactifs ou de médicaments, la substance active ou les gènes pouvant extravaser sous l'influence des ultrasons.

Ces liposomes, encore au stade du développement, ne sont pas arrivés aux phases d'essais cliniques et nécessitent encore des ajustements pour y parvenir. Les applications potentielles (citées précédemment) de ces liposomes ainsi que leurs caractéristiques et limitations sont décrits en détail par Huang et al. [Hua08]<sup>[3]</sup>. L'avantage de ces liposomes par rapport à leurs cousins traditionnels est qu'ils permettent une visualisation et un monitoring du traitement par imagerie ultrasonore.

La deuxième stratégie consiste à modifier la composition de la paroi lipidique pour la rendre plus sensible aux contraintes mécaniques générées par les ultrasons. Cette démarche est celle adoptée par l'entreprise norvégienne Epitarget qui est à l'origine du projet dans lequel s'inclue la thèse et qui s'occupe du développement des liposomes sonosensibles. Cette stratégie ne rend pas les liposomes à proprement parler échogènes mais simplement plus aptes à libérer leur contenu sous l'action des contraintes mécaniques résultant de l'application des ultrasons. De la même façon que les liposomes thermosensibles relarguent leur contenu plus facilement lorsqu'ils sont soumis à la chaleur. L'avantage de cette méthode par rapport au ciblage ultrasonore de liposomes échogènes est qu'elle permet de conserver des liposomes de petite taille favorable à une clairance faible dans le sang et une accumulation importante dans les tissus. Le champ de recherche sur ce genre de liposomes est tout récent et part de la constatation que la composition de l'enveloppe lipidique des liposomes influe sur le largage déclenché par ultrasons. Une des premières études consacrées spécifiquement à ce sujet est réalisé par Lin et Thomas en 2003 [LT03]<sup>[5]</sup> et montre que des liposomes conventionnels (constitués de phosphatidylcholine (PC)) auxquels ont été ajouté du PEG sont 10 fois plus perméables sous l'action ultrasons à basse fréquence (20 KHz) que ces liposomes sans PEG. De même, ces chercheurs révèlent que plus la molécule utilisée pour former le liposome est petite, plus

---

[5] HY Lin and JL Thomas. PEG lipids and oligo(ethylene glycol) surfactants enhance the ultrasonic permeabilizability of liposomes. *LANGMUIR*, 19(4):1098–1105, February 2003.

les liposomes sont perméables sous l'action des ultrasons. De plus, selon la nature du surfactant utilisé, la susceptibilité des liposomes aux ultrasons peut radicalement changer. Dans une étude ultérieure [LT04]<sup>[1]</sup>, ces mêmes chercheurs exposent que le cholestérol, connu pour augmenter la résistance à la rupture et diminuer la perméabilité, a peu d'impact sur la libération par ultrasons. Ceci donne des indications sur les mécanismes de libération du médicament par ultrasons et sera discuté dans la section suivante. Pong et al. [PUG<sup>+</sup>06]<sup>[2]</sup> montrent également l'influence du PEG sur la libération du contenu de liposomes par ultrasons et mettent en évidence une quantité optimale de PEG à incorporer dans leur formulation de liposome sous les conditions d'insonification utilisées (20 KHz  $p- = 0,06$  MPa) pour obtenir le largage le plus important (5%mol ou 8%mol de PEG). Cette tendance est confirmée dans la review de Schroeder et al. [SHT<sup>+</sup>09]<sup>[3]</sup>. Dans un souci de concevoir des liposomes sensibles aux ultrasons (sono-sensibles) et stables dans le sérum et potentiellement dans le sang, nos partenaires ont mené des recherches sur les composants lipidiques et leur proportions pouvant modifier la sensibilité aux ultrasons des liposomes. Ils ont incorporé un lipide non utilisé dans les liposomes conventionnels, le 1,2 distearoylsn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DSPE) en association avec du distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), du DSPE-PEG et du cholestérol [ENR<sup>+</sup>10]<sup>[4]</sup>. En comparant diverses formulations de liposomes contenant de la doxorubicine insonifiés à 40 KHz, ils ont principalement démontré que (1) le DSPE augmente la sonosensibilité (2) l'association de cholestérol et de DSPE à des niveaux élevés et moyens augmentent synergétiquement la sonosensibilité (3) de hautes concentrations de cholestérol augmentent la stabilité dans le sérum. A de hauts niveaux de DSPE, la libération de doxorubicine *in vitro* est jusqu'à 7 fois plus importante que des liposomes de même composition mais dont le DSPE est remplacé par du DSPC. Les formulations de liposomes ayant fait l'objet de cette étude ont été testées *in vitro* et *in vivo* dans les dispositifs ultrasonores expérimentaux que nous avons développé au cours de la thèse. Les expériences seront par conséquent décrites dans les chapitres suivants.

- 
- [1] HY Lin and JL Thomas. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. *LANGMUIR*, 20(15):6100–6106, July 2004.
- [2] M Pong, S Umchid, AJ Guarino, PA Lewin, J Litniewski, A Nowicki, and SP Wrenn. In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. *ULTRASONICS*, 45(1-4):133–145, December 2006.
- [3] A Schroeder, R Honen, K Turjeman, A Gabizon, J Kost, and Y Barenholz. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 137(1):63–68, July 2009.
- [4] Tove J Evjen, Esben A Nilssen, Sibylla Rognvaldsson, Martin Brandl, and Sigrid L Fossheim. Distearoylphosphatidylethanolamine-based liposomes for ultrasound-mediated drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(3):327–333, August 2010. PMID: 20434558.

## 1.4 Mécanismes potentiels de délivrance par ultrasons de médicaments encapsulés

### 1.4.1 La génération de chaleur

Lorsque les ultrasons se propagent dans un milieu, ils subissent une atténuation qui est en grande partie due à l'absorption par le milieu. Lors de l'absorption, l'énergie mécanique des ultrasons est convertie de façon prédominante sous forme de chaleur. Plus la fréquence et l'intensité acoustique sont élevées, plus l'absorption et par conséquent l'élévation de température, est importante. Par ailleurs, l'utilisation d'ultrasons focalisés permet de concentrer l'énergie dans une seule zone, induisant une élévation locale de température. Ainsi, les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU pour *high intensity focused ultrasound*), sont idéals pour induire une élévation de température dans les tissus et sont utilisés pour l'hyperthermie locale (augmentation locale de la température corporelle au dessus de 37°C). L'hyperthermie peut faciliter le dépôt de médicaments

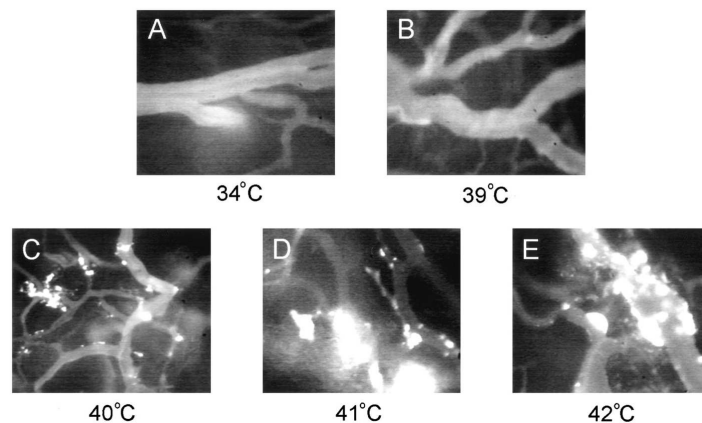


FIGURE 1.13 – Images de microscopie en épi-illumination de tissus tumoraux (carcinome ovarien humain) implanté dans la souris nude avec son lambeau cutané dorsal placé dans un chambre à fenêtre. Extravasation de liposomes de 100 nm rhodamine-labeled à travers les vaisseaux tumoraux 60 min après injections à différentes températures appliquées à la tumeur (par chauffage classique sans ultrasons) : A, 34°C; B, 39°C; C, 40°C; D, 41°C; E, 42°C. A 34 et 39 °C, il n'est pas observé d'extravasation dans les l'interstitium tumoral. A 42°C, des taches fluorescentes périvasculaires se développent et augmentent en taille et se diffusent largement. Source : [KBD01].

dans les tumeurs par deux effets [DRM08]<sup>[5]</sup>. Premièrement, quand la température des tissus augmente, une des premières réactions physiologiques est une augmentation du flux sanguin, provoquant une délivrance additionnelle de médicament dans les tissus [KKM88]<sup>[6]</sup>. Deuxièmement, il a pu être constaté dans certaines études une augmen-

[5] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.

[6] T Karino, S Koga, and M Maeta. Experimental studies of the effects of local hyperthermia on blood flow, oxygen pressure and pH in tumors. *The Japanese Journal of Surgery*, 18(3):276–283, May 1988. PMID:



tation de la taille des pores des microvaisseaux sanguins tumoraux uniquement, facilitant l'extravasation des nanocapsules (ou médicaments) dans la tumeur [GWH<sup>+</sup>96]<sup>[1]</sup>, [KBD00]<sup>[2]</sup>. Dans l'étude de Kong et al. [KBD01]<sup>[3]</sup> décrite figure 1.13, les nanoparticules extravasent pour des températures comprises entre 40°C et 42°C chez la souris nude soit des élévations de température comprises entre 6°C et 8°C dans la tumeur. L'extravasation se poursuit significativement environ 4h après l'hyperthermie. Six heures après, plus aucune extravasation n'est observée. Au delà de 42°C d'élévation, les vaisseaux tumoraux peuvent être endommagés et même devenir hémorragiques et être entièrement détériorés, la température exacte et la durée d'exposition n'étant pas mentionnée dans cette étude.

L'application d'ultrasons d'énergie suffisante pour créer une élévation locale de température de quelques degrés celsius permet par conséquent d'augmenter l'extravasation des nanoparticules spécifiquement dans les tumeurs. Bien entendu, l'utilisation de liposomes thermosensibles permet conjointement d'utiliser la chaleur produite pour libérer la substance thérapeutique.

#### 1.4.2 La pression de radiation et le courant acoustique

La pression de radiation résulte de l'interaction de l'onde ultrasonore avec les tissus ou un autre milieu de propagation. L'onde ultrasonore est absorbée par le milieu ce qui se traduit par une résistance à la propagation de l'onde. En réponse à cette absorption, l'onde ultrasonore exerce une pression dite pression de radiation dans le sens de la propagation. On peut aussi voir la force exercée par le milieu sur l'onde comme une absorption de la quantité de mouvement de l'onde par celui-ci. Si le milieu est un liquide, l'absorption de l'onde se traduit par un écoulement de liquide dans la direction de propagation appelé courant acoustique [Lei05]<sup>[4]</sup>. La force de radiation induit des déplacements qui peuvent engendrer des forces de cisaillement entre les tissus déplacés et non déplacés. La déformation résultante de ces efforts peut induire des espaces entre les cellules endothéliales et élargir l'espace intra-cellulaire des épithéliums. Le premier effet augmente l'extravasation des nanocapsules et le second effet en augmente la diffusion intracellulaire. Bien que le principe physique exact à l'origine de ces mécanismes ne soit pas bien compris, plusieurs études mentionnent que la pression de radiation peut

---

3404776.

- [1] M H Gaber, N Z Wu, K Hong, S K Huang, M W Dewhirst, and D Papahadjopoulos. Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 36(5):1177–1187, December 1996. PMID: 8985041.
- [2] G Kong, R D Braun, and M W Dewhirst. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Research*, 60(16):4440–4445, August 2000. PMID: 10969790.
- [3] G Kong, R D Braun, and M W Dewhirst. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Research*, 61(7):3027–3032, April 2001. PMID: 11306483.
- [4] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.

en être la cause [DRM08]<sup>[5]</sup>. Pour les véhicules contenant du gaz, la force de radiation est utilisée pour les diriger et concentrer près des parois des vaisseaux sanguins, ce qui peut aider à une délivrance ciblée [DKBF99]<sup>[6]</sup>.

### 1.4.3 La cavitation ultrasonore

La cavitation ultrasonore est un des mécanismes prépondérant de libération de médicament encapsulé dans des liposomes conventionnels (non-thermosensibles et sans gaz) et sans doute le mécanisme principal de libération de médicament encapsulé dans des véhicules contenant du gaz. Par ailleurs, la cavitation permet, dans certaines conditions, d'augmenter l'absorption du médicament dans les cellules voire d'augmenter l'ex-travasation des particules dans les tissus visés.

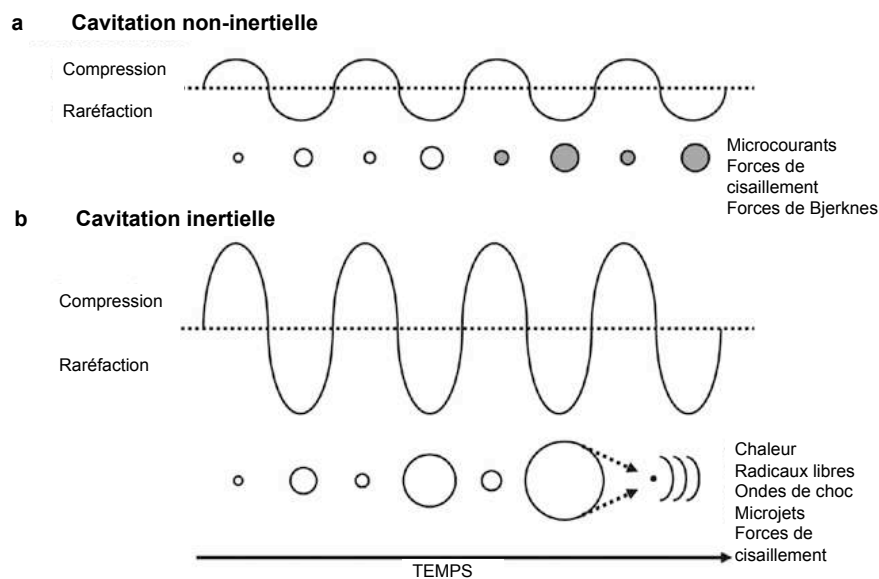


FIGURE 1.14 – Illustration du phénomène de cavitation ultrasonore. Les deux régimes de cavitation et leurs effets sont présentés. En régime de cavitation non-inertielle, la bulle croît par diffusion rectifiée puis oscille de façon stable autour de son rayon d'équilibre. En régime de cavitation inertielle, la bulle croît rapidement (par diffusion rectifiée ou croissance explosive) puis implose. Image modifiée de [NB07].

Ainsi, le terme d'accélération de la célèbre équation de Rayleigh-Plesset régissant la dynamique d'une bulle (équation 1.1 sous sa forme approximée négligeant les pertes thermiques et par radiation) est divisé en deux fonctions, une fonction de pression (FP)

[5] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.

[6] P Dayton, A Klibanov, G Brandenburger, and K Ferrara. Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 25(8):1195–1201, October 1999. PMID: 10576262.

et une fonction inertielle (FI) (équation 1.2). Lorsque la fonction de pression domine (équation 1.3), la cavitation est dite *non-inertielle*, lorsque la fonction inertielle domine (équation 1.4), la cavitation est dite *inertielle*.

$$R\ddot{R} + \frac{3\dot{R}^2}{2} = \frac{1}{\rho_0} \left\{ \left( p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v \right) \left( \frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} + p_v - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\eta\dot{R}}{R} - p_0 - P(t) \right\} + O\left(\frac{\dot{R}}{c}\right) \quad (1.1)$$

avec :

- $R(t)$  le rayon de la bulle au cours du temps
- $R_0$  rayon d'équilibre de la bulle dans le liquide
- $p_0$  pression statique dans le liquide en dehors de la bulle
- $p_v$  pression de vapeur
- $\sigma$  la tension de surface de la bulle qui engendre le terme de pression de Laplace  $\frac{2\sigma}{R}$  qui traduit l'excès de pression à l'intérieur de la bulle due à la tension de surface [Lei97]<sup>[1]</sup> p.68
- $\rho_0$  la masse volumique du liquide est supposée compressible, ce qui est indiqué par le terme négligé  $O\left(\frac{\dot{R}}{c}\right)$  qui indique que les pertes par rayonnement ne sont pas incluses dans l'équation
- $\eta$  la viscosité de cisaillement est le mécanisme unique de dissipation (pertes thermique et par rayonnement négligées)
- $\kappa$  l'index polytropique : quantité non fondamentale qui prend des valeurs comprises entre  $\gamma$  (rapport de la chaleur spécifique à pression constante et de la chaleur spécifique à volume constant) et 1 suivant le comportement du gaz (respectivement adiabatique ou isotherme ou un comportement intermédiaire).

$$R\ddot{R} = FP + FI \quad (1.2)$$

$$FP = \frac{1}{\rho_0} \left\{ \left( p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v \right) \left( \frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} + p_v - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\eta\dot{R}}{R} - p_0 - P(t) \right\} \quad (1.3)$$

$$FI = -\frac{3\dot{R}^2}{2} \quad (1.4)$$

L'apparition de la cavitation dans un milieu dépend d'un grand nombre de paramètres : la pression de raréfaction (c.f figure 1.15), la fréquence de l'onde US, la présence d'impuretés ou de noyaux de gaz ou de vapeur non dissous pouvant servir de germes de cavitation, la présence de gaz dissous, la viscosité du milieu, la température, la pression du milieu, la présence d'interfaces favorables à la nucléation, etc. Sous des conditions expérimentales similaires, il a été constaté que la probabilité et l'intensité de la cavitation augmente avec l'augmentation de la pression de raréfaction ultrasonore ou avec la réduction de la fréquence centrale des ondes générées. Les seuils d'apparition de la cavitation sont donc très dépendants du milieu et des conditions d'expérimentation.

---

[1] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.

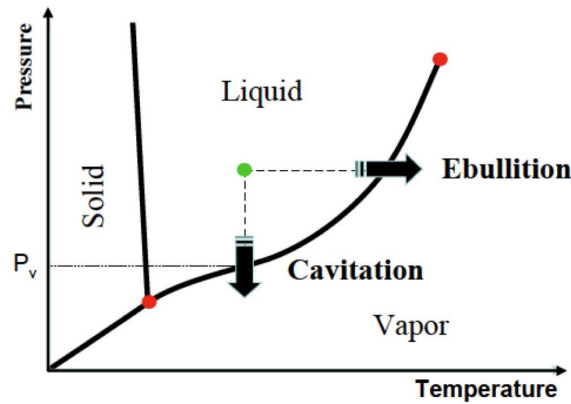


FIGURE 1.15 – Illustration du phénomène de cavitation. Une diminution locale de pression à température constante en dessous de la pression de vapeur saturante\*  $p_v$  entraîne une transition de la phase liquide vers la phase vapeur, et par conséquent la création de bulles de vapeur. L'ébullition est aussi une transition de la phase liquide vers la phase vapeur mais elle est induite par une élévation locale de la température à pression constante [FAR04].

Apfel et Holland [AH91]<sup>[2]</sup> ont défini un indice nommé indice mécanique (MI pour *mechanical index*) qui indique la probabilité d'avoir de la cavitation en fonction de la pression de raréfaction  $p_{r,3}$  et de la fréquence centrale  $f_0$  de l'onde US appliquée :

$$MI = \frac{p_{r,3}}{\sqrt{f_0}} \quad (1.5)$$

en supposant que l'atténuation du milieu est de  $0,3 \text{ dB/cm.MHz}$ . En théorie, lorsque le MI est inférieur à 0,7, la présence de cavitation est peu probable. Tous les appareils échographiques affichent le MI; cependant cet indice s'appuie sur des expériences *in vitro* et ne garantit pas l'absence de cavitation *in vivo* [HDA<sup>+</sup>96]<sup>[3]</sup>.

### 1.4.3.1 La cavitation non-inertielle

La cavitation non-inertielle est de manière générale le régime de cavitation le moins intense, même si comme nous l'avons indiqué précédemment, il peut donner lieu à des phénomènes de "haute énergie". Cependant, même associée à des phénomènes de "basse énergie", ces effets, en particulier sur les milieux biologiques, sont loin d'être négligeables.

La cavitation non-inertielle consiste essentiellement en l'oscillation linéaire ou non-linéaire de la bulle autour de son rayon d'équilibre  $R_0$  sous l'action de l'onde ultra-

[2] RE Apfel and CK Holland. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 17(2):179–185, 1991.

[3] Christy K. Holland, Cheri X. Deng, Robert E. Apfel, Jonathan L. Alderman, Leonardo A. Fernandez, and Kenneth J. W. Taylor. Direct evidence of cavitation in vivo from diagnostic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 22(7):917–925, 1996.

sonore. Dans ce régime de cavitation, c'est la fonction de pression (1.3) qui domine dans l'équation de Rayleigh-Plesset et qui régit par conséquent la dynamique de la bulle. Après sa formation, la bulle croît progressivement sous les oscillations de l'onde par le phénomène dit de *diffusion rectifiée* (voir figure 1.14 a). Durant la diffusion rectifiée le rayon d'équilibre  $R_0$  de la bulle augmente à mesure que les pulsations entraînent vers l'intérieur de la bulle du gaz préalablement dissous dans le liquide environnant [Lei05]<sup>[1]</sup>. En effet, pendant les phases de compression de la bulle, du gaz est expulsé de la bulle et pendant les phases d'expansion, du gaz est pompé dans la bulle. Or, pendant les phases d'expansion, la surface de la bulle est plus importante que pendant les phases de dépression, ce qui implique la croissance de la bulle. Cet effet, appelé *effet de surface* est renforcé par un effet dit *de couche* qui augmente la concentration de gaz situé dans la couche extérieure à la bulle pendant la phase d'expansion de la bulle. Ces effets sont décrits plus en détails dans le livre de Leighton *section 443* [Lei97]<sup>[2]</sup>. La diffusion rectifiée n'a lieu que si la pression acoustique est supérieure à la pression de Laplace (décrite dans l'équation 1.1) induite par la tension superficielle de la bulle. Ce seuil de pression s'appelle le seuil de diffusion rectifiée. Lorsque la pression acoustique est tout juste égale à la pression du seuil de diffusion rectifiée, la bulle ne peut ni grossir ni se dissoudre [EF63]<sup>[3]</sup>, [HP61]<sup>[4]</sup>. Au dessus de ce seuil, la bulle croît par diffusion rectifiée jusqu'à atteindre sa taille résonnante, pour laquelle elle va osciller de façon stable et avec de faibles amplitudes d'oscillations. En régime linéaire, la cavitation stable peut-être modélisée par un système masse-ressort amorti (ressort : compressibilité du gaz, masse : inertie du fluide environnant, amortissement : pertes visqueuses, thermiques, par rayonnement) [CFHR07a]<sup>[5]</sup>. La fréquence de résonance d'une bulle peut par conséquent être calculée en utilisant ce modèle. Ainsi, pour une bulle d'air de rayon initial d'équilibre  $R_0$  dans l'eau, la fréquence de résonance est donnée par :

$$f_r \simeq \frac{3,3}{R_0} Hz \quad (1.6)$$

Pour des pressions de raréfaction plus élevées, la réponse de la bulle devient non linéaire, ce qui a pour effet d'engendrer une oscillation asymétrique de la bulle se traduisant au niveau spectral l'apparition d'harmoniques (c.f figure 1.16 [Sza04]<sup>[6]</sup>).

- 
- [1] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasonnd Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
- [2] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.
- [3] Anthony Eller and H. G. Flynn. Rectified diffusion during nonlinear pulsations of cavitation bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 35(11):1906, November 1963.
- [4] Din-Yu Hsieh and Milton S. Plesset. Theory of rectified diffusion of mass into gas bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 33(2):206–215, February 1961.
- [5] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(2):105–120, March 2007.
- [6] Thomas L. Szabo. *Diagnostic ultrasound imaging: inside out*. Academic Press, 2004.

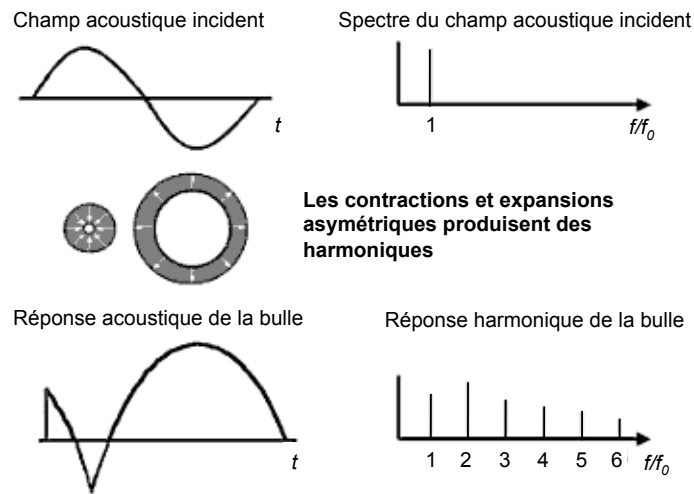


FIGURE 1.16 – A des pressions de raréfaction relativement importantes, la réponse de la bulle devient non linéaire car les phases de compression sont limitées et raccourcies en comparaison avec les phases d’expansion, ce qui se traduit par des oscillations asymétriques de la bulle induisant la génération d’harmoniques. Figure adaptée de [Sza04].

La cavitation non-inertielle n’est possible que si la pression de raréfaction reste inférieure au *seuil de Blake*. Au delà de ce seuil, la bulle répond de manière anarchique et sa croissance devient explosive, le régime de cavitation devient inertiel [Tho06].

Plusieurs phénomènes associés à la cavitation non-inertielle sont capables d’induire des modifications du milieu environnant, que celui-ci soit biologique ou ”synthétique” (tests *in vitro*). De la même manière, ces phénomènes peuvent aider à la délivrance de médicaments encapsulés. Les deux principaux phénomènes décrits dans la littérature sont les micro-courants et les contraintes de cisaillement associées, et la force de Bjerknes secondaire. La production de chaleur induite, même si ce n’est pas un phénomène prépondérant, peut aussi avoir une influence. Dans la suite de cette section nous nous attacherons à décrire chacun de ces phénomènes et leur implication dans la délivrance de médicaments encapsulés.

#### Microcourants et forces de cisaillement associées

Il existe un autre type de courant acoustique que celui que nous avons exposé §1.4.2 qui est lui généré par l’oscillation des bulles en régime de cavitation non-inertielle. Globalement, ce type de courant acoustique se retrouve près de nombreux objets vibrants (membranes, fils..) ou de petites sources acoustiques et serait plutôt lié à des forces de frottement entre une paroi et un milieu soumis à des vibrations circulaires. Contrairement au courant décrit précédemment, cette circulation indépendante du temps se produit seulement dans une petite région de fluide de l’ordre de grandeur de la bulle, d’où

son nom de *microcourant* [Lei05]<sup>[1]</sup>, [Nyb82]<sup>[2]</sup> (voir figure 1.17 [MH03]<sup>[3]</sup>). Les microcourants sont de petits tourbillons créés autour des bulles oscillantes et qui engendrent des forces de cisaillement dans le liquide proportionnelles à l’amplitude des oscillations [PHS04]<sup>[4]</sup>. Ils peuvent accélérer les vitesses des processus et altérer les structures faibles [Nyb01]<sup>[5]</sup>.

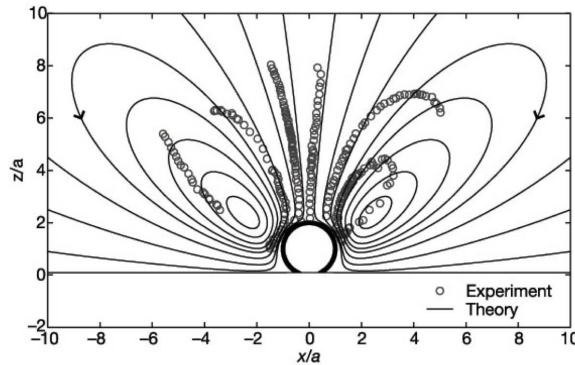


FIGURE 1.17 – Illustration du phénomène de microcourants. Le graphique représente les lignes de courant du champ de l’écoulement simulé, superposé avec des trajectoires de vésicules mesurées expérimentalement. Les lignes de courant sont très similaires aux trajectoires ce qui illustre que les vésicules suivent essentiellement l’écoulement de façon passive [MH03].

Les vitesses et forces de cisaillement engendrées peuvent être très intenses. Ainsi, lorsqu’une bulle de  $10\ \mu\text{m}$  oscille avec des amplitudes de  $2\ \mu\text{m}$  dans l’eau, la vitesse de l’eau est de  $10\ \text{m/s}$  et le taux de cisaillement à la surface de la bulle est de l’ordre de  $10^7\ \text{s}^{-1}$ . Pour se faire une idée de l’intensité de ce taux de cisaillement, il est équivalent au cisaillement de l’eau situé entre deux plaques parallèles, une fixe, l’autre mobile, se déplaçant à une vitesse de  $1010\ \text{m/s}$  et distantes de  $1\ \text{mm}$  l’une de l’autre [PHS04]<sup>[4]</sup>. Les microcourants sont un des effets les plus importants de la cavitation non-inertielle, et sont considérés comme un des facteurs clés par lequel la cavitation peut entraîner la lyse des cellules, rompre par cisaillement des globules rouges ou encore des nano/microcapsules de médicament et favoriser leur délivrance par convection [CFHR07a]<sup>[6]</sup>, [PHS04]<sup>[4]</sup>. Par exemple, Marmottant et Hilgenfeldt [MH03]<sup>[3]</sup> ont montré *in vitro* que de faibles oscil-

- 
- [1] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
- [2] W L Nyborg. Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *The British Journal of Cancer. Supplement*, 5:156–160, March 1982. PMID: 6950752.
- [3] Philippe Marmottant and Sascha Hilgenfeldt. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936):153–156, May 2003.
- [4] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.
- [5] WL Nyborg. Biological effects of ultrasound: Development of safety guidelines. part II: general review. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 27(3):301–333, March 2001.
- [6] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(2):105–120, March 2007.

lations en régime de cavitation stable peuvent être suffisantes pour rompre/fracturer des vésicules lipidiques isolées semblables à des cellules (c.f figure 1.19). Dans le cas de liposomes et éventuellement de micelles, la vésicule se reformera certainement après la fin de l'insonification en une ou plusieurs vésicules de plus petite taille, libérant ainsi une partie de sa charge de médicament, ce qui constitue une méthode intéressante de largage de médicament [PHS04]<sup>[4]</sup>. Notons que ce phénomène lié à l'application d'une contrainte de cisaillement peut avoir lieu en régime de cavitation non-inertielle ou inertielle. Les microcourants peuvent aussi perméabiliser les cellules et les vecteurs de médicaments favorisant ainsi la délivrance de médicaments

Van Wamel et al. montrent qu'une cellule déformée par une microbulle oscillante absorbe du propidium iodide alors qu'une cellule de référence non soumise à l'action d'une bulle oscillante n'en absorbe pas [vWKH<sup>+</sup>06]<sup>[7]</sup>. Ils expliquent ce phénomène par la formation de pores hydrophiles\* dans la membrane du aux oscillations de la bulle entraînant la rupture celle-ci (voir figure 1.18).

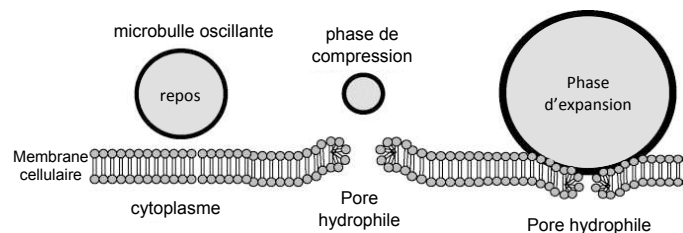


FIGURE 1.18 – *Modèle proposé de microbulle oscillante entraînant la formation de pores dans la membrane cellulaire. Le comportement de poussée et de traction de la bulle cause la rupture de la membrane cellulaire créant un pore hydrophile permettant des flux transmembranaires de fluides et de macromolécules. Figure adaptée de [vWKH<sup>+</sup>06].*

### Force de Bjerknes secondaire

La force de Bjerknes secondaire est la force attractive ou répulsive existant entre deux bulles soumises au champ acoustique secondaire émis par les autres bulles du milieu [MAP<sup>+</sup>97]<sup>[8]</sup>. Cette force a été découverte par Bjerknes ([Bje06]<sup>[9]</sup> cité par [MAP<sup>+</sup>97]<sup>[8]</sup>), d'où son nom. La force est attractive si les deux bulles oscillent en phase et répulsive si elles sont déphasées [You89]<sup>[10]</sup>. Si la force est attractive les bulles peuvent se fondre en

- 
- [7] Annemieke van Wamel, Klazina Kooiman, Miranda Harteveld, Marcia Emmer, Folkert J ten Cate, Michel Versluis, and Nico de Jong. Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 112(2):149–155, May 2006. PMID: 16556469.
- [8] R. Mettin, I. Akhatov, U. Parlitz, C. D. Ohl, and W. Lauterborn. Bjerknes forces between small cavitation bubbles in a strong acoustic field. *Physical Review E*, 56(3):2924, 1997.
- [9] Vilhelm Bjerknes. *Fields of force: supplementary lectures, applications to meteorology*. Columbia University Press, 1906.
- [10] F. Ronald Young. *Cavitation*. McGraw-Hill, September 1989.



une seule bulle, c'est le phénomène de *coalescence* [Lei05]<sup>[1]</sup>. Cette force peut permettre d'attirer des particules plus denses que le milieu vers les bulles oscillantes. Ainsi des véhicules de médicaments peuvent être attirés vers les bulles et libérer leur contenu sous l'action des forces de cisaillements engendrées par l'oscillation des bulles (exemple figure 1.19 [MH03]<sup>[2]</sup>). L'action de la force de Bjerknes secondaire se combine avec les microcourants qui entraînent les particules dans leur trajectoires orbitales et leur permet de se retrouver à proximité des bulles (voir figure 1.17). Le même phénomène a été constaté *in vitro* avec des cellules attirées près des bulles oscillantes [Nyb01]<sup>[3]</sup>. Notons qu'il existe une force de Bjerknes primaire qui ne s'exerce qu'en présence d'ondes stationnaires.



FIGURE 1.19 – Sous une insonification à 40 kHz, une vésicule ( $R = 40\mu\text{m}$ ) avec une membrane lipidique fluorescente est attirée par une bulle oscillante (entourée par un cercle blanc  $R = 20\mu\text{m}$ ). La vésicule se déforme et fragmente. Temps de 1 s entre les clichés. Adapté de [MH03].

### Production de chaleur

Les régimes de cavitation non-inertielle et inertielle augmentent la génération de chaleur induite par les ondes ultrasonores incidentes, et cette génération est dépendante de l'intensité et de la fréquence de l'onde incidente. Les deux types de cavitation ultrasonore augmentent le taux de conversion de l'énergie acoustique incidente en chaleur car elles augmentent la zone dans laquelle l'absorption visqueuse a lieu ou redistribuent l'énergie du champ incident en émettant à des fréquences US plus élevées où elles sont plus fortement absorbées. Trois mécanismes principaux sont responsables de cette conversion : la diffusion multiple par les bulles, l'absorption due aux pertes visqueuses dans la couche limite à la surface de la bulle oscillante et l'absorption des émissions acoustiques secondaires [CFHR07a]<sup>[4]</sup>.

- 
- [1] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
  - [2] Philippe Marmottant and Sascha Hilgenfeldt. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936):153–156, May 2003.
  - [3] WL Nyborg. Biological effects of ultrasound: Development of safety guidelines. part II: general review. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 27(3):301–333, March 2001.
  - [4] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF*

Le premier mécanisme est impliqué dans les deux types de cavitations. En effet, quelque soit le régime de cavitation des bulles, elles vont jouer le rôle de diffuseur de l'énergie acoustique incidente et augmenter la longueur de la trajectoire sur lequel l'absorption visqueuse peut se produire. Le second mécanisme est le mécanisme prépondérant pour la cavitation non-inertielle. En effet les grandes forces de cisaillements présentes dans la couche limite à la surface d'une bulle oscillante et dans le milieu environnant augmentent considérablement l'absorption visqueuse. La bulle agit simultanément comme un vecteur pour la conversion de l'énergie acoustique en énergie mécanique, et de l'énergie mécanique en énergie thermique via la dissipation visqueuse. L'énergie dissipée dépend de la viscosité du milieu, de la dynamique de la bulle, de la taille d'équilibre de la bulle et de la présence de gaz dissous dans le milieu [CFHR07a]<sup>[4]</sup>. La puissance thermique déposée ainsi dans un milieu (calculée par des simulations), peut être du même ordre de grandeur que celle déposée en cavitation inertielle par le biais du 3<sup>ème</sup> phénomène cité précédemment, mais dans un milieu de viscosité différente (voir [CR08]<sup>[5]</sup> pour plus de détails). Ainsi, la cavitation stable produit un échauffement supplémentaire mais seulement *in vitro* dans un milieu très visqueux saturé en gaz pour des bulles de grandes tailles. *In vivo*, pour la plupart des milieux et des conditions d'exposition, les tailles de bulles requises ne pourront être atteintes. Par conséquent la contribution de la cavitation stable à l'augmentation de la chaleur générée par l'onde ultrasonore incidente est très faible *in vivo* et ne contribuera pas à augmenter significativement la délivrance de médicaments.

#### 1.4.3.2 La cavitation inertielle

La cavitation *inertielle* est le régime de cavitation qui produit généralement les effets les plus intenses. Si les conditions sont réunies, une croissance explosive (isotherme) de la bulle a lieu, suivie d'une rapide implosion (adiabatique) puis d'un rebond qui produit une onde de choc\* [Lei05]<sup>[1]</sup>, [CR08]<sup>[5]</sup>, (voir figure 1.14 b). L'implosion de la bulle, assez violente, est dominée par l'inertie de l'afflux de fluide [CR08]<sup>[5]</sup>, d'où le nom de cavitation *inertielle*. Comme on peut s'y attendre, dans ce régime de cavitation, c'est la fonction inertielle (1.4) qui domine l'équation de Rayleigh-Plesset et qui régit la dynamique de la bulle.

La cavitation inertielle est un phénomène de seuil. Ce seuil est défini en terme de pression de raréfaction de l'onde ultrasonore incidente, de sa fréquence, et des tailles de bulles préexistantes et disponibles pour la "nucléation de la cavitation inertielle" [Lei05]<sup>[1]</sup>. Apfel et Holland [AH91]<sup>[6]</sup> ont calculé les tailles de bulles et les pressions nécessaires à

---

*HYPERTHERMIA*, 23(2):105–120, March 2007.

[5] C. C. Coussios and R. A. Roy. Applications of acoustics and cavitation to noninvasive therapy and drug delivery. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 40:395–420, 2008.

[6] RE Apfel and CK Holland. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 17(2):179–185, 1991.

la cavitation inertielle pour différentes fréquences d'insonification (c.f figure 1.20). Ce graphique illustre clairement qu'il existe une plage de taille de bulles, pour une pression et une fréquence donnée, pour laquelle la cavitation inertielle est possible.

Pourquoi les bulles en dehors de cette plage ne cavitent-elles pas de façon inertielle? La réponse vient du fait que la cavitation inertielle comprend une phase de croissance explosive de la bulle, suivie d'une phase d'effondrement rapide de la bulle. Si la bulle est trop petite, alors la tension de surface empêche la croissance initiale soudaine, et la cavitation inertielle ne peut avoir lieu. Cela vient du fait que la pression de Laplace (décrite dans l'équation 1.1) varie de façon inverse avec la taille de la bulle, elle est donc importante pour les petites tailles de bulle. Inversement, si la taille d'équilibre initial de la bulle est trop grande, elle peut grossir mais pas suffisamment pour concentrer l'énergie nécessaire à une violente implosion [Lei05]<sup>[1]</sup>.

Ces bulles présentes dans le milieu, qui ne sont pas de taille appropriée pour caviter de façon inertielle, oscillent de façon stable ou se dissolvent. C'est pourquoi la cavitation inertielle est généralement accompagnée de cavitation non-inertielle (sauf pour des pressions très élevées et des fréquences très basses). Par conséquent, les effets associés à la cavitation non-inertielle tels que les microcourants que nous avons décrits précédemment, ont également lieu en régime de cavitation inertielle et se cumulent avec les effets de ce dernier régime pour aider à la délivrance et l'absorption de médicaments. Les bulles trop petites pour caviter de façon inertielle peuvent croître via le phénomène de diffusion rectifiée associé à la cavitation non-inertielle. Elle peuvent ainsi atteindre la taille appropriée pour ensuite croître de façon explosive et imploser en régime de cavitation inertielle. De plus, une bulle qui implose se fragmente souvent en plus petites bulles qui servent de germe de cavitation, grossissent et peuvent éventuellement imploser une nouvelle fois [PHS04]<sup>[2]</sup>.

Les effets associés à la cavitation inertielle sont nombreux et peuvent, s'ils sont contrôlés, favoriser la délivrance de médicaments encapsulés aux cellules. Lors de l'implosion de la bulle, la température à l'intérieur de celle-ci peut atteindre des milliers de degré Kelvin, résultant en des réactions chimiques induisant la production de radicaux libres (*sonochimie*) et de pulses lumineux de courte durée (phénomène de *sonoluminescence*). L'onde de choc\* produite lors de l'implosion de la bulle engendre de fortes forces de cisaillement et si la bulle implose près d'une paroi, elle peut produire un microjet de liquide se déplaçant à la vitesse du son vers la paroi. Le phénomène de microcourants, décrit dans la section précédente peut aussi avoir lieu, particulièrement si la bulle n'est

---

[1] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.

[2] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.

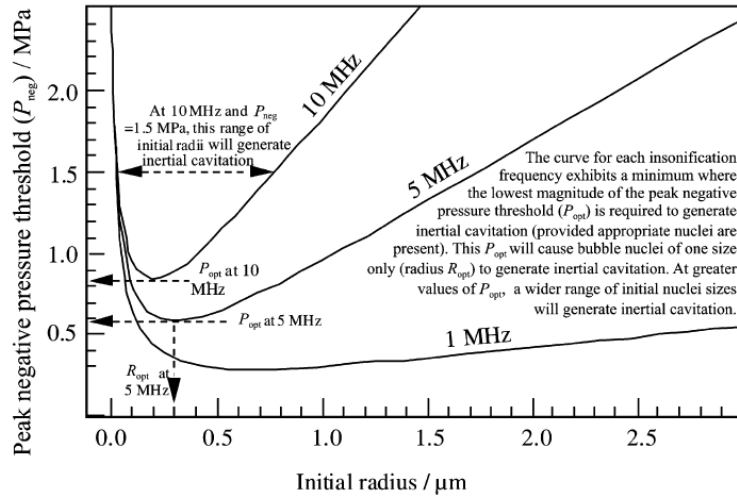


FIGURE 1.20 – Illustration du seuil de cavitation inertielle, d’après les calculs de Apfel et Holland (1991). A une fréquence d’insonification donnée, la cavitation inertielle à lieu uniquement pour des pressions supérieures à la courbe associée, et pour la plage de rayons de bulle définie par l’intersection de la droite de pression et la courbe. Quand la fréquence d’insonification augmente, le seuil de cavitation augmente pour toutes les tailles initiales de bulle, et la plage de rayons de bulle qui engendre la cavitation inertielle diminue [Lei05].

pas détruite par l’implosion et rebondit [CFHR07a]<sup>[3]</sup>.

Dans la suite de cette section nous allons détailler ces phénomènes et leur implication potentielle dans la délivrance de médicament aux cellules. L’impact du phénomène de microcourants sur la délivrance de médicament a déjà été abordé dans la section précédente. La sonoluminescence n’ayant aucun impact connu sur la libération de médicament ne sera pas décrite.

### Ondes de choc et microjets

L’onde de choc\* voire les ondes de chocs créée(s) lors d’une implosion d’une bulle en régime de cavitation inertielle sont des processus complexes qui ont donné lieu, et donne encore lieu à de nombreuses recherches et interprétations diverses.

Les recherches s’accordent sur le fait que des bulles libres qui implosent émettent une onde de choc sphérique symétrique divergente pendant le rebond de la bulle, lorsque celle-ci est située loin d’une paroi [SMH<sup>+</sup>09]<sup>[4]</sup>, [PG00]<sup>[5]</sup>, [LK10]<sup>[6]</sup>. Pour expliquer le

- 
- [3] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(2):105–120, March 2007.
- [4] George J Shaw, Jason M Meunier, Shao-Ling Huang, Christopher J Lindsell, David D McPherson, and Christy K Holland. Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes. *Thrombosis Research*, 124(3):306–310, July 2009. PMID: 19217651.
- [5] R. Pecha and B. Gompf. Microimplosions: Cavitation collapse and shock wave emission on a nanosecond time scale. *Physical Review Letters*, 84(6):1328, February 2000.
- [6] W Lauterborn and T Kurz. Physics of bubble oscillations. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*,

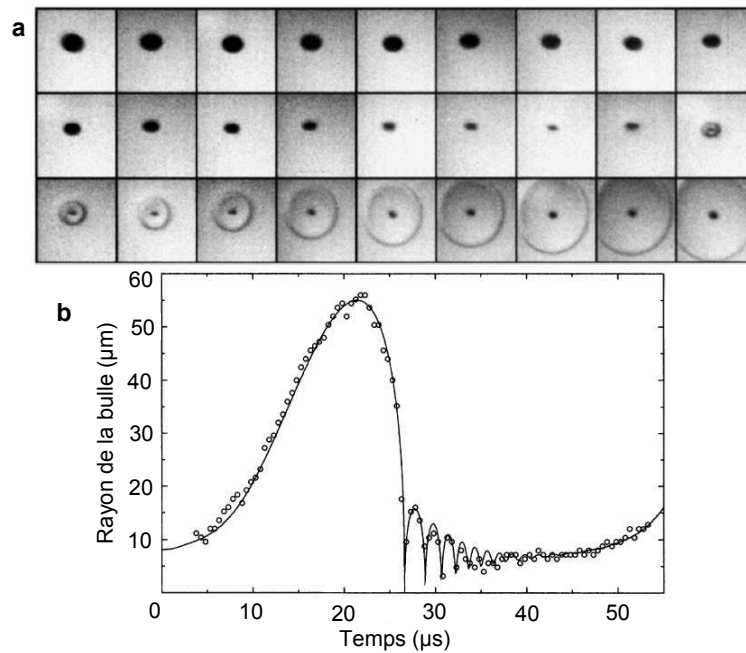


FIGURE 1.21 – (a) Images de l’implosion d’une bulle créée par laser et de l’émission d’une onde de choc sphérique (20.8 millions d’images/s) (b) Graphique Rayon en fonction du temps d’une bulle piégée dans un mélange eau-glycérine tirée d’images photographiques. Une courbe calculée numériquement est superposées aux points expérimentaux [OKG<sup>+</sup>99]

concept de rebond il est nécessaire de décrire tout le processus d’implosion. Lorsque la bulle a atteint son rayon maximum, elle commence à se contracter, acquérant une vitesse de plus en plus élevée, entraînée par la pression ambiante et conduisant à l’implosion de la bulle avec une très forte compression de son contenu (vapeur, gaz) dans la phase finale. La pression dans la bulle monte en flèche, avec le contenu gazeux agissant comme un ressort rigide, stoppant brusquement le mouvement vers l’intérieur et entraîne la bulle vers une nouvelle phase d’expansion appelée rebond (voir figure 1.21 b) [OKG<sup>+</sup>99]<sup>[1]</sup>. Comme nous l’avons dit précédemment, c’est au début de ce rebond que la bulle émet l’onde de choc sphérique symétrique, ce qu’on peut voir sur la figure (voir figure 1.21 a). La vitesse initiale de propagation de cette onde a été mesurée et est dépendante du rayon de la bulle :  $4000 \text{ m/s}$  pour une bulle de  $10 \mu\text{m}$  [PG00]<sup>[2]</sup>,  $2000 \text{ m/s}$  en moyenne pour une bulle de  $5 \mu\text{m}$  sur une distance comprise entre  $6$  et  $72 \mu\text{m}$  à partir du centre de la bulle [HRB98]<sup>[3]</sup>. Au bout d’un certain temps, la vitesse de l’onde se stabilise à

73(10), October 2010.

- [1] Claus-Dieter Ohl, Thomas Kurz, Reinhard Geisler, Olgert Lindau, and Werner Lauterborn. Bubble dynamics, shock waves and sonoluminescence. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357(1751):269–294, February 1999.
- [2] R. Pecha and B. Gompf. Microimplosions: Cavitation collapse and shock wave emission on a nanosecond time scale. *Physical Review Letters*, 84(6):1328, February 2000.
- [3] Joachim Holzfuss, Matthias Ruggeberg, and Andreas Billo. Shock wave emissions of a sonoluminescing bubble. *Physical Review Letters*, 81(24):5434, December 1998.

la vitesse de propagation d'une onde acoustique dans l'eau soit environ 1500  $m/s$ . La force du choc (en fait sa pression) semble dépendre de la taille de la bulle de façon à peu près linéaire pour une bulle formée par laser [SMH<sup>+</sup>09]<sup>[4]</sup>. Pecha et al. ont mesuré des pressions pouvant atteindre 60 kbar (soit 6000 MPa) pour une bulle unique implosant et produisant de la sonoluminescence. Le taux d'atténuation de la pression du choc est théoriquement de l'ordre de l'inverse du rayon de l'onde choc. En pratique, ce taux se vérifie pour de faibles ondes de chocs, mais a été mesuré bien plus élevé pour de fortes ondes de choc [PG00]<sup>[2]</sup>, [SMH<sup>+</sup>09]<sup>[4]</sup>. Cependant, lorsqu'il s'agit d'un nuage de bulle, les chocs peuvent agir sur de plus longues distances grâce à la coopération entre les bulles [Lei05]<sup>[5]</sup>.

Si la bulle se trouve à une distance inférieure à 3 fois son rayon maximum d'une paroi, l'implosion de la bulle ne se fait plus de façon symétrique [MP08]<sup>[6]</sup>. Un jet de liquide se forme (appelé *microjet*), qui traverse la bulle en son centre, frappe la paroi opposée de la bulle et la pousse (c.f figure 1.22). La bulle prend alors une forme torique puis devient instable ; ce qui entraîne l'émission de plusieurs ondes de choc non symétriques dans le liquide. Simultanément, un "contrejet" dans la direction opposé au premier jet peut apparaître [OKG<sup>+</sup>99]<sup>[1]</sup>. Ces ondes sont moins violentes que celle(s) émise(s) pendant une implosion sphérique [MP08]<sup>[6]</sup>.

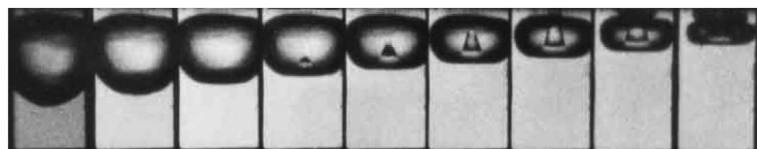


FIGURE 1.22 – Série de photographies montrant le développement d'un microjet dans une bulle implosant très près d'une paroi solide. [TS90].

On aura compris que ces phénomènes entraînant de hautes pressions et vitesses peuvent avoir un impact élevé sur les nanocapsules de médicaments tels que les liposomes et sur les cellules et vaisseaux tumoraux.

Premièrement, les ondes de choc lorsqu'elles passent sur les nanocapsules, créent d'importantes forces de cisaillement à la surface de celles-ci. Si les forces de cisaillement dépassent la tension critique de la nanocapsule, elles peuvent rompre cette dernière. Deuxièmement, les microjets de fluide générés lors d'une implosion asymétrique peuvent ouvrir les véhicules via les forces de cisaillements voire les percer [PHS04]<sup>[7]</sup>, [DRM08]<sup>[8]</sup>.

- 
- [4] George J Shaw, Jason M Meunier, Shao-Ling Huang, Christopher J Lindsell, David D McPherson, and Christy K Holland. Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes. *Thrombosis Research*, 124(3):306–310, July 2009. PMID: 19217651.
- [5] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
- [6] V. Minsier and J. Proost. Shock wave emission upon spherical bubble collapse during cavitation-induced megasonic surface cleaning. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4):598–604, April 2008.
- [7] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review.

Si de nombreuses études concluent au rôle de la cavitation inertielle (ou non-inertielle selon les cas) sur la libération de médicament encapsulé, peu d'entre elles peuvent en prouver les mécanismes exacts. En particulier, l'ouverture de pore par microjets ou ondes de choc, s'il est souvent évoqué comme un mécanisme probable, n'a pu être prouvé sur des liposomes. Toutefois, une nouvelle étude de Chen et al. ([CW10]<sup>[1]</sup>) montre des images en microscopie à transmission électronique de liposomes avant et après insonification à 1.1 MHz en présence de cavitation inertielle. Ces images suggèrent que les fractures induites dans de larges liposomes (>100 nm), et la formation de pores dans de petits liposomes pourraient être un des facteurs prédominants de la libération du contenu de liposomes.

La plupart du temps, les études suggèrent ces mécanismes car ils ont parfois pu être observés, en particulier les microjets, sur des cellules en suspension. Les liposomes ayant une structure proche des cellules, les mécanismes d'action pourraient être les mêmes. Cependant, les cellules animales mesurent en moyenne une dizaine de micromètres, et les liposomes peuvent avoir des tailles de l'ordre du micromètre pour certains ou inférieures à 100 nm pour d'autres, ce qui est susceptible de changer significativement les mécanismes de largage. Lin et al. montre une dépendance du taux de largage avec la taille des liposomes selon la composition du liposome utilisé [LT04]<sup>[2]</sup>.

Comme nous venons de le mentionner, les ondes de choc et microjets induisent d'importants effets en présence de cellules mais aussi dans les vaisseaux sanguins.

Il a été observé *in vitro*, que des cellules en suspension en présence de calcéine, dans un environnement de cavitation inertielle pouvaient (1) être mécaniquement détruites pour les cellules situées à proximité des bulles cavitantes (2) présenter une poration réversible et une augmentation de l'absorption de calcéine (phénomène de *sonoporation*) pour des cellules situées à une distance moyenne (3) n'être pas du tout affectées pour les cellules situées loin des bulles [CR08]<sup>[3]</sup>, [OAI<sup>+</sup>06]<sup>[4]</sup>, ([HMMP06]<sup>[5]</sup>, [GMNP03]<sup>[6]</sup>, [SRT<sup>+</sup>06]<sup>[7]</sup>,

---

*Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.

- [8] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2):400–409, February 2008.
- [1] D Chen and JR Wu. An in vitro feasibility study of controlled drug release from encapsulated nanometer liposomes using high intensity focused ultrasound. *ULTRASONICS*, 50(8):744–749, August 2010.
- [2] HY Lin and JL Thomas. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. *LANGMUIR*, 20(15):6100–6106, July 2004.
- [3] C. C. Coussios and R. A. Roy. Applications of acoustics and cavitation to noninvasive therapy and drug delivery. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 40:395–420, 2008.
- [4] Claus-Dieter Ohl, Manish Arora, Roy Ikin, Nico de Jong, Michel Versluis, Michael Delius, and Detlef Lohse. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophysical Journal*, 91(11):4285–4295, December 2006.
- [5] DM Hallow, AD Mahajan, TE McCutchen, and MR Prausnitz. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 32(7):1111–1122, July 2006.
- [6] HR Guzman, AJ McNamara, DX Nguyen, and MR Prausnitz. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: A unified explanation based on cell-to-bubble ratio and

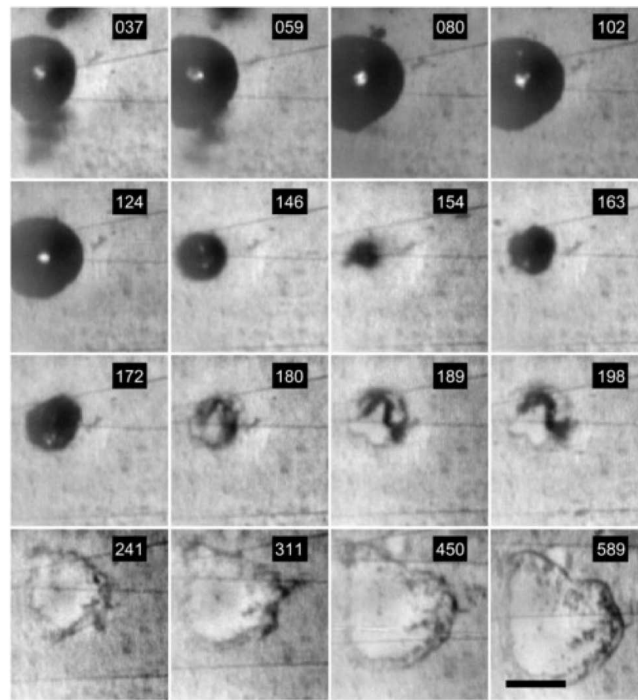


FIGURE 1.23 – *Détachement dynamique causé par l’implosion d’une bulle près de la paroi de cellules adhérentes (fond grisé). La ligne noire représente une échelle de 1 mm. Le nombre indiqué dans chaque image correspond au temps en microsecondes après le début de la pression négative. La bulle atteint un taille maximum à  $t = 80 \mu s$  et s’effondre à sa taille minimum à  $t = 154 \mu s$ . Elle croît à nouveau sous la forme d’une bulle torique ”ondulée”. A partir de  $t = 180 \mu s$ , le morceau détaché devient visible. La zone endommagée continue de s’étendre après la désintégration de la bulle [OAI<sup>+</sup>06].*

cités par [CR08]<sup>[3]</sup>).

Ohl et al. montrent (voir figure 1.23) le détachement d’une partie d’une cellule à proximité d’une bulle implosant de façon asymétrique et émettant un microjet [OAI<sup>+</sup>06]<sup>[4]</sup>. Cependant le mécanisme exact de poration des cellules (microjets, microstreaming, onde de choc, radicaux libres, température...) même s’il semble corrélé à la présence de cavitation inertielle [HMMP06]<sup>[5]</sup>, n’est pas résolu. De plus, les conditions d’expériences *in vitro* sont loin de reproduire les conditions de l’*in vivo* en particulier en terme de quantité de gaz dissous différentes et non prévisible *in vivo* [CR08]<sup>[3]</sup>.

Par ailleurs, la présence de bulles implosant de façon asymétrique et en particulier la génération de jets sont susceptibles de rompre ou percer les parois des vaisseaux sanguins tumoraux, ce qui augmenterait l’extravasation de nano/microcapsules. Ce phénomène a pu être observé en particulier avec des microbulles (voir [PHS04]<sup>[8]</sup>).

---

blast radius. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 29(8):1211–1222, August 2003.

[7] R. K. Schlicher, H. Radhakrishna, T. P. Tolentino, R. P. Apkarian, V. Zarnitsyn, and M. R. Prausnitz. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(6):915–924, 2006.

[8] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review.



### Production de chaleur

En régime de cavitation inertielle, la première cause de production de chaleur possible est l'augmentation de température générée par l'implosion des bulles et qui peut-être de l'ordre de plusieurs milliers de degrés Kelvin pour les implosions les plus fortes. Cependant, cette élévation de température est cantonnée à l'intérieur de la bulle et ne dure que quelques microsecondes. Aussi, si très localement une élévation de température a bien lieu, elle ne contient pas d'importantes énergies ou ne dure pas très longtemps [Lei05]<sup>[1]</sup>.

Le mécanisme prédominant en régime de cavitation inertielle est le 3<sup>ème</sup> mécanisme cité précédemment (voir section cavitation non-inertielle) à savoir l'absorption des émissions acoustiques secondaires. En régime de cavitation inertielle, la bulle subit de très rapides changements de rayon avec une accélération de sa paroi très importante qui a pour conséquence l'émission d'un bruit large bande ([Lei97]<sup>[2]</sup> p413-41). Ce bruit large bande est facilement détectable avec un hydrophone quelconque et sert par conséquent d'indicateur de la cavitation inertielle. Pour des bulles de taille microscopique ou inférieure oscillant de façon inertielle, cette émission de bruit large bande appelée émission acoustique secondaire dépasse de plusieurs ordres de grandeur l'énergie du faisceau US incident diffusée par les bulles [CFHR07a]<sup>[3]</sup>. En effet comme l'atténuation du son dans les tissus augmente avec la fréquence, les émissions larges bandes dans les hautes fréquences seront plus fortement absorbées que les ondes du champ incident diffusées par les bulles, à la fréquence fondamentale d'émission.

Deuxièmement l'accélération d'une bulle inertielle augmente fortement en cas d'implosion, ce qui accentue encore l'énergie des émissions secondaires. De plus, contrairement aux mécanismes observés en cavitation non-inertielle, les tailles de bulles requises pour ce type d'émission peuvent être atteintes sans problème *in vivo* (ainsi qu'*in vitro*). Par conséquent, l'émission de bruit large bande est le mécanisme le plus significatif d'augmentation de la température par cavitation *in vivo* lors d'une insonification ultrasonore [CFHR07a]<sup>[3]</sup>, [HLZ00]<sup>[4]</sup>.

Concernant les conséquences sur la délivrance de médicament encapsulé aux cellules, les effets de l'échauffement induit sont à peu près les mêmes que ceux de l'onde ultrasonore seule à la différence qu'ils sont intensifiés.

Pour rappel ces effets entraînent, premièrement, une augmentation locale du flux sanguin

*Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMCID: 1361256.

- [1] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
- [2] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.
- [3] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(2):105–120, March 2007.
- [4] Hilgenfeldt, Lohse, and Zomack. Sound scattering and localized heat deposition of pulse-driven microbubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 107(6):3530–3539, June 2000. PMID: 10875397.

et deuxièmement, une dilatation des pores des vaisseaux sanguins tumoraux favorisant l'extravasation des particules.

### Radicaux libres

L'énergie mécanique et thermique produite lors de l'implosion d'une bulle est suffisante pour induire la lyse de l'eau, c'est à dire la fragmentation des molécules d'eau. Comme cette lyse est induite par ultrasons, elle est nommée *sonolyse*. Il en résulte la formation de radicaux libres tels que les radicaux hydroxiles  $\bullet OH$  et les radicaux hydrogènes  $\bullet H$ . Ces radicaux peuvent aussi se recombinaisonner en d'autres espèces chimiques tel que le  $\bullet HO_2$  et le  $H_2O_2$  (péroxyde d'hydrogène) [MLBZ94]<sup>[5]</sup>, [MM88]<sup>[6]</sup>.

La quantité de radicaux formée dépend de l'activité de cavitation inertielle dans le milieu et est par conséquent utilisée comme indicateur de la cavitation inertielle [MLBZ94]<sup>[5]</sup>. Les radicaux libres sont source de réactions chimiques et peuvent interférer dans des processus biochimiques. Ils entrent dans le processus de réduction de la masse moléculaire de polymères solubles attribués à la cavitation inertielle [KLL89]<sup>[7]</sup>, [KvEKK02]<sup>[8]</sup>. Dans ce processus, la scission de la chaîne polymérique est attribuée aux contraintes de cisaillement visqueuses qui séparent la chaîne principale du polymère et aux radicaux libres qui peuvent réagir avec la chaîne et la casser. Lorsque des nanocapsules polymériques liées à des médicaments sont utilisées pour une délivrance ciblée par ultrasons, une telle réduction de la masse des polymères augmente la diffusivité des fragments de polymères-médicaments [PHS04]<sup>[9]</sup>. Ainsi, Howard et al. attribuent le largage de cobalamine encapsulé à la production de radicaux libres résultant de la cavitation inertielle. Les radicaux libres réagissent avec les liaisons attachant la cobalamine au véhicule et cassent ces liaisons pour libérer la cobalamine [HBN+97]<sup>[10]</sup>.

- 
- [5] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.
- [6] J. R. McLean and A. J. Mortimer. A CAVITATION AND FREE-RADICAL DOSIMETER FOR ULTRASOUND. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 14(1):59–64, 1988.
- [7] J KOST, K LEONG, and R LANGER. Ultrasound-enhanced polymer degradation and release of incorporated substances-(controlled release drug delivery systems). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20):7663–7666, October 1989.
- [8] M. W. A. Kuijpers, D. van Eck, M. F. Kemmere, and J. T. F. Keurentjes. Cavitation-Induced reactions in High-Pressure carbon dioxide. *Science*, 298(5600):1969–1971, December 2002.
- [9] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMID: 1361256.
- [10] W A Howard, A Bayomi, E Natarajan, M A Aziza, O el-Ahmady, C B Grissom, and F G West. Sonolysis promotes indirect Co-C bond cleavage of alkylcob(III)alamin bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 8(4):498–502, August 1997. PMID: 9258447.

## 1.5 Conclusion et positionnement de la thèse

Ce chapitre a permis de situer le contexte du ciblage de médicament encapsulé, de présenter les divers moyens de ciblage et de déclenchement du largage de médicament, et de montrer l'intérêt d'un ciblage par ultrasons. Nous avons détaillé et expliqué les mécanismes potentiels de largage par ultrasons et les mécanismes qui permettent une amélioration de l'absorption des médicaments par les cellules. En particulier, nous avons pu montrer le rôle important de la cavitation ultrasonore dans cette délivrance de médicaments avec de nombreux mécanismes potentiellement impliqués. Ces mécanismes, ainsi que quelques types de véhicules clés utilisés dans la délivrance de médicaments par ultrasons sont en partie résumés par la figure 1.24.

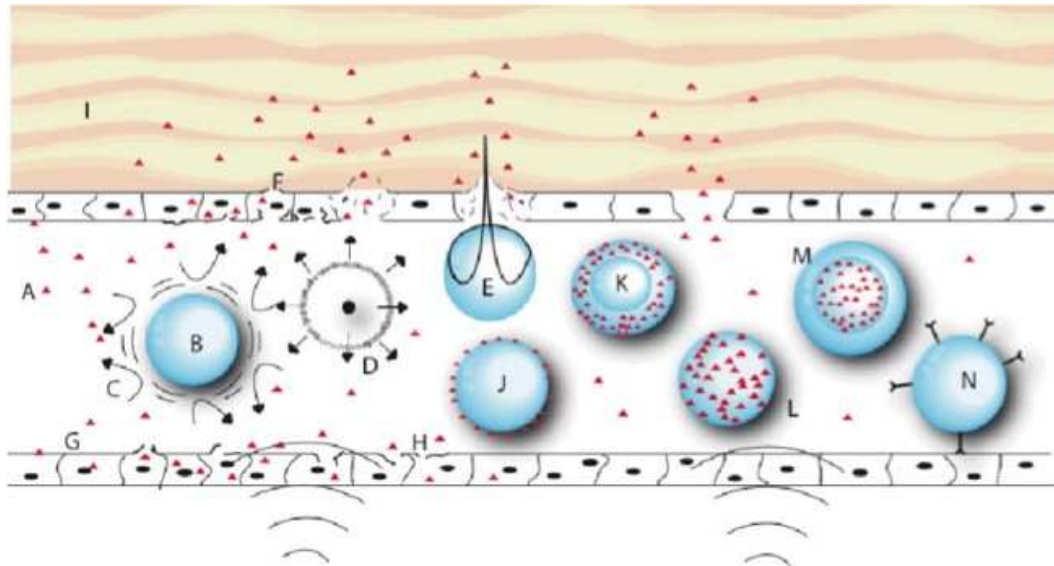


FIGURE 1.24 – Représentation schématique de plusieurs moyens par lesquels la délivrance de médicament peut-être augmentée par ultrasons. A : agents thérapeutiques (triangles) ; B : bulle de gaz en régime de cavitation stable ; C : microcourants autour d'une bulle de cavitation ; D : Implosion d'une bulle émettant une onde de choc ; E : implosion asymétrique d'une bulle produisant un jet de liquide qui perce la paroi interne de l'endothélium ; F : cellule entièrement percée et fracturée ; G : cellules non fracturées avec une augmentation de la perméabilité due à l'insonification ; H : cellule avec une membrane endommagée par des microcourants ou une onde de choc ; I : tissus extravasculaires ; J : microbulle à parois fines avec des agents attachés à sa surface ; K. microbulle à paroi fine contenant un agent dans sa phase lipophile ; L : micelle contenant un agent lipophile ; M : liposome avec un agent dans son centre aqueux ; N : vésicule avec des groupes caractéristiques de ciblage attachée à une cible spécifique [PHS04].

Cependant, la cavitation ultrasonore peut être chaotique et induire des processus violents capables de produire des dommages importants *in vivo*. Par exemple, des cellules saines comme des globules rouges peuvent être lysées par les microjets ou endommagées par les forces de cisaillement. Les radicaux libres peuvent interférer dans des processus

biochimiques essentiels. Des dommages importants dans les vaisseaux sanguins peuvent être favorables à la formation de thrombus [PHS04]<sup>[1]</sup>.

Il est donc nécessaire de contrôler ce phénomène et d'utiliser des véhicules de médicaments adaptés pour une libération la plus efficace possible tout en limitant au maximum les effets biologiques.

C'est l'objectif du projet dans lequel s'inscrit cette thèse, projet initié par la société norvégienne Epitarget, qui développe les liposomes, en partenariat avec l'INSERM U556, the Institute for Cancer Research du Radiumhaspitalet (Norvège) et the Institute of Pharmacy de l'Université de Tromso (Norvège).

Dans le cadre de ce projet, nous allons tout particulièrement nous intéresser au dosage de la cavitation inertielle afin de sélectionner *in vitro* les formulations de liposomes les plus sensibles aux ultrasons et trouver les paramètres ultrasonores adéquats pour la libération de leur contenu. Ces liposomes seront ensuite testés *in vivo* pour étudier l'efficacité d'une délivrance de doxorubicine encapsulée par ultrasons.

---

[1] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMCID: 1361256.



## Chapitre 2

# Dosage de la cavitation inertielle *in vitro*

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>61</b>
<b>2.2</b>	<b>Contexte scientifique et orientations de l'étude</b>	<b>61</b>
<b>2.3</b>	<b>Définition et validation d'une dose de cavitation</b>	<b>64</b>
2.3.1	Matériel et méthodes	64
2.3.1.1	Montage expérimental	64
2.3.1.2	Traitement du signal et définition de la dose de cavitation	65
2.3.1.3	Validation chimique de la dose de cavitation	68
2.3.2	Résultats	70
2.3.2.1	Validation de la dose de cavitation avec le dosimètre de téréphtalate	70
2.3.2.2	Validation et comparaison de la dose de cavitation avec le dosimètre de téréphtalate pour trois ensembles de paramètres ultrasonores	71
2.3.2.3	Indicateur dose de cavitation versus indicateur durée d'insonification	74
2.3.3	Discussion	74
2.3.3.1	Influence des paramètres ultrasonores sur la production de radicaux hydroxyles	74
2.3.3.2	Indicateur dose de cavitation versus indicateur durée d'insonification	83
2.3.3.3	Dispersion de la concentration de HTA aux hautes doses de cavitation	84
2.3.4	Conclusion	86
<b>2.4</b>	<b>Libération de médicament contrôlé par la dose de cavitation</b>	<b>87</b>
2.4.1	Matériel et méthodes	87

2.4.1.1	Les liposomes . . . . .	87
2.4.1.2	Mesure du largage de doxorubicine . . . . .	88
2.4.1.3	Paramètres ultrasonores . . . . .	89
2.4.2	Résultats . . . . .	89
2.4.3	Discussion . . . . .	91
2.4.3.1	Conclusion . . . . .	92
<b>2.5</b>	<b>Conclusion générale . . . . .</b>	<b>93</b>

---

## 2.1 Introduction

L'objectif du travail réalisé *in vitro* est de sélectionner, parmi les formulations fabriquées par nos partenaires, celles qui soient les plus sensibles aux ultrasons et de trouver un dosage adapté pour une libération efficace de leur contenu. Il est par conséquent nécessaire de contrôler le processus de libération des liposomes et pour cela, d'avoir une idée concrète de sa nature. Nous avons pu voir dans la section 1.4 que la cavitation et les nombreux effets qui y sont associés, semble être un phénomène majeur dans le processus de libération de médicaments encapsulés. Si pour la libération *in vitro* de vésicules contenant du gaz, la cavitation non inertielle peut être un mécanisme suffisant, la libération *in vivo* de liposomes de taille inférieure à 100 nm ne contenant pas de gaz serait plutôt attribuable au régime de cavitation inertielle. En effet, la rupture de si petits véhicules solides, même avec une membrane d'une composition les rendant plus sensibles aux ultrasons, nécessite des effets plus violents pour excéder leur tension critique et libérer leur contenu. Ce point est largement commenté dans la littérature [PHS04]<sup>[1]</sup>. Cette taille de liposomes a été choisie car elle est propice à l'accumulation dans les tissus tumoraux, comme cela a été discuté section 1.2.2.1. La cavitation inertielle, comme nous avons pu le voir (§1.4) induit de nombreux effets (ondes des choc, microjets, microcourants, forces de cisaillement, génération de chaleur, radicaux libres) susceptibles de déchirer ou de perméabiliser les liposomes. Qui plus est, les effets de la cavitation inertielle sont souvent cumulés avec ceux de la cavitation non inertielle (voir section 1.4.3.2). De plus, le régime de cavitation inertielle est plus facile à induire et maintenir *in vivo* que la cavitation stable. Il y a donc tout intérêt à se placer dans ce régime de cavitation.

Dans cette section, nous allons en premier lieu nous attacher à décrire le système mis en place pendant la thèse pour contrôler la cavitation inertielle. Nous présenterons ensuite le processus de validation de ce système ainsi que sa mise en œuvre pour le contrôle et le suivi de la libération d'agents encapsulés.

## 2.2 Contexte scientifique et orientations de l'étude

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la cavitation inertielle peut-être instable, imprévisible et très dépendante des conditions expérimentales. Par conséquent, contrôler et quantifier la cavitation inertielle serait une amélioration importante dans le domaine de la délivrance de médicaments. Plusieurs indicateurs de la cavitation inertielle sont utilisés dans la littérature. Le continuum de bruit large bande attribué aux changements rapides de taille de la bulle, est un des indicateurs les plus reconnus (c.f 1.4.3.2).

---

[1] William G. Pitt, Ghaleb A. Hussein, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1):37–56, November 2004. PMID: 16296719 PMCID: 1361256.



Quelques études, reportées dans la littérature, utilisent des doses et indices de cavitation basés sur l'indicateur de bruit large bande. Chen et al. ont défini une dose de cavitation inertielle (IC) qui correspond à l'accumulation temporelle du bruit large bande filtré entre le troisième et le quatrième harmonique de la fréquence fondamentale d'émission [CBMC03]<sup>[1]</sup>. Tu et al. ont utilisé cet indice IC pour étudier l'activité de cavitation dans des artères de lapin *ex vivo* en présence d'agents de contraste ultrasonore Optison<sup>®</sup> sous différents paramètres d'exposition ultrasonore [TMBC06]<sup>[2]</sup>. Par ailleurs, un détecteur passif à 20 MHz a été développé par Everbach et al. pour quantifier la cavitation inertielle dans le milieu insonifié [EMAM97]<sup>[3]</sup>. Ils ont pu corréliser la moyenne temporelle de la sortie du détecteur avec l'hémolyse\* engendrée par l'insonification d'une suspension de globules rouges humaines [EMAM97]<sup>[3]</sup>, [MEC<sup>+</sup>01]<sup>[4]</sup>. Un autre indicateur, défini par Frohly et al. et nommé indicateur de puissance de bruit de cavitation (CNP pour *cavitation noise power indicator*), consiste en une intégration du spectre ultrasonore entier à l'échelle logarithmique afin d'augmenter la contribution du bruit blanc représentatif de la cavitation inertielle comparativement aux autres composantes du signal. Ce principe de mesure a été adapté par Mestas et al. pour développer un générateur de cavitation régulé qui a permis la publication de plusieurs études [MVC<sup>+</sup>04]<sup>[5]</sup>, [MBA<sup>+</sup>09]<sup>[6]</sup>, [RMH<sup>+</sup>10]<sup>[7]</sup>.

Pour notre système, nous avons choisi de filtrer le bruit large bande entre l'émission fondamentale et le premier harmonique et de l'intégrer sur le temps d'insonification pour définir une dose de cavitation (DC). Comme les émissions acoustiques provenant du transducteur, de la cavitation et de source extérieures peuvent être nombreuses, nous avons choisi de valider en premier lieu la dose de cavitation définie avant de l'appliquer à la délivrance d'agents encapsulés.

Or, la cavitation inertielle induit la sonolyse de l'eau qui conduit à la formation de radicaux libres (c.f 1.4.3.2 §Radicaux libres). Le nombre de radicaux libres formés dépend

- 
- [1] W. S. Chen, A. A. Brayman, T. J. Matula, and L. A. Crum. Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without optison (R). *Ultrasound in Medicine and Biology*, 29(5):725–737, 2003.
  - [2] J. Tu, T. J. Matula, A. A. Brayman, and L. A. Crum. Inertial cavitation dose produced in ex vivo rabbit ear arteries with optison (R) by 1-MHz pulsed ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(2):281–288, 2006.
  - [3] E. C. Everbach, I. R. S. Makin, M. Azadniv, and R. S. Meltzer. Correlation of ultrasound-induced hemolysis with cavitation detector output in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 23(4):619–624, 1997.
  - [4] M. W. Miller, E. C. Everbach, C. Cox, R. R. Knapp, A. A. Brayman, and T. A. Sherman. A comparison of the hemolytic potential of optison (TM) and albumex (R) in whole human blood in vitro: Acoustic pressure, ultrasound frequency, donor and passive cavitation detection considerations. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 27(5):709–721, 2001.
  - [5] JL Mestas, L Villeneuve, S Chesnais, D Cathignol, L Alberti, and JY Blay. Correlation of the exposed-cell mortality with the transient cavitation noise in vitro. *2004 IEEE Ultrasonics Symposium, Vols 1-3*, pages 1816–1819, 2004.
  - [6] J. El Maalouf, J. C. Bera, L. Alberti, D. Cathignol, and J. L. Mestas. In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions. *Ultrasonics*, 49(2):238–243, 2009.
  - [7] L Reslan, JL Mestas, S Herveau, JC Bera, and C Dumontet. Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 142(2):251–258, March 2010.

de l'activité de cavitation inertielle dans le milieu et peut par conséquent être utilisé pour quantifier cette dernière [MLBZ94]<sup>[8]</sup>. Plusieurs méthodes existent pour estimer le nombre de radicaux libres générés par cavitation inertielle. La résonance de spin électronique (RSE) souvent dénommée résonance paramagnétique électronique\* (RPE) est une technique de référence pour la détection de radicaux libres, néanmoins, elle reste complexe et coûteuse à mettre en oeuvre [VAS<sup>+</sup>09]<sup>[9]</sup>, [PDD<sup>+</sup>97]<sup>[10]</sup>.

Des dosimètres chimiques permettent aussi de quantifier les radicaux libres tels que le dosimètre de Fricke (oxydation de  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  par  $\bullet OH$ ,  $\bullet HO_2$  ou  $H_2O_2$ ), le dosimètre iodure (oxydation de l'ion iodure en atomes d'iode) et le dosimètre téréphthalate (oxydation de l'acide théréphthalique (TA) en hydroxylthéréphthalate (HTA) par le radical hydroxyl ( $\bullet OH$ )).

Le dosimètre de téréphthalate est connu comme le plus sensible de ces dosimètres [IYTS05]<sup>[11]</sup> et est facile à mettre en oeuvre [VAS<sup>+</sup>09]<sup>[9]</sup>. Il a d'abord été utilisé par Armstrong en chimie des rayonnements [AFGH63]<sup>[12]</sup> puis plus tard comme indicateur de cavitation inertielle [VAS<sup>+</sup>09]<sup>[9]</sup>, [MLBZ94]<sup>[8]</sup>, [MM88]<sup>[13]</sup>, [PDD<sup>+</sup>97]<sup>[10]</sup>, [MTR<sup>+</sup>98]<sup>[14]</sup>. Ce dosimètre de TA est celui que nous avons choisi pour valider chimiquement notre dose de cavitation.

L'objectif de cette dose de cavitation est, entre autres, de suivre le largage *in vitro* de médicaments encapsulés et de voir s'il existe une relation entre le pourcentage libéré et l'activité de cavitation inertielle. La finalité étant de réaliser des expériences *in vivo* en régime de cavitation inertielle, nous avons choisi d'utiliser des ultrasons pulsés pour éviter des effets thermiques trop importants. C'est pour cette raison que la validation de la dose de cavitation et les tests *in vitro* se feront également en ultrasons pulsés.

- 
- [8] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.
- [9] L Villeneuve, L Alberti, JP Steghens, JM Lancelin, and JL Mestas. Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(3):339–344, March 2009.
- [10] G. J. Price, F. A. Duck, M. Digby, W. Holland, and T. Berryman. Measurement of radical production as a result of cavitation in medical ultrasound fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2):165–171, 1997.
- [11] Y. Iida, K. Yasui, T. Tuziuti, and M. Sivakumar. Sonochemistry and its dosimetry. *Microchemical Journal*, 80(2):159–164, 2005.
- [12] W. A. Armstrong, R. A. Facey, D. W. Grant, and W. G. Humphreys. A TISSUE-EQUIVALENT CHEMICAL DOSIMETER SENSITIVE TO 1 RAD. *Can. J. Chem.* 41(6), page 1575, 1577, 1963.
- [13] J. R. McLean and A. J. Mortimer. A CAVITATION AND FREE-RADICAL DOSIMETER FOR ULTRASOUND. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 14(1):59–64, 1988.
- [14] G. Mark, A. Tauber, L. A. Rudiger, H. P. Schuchmann, D. Schulz, A. Mues, and C. von Sonntag. OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution - part II: terephthalate and fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(2):41–52, 1998.

## 2.3 Définition et validation d'une dose de cavitation

### 2.3.1 Matériel et méthodes

#### 2.3.1.1 Montage expérimental

Le montage expérimental est présenté figure 2.1. Le transducteur utilisé pour générer la cavitation est un transducteur piezocéramique focalisé avec un backing air (PZ26, Piezoceramiques Ferroperm, Kvistgaard, Danemark) de 50 mm de diamètre, avec une longueur focale de 48 mm, et une zone focale de 2\*2\*13mm. Il est adapté électriquement à 50  $\Omega$  et possède un rendement électro-acoustique de 77% à 1,13MHz (sa fréquence d'utilisation). Le rendement est obtenu en calculant la moyenne de 15 mesures effectuées avec la méthode de la balance acoustique.

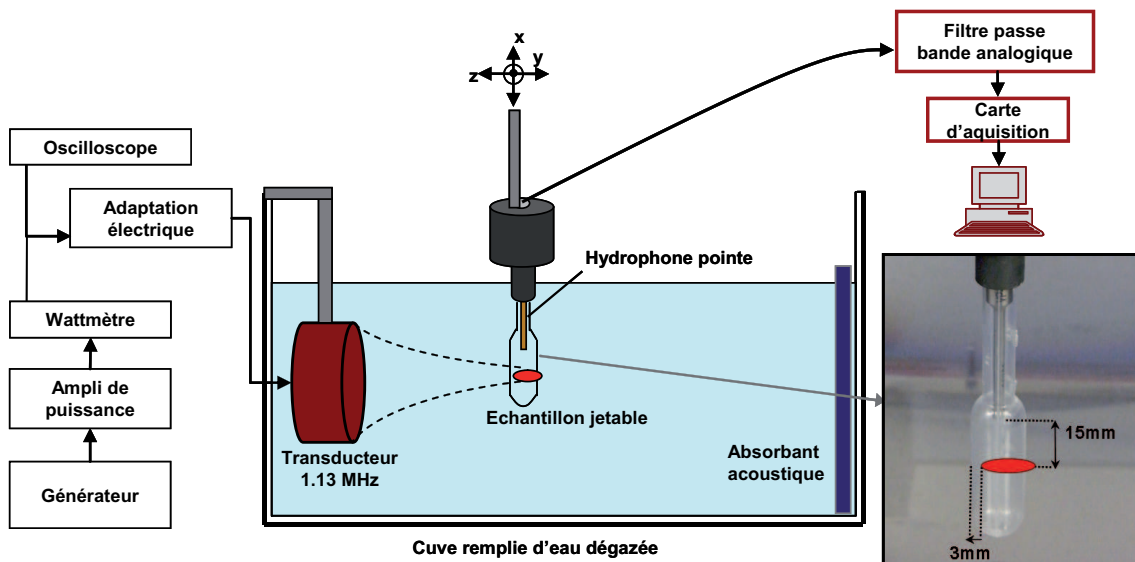


FIGURE 2.1 – Schéma du montage expérimental. Les ultrasons pulsés sont générés par un transducteur focalisé à l'intérieur d'une pipette pasteur jetable. Tous les appareils sont contrôlés par ordinateur via GPIB ou connection ethernet.

Des trains d'onde sinusoïdaux sont générés à l'aide d'un générateur de fonction (33120A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, Etats-Unis) et amplifié par un amplificateur RF de puissance (400 W, 55 dB; 1040L, Electronics and Innovation Ltd., Rochester, NY, Etats-Unis). Les puissances directe et réfléchie sont mesurées aux bornes du transducteur par un wattmètre (Mesure de puissance et réflectomètre NAP avec tête de mesure de puissance 1950, Rhode et Schwarz, Munich, Allemagne). La tension appliquée au transducteur est également mesurée à l'aide d'un oscilloscope (Wavesurfer 422, LeCroy, Chestnut Ridge, NY, Etats-Unis).

Un hydrophone aiguille, suspendu à un support PVC, sert de détecteur de cavitation (VP-1,5 pinducer; fréquence nominale piezoélectrique : 2.5 MHz; diamètre : 1,5 mm,

Valpey Fisher, MA, Etats-Unis).

Le récipient de mesure est un réservoir de pipette de polyéthylène jetable (Copan, Brescia, Italie ; dimensions du réservoir : diamètre = 13 mm ; longueur = 40 mm, épaisseur =  $0,35 \pm 0,05$  mm) insérée dans le support de l'hydrophone (c.f figure 2.1).

La disposition des éléments proposée permet une mesure préférentielle du bruit acoustique survenant à l'intérieur de la pipette. Avant chaque série de mesure, un champ acoustique est mesuré à l'aide de l'hydrophone pointe relié à l'oscilloscope de façon à localiser précisément la pression maximum à la focale du transducteur. Pour effectuer les mesures de cavitation, le réservoir d'une pipette est placée dans la zone focale du transducteur comme indiqué figure 2.1 : un décalage de 3mm vers le transducteur permet de réduire la cavitation à l'extérieur de la pipette et une distance de 15 mm est observée entre l'hydrophone et la tâche focale afin de préserver celui-ci de dommages éventuels.

Le signal, détecté par l'hydrophone, est filtré analogiquement avant d'être numérisé par une carte d'acquisition (Carte d'acquisition de données NUDAQ PCI-9221 16 bits 250 kHz, ADLINK Technology Inc, Taipei, Taiwan) et traité numériquement pour calculer la dose de cavitation décrite dans le paragraphe suivant.

### 2.3.1.2 Traitement du signal et définition de la dose de cavitation

Le bruit large-bande ayant été choisi parmi les indicateurs de cavitation inertielle pour notre dispositif (c.f section 1.4.3.2 et figure 2.2), il faut mettre en place un dispositif de mesure de ce dernier. Le choix des ultrasons pulsés pour générer la cavitation

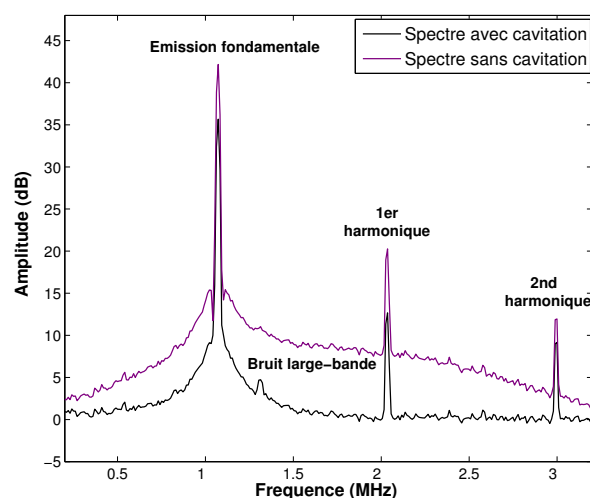


FIGURE 2.2 – Exemple de spectre ultrasonore obtenu en présence ou en l'absence de cavitation inertielle.

implique d'avoir un dispositif capable d'acquérir très rapidement les données s'il l'on

veut avoir un système de mesure en temps réel. Par conséquent, le signal détecté par l'hydrophone est filtré pour réduire la quantité de données avant numérisation par la carte d'acquisition.

Pour définir le filtre, la bande située entre l'émission fondamentale et le premier harmonique est choisie (c.f figure 2.2) . Cette bande particulière est sélectionnée pour rester dans les valeurs de sensibilité nominale de l'hydrophone et pour éviter la bande située sous la fréquence fondamentale d'émission, où peuvent être émis des sous-harmoniques associés généralement à de la cavitation stable.

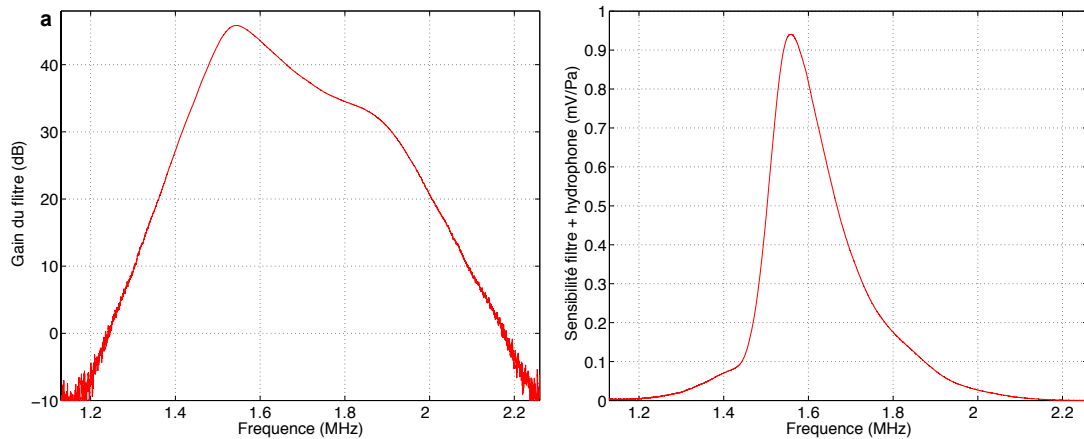


FIGURE 2.3 – (a) Gain du filtre passe-bande analogique obtenu en mesurant la tension à la sortie du filtre après application à son entrée d'une tension sinusoïdale de 25 mVpp à fréquence variable (balayage linéaire de 1 à 3 MHz, temps de balayage 500 ms). (b) Sensibilité totale du dispositif de mesure calculé par multiplication de la sensibilité de l'hydrophone et de la fonction de transfert du filtre passe-bande (sensibilité moyenne : 0,185 mV/Pa; sensibilité maximale (à 1.56 MHz) : 0,940 mV/Pa; bande passante à mi-hauteur : 0,18 MHz; bande passante à 10 dB : 0,25 MHz; bande passante à 30 dB = 0,66 MHz).

Un filtre passe-bande analogique a été conçu et réalisé à cet effet (c.f figures 2.3 et 2.4). Le signal capturé par l'hydrophone est amplifié et filtré à l'aide d'un passe-bande entre 1,24 et 2,17 MHz (fréquences de gain nul). Le signal est ensuite de nouveau amplifié, puis son enveloppe est extraite par redressement du signal et filtrage passe-bas (fcoupeure(3 dB) = 2,31 kHz). Le gain du filtre est présenté figure 2.3 dans la bande d'intérêt. Le gain du filtre passe-bande analogique est obtenu en mesurant la tension à la sortie du filtre après application à son entrée d'une tension sinusoïdale de 25 mVpp à fréquence variable (balayage linéaire de 1 à 3 MHz, temps de balayage 500 ms). La sensibilité de l'hydrophone est mesurée par la "méthode du transducteur épais" [BDP88]<sup>[1]</sup> (c.f figure 2.3 a). La multiplication de la sensibilité de l'hydrophone et de la fonction de transfert du filtre

[1] J.C. Baboux, H. Djelouah, and M. Perdrix. Interferometric measurements of transient ultrasonic fields. application to hydrophone calibration. In *Ultrasonics Symposium, 1988. Proceedings., IEEE 1988*, pages 857–861 vol.2, 1988.

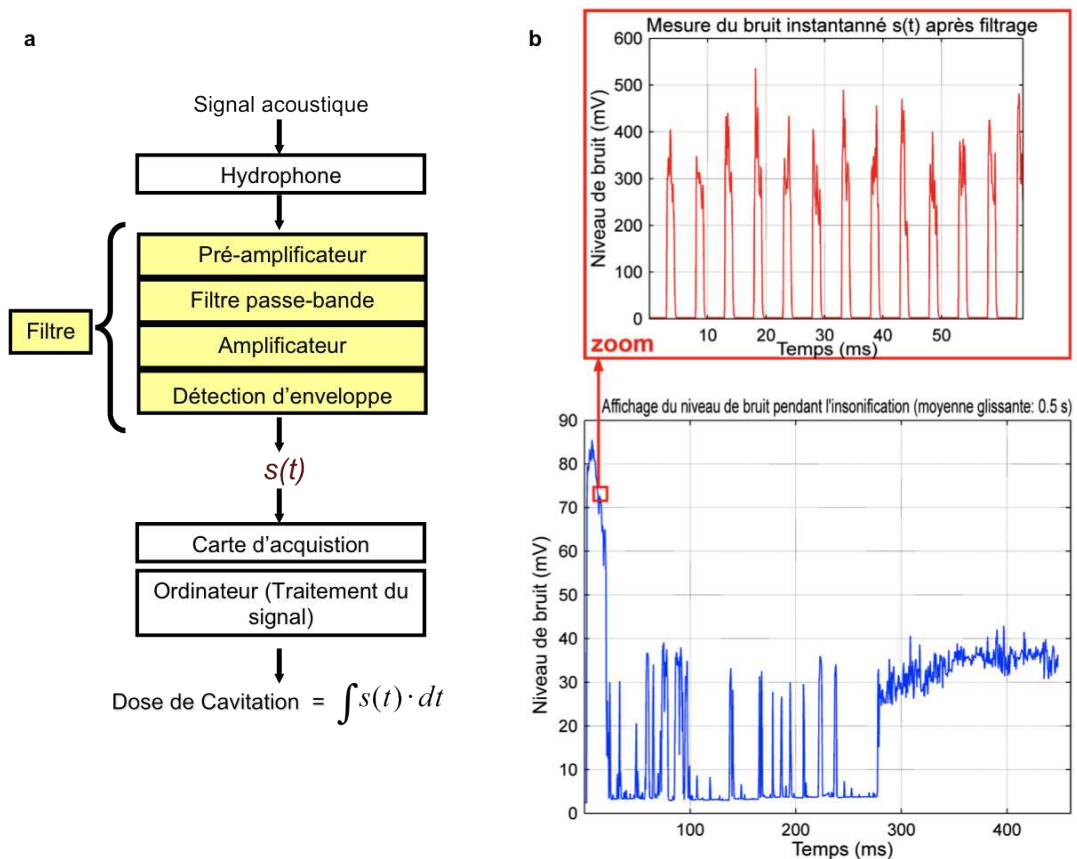


FIGURE 2.4 – (a) Chaîne d'acquisition de la dose de cavitation (DC). (b) Bruit instantané et bruit moyen de cavitation inertielle après filtration entre  $f_0$  et  $2f_0$  pendant une insonification avec des paramètres US proches du seuil de cavitation ( $RC=25\%$ ).

permet de calculer une fonction de transfert globale du filtrage du signal acoustique par ces deux dispositifs (c.f figure 2.3 b). Les principales caractéristiques de cette fonction de transfert sont les suivantes : sensibilité moyenne : 0,185 mV/Pa ; sensibilité maximum (à 1.56 MHz) : 0,940 mV/Pa ; bande passante à mi-hauteur : 0,18 MHz ; bande passante à 10 dB : 0,25 MHz ; bande passante à 30 dB = 0,66 MHz.

Le calcul de cette fonction de transfert globale donne un élément de comparaison entre la dose de cavitation définie et les doses de cavitation générées dans d'autres systèmes. Pour une comparaison plus précise, il faut tenir compte de la distance de 15 mm entre l'hydrophone et la zone focale.

Le signal filtré  $s(t)$  est numérisé par la carte d'acquisition avant d'être intégré par rapport au temps d'insonification pour obtenir la dose de cavitation (DC) (c.f figure 2.4) Dans ce chapitre, toutes les doses de cavitation sont présentées en mV\*s.

La mesure instantanée du bruit après filtrage ainsi qu'une moyenne glissante de 0,5 secondes est affichée pendant les expériences (c.f figure 2.4 b). L'affichage de la moyenne glissante donne une information qualitative sur l'évolution du niveau moyen de cavitation au cours de l'expérimentation. La dose de cavitation cumulée en temps réel est

également affichée. L'insonification est stoppée dès que la dose cible préalablement saisie est atteinte. La puissance moyenne directe et réfléchiée ainsi que la tension aux bornes du transducteur sont également mesurées et affichées pendant l'expérimentation. Toutes les données sont enregistrées pour analyse ultérieure.

### 2.3.1.3 Validation chimique de la dose de cavitation

Le principe du dosimètre de terephthalate est le suivant : quand des anions téréphthalate (TA) non fluorescents sont au contact de radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ), ils réagissent pour former de l'hydroxytéréphthalate (HTA). La cavitation inertielle produisant des radicaux hydroxyles, le dosage consiste à exposer une solution de TA à des ondes ultrasonores génératrices de cavitation et à mesurer la fluorescence résultant de la formation de HTA. La production de HTA augmente généralement avec la durée d'insonification et l'intensité ultrasonore [MM88]<sup>[1]</sup>, [PDD+97]<sup>[2]</sup>, [PL93]<sup>[3]</sup>.

Une solution mère de TA de 20 mM est préparée comme décrit par Villeneuve et al. [VAS+09]<sup>[4]</sup>. Des tests préliminaires de cavitation permettent de choisir une concentration de 2 mM pour réaliser les expériences. Cette concentration a été choisie car, sans être trop importante, sa valeur reste suffisamment élevée pour permettre de piéger tous les radicaux libres. Une concentration de TA trop haute induirait possiblement des agrégats moléculaires qui réduirait les interactions entre les molécules de TA et les radicaux  $\bullet\text{OH}$  [VAS+09]<sup>[4]</sup>, [PL93]<sup>[3]</sup>.

Une solution mère de 20 mM de HTA est préparée suivant le même procédé [VAS+09]<sup>[4]</sup>. Une dilution au 1  $\mu\text{M}$  de cette solution est utilisée comme référence pour les mesures de fluorescence. Cette concentration peut-être utilisée pour toutes les expériences sans restriction car, premièrement, la fluorescence de la solution de HTA augmente linéairement avec sa concentration dans la gamme 0,2-20  $\mu\text{M}$  [MLBZ94]<sup>[5]</sup> [PDD+97]<sup>[2]</sup>; deuxièmement, la concentration de HTA produite par insonification des échantillons est toujours inférieure à 20  $\mu\text{M}$ . En divisant le niveau de fluorescence après insonification de l'échantillon par le niveau de fluorescence de la référence choisie, on obtient la concentration en  $\mu\text{M}$  d'ions HTA présents en solution (voir équation 2.1). Cette concentration permet une comparaison avec d'autres études ce qui n'est pas le cas d'une mesure de

- 
- [1] J. R. McLean and A. J. Mortimer. A CAVITATION AND FREE-RADICAL DOSIMETER FOR ULTRASOUND. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 14(1):59–64, 1988.
  - [2] G. J. Price, F. A. Duck, M. Digby, W. Holland, and T. Berryman. Measurement of radical production as a result of cavitation in medical ultrasound fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2):165–171, 1997.
  - [3] GJ PRICE and EJ LENZ. THE USE OF DOSIMETERS TO MEASURE RADICAL PRODUCTION IN AQUEOUS SONOCHEMICAL SYSTEMS. *ULTRASONICS*, 31(6):451–456, November 1993.
  - [4] L Villeneuve, L Alberti, JP Steghens, JM Lancelin, and JL Mestas. Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(3):339–344, March 2009.
  - [5] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.

fluorescence qui est dépendante de l'appareil utilisé.

Les mesures de fluorescence sont effectuées par spectrofluorimétrie (Spectrofluorimètre SFM 25, Kontron Instruments, Zurich, Suisse), à des fréquences d'excitation et d'émission de 318 et 426 nm respectivement. Plusieurs mesures de fluorescence d'échantillons de HTA à 1  $\mu\text{M}$  sont réalisées. Leur moyenne, à laquelle on a soustrait la fluorescence de l'eau utilisée pour la dilution de l'échantillon, est prise comme référence pour toutes les expériences (ceci permet également de s'affranchir du bruit de fond du spectrofluorimètre).

Avant une série d'insonifications, on mesure la fluorescence d'un échantillon prélevé sur la dilution de 2 mM de TA préparée pour ces tests. Après insonification de chaque échantillon, on mesure sa fluorescence. On peut alors calculer la concentration de HTA en solution formé sous l'action de la cavitation inertielle en utilisant la formule suivante :

$$C_{HTA}(\mu\text{M}) = \frac{F_{HTA} - F_T}{F_{HTAref}} \times C_{HTAref} \quad (2.1)$$

avec :

- $F_{HTA}$  : Fluorescence de HTA générée par insonification de la solution de TA à 2mM
- $F_T$  : Fluorescence de la solution témoin de TA à 2mM
- $F_{HTAref}$  : Fluorescence de la solution référence de HTA à 1 $\mu\text{M}$
- $C_{HTA}$  : Concentration de la solution référence de HTA, ici 1 $\mu\text{M}$

Dans l'optique de valider la dose de cavitation définie, de nombreux tests avec la solution de TA à 2 mM ont été réalisés. Les paramètres ultrasonores utilisés ont une  $I_{spta}$  (Intensité spatiale pic moyennée sur le temps) comprise entre 475 et 1600 W/cm<sup>2</sup>, ils varient de :

- 10 Hz à 1 kHz en fréquence de répétition\* (FR)
- 5% à 25% en rapport cyclique\* (RC)
- 4000 à 12000 W/cm<sup>2</sup> en  $I_{sppa}$  (Intensité spatiale pic moyennée sur l'impulsion) correspondant à  $p_{pic} = 11 - 19$  MPa (pression pic de raréfaction)

Les intensités ( $I_{sppa}$  et  $I_{spta}$ ) ont été estimées à partir des mesures de puissance électrique effectuées durant les expériences. Les pressions pic de raréfaction ont été estimées à partir des calculs d' $I_{sppa}$ . Ces pressions calculées concordent avec les valeurs extrapolées de mesures de pression à la focale du transducteur avec un hydrophone calibré.

Les tests sur le TA ont été réalisés sur plusieurs jours et dans des conditions expérimentales différentes (pression atmosphérique, température de l'eau dégazée de la cuve, taux de gaz dissous dans l'échantillon et l'eau dégazée de la cuve, etc) de façon à tester la reproductibilité des résultats indépendamment des conditions d'expérimentation. Après un large éventail de tests, des paramètres ultrasonores pertinents ont été retenus et répétés pour aider à une meilleure interprétation des résultats.



### 2.3.2 Résultats

#### 2.3.2.1 Validation de la dose de cavitation avec le dosimètre de téréphtalate

Pour tous les paramètres testés (111 échantillons de TA insonifiés), la concentration de HTA produite augmente avec la DC (c.f figure 2.5). Comme les concentrations de HTA relevées sont de plus en plus variables avec l'augmentation de la dose de cavitation, un modèle de régression linéaire n'est pas applicable. Pour obtenir l'homogénéité des variances et une régression de qualité, la variable concentration de HTA est transformée par une fonction logarithme Népérien. Dans ces conditions, les variances sont homogènes (test de Levene vérifié (c.f Annexe 1) :  $p = 0,82$ ) et la relation entre  $\ln(C_{HTA})$  et  $\ln(DC)$  est une régression linéaire dont les deux coefficients ont été validés par le "test t" de Student ( $p < 0,0001$  c.f Annexe 1). De plus, la normalité des résidus a été validée par le test de Shapiro-Wilk ( $p = 0,72$  c.f Annexe 1). En passant de l'échelle logarithmique à une échelle linéaire, la régression linéaire devient une courbe de puissance (c.f figure 2.5) et conserve son coefficient de détermination  $R^2 = 0,93$ . La corrélation obtenue est relativement élevée compte tenu des conditions expérimentales variées dans lesquels ont été pratiqués les essais (7 jours de manipulations). La dose de cavitation définie semble par conséquent être un indicateur cohérent de la cavitation inertielle. Cependant, même si les variances sont homogènes, elles sont trop importantes pour l'application ciblée. La dose de cavitation doit être validée plus précisément pour pouvoir permettre le suivi et la comparaison du largage de médicament encapsulé dans différentes formulations de liposomes.

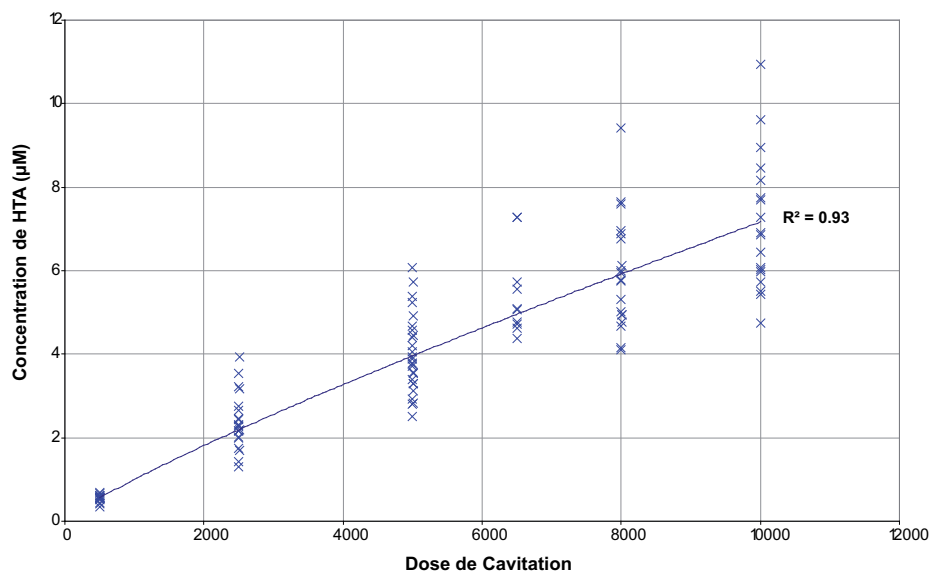


FIGURE 2.5 – Concentration de HTA à différentes doses de cavitation pour tous les paramètres ultrasonores testés. Equation de la courbe de régression :  $C_{HTA} = 0,0027(CD)^{0,85}$

L'analyse des données de toutes les expériences réalisées a démontré que la concentration de HTA estimée variait pour une dose de cavitation donnée, et ce, lorsque le rapport cyclique ou la fréquence de répétition étaient éloignés. Une étude préliminaire a été réalisée en faisant varier le fréquence de répétition entre 10 Hz et 1000 Hz et en fixant les autres paramètres ultrasonores :  $I_{sppa} = 5680 W/cm^2$  et  $rc = 25\%$  (soit une  $I_{spta} = 1420 W/cm^2$ ) (c.f figure 2.6).

La tendance observée est une diminution de la concentration de HTA lorsque la fréquence

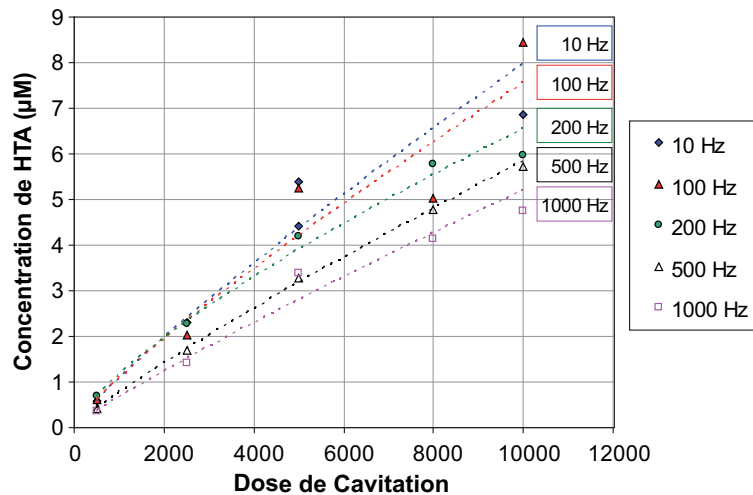


FIGURE 2.6 – Concentration de HTA en fonction de la dose de cavitation pour différentes fréquences de répétitions (10Hz – 1kHz).  $I_{sppa} = 5680 W/cm^2$  et  $rc = 25\%$  (soit une  $I_{spta} = 1420 W/cm^2$ )

de répétition augmente. A faible DC, il semble que les concentrations de HTA soient similaires pour des FR de 10, 100 et 200 Hz d'une part, et de 500 et 1000 Hz d'autre part. Cependant, le nombre d'expériences réalisé pour chaque FR n'est pas suffisant pour conclure à l'existence de deux groupes pour toutes les DC.

### 2.3.2.2 Validation et comparaison de la dose de cavitation avec le dosimètre de téréphthalate pour trois ensembles de paramètres ultrasonores

Nous avons décidé d'effectuer une étude détaillée des concentrations de HTA produites en fonction de la DC en sélectionnant et comparant 3 ensembles de paramètres ultrasonores distincts. Pour cela, nous avons fixé la fréquence de répétition et le rapport cyclique pour chaque groupe ainsi qu'une plage de variation en amplitude. Deux fréquences de répétitions ont été choisies, une dans chaque "groupe" identifié dans la section précédente, de façon à vérifier l'influence de la FR sur la production de HTA. Des fréquences de répétitions éloignées ont été choisies à RC constant pour également étudier l'influence de ce dernier. Les 3 ensembles de paramètres ultrasonores choisis sont les suivants :

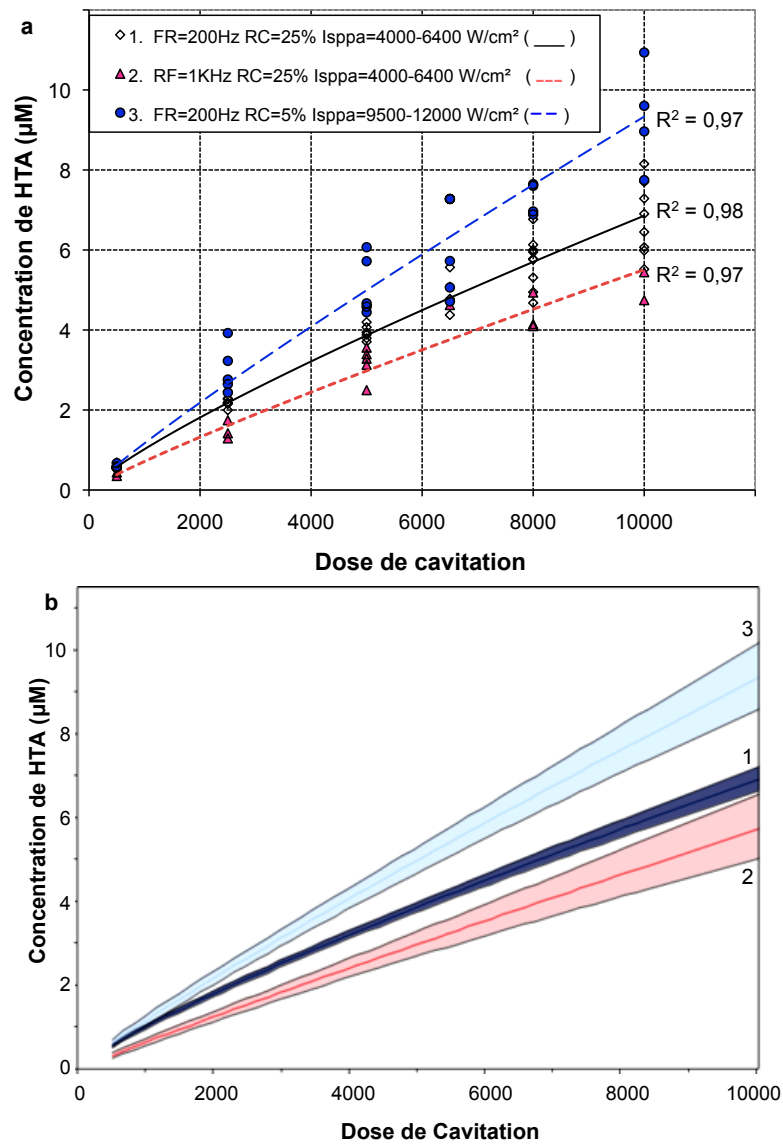


FIGURE 2.7 – (a) et (b) : Concentration de HTA à différentes doses de cavitation pour les 3 ensembles de paramètres ultrasonores testés. (b) Intervalles de confiance à 95% pour chaque ensemble de paramètres.

1.  $I_{sppa} = 4000 - 6400 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 11 - 14 \text{ MPa}$ ,  $fr = 200 \text{ Hz}$ ,  $rc = 25 \%$  ( $I_{spta} = 1000 - 1600 \text{ W/cm}^2$ )
2.  $I_{sppa} = 4000 - 6400 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 11 - 14 \text{ MPa}$ ,  $fr = 1 \text{ kHz}$ ,  $rc = 25 \%$  ( $I_{spta} = 1000 - 1600 \text{ W/cm}^2$ )
3.  $I_{sppa} = 9500 - 12000 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 17 - 19 \text{ MPa}$ ,  $fr = 200 \text{ Hz}$ ,  $rc = 5 \%$  ( $I_{spta} = 475 - 600 \text{ W/cm}^2$ )

Notons que le jeu de paramètres (3) est choisi avec des intensités plus hautes que les jeux (1) et (2) car les intensités de ces deux derniers jeux ne sont pas suffisantes pour induire de la cavitation inertielle. Pour chaque jeu de paramètres, la variabilité des

Paramètres US		Nombre de données	Nombre de jours d'expérience	Equation de la courbe de Régression	R <sup>2</sup>	Paramètre p du test de Levène	Paramètre p du test de Shapiro-Wilk
1	200 Hz, 25 % 4000-6400 W/cm <sup>2</sup>	41	5	$C_{HTA}=0,0034 (CD)^{0,83}$	0,99	0,11	0,75
2	1 kHz, 25 % 4000-6400 W/cm <sup>2</sup>	16	4	$C_{HTA}=0,0016 (CD)^{0,89}$	0,97	0,93	0,31
3	200 Hz, 5 % 9500-12000 W/cm <sup>2</sup>	28	2	$C_{HTA}=0,0023 (CD)^{0,90}$	0,97	0,28	0,47

FIGURE 2.8 – Données expérimentales et analyse statistique des 3 ensembles de paramètres US testés.

données augmente avec la DC dans une moindre proportion que pour l'ensemble des paramètres ultrasonores combinés. Par conséquent, le modèle de régression puissance est également appliqué à ces données. Pour chaque ensemble de paramètres, les résultats ont montré une bonne homogénéité des variances et une excellente corrélation entre la concentration de HTA et la DC (c.f figure 2.7 a. et table 2.8). La haute significativité des coefficients d'ajustement de la courbe de régression pour chaque jeu de paramètre valide le modèle proposé (paramètre p du test de student < 0,0001). L'intervalle de confiance à 95% calculé pour les trois jeux de paramètres (c.f figure 2.7) permet de conclure que les concentrations de HTA à des doses de cavitation données sont statistiquement différentes.

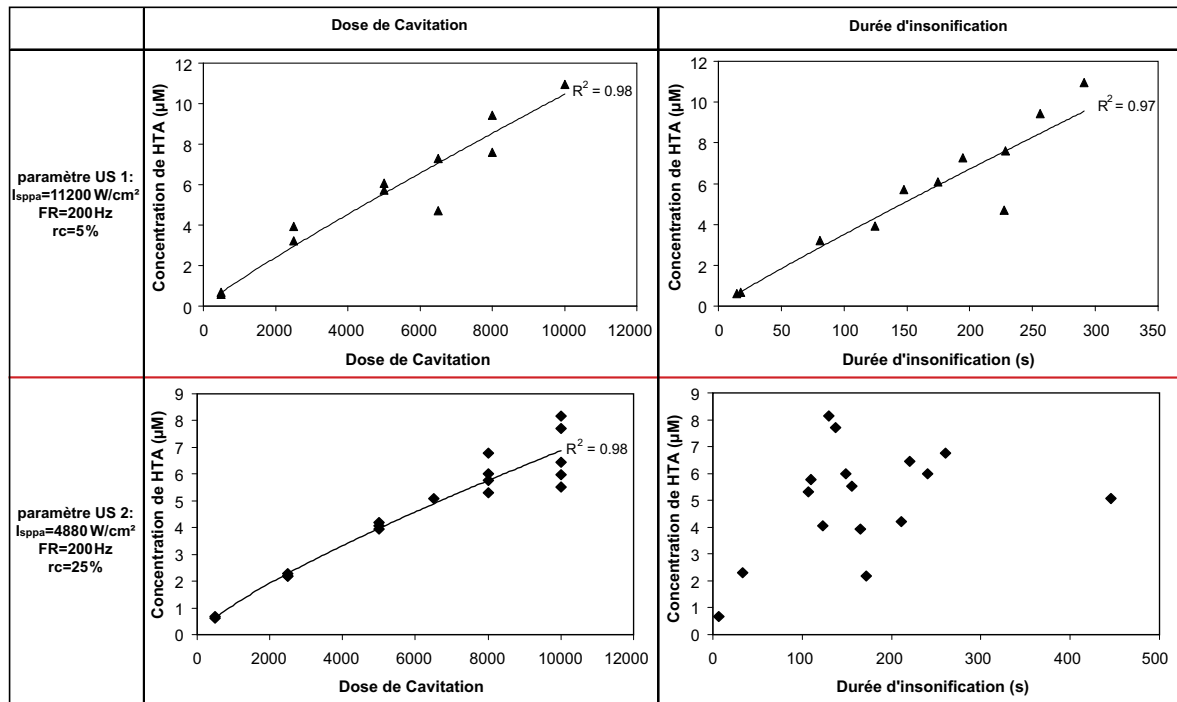


FIGURE 2.9 – Concentration de HTA en fonction de la dose de cavitation ou de la durée d'insonification pour les 2 paramètres ultrasonores testés.

### 2.3.2.3 Indicateur dose de cavitation versus indicateur durée d'insonification

Deux conditions d'irradiation ont été choisies parmi les jeux de paramètres présentés dans la section précédente, afin de comparer l'indicateur dose de cavitation avec l'indicateur durée d'insonification pour le suivi de la concentration de HTA produite (c.f figure 2.9). Pour le premier paramètre ( $I_{sppa} = 11200 \text{ W/cm}^2$ ,  $fr = 200 \text{ Hz}$ ,  $rc = 5 \%$ ) un coefficient de détermination d'environ 0,97 est obtenu pour les deux indicateurs. Pour le second paramètre ( $I_{sppa} = 4880 \text{ W/cm}^2$ ,  $fr = 200 \text{ Hz}$ ,  $rc = 25 \%$ ), un coefficient de détermination de 0,98 est obtenu pour l'indicateur dose de cavitation mais aucune corrélation n'a été trouvée entre la durée d'insonification et la concentration de HTA (c.f figure 2.9).

### 2.3.3 Discussion

Les résultats montrent que la dose de cavitation définie est un bon indicateur de la cavitation inertielle pour chaque jeu de paramètres testé.

Premièrement, nous avons constaté que des changements spécifiques dans les paramètres ultrasonores induisent des variations de la concentration de HTA et donc, de la formation de radicaux libres. Dans la section 2.3.3.1, nous allons analyser ces variations et les comparer aux résultats obtenus dans la littérature.

Deuxièmement, dans la section 2.3.3.2, nous allons ensuite comparer la durée d'insonification (souvent utilisée comme référence pour comparer des expériences de cavitation) avec notre dose de cavitation.

Pour finir, la dispersion des données augmente avec la DC. Les origines possibles de cette dispersion seront examinées dans la section 2.3.3.3.

#### 2.3.3.1 Influence des paramètres ultrasonores sur la production de radicaux hydroxyles

Tout d'abord, on remarque que la dose de cavitation n'est pas affectée par un changement d'intensité pic à des rapports cycliques et fréquences de répétitions donnés. Cette invariabilité est très utile pour suivre et comparer les expériences utilisant des intensités ultrasonores différentes.

D'autre part, la concentration de HTA est statistiquement différente à doses de cavitation égales pour les trois jeux de paramètres sélectionnés. Toutefois, l'équation de la courbe de régression pour tous les jeux de paramètres est une fonction puissance avec des coefficients très similaires (voir table 2.8). On remarque aussi, indépendamment des conditions expérimentales, que plus le nombre d'expériences menées est grand, plus l'intervalle de confiance est fin (voir figure 2.7 (b) et table 2.8). Ces résultats confirment la cohérence des relations obtenues entre la DC et la concentration de HTA. Finalement,

on peut affirmer que la dose de cavitation est un indicateur de cavitation inertielle validé pour chaque jeu de paramètres testés.

Les différences de concentrations de HTA établies entre les trois jeux de paramètres montrent l'influence des paramètres ultrasonores sur la production de radicaux libres  $\bullet OH$  et/ou sur la dose de cavitation. En effet, en comparant les jeux de paramètres 1 et 3 qui ont la même FR (200 Hz) mais des  $I_{spta}$  et RC différents (25% et 5% respectivement), on observe une différence significative entre les concentrations de HTA à DC donnée (c.f figure 2.7). De plus, les concentrations de HTA sont plus élevées pour le jeu de paramètre 3 que pour le 1, ce qui montre qu'un RC plus haut n'induit pas forcément une concentration plus élevée de HTA, et donc une production de radicaux libres plus élevés. Lorsque la FR est fixée, une diminution du RC équivaut à une diminution de la durée de l'impulsion (durée "on") et à une augmentation du temps entre deux impulsions (durée "off"). C'est le cas en passant du jeu de paramètre 1 à 3 et pourtant cela se traduit par une augmentation de la production de radicaux hydroxyles.

La comparaison des jeux de paramètres 2 et 3, ayant des  $I_{spta}$  différents, des RC différents (25% et 5% respectivement), des FR différentes (1000 Hz et 200 Hz) et les mêmes durées d'impulsion (0,25 ms), a montré de larges différences de concentration de HTA. Ceci illustre bien qu'il ne suffit pas d'avoir la même durée d'impulsion pour produire la même quantité de radicaux libres. Dans ce cas, une augmentation de la durée "off" induit une augmentation de la production de radicaux hydroxyles.

Les paramètres 1 et 2 ont des FR différentes (200 Hz et 1000 Hz respectivement), les mêmes RC,  $I_{spta}$ , nombre de cycles par unité de temps (1 cycle = 1 sinusoïde) et par conséquent la même énergie par unité de temps. Pourtant, ils induisent des concentrations de HTA différentes. Ici, la diminution de la durée "on" et de la durée "off" induit une diminution de la production de radicaux hydroxyles.

Pour résumer, plusieurs paramètres ultrasonores influencent la production de radicaux libres à dose de cavitation constante : la durée de pulse (ou durée "on"), la durée "off" et le rapport des deux durées qui est directement lié au rapport cyclique. Il est important de noter que, contre toute attente, la durée "off" semble avoir une influence toute aussi importante sur la production de radicaux hydroxyles que la durée "on".

#### ***Choix des études montrant les variations de la cavitation en régime pulsé pour comparaison avec notre système***

Cette dépendance de la production de radicaux hydroxyles avec les paramètres ultrasonores a déjà été mise en évidence dans la littérature. Plus généralement, l'influence des ultrasons pulsés sur l'activité de cavitation a largement été discutée. Cependant, les mécanismes impliqués sont complexes et nombreux, ce qui donne lieu à des analyses parfois contradictoires.

Dans le domaine de la sonoluminescence, de nombreuses études ont été publiées concer-

nant l'influence des paramètres US pulsés sur l'activité de sonoluminescence [AHMG97]<sup>[1]</sup>, [CDIK98]<sup>[2]</sup>, [DSJ+99]<sup>[3]</sup>, [CDF+00]<sup>[4]</sup>, [DFC+00]<sup>[5]</sup>, [LKMA05]<sup>[6]</sup>, [LYT+08]<sup>[7]</sup>, [IAT+10a]<sup>[8]</sup>, [IAT+10b]<sup>[9]</sup>. Ces études fournissent des explications sur les mécanismes de cavitation se produisant lors d'une exposition aux ultrasons pulsés. Souvent, le phénomène de sonoluminescence a été associé avec des processus sonochimiques impliquant des espèces réactives comme les radicaux libres. Toutefois, ce dernier point est controversé, en particulier pour de la cavitation induite en présence d'un nuage de bulle (par opposition aux systèmes étudiant la sonoluminescence à partir d'une bulle unique) [Lei97]<sup>[10]</sup> p.466-472. Des études récentes ont montré que les bulles à l'origine de la sonoluminescence et les bulles produisant des réactions sonochimiques présentent, dans certains cas, des tailles moyennes différentes et présentent toujours des distributions de taille différente, indiquant que les populations de bulles impliquées dans les deux phénomènes ne sont pas les mêmes [YTL+08]<sup>[11]</sup>, [BGA09]<sup>[12]</sup> : voir figure 2.10. Cette hypothèse est renforcée par une autre étude qui montre la présence d'une activité sonochimique dans des bulles n'induisant pas de sonoluminescence [SAG05]<sup>[13]</sup>. Au vu de ces résultats, nous allons par conséquent nous limiter à l'analyse de la littérature étudiant les effets des ultrasons

- 
- [1] M. Ashokkumar, R. Hall, P. Mulvaney, and F. Grieser. Sonoluminescence from aqueous alcohol and surfactant solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(50):10845–10850, 1997.
  - [2] P Ciuti, NV Dezhkunov, G Iernetti, and AI Kulak. Cavitation phenomena in pulse modulated ultrasound fields. *ULTRASONICS*, 36(1-5):569–574, February 1998.
  - [3] J. Debus, J. Spoo, J. Jenne, P. Huber, and P. Peschke. Sonochemically induced radicals generated by pulsed high-energy ultrasound in vitro and in vivo. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 25(2):301–306, 1999.
  - [4] P. Ciuti, N. V. Dezhkunov, A. Francescutto, A. I. Kulak, and G. Iernetti. Cavitation activity stimulation by low frequency field pulses. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7(4):213–216, 2000.
  - [5] NV Dezhkunov, A Francescutto, P Ciuti, TJ Mason, G Iernetti, and AI Kulak. Enhancement of sonoluminescence emission from a multibubble cavitation zone. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 7(1):19–24, January 2000.
  - [6] J. Lee, S. Kentish, T. J. Matula, and M. Ashokkumar. Effect of surfactants on inertial cavitation activity in a pulsed acoustic field. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(35):16860–16865, 2005.
  - [7] J. Lee, K. Yasui, T. Tuziuti, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. Spatial distribution enhancement of sonoluminescence activity by altering sonication and solution conditions. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(48):15333–15341, 2008.
  - [8] Y. Iida, M. Ashokkumar, T. Tuziuti, T. Kozuka, K. Yasui, A. Towata, and J. Lee. Bubble population phenomena in sonochemical reactor: I estimation of bubble size distribution and its number density with pulsed sonication - laser diffraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2):473–479, 2010.
  - [9] Yasuo Iida, Muthupandian Ashokkumar, Toru Tuziuti, Teruyuki Kozuka, Kyuichi Yasui, Atsuya Towata, and Judy Lee. Bubble population phenomena in sonochemical reactor: II. estimation of bubble size distribution and its number density by simple coalescence model calculation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2):480–486, February 2010. PMID: 19819749.
  - [10] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.
  - [11] K. Yasui, T. Tuziuti, J. Lee, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. The range of ambient radius for an active bubble in sonoluminescence and sonochemical reactions. *Journal of Chemical Physics*, 128(18):12, 2008.
  - [12] A. Brotchie, F. Grieser, and M. Ashokkumar. Effect of power and frequency on Bubble-Size distributions in acoustic cavitation. *Physical Review Letters*, 102(8), 2009.
  - [13] D. Sunartio, M. Ashokkumar, and F. Grieser. The influence of acoustic power on multibubble sonoluminescence in aqueous solution containing organic solutes. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(42):20044–20050, 2005.

pulsés sur la mesure de la production de radicaux libres ou sur la sonochimiluminescence (SCL) obtenue avec une solution de luminol. La production de flash lumineux étant induite chimiquement par l'ajout de luminol, la SCL n'a pas de point commun avec la sonoluminescence. La mesure de la SCL est représentative uniquement de l'activité sonochimique des bulles de cavitation [OKH<sup>+</sup>09]<sup>[14]</sup>.

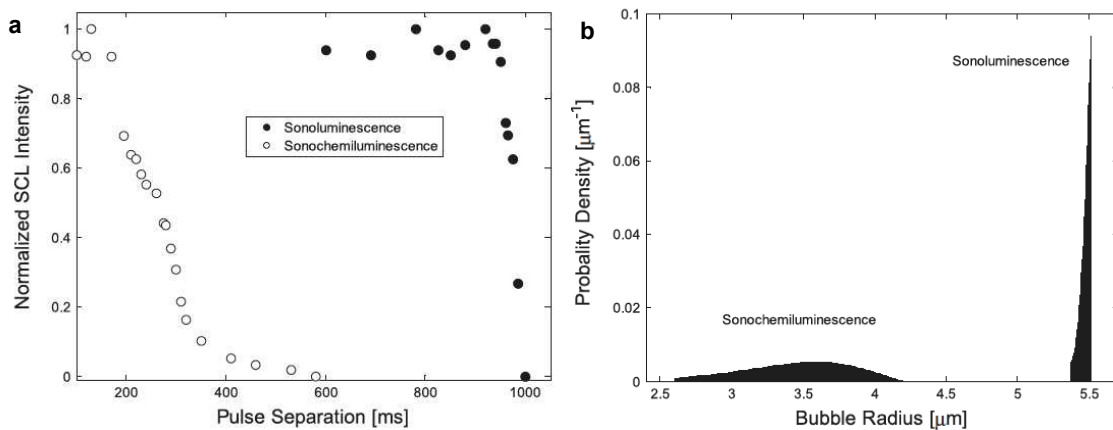


FIGURE 2.10 – (a) Intensité normalisée de la sonochimiluminescence (SCL) d'une solution de luminol et intensité normalisée de sonoluminescence (SL) en fonction de la durée "off" (avec une durée "on" de 4 ms) à 545 kHz. (b) Distribution des tailles de bulles déterminées à partir des données de SCL et de SL. La puissance acoustique utilisée pour (a) et (b) est de  $1,5 \pm 0,4 W$  [BGA09].

### *Influence des caractéristiques du système ultrasonore sur la production de radicaux libres et restriction du choix des études considérées*

Il ressort des articles étudiés que les effets chimiques de la cavitation inertielle sont dépendants des caractéristiques du dispositif ultrasonore. Ainsi, les résultats obtenus dans des systèmes générant des ondes stationnaires et dans des systèmes de type focalisés ne sont généralement pas les mêmes car ils impliquent des mécanismes différents [Hen87]<sup>[15]</sup>, [HHG92]<sup>[16]</sup>, [BHZ<sup>+</sup>09]<sup>[17]</sup>. Comme on pouvait s'y attendre, des fréquences fondamentales d'émission ultrasonore  $f_0$  différentes, d'une part et des changements d'intensités ultrasonores d'autre part, induisent aussi des variations significatives de la pro-

- [14] K Okada, N Kudo, MA Hassan, T Kondo, and K Yamamoto. Threshold curves obtained under various gaseous conditions for free radical generation by burst ultrasound - effects of dissolved gas, microbubbles and gas transport from the air. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(4):512–518, April 2009.
- [15] A. Henglein. SONOCHEMISTRY - HISTORICAL DEVELOPMENTS AND MODERN ASPECTS. *Ultrasonics*, 25(1):6–16, 1987.
- [16] A. Henglein, D. Herburger, and M. Gutierrez. SONOCHEMISTRY - SOME FACTORS THAT DETERMINE THE ABILITY OF a LIQUID TO CAVITATE IN AN ULTRASONIC-FIELD. *Journal of Physical Chemistry*, 96(3):1126–1130, 1992.
- [17] M. A. Buldakov, M. A. Hassan, Q. L. Zhao, L. B. Feril, N. Kudo, T. Kondo, N. V. Litvyakov, M. A. Bolshakov, V. V. Rostov, N. V. Cherdynstseva, and P. Riesz. Influence of changing pulse repetition frequency on chemical and biological effects induced by low-intensity ultrasound in vitro. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3):392–397, 2009.



duction de radicaux libres [BGA09]<sup>[1]</sup>, [Hen95]<sup>[2]</sup>, [KAG08]<sup>[3]</sup>. Il est en effet connu que ces deux grandeurs influent sur l'activité de cavitation inertielle et particulièrement sur les seuils de cavitation inertielle (c.f section 1.4.3.2). Le volume du liquide insonifié influence aussi cette production. Tuziuti et al. [TYL<sup>+</sup>08]<sup>[4]</sup> ont démontré que pour une insonification de 152 kHz, l'efficacité de la réaction sonochimique est fortement dépendante de ce dernier. La présence d'une interface air-liquide dans l'échantillon insonifié a également un effet sur la quantité de radicaux libres générée. Pour plus de détails le lecteur peut se référer à l'étude d' Okada et al. [OKH<sup>+</sup>09]<sup>[5]</sup>. De plus, la quantité de radicaux libres produite est dépendante des caractéristiques du milieu telles que la quantité et la nature du gaz dissous, l'existence de germes de cavitation, la pression atmosphérique, la température...[Hen95]<sup>[2]</sup>, [HHG92]<sup>[6]</sup>, [OKH<sup>+</sup>09]<sup>[5]</sup>. Il y a par conséquent de nombreux facteurs pouvant influencer les résultats dans des systèmes ne disposant pas d'une mesure de cavitation. L'avantage de notre dose de cavitation est quelle est, idéalement, indépendante de telles variations des conditions expérimentales. Ce dernier point sera discuté dans la section 2.3.3.3.

Afin de comparer notre étude avec la littérature, des études opérant dans des conditions expérimentales similaires ont été retenues. Etant donné qu'il existe une grande variété de conditions expérimentales, les deux principaux critères de sélection sont les suivants : l'absence d'ondes stationnaires dans le système et une fréquence d'insonification relativement proche de 1 MHz.

***Comparaison avec la littérature : influence de la durée d'impulsion (ou de la FR à RC constant)***

Casadonte et al. [CFP05]<sup>[7]</sup> comparent à 400 kHz l'influence sur la production de radicaux libres dosés avec le iodure, de deux insonifications pulsées ( $FR = 1$  Hz et 100 Hz,

- 
- [1] A. Brothie, F. Grieser, and M. Ashokkumar. Effect of power and frequency on Bubble-Size distributions in acoustic cavitation. *Physical Review Letters*, 102(8), 2009.
  - [2] A. Henglein. CHEMICAL EFFECTS OF CONTINUOUS AND PULSED ULTRASOUND IN AQUEOUS-SOLUTIONS. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(2):S115–S121, 1995.
  - [3] P. Kanthale, M. Ashokkumar, and F. Grieser. Sonoluminescence, sonochemistry (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yield) and bubble dynamics: Frequency and power effects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2):143–150, 2008.
  - [4] T. Tuziuti, K. Yasui, J. Lee, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. Mechanism of enhancement of sonochemical-reaction efficiency by pulsed ultrasound. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(22):4875–4878, 2008.
  - [5] K Okada, N Kudo, MA Hassan, T Kondo, and K Yamamoto. Threshold curves obtained under various gaseous conditions for free radical generation by burst ultrasound - effects of dissolved gas, microbubbles and gas transport from the air. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(4):512–518, April 2009.
  - [6] A. Henglein, D. Herburger, and M. Gutierrez. SONOCHEMISTRY - SOME FACTORS THAT DETERMINE THE ABILITY OF a LIQUID TO CAVITATE IN AN ULTRASONIC-FIELD. *Journal of Physical Chemistry*, 96(3):1126–1130, 1992.
  - [7] D. J. Casadonte, M. Flores, and C. Petrier. Enhancing sonochemical activity in aqueous media using power-modulated pulsed ultrasound: an initial study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(3):147–152, 2005.

$RC = 50\%$ ,  $I < 2,6 W/cm^2$ ) et d'une insonification continue. Ils trouvent un taux de formation d'iode de  $10,5 \mu M/min$  pour la FR de 1 Hz, de  $7,1 \mu M/min$  pour l'insonification continue et de  $4,1 \mu M/min$  pour la FR de 100 Hz. La tendance décrite ici est la même que celle observée pour nos expériences. En effet, pour un RC et une amplitude fixée, la production de radicaux libres diminue en augmentant la FR. Or, quand FR augmente à RC constant, cela correspond à une diminution de la durée de l'impulsion US. Logiquement, cette diminution pourrait expliquer la diminution de l'activité de cavitation et par conséquent la diminution de la production de radicaux libres. Cependant, Ciaravano et al. [CFM81]<sup>[8]</sup> ont montré que pour un  $I_{sppa}$  de  $10 W/cm^2$ , il y a une durée d'impulsion optimale pour la production de radicaux libres mesurée par le dosimètre iodure ( $f_0 = 1$  MHz,  $RC = 50\%$ , 60 s d'insonification). Le même type de résultat est obtenu par Clarke et Hill [CH70]<sup>[9]</sup> pour de faibles intensités à  $f_0 = 1$  MHz et des RC fixés à 9% and 50%. Dans les deux études [CFM81]<sup>[8]</sup> [CH70]<sup>[9]</sup>, les durées d'impulsion optimales pour une production maximale de radicaux libres varient entre 5 and 100 ms, suivant le RC et l'intensité acoustique utilisée. Comme discuté précédemment, nous avons pu observer dans notre système (à RC fixé) une diminution de la production des radicaux hydroxyles avec l'augmentation de la FR (correspondant à la diminution de la durée "on"). Les paramètres 1 et 2, avec des durées "on" de 1,25 ms et 0,25 ms respectivement concordent avec la phase croissante des courbes de formation de iodure décrites dans les deux expériences citées. Notons que les comparaisons effectuées correspondent à des tendances observées qui semblent être du même ordre de grandeur ; néanmoins, les paramètres ultrasonores (en particulier les RC et intensités) et les dispositifs n'étant pas les mêmes, il n'est donc pas possible de faire une comparaison *stricto sensu*.

#### ***Comparaison avec la littérature : influence de la durée "off" entre deux impulsions***

Par ailleurs, Brotchie et al. [BGA09]<sup>[1]</sup> ont montré qu'il y a une durée "off" optimale différente pour chaque fréquence d'insonification (voir figure 2.11 a). La fréquence d'insonification la plus élevée correspond exactement à la fréquence de notre transducteur. A cette fréquence, la durée "off" optimale pour une production maximale de radicaux libres est d'environ 14 ms pour une durée "on" de 4 ms. Pour de faibles durées "off" inférieures à 14 ms, l'intensité de SCL augmente avec la durée "off". Dans notre système, la tendance est similaire puisqu'une augmentation de la durée "off" de 0,75 ms à 4,75 ms induit une large augmentation de la production de radicaux hydroxyles (comparaison des paramètres 2 et 3 ayant la même durée "on" de 0,25 ms).

---

[8] V. Ciaravino, H. G. Flynn, and M. W. Miller. PULSED ENHANCEMENT OF ACOUSTIC CAVITATION - a POSTULATED MODEL. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 7(2):159–166, 1981.

[9] P. R. Clarke and C. R. Hill. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 47(2B):649–653, February 1970.

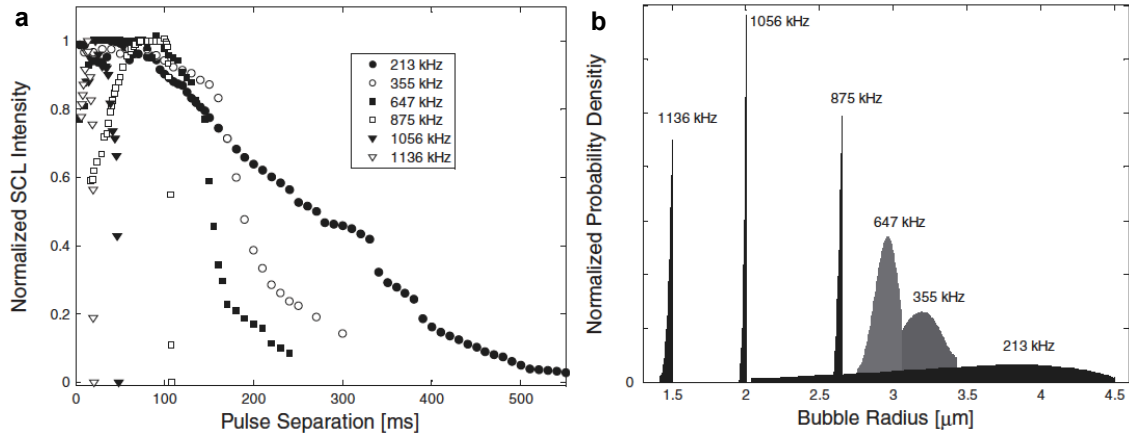


FIGURE 2.11 – (a) Intensité normalisée de la sonochimiluminescence d’une solution de luminol en fonction de la durée ”off” (avec une durée ”on” de 4 ms). (b) Distribution des tailles de bulles pour  $f_0 = 213, 355, 647, 875, 1056,$  et  $1136$  kHz. Dans (b) les données pour  $f_0 = 875, 1056,$  et  $1136$  kHz ont subi une diminution d’échelle d’un facteur 4. La puissance acoustique utilisée à toutes les fréquences pour (a) et (b) est de  $1,5 \pm 0,4$  W. Les valeurs pour  $f_0 = 1136$  et  $1056$  kHz ont une haute précision (écart type  $< 5\%$ ) tandis que les tailles déterminées pour les fréquences inférieures ont une précision moindre (écart type  $\approx 25\%$ ) [BGA09].

### **Analyse des mécanismes potentiels à l’origine des variations de la production de radicaux libres avec les paramètres ultrasonores pulsés**

L’analyse des études présentées confirme la forte dépendance de la production de radicaux libres avec les durées ”on”, ”off” et RC. L’explication la plus simple de ce phénomène est l’existence d’une plage de taille de bulles optimale pour la cavitation inertielle produisant des radicaux libres. En effet, des variations d’un ou plusieurs des paramètres ultrasonores que sont les durées ”on”, ”off” et le RC, induisent des variations de taille de bulles car ces dernières croissent par diffusion rectifiée ou par coalescence (c.f §1.4.3.1) pendant les durées ”on” et décroissent ou se dissolvent complètement pendant les durées ”off”. L’implosion d’une bulle peut aussi conduire à la fragmentation de cette dernière en petites bulles (c.f §1.4.3.2) pouvant servir de germe de cavitation à l’impulsion suivante si la durée ”off” est adéquate. Par conséquent, un équilibre entre les paramètres US peut-être trouvé pour générer des bulles de tailles optimales de façon à engendrer des niveaux de cavitation inertielle conséquents se traduisant par la production de radicaux libres. Brotchie et al. [BGA09]<sup>[1]</sup> corroborent cette théorie en montrant qu’il existe des tailles de bulles spécifiques associées à la mesure de SCL et que ces tailles de bulles varient avec la fréquence d’insonification  $f_0$ . Il en ressort que la taille moyenne de bulle produisant de la SCL diminue quand  $f_0$  augmente tandis que la distribution des tailles de bulle devient de plus en plus étroite (voir figure 2.11 b). Ces deux tendances concordent avec la théorie d’Apfel et Hollande sur les seuils de cavitation inertielle et

[1] A. Brotchie, F. Grieser, and M. Ashokkumar. Effect of power and frequency on Bubble-Size distributions in acoustic cavitation. *Physical Review Letters*, 102(8), 2009.

les distributions de taille de bulles associées (présenté section 1.4.3.2 et figure 1.20) à ceci près qu'il s'agit ici uniquement des bulles produisant des effets sonochimiques.

Il y a d'autres phénomènes impliqués dans la variation de la cavitation inertielle de manière générale sous ultrasons pulsés et qui participent par conséquent à la variation de la production de radicaux libres. Les explications données par différents auteurs à ce sujet ne sont pas toujours concordantes car comme nous l'avons dit précédemment, ces mécanismes sont complexes, nombreux et souvent difficiles à identifier. Leighton [Lei97]<sup>[2]</sup> (p.504-523) donne une intéressante vue d'ensemble de ces phénomènes qui peuvent produire une augmentation de la cavitation par l'application d'ultrasons pulsés. Il décrit l'influence de changements de paramètres US pulsés sur l'activité de cavitation, en s'appuyant sur plusieurs études. Il décrit quatre mécanismes principaux qui peuvent induire ce qu'il appelle "le renforcement pulsé", autrement dit une augmentation de l'activité de cavitation liée au pulsé.

Le premier est le recyclage périodique de cavités/bulles à la taille de résonance. Ce phénomène est schématisée par la figure 2.12. Pour résumer, une bulle qui croît pendant l'insonification jusqu'à une taille supérieure à la taille de résonance de la bulle *via* le processus de diffusion rectifiée (c.f §1.4.3.1) pourrait se dissoudre pour atteindre une taille inférieure à la résonance pendant la durée "off", avant de croître à nouveau pendant la durée "on" suivante et ainsi de suite. L'intérêt de ce processus est qu'une bulle ayant une taille supérieure à la résonance est peu active d'un point de vue sonochimique alors que son activité est maximale pour cette taille de résonance. La taille de résonance est ici prise comme exemple car elle souvent associée au maximum d'activité de la bulle, pourtant il semble que ce ne soit pas toujours cette taille de bulle qui y soit associée. Toutefois, s'il existe une taille optimale de bulle qui peut être atteinte par diffusion rectifiée, ayant une activité telle qu'un maximum d'effet soit produit sans pour autant qu'elle soit détruite, alors des ultrasons pulsés de durées "on" et "off" appropriées permettent de recycler périodiquement la bulle à cette taille optimum.

Le second mécanisme est la survie de germes *non stabilisés*. Sont appelés germes stabilisés, les germes préexistants dans le milieu avant toute insonification et donc qui ne se dissolvent pas. Les germes stabilisés de tailles appropriées grossissent de façon explosive lorsqu'une première impulsion US est générée dans le milieu, implosent et éventuellement se fragmentent. Les germes issus de la fragmentation sont les germes dits *non stabilisés*. Si ces germes ne se dissolvent pas entièrement pendant la durée "off" qui suit la première impulsion, ils grossissent de façon explosive et forment des bulles qui vont imploser et se fragmenter à leur tour, générant d'autres germes *non stabilisés* et ainsi de suite. Là encore, il existe une taille limite inférieure et supérieure pour que le germe puisse croître de façon explosive et pour que l'implosion de la bulle soit violente et produise de nom-

---

[2] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.

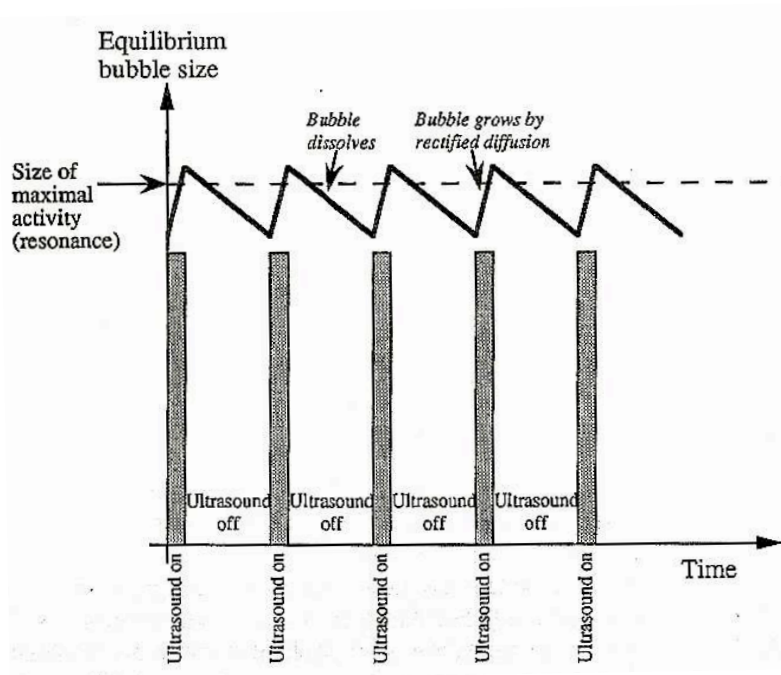


FIGURE 2.12 – Illustration du phénomène de recyclage de bulles à la taille de résonance [Lei97].

breux effets. Il est donc nécessaire que les durées "on" et "off" permettent de générer et maintenir ces tailles de germes pour observer cet effet. On voit là encore l'importance de ces derniers paramètres ultrasonores.

Le troisième mécanisme est l'excitation transitoire. Il a été observé que la croissance explosive des bulles et leur implosion violente avait lieu principalement après le début de l'insonification et très peu ensuite. Par conséquent, en régime pulsé, le milieu est transitoirement excité à chaque nouvelle impulsion émise et de plus nombreuses implosions de bulles sont générées en comparaison avec une insonification continue.

Le quatrième mécanisme est la migration des bulles. Ce mécanisme existe préférentiellement en présence d'ondes stationnaires. Pendant une insonification continue, les bulles plus petites que la taille résonnante se rassemblent aux ventres de pression sous l'influence des forces de Bjerknes (c.f section 1.4.3.1). En grossissant, elles pompent le gaz dissous dans le liquide à proximité des ventres et dégazent ces zones. Moins de gaz sera alors disponible pour leur permettre de grossir, ce qui se traduira par une cavitation moins intense. C'est ce qu'on appelle le *mécanisme de dégazage*. Par ailleurs, les bulles situées en périphérie des amas atténuent l'onde ultrasonore incidente car leur impédance est beaucoup plus faible que celle du liquide. Par conséquent, les bulles situées au centre de l'amas reçoivent moins d'énergie acoustique et leur activité de cavitation est moins intense. C'est ce qu'on appelle la théorie du *bouclier d'impédance* car les bulles situées à l'extérieur de l'amas agissent comme un bouclier "protégeant" les bulles du centre de l'énergie acoustique incidente. En régime pulsé, pendant les durées "off" les amas de

bulles s'éparpillent et à la reprise de l'insonification, de l'eau fraîchement gazée afflue vers les ventres de pression où les amas se reforment progressivement. La dispersion des bulles pendant la durée "off" permet à l'énergie ultrasonore d'atteindre indifféremment les bulles à la reprise de l'insonification et d'éviter l'effet de *bouclier d'impédance*.

Tous les mécanismes décrits peuvent être combinés et de plus, dépendent de nombreux paramètres expérimentaux. Ils peuvent par conséquent expliquer les variations observées pour différents paramètres ultrasonores dans un même système et celles observées entre les études.

Pour résumer, la production de radicaux libres par cavitation inertielle varie sous différentes insonifications pulsées et dans des conditions expérimentales diverses. Nous avons vu que plusieurs mécanismes sont potentiellement impliqués dans ces variations. Des tendances de variation similaires ont été mise en évidence dans des études opérant dans des conditions expérimentales proches des nôtres, à l'exception des intensités US, plus élevées dans notre dispositif. Pour les mêmes doses de cavitation, la production de radicaux hydroxyles varie principalement en altérant significativement la durée "on", "off" et/ou le RC.

Une étude de la signature acoustique de la cavitation aurait pu permettre une meilleure appréhension de l'origine de ces variations. Cependant, le dispositif utilisé ne permet pas d'avoir accès aux signaux acoustiques avant filtrage.

Toutes les études citées dans cette section ont utilisé la durée d'insonification comme référence pour la comparaison des niveaux de cavitation. Les dispositifs utilisés ne comportaient pas de contrôle de la dose de cavitation générée. Pourtant, nous avons pu observer les mêmes tendances dans notre système, ce qui nous amène à la question suivante : la durée d'insonification est-elle un indicateur suffisant de la cavitation inertielle ?

### 2.3.3.2 Indicateur dose de cavitation versus indicateur durée d'insonification

Nous avons constaté précédemment que pour le paramètre (1), la durée d'insonification est un aussi bon indicateur que la dose de cavitation (c.f §2.3.2.3). En revanche pour le paramètre (2), la durée d'insonification n'est plus du tout un indicateur de cavitation, alors que la dose de cavitation est toujours aussi fiable. Ces différences entre les deux paramètres proviennent *a priori* des seuils de cavitation. En effet, même si les seuils de cavitation n'ont pas été mesurés précisément dans notre dispositif, l'observation (suivi de la DC instantanée et moyenne sur l'écran) et l'écoute (bruit large bande audible) de la cavitation inertielle pendant de nombreuses expériences ont permis de déduire les paramètres qui peuvent induire systématiquement de la cavitation. En effet, le paramètre (1), avec un  $I_{sppa}$  élevé est considéré comme étant très au dessus du seuil de cavitation car la cavitation inertielle est toujours induite par ce paramètre et est de plus

régulière. Ces conditions permettent d'utiliser la durée d'insonification comme un indicateur de cavitation. Cependant, même si la cavitation est initiée à chaque expérience avec ce paramètre, des changements de conditions d'expérimentation (température du bain, pression atmosphérique, taux de gaz dissous...) peuvent induire des variations du niveau de cavitation. Ces variations ne peuvent être détectés en utilisant la durée d'insonification.

D'autre part, le paramètre (2) avec un  $I_{sppa}$  plus modéré est supposé proche du seuil de cavitation. Quand ce paramètre US est appliqué, la cavitation inertielle n'est pas toujours initiée, peut être irrégulière ou même stopper durant l'expérience. Dans ces conditions, il va de soit que la durée d'insonification n'est plus du tout un indicateur de la cavitation. La dose de cavitation n'est pas (ou très peu) perturbée par ces changements et reste excellentement corrélée à la concentration de HTA.

Pour résumer, contrairement à la durée d'insonification, la dose de cavitation développée garanti un dosage de la cavitation inertielle sous différentes conditions expérimentales, y compris lorsque la cavitation est très irrégulière. De plus, elle permet de comparer des expériences réalisées à différentes intensités (la FR et le RC étant fixés), ce qui n'est pas possible avec la durée d'insonification.

### 2.3.3.3 Dispersion de la concentration de HTA aux hautes doses de cavitation

Idéalement, la dose de cavitation définie est indépendante des conditions expérimentales, étant donné qu'elle mesure le bruit large bande émis pendant la cavitation inertielle. Néanmoins, comme de la dispersion dans les concentrations de HTA est observée à paramètres US et DC fixés, la question des variations qui pourraient être causées par les conditions d'expérimentation est soulevée. Ces variations, existantes à toutes les DC, sont particulièrement visibles pour les hautes DC car elles s'accumulent au cours du temps. En effet, les expériences ont été réalisées *a propos* (pour tester la reproductibilité du système) sur plusieurs jours (voir table 2.8), ce qui induit des changements dans les conditions expérimentales telles que la pression atmosphérique, la température et le taux de dégazage de l'eau destinée à la cuve, le taux de gaz dissous et les impuretés présentes dans la dilution de TA destinée à l'insonification.

Pour illustrer l'influence des conditions expérimentales sur ces variations, nous allons nous focaliser sur le jeu de paramètres 1 testé ( $FR = 200Hz$ ,  $RC = 25\%$ ). Pour ces paramètres, les expériences ont été réalisées sur 5 jours différents. On peut voir que la dispersion des données et que les résidus sont importants pour toutes les DC au-dessus de 500, excepté à 5000 où l'on a des concentrations de HTA très proches (c.f figure 2.7 a). En effet à DC=5000, 4 des 5 échantillons ont été réalisés le même jour pour tester la variabilité des résultats. Cette diminution de la variabilité sur un jour d'expériences

est généralement avérée pour chaque jeu de paramètres. Par conséquent, les variations des conditions expérimentales semblent bien être un facteur de dispersion significatif.

En premier lieu, les variations des conditions expérimentales impliquent des variations des seuils de cavitation inertielle. Or, de nombreuses expériences ont été effectuées *a propos* (pour tester la robustesse du système) dans des conditions proches du seuil de cavitation, ce qui a impliqué une cavitation très irrégulière. Dans certains cas, la cavitation s'initiait difficilement ou pouvait s'arrêter durablement pendant une partie de l'expérience. Des durées d'insonification bien plus longues se sont alors avérées nécessaires pour atteindre la DC cible, et ont résulté en l'accumulation de bruits parasites par la carte d'acquisition (perturbations électromagnétiques, filtre...). Par conséquent, la cavitation a été un peu surestimée pour ces expériences de longues durées avec une erreur induite qui augmente avec la durée d'insonification. Nous avons également pu observer, grâce à l'affichage en temps réel du bruit moyen de cavitation filtré (c.f figure 2.4), que pour les mêmes paramètres US, la cavitation pouvait être régulière certains jours et irrégulières d'autres jours. La dispersion observée pour les hautes DC peut-être partiellement expliquée par ce phénomène et l'accumulation de bruit qui peut y être associée.

Deuxièmement, la dispersion dans la production de HTA peut être causée par des variations de température. En effet, la température de l'eau de la cuve produite par la machine à dégazer et par conséquent la température de l'échantillon insonifié, peut varier de 23 à 28°C selon les jours d'expériences. De plus, la durée d'insonification n'étant pas constante pour une DC donnée, un échauffement variable de l'échantillon peut être causé par l'absorption acoustique de la pipette.

D'après la littérature, il semble que l'oxydation du TA en HTA par les radicaux hydroxyles soit influencée par la température de l'échantillon. Toutefois, les tendances de variations ne sont pas claires. Mason et al. [MLBZ94]<sup>[1]</sup> ( $f_0 = 20 \text{ kHz}$ ) et Vercet et al. [VLB98]<sup>[2]</sup> ( $f_0 = 20 \text{ kHz}$ ) montrent une diminution de la production de HTA avec l'augmentation de la température. Inversement, Miller et Thomas [MT93]<sup>[3]</sup> ( $f_0 = 1,6 \text{ MHz}$ ) montrent une augmentation de la concentration de HTA avec la température. Enfin Iida et al. [IYTS05]<sup>[4]</sup> ( $f_0 = 130 \text{ kHz}$ ) montrent une diminution suivie d'une augmentation de

- 
- [1] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.
  - [2] A Vercet, P Lopez, and J Burgos. Free radical production by manothermosonication. *ULTRASONICS*, 36(1-5):615–618, February 1998.
  - [3] D. L. Miller and R. M. Thomas. A COMPARISON OF HEMOLYTIC AND SONOCHEMICAL ACTIVITY OF ULTRASONIC CAVITATION IN a ROTATING TUBE. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 19(1):83–90, 1993.
  - [4] Y. Iida, K. Yasui, T. Tuziuti, and M. Sivakumar. Sonochemistry and its dosimetry. *Microchemical Journal*, 80(2):159–164, 2005.



la concentration de HTA en augmentant la température. Par conséquent, l'influence de la température sur la production de HTA est démontrée dans différents dispositifs, mais la tendance de variation n'est pas résolue. On peut remarquer que les dispositifs US, les intensités et les fréquences utilisés diffèrent d'une étude à l'autre. Les variations de concentration de HTA avec la température pourraient par conséquent être dépendante de ces facteurs.

Pour finir, nous pouvons seulement affirmer que des variations de la concentration de HTA sont potentiellement induites par des changements de température. Cependant, si ces variations de concentration sont proportionnelles à l'émission de bruit large bande, elles ne devraient pas être visibles en utilisant la DC comme indicateur. Ce n'est que dans le cas contraire qu'elles pourraient participer à la dispersion des données observée.

#### **2.3.4 Conclusion**

Pour résumer, la dose de cavitation définie (DC) basée sur le filtrage du bruit large bande émis lors de la cavitation inertielle a pu être validée chimiquement par le dosimètre de téréphthalate pour trois jeux de paramètres testés. La corrélation obtenue entre la DC et la concentration de HTA, (et par extension la production de radicaux hydroxyles produits lors de la cavitation inertielle) est excellente pour chacun de ces jeux de paramètres. Par conséquent, malgré un peu de dispersion visible en particulier aux hautes concentrations de HTA, nous pensons que cette dose de cavitation est un bon outil pour suivre le largage d'agents encapsulés dans notre système en utilisant les paramètres ultrasonores validés. C'est ce que nous allons réaliser dans la section qui suit.

## 2.4 Libération *in vitro* de médicament encapsulé contrôlé par la dose de cavitation

### 2.4.1 Matériel et méthodes

#### 2.4.1.1 Les liposomes

Les principales caractéristiques des liposomes fabriqués par nos partenaires ainsi que le concept de modification des constituants de la membrane chimique rendant les liposomes plus ou moins sonosensibles ont été décrits section 1.3.3 (§"Les liposomes"). Rappelons que ces liposomes sont des liposomes de taille inférieure à 100 nm et ne contiennent pas de gaz. Nos partenaires ont mis au point successivement plusieurs formulations de liposomes en faisant varier les proportions des constituants de la membrane. Ils ont, à plusieurs reprises, également changé certains composants de la membrane afin d'en améliorer la sonosensibilité et ont ainsi conçu plusieurs "générations" de formulations. Parmi les formulations de liposomes fabriquées par nos partenaires, nous pouvons seulement détailler la méthode de fabrication et la composition des formulations ayant déjà fait l'objet de publications, pour des raisons de confidentialité. C'est par conséquent la première génération de liposomes qui a été décrite dans la section 1.3.3 (§"Les liposomes"). De même, la méthode de fabrication d'une formulation de liposomes de cette génération nommée CCD6-26 contenant de la doxorubicine (dox) est ici donnée à titre d'exemple. Cette formulation en particulier est choisie car elle est utilisée pour les premières expériences *in vivo* réalisées (c.f chapitre 4).

#### Méthode de fabrication de la formulation CCD6-26

Les liposomes de la formulation CCD6-26 contiennent une fraction molaire de 47% mol de DSPE, 5% mol de DSPC, 8% mol de DSPE-PEG 2000 et 40% mol de cholestérol. Ils ont une taille moyenne de 83 nm. Ils sont préparés par la méthode d'hydratation d'un film fin de lipides et réduits par extrusion séquentielle [MCHD03]<sup>[1]</sup> à une taille cible de 80-90nm. Pour résumer, les lipides sont dissous dans un mélange de chloroforme et méthanol (9/1 volume/volume) à 60 ° C, et évaporé jusqu'à dessèchement par rotation sous vide. Le film lipidique sec résultant est hydraté avec une solution à 300 mM de sulfate d'ammonium avant d'être soumis à 3 cycles de gel-dégel et extrudé successivement (extrudeuse Lipex , Biomembrane Inc., Vancouver B.C., Canada) à travers des filtres de polycarbonate avec des pores de plus en plus petits. L'hydratation lipidique, l'extrusion des liposomes et le processus de dégel sont effectués à 75 ° C au-dessus de la température de transition de la phase gel vers la phase liquide cristalline des phospholipides.

La formation d'un gradient de sulfate d'ammonium est réalisée par une dialyse\* ex-

---

[1] Barbara Mui, Laurie Chow, Michael J Hope, and Nejat Duzgunes. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. In *Liposomes, Part A*, volume Volume 367, pages 3–14. Academic Press, 2003.

tensive des liposomes extrudés avec une solution de sucrose à 255 mM, avec plusieurs changements de la solution de dialyse sur une période de 24 heures. La solution de doxorubicine hydrochloride est ajoutée à la dispersion de liposomes chauffés à 75 ° C pour donner un ratio final médicament/lipides d'une valeur nominale de 1 :16 (masse/masse). La concentration finale de lipides est de 16 mg/ml. Pour obtenir une efficacité d'encapsulation optimale, les dispersions de liposomes sont, après addition de dox, incubés pendant 30 minutes sous agitation avec un barreau magnétique à une température de 75 ° C. Toute la dox libre restante est éliminée par dialyse des liposomes avec une solution de sucrose isotonique contenant 10 mM d'HEPES (PH=7,4).

Plus de détails concernant la préparation et les méthodes de caractérisation de ces liposomes sont donnés par Evjen et al. [ENR<sup>+</sup>10]<sup>[1]</sup>.

#### 2.4.1.2 Mesure du largage de doxorubicine

Diverses formulations de liposomes fabriquées par nos partenaires Epitarget ont pu être testées au cours du projet. Une exposition exhaustive de ses tests ne présente pas grand intérêt. Nous avons choisi de présenter une formulation de seconde génération nommée par nos partenaires "Epi2-8D" (que nous appelleront "Epi" pour simplifier) en comparaison avec la formulation commerciale Caelyx<sup>®</sup> dont les applications thérapeutiques sont décrites paragraphe "les liposomes" de la section 1.2.1.

Des mesures du largage de doxorubicine sous l'action d'ultrasons pulsés ont été effectuées à différentes doses de cavitation pour les deux formulations sélectionnées.

Les dispersions de liposomes sont diluées au 1/500 (rapport volume/volume) dans une solution de sucrose isosmotique\*. Les liposomes Caelyx<sup>®</sup> (Schering-Plough International, Kenilworth, NJ, Etats-Unis) sont des liposomes PEGylés d'une taille d'environ 100 nm contenant de la doxorubicine hydrochloride. Les liposomes "Epi" sont des liposomes à base de DSPE contenant de la doxorubicine hydrochloride et ayant une taille moyenne de 97 nm.

Comme la doxorubicine est une molécule fluorescente, elle permet d'estimer le largage de doxorubicine encapsulée dans les liposomes. En effet, une dispersion de liposomes intacts contenant de la doxorubicine à une fluorescence très faible à cause de l'auto "quenching"\* causé par la forte concentration de doxorubicine à l'intérieur du liposome. Quand la doxorubicine est libérée des liposomes, cela induit une forte augmentation de l'intensité fluorescente due à la réduction de l'effet de quenching.

L'équation suivante est utilisée pour le calcul du pourcentage de doxorubicine libérée

---

[1] Tove J Evjen, Esben A Nilssen, Sibylla Rognvaldsson, Martin Brandl, and Sigrid L Fossheim. Distearoylphosphatidylethanolamine-based liposomes for ultrasound-mediated drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(3):327–333, August 2010. PMID: 20434558.

après insonification :

$$\%Dox_{lib} = \frac{F_{dox(US)} - F_{dox(init)}}{F_{dox(100\%)} - F_{dox(init)}} \times 100 \quad (2.2)$$

avec :

- $F_{dox(US)}$  : Fluorescence de la dispersion de doxorubicine liposomale après insonification
- $F_{dox(init)}$  : Fluorescence de la dispersion de doxorubicine liposomale avant insonification
- $F_{dox(100\%)}$  : Fluorescence de la dispersion de doxorubicine liposomale après insonification et addition de 20  $\mu$ l de surfactant par ml d'échantillon (Solution de TritonX100, Sigma-Aldrich, Oslo, Norvège), pour induire un largage de 100% de la doxorubicine liposomale.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre (QE6500 Ocean Optics, Dunedin, FL, Etats-Unis) comportant une source de lumière de type LED produisant une excitation dans la plage de longueur d'onde de 440-500 nm avec un pic à 470 nm. Le pic d'émission mesuré de la doxorubicine se situe à environ 595 nm (paramètres du spectromètre : résolution = 5000 ms, scans de la moyenne = 10, largeur de l'échantillonneur monocanal = 10, refroidissement activé).

### 2.4.1.3 Paramètres ultrasonores

Les dispersions de liposomes sont insonifiées avec les paramètres ultrasonores suivants :  $I_{sppa} = 4880 \text{ W/cm}^2$ ,  $FR = 200 \text{ Hz}$ ,  $RC = 25 \%$  (correspondant à une  $I_{spta} = 1220 \text{ W/cm}^2$ ). Ces paramètres font partie du jeu de paramètres 1 validé avec le dosimètre téréphthalate dans la section 2.3. Ils ont été choisis proches du seuil de cavitation afin de continuer à tester la variabilité et la reproductibilité du système. Vingt et un échantillons de Caelyx<sup>®</sup> ont été insonifiés sur deux jours différents, et 14 échantillons de liposomes "Epi" ont été insonifiés au cours d'une même journée. Les liposomes Caelyx<sup>®</sup> nous servent de référence pour toutes les expériences.

### 2.4.2 Résultats

Le modèle de régression puissance utilisé pour la validation avec le TA est aussi applicable dans ce cas et montre une haute corrélation entre la dose de cavitation et le pourcentage de médicament libéré. Cependant, ce modèle n'est pas représentatif physiquement de la libération de médicament encapsulé. En effet, si on applique ce modèle quand la DC tend vers l'infini, l'équation puissance implique que le pourcentage de libération de doxorubicine tende lui aussi vers l'infini, ce qui n'est évidemment pas possible vu que la quantité de médicament est finie dans l'échantillon testé.

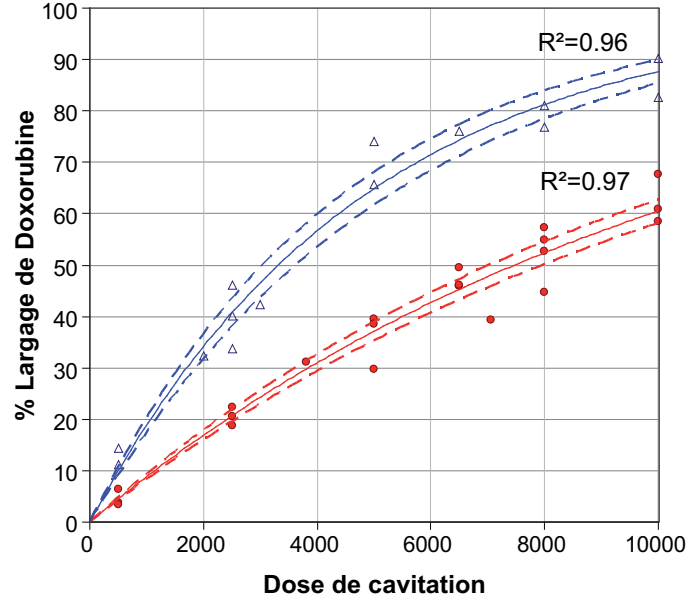


FIGURE 2.13 – Pourcentage de libération de doxorubicine encapsulée dans des liposomes en fonction de la dose de cavitation appliquée. Les ronds et courbes rouges représentent les liposomes Caelyx<sup>®</sup>, les triangles et courbes bleus représentent les liposomes "Epi" fabriqués par l'entreprise Epitarget. Les courbes en pointillés représentent les intervalles de confiance à 95 %.  $\alpha_{Caelyx} = 10774$  et  $\alpha_{Epi} = 4781$  dans l'équation de la courbe de régression (c.f équation 2.3).

Par conséquent, un modèle plus approprié, qui sature à 100% de dox libérée quand la DC tends vers l'infini est proposé comme suit :

$$\%Dox_{lib} = (1 - \exp(-\frac{DC}{\alpha})) \times 100 \quad (2.3)$$

Ce modèle est basé sur les propriétés "physiques" du système. En effet, la proportion de dox encapsulée ( $Dox_{encaps}$ ) est soumise à une décroissance exponentielle quand la DC augmente. Autrement dit, la proportion de dox encapsulée décroît à un taux proportionnel à sa propre valeur quand la DC augmente car la doxorubicine est en quantité finie dans le système. On peut modéliser la décroissance exponentielle de la proportion de dox encapsulée dans l'équation suivante :

$$\frac{d(Dox_{encaps})}{d(DC)} = -\lambda Dox_{encaps} \quad (2.4)$$

où  $\lambda$  est un nombre positif appelé *constante de décroissance*.

La solution de l'équation 2.4 est :  $Dox_{encaps} = D_0 e^{-\lambda DC}$  avec  $D_0$  constante.

Pour  $DC = 0$  toute la dox est encapsulée, donc  $Dox_{encaps}(0) = D_0 = 1$ . La solution devient alors :

$$Dox_{encaps} = \exp(-\lambda DC) \quad (2.5)$$

Comme nous sommes intéressés par le pourcentage de doxorubicine libéré des liposomes  $\%Dox_{lib}$ , l'équation 2.5 est réécrite de la façon suivante :

$$\%Dox_{lib} = (1 - \exp(-\lambda DC)) \times 100 \quad (2.6)$$

En définissant une constante  $\alpha = \frac{1}{\lambda}$ , l'équation 2.6 devient alors :

$$\%Dox_{lib} = (1 - \exp(-\frac{DC}{\alpha})) \times 100 \quad (2.7)$$

Quand  $DC = \alpha$ , la doxorubicine encapsulée est réduite par un facteur e, tel que  $\approx 63\%$  de la dox est libérée des liposomes.

Pour les deux formulations de liposomes, la quantité de doxorubicine libérée est hautement corrélée avec la DC ( $R^2 > 0,96$  c.f. figure 2.13). Le test d'égalité des variances et de normalité des résidus sont validés pour les liposomes Caelyx<sup>®</sup> ( $p_{Levene} = 0,23$ ,  $p_{Shapiro-Wilk} = 0,06$ ) et pour les liposomes "Epi" ( $p_{Levene} = 0,57$ ,  $p_{Shapiro-Wilk} = 0,96$ ) (voir Annexe 1 pour plus de précision sur les tests statistiques).

### 2.4.3 Discussion

Comme nous l'avons commenté dans la section précédente, les résultats montrent une haute corrélation entre la dose de cavitation et le pourcentage de doxorubicine libéré des liposomes (c.f figure 2.13). Or, la dose de cavitation est représentative de la cavitation inertielle pour les paramètres ultrasonores utilisés qui ont été validés avec le dosimètre téréphthalate. Par conséquent, on peut dire que la cavitation est au moins un des mécanismes de largage, si ce n'est le mécanisme principal de largage, de doxorubicine encapsulée dans ces formulations de liposomes.

Un intervalle de confiance à 95% est déterminé pour la courbe de largage de chaque formulation de liposome (c.f figure 2.13). Comme les intervalles ne se recoupent pas, la quantité de dox libérée par ultrasons des liposomes de la formulation "Epi" est statistiquement et significativement plus élevée que celle libérée des liposomes Caelyx<sup>®</sup> à toutes les DC.

La constante  $\alpha$  définie dans l'équation du modèle de régression établi (voir section 2.4.2) peut-être interprétée comme la DC moyenne nécessaire à libérer le médicament encapsulé dans un liposome de la dispersion liposomale sous ultrasons. Mathématiquement, plus  $\alpha$  est petit, plus la doxorubicine est libérée rapidement des liposomes. Ceci est illustré par les courbes de largage des deux formulations testées : les liposomes "Epi", qui libèrent beaucoup plus rapidement la dox que les liposomes Caelyx<sup>®</sup>, ont une valeur  $\alpha = 4781$  bien inférieure à celle des Caelyx<sup>®</sup> qui est de 10 774. De plus,  $\lambda$  (l'inverse d' $\alpha$ ), est le coefficient directeur de la pente à l'origine des courbes de liposomes. Plus  $\alpha$

est petit et donc plus  $\lambda$  est grand, plus la pente est forte et donc plus la dox encapsulée va être libérée rapidement sous l'action des ultrasons.

Nous considérons par conséquent le nombre  $\alpha$  comme représentatif de la sensibilité des liposomes aux ultrasons (la *sonosensibilité*). En considérant les résultats obtenus et la signification du coefficient  $\alpha$ , il peut être conclu que les liposomes "Epi" sont plus sonosensibles que les liposomes Caelyx<sup>®</sup> pour les paramètres US utilisés.

Par ailleurs, avec le suivi en temps réel, il a été observé que la cavitation inertielle était irrégulière et parfois difficile à maintenir ou à initier. Ceci est dû certainement aux paramètres US choisis proches du seuil de cavitation. De plus, les tests de Caelyx ont été réalisés sur deux jours différents, ce qui induit des variations dans les conditions expérimentales. Néanmoins, la corrélation entre la libération de dox et la DC est excellente, démontrant ainsi la robustesse de la DC.

Nous pouvons toutefois remarquer que trois points des tests sur les liposomes Caelyx<sup>®</sup> sont clairement situés en dessous de la courbe de régression (voir figure 2.13). Les données d'expériences enregistrées confirment que pour ces trois échantillons, la cavitation était quasi-nulle pendant plusieurs minutes, permettant une accumulation de bruits parasites par la DC. Ainsi, pour ces trois points la DC est surestimée. Ceci confirme l'hypothèse émise dans la section 2.3.3.3 sur l'accumulation par la DC de bruit autre que le bruit large bande de cavitation pouvant induire une dispersion des données. D'ailleurs, si ces trois points sont retirés de la courbe, le coefficient de détermination passe de 0,96 à 0,99, les tests statistiques étant toujours validés et la valeur d' $\alpha$  devient 10 212.

Pour éviter ces surestimations, il serait nécessaire d'ajouter un "seuil bas" dans le calcul de la DC qui éliminerait l'accumulation de bruits parasites.

#### 2.4.3.1 Conclusion

En résumé, nous avons pu voir dans cette section que pour les deux formulations de liposomes insonifiées, une excellente corrélation a été trouvée entre la libération de liposomes et la DC. Comme la DC est corrélée à la cavitation inertielle pour les paramètres ultrasonores appliqués, la cavitation inertielle apparaît comme le principal phénomène impliqué dans la libération du médicament. Nous avons défini un modèle de courbe permettant de comparer à l'aide d'un seul paramètre  $\alpha$ , la sonosensibilité des formulations de liposomes testées.

Ajoutons au passage que pour toutes les formulations de nos partenaires qui ont pu être testées dans ce système, une haute corrélation est toujours trouvée entre la DC et le largage d'agents encapsulés.

## 2.5 Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons pu voir en détail la mise au point d'un dispositif ultrasonore permettant de doser la cavitation inertielle. La validation de la dose de cavitation inertielle définie par le dosimètre téréphthalate a mis en avant des différences significatives dans la production de radicaux libres pour les trois jeux de paramètres ultrasonores pulsés testés à dose de cavitation égale. Ces différences ont aussi été observées dans la littérature. Pour des études effectuées dans des conditions d'expérimentations proches de celles que nous avons utilisées, les mêmes tendances de variations ont été trouvées. La dose de cavitation a été validée pour chacun des jeux de paramètres et a été appliquée au suivi et à la comparaison du largage de doxorubicine encapsulée dans des liposomes. Pour chacune des formulations testées, une excellente corrélation a été trouvée entre la doxorubicine libérée et la dose de cavitation pour des paramètres US validés chimiquement. Nous pouvons en déduire que la cavitation inertielle est un des principaux, sinon le principal mécanisme de libération de médicament encapsulé dans les liposomes testés. Par ailleurs, une étude détaillée a permis de mettre en avant un peu de dispersion des concentrations de HTA, visible en particulier à haute dose de cavitation. Il semble que cette dispersion soit principalement liée à l'accumulation de bruits parasites par la dose de cavitation et aux variations de température de l'eau de la cuve pouvant entraîner des changements de la production de radicaux libres.

Une étude consacrée spécifiquement à la variation de production de HTA avec la température pourrait nous donner des indications sur ces variations. De plus, l'analyse du spectre acoustique émis pendant l'insonification à différentes températures pourrait apporter des réponses quand aux mécanismes impliqués. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné, cette information n'est pas accessible avec le système décrit dans ce chapitre.

Le problème d'accumulation de bruits parasites constaté sur la dispersion de concentration de HTA et confirmé pour trois échantillons lors du suivi de libération de doxorubicine encapsulé, a montré la nécessité d'ajouter un seuil bas éliminant les bruits parasites.

Les questions soulevées dans cette étude sont à l'origine des travaux exposés dans le chapitre suivant dans lequel nous nous efforcerons d'apporter des éléments de réponse.





## Chapitre 3

# Evolution de la dose de cavitation et étude de l'influence de la température *in vitro*

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>96</b>
<b>3.2</b>	<b>Description et validation de la nouvelle dose de cavitation</b>	<b>96</b>
3.2.1	Description du dosage de la cavitation inertielle	96
3.2.2	Evaluation de la nouvelle dose de cavitation	103
<b>3.3</b>	<b>Libération de doxorubicine encapsulée</b>	<b>107</b>
<b>3.4</b>	<b>Influence de la température</b>	<b>110</b>
3.4.1	Influence de la température sur la concentration de HTA	110
3.4.2	Influence de la température sur la libération de doxorubicine liposomale	114
<b>3.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>116</b>

---

### 3.1 Introduction

Nous avons mis en oeuvre un nouveau dispositif d'acquisition du bruit large bande basé sur un filtrage numérique. L'objectif de ce nouveau dispositif est d'une part, d'améliorer le procédé de filtrage et d'ajouter un seuil bas pour éliminer les bruits parasites, d'autre part, de sauvegarder les signaux acoustiques avant filtrage.

Après une description du traitement du signal réalisé pour obtenir la nouvelle dose de cavitation, nous allons procéder à la validation de cette dose avec le dosimètre téréphtalate et comparer les résultats obtenus avec ceux du chapitre précédent. La nouvelle dose définie sera ensuite utilisée comme indicateur pour le suivi du largage de doxorubicine encapsulée sous diverses conditions d'insonification. Ensuite, l'influence de la température imposée à l'échantillon sur la production de HTA sera étudiée. Enfin, nous nous intéressons à l'impact de ces mêmes élévations de température sur la libération de doxorubicine liposomale.

Chronologiquement, la mise en place de ce dispositif correspond à la fin de la thèse et les dernières expériences au tout dernier mois de celle-ci. Aussi, les données expérimentales ont pu être analysées mais l'analyse spectrale des signaux bruts enregistrés se fera ultérieurement.

### 3.2 Description et validation de la nouvelle dose de cavitation

#### 3.2.1 Description du dosage de la cavitation inertielle

Le système mis en place effectue un traitement des données et un filtrage numérique en temps réel pour calculer la dose de cavitation et permet parallèlement de sauvegarder les données brutes avant traitement.

Le dispositif ultrasonore reste le même que celui décrit figure 2.3.1.1. Seul le processus d'acquisition de la dose de cavitation est modifié, principalement en remplaçant le filtrage analogique par un filtrage numérique. Ce processus est décrit pas à pas figure 3.1. Le signal acoustique est capturé par l'hydrophone avant d'être traité à l'aide d'un filtre passe-bas pour éliminer les hautes fréquences (filtre analogique anti-repliement). Nous avons développé un programme en C permettant simultanément et en temps réel de sauvegarder les données échantillonnées et de traiter le signal (fenêtrage, filtrage, calcul d'enveloppe) pour obtenir le signal instantané  $s(t)$ . Ce signal est sommé pendant toute la durée de l'insonification (ce qui correspond mathématiquement à une intégration) afin d'obtenir la nouvelle dose de cavitation.

Nous nommerons cette nouvelle dose de cavitation NDC pour la différencier de la dose définie au chapitre précédent.

Une nouvelle carte d'acquisition plus performante est utilisée (CH-3160 12 bits 40 MHz 4 entrées analogiques, Acquiteck, Massy, France). La fréquence d'échantillonnage  $f_e$  du signal est fixée à 12 MHz. Cette fréquence représente un compromis entre précision et rapidité. En effet, cette fréquence doit être suffisamment importante pour avoir une résolution du signal satisfaisante et permettre d'observer le spectre du signal brut sur une large plage de fréquences. Toutefois, elle doit être limitée afin de permettre un calcul en temps réel de la dose de cavitation parallèlement à un enregistrement des données brutes. Afin d'éviter du repliement spectral (dû à l'échantillonnage du signal) sur la partie du spectre à filtrer et à étudier, un filtre analogique anti-repliement (filtre BLP-5+  $f_{c0}(-3dB) = 6 MHz$   $f_{c0}(-20dB) = 8 MHz$ , Mini-circuit, NY, Etats-Unis) est installé sur l'entrée de la carte d'acquisition. Ce filtre est un passe-bas dont la fréquence de coupure  $f_{c0}$  à -3dB est à la limite des conditions de Shannon :  $f_{c0} = \frac{f_e}{2} = 6 MHz$ . Ce filtre a été choisi car, contrairement à un filtre maison préalablement testé ayant une fréquence de coupure à -3dB de 5MHz permettant d'éviter tout repliement spectral, il n'introduit quasiment aucun bruit parasite sur le signal après filtrage et aucun facteur d'atténuation ou d'amplification. De plus, un éventuel repliement spectral n'apparaîtra qu'au delà du 3<sup>ème</sup> harmonique voire du 4<sup>ème</sup> harmonique, ce qui assure un calcul correct de la NDC (effectué entre l'émission fondamentale et le 1<sup>er</sup> harmonique) et paraît suffisant pour le post-traitement spectral.

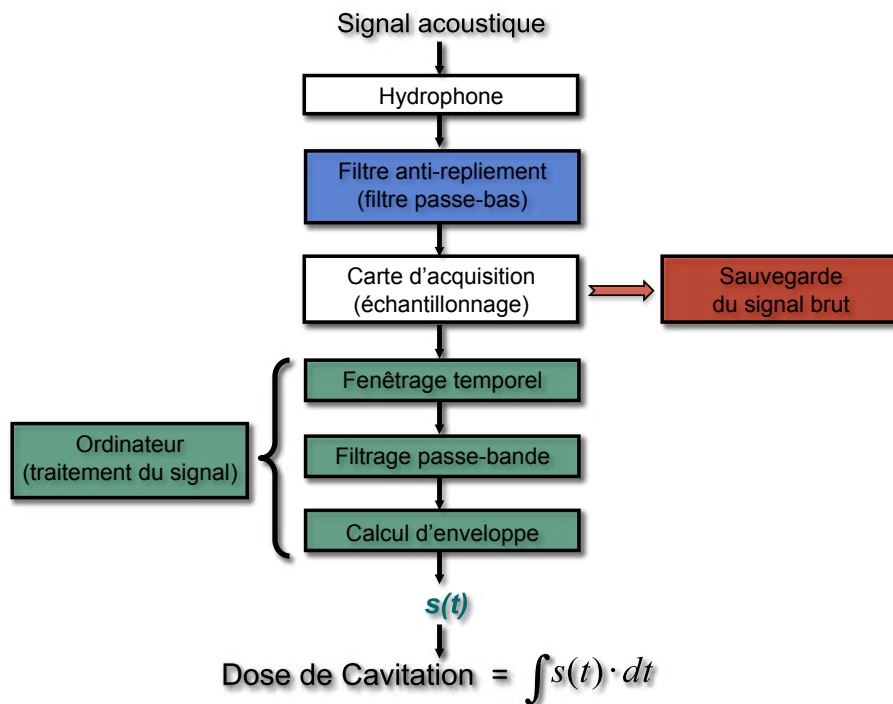


FIGURE 3.1 – Chaîne d'acquisition de nouvelle dose de cavitation (NDC) et de la sauvegarde des données brutes.

Une fois le signal échantillonné, le signal brut filtré passe-bas est sauvegardé. Ensuite, un fenêtrage temporel du signal est effectué. En effet, l'ordinateur n'est pas assez performant pour pouvoir simultanément calculer la dose de cavitation et acquérir le signal brut en permanence (même en effectuant un "traitement par paquets" des données). Il faut donc arrêter d'acquérir le signal pendant une partie des durées "off" pour permettre le traitement des données, et acquérir pendant les durées "on". Une marge de 10% de la durée "on" est prise par défaut, car le transducteur ne coupe pas l'émission de façon nette : il reste donc de l'énergie dans le milieu après cette durée. Le programme permet d'ajuster la durée acquise grâce à un facteur multiplicatif de la durée "on" d'émission nommé *grand\_acq*, modifiable par l'utilisateur via le fichier de configuration. La valeur de *grand\_acq* est de 1,1 par défaut pour obtenir la marge de 10% voulue.

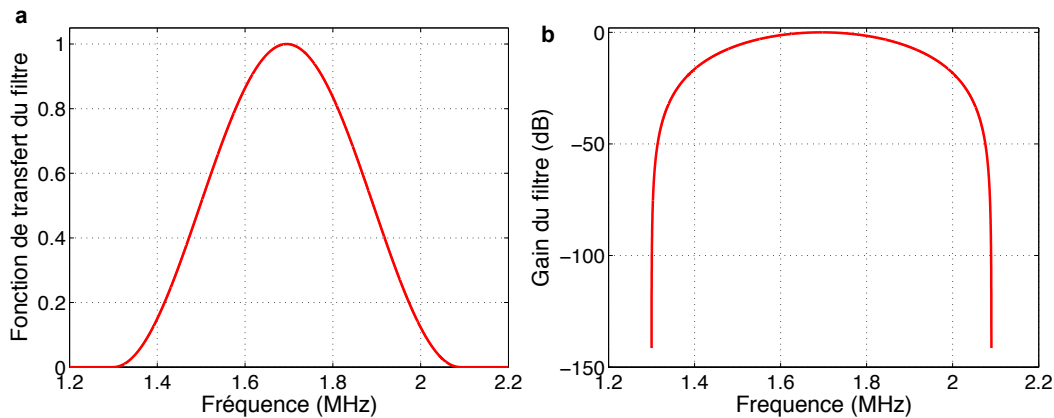


FIGURE 3.2 – (a) Module de la fonction de transfert du filtre dans le domaine fréquentiel. (b) Gain normalisé du filtre dans le domaine fréquentiel (en dB)

Le signal est ensuite filtré dans la zone d'intérêt, comprise entre l'émission fondamentale  $f_0$  et le premier harmonique  $2f_0$ , de façon à capter préférentiellement du bruit blanc. Cette zone de filtrage est sélectionnée pour les mêmes raisons évoquées dans le chapitre précédent (§2.3.1.2), le filtrage utilisé ici est néanmoins sensiblement amélioré (voir figure 3.2). En effet, le filtrage analogique n'était pas de forme très régulière et le filtre introduisait des facteurs d'amplifications et potentiellement du bruit.

Pour illustrer le procédé de filtrage numérique utilisé, prenons l'exemple de signaux acquis et traités en une itération du programme pendant l'émission de 10 trains d'onde par le transducteur (c.f figure 3.3). En pratique, le filtrage est réalisé de la façon suivante : (1) on calcule la transformée de Fourier du signal acquis (2) on multiplie la transformée de Fourier obtenue par une fenêtre de Hann en fréquentiel (c.f figure 3.4) (3) on effectue la transformée de Fourier inverse pour obtenir le signal filtré en temporel.

Nous avons opté pour l'utilisation d'une fenêtre de Hann pour le filtrage du signal. Afin de justifier ce choix, reprenons quelques bases de signal.

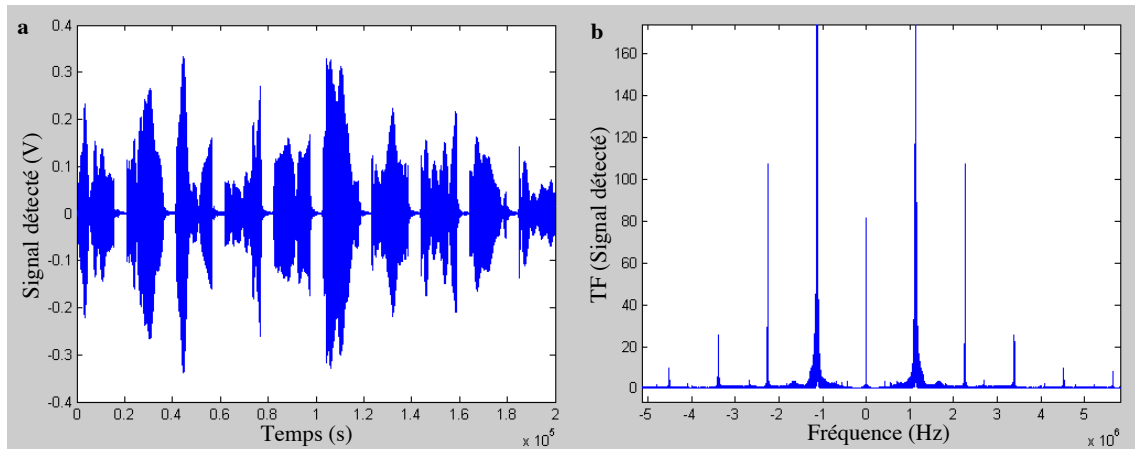


FIGURE 3.3 – (a) Enregistrement effectué par l'hydrophone pendant une durée où 10 trains d'ondes sont émis avec les paramètres suivants (induisant de la cavitation inertielle) :  $I_{sppa} = 11425 \text{ W/cm}^2$   $FR = 200 \text{ Hz}$   $RC = 5 \%$  (une partie des durées "off" a été coupée sur la représentation) (b) Transformée de Fourier du signal représenté en (a)

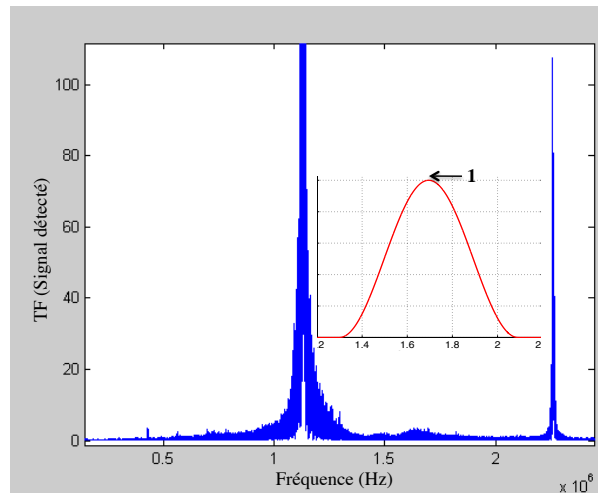


FIGURE 3.4 – Illustration du processus de filtrage. La transformée de Fourier du signal de la figure 3.3 est représentée dans la zone d'intérêt, c'est à dire la bande de fréquence incluant  $f_0$  et  $2f_0$ . En rouge est représenté la fenêtre de Hann par laquelle on multiplie la transformée de Fourier pour effectuer le filtrage. La fenêtre de Hann est représentée en ordonnée à une échelle environ 50 fois plus grande que la TF.

Le signal ultrasonore imposé au transducteur est un signal sinusoïdal pulsé, en d'autres termes un sinus émis par intermittence et ici de fréquence  $f_0 = 1,13 \text{ MHz}$ . Une durée "on" d'émission correspond donc au produit d'une fonction "porte" par une sinusoïde à 1,13 MHz (c.f figure 3.5). La transformée de Fourier (TF) du sinus tronqué correspondant à une durée "on" est donc (d'après le théorème de Plancherel) le produit de convolution de la TF de la fonction porte (soit un sinus cardinal centré en 0) par la TF de la fonction sinus de fréquence  $f_0$  (soit deux fonctions dirac) (voir figure 3.5). La TF résultante est composée de deux fonctions sinus cardinal, l'une centrée en  $f_0$ , l'autre

centrée en  $-f_0$ .

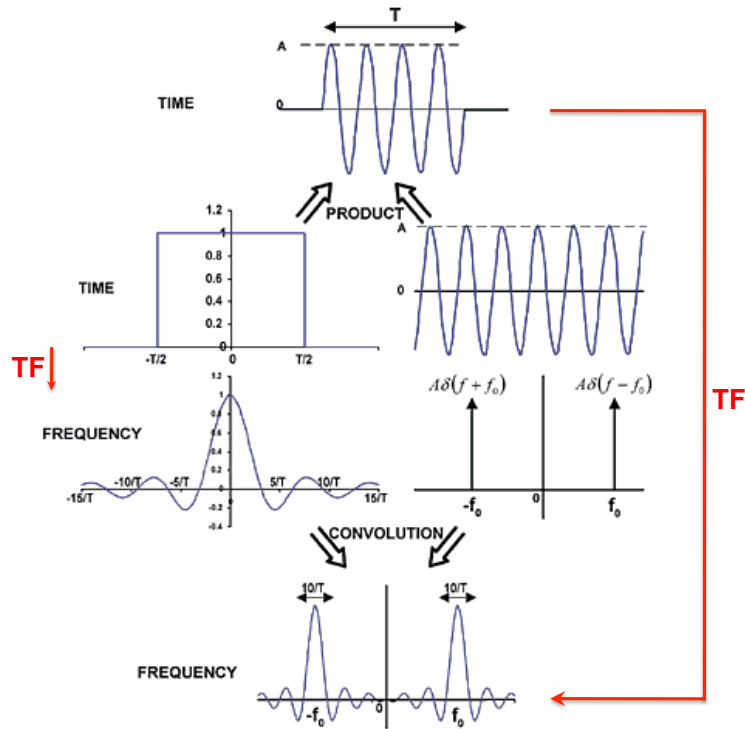


FIGURE 3.5 – Calcul de la transformée de Fourier (TF) d'un signal sinusoïdal coupé (régime ultrasonore pulsé). Un signal sinusoïdal pulsé est le produit d'une fonction porte et d'un sinus. La transformée de Fourier du signal sinusoïdal pulsé est le produit de convolution de la TF de la fonction porte (un sinus cardinal centré en  $0$ ) et de la TF de la fonction sinus (deux fonctions Dirac). La TF résultante est composée de deux fonctions sinus cardinal, l'une centrée en  $f_0$ , l'autre centrée en  $-f_0$ . Adapté de : <http://archives.sensorsmag.com/articles/0704/20/main.shtml>

Le signal détecté par l'hydrophone lors d'une insonification pulsée générant de la cavitation est constituée principalement de la fréquence fondamentale d'émission, d'harmoniques de celle-ci et du bruit large bande de cavitation inertielle. La transformée de Fourier de ce signal sera donc constituée de pics qui sont en fait des fonctions sinus cardinal à la fréquence fondamentale  $f_0$ , aux harmoniques ( $2f_0, 3f_0, 4f_0$ , etc) et de bruit de cavitation. C'est ce qu'on peut voir sur la figure 3.3. Nous avons choisi de filtrer le bruit de cavitation entre la fondamentale  $f_0$  et le premier harmonique  $2f_0$ . Or, la fonction sinus cardinal possède autour de son pic central des lobes secondaires. Prenons un exemple : si on filtre en multipliant dans le domaine fréquentiel une fonction porte définie entre  $1,2\text{ MHz}$  et  $2,2\text{ MHz}$  et le spectre du signal, on va intégrer dans la dose de cavitation les lobes secondaires en plus du bruit large bande. Pourquoi ne pas prendre alors une fonction porte plus étroite, par exemple entre  $1,5\text{ MHz}$  et  $1,8\text{ MHz}$ ? Principalement parce que l'on va perdre en résolution de filtrage. Plus une fonction est large en fréquentiel, plus son équivalent en temporel est étroit, plus la résolution de

filtrage est importante. Si on utilise une fonction étroite en fréquentiel (correspondant à une fonction large en temporel) la résolution de filtrage est mauvaise ce qui ne permet pas de résoudre des signaux courts qui se suivent à une cadence élevée.

On prend par conséquent une fenêtre de Hann entre 1,3 et 2,09 MHz centrée à 1,695 MHz (au milieu de l'intervalle  $f_0$  et  $2f_0$ ) (c.f figure 3.2). Cette fonction de Hann est large (en fréquentiel) et permet donc une bonne résolution de filtrage en temporel. C'est sa forme qui nous permet de prendre une grande largeur en fréquence, car elle permet de couper sur ces bords les lobes secondaires de l'émission fondamentale et du 1er harmonique. Il n'y aura donc pas d'erreur commise par l'intégration de ce bruit non représentatif de la cavitation. Bien entendu, la largeur de la fenêtre de Hann a été choisie à l'aide de des tests numériques de façon à ne pas intégrer de bruit provenant des lobes secondaires, et ce quel que soit les paramètres ultrasonores choisis et le nombre d'impulsions traité simultanément à chaque itération du programme d'acquisition. La forme de la fenêtre de Hann présente d'autres intérêts qui ne seront pas abordés ici car l'objectif de ce chapitre n'est pas une description exhaustive des propriétés du filtrage numérique utilisé.

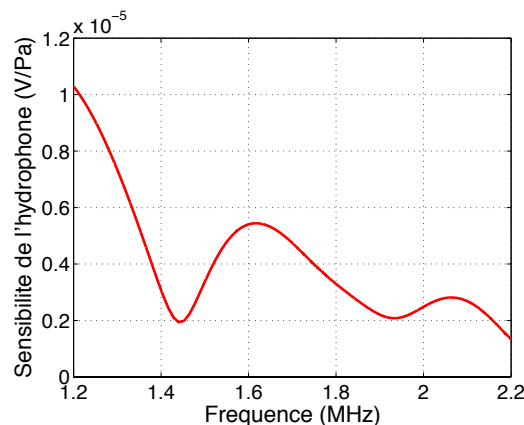


FIGURE 3.6 – Module de la fonction de transfert de l'hydrophone de mesure sur la bande de fréquence d'intérêt.

Après filtrage, on prend l'enveloppe du signal en temporel c'est à dire le module du signal. Le signal  $s(t)$  obtenu (c.f figure 3.1) est sommé à chaque itération de l'acquisition pour obtenir à la fin de l'insonification la nouvelle dose de cavitation en V.s (la NDC sera toujours donnée en mV.s dans ce chapitre pour plus de commodité).

L'hydrophone utilisé est le même que celui utilisé avec le dispositif précédent. Cet hydrophone n'a pas une fonction de transfert très plate (c.f figure 3.6) mais est très sensible et très solide, ce qui permet une utilisation dans les produits chimiques et au contact de la cavitation. De plus, il est peu coûteux et les fonctions de transferts des hydrophones du même lot sont quasi identiques, ce qui permet de changer d'hydrophone en cas de perte de sensibilité (son niveau de détection est testé avant chaque journée d'expérience



de façon à détecter une éventuelle perte de sensibilité). Au final, le signal détecté par l'hydrophone est donc multiplié par la fonction de transfert de l'hydrophone et celle du filtre en fréquence. La caractéristique du module de la fonction de transfert globale est représentée figure 3.7.

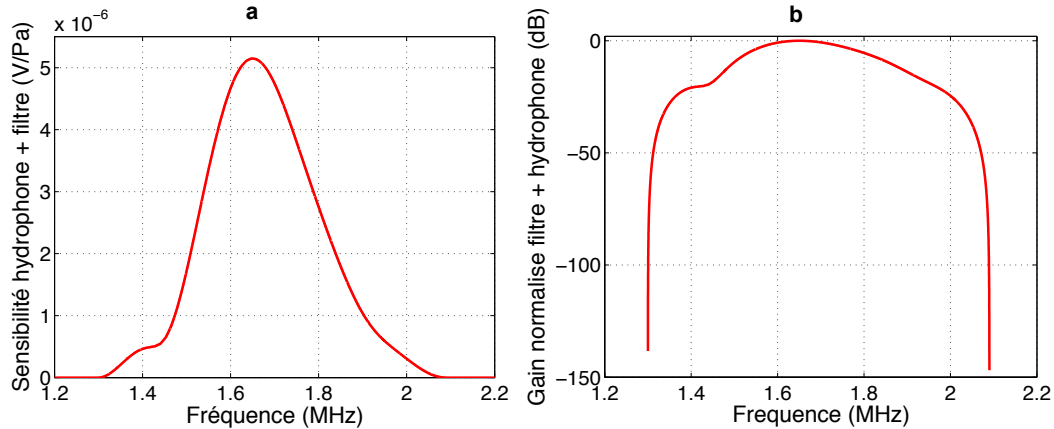


FIGURE 3.7 – (a) Sensibilité de l'ensemble hydrophone et filtre de Hann en V/Pa dans le domaine fréquentiel. (b) Gain normalisé de l'ensemble hydrophone et filtre de Hann en dB dans le domaine fréquentiel. (sensibilité moyenne :  $1,98 \cdot 10^{-6}$  V/Pa ; sensibilité maximum (à 1,648 MHz) :  $5,15 \cdot 10^{-6}$  V/Pa ; bande passante à mi-hauteur : 0,283 MHz ; bande passante à 10 dB : 0,363 MHz ; bande passante à 30 dB = 0,685 MHz)

Par ailleurs, un seuil bas de bruit est ajouté de façon à éliminer les bruits parasites qui peuvent fausser la dose de cavitation, comme nous l'avons mentionné précédemment. Ce seuil de bruit bas a été ajusté en situation expérimentale avec des intensités 20 fois plus faibles que celles nécessaires à induire de la cavitation et en utilisant de l'eau fraîchement dégazée pour remplir l'échantillon de mesure et la cuve. Des paramètres ultrasonores différents (FR, DC) ainsi que des calibres de mesure différents ont été testés. Ce seuil a été ajusté de façon à obtenir une dose de cavitation nulle (5 chiffres après la virgule nuls en mV.s soit 8 chiffres après la virgule nuls en V.s) après 2 min d'insonification ne générant pas de cavitation. Ce seuil dépend du calibre d'entrée sur la carte d'acquisition du signal de l'hydrophone (paramètre "rangeacq" ajustable via le fichier de configuration). Pour rangeacq = 0,5 V, 1 V, 2 V, 5 V le seuil est respectivement de 0,0003 mV.s, 0,00057 mV.s, 0,001 mV.s, 0,0025 mV.s.

De nombreux tests ont été effectués pour ajuster tous les paramètres au mieux. Par exemple, l'influence sur la dose de cavitation d'un filtrage par "paquets de données" plus ou moins grands a été étudiée numériquement tout comme l'influence de la largeur du fenêtrage. Ces deux tests ont montré, que dans les plages de valeurs utilisées, ces paramètres n'avaient aucune incidence sur la dose de cavitation. De nombreux tests pour

optimiser le programme de façon à pouvoir sauvegarder les données, calculer la dose de cavitation et afficher le signal filtré en temps réel (c.f figure 3.8) ont été effectués.

Par rapport à l'ancien dispositif, ce système apporte un meilleur contrôle de l'acquisition de la dose de cavitation et une grande flexibilité, le filtrage et de nombreux paramètres pouvant être, au besoin, ajustés.

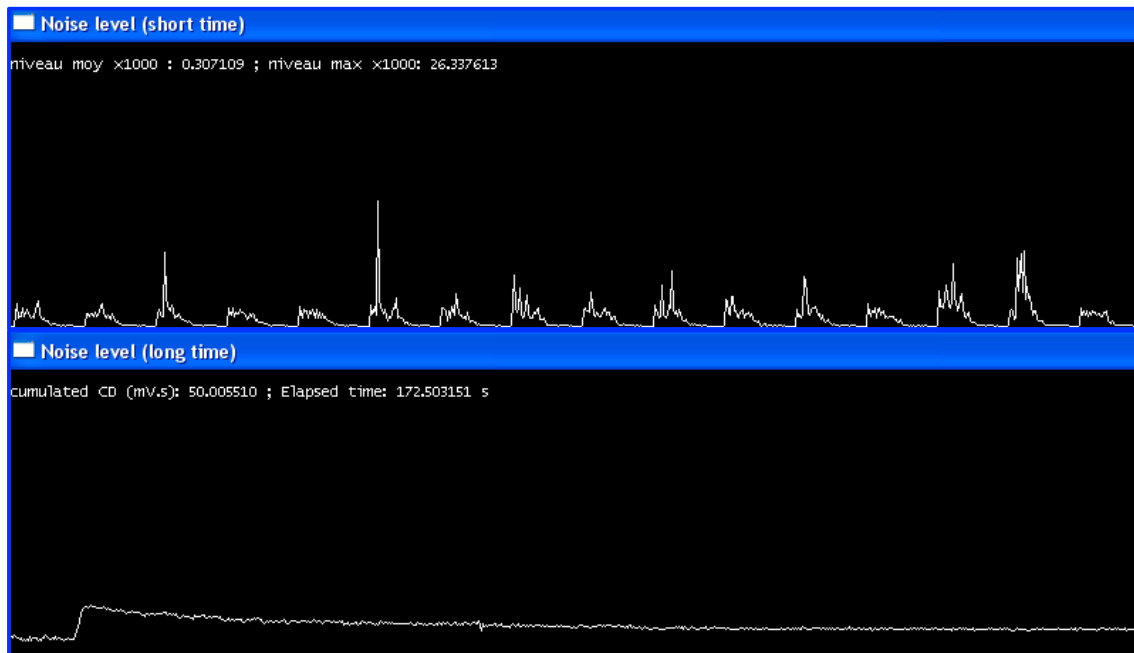


FIGURE 3.8 – Affichage du bruit instantané filtré (fenêtre du haut) et du niveau de bruit moyen filtré sur toute la période d'insonification écoulée (fenêtre du bas). La dose de cavitation (ici CD pour cavitation dose en anglais) est affichée en temps réel ainsi que le temps écoulé et le niveau de bruit minimum et maximum atteint pendant l'expérience. Exemple sous la condition d'insonification suivante :  $I_{sppa} = 5300 \text{ W/cm}^2$ ,  $FR = 1 \text{ kHz}$ ,  $RC = 25 \%$  (condition d'exposition 2b décrite section suivante).

### 3.2.2 Evaluation de la nouvelle dose de cavitation

L'utilisation d'une nouvelle dose de cavitation (NDC), même si elle n'est pas si éloignée de la dose définie au chapitre précédent, requiert une nouvelle validation. De plus, les tests avec le dosimètre téréphthalate, réalisés selon la même méthode qu'au chapitre précédent (c.f 2.3.1.3), permettront de confirmer ou non les variations de la production de radicaux hydroxyles observées avec les paramètres ultrasonores.

Afin de valider le système et permettre une comparaison avec les résultats du chapitre précédent, trois conditions d'irradiations à intensités fixes, que nous nommerons respectivement 1b, 2b, 3b, sont sélectionnées parmi les jeux de paramètres 1, 2, 3 précédents :

- ◇ 1b.  $I_{sppa} = 5700 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 13 \text{ Mpa}$ ,  $FR = 200 \text{ Hz}$ ,  $RC = 25 \%$  ( $I_{spta} = 1425 \text{ W/cm}^2$ ,  $durée_{on} = 1,25 \text{ ms}$ )
- ◇ 2b.  $I_{sppa} = 5300 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 12,8 \text{ Mpa}$ ,  $FR = 1 \text{ kHz}$ ,  $RC = 25 \%$  ( $I_{spta} = 1325 \text{ W/cm}^2$ ,  $durée_{on} = 0,25 \text{ ms}$ )
- ◇ 3b.  $I_{sppa} = 12000 \text{ W/cm}^2$  correspondant à  $p_{pic} = 19 \text{ Mpa}$ ,  $FR = 200 \text{ Hz}$ ,  $RC = 5 \%$  ( $I_{spta} = 600 \text{ W/cm}^2$ ,  $durée_{on} = 0,25 \text{ ms}$ )

L'intensité est fixée car nous avons pu voir dans le chapitre précédent que cette dernière n'avait pas d'influence sur la dose de cavitation. Les essais ont été réalisés sur plusieurs jours de façon à déterminer la reproductibilité des expériences (c.f table 3.9). Tout d'abord, l'influence de la largeur du fenêtrage a été évaluée pour les trois conditions d'irradiation. Il convient en effet de prendre en compte toute l'activité de cavitation même au delà de la durée de l'excitation ultrasonore (durée "on"). En effet, ne connaissant pas l'impact des vibrations résiduelles du transducteur ultrasonore après l'arrêt de l'excitation, il est nécessaire de vérifier si la largeur de fenêtrage par défaut est suffisante. Pour étudier l'influence de la largeur du fenêtrage, nous avons ajusté la valeur de *grand\_acq* (qui est par défaut de 1,1) à sa valeur maximale permettant d'éviter des pertes de données par le système durant l'acquisition. Suivant les paramètres testés, cette valeur maximale de *grand\_acq* est de 2, 2, 1 et 10 (pour les paramètres 1b, 2b, 3b respectivement).

Trente six échantillons de TA à différentes doses de cavitation ont été insonifiés sur plusieurs jours dans ces conditions. Ensuite, trente six échantillons de plus ont été insonifiés avec la valeur par défaut de *grand\_acq*. Les résultats obtenus dans les deux cas sont statistiquement identiques (test d'Anova comparant deux à deux les groupes de facteur *grand\_acq* différents validé pour chaque DC). La valeur du paramètre *grand\_acq* par défaut est par conséquent conservée et les résultats obtenus pour l'ensemble des valeurs de ce paramètre peuvent être assemblées. L'analyse des résultats suivant les conditions d'exposition se fera ainsi sur un plus grand nombre d'échantillons.

Observons maintenant les concentrations de HTA produites en fonction de la NDC (c.f figure 3.10). Tout comme au chapitre précédent, une croissance des variances est observée avec l'augmentation de la dose de cavitation pour chaque paramètre. Une transformation des données par une fonction logarithme Népérien permet d'uniformiser la variance des relevés pour chaque NDC. Cette opération revient, en linéaire, à appliquer un modèle de régression puissance.

Les résultats ont montrés, pour chaque ensemble de paramètres, une bonne homogénéité des variances (test de Levene), une normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk) et une excellente corrélation entre la concentration de HTA et la NDC (voir table 3.9 et figure 3.10 a). Les coefficients d'ajustement de la courbe de régression pour chaque condition d'exposition sont hautement significatifs, ce qui valide le modèle de régression utilisé (paramètre p du test de student  $< 0,0001$ ).

	Paramètres US	Nombre de données	Nombre de jours d'expérience	Equation de la courbe de Régression	R <sup>2</sup>	Paramètre p du test de Levène (égalité des variances)	Paramètre p du test de Shapiro-Wilk (normalité des résidus)
1	200 Hz, 25 % (1,25 ms) 4000-6400 W/cm <sup>2</sup>	41	5	$C_{HTA}=0,0034 (CD)^{0,83}$	0,99	0,11	0,75
2	1 kHz, 25 % (0,25 ms) 4000-6400 W/cm <sup>2</sup>	16	4	$C_{HTA}=0,0016 (CD)^{0,89}$	0,97	0,93	0,31
3	200 Hz, 5 % (0,25 ms) 9500-12000 W/cm <sup>2</sup>	28	2	$C_{HTA}=0,0023 (CD)^{0,90}$	0,97	0,28	0,47
1b	200 Hz, 25 % (1,25ms) 5700 W/cm <sup>2</sup>	25	4	$C_{HTA}=0,1559 (CD)^{0,89}$	0,99	0,15	0,40
2b	1 kHz, 25 % (0,25 ms) 5300 W/cm <sup>2</sup>	27	4	$C_{HTA}=0,1571 (CD)^{0,89}$	0,99	0,05	0,16
3b	200 Hz, 5 % (0,25 ms) 12000 W/cm <sup>2</sup>	20	4	$C_{HTA}=0,235 (CD)^{0,91}$	0,99	0,82	0,91

FIGURE 3.9 – Tableau récapitulatif des tests de téréphthalate effectués avec l'ancien dispositif et le nouveau dispositif à température ambiante.

La NDC est donc pleinement représentative de la cavitation inertielle pour les trois conditions d'irradiation testées et est par conséquent validée comme indicateur de la cavitation inertielle.

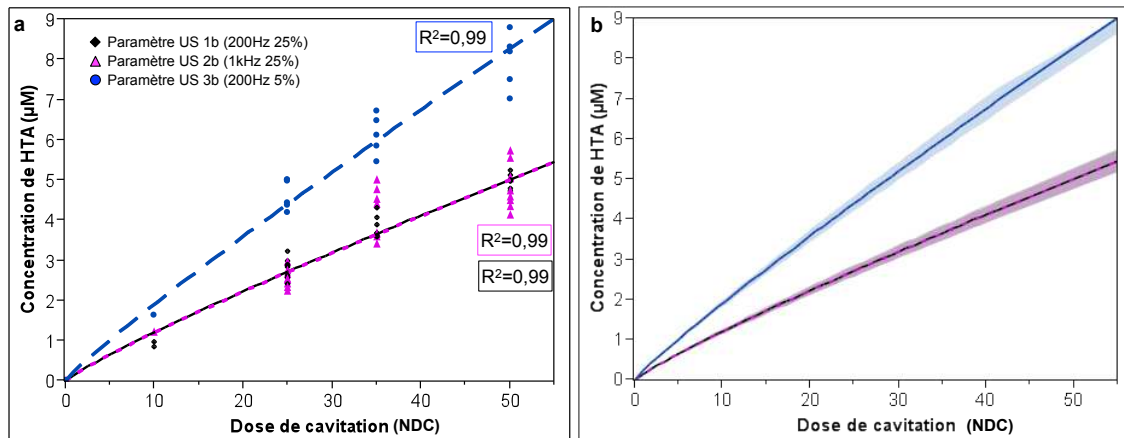


FIGURE 3.10 – (a) et (b) : Concentration de HTA à différentes doses de cavitation pour les 3 conditions d'irradiation testées (1b, 2b, 3b). (b) Intervalles de confiance à 95% pour chaque condition testée.

Par ailleurs, les intervalles de confiance à 95% ont été calculés pour chacune des conditions d'exposition (c.f figure 3.10 b). Ces intervalles permettent de conclure que la condition d'exposition 3b est significativement différente des deux autres. Cependant les conditions 1b et 2b ont des niveaux de concentrations de HTA identiques avec un recouvrement total des courbes et intervalles de confiance. Seule la variabilité des concentrations obtenues pour la condition d'exposition 2b aux doses 35 et 50 est plus importante que la variabilité de la condition 1b. Mis à part ce point, illustré par la valeur

faible du paramètre de Levène pour 2b (c.f tableau 3.9), les conditions d'expositions 1b et 2b induisent des résultats similaires.

Ces résultats diffèrent des résultats obtenus dans le chapitre précédent, pour lesquels les trois jeux de paramètres testés étaient significativement distincts. Les paramètres 1b et 2b ont des FR différentes (200 Hz et 1000 Hz respectivement), leur RC sont identiques et leur  $I_{spta}$  quasi identiques. Ils ont par conséquent le même nombre de cycles par unité de temps ( $1cycle = 1sinusoïde$ ) et la même énergie par unité de temps. Trouver une concentration de HTA identique, à **dose de cavitation constante**, pour des paramètres induisant la même énergie par unité de temps dans le milieu et ayant des RC identiques est loin d'être aberrant et semble même plutôt logique. Il est pourtant difficile de savoir si c'est ce résultat qui représente la réalité.

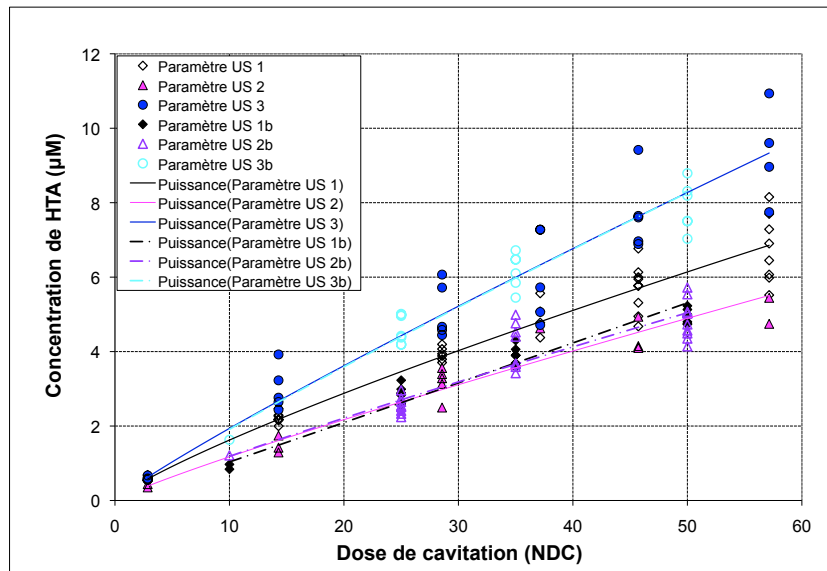


FIGURE 3.11 – Superposition des courbes de concentration de HTA en fonction de la nouvelle dose de cavitation (NDC) pour les jeux de paramètres 1, 2, 3 testés avec l'ancien dispositif et les paramètres 1b, 2b, 3b testés avec le nouveau dispositif. Un rapport de conversion  $\gamma_1 = 175$  est appliqué aux paramètres 1, 2, 3 testés dans l'ancien dispositif pour se ramener à la NDC.

Pour tenter d'y voir plus clair, nous allons superposer les résultats de la NDC (conditions d'exposition 1b, 2b, 3b) avec ceux de la DC obtenus au chapitre précédent (jeux de paramètres 1,2,3). Pour ce faire, l'ancienne DC est divisée par un coefficient de conversion  $\gamma_1$  pour obtenir la NDC. Ce coefficient est ajusté jusqu'à obtenir la meilleure superposition des courbes (valeurs de  $C_{HTA}$ , pentes...). Cette dernière est obtenue pour  $\gamma_1 = 175$  ( $\pm 5$ ) (voir figure 3.11). Sur la figure 3.11, on peut voir que les courbes des paramètres US 2 et 2b, 3 et 3b se superposent. Par contre, les courbes des conditions d'exposition 1 et 1b sont très différentes, avec une concentration de HTA nettement plus élevée pour 1 que pour 1b. Ces conditions d'exposition ont une FR de 200 Hz et un RC de 25% cor-

respondant à une durée "on" de 1,25 ms contre 0,25 ms pour les autres conditions. On peut se poser la question de l'origine des différences observées entre les deux dispositifs pour ces paramètres.

Une possibilité serait qu'il y aurait plus de bruit généré pour les tests avec le paramètre 1 (dans l'ancien dispositif) qu'avec les autres paramètres car ils ont une durée d'insonification 5 fois plus longue. L'ancien système n'ayant pas de seuil bas de bruit contrairement au nouveau système et étant plus susceptible d'accumuler du bruit (bruits parasites dans le filtre analogique par exemple), les différences pourraient provenir de là.

Voyons l'influence de cette hypothèse sur la production de HTA. Si du bruit parasite était accumulé en plus du bruit de cavitation sur l'ancien dispositif, la DC cible serait atteinte avant qu'elle ne soit représentative de la concentration de radicaux libres. On aurait donc une sous-estimation de la concentration de HTA. Or, cette dernière est plus élevée dans l'ancien système que dans le nouveau système pour le paramètre considéré. Cette hypothèse ne peut donc être validée.

Ces différences peuvent aussi simplement provenir de la forme de la fonction de transfert appliquée au signal pour filtrer et qui n'est pas la même dans les 2 cas. La fonction de transfert du filtre analogique couplée avec celle de l'hydrophone est dissymétrique et non centrée sur l'intervalle  $f_0-2f_0$  avec son maximum à 1,56 MHz au lieu du milieu de l'intervalle qui est de 1,695 MHz (voir figure 2.3). La fonction de transfert du système numérique (filtre + hydrophone) a son maximum à 1,648 MHz, elle est donc quasiment centrée en plus d'être quasiment symétrique (c.f figure 3.7). La dissymétrie de l'ancien filtre pourrait être une source d'erreur si les signaux générés par ce paramètre ultrasonore en particulier sont dissymétriques sur la bande filtrée ou présentent des ultraharmoniques particuliers. Une étude des signaux permettrait d'y voir plus clair et sera réalisée ultérieurement. Pour le moment, il n'est pas possible de conclure sur l'origine des différences constatées. Nous pouvons simplement dire qu'il existe une très haute corrélation entre la concentration de HTA et la NDC pour chacun des paramètres testés.

### 3.3 Libération de doxorubicine encapsulée

Nous allons dans cette section appliquer la NDC au suivi du largage de liposomes. Nous allons tout particulièrement nous intéresser à l'impact des 3 paramètres ultrasonores utilisés dans la section précédente sur la libération de doxorubicine encapsulée. La formulation de liposomes testée dénommée "Epi1.12D" est une des dernières formulations mise au point par nos partenaires, elle est *a priori* très sensible aux ultrasons. Pour chaque condition d'exposition, les tests sont effectués sur trois jours différents. Le modèle de régression non linéaire décrit section 2.4.2 et d'équation 2.3 est appliqué aux résultats de chaque paramètre. Avec ce modèle, une excellente corrélation ( $> 0,98$ ) est trouvée entre la NDC et le taux de largage de doxorubicine (voir figure 3.12 b). De plus,

les tests d'égalité des variances et de normalité des résidus sont validés.

Les paramètres ultrasonores utilisés ont été validés par le dosimètre téréphthalate et sont donc représentatifs de la cavitation inertielle. On peut conclure que le taux de largage de doxorubicine est induit principalement par la cavitation inertielle. Ces résultats obtenus avec la NDC confirment ceux obtenus avec la DC précédente.

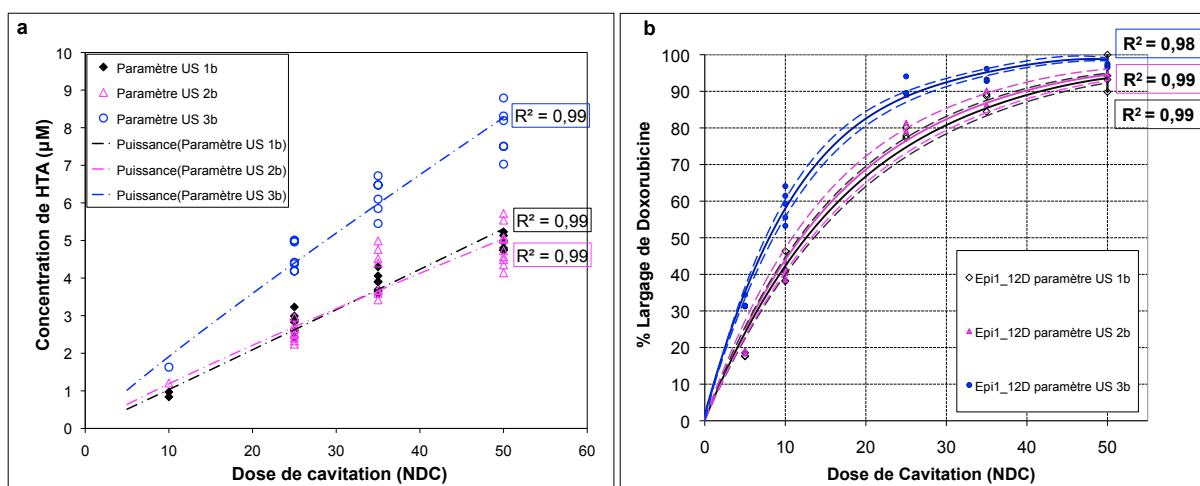


FIGURE 3.12 – Comparaison du largage de doxorubicine de la formulation "Epi1.12D" pour les paramètres ultrasonores 1b, 2b, 3b avec les concentrations de HTA obtenues pour ces mêmes paramètres ultrasonores. (a) Concentration de HTA en fonction de la NDC pour les 3 paramètres ultrasonores testés. (b) Taux de largage de doxorubicine de la formulation "Epi1.12D" en fonction de la NDC pour les 3 paramètres ultrasonores.

Comparons maintenant les taux de largage de dox associés à chacune des conditions d'insonification. Les résultats présentés figure 3.12 (b) avec les intervalles de confiance à 95% montrent que l'on a un taux de largage de doxorubicine significativement plus important pour la condition 3b en comparaison avec les deux autres conditions d'exposition. De plus, le taux de largage de dox sous l'action des paramètres ultrasonores 1b et 2b sont statistiquement les mêmes, vu que les intervalles de confiance se recoupent. Ces résultats sont confirmés par le calcul du coefficient  $\alpha$  de l'équation des trois courbes de largages qui ont respectivement pour valeur (18,  $18 \pm 0,65$ ), (17,  $26 \pm 0,80$ ), (11,  $53 \pm 0,34$ ) pour les paramètres 1b, 2b, 3b. En effet, les coefficients  $\alpha$  des paramètres 1b et 2b se recoupent en tenant compte de l'erreur approchée sur le calcul des coefficients. L'analyse des résultats montre que le taux de largage de doxorubicine encapsulée dans la formulation "Epi1.12D" est lui aussi influencé par les conditions d'insonification. De plus, les tendances de variations avec les paramètres ultrasonores du taux de largage de dox encapsulé sont les mêmes que pour la production de radicaux hydroxyles, ce que l'on peut aisément comparer sur les figures 3.12(a) et (b). Ces résultats vont dans le sens d'une bonne représentativité de la cavitation inertielle et de ses effets par la NDC.

Pour estimer la sono-sensibilité de la formulation "Epi1\_12D" comparativement avec les formulations testées jusqu'ici, des tests avec la NDC sont effectués sur les liposomes Caelyx<sup>®</sup> que nous utilisons comme référence. Ces tests sont réalisés avec la même condition d'exposition que les tests réalisés sur le Caelyx dans l'ancien dispositif (appartenant au jeu de paramètres 1) à savoir  $I_{sppa} = 4880 \text{ W/cm}^2$ ,  $FR = 200 \text{ Hz}$ ,  $RC = 25 \%$  (correspondant à une  $I_{sppa} = 1220 \text{ W/cm}^2$ ). Le modèle de régression habituel est appliqué avec un coefficient  $\alpha$  de  $89, 29 \pm 4, 11$ . Là encore, tous les tests statistiques sont vérifiés et la corrélation entre le taux de largage et la NDC est très élevée ( $R^2 = 0,95$ ). La courbe des taux de largage du Caelyx<sup>®</sup> en fonction de la NDC est superposée avec celle obtenue dans l'ancien dispositif (c.f figure 3.13 a) afin de trouver le facteur de conversion entre l'ancienne DC et la NDC. Ce facteur  $\gamma_2$  est de 120,5. En calculant directement  $\gamma_2$  par division de  $\alpha_{Caelyx}$  pour l'ancienne dose et pour la nouvelle, une valeur de 120,66 est très exactement obtenue.

Ce facteur de conversion, appliqué à la formulation "Epi" testée avec l'ancienne DC permet de comparer simultanément le taux de largage de la formulation "Epi", "Epi1\_12D" et Caelyx<sup>®</sup> sur le graphique 3.13 (b), ces formulations ayant toutes été insonifiées avec des conditions d'expositions appartenant au jeu de paramètre 1. Il en ressort que la dernière formulation testée est bien plus sono-sensible que la formulation "Epi", qui elle même l'est bien plus que la formulation Caelyx<sup>®</sup>. Ceci peut être aussi déduit du coefficient  $\alpha$  qui représente la dose de cavitation moyenne nécessaire pour libérer le médicament encapsulé dans un liposome de la dispersion liposomale sous ultrasons et dont la valeur est d'autant plus petite que la sono-sensibilité est grande pour chacune de ces formulations ( $\alpha_{Epi1_12D} = 18, 18$ ,  $\alpha_{Epi} = 39, 62$ ,  $\alpha_{Caelyx} = 89, 29$ ).

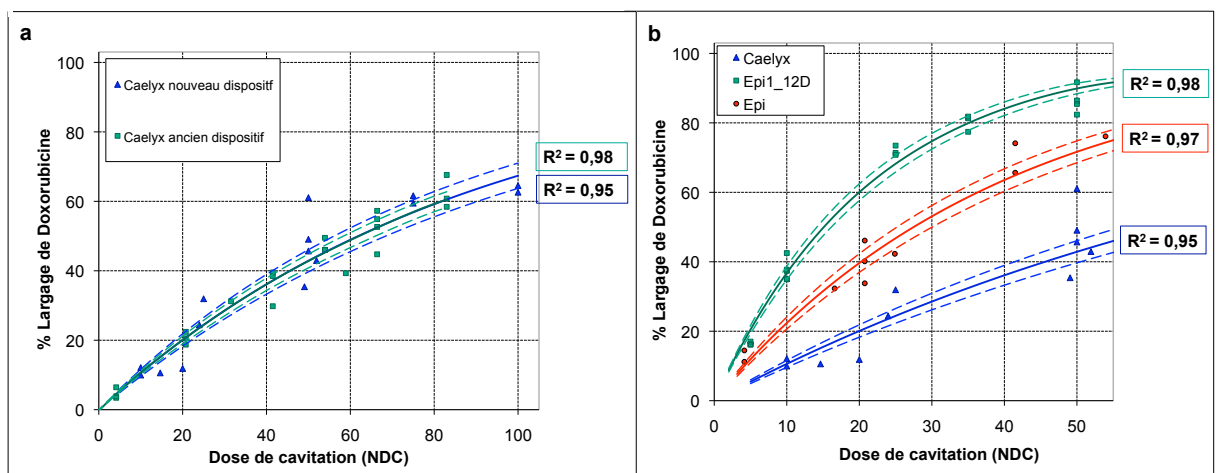


FIGURE 3.13 – (a) Superposition des courbes de libération de doxorubicine en fonction de la NDC pour la formulation Caelyx<sup>®</sup> dans l'ancien et le nouveau dispositif. La condition d'exposition utilisée est :  $I_{sppa} = 4880 \text{ W/cm}^2$ ,  $FR = 200 \text{ Hz}$ ,  $RC = 25 \%$  (appartient au jeu de paramètres 1). (b) Comparaison de la libération de doxorubicine en fonction de la NDC pour 3 formulations : Caelyx<sup>®</sup> et "Epi1\_12D" dans le nouveau dispositif, "Epi" dans l'ancien dispositif.



Remarquons que le facteur de conversion  $\gamma_2$  (120,66) trouvé en comparant les taux de largage de dox des liposomes de l'ancien système et du nouveau, est différent du facteur de  $\gamma_1$  (175) obtenu en comparant les concentrations de HTA produite dans l'ancien et le nouveau système. Les tests sur les liposomes ont "malheureusement" été effectués avec la condition d'exposition 1b (ou une autre condition d'exposition appartenant au jeu de paramètres 1) pour permettre une comparaison avec l'ancien système. Or, les concentrations de HTA obtenues avec cette condition d'exposition dans l'ancien système (après conversion de DC en NDC) ne sont justement pas les mêmes que celles obtenues dans le nouveau système comme nous l'avons vu dans la section précédente. La différence entre les facteurs de conversion  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  pourraient donc provenir de cette écart.

### 3.4 Influence de la température

Dans le chapitre précédent, nous avons supposé une influence de la température de l'échantillon sur la concentration de HTA après insonification et par conséquent sur production de radicaux libres. Cette supposition est basée sur l'analyse de la littérature à ce sujet (c.f 2.3.3.3). De plus, la cavitation en général dépend de la température (dynamique de la bulle, variation du taux de gaz dissous....) et par conséquent de la production de radicaux libres.

Dans cette section, nous allons en premier lieu étudier l'influence de la température sur la concentration de HTA dans notre système. Nous nous intéresserons ensuite à l'impact d'un changement de température sur le largage de doxorubicine encapsulée dans des liposomes.

#### 3.4.1 Influence de la température sur la concentration de HTA

Les tests sur le téréphthalate (TA) ont été réalisés en suivant toujours la même méthodologie (décrite section 2.3.1.3). Les températures choisies sont de 10°C, 20°C, 40°C et 55°C. Pour obtenir une température de 10°C l'eau dégazée destinée à la cuve est mise au réfrigérateur pendant 2 jours dans un bidon fermé hermétiquement (et rempli entièrement). Elle est ensuite maintenue à température entre les tests par l'ajout de packs de glace plastifiés. La température de 20°C correspond aux tests réalisés à température ambiante. La cuve est directement remplie avec de l'eau fraîchement dégazée. Comme un nouveau dispositif pour dégazer l'eau est utilisé, il y a très peu de variations de la température de l'eau dégazée produite et utilisée à température ambiante, contrairement à l'ancien dispositif utilisé pour les expériences décrites au chapitre 2. Les expériences à 40°C et 55°C sont réalisées en chauffant préalablement l'eau dégazée à l'aide d'un thermoplongeur et en maintenant ensuite la température à l'aide d'une résistance. Les variations de la température de l'eau de la cuve sont d'environ  $\pm 2^\circ\text{C}$ . Pour des raisons pratiques de chauffage ou de refroidissement du bain, les expériences sont réalisées sur

une journée pour chaque température sauf pour la température ambiante où les tests ont été réalisés sur 2 jours (résultats présentés précédemment).

Tous les tests ont été réalisés en utilisant les conditions d'exposition US 1b pour une dose de cavitation  $NDC = 35$ , à raison de 5 échantillons par température soit 20 échantillons au total. Les résultats obtenus sont présentés figure 3.14.

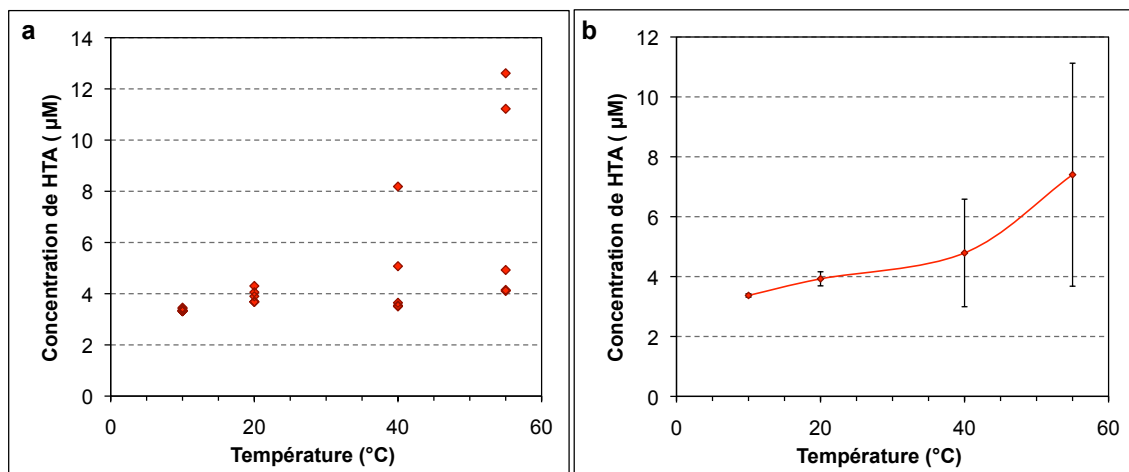


FIGURE 3.14 – Concentrations de HTA formé sous insonification d'une solution de TA pour différentes températures imposées à l'échantillon. Les paramètres ultrasonores 1b sont utilisés pour régler les conditions d'exposition. Une dose de cavitation  $NDC=35$  est atteinte pour tous les échantillons. (a) Ensemble des échantillons testés (b) Moyenne et écart type des concentrations de HTA obtenues pour chaque température.

Si les concentrations de HTA produites à chaque température sont très similaires à 10  $^{\circ}\text{C}$  et 20  $^{\circ}\text{C}$ , on constate une importante dispersion des données à 40  $^{\circ}\text{C}$  et 55  $^{\circ}\text{C}$ . Le calcul de l'écart type (figure 3.14 b) et de l'intervalle de confiance (non représenté) permettent d'affirmer que la concentration de HTA est un peu plus importante à 20  $^{\circ}\text{C}$  qu'à 10  $^{\circ}\text{C}$ . Par contre à 20  $^{\circ}\text{C}$ , 40  $^{\circ}\text{C}$  et 55  $^{\circ}\text{C}$  les écarts types et les intervalles de confiance se recoupent, ce qui ne permet pas de conclure à des différences significatives. On a toutefois une augmentation globale de la moyenne des concentrations de HTA avec la température (voir figure 3.14 b). Il faudrait augmenter le nombre d'échantillons pour confirmer ou non cette tendance. A dose de cavitation fixée, 5 échantillons par température n'est pourtant pas un nombre faible d'échantillons. Il se pourrait qu'une augmentation de température se traduise par une variabilité importante de la concentration de HTA produite voire de la production de radicaux libres.

L'étude effectuée par Miller et al. [MT93]<sup>[1]</sup> à 1,6 MHz commente une augmentation avec la température de la production de radicaux hydroxyles mesurée par le dosimètre TA et

[1] D. L. Miller and R. M. Thomas. A COMPARISON OF HEMOLYTIC AND SONOCHEMICAL ACTIVITY OF ULTRASONIC CAVITATION IN a ROTATING TUBE. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 19(1):83–90, 1993.

de la concentration d'hydrogène peroxyde. Cependant même s'ils ne le mentionnent pas dans le texte, on peut voir sur la figure 3.15 que les écart-types obtenus, en particulier avec le TA sont très importants. Nous ne sommes donc pas les seuls à obtenir ce type de résultats. Les écarts-types et la variabilité n'étant pas toujours indiqués, il est difficile de savoir si c'est le cas ou non dans d'autres études. On peut tout de même se demander si les conditions de maintien de la température, relativement sommaires dans notre système ne sont pas à l'origine de cette variabilité en particulier à 55°C.

En tous cas, cette variation et cette dispersion des concentrations de HTA observées pour différentes températures testées pourraient expliquer la variabilité des concentrations de HTA observée dans les expériences précédentes effectuées à température ambiante (section 3.2.2 et section 2.3).

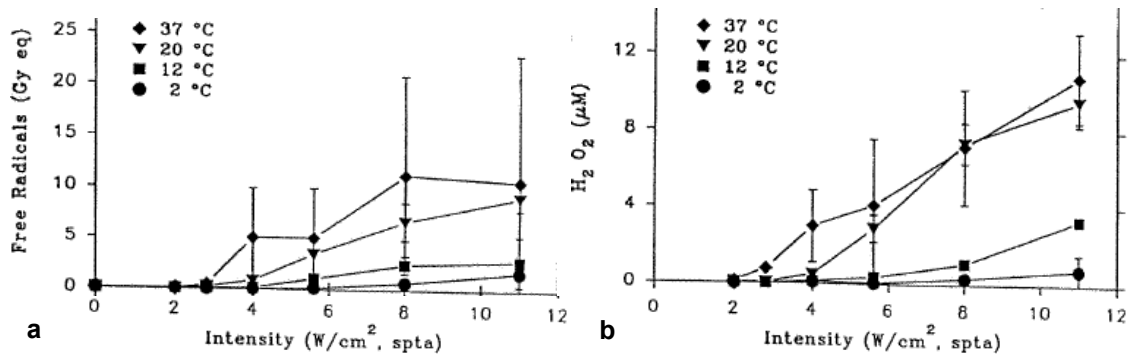


FIGURE 3.15 – Etude de l'influence de la température sur la production de radicaux libres sous insonification continue à 1,6 MHz (transducteur non focalisé) et dans un échantillon tournant à 60 rpm (révolutions par minutes). Les points représentent une moyenne de 4 mesures et les barres d'erreur l'écart type sur ces mesures. (a) Production de radicaux hydroxyles mesurée avec le dosimètre TA exprimée en dose équivalente de rayons gamma. Insonification de 4 min (b) Production d'hydrogène peroxyde calculée à partir de la mesure de l'intensité de sonochemiluminescence d'une solution d'isoluminol. Insonification de 15 min [MT93]

Concernant les tendances de variation de la production de radicaux libres, nous avons discuté dans la section 2.3.3.3 les tendances observées dans la littérature pour des expériences réalisées avec le dosimètre téréphthalate. Ainsi, pour deux études basse fréquence ( $f_0 = 20 \text{ kHz}$ ), il a été constaté une diminution de la quantité de HTA formée avec une augmentation de la température [MLBZ94]<sup>[1]</sup>, [VLB98]<sup>[2]</sup> et à 1,6 MHz la tendance inverse a été observée [MT93]<sup>[3]</sup>. Notre système suit la même tendance que celle observée par Miller et al. pour des intensités pics utilisées pourtant bien supérieures.

- 
- [1] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.
- [2] A Vercet, P Lopez, and J Burgos. Free radical production by manothermosonication. *ULTRASONICS*, 36(1-5):615–618, February 1998.
- [3] D. L. Miller and R. M. Thomas. A COMPARISON OF HEMOLYTIC AND SONOCHEMICAL ACTIVITY OF ULTRASONIC CAVITATION IN A ROTATING TUBE. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 19(1):83–90, 1993.

De plus, une toute nouvelle étude réalisée par De Bel et al. montre une augmentation avec la température de la dégradation du ciprofloxacine (antibiotique) dans l'eau due à l'oxydation par les radicaux hydroxyles sous une insonification à 544 kHz [BJS<sup>+</sup>11]<sup>[4]</sup>. Aussi, on peut se demander si ce n'est pas la fréquence d'insonification qui changerait les tendances de variations de la production de radicaux libres avec la température. A température ambiante, il a été constaté que la production de radicaux libres était fortement influencée par la fréquence d'insonification. Petrier et al. montrent [PJR92]<sup>[5]</sup> que la formation de radicaux hydroxyles et d'hydrogène peroxyde est bien plus importante et plus rapide à 514 kHz qu'à 20 kHz dans des solutions saturées en hydrogène ou Argon. Ils expliquent ce phénomène par le fait qu'à haute fréquence (ici 514 kHz) l'implosion de la bulle libère moins d'énergie et se produit plus rapidement. A haute fréquence, les radicaux hydroxyles peuvent du coup être éjectés de la bulle avant de subir une quelconque réaction et sont donc disponibles pour oxyder une solution comme le TA. Par contre à basse fréquence, les radicaux libres peuvent réagir à l'intérieur de la bulle pour former par exemple de l'oxygène ; moins de radicaux hydroxyles sont alors éjectés dans la solution.

Essayons de comprendre ce qui se passe avec la température. De Bel et al. [BJS<sup>+</sup>11]<sup>[4]</sup> fournissent une explication claire basée sur littérature que nous allons reprendre ici (voir l'article [BJS<sup>+</sup>11]<sup>[4]</sup> pour les références concernant chaque phénomène décrit). La température de l'échantillon affecte de nombreux facteurs tels que la pression de vapeur, la viscosité, la solubilité du gaz et la tension de surface. D'un côté, la température de l'eau augmente la pression de vapeur du solvant. Par conséquent, les bulles de cavitation contiennent plus de vapeur d'eau et l'implosion de la bulle est moins violente ("effet coussin"). La température induite par l'implosion est donc plus faible et par conséquent la production de radicaux libres l'est aussi. D'un autre côté, l'augmentation de la température induit une réduction de la viscosité et de la tension de surface, ce qui diminue les seuils d'intensités nécessaires pour produire de la cavitation. Ce qui aurait pour effet d'augmenter le nombre de bulles cavitantes et donc la production de radicaux libres. De plus, la température augmente les vitesses de réaction des radicaux hydroxyles avec les autres espèces présentes en solution. La tendance de variation de la production de radicaux libres avec la température dépend donc de la prépondérance du premier phénomène décrit ou des deux derniers évoqués sans compter que d'autres phénomènes peuvent intervenir. L'effet de la température sur la production de radicaux libres est donc un processus compliqué et l'on peut imaginer que la fréquence d'insonification ainsi que d'autres facteurs expérimentaux peuvent inverser les tendances de variations.

---

[4] Evelien De Bel, Colin Janssen, Sanne De Smet, Herman Van Langenhove, and Jo Dewulf. Sonolysis of ciprofloxacin in aqueous solution: influence of operational parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1):184–189, January 2011. PMID: 20627656.

[5] Christian Petrier, Andre Jeunet, Jean Louis Luche, and Gilbert Reverdy. Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*, 114(8):3148–3150, 1992.

### 3.4.2 Influence de la température sur la libération de doxorubicine liposomale

Nous allons maintenant nous intéresser au largage de doxorubicine encapsulée dans des liposomes suivi par la NDC et dans les mêmes conditions de température que celles décrites dans la section précédente à savoir 10°C, 20°C, 40°C, 55°C.

Les liposomes testés sont ceux de la formulation "Epi1\_12D" qui ont été testés à température ambiante (c.f 3.3). Ces liposomes ne sont pas thermosensibles. Des tests d'incubation en diluant les liposomes au 1/500 dans du sucrose ou du sérum 20% ont été réalisés à 44°C et à 60°C. Aucun largage de doxorubicine n'est observé pour tous les tests effectués après 1 heure d'incubation. Ils sont de plus très stables car ils libèrent au maximum 3% de doxorubicine après 1 mois d'incubation à 25°C.

Au total, 60 échantillons sont insonifiés et les conditions d'expériences sont résumées tableau 3.16. Les résultats sont présentés figure 3.17 et tableau 3.16.

Le modèle de courbe de régression d'équation 2.3 défini section 2.4.2 pour les liposomes

Température (°C)	Paramètres US	Nombre de données	Nombre de jours d'expérience	$\alpha$	$\Delta\alpha$ (incertitude)	R <sup>2</sup>	Paramètre p du test de Shapiro-Wilk
10	1b (200 Hz 25 % 5700 W/cm <sup>2</sup> )	12	1	32,82	2,05	0,96	0,36
20	1b	18	3	18,18	0,65	0,98	0,65
40	1b	15	1	10,94	0,61	0,97	0,22
55	1b	15	1	5,78	0,34	0,93	0,9

FIGURE 3.16 – Données expérimentales et paramètres statistiques des tests effectués sur les liposomes "Epi1\_12D" à différentes températures.

est toujours appliqué. En premier lieu, pour chacune des températures testées, il y a une très bonne corrélation (pour 55°C et 10°C) voire une excellente corrélation (pour 20°C et 40°C) entre la NDC et le pourcentage de doxorubicine libéré. Les tests statistiques révèlent que les variances sont homogènes et que les résidus sont normaux pour chacune des températures (c.f test de shapiro-Wilk tableau 3.16). Les intervalles de confiance à 95% représentés figure 3.17 permettent d'affirmer que le largage est significativement et statistiquement différent pour chacune des températures testées à dose de cavitation égale. De plus, les intervalles de confiance relativement fins montrent que ces résultats sont fiables même pour un nombre d'échantillons peu élevé testé par température. Par conséquent, on peut conclure avec certitude qu'il y a une augmentation du taux de doxorubicine libérée avec la température imposée à l'échantillon. Cette augmentation est illustrée par le coefficient  $\alpha$  de chaque courbe de régression qui diminue avec la température 3.16, montrant que la sono-sensibilité des liposomes augmente avec cette dernière.

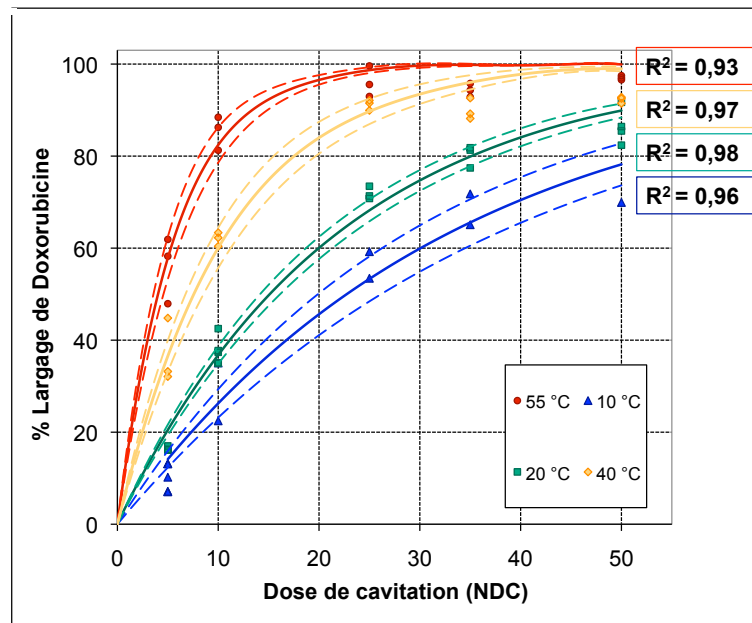


FIGURE 3.17 – Taux de largage de doxorubicine des liposomes de la formulation "Epi1.12D" en fonction de la NDC pour différentes températures imposées à l'échantillon (température de l'eau dégazée de la cuve à 10°C, 20°C, 40°C ou 55°C).

Pourtant les liposomes testés ne sont pas thermosensibles comme nous l'avons démontré précédemment pour des températures testées allant jusqu'à 60°C. Par contre, il se peut que l'augmentation de la température induite par la cavitation inertielle pour les échantillons initialement à 40°C ou 55°C puissent occasionner un largage par température. Globalement, l'élévation de température constatée dans un échantillon à température ambiante pour les paramètres ultrasonores utilisés est de l'ordre de 10-12°C. Il semble donc peu probable, en particulier à 40°C, qu'il y ait une libération importante de doxorubicine due uniquement à la température dans l'échantillon.

Il serait par contre possible qu'il y ait une fragilisation de la membrane avec l'augmentation de la température, la rendant plus sensible aux nombreux effets engendrés par la cavitation susceptibles de l'altérer tels que les forces de cisaillement, les radicaux libres, les microcourants, etc (voir section 1.4).

D'autres mécanismes qui seraient plus importants avec la température à dose de cavitation égale pourraient être impliqués. Bien entendu, nous avons constaté dans la section précédente une augmentation moyenne de la concentration de HTA et supposément de la quantité de radicaux hydroxyles produite avec la température. Une dégradation de la membrane par les radicaux hydroxyles associée avec les forces de cisaillement pourrait être un des mécanismes de largage impliqué (c.f 1.4.3.2 §Radicaux libres). Dans ce cas, l'augmentation de la production de radicaux hydroxyles avec la température augmenterait le largage.

Une augmentation du nombre de bulles de cavitation mais implosant de façon moins

violente, comme nous l'avons mentionné précédemment, pourrait aussi être à l'origine de l'augmentation du largage. Si les bulles implosent de façon moins violente, la vitesse de l'effondrement de la paroi de la bulle est moins importante. Or cet effondrement est supposé être à l'origine de l'émission du bruit large bande. Il y aurait donc moins de bruit large bande émis par chaque bulle mais plus de bulles. La présence de plus de bulles de cavitation peut augmenter plusieurs mécanismes potentiels de largage. Premièrement, les bulles oscillants près des parois des liposomes peuvent créer des pores dans la paroi induisant la libération du médicament. Deuxièmement, lorsque des bulles implosent au sein d'un nuage de bulle, les ondes de choc émises peuvent agir sur de plus longues distances qu'une onde choc émise par une bulle isolée. Ainsi, le largage peut-être augmenté si les ondes de choc permettent de libérer la doxorubicine en "cisillant" la paroi des liposomes. Globalement, un nombre plus important de bulles oscillant et implosant augmenterait les interactions possibles avec les liposomes ainsi que les forces de cisaillement, les microcourants, les forces de Bjerknes, tout ces mécanismes étant susceptibles d'induire la libération de médicament encapsulé comme nous avons pu le voir section 1.4.

### 3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons validé une nouvelle dose de cavitation basée sur un filtrage numérique qui permet un plus grand contrôle et une plus grande flexibilité dans l'acquisition de la dose de cavitation.

Globalement les résultats obtenus à température ambiante sont similaires à ceux obtenus avec l'ancienne DC. Seules les concentrations de HTA obtenues pour une des trois conditions d'exposition ultrasonore testées diffèrent de l'ancien système. Le rôle prédominant de la cavitation inertielle dans la libération de doxorubicine encapsulée dans les formulations anciennement testées et dans d'autres formulations est confirmé. Les trois conditions d'expositions précédentes ont été appliquées sur des liposomes et montrent des tendances de variation similaires de la libération de doxorubicine encapsulée à celles des concentrations de HTA produites sous ces mêmes conditions d'exposition.

L'influence de la température imposée à l'échantillon sur la concentration de HTA et la libération de doxorubicine encapsulée dans des liposomes non thermosensibles a été étudiée. Les résultats montrent une augmentation moyenne de la concentration de HTA avec la température mais une très grande variabilité des concentrations pour les plus hautes températures. Ces résultats, qui sont comparables à ceux obtenus dans la littérature pour de hautes fréquences d'insonification, peuvent expliquer la variabilité des concentrations de HTA obtenues à température ambiante pour les hautes doses de cavitation. Pour ce qui est de la libération de doxorubicine encapsulée, cette dernière augmente fortement avec la température à dose de cavitation égale. Les mécanismes

possiblement impliqués dans cette augmentation de la libération de doxorubicine avec la température ont été discutés.

Afin de recueillir plus d'informations sur les mécanismes potentiellement impliqués dans les variations de concentration de HTA et la libération de doxorubicine sous diverses conditions d'exposition ultrasonores et pour différentes températures, un post-traitement spectral des signaux bruts enregistrés avec ce système sera effectué.





## Chapitre 4

# Campagne d'expériences *in vivo* avec la première génération de liposomes

### Sommaire

---

<b>4.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>122</b>
<b>4.2</b>	<b>Etude de sensibilité à la doxorubicine du modèle tumoral</b>	<b>122</b>
4.2.1	Modèle tumoral	122
4.2.2	Etude <i>in vitro</i>	123
4.2.2.1	Matériel et méthodes	123
4.2.2.2	Résultats et discussion	124
4.2.2.3	Conclusion	125
4.2.3	Etude <i>in vivo</i>	126
4.2.3.1	Matériel et méthodes	126
4.2.3.1.1	Matériel et animaux	126
4.2.3.1.2	Méthodes	127
4.2.3.2	Résultats et discussion	129
4.2.3.3	Conclusion	130
<b>4.3</b>	<b>Première étude de bio distribution</b>	<b>131</b>
4.3.1	Introduction	131
4.3.2	Etude préliminaire	131
4.3.2.1	Matériel et Méthodes	131
4.3.2.2	Résultats et discussion	133
4.3.2.3	Conclusion	134
4.3.3	Etude principale de cinétique sanguine et de bio distribution	134
4.3.3.1	Matériel et Méthodes	134
4.3.3.2	Résultats et discussion	136

4.3.3.2.1	Clairance de distribution . . . . .	136
4.3.3.2.2	Bio distribution dans les organes . . . . .	137
4.3.4	Conclusion . . . . .	139
<b>4.4</b>	<b>Seconde étude de bio distribution . . . . .</b>	<b>140</b>
4.4.1	Matériel et méthodes . . . . .	140
4.4.2	Résultats et discussion . . . . .	141
4.4.2.0.3	Clairance sanguine . . . . .	141
4.4.2.0.4	Bio distribution dans les organes . . . . .	141
4.4.3	Conclusion . . . . .	143
<b>4.5</b>	<b>Première preuve de concept <i>in vivo</i> . . . . .</b>	<b>144</b>
4.5.1	Introduction . . . . .	144
4.5.2	Matériel et Méthodes . . . . .	144
4.5.2.0.5	Produits chimiques et médicaments utilisés .	144
4.5.2.0.6	Montage expérimental et procédure de traitement aux ultrasons . . . . .	145
4.5.2.0.7	Choix des doses de cavitation pour les traitements . . . . .	147
4.5.2.0.8	Animaux, groupes de traitement et suivi après traitements . . . . .	150
4.5.3	Résultats et discussion . . . . .	151
4.5.3.0.9	Observations liées au traitement et au suivi .	151
4.5.3.0.10	Analyse des zones et temps de traitements ultrasonores . . . . .	152
4.5.3.0.11	Analyse des images échographiques . . . . .	153
4.5.3.0.12	Aspect visuel des tumeurs après traitement .	155
4.5.3.0.13	Evolution des surfaces tumorales au cours du temps . . . . .	157
4.5.3.0.14	Comparaison du poids des tumeurs excisées .	159
4.5.3.0.15	Evolution du poids des rats après traitement	160
4.5.4	Conclusion . . . . .	161
<b>4.6</b>	<b>Seconde preuve de concept <i>in vivo</i> . . . . .</b>	<b>161</b>
4.6.1	Introduction . . . . .	161
4.6.2	Matériel et méthodes . . . . .	162
4.6.2.0.16	Animaux, groupes de traitement et suivi après traitement . . . . .	162
4.6.3	Résultats et discussion . . . . .	163
4.6.3.0.17	Observations liées au traitement et au suivi .	163
4.6.3.0.18	Analyse des zones et temps de traitements ultrasonores . . . . .	164
4.6.3.0.19	Aspect visuel des tumeurs après traitement .	165
4.6.3.0.20	Evolution des surfaces tumorales au cours du temps . . . . .	165

4.6.3.0.21	Comparaison du poids des tumeurs excisées .	168
4.6.3.0.22	Evolution du poids des rats après traitement	169
4.6.4	Conclusion . . . . .	170
<b>4.7</b>	<b>Conclusion générale . . . . .</b>	<b>171</b>

---

## 4.1 Introduction

Dans les précédents chapitres, nous avons présenté la mise au point d'un dosage de la cavitation inertielle. Nous avons montré que la libération de doxorubicine encapsulée dans diverses formulations de liposomes était *in vitro* principalement liée à la cavitation inertielle et que cette libération était fiable et reproductible dans le dispositif mis en place.

Des expériences sur des animaux sont nécessaires afin de tester la possibilité d'un largage de doxorubicine liposomale *in vivo* sous l'action des ultrasons et d'en évaluer l'action sur le modèle tumoral sélectionné.

Dans ce chapitre nous décrivons en premier lieu une étude visant à déterminer si le modèle tumoral choisi est sensible à la doxorubicine.

Nous étudions ensuite le devenir des liposomes après injection, en particulier leur accumulation dans la tumeur pour diverses formulations et dosages de liposomes.

Enfin, nous tentons d'évaluer l'efficacité d'un traitement combinant injection de liposomes et application d'ultrasons en comparaison avec d'autres traitements.

## 4.2 Etude de sensibilité à la doxorubicine du modèle tumoral

### 4.2.1 Modèle tumoral

Le modèle tumoral est un modèle d'adénocarcinome prostatique hormono-indépendant de la lignée Dunning R 3327-H et de la sous lignée AT-2. Cette lignée de tumeur a été choisie car elle est très similaire aux tumeurs humaines notamment en terme de réponse aux traitements, de lenteur de développement et de potentiel métastatique dans les os. Il existe plusieurs sous lignées de cette tumeur (AT-1 : Mat Ly Lu et Mat Lu, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6. . .). La lignée AT2 a été choisie car son potentiel métastatique est faible et sa croissance tumorale est rapide. De plus, ce modèle tumoral Dunning AT-2 a déjà été utilisée pour étudier les effets des ultrasons focalisés de haute intensité qu'ils soient appliqués seuls [CMV<sup>+</sup>92]<sup>[1]</sup>, [SAG07]<sup>[2]</sup> ou en combinaison avec des médicaments cytotoxiques [PCC<sup>+</sup>05]<sup>[3]</sup>.

Cette tumeur est implantée chez le rat Copenhague mâle car M. Dunning a mis en

- 
- [1] J Y Chapelon, J Margonari, F Vernier, F Gorry, R Ecochard, and A Gelet. In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma dunning r3327. *Cancer Research*, 52(22):6353–6357, November 1992. PMID: 1423282.
  - [2] D. Sunartio, M. Ashokkumar, and F. Grieser. Study of the coalescence of acoustic bubbles as a function of frequency, power, and water-soluble additives. *Journal of the American Chemical Society*, 129(18):6031–6036, 2007.
  - [3] P. Paparel, L. Curiel, S. Chesnais, R. Ecochard, J. Y. Chapelon, and A. Gelet. Synergistic inhibitory effect of high-intensity focused ultrasound combined with chemotherapy on dunning adenocarcinoma. *Bju International*, 95(6):881–885, 2005.

évidence en 1961 que des tumeurs de cette lignée se développaient spontanément chez ces rats. Ce modèle animal et tumoral semble adéquat pour notre étude. Il faut cependant vérifier s'il répond à un traitement de doxorubicine car il sera utilisé pour des expériences utilisant de la doxorubicine encapsulée. *In vitro*, seule une étude publiée par Bashir et al. [BSAF94]<sup>[4]</sup> montre que les sous-lignées Mat Ly Lu, AT-2 et AT-3 du modèle de Dunning sont sensibles à la doxorubicine. *In vivo*, Rabbani et al. [RHBA98]<sup>[5]</sup> montre l'efficacité d'un traitement à la doxorubicine sur la sous-lignée Mat Ly Lu mais pas sur la sous lignée AT-2. Une étude complète comprenant une partie *in vivo* et in partie *in vitro* est menée afin de valider ce modèle tumoral pour nos futures études *in vivo*.

#### 4.2.2 Etude *in vitro*

Avant toute étude sur le modèle animal, il convient en premier lieu de vérifier si la doxorubicine a un effet *in vitro* sur la croissance de la lignée Dunning AT-2.

##### 4.2.2.1 Matériel et méthodes

###### Matériel

Les cellules de la lignée Dunning R 3327-H et de la sous lignée AT-2 sont immergées dans un milieu de croissance constitué de RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), SVF 10%, Dexamethason 250nM, L-Glutamine 10%, Penicillin-streptomycin 1% GIBCO. Le Bleu de Trypan (SIGMA) permet de compter les cellules mortes en les colorant. Le Propidium Iodide (PI) associé avec l'Annexine5 (Kit d'apoptose MEBCYTO (MBL) : AnnexineV-FITC / Propidium Iodide) permet de différencier l'apoptose tardive et la nécrose après analyse au cytomètre de flux (FACScan ®, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Une solution de trypsine-EDTA (2 mL) sert à séparer les cellules avant comptage. Une solution tampon de PBS 1X (phosphate-buffered saline) sert à rincer les cellules. Le traitement des cellules est effectué avec de la Doxorubicine Teva® 50mg / 25ml.

###### Méthodes

Les cellules sontensemencées au nombre de 1 million par boîte de Petri un jour avant traitement (J-1). Après 24h, la doxorubicine est ajoutée dans les boîtes de Petri à des concentrations croissantes : 100, 400, 1600, 3200 et 6400 ng/ml. A chaque point de mesure, on rince les cellules, on ajoute de la trypsine afin de décoller les cellules puis on

---

[4] I. Bashir, K. Sikora, P. Abel, and C. S. Foster. ESTABLISHMENT AND IN-VIVO CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG-RESISTANT DUNNING r3327 RAT PROSTATE-CARCINOMA CELL-LINES. *International Journal of Cancer*, 57(5):719–726, 1994.

[5] S. A. Rabbani, P. Harakidas, T. Bowlin, and G. Attardo. Effect of nucleoside analogue BCH-4556 on prostate cancer growth and metastases in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 58(15):3461–3465, 1998.

ajoute du bleu de trypan ( $50 \mu\text{l}$ ). Le comptage des cellules vivantes (non colorées par le bleu de trypan) se fait sous microscope sur des cellules de Malassez et est effectué par le même opérateur pendant toute l'étude. Les cellules, décollées par trypsine sont ensuite centrifugées et reprises dans  $100 \mu\text{l}$  de PBS. On y ajoute  $5 \mu\text{l}$  de solution de PI et Annexine5 et on laisse incuber pendant 10 minutes à l'obscurité.  $100 \mu\text{l}$  de PBS sont ajoutés à chaque tube avant analyse au cytomètre de flux. Les différents temps de mesure sont 24h, 48h et 72h. Pour chaque échantillon, 10000 événements sont comptabilisés et les résultats sont analysés par le logiciel CellQuestPro sur le canal FL2x.

#### 4.2.2.2 Résultats et discussion

##### Comptages des cellules vivantes

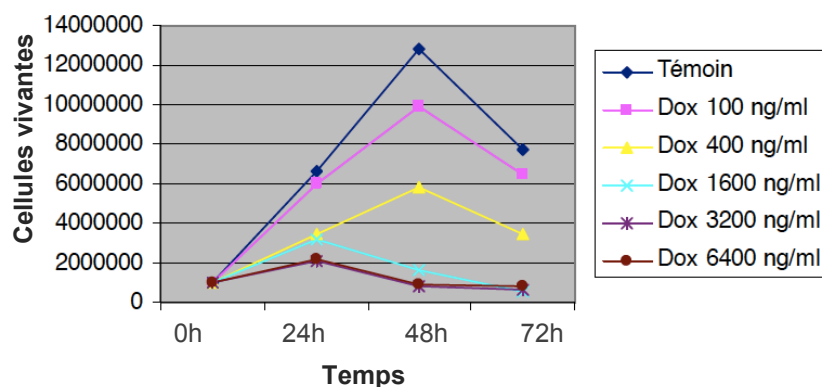


FIGURE 4.1 – Nombre de cellules vivantes en fonction du temps après ajout de doxorubicine à différentes concentrations. Les cellules vivantes sont les cellules non colorées comptées après ajout de bleu de Trypan.

Premièrement, les cellules témoins et les cellules traitées avec une concentration de doxorubicine de  $100 \text{ ng/ml}$  ont le même profil de croissance (c.f figure 4.1 ). Cette concentration a donc peu d'effet sur la croissance des cellules. Par contre, à une concentration de  $400 \text{ ng/ml}$ , on observe très clairement une diminution de croissance des cellules à partir de 48h. Notons que pour ces 3 cas, on voit nettement une baisse du nombre de cellules à partir de 72h, ce qui s'explique par un phénomène dit de confluence au niveau des boîtes : quand il n'y a plus assez d'espace pour que les cellules prolifèrent, une partie d'entre elles meurent. Aux concentrations 1600, 3200 et  $6400 \text{ ng/ml}$  de doxorubicine il y a un net ralentissement et/ou un arrêt de la croissance cellulaire.

Enfin, lors des comptages, on observe qu'il n'y a pas plus de cellules marquées avec le bleu de trypan dans les boîtes contenant de la doxorubicine que dans la boîte témoin. Ceci indique que la doxorubicine n'induit pas de toxicité immédiate mais qu'elle induit un arrêt de la prolifération cellulaire.

## Analyse des échantillons traités en cytométrie de flux

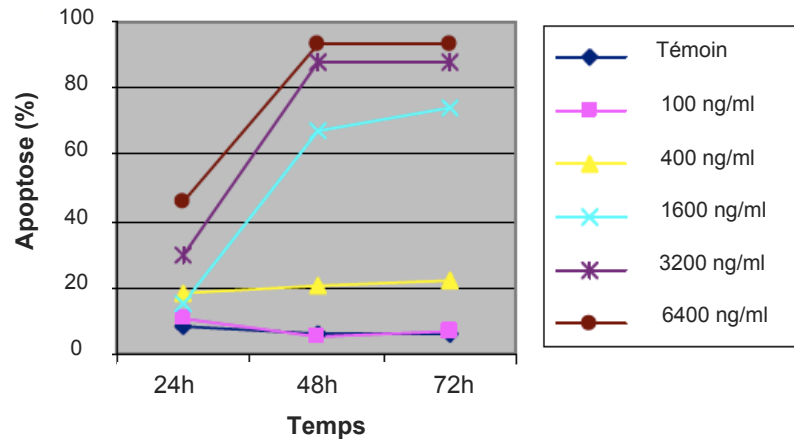


FIGURE 4.2 – Pourcentage d'apoptose cellulaire en fonction du temps après ajout de doxorubicine à différentes concentrations. Mesures effectuées en cytométrie de flux.

La figure 4.2 montre que la concentration de Doxorubicine de 100 ng/ml n'induit aucun effet d'apoptose par comparaison avec le témoin. A partir de 400 ng/ml de doxorubicine de l'apoptose est détectée. A 1600 ng/ml, un taux élevé d'apoptose est détecté et ceci dès 48h. Les concentrations les plus fortes (3200 et 6400 ng/ml) entraînent un effet d'apoptose sur la quasi-totalité de la population cellulaire. En résumé, à partir de la concentration 400 ng/ml, la doxorubicine induit de l'apoptose sur les cellules AT-2, ce qui explique la diminution voire l'arrêt de la prolifération cellulaire observée précédemment à ces concentrations.

#### 4.2.2.3 Conclusion

Cette étude a permis d'établir que la doxorubicine avait un effet sur la lignée cellulaire AT-2 à partir d'une concentration proche de 400 ng/ml. A partir d'une concentration de 1600 ng/ml, la doxorubicine entraîne l'arrêt de la croissance cellulaire. La doxorubicine n'induit pas de phénomènes toxiques mais induit un phénomène d'apoptose tardive. Ces résultats confirment ceux décrits dans la littérature [BSAF94]<sup>[1]</sup>.

[1] I. Bashir, K. Sikora, P. Abel, and C. S. Foster. ESTABLISHMENT AND IN-VIVO CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG-RESISTANT DUNNING r3327 RAT PROSTATE-CARCINOMA CELL-LINES. *International Journal of Cancer*, 57(5):719–726, 1994.



### 4.2.3 Etude *in vivo*

L'objectif de cette étude est de déterminer si la croissance de la tumeur Dunning de la sous lignée AT-2 implantée chez le rat Copenhague est ralentie par une injection de doxorubicine libre. L'influence du mode d'injection de la doxorubicine chez le rat est également testée dans cette étude.

#### 4.2.3.1 Matériel et méthodes

##### 4.2.3.1.1 Matériel et animaux

#### Animaux

17 Rats Copenhague mâle âgés de 10 à 12 semaines, pesant de 220 à 250 grammes et



FIGURE 4.3 – (a) Rats Copenhague mâle âgés utilisés comme modèle animal. (b) Tumeur AT2 Dunning sous-cutanée 10 jours après implantation.

provenant de Harlan aux USA sont utilisés pour cette expérimentation (voir figure 4.3 a). La lignée de rat utilisée a été créée par De Curtis en 1921 à l'institut de recherche sur le cancer de Columbia. Les rats de cette lignée sont consanguins et leur durée de vie moyenne est de 20 mois.

Pour amplifier et développer les tumeurs, 7 rats sont nécessaires. Pour l'étude d'efficacité de la doxorubicine, 12 rats sont répartis en 3 groupes de 4 rats.

Le nombre de rats utilisé pour chaque groupe de l'étude est déterminé en utilisant la méthode de comparaison de deux moyennes du logiciel Biostatgv développé par les Universités Pierre et Marie Curie à Paris et Paul Sabatier à Toulouse sachant que :

- Le diamètre d'une tumeur de Dunning AT2 13 jours après l'implantation et sans traitement est de  $15 \pm 3$  mm d'après les études précédentes [CMV<sup>+</sup>92]<sup>[1]</sup>.
- Une dose de 5 mg/kg de Doxorubicine injectée à J8 sur une tumeur Mat Ly Lu conduit à une réduction du diamètre de la tumeur d'un facteur 2 d'après l'étude de Rabbani et al. [RHBA98]<sup>[2]</sup>.

[1] J Y Chapelon, J Margonari, F Vernier, F Gorry, R Ecochard, and A Gelet. In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma dunning r3327. *Cancer Research*, 52(22):6353–6357, November 1992. PMID: 1423282.

[2] S. A. Rabbani, P. Harakidas, T. Bowlin, and G. Attardo. Effect of nucleoside analogue BCH-4556 on prostate cancer growth and metastases in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 58(15):3461–3465, 1998.

## 4.2. ETUDE DE SENSIBILITÉ À LA DOXORUBICINE DU MODÈLE TUMORAL 127

Une significativité  $\alpha$  de 0.05 est utilisée, la puissance du test  $\beta$  est égale à 0.9 (valeurs usuelles pour les protocoles) et on considère une variation unilatérale des données car l'action d'un agent thérapeutique ne peut que ralentir la croissance tumorale (ou ne pas avoir d'effet sur celle-ci) mais pas l'inverse.

Le nombre de rats nécessaires pour amplifier la tumeur à partir d'une suspension cellulaire est incompressible. Il est déterminé de façon à avoir assez de fragments tumoraux pour implanter la série de rats de l'étude.

### Lignées cellulaires

4,5 ml soit environ 90 millions de cellules de la sous lignée AT-2 du modèle de Dunning R 3327-H sont conservées dans de l'azote liquide.

### Autres matériels

- . Kétamine : anesthésique (Dose : 40mg/kg)
- . Xylazine : analgésique (Dose : 5mg /kg)
- . Doxorubicine Teva® 50mg /25ml
- . Azote liquide
- . Sérum physiologique
- . Doléthal
- . Cathéter 25G
- . Matériel de dissection
- . Aiguille courbe, fil
- . Boite de Pétri
- . Balance de précision

#### 4.2.3.1.2 Méthodes

##### Obtention du modèle tumoral chez le rat Copenhague

Les expérimentations animales se déroulent au SCAL, faculté Laennec, Lyon 8ème. Le protocole a été validé par le comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale. Avant l'inoculation de cellules ou l'implantation de fragments tumoraux, les rats sont anesthésiés avec un mélange kétamine (40 mg/kg) et xylazine (5 mg/kg) injecté par voie Intra Péritonéale (i.e dans l'abdomen) ou par anesthésie gazeuse avec de l'isoflurane. Chez le rat, une anesthésie correcte se caractérise par l'insensibilité au pincement d'une patte et l'abolition du réflexe d'occlusion palpébral lorsqu'on touche la cornée avec le doigt.

Deux étapes sont nécessaires pour obtenir une population de rats porteurs d'une tu-

meur sous-cutanée :

- ◇ **Etape 1** : Des cellules tumorales Dunning R 3327, conservées dans de l'azote liquide sont d'abord décongelées, lavées puis injectées directement en sous-cutanée à trois rats dans trois secteurs différents de l'abdomen (l'injection d'un volume de 0,5 ml correspond à 10 millions de cellules). Neuf tumeurs d'environ 15 mm chacune se développent chez les trois rats deux semaines après l'injection.
- ◇ **Etape 2** : Les neufs tumeurs sont alors prélevées, lavées et pesées. On prépare ensuite des fragments tumoraux de 25 mg, qui sont implantés, sous anesthésie, en sous cutanée chez 4 animaux (environ 4 fragments /rat). Ces animaux servent à amplifier suffisamment de tumeurs pour pouvoir ensuite implanter les 12 rats pour l'étude.

Deux semaines plus tard, l'implantation des groupes est effectuée. Les rats sont préalablement rasés au niveau de l'abdomen pour permettre un bon repérage du site d'implantation. Il est nécessaire que les fragments tumoraux administrés soient cubiques et le plus homogènes possible de manière à obtenir huit jours plus tard une tumeur de forme sphérique régulière et non stellaire (c.f figure 4.3 b). Une forme irrégulière rendrait les mesures plus délicates avec des risques accrus de biais. La tumeur atteint un volume moyen de 7-9 cm<sup>3</sup> 8 jours après implantation soit un diamètre d'environ 7-8 mm. En l'absence de traitement, le rat meurt sous 8 semaines après implantation.

Toutes les expériences sur animaux décrites dans cette thèse ont été approuvées par un comité d'éthique indépendant et sont conformes aux lois nationales d'éthique pour les expérimentations animales.

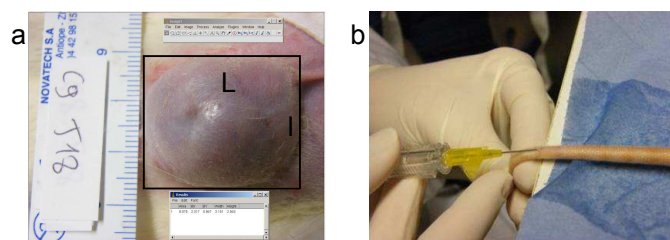


FIGURE 4.4 – (a) Détermination de la surface tumorale avec le logiciel ImageJ. (b) Injection en intra-veineuse (IV) dans la veine caudale.

## Déroulement de l'étude

### a. Répartition des rats et traitements

Les 12 rats implantés sont répartis en 3 groupes de 4 rats :

- groupe 1 : témoin
- groupe 2 : traitement avec Doxorubicine à 1mg/kg/jour pendant 5 jours en IP (Intra Péritonéale i.e dans l'abdomen)

- groupe 3 : traitement avec Doxorubicine à 5mg/kg en IV (Intra Veineux (administration parentérale) i.e dans la veine caudale située dans la queue (c.f figure 4.4 b)

Le poids des rats est de  $(242 \pm 12)$  g

Le traitement des groupes Doxorubicine débute 10 jours (J10) après l'implantation sous-cutanée de la tumeur. Les injections IP se font sur les animaux vigiles et les injections IV au niveau de la veine caudale se feront sur des animaux anesthésiés.

#### *b. Suivi de l'animal*

A partir de J10 et pendant 2 semaines, les tumeurs sont photographiées de face avec un régllet et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (logiciel libre ImageJ, NIH, Bethesda, Ma, Etats-Unis) qui permet de déterminer la surface tumorale (c.f figure 4.4 b). Le poids des rats est suivi sur toute cette période. A J26, tous les rats sont sacrifiés et la tumeur est excisée afin d'être pesée. La méthode d'euthanasie utilisée est l'injection de Dolethal en Intra Veineux sous anesthésie gazeuse. Le critère de jugement principal de cette étude est l'évolution de la surface tumorale dans chaque groupe après traitement à la doxorubicine.

#### 4.2.3.2 Résultats et discussion

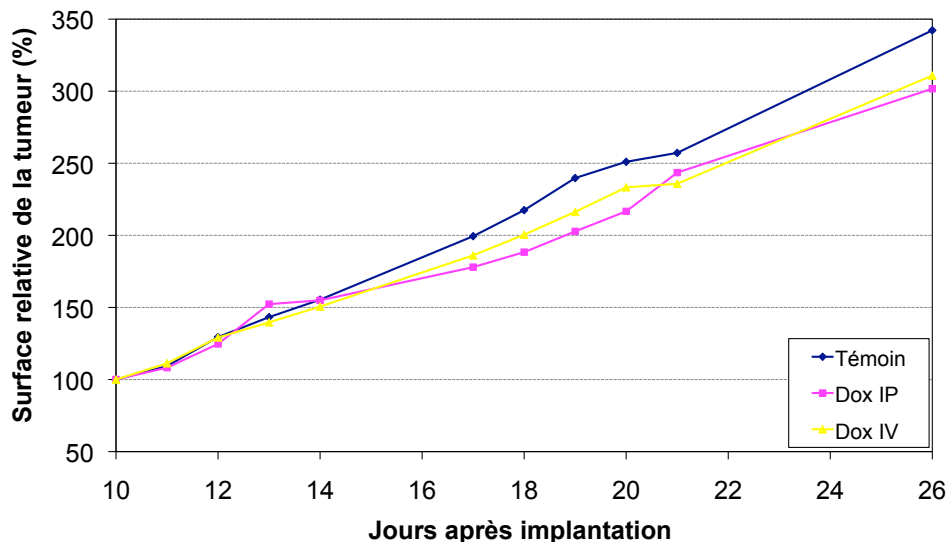


FIGURE 4.5 – Moyenne par groupe de rat de l'évolution de la surface tumorale relative en fonction du temps après implantation.

Sur la figure 4.5, montrant le pourcentage de changement de taille de la tumeur par rapport au jour d'injection en fonction du temps, on observe une légère différence entre le groupe témoin et les groupes traités en IV et IP. Une étude statique utilisant le

test d'ANOVA à mesures répétées permet de prouver que la différence entre le groupe témoin et les groupes traités est significative ( $p=0,016 < 0,05$ ).

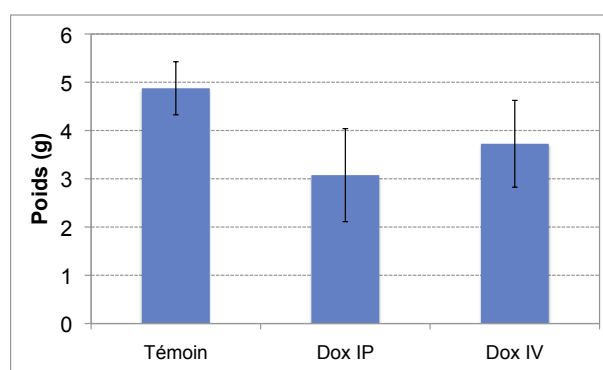


FIGURE 4.6 – Moyenne et écart type par groupe du poids des tumeurs prélevées à J26.

Le poids moyen et l'écart type des tumeurs excisées à J26 par groupe est présenté figure 4.6.

L'analyse du poids des tumeurs prélevées à J26 pour les 3 groupes de rats avec le test d'ANOVA montre également qu'il y a une différence significative entre le groupe témoin et les groupes traités ( $p=0,037 < 0,05$ ). Un test de Tukey-Kramer permet de conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes injectés en IP et les groupes injectés en IV ( $p=0,36 > 0,05$ ).

#### 4.2.3.3 Conclusion

Cette étude permet de conclure que la doxorubicine a un effet sur la croissance tumorale de la tumeur Dunning AT-2. Cet effet est cependant peu marqué mais une encapsulation et un traitement ultrasonore pourrait accroître cet effet, ce qui est testé par la suite dans les sections 4.5 et 4.6.

Comme il n'y a pas de différence significative entre les groupes traités par une injection IP de doxorubicine et par une injection IV, le mode d'injection IV est retenu. En effet, le mode d'injection IV s'affranchit de la phase d'absorption nécessaire en injection IP pour traverser les membranes biologiques et parvenir à la circulation systémique. Elle entraîne donc une diffusion plus grande et plus rapide de la substance dans l'organisme. De plus, c'est la méthode la plus utilisée pour les injections chez les patients, ce qui permet de se rapprocher des conditions d'une étude clinique.

## 4.3 Première étude de bio distribution

### 4.3.1 Introduction

Avant de pouvoir réaliser une étude *in vivo* complète pour étudier l'efficacité d'un traitement combinant ultrasons et liposomes contenant de la doxorubicine, il est nécessaire de connaître certains aspects de la pharmacocinétique des liposomes. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme après son administration. Elle comprend généralement quatre phases : absorption, distribution, métabolisme, élimination. Comme un mode d'injection en intra-veineux est choisi, il n'y a pas de phase d'absorption, le médicament rejoint très rapidement la circulation sanguine générale. Le phase de distribution ou bio distribution est la répartition du médicament dans l'organisme et notamment l'accumulation dans les organes. C'est cette phase en particulier que nous allons étudier de façon à connaître la durée de vie des liposomes dans le sang, la répartition des liposomes dans les différents organes, en particulier l'accumulation dans la tumeur. Il est en effet nécessaire de connaître la durée après injection où l'accumulation des liposomes dans la tumeur est maximale pour appliquer les ultrasons. Cette étude nous permettra également de choisir entre deux formulations de liposomes de première génération fabriquées par nos partenaires et sélectionnées pour leur stabilité dans le sérum, leur sonosensibilité acceptable *in vitro* et leur possibilité d'être fabriqués à grande échelle.

### 4.3.2 Etude préliminaire

Une étude préliminaire est menée sur 4 rats afin de connaître approximativement la concentration de doxorubicine (et supposément la quantité de liposomes) présente dans le sang après injection et la cinétique de la clairance\* de distribution de la doxorubicine. Ces données serviront à confirmer les temps choisis pour étudier l'accumulation intratumorale et à choisir parmi deux dosages de doxorubicine testés.

#### 4.3.2.1 Matériel et Méthodes

##### Matériel et animaux

Le modèle animal et tumoral ainsi que la méthode pour implanter les rats sont décrits section 4.2.3.1. Un total de 5 rats est utilisé pour cette étude. Le matériel annexe servant au développement et à l'amplification des tumeurs est également décrit dans cette même section. Le matériel additionnel nécessaire pour cette étude est le suivant :

- . Rompun : analgésique
- . Héparine : anticoagulant
- . Solution d'éthanol acidifié (0,3M HCL dans éthanol 50%) fabriquée à partir d'eau distillée, d'éthanol 96% et d'acide chlorhydrique concentré (HCl fumant 37%)

- . homogénéiseur (Polytron, Fisher Scientific, Illkirch, France)
- . Vortex
- . Spectromètre Ocean optics QE65000 et cuves à usage unique
- . Pipette pasteur
- . Tube Eppendorf de 2ml, tube de 50ml, tube de 100ml
- . Liposomes Caelyx<sup>®</sup> (2mg de Doxorubicine hydrochloride /ml)

Les liposomes utilisés sont les formulations CCD6\_26 et CCD6\_28 ayant la même concentration de doxorubicine (0.93 mg/ml). La formulation des liposomes CCD6\_26 ainsi que son procédé de fabrication ont été décrit section 2.4.1.1. Les liposomes de la formulation CCD6\_28 ont la même méthode de fabrication et leur membrane les mêmes constituants mais dans des proportions différentes. Nous les dénommerons formulations 26 et 28. Ces deux formulations de liposomes sont stables dans le sérum 20% à 37°C.

### Méthodes

4 rats sont implantés à J0 avec un fragment tumoral de 25 mg issu d'un rat d'amplification.

A J10, les rats sont injectés en IV de la façon suivante :

- . rat 1 : formulation 26 à une dose de 3mg/kg de doxorubicine
- . rat 2 : formulation 26 à une dose de 6mg/kg de doxorubicine
- . rat 3 : formulation 28 à une dose de 3mg/kg de doxorubicine
- . rat 4 : formulation 28 à une dose de 6mg/kg de doxorubicine

Des prises de sang sont effectuées en intra cardiaque à 30 min, 90 min, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'injection des liposomes pour dosage fluorimétrique. Une procédure de digestion est réalisée de façon à mesurer la fluorescence dans l'échantillon de sang. Cette procédure sera décrite dans l'étude de bio distribution principale en même temps que la procédure de digestion des organes et tumeurs prélevées dans l'étude en question (c.f section 4.3.3.1). Une calibration du fluorimètre avec du sang de porc et des liposomes contenant du Caelyx a préalablement été réalisée de façon à connaître la fluorescence associée à une concentration de doxorubicine dans le sang.

Les temps de prélèvements ont été choisi au vu des résultats obtenus dans des études de cinétique utilisant de la doxorubicine sous forme liposomale [HHT+99]<sup>[1]</sup>, [CLG+07]<sup>[2]</sup>.

Les rats sont euthanasiés après la dernière prise de sang.

---

[1] R. L. Hong, C. J. Huang, Y. L. Tseng, V. F. Pang, S. T. Chen, J. J. Liu, and F. H. Chang. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in c-26 tumor-bearing mice: Is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clinical Cancer Research*, 5(11):3645–3652, 1999.

[2] J. X. Cui, C. L. Li, W. M. Guo, Y. H. Li, C. X. Wang, L. Zhang, Y. L. Hao, and Y. L. Wang. Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: Is AUC predictive for toxicity and efficacy? *Journal of Controlled Release*, 118(2):204–215, 2007.

## 4.3.2.2 Résultats et discussion

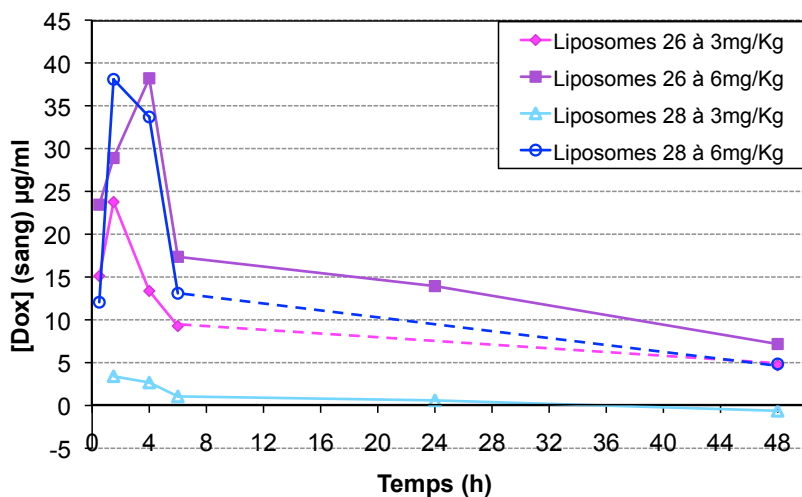


FIGURE 4.7 – Concentration de doxorubicine présente dans le sang après injection de liposomes des formulations 26 ou 28 à une dose de 3mg/Kg ou 6 mg/Kg de doxorubicine. Quelques points de mesures sont manquants dû à des problèmes de coagulation d'échantillons (les courbes sont en pointillés au niveau des points manquants).

Les résultats analysés sont basés sur une procédure de digestion du sang (et ensuite dans les tissus) pour permettre de mesurer la fluorescence de la doxorubicine présente dans les échantillons prélevés. Aussi, il n'est pas possible de savoir si la doxorubicine est toujours encapsulée ou non au moment du prélèvement. Les liposomes testés étant stables dans du sérum à 20%, nous supposons pour commenter les résultats dans toutes les études de bio distribution que c'est bien de la doxorubicine liposomale que nous dosons.

On constate (figure 4.7) qu'il y a une plus forte concentration de doxorubicine présente dans le sang pour les deux formulations au dosage de 6 mg/Kg. Les pics de concentrations se situent entre 2 h et 6 h pour toutes les formulations et dosages sauf pour la formulation 28 à un dosage de 3 mg/ml. Pour ce rat, il manque une mesure à 30 min pour cause de coagulation de l'échantillon et les valeurs semblent bien plus faibles pour toutes les mesures : peut-être y a-t-il eu un problème d'injection ? Pour les mesures sur les trois autres rats, le pic de concentration est suivi d'une diminution progressive de la concentration pour atteindre le même ordre de grandeur vers 48 h (entre 5 et 8 µg/ml environ). La clairance de distribution de la doxorubicine liposomale semble donc équivalente chez les 3 rats. On note également que les concentrations dans le sang à 30 min ne sont pas les mêmes à dosage égal. Il serait intéressant de connaître la concentration avant ce temps de 30 min.



### 4.3.2.3 Conclusion

Le dosage de 6 mg/Kg est retenu pour les deux formulations car il induit une plus forte concentration de doxorubicine dans le sang pour les premiers prélèvements après injection pour une cinétique de clairance sanguine du même ordre de grandeur pour les temps plus tardifs. Des prélèvements à des temps antérieurs à 30 min seront rajoutés dans l'étude complète de bio distribution de façon à avoir une meilleure idée de ce qui se passe juste après l'injection.

### 4.3.3 Etude principale de cinétique sanguine et de bio distribution

Cette étude sert à déterminer de façon plus précise la clairance\* sanguine des deux formulations de liposomes sélectionnées et à connaître la distribution de la doxorubicine liposomale dans les différents organes de l'animal.

#### 4.3.3.1 Matériel et Méthodes

##### Matériel et animaux

Le modèle animal et tumoral a été décrit section 4.2.3.1 et le matériel nécessaire à cette étude est le même que celui décrit section 4.3.2.1.

42 rats Copenhague sont nécessaires à cette étude dont 7 rats pour l'amplification des tumeurs.

##### Méthodes

Suite à l'étude préliminaire, 5 temps de prélèvements sanguins en intra-cardiaque sont choisis pour étudier la clairance\* sanguine et la bio distribution dans les organes : 5 min, 30 min, 3 h, 6 h, 18 h et 24h après injection. Des prélèvements sanguins complémentaires en intra-orbitaire sont réalisés aux temps 4 min, 8 min et 12 min sur les rats sacrifiés 24h après injection.

Nous avons, comme mentionné précédemment, rajouté des temps précoces et aussi un temps intermédiaire à 18h. Le temps 48h qui semble présenter moins d'intérêt a été supprimé pour limiter le nombre d'animaux de l'étude. En effet, 3 animaux sont sacrifiés après prélèvement sanguin pour chaque temps et pour chaque formulation de façon à effectuer la bio distribution de la doxorubicine dans les organes prélevés, ce qui démultiplie rapidement le nombre d'animaux. Seul le point 5 min fait exception car il n'y a qu'un seul rat par formulation pour ce temps.

La série des 35 rats est implantée avec un fragment tumoral de 25 mg. Un groupe témoin T de 3 rats avec tumeur et sans injection est prévu mais suite à des décès, il est réduit à 1 seul rat par formulation. Les 32 rats restants sont répartis en 6 groupes pour la formulation 26 et 6 groupes pour la formulation 28 comme suit :

- groupe 26-5min (n = 1) : animal sacrifié 5min après injection

- . groupe 26-30min (n = 3) : animaux sacrifiés 30min après injection
- . groupe 26-3h (n= 3) : animaux sacrifiés 3h après injection
- . groupe 26-6h (n=3) : animaux sacrifiés 6h après injection
- . groupe 26-18h (n=3) : animaux sacrifiés 18h après injection
- . groupe 26-24h (n=3) : animaux sacrifiés 24h après injection, avec prélèvement sanguin intra orbitaire au temps T= 4min, 8min et 12min
  
- . groupe 28-5min (n = 1) : animal sacrifié 5min après injection
- . groupe 28-30min (n = 3) : animaux sacrifiés 30min après injection
- . groupe 28-3h (n= 3) : animaux sacrifiés 3h après injection
- . groupe 28-6h (n=3) : animaux sacrifiés 6h après injection
- . groupe 28-18h (n=3) : animaux sacrifiés 18h après injection
- . groupe 28-24h (n=3) : animaux sacrifiés 24h après injection, avec prélèvement sanguin intra orbitaire au temps T= 4min, 8min et 12min

Tous les rats de ces groupes reçoivent, à J10 après implantation de la tumeur, une injection IV de liposomes d'une des deux formulations à un dosage de 6mg/Kg de doxorubicine.

Avant chaque sacrifice, un prélèvement de sang en intra-cardiaque (400-500  $\mu$ l) est réalisé puis déposé dans un tube Eppendorf contenant 40  $\mu$ l d'héparine. Le tube est passé au vortex immédiatement, plongé dans de l'azote liquide avant conservation à -20°C.

Après chaque sacrifice, la tumeur, le foie, la rate et les reins sont prélevés, pesés et congelés instantanément à l'azote liquide avant conservation -20°C.

Avant analyse au spectrofluorimètre, tous les échantillons doivent être préparés, selon une procédure de digestion et incubation précise.

Les tissus décongelés sont pesés et digérés\* avec une solution d'éthanol acidifié avec un rapport de dilution final de 1 : 10 (1g de tissus pour 9ml d'éthanol acidifié). Le mélange est homogénéisé (avec l'homogénéiseur) jusqu'à ce qu'un broyat de tissus soit obtenu. On laisse incuber ce broyat à 4°C dans le noir pendant 24 heures. Ensuite 3 échantillons du broyat (de 2ml chacun) sont centrifugés à 10000g pendant 20 min à la température de 4°C de façon à précipiter tous les débris de cellules. Le liquide surnageant\* clair obtenu est stocké à -20°C jusqu'à ce que les mesures de fluorescence soient effectuées.

La même procédure est appliquée pour la digestion des échantillons de sang sauf que les échantillons de sang sont dilués dans la solution d'éthanol acidifié avec un rapport de dilution final de 1 : 20.

Une calibration a été préalablement réalisée dans une tumeur de rat avec des liposomes Caelyx pour avoir une correspondance entre la fluorescence mesurée et la quantité de doxorubicine présente dans l'échantillon. Les courbes de calibration ont été réalisées en ajoutant des quantités connues de doxorubicine liposomale à des échantillons de tissus

digestés selon la procédure décrite ci-dessus et en mesurant la fluorescence associée. Une calibration identique dans le sang avait été réalisée au moment de l'étude préliminaire.

Les résultats des dosages de fluorescence peuvent être présentés sous plusieurs formes. Dans le sang, on présente la concentration de doxorubicine [Dox] en  $\mu\text{g/ml}$  déduite des mesures de fluorescence et de la courbe de calibration dans le sang. La concentration donnée est la moyenne des concentrations par groupe de rats sacrifiés.

Une deuxième grandeur, le pourcentage de dox dans le sang par rapport à la dose injectée, peut-être présentée :

$$\%DI = \frac{[Dox](\mu\text{g/ml}) \times V_{\text{sang}}(\text{ml})}{Dose\ injectée(\mu\text{g})} \times 100 \quad (4.1)$$

Là aussi on donne la valeur moyenne de %DI par groupe de rats sacrifiés.

Dans la tumeur ou dans les autres organes on présente la concentration de doxorubicine [Dox] en  $\mu\text{g/g}$  de tissu déduite des mesures de fluorescence et de la courbe de calibration dans les tissus. La concentration donnée est la moyenne des concentrations par groupe de rats sacrifiés.

Une deuxième grandeur, le pourcentage de dox dans les tissus par rapport à la dose injectée (ou pourcentage de captation par l'organe ou la tumeur), peut-être présentée :

$$\%DI = \frac{[Dox](\mu\text{g/g}) \times Poids_{\text{tissus}}(\text{g})}{Dose\ injectée(\mu\text{g})} \times 100 \quad (4.2)$$

De même on donne la valeur moyenne de %DI par groupe de rats sacrifiés.

### 4.3.3.2 Résultats et discussion

#### 4.3.3.2.1 Clairance de distribution

Dans le sang, on observe une première phase d'augmentation de la concentration de doxorubicine jusqu'à ce qu'un maximum, correspondant à une distribution homogène de la substance, soit atteint. Pour les deux formulations de liposomes, ce maximum est atteint 12 minutes après injection (c.f. figure 4.8 b).

Une seconde phase de diminution globale de la doxorubicine est ensuite observée pour les deux formulations (c.f. figure 4.8 a). Cette phase correspond à la clairance\* du médicament du système circulatoire. Pendant le laps de temps 3h-6h, la clairance se fait de façon beaucoup plus rapide pour la formulation 28 que pour la formulation 26. Au delà de 6h, la clairance de chacune des formulations se fait plus lentement. Au delà de 4h après injection, la concentration de doxorubicine dans le sang est plus importante pour la formulation 26 que pour la formulation 28. La clairance du système circulatoire des liposomes de la formulation 26 est donc plus lente que celle de la formulation 28.

On notera une légère ré-augmentation de la concentration de doxorubicine entre le temps

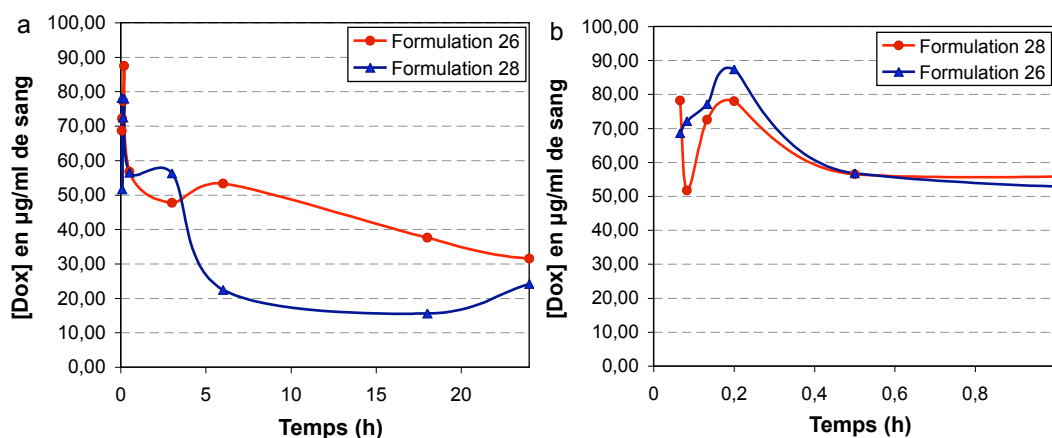


FIGURE 4.8 – (a) et (b) Concentration de doxorubicine hydrochloride en fonction du temps dans le sang de rat porteur d'une tumeur Dunning AT2 après injection de liposomes des formulations 26 ou 28. (b) Concentration pendant la première heure après injection.

18 et 24h. Une étude détaillée des tous premiers temps (4 et 5 min c.f figure 4.8 b) montre qu'il pourrait y avoir, au moins pour la formulation 28, un premier pic de concentration de doxorubicine antérieur à 4 min. Le pic de 12 min correspondrait dans ce cas à un second passage dans la circulation sanguine.

Notons que la concentration de doxorubicine à 3h pour la dose de 6 mg/Kg est environ deux fois plus importante que celle observée dans l'étude préliminaire. Il faut signaler qu'au temps 3h, nous observons de très gros écarts des concentrations de dox dans le sang entre les 3 rats du groupe "26-3h". Ces écarts sont sans doute dû aux petites variations entre les temps de prélèvement sanguins pour les trois rats alors que les concentrations de doxorubicine varient très vite au alentours de 3h. Il faudra veiller à réduire ces variations de temps de prélèvement pour les études ultérieures.

#### 4.3.3.2.2 Bio distribution dans les organes

Les graphiques 4.9 (a) et (b) montrent une augmentation progressive de la captation des liposomes dans la tumeur dans les premières heures après injection pour chacune des formulations de liposomes. Il y a ensuite accélération de cette captation à partir de 3h pour la formulation 26 et 18h pour la formulation 28. La formulation 26 est donc captée plus rapidement par la tumeur. Les pourcentages de DI sont les plus élevés à 24h mais sont toujours sur une phase ascendante pour les deux formulations, il n'est donc pas possible de déterminer le temps où l'accumulation de liposomes est maximale dans la tumeur avec cette étude.

L'organe qui capte le plus de liposomes est le foie (c.f 4.10) avec des pourcentages de DI maximaux atteignant  $\approx 13\%$  pour la formulation 28 et 15 % pour la formulation 28 dans les 24h après injection. Une accumulation importante a lieu dès les premières

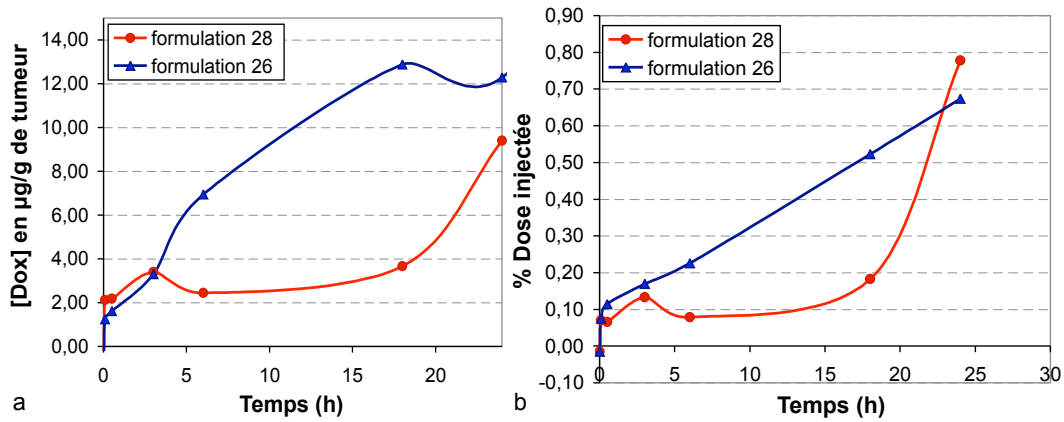


FIGURE 4.9 – (a) Concentration de doxorubicine dans la tumeur en fonction du temps après injection de liposomes des formulations 26 ou 28. (b) Pourcentage de doxorubicine captée par la tumeur par rapport à la dose de liposome injectée en fonction du temps (c.f équation 4.2).

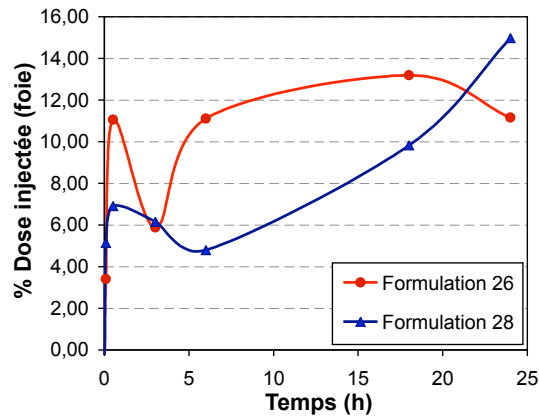


FIGURE 4.10 – Pourcentage de doxorubicine captée par le foie par rapport à la dose de liposome injectée en fonction du temps pour les formulations 26 ou 28 (c.f équation 4.2).

minutes après injection avec un pic à 30 min pour les deux formulations ; ce pic étant plus élevé pour la formulation 26. Pour la formulation 28, on a ensuite une augmentation progressive de l'accumulation. Pour la formulation 26, l'accumulation augmente avant d'atteindre un plateau. Au temps final, la concentration dans le foie est plus importante pour la formulation 28 que pour la formulation 26.

Dans la rate et les reins, la captation de liposomes est beaucoup moins importante que dans le foie avec des pourcentages maximaux situés entre 1,3 et 1,9 % selon l'organe et la formulation (c.f figures 4.11 a et b). Dans les reins, on observe le même type de courbes que dans le foie avec une rapide captation et un pic aux alentours de 30 min ; ce pic étant plus élevé pour la formulation 26. Dans la rate, ce premier pic est plus tardif (à 3h et 6 heures pour les formulations 28 et 26 respectivement) et plus élevé pour la formulation 28. Au bout de 24h, les courbes d'accumulation des formulations 26 et 28 se rejoignent.

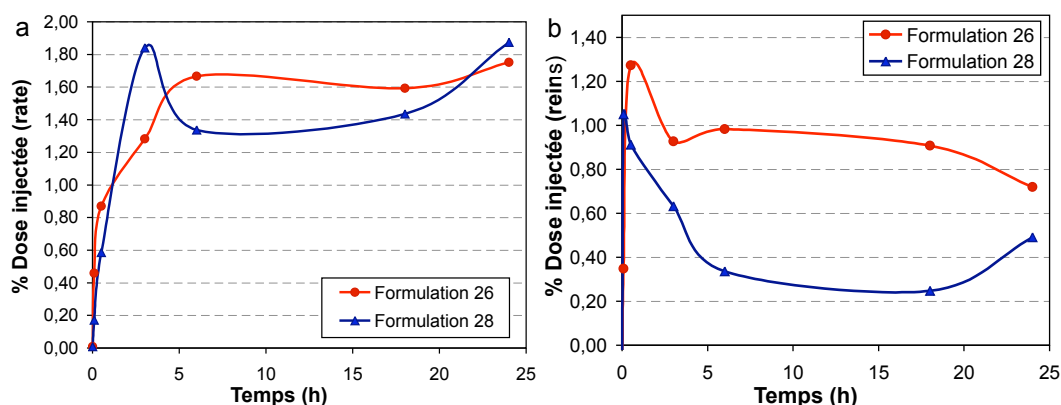


FIGURE 4.11 – Pourcentage de doxorubicine captée par la rate (a) et les reins (b) par rapport à la dose de liposome injectée en fonction du temps pour les formulations 26 ou 28 (c.f équation 4.2)

La captation plus ou moins importante des liposomes observée dans les organes est très cohérente avec ce qui est dit dans la littérature pour des nanoparticules. Nous avons abordé la question dans la section 1.2.2 où nous avons notamment commenté que l'accumulation dans le foie, la rate et les reins étaient dû au SRE (système réticulo-endothélial)\* et que cette accumulation dépendait de la taille des nanoparticules et de leurs propriétés de surface. La taille des liposomes utilisée est d'environ 83 nm. Ils ne peuvent donc pas être filtré par le glomérule rénal ayant des jonctions de taille inférieure à 60 nm, d'où l'accumulation très faible dans les reins. Par contre, les liposomes pénètrent dans les jonctions des sinusoides de la rate et dans les fenêtres de Kupffer du foie qui ont des tailles de 150 à 200 nm. Ils peuvent en ressortir uniquement s'ils échappent à la capture par les macrophages\* (dépend en particulier des propriétés de surface), ce qui est apparemment peu le cas dans le foie vu l'accumulation importante dans cet organe.

#### 4.3.4 Conclusion

Cette étude a permis de sélectionner la formulation 26 par rapport à la formulation 28 pour plusieurs raisons. Premièrement, la clairance des liposomes de cette formulation de la circulation sanguine est plus faible, ce qui permet d'augmenter les chances d'accumulation dans les organes et donc dans la tumeur (c.f 1.2.2). Deuxièmement, les liposomes de cette formulation sont assimilés plus rapidement au niveau de la tumeur et en plus grand nombre *a priori*. Pour finir, les liposomes de la formulation 26 sont un peu moins captés par le foie à des temps tardifs que ceux de la formulation 28. Cependant, cette étude ne permet pas de conclure sur le temps où l'accumulation est maximale dans la tumeur. Elle indique seulement que ce maximum est situé dans les temps tardifs après injection, à 24h ou au delà. Une seconde étude est nécessaire pour déterminer ce temps d'accumulation pour la formulation 26 sélectionnée.

## 4.4 Seconde étude de bio distribution

Cette étude a pour objectif de compléter l'étude de bio distribution menée précédemment pour la formulation 26 sélectionnée de façon à déterminer le temps optimal de traitement de la tumeur par ultrasons. Cette étude permettra également de vérifier si le dosage influence la cinétique de bio distribution, les données étant peu nombreuses dans l'étude préliminaire.

### 4.4.1 Matériel et méthodes

#### Matériel et animaux

Le modèle animal et tumoral et le matériel sont les mêmes que ceux décrits section 4.3.3.1. La formulation 26 (*CCD6.26*) de doxorubicine liposomale est testée dans cette étude. 43 animaux dont 7 rats d'amplification sont nécessaires à cette étude.

#### Méthodes

Des temps tardifs complémentaires sont choisis pour la bio distribution et l'étude de la cinétique sanguine : 3h, 24h, 48h, 72h, 96h, et 168h (J7).

Deux dosages sont retenus pour les liposomes de la formulation 26 : 3 et 6 mg/kg de doxorubicine correspondant à 48 et 96 mg de lipides/kg.

Tous les prélèvements sanguins sont effectués en intra-cardiaque.

Le reste du protocole d'injection, de sacrifice, d'incubation et de digestion des organes et du sang prélevés ainsi que la détermination des concentrations et pourcentage de dose injectés (%DI) de doxorubicine dans le sang et les tissus sont en tous points identiques à ceux décrits dans l'étude de bio distribution précédente 4.3.3.1.

Un rat sert de témoin et les 36 autres rats de l'étude sont répartis en 12 groupes de 3 rats :

- groupe 3h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 3h après injection à 6 mg/Kg
- groupe 24h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 24h après injection à 6 mg/Kg
- groupe 48h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 48h après injection à 6 mg/Kg
- groupe 72h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 72h après injection à 6 mg/Kg
- groupe 96h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 96h après injection à 6 mg/Kg
- groupe 168h à 6 mg/Kg : animaux sacrifiés 168h après injection à 6 mg/Kg
  
- groupe 3h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 3h après injection à 3 mg/Kg
- groupe 24h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 24h après injection à 3 mg/Kg
- groupe 48h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 48h après injection à 3 mg/Kg
- groupe 72h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 72h après injection à 3 mg/Kg
- groupe 96h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 96h après injection à 3 mg/Kg
- groupe 168h à 3 mg/Kg : animaux sacrifiés 168h après injection à 3 mg/Kg

## 4.4.2 Résultats et discussion

### 4.4.2.0.3 Clairance sanguine

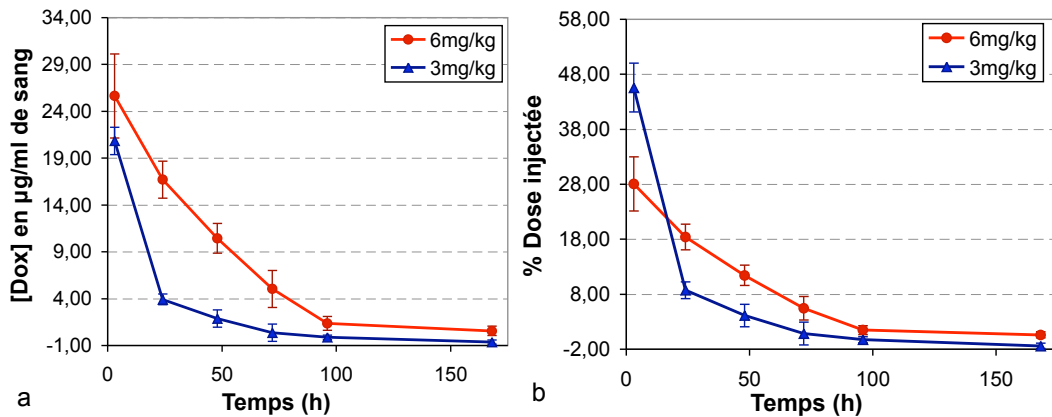


FIGURE 4.12 – (a) Concentration de doxorubicine dans le sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes à une concentration de 3 mg/ml ou 6 mg/ml (b) Pourcentage de la dose injectée de doxorubicine se retrouvant dans le sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes à une concentration de 3 mg/ml ou 6 mg/ml (c.f équation 4.1)

Les figures 4.12 (a) et (b) montrent que l'on retrouve la phase de clairance lente des liposomes de la circulation sanguine observée dans les études précédentes quelques heures après injection. On constate que les liposomes ont une longue durée de vie dans la circulation sanguine puisqu'il reste entre 10 et 20% de la dose injectée après 24 h. La clairance des liposomes de la circulation sanguine est totale aux alentours de 100 heures après injection pour les deux dosages. La clairance des liposomes à 3 mg/Kg se fait de façon beaucoup plus rapide jusqu'à 24 h et est ensuite ralentie. La cinétique de clairance sanguine des liposomes est donc dépendante de la dose injectée. On constate que la concentration de doxorubicine présente dans le sang est plus importante que celle qui soit le temps pour le dosage de 6 mg/Kg (c.f 4.12 a).

Notons que la concentration de doxorubicine observée à 3h pour la dose de 6 mg/kg est du même ordre de grandeur que dans l'étude préliminaire. Ceci tend à confirmer que les valeurs plus élevées obtenues dans l'étude précédente provenaient de variations inter-groupe.

### 4.4.2.0.4 Bio distribution dans les organes

La figure 4.13 (a) montre que dans la tumeur, une concentration maximale de doxorubicine est atteinte aux alentours de 48h pour le plus haut dosage de liposomes et aux alentours de 24 h pour le plus bas dosage de liposomes. Cette dernière constatation doit cependant être nuancée car l'écart-type du point 24 h étant très important et celui du



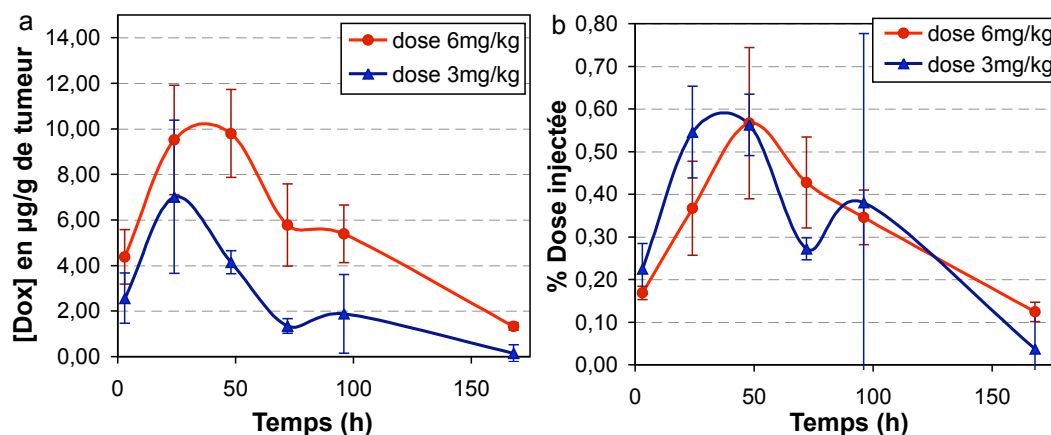


FIGURE 4.13 – (a) Concentration de doxorubicine dans la tumeur en fonction du temps écoulé après injection de liposomes à une concentration de 3 mg/kg ou 6 mg/kg (b) Pourcentage de doxorubicine captée par la tumeur par rapport à la dose de liposomes injectée (c.f équation 4.2).

point 48 h très faible, le maximum peut tout aussi bien se situer aux alentours de 48 h. Par ailleurs, le pourcentage de dose injectée captée par la tumeur est lui maximum à 48h pour les deux dosages (c.f figure 4.13 b). On pourra de toutes façons choisir d'appliquer les ultrasons à 24 h ou 48 h si la dose de 3 mg/Kg est utilisée car la concentration est élevée pour les deux temps.

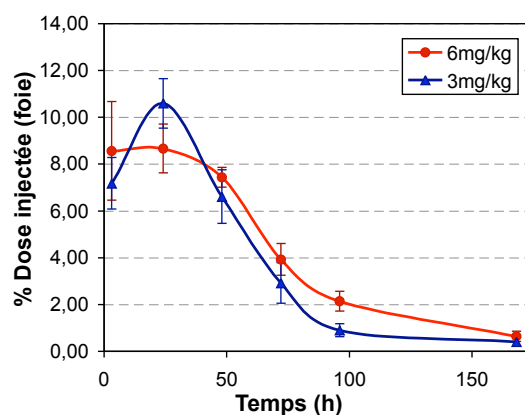


FIGURE 4.14 – Pourcentage de doxorubicine captée par le foie par rapport à la dose de liposomes injectée de 3 mg/kg ou 6 mg/kg en fonction du temps après l'injection (c.f équation 4.2).

Dans le foie, on retrouve une captation importante de doxorubicine qui est de l'ordre de 10% de la dose injectée (c.f 4.14). La clairance totale de la doxorubicine du foie se fait au bout d'environ 7 jours après injection des liposomes. La même tendance se retrouve dans la rate avec des pourcentages de captation moindres, de l'ordre de 1,8 à 2,5% au maximum suivant les dosages (c.f figure 4.15 a). Dans les reins, la captation de doxorubicine est très faible voir nulle dans le cas du dosage à 3mg/Kg (c.f 4.15 b). Pour la formulation 26 à 6 mg/kg, on retrouve globalement les mêmes valeurs que dans l'étude précédente et donc la même répartition des liposomes dans les organes.

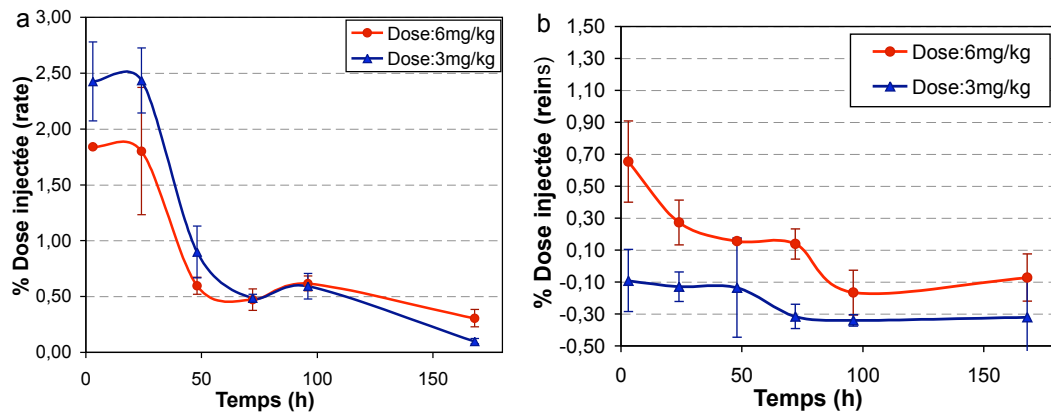


FIGURE 4.15 – Pourcentage de doxorubicine captée par la rate (a) ou pour les reins (b) par rapport à la dose de liposomes injectée de 3 mg/kg ou 6 mg/kg en fonction du temps après l'injection (c.f équation 4.2).

De plus, un article de Drummond et al. [DMH<sup>+</sup>99]<sup>[1]</sup> montre, pour une étude réalisée par Siegal et al. [SHG95]<sup>[2]</sup> sur des rats Fisher implantés avec un histiocytome fibreux auxquels a été injecté du Doxil/Caelyx à une dose de 6 mg/kg, une concentration de doxorubicine accumulée dans la tumeur ( $[Dox] = 10,92 \mu\text{g/g}$  à 48 h) quasi identique à celle que nous mesurons. Dans cette même étude, l'accumulation de doxorubicine libre dans la tumeur a été mesurée pour une dose injectée de 6 mg/kg. Le pic d'accumulation se produit 4 h après injection avec une concentration de dox mesurée de 0,8  $\mu\text{g/g}$  soit  $\approx 13$  fois moins importante que pour une injection de Doxil ou de la formulation 26. Ces résultats montrent le bénéfice de l'encapsulation pour une même dose injectée de doxorubicine et confirment que l'accumulation obtenue dans la tumeur avec la formulation 26 est satisfaisante.

#### 4.4.3 Conclusion

Cette étude de bio distribution complémentaire a permis de situer dans le temps le pic d'accumulation des liposomes de la formulation 26 dans la tumeur pour deux dosages de doxorubicine de 3 mg/Kg et 6 mg/Kg. Ce pic d'accumulation se situe à environ 48 h après injection pour le plus haut dosage et entre 24 et 48 h pour le plus faible dosage. Nous avons constaté que la cinétique de la clairance sanguine dépend de la dose de liposomes injectée. Dans la circulation sanguine et dans tous les organes analysés, la clairance de la doxorubicine est totale environ 7 jours après injection.

[1] D C Drummond, O Meyer, K Hong, D B Kirpotin, and D Papahadjopoulos. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews*, 51(4):691–743, December 1999. PMID: 10581328.

[2] T SIEGAL, A HOROWITZ, and A GABIZON. DOXORUBICIN ENCAPSULATED IN STERICALLY STABILIZED LIPOSOMES FOR THE TREATMENT OF a BRAIN-TUMOR MODEL - BIODISTRIBUTION AND THERAPEUTIC EFFICACY. *JOURNAL OF NEUROSURGERY*, 83(6):1029–1037, December 1995.

La bio distribution des liposomes de la formulation sélectionnée à différents dosages est maintenant connue en particulier dans la tumeur. L'accumulation dans la tumeur est plus importante pour la dose de 6 mg/Kg que pour la dose de 3 mg/Kg. Dans les deux cas, elle semble satisfaisante pour réaliser des études *in vivo* sur des rats en appliquant des ultrasons sur la tumeur.

## 4.5 Première preuve de concept *in vivo*

### 4.5.1 Introduction

Connaissant le délai après injection où l'accumulation des liposomes est maximale, il est maintenant possible de tester l'application d'ultrasons sur la tumeur en combinaison avec une injection de liposomes. Pour cela, un dispositif ultrasonore a été mis au point. L'un des objectifs de cette étude est de vérifier que ce dispositif expérimental permet une délivrance efficace d'une dose de cavitation cible dans la tumeur. On comparera également les résultats de traitements combinant liposomes et ultrasons avec ceux d'autres traitements.

Au vu de l'étude de bio-distribution précédente, la dose de doxorubicine liposomale de 6mg/Kg a été choisie car elle induit une plus forte accumulation de liposomes dans la tumeur qui sera plus propice à une optimisation du traitement ultrasonore.

### 4.5.2 Matériel et Méthodes

#### 4.5.2.0.5 Produits chimiques et médicaments utilisés

Pour anesthésier les rats durant les diverses manipulation sur les animaux, il est utilisé de la Ketamine (Imalgène 1000, 100mg/ml, Merial SAS, France) et de la xylazine (Rompun 2%, Bayer-Pharma Santé Animale, France) ou de l'isoflurane belamont (Nicholas Piramal Ltd, United Kingdom). Du Dolethal (Vetoquinol, Paris, France) est administré pour l'euthanasie des rats.

Pour préparer des fantômes de gel, de la gelatine et de l'Agar sont achetés chez Sigma-Aldrich Corp (Saint Louis, MO, USA).

Les liposomes utilisés sont ceux de la formulation 26 (CCD6-26) testés lors des études de bio distribution précédentes. Ils ont été décrits section 2.4.1.1.

Cette formulation de liposomes a montré une excellente stabilité après deux jours d'incubation à 37 ° C dans du sérum 20%. En effet, aucun largage de DXR n'a été observé par analyse fluorimétrique au bout des deux jours. Ces liposomes sont également peu sensibles à la température car après 15 minutes d'exposition à 60 ° C dans du sérum 20%, seulement 4% de largage a été mesuré.

#### 4.5.2.0.6 Montage expérimental et procédure de traitement aux ultrasons

Le montage expérimental et la méthode de sélection du contour de la tumeur sont résumés schématiquement par la figure 4.16.

Le rat est suspendu à un système de platines motorisées 3D avec une nacelle en PVC inclinée à  $\approx 45^\circ$  de façon à ce que l'abdomen et la tumeur soient immergés dans l'eau dégazée maintenue à  $37^\circ\text{C}$ . La nacelle en PVC présente une fenêtre acoustique qui permet le traitement de la tumeur, celle-ci étant maintenue autant que possible hors de l'abdomen à l'aide d'un élastique (c.f figure 4.3 b). Les platines, pilotées par un contrôleur de mouvement (ESP300, Newport, Irvine, Californie) et reliées à l'ordinateur par GPIB permettent de programmer le déplacement du rat pour traiter toute la tumeur.

Le "bloc d'émission ultrasonore" est le même que celui utilisé pour les expériences *in vitro* (c.f section 2.3.1.1). De même, le "bloc d'écoute" de la cavitation avec calcul en temps réel de "l'ancienne" dose de cavitation (DC) est conservé (c.f section 2.3.1.2). En effet, ces expériences correspondent chronologiquement à la mise au point de la première dose de cavitation. L'hydrophone d'écoute est toujours placé à une distance de 15 mm de la zone focale mais cette fois sur un support situé au fond de la cuve, pour des raisons pratiques.

Une sonde échographique (Ultrasonix L14 5W/60 : barrette linéaire 5-14MHz large de 59mm), reliée à un échographe (Ultrasonix 500 RP), est placée dans le plan passant par le centre de la zone focale et perpendiculaire à l'axe d'émission acoustique  $z$  (c.f figure 4.16) de façon à permettre le repérage et positionnement de la tumeur. Un programme informatique (combinaison de Matlab et de C) a été spécialement réalisé pour procéder à la sélection de la tumeur et au traitement ultrasonore.

La procédure de positionnement et traitement de la tumeur est la suivante :

1. **Repérage et marquage de la zone focale** : avant le début de l'expérience, un champ acoustique est réalisé de façon à repérer la zone focale et la matérialiser par une flèche sur l'écran de l'échographe.
2. **Recherche du plan médian de la tumeur** : le rat, maintenu sous anesthésie, est placé dans la cuve suspendu dans la nacelle et déplacé jusqu'à ce que la tumeur apparaisse à l'écran. Il est déplacé par l'opérateur suivant l'axe  $z$  via le programme de façon à trouver les extrémités de la tumeur en la faisant apparaître et disparaître. Pour chaque extrémité, l'opérateur clique sur un bouton approprié de l'interface de façon à enregistrer les coordonnées. Le programme se positionne ensuite automatiquement sur le plan médian de la tumeur suivant cet axe.
3. **Sélection du contour de la tumeur** : l'opérateur déplace le rat dans le plan  $xy$  de façon à faire coïncider la flèche de la zone focale avec un point du bord de la tumeur. Il enregistre ce point via le programme et réitère l'opération jusqu'à décrire le contour de la tumeur (c.f figure 4.16).
4. **Traitement de la tumeur** : Le programme utilise le contour sélectionné pour

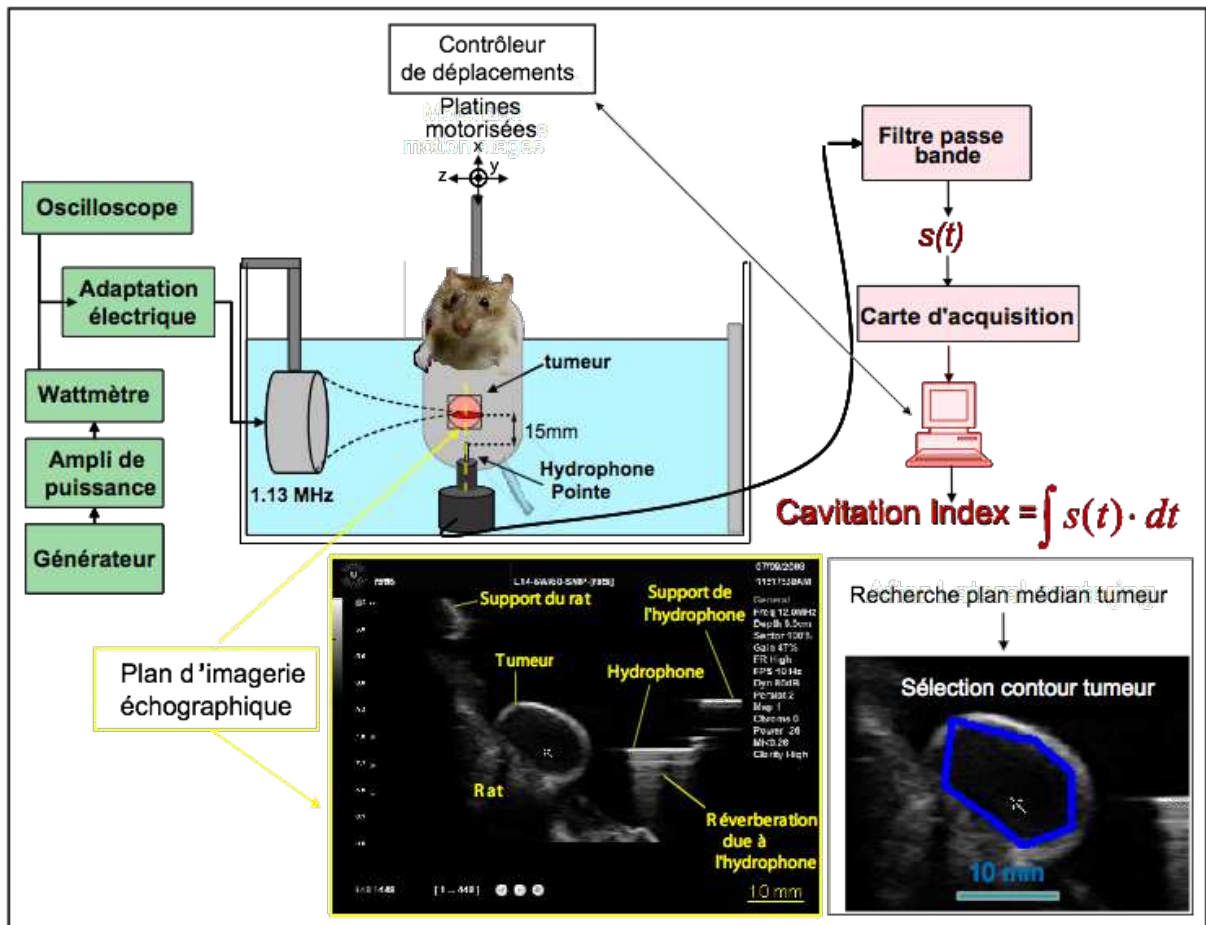


FIGURE 4.16 – Schéma expérimental

créer une grille de tir pour traiter la tumeur. L'opérateur rentre dans le programme les paramètres de tirs ultrasonores et la dose de cavitation à atteindre par point et lance le traitement. Afin d'éviter un échauffement trop important de la tumeur, les tirs sont effectués dans un ordre aléatoire pour éviter de tirer successivement sur deux zones adjacentes (c.f figure 4.17). De plus, la dose de cavitation est atteinte en deux temps pour chaque point en décrivant la grille de tir aléatoire deux fois. En pratique, le programme calcule pendant le tir la dose de cavitation instantanée et stoppe le tir quand la moitié de la dose cible est atteinte avant de déplacer le rat pour effectuer le tir suivant. Une fois la grille de tir achevée, elle est recommencée pour atteindre la dose de cavitation cible par point.

5. **Images échographiques** : Des images échographiques sont prises systématiquement avant et après traitement de façon à constater les éventuels changements induits par le traitement ultrasonore. Quelques images sont prises pendant les traitements.

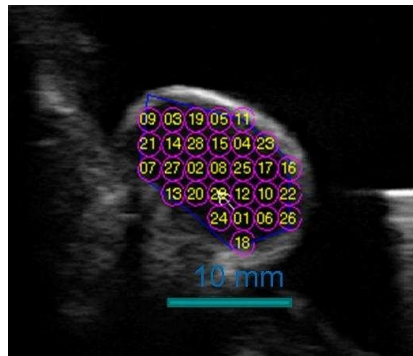


FIGURE 4.17 – Grille de tirs ultrasonores dans la tumeur généré aléatoirement par le programme informatique dans le contour sélectionné.

#### 4.5.2.0.7 Choix des doses de cavitation pour les traitements

Avant de discuter du choix des doses à proprement parler, il nous faut donner un peu plus d'informations sur la formulation de liposomes 26 utilisée. Nous avons mentionné précédemment que cette formulation avait été sélectionnée par nos partenaires pour sa stabilité dans le sérum, sa sono-sensibilité acceptable *in vitro* et la possibilité d'être fabriquée à grande échelle. Cette formulation de liposomes faisant partie de la première génération de liposomes, elle a tout d'abord été testée par nos partenaires dans un système (commercial) à 40 kHz avant que notre dispositif *in vitro* ne soit au point. Elle a été sélectionnée suite à ces tests pour les études de bio-distribution, car dans le système à 40 kHz les liposomes de cette formulation sont significativement plus sono-sensibles que ceux de la formulation Caelyx.

Nous avons ensuite testé cette formulation dans notre dispositif avant les expériences *in vivo* et nous avons trouvé une sono-sensibilité identique aux liposomes Caelyx (c.f figure 4.18). Cependant, le largage de doxorubicine de la formulation Caelyx étant relativement élevé dans notre système (beaucoup plus que dans le système à 40 kHz fonctionnant à de faibles puissances), nous avons jugé acceptable le choix de cette formulation pour les expériences *in vivo*.

Les paramètres de tirs ultrasonores et les doses de cavitation à atteindre pour chaque tir sont déterminés en faisant un compromis entre un taux maximum de largage de chimiothérapie et un dépôt minimum d'énergie ultrasonore. Ceci afin de limiter l'échauffement des tissus et des lésions sur la peau.

Différentes études préliminaires ont permis la sélection des paramètres ultrasonores.

Des tests *in vitro* menés sur des fantômes de gel représentatifs des tissus (mélange d'Agar (2%) et de gélatine (6%) dans de l'eau déionisée) ont d'abord permis de comparer différents paramètres ultrasonores pulsés et de retenir deux conditions d'exposition qui nécessitaient le moins d'énergie pour atteindre une dose de cavitation donnée (DC=40

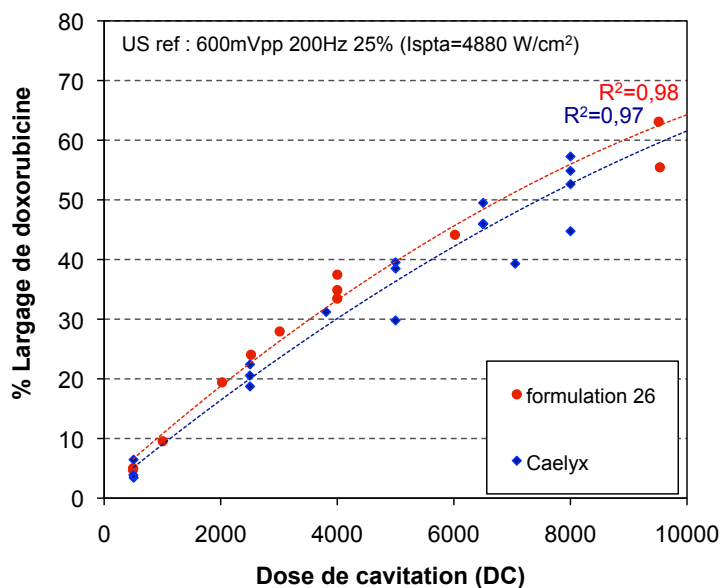


FIGURE 4.18 – Comparaison du taux de largage de doxorubicine de la formulation 26 avec celui du Caelyx dilué au 1/500 dans du sucrose. La condition d'exposition US de référence est utilisée.

mV.s) en un minimum de temps (conditions 3 et 8 voir figure 4.19 où une partie de ces tests sont présentés).

Ces conditions d'exposition ont ensuite été testées sur du Caelyx pour étudier si elles induisaient suffisamment de libération de doxorubicine comparativement à nos paramètres ultrasonores de référence *in vitro*. Notons que ces tests ont été fait sur du Caelyx (de sono-sensibilité équivalente à la formulation 26) pour des raisons d'indisponibilité des liposomes de la formulation 26 au moment des tests. On peut voir sur la figure 4.20 que les deux conditions d'exposition sélectionnées induisent toutes deux des taux de libération de doxorubicine importants (allant jusqu'au double du taux de libération avec les paramètres ultrasonores de références). La condition d'exposition 3 induit les taux de largages les plus élevés avec très peu de dispersion (taux de largages très reproductibles). De plus, elle nécessite un peu moins d'énergie dans le gel que la condition 8 pour atteindre  $DC=40$  (c.f figure 4.19). Le temps pour atteindre cette dose est un peu plus élevé pour la condition 3 que pour la condition 8 mais reste très raisonnable (3s).

Par conséquent, la condition d'exposition 3 est retenue. Ces paramètres ultrasonores sont en détail : une fréquence de répétition de 200Hz, un rapport cyclique de 5%, une intensité pic de  $11200 \text{ W/cm}^2$  (pression pic de 19MPa) correspondant à une intensité moyenne de  $560 \text{ W/cm}^2$  ( $I_{spta}$ ).

Deux doses de cavitations cibles par point de tir (doses élémentaires) sont retenues avec les paramètres ultrasonores sélectionnés. La dose dite forte ( $DC=80 \text{ mV.s}$ ) a été

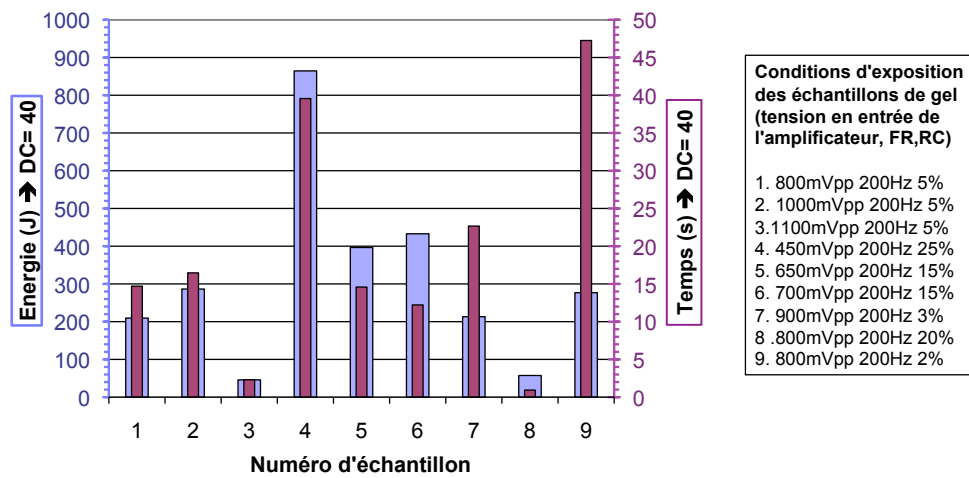


FIGURE 4.19 – Comparaison de l'énergie et du temps nécessaires pour atteindre une dose de cavitation arbitraire de 40 pour diverses conditions d'insonification de fantômes fabriqués avec un mélange de gel et d'Agar.

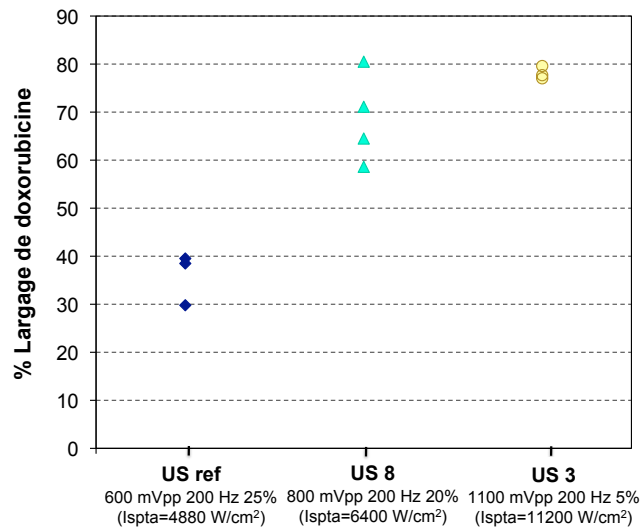


FIGURE 4.20 – Taux de largage de doxorubicine de la formulation Caelyx à DC = 5000 pour les conditions d'exposition US 3 et US 8 comparativement avec la condition US ref (dilution au 1/500 dans du sucrose)

fixée de façon à libérer un maximum de chimiothérapie (largage proche de 100% *in vitro*) mais induit potentiellement une élévation de température non négligeable dans les tissus. La dose dite faible (DC=32 mV.s) limite potentiellement l'élévation de température dans les tissus mais induit *in vitro* un largage de l'ordre de 50%. Ces doses de cavitation par tir pour l'*in vivo* sont extrapolées des doses *in vitro* correspondant au largage voulu de chimiothérapie. *In vitro*, les liposomes, grâce au streaming dans l'échantillon, passent dans la zone focale un certain nombre de fois. On fait l'hypothèse que ce nombre de passage "n" dans la zone focale est égal au volume de la fiole divisé par le volume de la focale ( $n=4300/41=104.87$ ) et que les liposomes larguent leur contenu uniquement



lorsqu'ils se trouvent dans la zone focale. Comme *in vivo* ce phénomène de streaming n'est pas possible dans les tissus, les liposomes qui libèrent la chimiothérapie sous l'action des ultrasons ne peuvent bouger de la zone focale et doivent donc recevoir une dose de cavitation élémentaire. Cette dose s'obtient en divisant la dose de cavitation totale appliquée à l'échantillon *in vitro* par le nombre de passage "n" devant la focale.

La méthode de calcul utilisée est bien entendu approximative mais ne pouvant pas connaître le taux de largage *in vivo* engendré par la condition d'exposition sélectionnée, il faut faire des choix de dose de cavitation basés sur les données en notre possession.

Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné précédemment, la dose cible par zone de tir sera atteinte en deux passages (DC/2 à chaque passage) et la tumeur sera insonifiée aléatoirement afin de ne pas tirer successivement sur deux zones voisines. Ces deux mesures permettent de diminuer l'échauffement des tissus.

#### 4.5.2.0.8 Animaux, groupes de traitement et suivi après traitements

Le modèle animal et tumoral et le matériel nécessaire à l'implantation des tumeur sont décrits section 4.2.3.1. Les 63 rats de l'étude ont développé une tumeur Dunning AT2 après implantation de fragments tumoraux provenant de 7 rats d'amplification selon la méthode précédemment décrite section (c.f 4.2.3.1). A J12 ces tumeurs ont une largeur moyenne sur l'axe acoustique de  $14 \pm 3$  mm. Les rats pèsent en moyenne  $238 \pm 45$ g. Pour des raisons pratiques, tous les groupes n'ont pas été implantés le même jour.

Les rats sont répartis en 7 groupes de 9 rats :

- . le groupe A (n = 9) : témoin
- . le groupe B (n = 9) : ultrasons à faible dose
- . le groupe C (n = 9) : ultrasons à forte dose
- . le groupe D (n = 9) : doxorubicine liposomale
- . le groupe E (n = 9) : doxorubicine libre + ultrasons à forte dose
- . le groupe F (n = 9) : doxorubicine liposomale + ultrasons à faible dose
- . le groupe G (n = 10) : doxorubicine liposomale + ultrasons à forte dose (un rat de plus est inclus dans ce groupe car un rat supplémentaire a été livré)

Les injections en intra-veineuse de doxorubicine (6 mg/kg) libre ou encapsulée (groupes D, E, F et G) ont été pratiquées à J10 après l'implantation du fragment tumoral. Les rats des groupes B, C, E, F et G ont été exposés aux ultrasons à J12, soit 48h après injection lorsque l'accumulation des liposomes est maximale dans la tumeur pour les groupes ayant reçu des liposomes (c.f étude de bio distribution section 5.2.3.2).

Les expositions aux ultrasons ont été réalisées en maintenant les animaux sous anesthésie générale gazeuse par isoflurane (1,5%) au masque. Les rats sont ensuite détachés de la nacelle, enroulés dans une couverture de survie et placés provisoirement dans un box de

réveil.

Le critère d'analyse principal de cette étude est l'évolution de la "surface" tumorale dans chaque groupe après traitement (c.f figure 4.4). Le poids des animaux est également suivi tout au long de l'étude et tout signe extérieur particulier repéré chez l'animal est consigné. Tous les groupes n'ayant pas été implantés au même moment, les jours de suivi sont un peu différents selon les groupes :

- . Groupe A : J10, 14, 18, 21, 25, 28, 31, 36
- . Groupe B et E : J10, 15, 17, 22, 25, 28, 31, 35
- . Groupe C et D : J10, 13, 18, 20, 25, 28,31, 34
- . Groupe F et G : J11, 13, 18, 21, 24, 27, 31, 34

Les rats sont euthanasiés entre J34 et J36 par inhalation de CO<sub>2</sub>. Les foies et tumeurs de chaque rat sont alors prélevés, pesés et congelés avec de l'azote puis conservés à -20°C. Des analyses statistiques complètes selon la méthode décrite en Annexe 1 sont menées pour comparer les différents groupes en terme d'évolution de la surface tumorale, de poids des rats et de poids des tumeurs après sacrifice. Pour faciliter l'analyse des résultats, la surface tumorale (ST) de chaque rat aux différents jours de suivi est tout d'abord centrée par rapport aux surfaces tumorales de l'ensemble des rats à J10 (exemple :  $ST_{centré_{groupeA\ rat1}(J25)} = ST_{groupeA\ rat1}(J25) - moyenne[ST_{groupeA}(J10)] + moyenne[ST_{tous\ groupes}(J10)]$ ). Le centrage permet de comparer l'évolution des surfaces tumorales de tous les groupes quelles que soient les tailles de tumeurs initiales à J10. On peut ensuite si on le souhaite "normaliser" (ou réduire) les surfaces tumorales obtenues en divisant par la moyenne des surfaces tumorales de l'ensemble des rats à J10 (exemple :  $ST_{centré\ norm_{groupeA\ rat1}(J25)} = \frac{ST_{centré_{groupeA\ rat1}(J25)}{moyenne[ST_{tous\ groupes}(J10)]}$ ).

### 4.5.3 Résultats et discussion

#### 4.5.3.0.9 Observations liées au traitement et au suivi

- ◇ Les différentes injections en IV de liposomes ou de doxorubicine sont réalisées sans difficulté. Les temps de 48h entre les injections et l'application des ultrasons sont respectés au plus près :
  - . Groupe E : 47,96 ± 0.08 h
  - . Groupe F : 48,24 ± 0.13 h
  - . Groupe G : 48,11 ± 0.15 h
- ◇ Le premier groupe traité est le groupe C. On observe une cavitation importante sur l'interface eau-peau de la tumeur sur l'axe acoustique z du côté transducteur. Ce phénomène induit des dommages importants sur la peau et diminue la pénétration de l'onde acoustique dans la tumeur. Nous avons alors décidé, pour les groupes suivants, **de décaler les rats de 2 mm vers le transducteur selon l'axe z**

**de façon à atténuer ce phénomène.** La sélection du contour de la tumeur se fait par conséquent sur un plan décalé de 2 mm par rapport au plan médian de la tumeur. Tous les autres groupes sont traités avec ce décalage.

- ◇ Aucun décès consécutif au traitement ultrasonore n'est constaté. Le temps d'anesthésie total est limité à 30 minutes. Sur toute la période du suivi pour tous les groupes, 3 décès sont déclarés :
  - . Un rat du groupe B est mort à J31 après implantation. Son autopsie n'a pas révélé de métastases à distance, son état ne paraissait pas suspect les jours précédents.
  - . Deux rats du groupe E sont morts à J28 et J35. Le premier rat a perdu 28% de son poids entre J10 et J25, il a été isolé de ses congénères quelques jours avant sa mort. La perte de poids est très certainement liée au traitement chimiothérapeutique. On peut noter qu'il présente un poids inférieur aux autres rats au début du protocole. Le deuxième rat présente à partir de J20 une infection au niveau de la queue. On peut supposer que cette infection s'est propagée et a engendré la mort à J35.

#### 4.5.3.0.10 Analyse des zones et temps de traitements ultrasonores

Une analyse de toutes les données issues des traitements ultrasonores sur les rats est menée et révèle que :

- ◇ Les zones de traitement sélectionnées ont une aire variant de 1 cm<sup>2</sup> à 3 cm<sup>2</sup> (moyenne 2,1 cm<sup>2</sup>, écart type 0,7 cm<sup>2</sup>). Le nombre de tirs par passage correspondant sont compris entre 12 et 36 (moyenne 25,9, écart type 8,8). La distance moyenne entre deux tirs consécutifs est de 6.2 mm. Ceci prouve que la grille de tir aléatoire permet bien d'éviter les tirs consécutifs sur des zones voisines.
- ◇ Les doses de cavitation visées sont toujours atteintes.
- ◇ Les expositions aux ultrasons durent entre 140 et 486 s, selon la taille de la zone à traiter et la dose de cavitation à appliquer.
- ◇ La durée des tirs lors du premier balayage de la tumeur est proche de celle des tirs lors du second balayage (écart moyen 2,4%).
- ◇ La durée des tirs et l'énergie déposée par tir diffèrent peu d'un rat à l'autre à l'intérieur d'un même groupe (c.f Table 4.21).
- ◇ En comparant les groupes ayant reçu les mêmes doses ultrasonores, on constate que les deux groupes ultrasons faibles (B et F) sont homogènes. Les groupes ultrasons fort E et G sont homogènes mais le groupe ultrasons fort C présente des temps de traitement et une énergie déposée significativement inférieurs à ceux des groupes E et G. Cet écart peut provenir de la cavitation observée à l'extérieur de la tumeur qui aurait permis d'atteindre la dose de cavitation plus rapidement. En

effet, ce groupe n'a pas le décalage de 2 mm vers le transducteur appliqué aux groupes suivants comme expliqué dans la section précédente.

Notons que les durées de tirs pour la dose faible DC=32 ( $t = 2,65$  s en moyenne) sont très proches des durées de tirs dans le fantôme pour la dose de cavitation DC=40 ( $t = 3$  s en moyenne soit  $t = 2,4$  s ramené à DC=32) ce qui montre que le fantôme était un modèle pertinent.

Groupe	Dose	Durée moyenne d'exposition par position de tir (écart type)	Energie moyenne déposée par position de tir (écart type)
<b>B</b>	Faible	2,6s (0,13s)	38,7J (4,6J)
<b>C</b>	Forte	4,7s (0,25s)	92,9J (6,4J)
<b>E</b>	Forte	5,6s (0,35s)	112,7J (7,6J)
<b>F</b>	Faible	2,7s (0,13s)	40,8J (3,4J)
<b>G</b>	Forte	6,2s (0,42s)	125,45J (9,5J)

FIGURE 4.21 – *Durée moyenne d'exposition aux ultrasons et énergie moyenne déposée par zone de tir (somme des deux passages par zone) par groupe de rats traités. L'écart type à l'intérieur de chaque groupe est précisé.*

#### 4.5.3.0.11 Analyse des images échographiques

De l'analyse des images échographiques ressort trois points principaux illustrés par la figure 4.22 :

1. Dans la majorité des cas, une zone hyper-échogène transitoire est observée sur la zone focale pendant les tirs
2. Dans certains cas, pour certains tirs sur les zones superficielles de la tumeur, une zone hyper-échogène transitoire est observée dans l'eau, à la surface de la tumeur
3. Pour 37% des rats traités, des zones hyper-échogènes persistent après traitement :
  - . 80% de ces rats appartiennent aux groupes ultrasons forts E et G
  - . 20% de ces rats appartiennent aux groupes ultrasons faibles B

Il semblerait logique que les zones hyper-échogènes transitoires correspondent à de la cavitation ultrasonore, vu que ces zones sont observées pendant quasiment tous les tirs à la focale et que l'on détecte parallèlement du bruit de cavitation. Des films capturés pendant quelques tirs montrent que cette zone est constituée de tâches brillantes de la taille du speckle bien représentatives de petites bulles, le tout oscillant à la façon d'un nuage de bulles. Il peut donc s'agir de cavitation ou d'ébullition. On suppose qu'il s'agit de cavitation dans les cas où ces zones hyper-échogènes disparaissent après traitement.

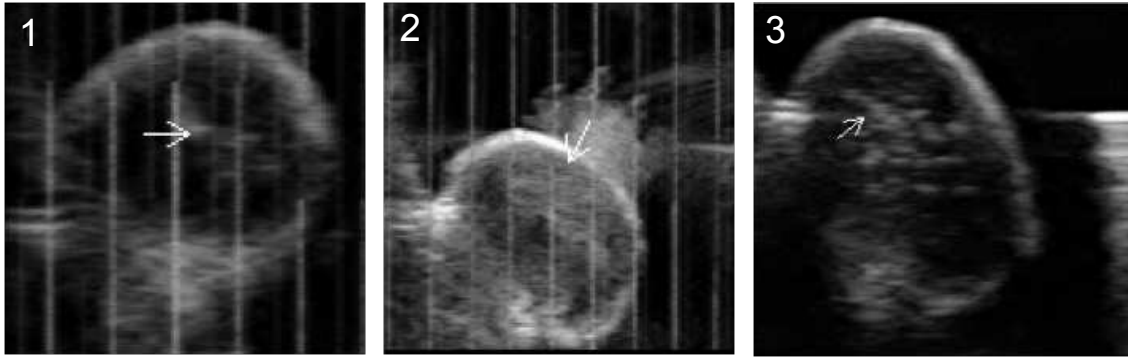


FIGURE 4.22 – Images échographiques types enregistrées pendant ou après traitement. (1) Apparition d'une zone hyper-échogène pendant le tir. (2) Cavitation à la surface de la tumeur lors d'un tir superficiel. (3) Zones hyper-échogènes persistantes après traitement.

Par ailleurs, la cavitation en surface pour les tirs superficiels n'a rien de surprenant. En effet, même si l'eau est dégazée et la tumeur du rat rasée avant traitement, l'eau est vite remplie de poils de rats et autre poussières qui servent de germes de cavitation à l'extérieur de la tumeur, l'interface de celle-ci étant de plus déjà propice à l'initiation de la cavitation dans l'eau.

En ce qui concerne les zones hyper-échogènes persistantes, on peut se demander s'il s'agit de zones endommagées suite à une cavitation intense ou suite à de l'ébullition. Ce qui est certain, c'est que ces zones sont bien plus présentes pour les fortes doses d'ultrasons que pour les faibles doses. Ceci a déjà été observé notamment par Coussios et al. [CFHR07b]<sup>[1]</sup> qui montrent que ces zones hyper-échogènes persistantes n'apparaissent qu'au dessus d'un seuil de pression donné et d'un temps donné. Parallèlement, la mesure du bruit large bande caractéristique de la cavitation inertielle avec un PCD, montre que la cavitation est détectée pour des seuils de pression et des temps bien plus courts que ceux nécessaires à l'apparition d'une zone hyper-échogène persistante. Coussios et al. ainsi que plusieurs de leurs confrères ([FHR09]<sup>[2]</sup>, [RZCV06]<sup>[3]</sup>, [RZV05]<sup>[4]</sup>, [VSM<sup>+</sup>01]<sup>[5]</sup>), expliquent la création de cette zone hyper-échogène persistante par l'ap-

- 
- [1] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU) (vol 23, pg 105, 2007). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(3):327–327, May 2007.
  - [2] CH Farny, RG Holt, and RA Roy. TEMPORAL AND SPATIAL DETECTION OF HIFU-INDUCED INERTIAL AND HOT-VAPOR CAVITATION WITH a DIAGNOSTIC ULTRASOUND SYSTEM. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 35(4):603–615, April 2009.
  - [3] BA Rabkin, V Zderic, LA Crum, and S Vaezy. Biological and physical mechanisms of HIFU-induced hyperecho in ultrasound images. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 32(11):1721–1729, November 2006.
  - [4] BA Rabkin, V Zderic, and S Vaezy. Hyperecho in ultrasound images of HIFU therapy: Involvement of cavitation. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 31(7):947–956, July 2005.
  - [5] S Vaezy, XG Shi, RW Martin, E Chi, PI Nelson, MR Bailey, and LA Crum. Real-time visualization of high-intensity focused ultrasound treatment using ultrasound imaging. *ULTRASOUND IN MEDICINE*

parition de large bulles d'ébullition entretenues par le champ acoustique. L'apparition des ces bulles serait liée à l'échauffement du milieu qui induit un changement de ces propriétés et une extinction progressive de la cavitation.

Ces explications semblent concorder avec les observations des images échographiques et le dosage de la cavitation inertielle réalisés dans notre étude. En effet, la dose de cavitation est atteinte dans tous les cas, ce qui montre qu'il y a eu cavitation inertielle pendant tous les tirs. De plus, les zones hyper-échogènes persistantes sont observées principalement pour les groupes ayant reçu des ultrasons à forte dose, c'est à dire avec un temps de traitement au moins 2 fois plus important que les groupes ultrasons à faible dose. Il y aurait donc eu dans ces cas, comme décrit par Coussios et al, une période de cavitation inertielle suivie d'une période d'ébullition. Cette dernière se traduisant par l'apparition des zones hyper-échogène persistantes.

#### 4.5.3.0.12 Aspect visuel des tumeurs après traitement

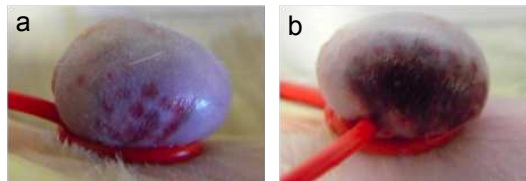


FIGURE 4.23 – *Dommmages types sur les tumeurs après traitement. (a) Dommmages légers où l'on peut compter les impacts. (b) Dommmages marqués dits "fusionnés"*

92% des rats présentent des dommages sur la peau de la tumeur après traitement. Ces dommages sont le plus souvent situés sur la tumeur du côté opposé au transducteur. Ils sont un peu plus nombreux pour les groupes ayant reçu une dose forte d'ultrasons sauf pour le groupe C. Ce dernier groupe n'ayant pas été décalé de 2 mm vers le transducteur, on peut en déduire que ce décalage expose plus l'arrière de la tumeur aux ultrasons. Ceci est logique vu que la longueur focale du transducteur est de 13 mm pour des largeurs moyennes de tumeur sur l'axe acoustique de 14 mm à J12, les plus petites ayant une largeur de 10 mm. Ce décalage est cependant indispensable pour éviter la cavitation en avant de la tumeur et permettre une bonne pénétration des ultrasons.

Deux types de dommages sont observés. Des dommages légers de type hématomes où l'on peut en général compter les impacts sur la peau (c.f figure 4.23.a), et des dommages plus marqués de type brûlure où les impacts sont "fusionnés" (c.f figure 4.23.b). Dans le cas des "brûlures", on peut se demander si l'élévation de température a été tellement importante qu'elle aurait engendré des nécroses tissulaires. Ce point mérite d'être étudié de plus près lors de la prochaine manipulation *in vivo*.

Groupe	Dose	Dommages légers	Dommages dits « fusionnés »	Zone hyper-échogène persistante
<b>B</b>	Faible	1/9	8/9	5/9
<b>C</b>	Forte	4/9	3/9	0/9
<b>E</b>	Forte	8/10	2/10	7/10
<b>F</b>	Faible	6/9	2/9	0/9
<b>G</b>	Forte	6/9	3/9	5/9

FIGURE 4.24 – Tableau récapitulatif des dommages apparents sur les tumeurs induits par le traitement ultrasonore sur les tumeurs

Contrairement à ce que nous attendions, les dommages marqués ne sont pas plus importants chez les groupes ultrasons forts que chez les groupes ultrasons faibles (c.f Tableau 4.24), le groupe B étant pour une raison inconnue, un cas particulier.

Par ailleurs, nous avons constaté que les rats pour lesquels une zone hyper-échogène

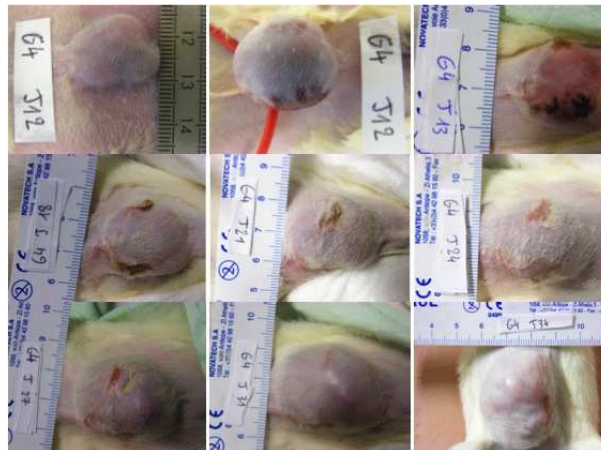


FIGURE 4.25 – Evolution de l'aspect de la tumeur d'un rat du groupe G (forte dose d'US) au cours du temps. Les photographies sont prises à J12 (avant et après traitement), J13, J18, J21, J24, J27, J31 et J34.

persistante avait été observée présentent dans 16 cas sur 17 une brûlure de type fusionnée. Cette observation va dans le sens de l'analyse faite à la section précédente de l'origine possible de ces zones hyper-échogènes persistantes. S'il s'agit bien d'ébullition, les brûlures sont probablement induites par ce mécanisme.

Notons que ces brûlures se résorbent bien dans les jours qui suivent le traitement (c.f figure 4.25). En comparaison avec des brûlures induites par des ultrasons focalisés de haute intensité à visée d'ablation thermique sur le même modèle tumoral [CMV<sup>+</sup>92]<sup>[1]</sup>, ces brûlures sont modérées.

[1] J Y Chapelon, J Margonari, F Vernier, F Gorry, R Ecochard, and A Gelet. In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma dunning r3327. *Cancer Research*, 52(22):6353–6357, November 1992. PMID: 1423282.

#### 4.5.3.0.13 Evolution des surfaces tumorales au cours du temps

Tout d'abord, l'analyse statistique réalisée à l'intérieur de chaque groupe montre que les surfaces tumorales sont réparties quasi-systématiquement en décrivant une gaussienne autour de la valeur moyenne du groupe. Seul le groupe C fait exception ce qui peut s'expliquer par le problème de cavitation côté transducteur signalé précédemment. Cette exception valide le décalage de 2 mm vers le transducteur effectué pour les autres groupes. Ce décalage permettrait *a priori* une cavitation plus reproductible au sein de la tumeur induisant une croissance tumorale plus uniforme au sein de chaque groupe.

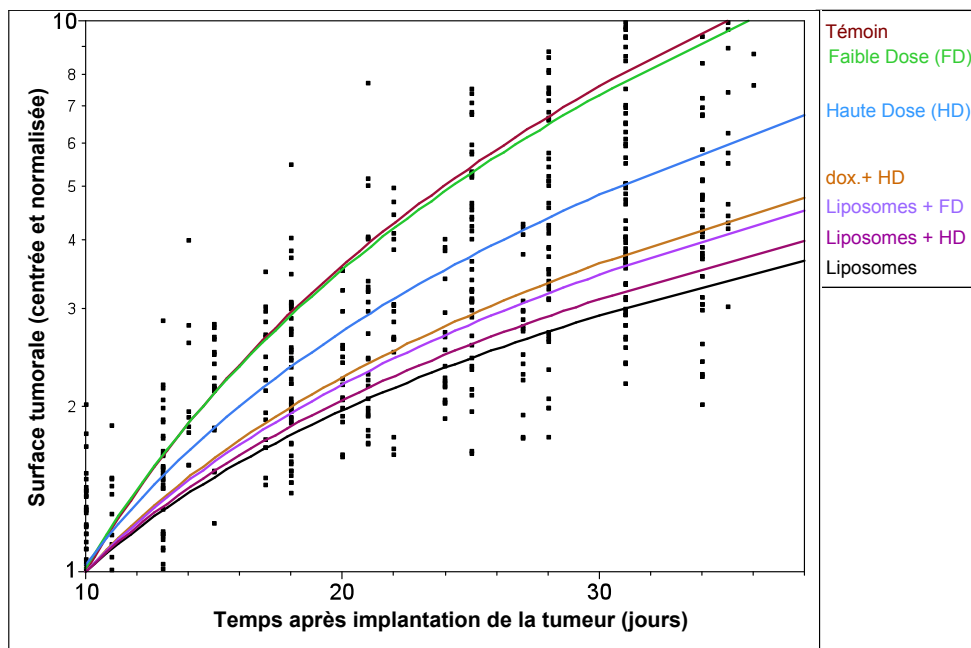


FIGURE 4.26 – Evolution de la surface tumorale centrée et normalisée après injection à J10 pour les groupes recevant de la doxorubicine (forme libre ou liposomale) et traitement à J12 pour les groupes recevant des ultrasons.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution de la surface tumorale normalisée au cours du temps par groupe de rats (c.f 4.26). Afin d'homogénéiser les variances au cours du temps, une transformation logarithmique est appliquée aux surfaces tumorales normalisées. Les relevés de surface n'ayant pas été effectués le même jour, il n'est pas possible de comparer directement les groupes par des tests statistiques tels qu'Anova. Ce sont donc les intervalles de confiance à 95% calculés pour chaque groupe qui vont nous permettre de conclure sur les différences existant ou non entre ces groupes :

- ◊ Il n'existe pas de différence significative entre le groupe A (témoin) et le groupe B (ultrasons faible). Par contre, il existe une différence importante entre le groupe A et le groupe C (ultrasons forts). On peut donc conclure que le traitement appliqué avec une dose de cavitation faible n'a pas d'effet sur la croissance tumorale alors



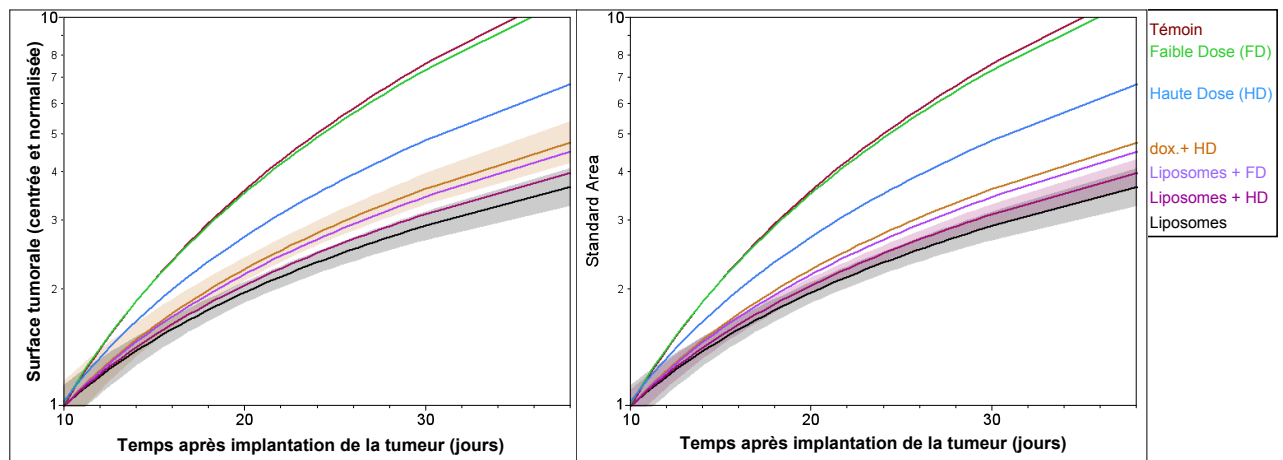


FIGURE 4.27 – Evolution de la surface tumorale centrée et normalisée après injection à J10 pour les groupes recevant de la doxorubicine (forme libre ou liposomale) et traitement à J12 pour les groupes recevant des ultrasons. Représentation des intervalles de confiance à 95% pour illustrer la comparaison de certains groupes.

que le traitement avec une dose de cavitation forte ralentit significativement la croissance tumorale.

- ◇ Il existe une différence importante entre les groupes ultrasons seuls B et C et tous les groupes ayant reçu un traitement à base de doxorubicine (liposomale ou libre) que ce traitement soit combiné ou non avec des ultrasons. Les traitements ultrasonores de cette étude appliqués seuls ont donc un impact limité sur la croissance tumorale en comparaison avec l'impact des traitements à base de doxorubicine combinés ou non avec des ultrasons.
- ◇ Le groupe E (doxorubicine libre + ultrasons forte dose) et le groupe F (liposomes + ultrasons faible dose) ont le même effet sur la croissance tumorale. Par contre, le groupe G (liposomes + ultrasons forte dose) ralentit la croissance tumorale de façon significativement plus importante que le groupe E. De même, le groupe D (liposomes) est plus efficace que le groupe E. La doxorubicine sous forme liposomale semble donc plus efficace que la doxorubicine libre.
- ◇ Le groupe G (liposomes + ultrasons forte dose) a une courbe de régression située au dessus du groupe F (liposomes + ultrasons faible dose), mais n'est pas significativement différent de celui-ci. Nous avons précédemment constaté que les ultrasons à forte dose seuls induisent un ralentissement de la croissance tumorale contrairement aux ultrasons à faible dose seuls qui n'ont aucun effet sur celle-ci. Pourtant, la combinaison des liposomes avec l'un ou l'autre de ces traitements induit le même ralentissement de la croissance tumorale.
- ◇ Le groupe D (liposomes) est légèrement plus efficace que le groupe F (liposomes + ultrasons faible dose) pour ralentir la croissance tumorale. Le groupe G (liposomes

+ ultrasons forte dose) n'est lui pas significativement différent du groupe D (c.f figure 4.27).

Au vu des deux derniers points, on peut se demander si la dose de liposomes injectée n'est pas trop importante, ce qui aurait pour effet de masquer le traitement ultrasonore. Une autre hypothèse plausible est que les ultrasons n'induisent pas ou peu de largage de chimiothérapie des liposomes soit parce qu'ils sont mal dosés, soit parce que ces liposomes ne sont pas assez sensibles aux ultrasons. Nous avons en effet constaté que ces liposomes n'étaient pas beaucoup plus sensibles que le Caelyx *in vitro*. De plus, les doses ont été calculées basées sur le taux de largage *in vitro*. Il est probable que le largage soit bien inférieur *in vivo*. Les liposomes pourraient notamment perdre une partie de leur sensibilité à cause d'interactions avec les protéines et les cellules de la tumeur.

Ce qui est inattendu, c'est que les liposomes seuls soient plus efficaces que les liposomes combinés avec un traitement ultrasonore à faible dose, qui n'ont pourtant pas d'impact sur la croissance tumorale. Se pourrait-il que le traitement ultrasonore détruise des vascularisations de la tumeur, empêchant ainsi une bonne diffusion des liposomes et/ou de la dox libérée dans la tumeur, tout en n'ayant pas d'impact sur la croissance tumorale? Cet effet devrait alors être plus important pour le groupe liposomes combiné avec des ultrasons à forte dose (G), mais ce n'est pas ce qui est observé. Peut-être cet effet existe-t-il aussi dans le groupe G mais il serait masqué par un largage plus efficace sous la haute dose de cavitation voire par un effet synergétique entre liposomes et ultrasons. Une autre piste serait la libération spontanée du contenu des liposomes avant le traitement ultrasonore. En effet la stabilité de ces liposomes a été constatée sur deux jours à 37 ° C uniquement dans du sérum 20%. Il se pourrait que la stabilité ne soit pas si importante dans le sang et dans les tissus tumoraux.

#### 4.5.3.0.14 Comparaison du poids des tumeurs excisées

Le test de Levene appliqué au poids des tumeurs excisées montre l'absence d'homogénéité des variances. Afin de pouvoir continuer les traitements statistiques, une transformation logarithmique Népérien est appliquée au poids des tumeurs. Le groupe F doit cependant être exclu car la variance à l'intérieur de ce groupe est trop élevée pour permettre une comparaison avec les autres groupes malgré la transformation. Cette transformation permet d'avoir l'homoscédacité\* et la normalité de l'ensemble des données (groupe F exclu). Ainsi, une comparaison des groupes est réalisée avec le test de Tuckey-Kramer (c.f figure 4.28).

Les résultats de cette analyse révèlent que le traitement appliqué au groupe B n'induit pas de ralentissement de la croissance tumorale tandis que les traitements appliqués aux groupes C, G, E induisent un ralentissement modéré équivalent pour ces 3 groupes. Le traitement appliqué au groupe D induit un ralentissement tumoral plus important que tous les autres groupes. Ces résultats sont relativement proches de ceux obtenus

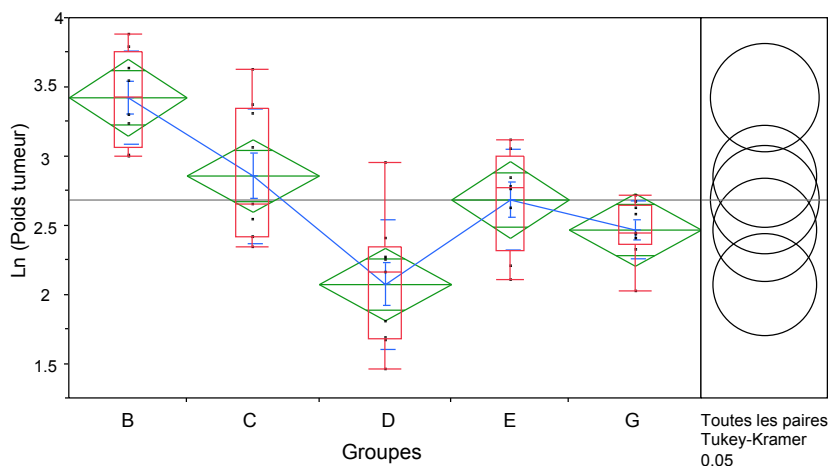


FIGURE 4.28 – Représentation en diamant de  $\text{Ln}(\text{Poids des tumeurs})$  excisées entre J34 et J36. Les cercles issus du test de Tukey-Kramer permettent une comparaison des groupes (c.f Annexe 2). Les erreurs et écarts types ainsi que les diagrammes d'observation des valeurs aberrantes sont également représentés (voir signification des diverses représentations en Annexe 2).

avec les surfaces tumorales avec toutefois des différences notables. En particulier, les jours de sacrifices varient de J34 à J36 suivant les groupes, ce qui peut influencer les résultats obtenus. Les grandes tendances restent toutefois les mêmes avec une efficacité plus importante du traitement liposome seul.

#### 4.5.3.0.15 Evolution du poids des rats après traitement

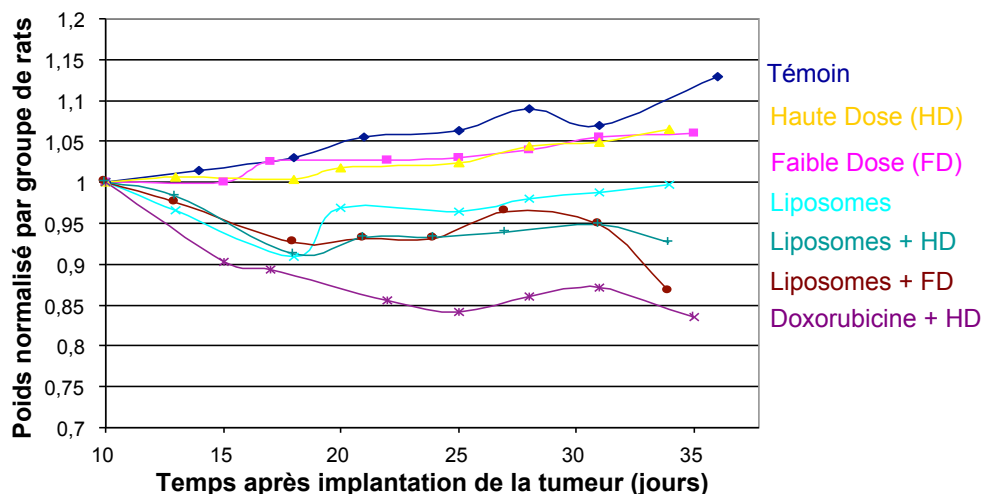


FIGURE 4.29 – Poids normalisé moyen par groupe de rats en fonction du temps.

Le groupe perdant le plus de poids est sans surprise le groupe ayant reçu de la doxorubicine libre avec une perte de poids allant jusqu'à 15% du poids initial de l'animal au moment du sacrifice. Par contre, les groupes ayant reçu une injection de liposomes (groupes D, F et G) perdent également du poids. Cette perte de poids est assez impor-

tante la première semaine. Le poids des rats de ces 3 groupes se stabilise ensuite avec même une reprise de poids sensible pour le groupe D (liposomes seuls). Les liposomes entraînent donc une réduction des effets secondaires dus à la doxorubicine. Cependant, il y a toujours perte de poids, ce qui soulève à nouveau la question d'une dose de doxorubicine liposomale peut-être un peu trop élevée.

#### 4.5.4 Conclusion

Cette première étude *in vivo* permet de valider le dispositif ultrasonore développé pour le traitement des tumeurs sous-cutanées au niveau abdominal chez le rat. En effet, ce système délivre de façon précise et reproductible une dose de cavitation cible sur la tumeur sans affecter d'autres tissus ou organes environnants.

Par ailleurs, cette étude montre l'efficacité de la formulation de doxorubicine sous forme liposomale par rapport à la doxorubicine libre sur la tumeur Dunning AT2 implantée chez le rat Copenhague. L'encapsulation permet un ralentissement accru de la croissance tumorale tout en réduisant la perte de poids. Cependant, une perte de poids est tout de même constatée, ce qui amène à se demander si la dose de doxorubicine injectée n'est pas trop importante. De plus, il n'y a pas eu d'effet synergétique constaté entre l'application des ultrasons et la formulation de doxorubicine. En effet, le groupe de liposomes seuls a été aussi efficace voire plus efficace que les groupes de liposomes associés avec des ultrasons. Ce qui amène plusieurs interrogations en plus de l'ajustement de la dose injectée. Les deux principales concernent les doses de cavitations appliquées et la sensibilité des liposomes aux ultrasons. On peut en effet se demander si les doses de cavitation appliquées sont appropriées pour libérer la chimiothérapie encapsulée dans les tissus et s'il est possible de libérer le contenu de cette formulation de liposomes *in vivo* sans induire de nécrose tissulaire. Pour finir, il se peut qu'il y ait une influence des variations des jours d'implantations et de suivi des rats sur l'étude statistique. Dans les prochaines études, ces jours d'implantation et de suivi seront dans la mesure du possible identiques pour tous les groupes.

## 4.6 Seconde preuve de concept *in vivo*

### 4.6.1 Introduction

L'étude *in vivo* précédente, tout en montrant l'efficacité d'un traitement de doxorubicine liposomale, n'a pas montré d'effet synergétique lié à l'association de liposomes et d'ultrasons. Une des hypothèses principales permettant d'expliquer ce manque de synergie est que la dose de liposomes injectée serait trop importante et induirait un masquage de cet effet synergétique. Dans cette étude, nous allons par conséquent étudier tout particulièrement l'influence de la dose de liposomes injectée sur la croissance tumorale pour

des groupes recevant un traitement ultrasonore ou non. Une dose d'injection plus faible de 3 mg/Kg a donc été rajoutée à l'étude. Cette dose a été choisie car nous savons qu'elle induit une accumulation significative dans la tumeur et nous connaissons son pic d'accumulation, grâce à l'étude de bio-distribution précédente. Une seule dose de cavitation cible est conservée, afin de limiter le nombre de rats de l'étude et permettre une implantation et un suivi des rats le même jour. C'est la dose de cavitation dite faible qui est retenue, et ce pour plusieurs raisons :

1. Contrairement à la dose de cavitation forte, elle n'induit pas de ralentissement de la croissance tumorale et elle est donc plus propice à la démonstration d'un effet synergétique entre ultrasons et liposomes.
2. Les zones hyper-échogènes persistantes observées après traitement dans les tumeurs étaient à 80% observée chez les rats traités par une dose de cavitation forte. Ces zones sont le plus souvent associées dans la littérature à de l'ébullition et donc à des dommages induits au sein de la tumeur.
3. Les dommages induits au niveau de la peau des tumeurs sont légèrement moins nombreux à faible dose qu'à forte dose sauf pour le groupe C.

#### 4.6.2 Matériel et méthodes

Le matériel utilisé, les procédures de traitement et le choix des doses de cavitations sont décrits dans l'étude précédente section 4.5.2. La formulation de liposomes utilisée est également la même que celle utilisée précédemment à savoir la formulation 26 (CCD6-26).

##### 4.6.2.0.16 Animaux, groupes de traitement et suivi après traitement

70 rats au total sont nécessaires à cette étude. Ces rats ont un poids de  $237.9 \pm 19.1$  g (écart type). 63 rats présentent une tumeur Dunning AT2 atteignant un diamètre de 12-14mm à J10 après implantation de fragments tumoraux provenant de 7 rats d'amplification (méthode précédemment décrite section 4.2.3.1). Tous les rats ont été implantés le même jour.

Les rats sont répartis en 7 groupes de 9 rats :

- le groupe 1 : témoin ultrasons
- le groupe 2 : doxorubicine libre à 6 mg/Kg
- le groupe 3 : doxorubicine libre à 3 mg/Kg
- le groupe 4 : doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg
- le groupe 5 : doxorubicine liposomale à 3 mg/Kg
- le groupe 6 : doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg + ultrasons
- le groupe 7 : doxorubicine liposomale à 3 mg/Kg + ultrasons

Rappelons que la dose de cavitation utilisée dans cette étude est la dose de cavitation dite faible ( $DC = 32$ ). Il n'y a pas de groupe témoin sans traitement ultrasonore dans cette étude car nous avons prouvé dans l'étude précédente que le traitement ultrasonore à faible dose n'induit pas de ralentissement de la croissance tumoral significatif par rapport au groupe témoin. Le traitement ultrasonore est appliqué 48 heures après injection pour les deux dosages de liposomes utilisés. Ce temps est justifié par l'observation des pics d'accumulation pour les deux dosages effectués dans l'étude de bio distribution précédente (c.f §5.2.3.2).

Les méthodes d'injection sont identiques à l'étude précédente ainsi que le suivi après traitement. Seul les jours de suivi sont maintenant les mêmes pour tous les groupes : J10, J17, J24, J31, J38, J45 et J49. Les rats sont sacrifiés plus tard, à J49. Les critères d'analyse sont également conservés.

### 4.6.3 Résultats et discussion

#### 4.6.3.0.17 Observations liées au traitement et au suivi

- ◇ Les temps de 48h entre les injections et l'application des ultrasons sont respectés autant que possible :
  - . Groupe 6 :  $48,72 \pm 0.72$  h
  - . Groupe 7 :  $51,14 \pm 0.89$  h
- ◇ Deux rats du groupe 6 décèdent prématurément. Ces décès semblent liés à des problèmes d'anesthésie prolongée. Un rat du groupe 7 décède de douleurs abdominales consécutivement au traitement ultrasonore. Une mauvaise sélection de la tumeur induisant des tirs dans l'abdomen est sans doute à l'origine de ce décès (tumeurs parfois assez enfoncées dans l'abdomen malgré l'élastique mis en place).
- ◇ Les rats du groupe témoin ultrasons sont euthanasiés avant la fin de l'étude à J42 car leur tumeur a dépassé la taille critique fixée à 3 cm de diamètre.
- ◇ De nombreux rats décèdent entre J42 et J49 (c.f tableau 4.30). Une autopsie de tous les rats est réalisée au moment du décès et à J49 pour les rats euthanasiés. La moitié de l'ensemble des rats présente des métastases au niveau du thymus mais la répartition de ces rats dans les groupes est loin d'être uniforme (c.f tableau 4.30). En effet, les groupes 4 et 5 ayant reçu des liposomes seuls présentent environ deux fois plus de métastases à dose équivalente que les groupes ayant reçu de la doxorubicine libre (2 et 3) ou des liposomes associés à un traitement ultrasonore (6 et 7). Paradoxalement, ce sont ces groupes qui possèdent le plus de métastases qui présentent le taux de mortalité le plus faible avant J49. Les rats ayant été euthanasiés à J49, il est difficile de tirer des conclusions sur la survie de ces rats avec des métastases aussi nombreuses. Par contre, tous les rats décédés prématurément présentent des métastases au niveau du thymus. Ce qui laisse tout de même penser que les métastases sont un facteur de mortalité possible, voire important. Une autre

tendance qui se dégage est que, à type de traitement égal, le taux de métastase est un peu plus important pour les doses les plus élevées de doxorubicine. Il est également difficile de conclure sur ce point.

- ◇ Aucune relation n'est trouvée entre le taux de décès par groupe et le type de traitement appliqué. En moyenne, un tiers des rats décède prématurément et ces décès sont répartis de façon quasi uniforme dans tous les groupes sacrifiés à J49 (c.f tableau 4.30).

Notons que seulement 3 décès avaient été déplorés dans l'étude *in vivo* précédente mais que les rats avaient été sacrifiés entre J34 et J36 c'est à dire avant la série de décès prématurés observés dans cette étude.

Groupe	Traitement	Pourcentage de rats présentant des métastases	Pourcentage de rats décédés avant J49	Pourcentage de rats décédés avant J49 et présentant des métastases
1	US	Euthanasie J42 pas d'autopsie	Euthanasie J42	Euthanasie J42
2	Dox.6	40	40	100
3	Dox.3	33	33	100
4	Lip.6	89	22	100
5	Lip.3	67	22	100
6	Lip.6+US	42	29	100
7	Lip.3+US	33	33	100

FIGURE 4.30 – Tableau récapitulatif des taux de décès, métastases et décès avec métastases par groupe de rats

Pour la suite de l'étude, les analyses se baseront sur les données où tous les rats sont encore vivants c'est-à-dire à J38. Le point de mesure suivant étant J45 où de nombreux décès sont déjà constatés.

#### 4.6.3.0.18 Analyse des zones et temps de traitements ultrasonores

Une analyse de toutes les données issues des traitements ultrasonores sur les rats est menée et révèle que :

- ◇ Le nombre de tirs par passage sont compris entre 12 et 37 (moyenne 22,5, écart type 6,5).
- ◇ Les doses de cavitation visées sont toujours atteintes.
- ◇ Les expositions aux ultrasons durent entre 176 et 587 s, selon la taille de la zone à traiter (c.f détails par groupe Tableau 4.31).
- ◇ La durée des tirs lors du premier balayage de la tumeur est proche de celle des tirs lors du second balayage.
- ◇ La durée moyenne d'exposition aux ultrasons par zone de tir cumulée sur les deux passages est de  $2.7 \pm 0.65$  s. Ces durées sont homogènes entre les 3 groupes traités

(c.f détails par groupe Tableau 4.31).

Groupe	Traitement	Durée moyenne d'exposition par position de tir (écart type)	Durée totale du traitement par tumeur (écart type)
1	US	2,8s (0,32s)	312s (58s)
6	Lip.6+US	2,65s (0,36s)	300s (101s)
7	Lip.3+US	2,7s (0,35s)	313s (116s)

FIGURE 4.31 – Durée moyenne d'exposition de la tumeur aux ultrasons par zone de tir (somme des deux passages par zone) et durée totale d'exposition de la tumeur aux ultrasons par groupe de rats traités. L'écart type à l'intérieur de chaque groupe est précisé.

#### 4.6.3.0.19 Aspect visuel des tumeurs après traitement

Les tumeurs présentent le même type d'hématomes et de brûlures que ceux observés dans l'étude *in vivo* précédente. Ils sont également situés du côté opposé au transducteur. En moyenne, ces dommages sont visiblement cicatrisés au bout de 5-7 jours.

#### 4.6.3.0.20 Evolution des surfaces tumorales au cours du temps

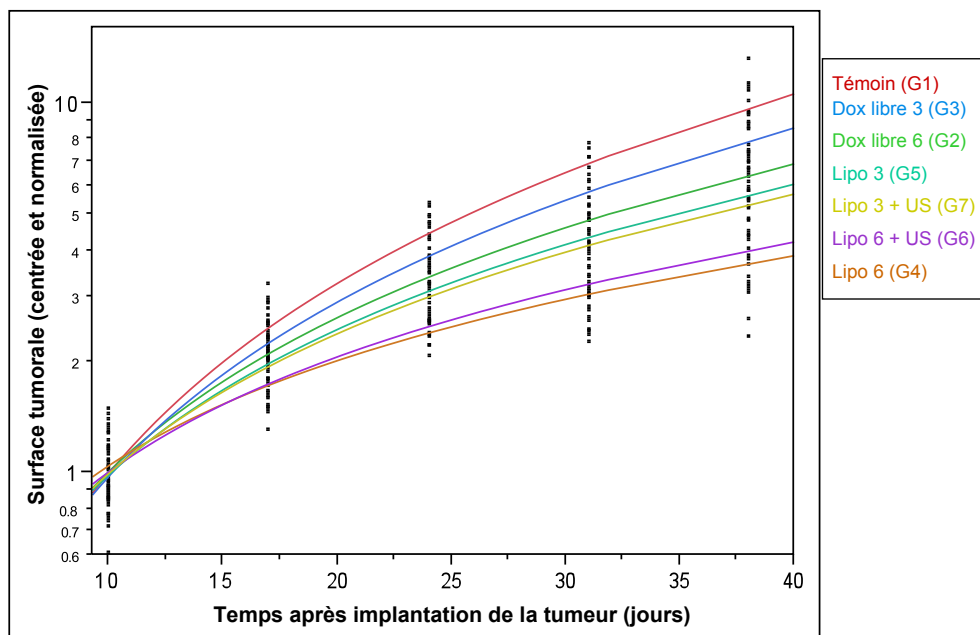


FIGURE 4.32 – Comparaison du logarithme Népérien des surfaces tumorales centrées et normalisées en fonction du nombre de jours après l'implantation de la tumeur pour tous les groupes de rats.



Jour Groupes	J10	J17	J24	J31	J38
G1/G3	0.73	0.21	0.19	0.30	0.16
G3/G5	0.97	0.46	<b>0.01</b>	<b>0.00*</b>	0.07
G5/G7	0.71	0.89	0.99	0.95	0.99
G1/G2	0.72	0.28	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00 *</b>
G2/G4	0.99	0.11	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>
G4/G6	0.70	0.98	0.97	0.99	0.85

FIGURE 4.33 – Tableau des valeurs du paramètre  $p$  du test statistique de Tukey-Kramer permettant de comparer les groupes 2 à 2. Les groupes sont considérés différents si  $p < 0,05$

À J10, les surfaces tumorales sont statistiquement similaires pour tous les groupes, ce qui permet une juste comparaison de l'évolution de la surface tumorale à des temps plus élevés. Une transformation logarithmique a également été appliquée dans cette étude de façon à homogénéiser les variances au cours du temps et permettre une analyse statistique complète (c.f Annexe 1). L'intervalle de confiance à 95% est calculé pour chaque groupe.

La première constatation au vu de la figure 5.4.3.3 est que la croissance tumorale est inversement proportionnelle à la dose de doxorubicine injectée qu'elle soit liposomale ou encapsulée. Une étude des intervalles de confiance confirmée par le test de tukey-Kramer (tableau 4.33) montre cependant que la dose de doxorubicine libre de 3mg/Kg (groupe 3) n'a aucun effet significatif sur la croissance tumorale en comparaison avec le témoin ultrasons (groupe 1) alors que la dose de 6mg/Kg (groupe 2) ralentit, elle, significativement la croissance tumorale.

Globalement, l'encapsulation de la doxorubicine permet d'augmenter son efficacité sur le ralentissement de la croissance tumorale. Cet effet est très marqué à 6mg/Kg entre les groupes 2 (dox. libre) et 4 (liposomes) avec un paramètre  $p$  de Tukey-Kramer hautement significatif à J24, J31 et J38, confirmant ainsi les résultats obtenus dans l'étude précédente. Cet effet est un peu moins marqué pour la dose de 3mg/Kg entre les groupes 3 (dox. libre) et 5 (liposomes) avec un paramètre de  $p$  de Tukey-Kramer hautement significatif à J24 et J31 mais légèrement supérieur à 0.05 à J38. Cependant, une analyse des intervalles de confiance à J45 sur les rats encore vivants (5 et 8 rats, groupes 3 et 5 respectivement) montre que les intervalles de confiance ne se recoupent pratiquement plus à cette date (taux de recouvrement d'environ 0.8% contre 29% à J38) laissant penser que l'encapsulation de doxorubicine à une dose de 3mg/Kg augmente tout de même l'efficacité du traitement. La comparaison des intervalles de confiance des groupes 4 et 5 et des groupes 6 et 7 respectivement montre, avec ou sans l'application d'ultrasons,

que la dose de doxorubicine liposomale de 6mg/Kg est significativement plus efficace que celle de 3mg/Kg.

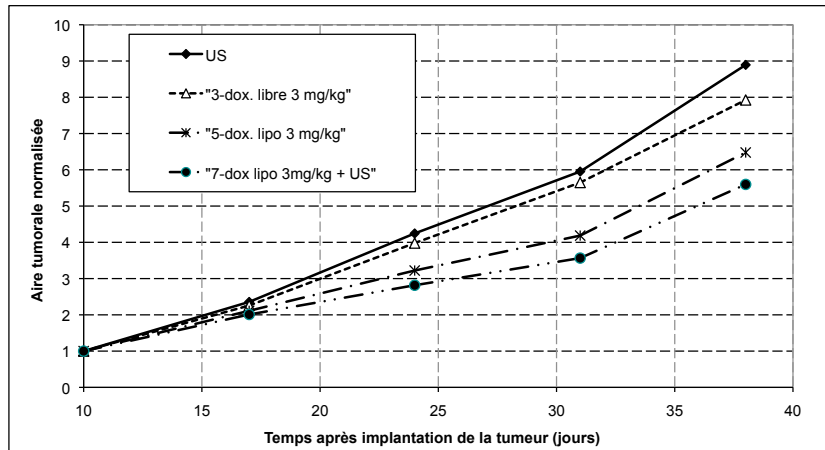


FIGURE 4.34 – Comparaison de l'aire tumorale centrée et normalisée pour les groupes ayant reçu une injection de 3mg/Kg de doxorubicine libre ou encapsulée.

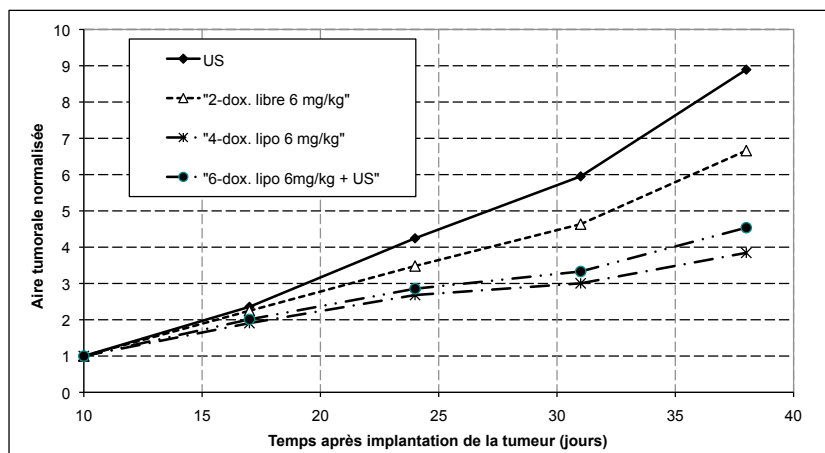


FIGURE 4.35 – Comparaison de l'aire tumorale centrée et normalisée pour les groupes ayant reçu une injection de 6mg/Kg de doxorubicine libre ou encapsulée.

Intéressons nous maintenant à la comparaison entre le traitement de doxorubicine encapsulée et la combinaison du traitement ultrasonore et de la doxorubicine encapsulée à dose égale. A 6mg/kg, on observe aucune différence significative entre le groupe 4 (liposomes) et le groupe 6 (liposomes + ultrasons) (c.f figures 5.4.3.3, 4.35 et 4.33) . Ces résultats confirment ceux de l'étude précédente.

A 3mg/kg, on constate que l'aire tumorale normalisée (c.f figure 4.34) du groupe 7 (liposomes + ultrasons) croit un peu plus lentement que celle du groupe 5 (liposomes). Cependant, statistiquement, cette différence n'est pas significative à J38 (c.f tableau 4.33). En regardant les intervalles de confiance à J38 et J45 (8 rats vivants dans chaque groupe)

on constate une évolution allant dans le sens d'une meilleure efficacité du groupe 7. En effet à J38, les intervalles de confiance correspondant aux groupe 5 et 7 se recouvrent totalement. A J45, ce taux a chuté à moins de 60%. Ce phénomène n'est pas observé pour la dose de 6mg/kg pour laquelle les intervalles de confiances des groupes 4 et 6 se recouvrent totalement tout le long du traitement.

Un autre point à relever est que l'intervalle de confiance du groupe ayant reçu un traitement ultrasonore est bien plus étroit (3 fois plus étroit à J38 et 2 fois plus étroit à J45) que celui n'en ayant pas reçu et ce, pour les deux doses de doxorubicine liposomale.

Par conséquent, le traitement ultrasonore aide, sinon à réduire la croissance tumorale, à rendre le traitement à base de doxorubicine liposomale plus reproductible et donc plus fiable. Il est toujours difficile de conclure sur les causes de la non-synergie du traitement combiné liposome et ultrasons. La diminution de la dose de doxorubicine encapsulée n'a pas permis d'obtenir des résultats concluants.

#### 4.6.3.0.21 Comparaison du poids des tumeurs excisées

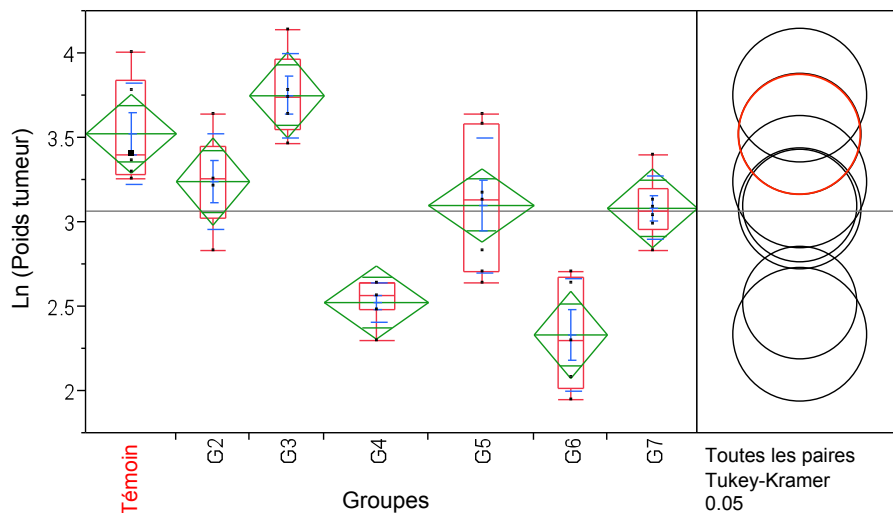


FIGURE 4.36 – Représentation en diamant de  $\text{Ln}(\text{Poids des tumeurs})$  excisées à J49. Les cercles issus du test de Tukey-Kramer permettent une comparaison des groupes (c.f Annexe 2). Les erreurs et écarts types ainsi que les diagrammes d'observation des valeurs aberrantes sont également représentés (voir signification des diverses représentations en Annexe 2). Les rats du groupe témoin ayant été sacrifiés à J42, on ne peut pas les comparer aux autres groupes.

Le test de Levene appliqué au poids des tumeurs excisées montre l'absence d'homogénéité des variances. Comme dans l'étude précédente, une transformation logarithmique est appliquée au poids des rats pour obtenir l'homoscédacité\* et la normalité des données. Le test de Tukey-Kramer permet de comparer les groupes deux à deux (c.f 4.36). On ne peut pas comparer strictement le groupe témoin avec les autres groupes car les rats de ce groupe ont été sacrifiés à J42 (taille critique de tumeur atteinte) alors que ceux des autres groupes ont été sacrifiés à J49. Cette analyse confirme les résultats

Groupe	Traitement	A, B, C sous-ensemble de données de ln(poids)			Ln(Poids) (moyenne par groupe)
		A	B	C	
G3	Dox.3	A			3.7536632
G2	Dox.6	A	B		3.2411737
G5	Lip.3		B		3.1021391
G7	Lip.3+US		B		3.0835337
G4	Lip.6			C	2.5257731
G6	Lip.6+US			C	2.3350089

FIGURE 4.37 – Tableau récapitulatif des différences du logarithme népérien du poids de la tumeur excisée entre groupes. Une analyse statistique complète finalisée par un test de Tukey-Kramer permet de générer ce récapitulatif. Les groupes non connectés par la même lettre sont significativement différents.

obtenus par comparaison des surfaces tumorales. Le tableau 5.30 résume les différences observées entre les groupes. En particulier, le groupe 5 n'est statistiquement pas différent du groupe 7, de même le groupe 4 en comparaison avec le groupe 6. Le traitement liposomal n'est donc pas potentialisé par les ultrasons. On notera une meilleure concordance que dans l'étude précédente entre le poids des tumeurs excisées et les surfaces tumorales correspondantes. Ceci est certainement dû aux implantations et au suivis des groupes de rats effectués le même jour.

#### 4.6.3.0.22 Evolution du poids des rats après traitement

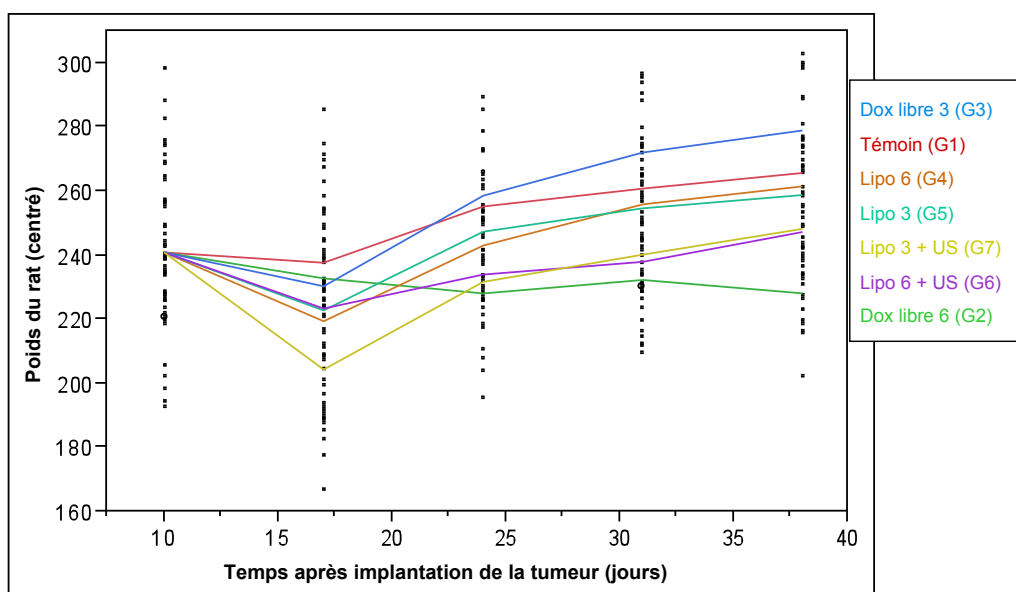


FIGURE 4.38 – Evolution du poids centré des rats au cours du temps

Au début de l'étude, à J10, il est établi que le poids des rats sont statistiquement similaires pour tous les groupes. Le poids des rats est de  $241 \pm 24$  g. Les animaux ont globalement bien toléré les différents traitements. On observe pour tous les groupes une diminution plus ou moins rapide du poids dans les 5 jours après traitement suivi d'une reprise de poids amorcée à J17. Seul le groupe 2 (dox. 6) n'amorce pas de reprise de poids significative avant J31. La perte maximale de poids moyen observée est de 15% à J17 pour le groupe 7 (liposomes 3 mg/kg + ultrasons), ce qui n'est pas très logique vu que ce groupe reçoit une dose minimale de doxorubicine. Les groupes ayant reçu un traitement à base de liposomes combiné ou non avec des ultrasons perdent un peu plus de poids que les autres groupes à J17. Par contre, tous les groupes ont récupéré leur poids initial, sinon un poids supérieur, à J38 sauf le groupe 2 (dox. 6) qui n'a récupéré que 96% de son poids initial. Ce dernier résultat fait écho à celui obtenu dans l'étude précédente où la perte de poids la plus importante à la fin de l'étude est observée pour le groupe combinant doxorubicine libre à 6 mg/kg et ultrasons à forte dose. Il semblerait que la doxorubicine libre à une dose de 6 mg/kg induise une perte de poids chez l'animal et que cette dose soit donc trop importante. On n'observe pas ce phénomène lorsque la doxorubicine est encapsulée. De plus, la doxorubicine libre à 6 mg/kg ne ralentit que très modérément la croissance tumorale contrairement à la même dose encapsulée qui induit le plus important ralentissement de l'étude. On peut également noter que les pertes de poids des groupes ayant reçu uniquement des liposomes à différentes doses sont statistiquement identiques. De même pour les groupes ayant reçu une combinaison d'ultrasons et de liposomes à différentes doses.

#### 4.6.4 Conclusion

Cette étude n'a pas non plus permis de démontrer une synergie entre le traitement ultrasonore et le traitement de doxorubicine liposomale. La question de l'origine de cette non synergie reste ouverte. Les hypothèses mentionnées dans la première étude restent valables (c.f §4.5.3.0.13) mis à part celle testée dans cette étude concernant un éventuel masquage de l'efficacité du traitement ultrasonore par une dose plus importante de doxorubicine. En effet, la diminution de la dose de doxorubicine liposomale n'a pas permis de montrer de façon convaincante une efficacité combinée du traitement ultrasonore et des liposomes. Des différences ont tout de même été constatées entre les groupes liposomes seuls et liposomes combinés avec des ultrasons sur deux jours de suivi.

## 4.7 Conclusion générale

Nous avons présenté dans ce chapitre une série complète d'études *in vivo*.

Pour commencer, nous avons montré la sensibilité à la doxorubicine du modèle de tumeur prostatique AT2 de Dunning implanté chez le rat Copenhague.

Nous avons ensuite étudié la bio-distribution et les propriétés pharmacocinétiques des formulations de liposomes 26 et 28 à des dosages de  $3\text{ mg/Kg}$  et  $6\text{ mg/Kg}$ . Ces études ont permis de montrer que la durée de vie des liposomes dans la circulation sanguine était longue et que l'accumulation dans la tumeur était satisfaisante aux deux dosages testés pour la formulation 26. Un pic d'accumulation aux alentours de 48 h a pu être déterminé pour les deux dosages de la formulation 26.

Enfin, deux études comparant divers traitements à un traitement combinant liposomes et ultrasons (à divers dosages) ont été menées dans notre dispositif expérimental permettant l'application d'une dose de cavitation cible de manière reproductible. Nous avons pu voir dans cette étude que l'encapsulation de doxorubicine dans des liposomes avec une durée de vie prolongée dans la circulation sanguine est un vecteur augmentant l'efficacité de la doxorubicine tout en réduisant la perte de poids de l'animal. L'application d'ultrasons sur des tumeurs où des liposomes se sont accumulés n'a pas permis d'augmenter l'efficacité du traitement mais à tout de même permis de le rendre plus reproductible et donc plus fiable. De nombreuses hypothèses expliquant ce manque de synergie ont été soulevées comme une trop faible sono-sensibilité des liposomes utilisés *in vivo* ou encore une dosimétrie ultrasonore non adaptée pour la libération *in vivo*. Une nouvelle génération de liposomes beaucoup plus sono-sensible mise au point par nos partenaires va permettre d'améliorer le premier point. Un nouveau dispositif ultrasonore est conçu afin de générer de façon encore plus localisée de la cavitation inertielle et tenter d'augmenter l'efficacité du traitement ultrasonore. Ce dispositif et les études *in vivo* réalisées sont présentés dans le chapitre suivant.



## Chapitre 5

# Campagne d'expériences *in vivo* avec la troisième génération de liposomes

### Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>175</b>
<b>5.2</b>	<b>Etude de bio distribution</b>	<b>175</b>
5.2.1	Introduction	175
5.2.2	Matériel et méthodes	176
5.2.3	Résultats et discussion	177
5.2.3.1	Clairance sanguine	177
5.2.3.2	Bio distribution dans les organes	178
5.2.4	Conclusion	182
<b>5.3</b>	<b>Détermination des conditions d'exposition ultrasonores</b>	<b>183</b>
5.3.1	Introduction	183
5.3.2	Description du dispositif de traitement	183
5.3.3	Etude des effets induits sur la tumeur par différentes conditions d'exposition ultrasonores.	187
5.3.3.1	Matériel et méthodes	187
5.3.3.2	Résultats et discussion	189
5.3.4	Etude sous IRM du largage induit par les conditions d'expositions ultrasonores.	193
5.3.4.1	Matériel, méthodes et rappels théoriques	193
5.3.4.2	Résultats et discussion	195
5.3.5	Conclusion	198
<b>5.4</b>	<b>Etude d'efficacité de la délivrance par ultrasons</b>	<b>199</b>
5.4.1	Introduction	199



5.4.2	Matériel et méthodes . . . . .	199
5.4.2.1	Animaux, groupes de traitement et suivi après traitement . . . . .	199
5.4.3	Résultats et discussion . . . . .	200
5.4.3.1	Observations liées au traitement et au suivi . . . . .	200
5.4.3.2	Aspect visuel des tumeurs après traitement . . . . .	200
5.4.3.3	Etude des surfaces tumorales des différents groupes . . . . .	201
5.4.3.4	Comparaison du poids des tumeurs excisées . . . . .	205
5.4.3.5	Evolution du poids des rats . . . . .	206
5.4.4	Conclusion . . . . .	208
<b>5.5</b>	<b>Conclusion générale . . . . .</b>	<b>209</b>

---

## 5.1 Introduction

Les formulations de liposomes mises à disposition par nos partenaires pour ces nouvelles études *in vivo* sont beaucoup plus sono-sensibles que la formulation utilisée pour les expériences présentées dans le chapitre précédent. Pourtant cela ne garantit pas l'efficacité du traitement combinant l'application d'ultrasons et l'injection de ces liposomes. Afin d'augmenter les chances d'obtenir cette synergie, nous avons mis au point un dispositif ultrasonore permettant de caviter à de moindres puissances et de façon plus localisée.

Un ensemble d'études est réalisé de façon à optimiser le traitement ultrasonore pour permettre de délivrer le contenu des liposomes dans les tissus tumoraux.

En premier lieu, une étude de bio distribution et de pharmacocinétique est effectuée pour sélectionner une nouvelle formulation de liposomes et déterminer son pic d'accumulation intra-tumoral.

Ensuite, une étude est menée *in vivo* pour déterminer les conditions d'exposition ultrasonores qui n'affectent pas la croissance tumorale et qui nécrosent de façon modérée les tissus. Les conditions d'exposition sélectionnées à l'issue de cette étude sont testées en combinaison avec une injection de liposomes contenant des agents de contraste IRM. Les images des tumeurs obtenues sous IRM avant et après insonification permettent d'étudier un éventuel largage de liposomes lié aux traitements ultrasonores testés.

Pour finir, une étude complète avec la condition d'exposition sélectionnée est menée pour tester l'efficacité de la délivrance par ultrasons de doxorubicine encapsulée en comparaison avec d'autres traitements.

## 5.2 Etude de bio distribution

### 5.2.1 Introduction

Nous disposons de nouvelles formulations de liposomes plus sono-sensibles fabriquées par nos partenaires. Une nouvelle étude de bio distribution et de pharmacocinétique est par conséquent nécessaire. Un des principaux objectifs de cette étude est de choisir la formulation la plus adaptée à des expériences *in vivo*. Cette étude permettra également de déterminer le moment où l'accumulation intra tumorale des liposomes est maximale avec la formulation choisie. Ainsi, l'application des ultrasons pourra être optimisée pour l'étude d'efficacité du traitement combinant liposomes et ultrasons présentée à la fin de ce chapitre.

### 5.2.2 Matériel et méthodes

Les formulations de liposomes testées dans cette étude sont des formulations bien plus sensibles aux ultrasons dans notre dispositif *in vitro* que la formulation utilisée pour les tests *in vivo* du chapitre 4. Ces formulations, nommées *Epi2.8D* ("Epi") et *Epi1.12D*, ont en effet été testées dans notre dispositif *in vitro* et montrent, à dose de cavitation égale, un largage de doxorubicine bien supérieur à celui observé pour le Caelyx ou la formulation 26 de l'étude précédente (c.f figure 3.13 b). A titre d'exemple, pour une NDC de 40 (conditions d'exposition de référence), le taux de largage de doxorubicine avec la formulation Caelyx est de moins de 40%, celui de la formulation *Epi2.8D* est de plus de 60% et celui de la formulation *Epi1.12D* est supérieur à 80%. La formulation *Epi2.8D* est une formulation de liposomes dite de 1<sup>ère</sup> génération c'est-à-dire ayant pour principal composant lipidique le lipide DSPE. La formulation *Epi1.12D* est une formulation dite de 3<sup>ème</sup> génération ayant un autre composant lipidique principal dont nous ne pouvons pas divulguer la nature. Cette dernière formulation est la plus sonosensible et la plus susceptible de larguer son contenu *in vivo* sous l'action des ultrasons. Il convient toutefois d'étudier son accumulation intra-tumorale afin de déterminer si elle convient pour les essais *in vivo*. La bio distribution et la pharmacocinétique des deux formulations de liposomes sera par conséquent étudiée ici.

Deux doses de doxorubicine liposomale seront testées pour chacune des formulations ; une dose de 3 mg/Kg et une dose de 6 mg/Kg. Le matériel nécessaire à cette étude, le modèle tumoral et les procédures utilisées sont décrites dans les études de bio distribution précédentes (c.f section 4.3.3.1).

Les temps choisis dans cette étude pour les prélèvements sanguins en intra-cardiaque, le sacrifice des animaux et l'excision des différents organes sont de 6, 19, 24, 50 et 75 heures après injection. Trois rats sont sacrifiés par temps et par groupe. Des prélèvements sanguins en intra-orbitaire (sous anesthésie gazeuse) sont réalisés à 30 min, 1h et 2h après injection sur les animaux sacrifiés à 24h.

67 rats au total sont utilisés pour cette étude. 7 rats servent à l'amplification des tumeurs.

Les 60 autres rats sont répartis en 4 groupes recevant des injections de liposomes différentes :

- . *Epi2.8D* à 3 mg/Kg (15 rats)
- . *Epi2.8D* à 6 mg/Kg (15 rats)
- . *Epi1.12D* à 3 mg/Kg (15 rats)
- . *Epi1.12D* à 6 mg/Kg (15 rats)

3 rats de chaque groupe sont sacrifiés à chaque temps énoncé précédemment.

### 5.2.3 Résultats et discussion

#### 5.2.3.1 Clairance sanguine

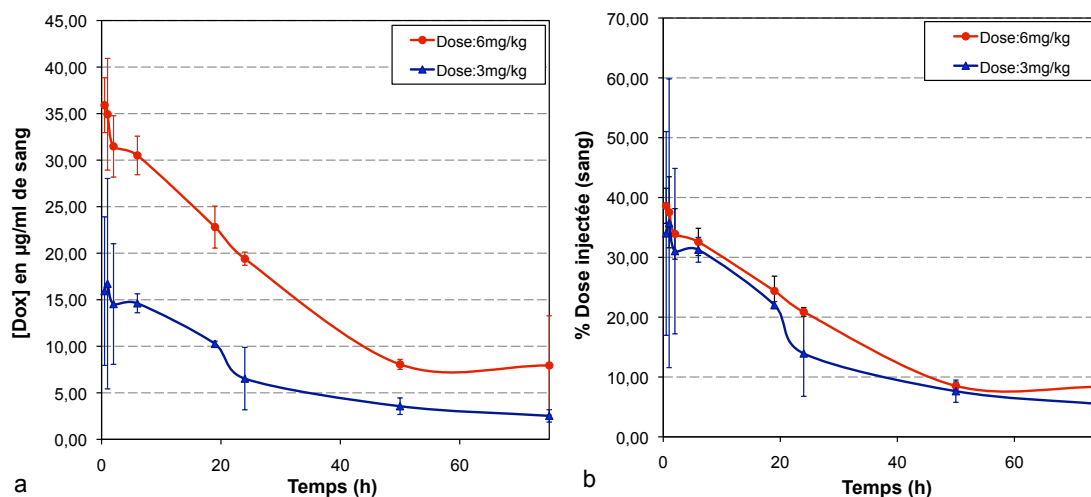


FIGURE 5.1 – (a) Concentration de doxorubicine par ml de sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi2.8D* à une concentration de 3 mg/ml ou 6 mg/ml (b) Pourcentage de la dose injectée de doxorubicine se retrouvant dans le sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi2.8D* à une concentration de 3 mg/Kg ou 6 mg/Kg (c.f équation 4.1).

Pour la formulation *Epi2.8D* (c.f figure 5.1), on observe globalement une diminution de la doxorubicine dans le sang pour les deux dosages de doxorubicine liposomale, la concentration de doxorubicine par ml de sang étant globalement deux fois plus importante pour l'injection à 6 mg/kg. Pour le dosage à 6 mg/kg la vitesse de clairance des liposomes de la circulation sanguine est à peu près uniforme jusqu'à 50h après injection. Au delà de 50h la concentration de doxorubicine liposomale stagne aux alentours de 8  $\mu\text{g/ml}$ . Pour le dosage de 3 mg/kg, on observe des variations de la vitesse de clairance jusqu'à 24h après injection. Au delà de ce temps, la vitesse de clairance est lente et uniforme. Pour les deux dosages de doxorubicine liposomale, les pourcentages de la dose injectée se retrouvant dans le sang sont similaires.

Pour la formulation *Epi1.12D* (c.f 5.2), la cinétique sanguine est plus irrégulière jusqu'à 24h après injection. A partir de 2h après injection on a une augmentation brutale de la concentration de doxorubicine jusqu'à 6h avant d'observer à nouveau une diminution de la concentration. Cette augmentation est d'autant plus brutale et élevée pour la dose de 3 mg/kg où la concentration de doxorubicine dans le sang est doublée en l'espace de 4h environ. Entre 19h et 24h, pour cette même dose, la concentration de doxorubicine chute à nouveau brutalement pour retrouver une valeur similaire à celle observée 2h après injection. La clairance est ensuite lente jusqu'à 75h après injection. Pour la dose de 6 mg/Kg, la vitesse de clairance est relativement uniforme entre 6h et 75h.

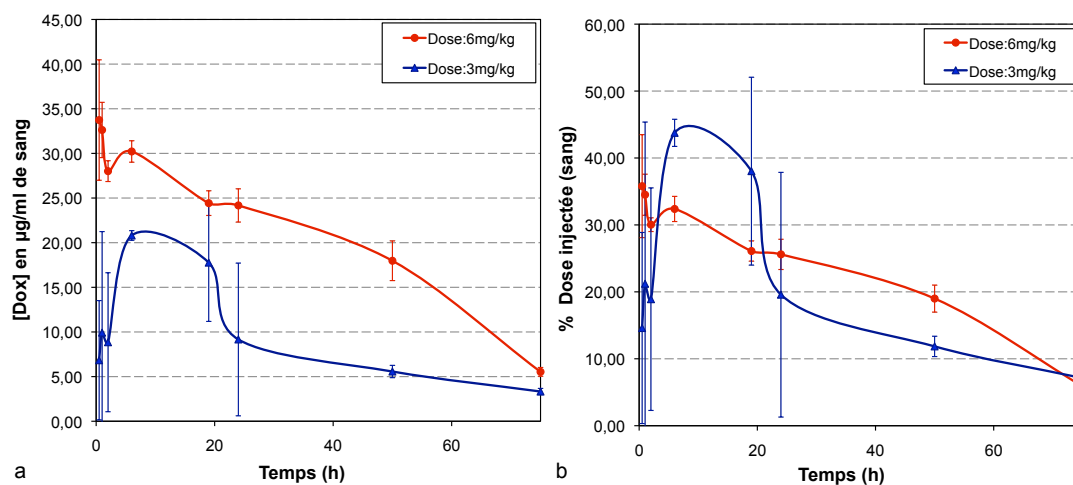


FIGURE 5.2 – (a) Concentration de doxorubicine par ml de sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi1.12D* à une concentration de 3 mg/ml ou 6 mg/ml (b) Pourcentage de la dose injectée de doxorubicine se retrouvant dans le sang en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi1.12D* à une concentration de 3 mg/Kg ou 6 mg/Kg.

On observe par conséquent une forte dépendance de la dose injectée sur la cinétique sanguine de la formulation *Epi1.12D*. Cette dépendance est bien caractérisée par les courbes représentant le pourcentage de dose injectée au cours du temps après injection (c.f 5.2 b).

Nous avons vu que les deux formulations de liposomes ont des profils de cinétique sanguine différents, ce qui montre l'importance de la composition de la membrane des liposomes sur leur comportement *in vivo*. La durée de vie des liposomes dans la circulation sanguine est du même ordre de grandeur soit  $\approx 5\%$  pour un temps de 50 h après injection.

### 5.2.3.2 Bio distribution dans les organes

Dans la tumeur, la concentration par gramme de tissus de doxorubicine liposomale atteint un premier maximum à 19 h et un second maximum aux alentours de 50 h après injection de liposomes de la formulation *Epi2.8D* à 3 mg/kg ou à 6 mg/kg (c.f figure 5.3 a). La valeur moyenne du pic de concentration est de  $10,7 \mu\text{g/g}$  et de  $3,3 \mu\text{g/g}$  à 50 h pour les injections de dox liposomale respectives de 6 mg/kg ou 3 mg/kg. Si on considère uniquement ces concentrations par gramme de tumeur, on pourrait penser que le pic d'accumulation maximum pour la dose de 3 mg/kg se produit 19 h après injection dans la tumeur avec une concentration de  $4,1 \mu\text{g/g}$  supérieure au pic de 50 h.

Cependant, il convient de considérer le poids total des tumeurs pour connaître l'accumulation totale dans celles-ci par rapport à la dose injectée (c.f figure 5.3 b). Ceci est d'autant plus important que de nombreuses tumeurs ont un poids inférieur à 1 g en particulier pour les premières heures après injection, ce qui peut nous faire mal interpréter

l'accumulation globale dans les tumeurs. Bien entendu, les écarts types sont plus importants en regardant le %DI puisqu'ils reflètent les variations entre les animaux. On peut voir que si l'on considère le %DI, le pic d'accumulation maximale se trouve bien aux alentours de 50 h pour les deux doses de doxorubicine et on observe un seul pic pour la dose de 6 mg/Kg.

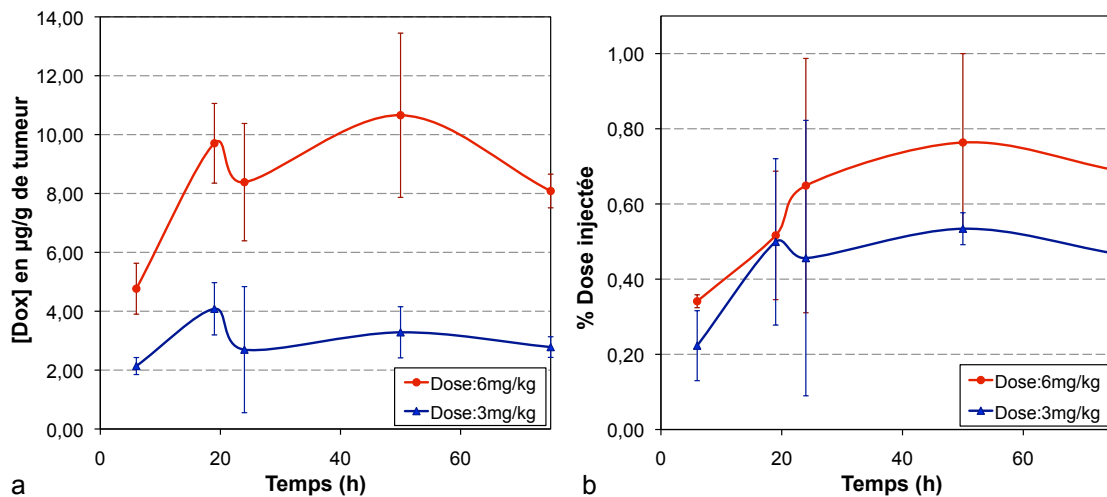


FIGURE 5.3 – a) Concentration de doxorubicine par g de tumeur en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi2.8D* à une concentration de 3 mg/kg ou 6 mg/kg (b) Pourcentage de doxorubicine captée par la tumeur par rapport à la dose de liposomes *Epi2.8D* injectée (c.f équation 4.2).

Pour les rats injectés avec la formulation *Epi1.12D*, un seul pic est observé à 50 h pour l'injection à 6 mg/kg, que ce soit pour la courbe donnant la concentration par gramme de tissus (14,4  $\mu\text{g/g}$ ) ou celle donnant le %DI (1,10%) (c.f figure 5.4 a et b). Pour l'injection à 3 mg/kg, on observe deux pics très marqués à respectivement 19 h et  $\approx 50$  h. La même remarque que pour la formulation précédente nous permet de conclure que le second pic est en moyenne plus important que le premier si on considère le %DI (1,14%).

Nous avons observé que l'accumulation de liposomes dans la tumeur est plus importante pour la formulation *Epi1.12D* que pour la formulation *Epi2.8D*. L'accumulation dans la tumeur est maximale aux alentours de 50 h tout comme dans les études de bio distribution précédentes (temps de 48 h pour l'excision dans les études précédentes). Pour la formulation *Epi1.12D* à 6 mg/Kg ce maximum est en moyenne de 14,4  $\mu\text{g/g}$  ou de 1,10% alors que pour la formulation *Epi2.8D* il est de 10,7  $\mu\text{g/g}$  ou de 0,76%. A 3 mg/Kg il est en moyenne de 7,1  $\mu\text{g/g}$  ou de 1,14% pour la formulation *Epi1.12D* contre 4,1  $\mu\text{g/g}$  ou 0,53%

Nous avons constaté que la dose de liposomes injectée influait aussi sur la cinétique d'accumulation dans la tumeur quelle que soit la formulation de doxorubicine utilisée.

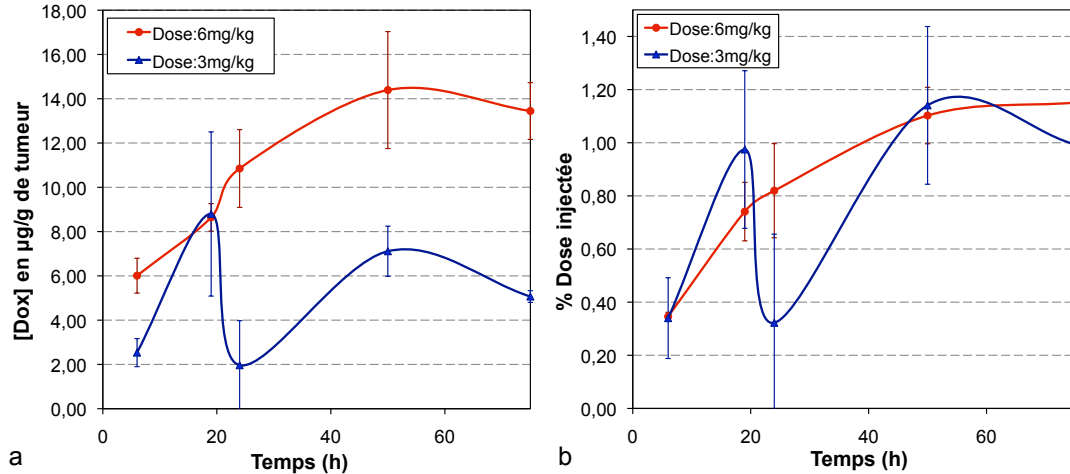


FIGURE 5.4 – a) Concentration de doxorubicine par g de tumeur en fonction du temps écoulé après injection de liposomes *Epi1.12D* à une concentration de 3 mg/kg ou 6 mg/kg (b) Pourcentage de doxorubicine captée par la tumeur par rapport à la dose de liposomes *Epi1.12D* injectée.

La bio distribution au cours du temps des liposomes de la formulation *Epi2.8D* à 3 mg/kg et 6 mg/kg dans tous les organes ainsi que dans la tumeur est résumée par la figure 5.5. Les concentrations par g de tissus ainsi que les %DI sont représentés. On peut voir que si l'on considère les concentrations en doxorubicine par gramme, c'est la rate qui a de loin la plus forte densité de doxorubicine liposomale dans les tissus quelle que soit la dose injectée avec une valeur moyenne maximale de 52,8 µg/g à 3 mg/kg et de 68,8 µg/g à 6 mg/kg. C'est ensuite le foie (9,6 µg/g à 3 mg/kg et de 17,1 µg/g à 6 mg/kg) puis la tumeur qui ont la plus forte densité de doxorubicine. Les reins et les poumons contiennent très peu de doxorubicine à 3 mg/kg et des concentrations du même ordre de grandeur que dans la tumeur à 6 mg/kg.

Les résultats dans la rate, les reins et les poumons sont toutefois à prendre avec précaution car les concentrations de doxorubicine (et de %DI) sont calculés sur la base des calibrations effectuées dans le foie. Le type de tissu n'étant pas le même, les résultats peuvent être un peu décalés, ce que nous avons constaté sur certaines valeurs de concentrations ou de % DI qui peuvent être négatives, en particulier dans les reins et les poumons. On ne peut le voir sur ces histogrammes (figures 5.5 et 5.6) mais cela s'observe aisément dans les études de bio distribution du chapitre précédent. Il serait plus correct de refaire une calibration dans les tissus de chacun des organes pour avoir des résultats plus précis, ce qui sera fait ultérieurement.

Le %DI dans la tumeur nous permet de connaître la répartition globale de la doxorubicine liposomale injectée dans les différents organes et la tumeur. Ainsi, c'est bien dans le foie, comme pour les précédentes formulations testées, que l'on retrouve le plus de liposomes avec des %DI maximums de 8,4 et 9,5 à 3 mg/kg et à 6 mg/kg. La rate n'ac-

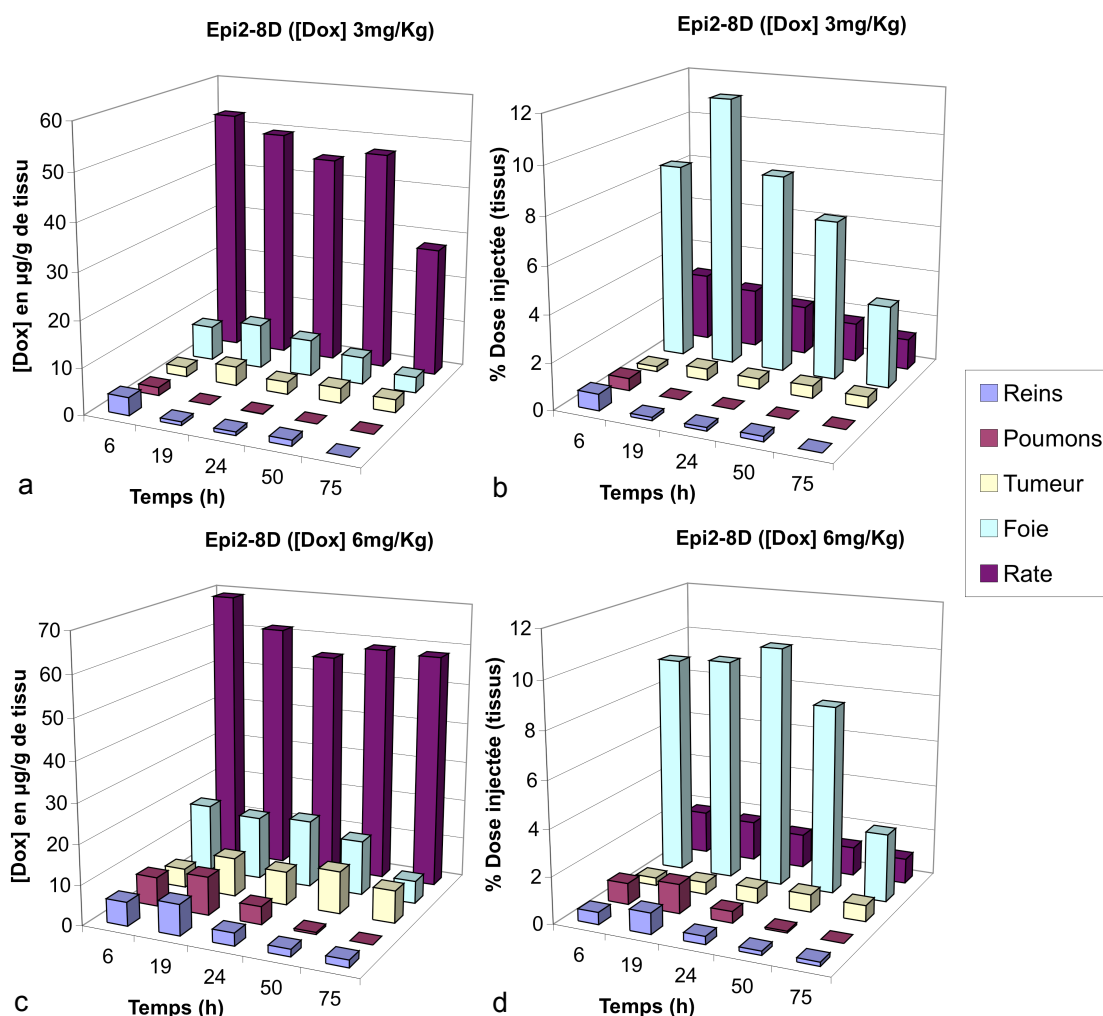


FIGURE 5.5 – Concentration de doxorubicine par gramme de tissus des différents organes de rats pour une injection de liposomes Epi2-8D à 3 mg/kg (a) ou à 6 mg/kg (c). Pourcentage de doxorubicine captée par les tissus des différents organes de rats pour une injection de liposomes Epi2-8D à 3 mg/kg (b) ou à 6 mg/kg (d).

cumule, au maximum " que" 2,9% de la dose injectée à 3 mg/kg ou 1,8% à 6 mg/kg, car elle est bien plus petite que 1 g. Les reins et les poumons captent peu de liposomes. Ces résultats dans les divers organes sont du même ordre de grandeurs que ceux observés dans les précédentes études de bio distribution.

La bio distribution au cours du temps des liposomes de la formulation Epi1.12D à 3 mg/kg et 6 mg/kg dans tous les organes ainsi que dans la tumeur est résumée par la figure 5.6. On constate globalement qu'avec la formulation Epi1.12D la captation dans la rate ( $\%DI_{max} = 1, 29\%$  (3 mg/kg) et  $2\%$  (6 mg/kg)) et dans le foie est inférieure à la captation dans ces même organes pour la formulation Epi2.8D. Comme nous l'avons dit précédemment, la captation dans la tumeur est plus importante pour la formulation



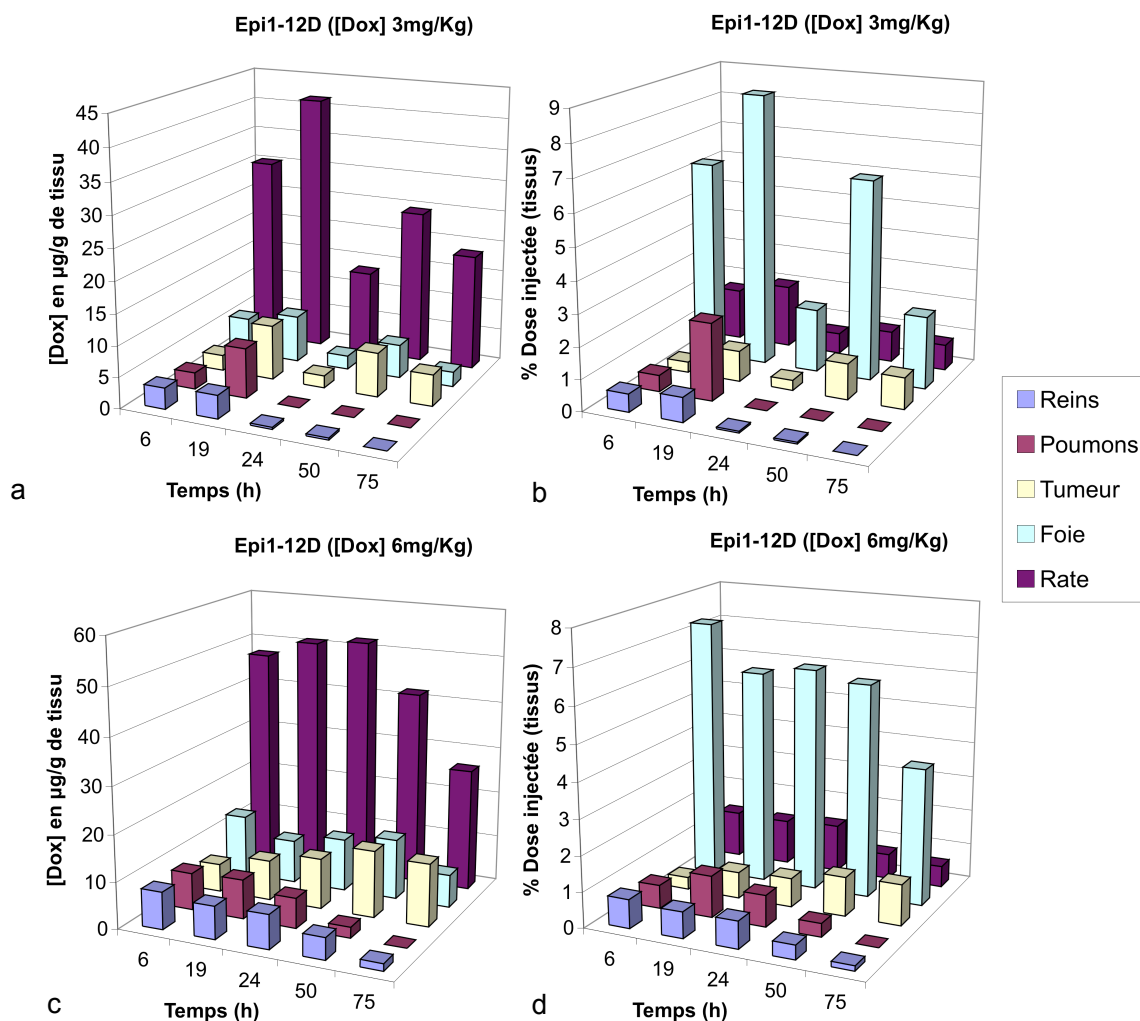


FIGURE 5.6 – Concentration de doxorubicine par gramme de tissus des différents organes de rats pour une injection de liposomes Epi1.12D à 3 mg/kg (a) ou à 6 mg/kg (c). Pourcentage de doxorubicine captée par les tissus des différents organes de rats pour une injection de liposomes Epi1.12D à 3 mg/kg (b) ou à 6 mg/kg (d).

Epi1.12D. On observe toutefois un peu plus de captation dans les reins et surtout dans les poumons aux premières heures après injections mais la doxorubicine liposomale est ensuite éliminée complètement de ces organes pour des temps plus tardifs. Les résultats au temps de 19 h pour les poumons doivent être pris avec précaution car l'écart type est très important sur ces valeurs.

## 5.2.4 Conclusion

L'étude de bio distribution et de pharmacocinétique menée sur les deux formulations de liposomes à 3 mg/Kg et à 6 mg/Kg a montré que l'accumulation maximale de liposomes dans la tumeur se faisait aux alentours de 50 h, comme pour les autres for-

mulations testées. Elle a permis de différencier les deux formulations en montrant que la captation intra tumorale était plus importante pour la formulation *Epi1.12D* que pour la formulation *Epi2.8D* quelque soit la dose de doxorubicine liposomale injectée. De plus, moins de liposomes sont captés dans le foie et la rate pour cette formulation. Nous avons par ailleurs reporté que la formulation *Epi1.12D* est plus sono-sensible que la formulation *Epi2.8D in vitro*. La formulation *Epi1.12D* est par conséquent la candidate idéale pour l'étude d'efficacité de la délivrance par ultrasons de doxorubicine encapsulée qui sera présentée section 5.4.

## 5.3 Détermination des conditions d'exposition ultrasonores

### 5.3.1 Introduction

Les résultats des expériences *in vivo* menées précédemment ne nous ont pas permis de vérifier si nous induisons la libération de la doxorubicine encapsulée par l'application d'ultrasons. Afin de maximiser les chances d'induire cette libération *in vivo* sous l'action des ultrasons en causant le moins de dommages possibles aux tissus, nous allons réaliser une étude *in vivo* complète sur des rats afin de déterminer les paramètres ultrasonores adéquats pour insonifier les tumeurs. Cette étude se divisera en deux étapes. Premièrement nous allons sélectionner les conditions d'expositions ultrasonores n'induisant pas de ralentissement de la croissance tumorale et peu de nécrose des tissus. Deuxièmement, nous allons étudier par imagerie IRM quelles conditions d'expositions induisent la libération *in vivo* du contenu des liposomes.

### 5.3.2 Description du dispositif de traitement

Un nouveau dispositif ultrasonore est mis en place afin de générer de façon plus localisée la cavitation inertielle.

Le nouveau dispositif d'irradiation se compose de deux transducteurs focalisés dont les zones focales sont mises en coïncidence (c.f figure 5.8). Leurs axes acoustiques forment un angle d'environ 90°.

Le transducteur 1 est le transducteur utilisé dans l'ancien dispositif (c.f figure 5.7 b). Pour rappel, c'est un transducteur piezocéramique focalisé de 50 mm de diamètre avec une longueur focale de 48 mm et une zone focale à -6 dB de 2\*2\*13mm.

Le transducteur 2 est un transducteur bi-fonction permettant la thérapie et l'imagerie (EDAP TMS SA, Vaux-en-Velin, France) (c.f figure 5.7 b). La partie thérapie est un transducteur composite tronqué (backing air et couche d'adaptation) de fréquence nominale 1 MHz et de dimensions actives 34,6\*56,9 mm<sup>2</sup>. La longueur focale du transducteur est de 45 mm et sa zone focale à -6 dB est de 2.4\*1.25 \*12 mm. Son rendement électro-acoustique est de 77% à 1,16MHz (mesuré avec la méthode de la balance acoustique).

La partie imagerie est une sonde sectorielle 5 MHz (VERMON, Tours, France) située au centre du transducteur. Elle est compatible avec les échographes *B&K*.

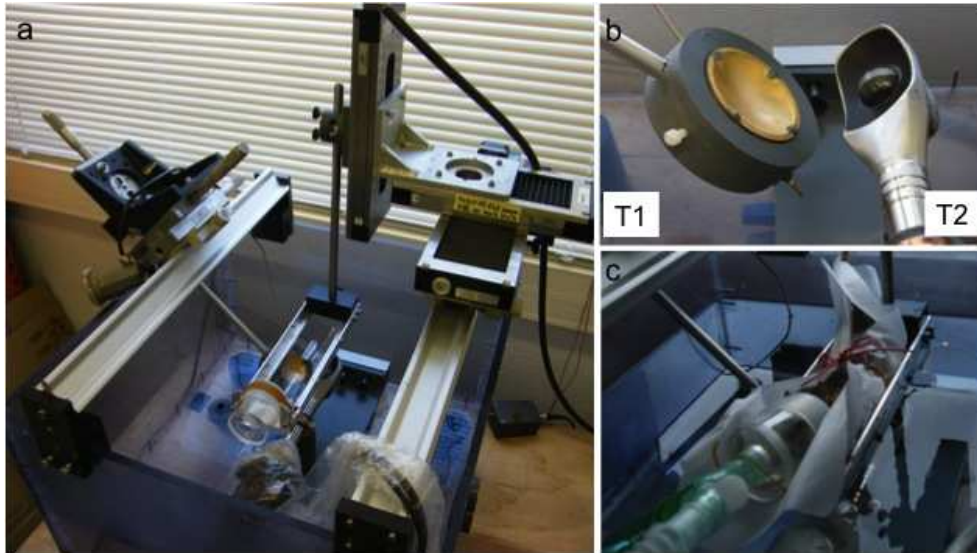


FIGURE 5.7 – (a) Photo de l'ensemble cuve, platines motorisées, support du rat, transducteurs. (b) Photo du dispositif d'irradiation : transducteurs focalisés 1 et 2. (c) Photo prise pendant le traitement d'un rat (sous anesthésie).

Le dispositif d'émission de l'excitation ultrasonore est constitué de deux générateurs de fonction (33120A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, Etats-Unis). Le premier construit le signal de modulation d'amplitude délivré au second qui fixe la fréquence d'excitation commune des 2 sources d'irradiation. Le détails des réglages des deux générateurs pour obtenir des pulses de forme sinusoïdale, de fréquence  $f_0 = 1,16 \text{ MHz}$  et de  $FR \approx 250 \text{ Hz}$  est donné figure 5.8 où est par ailleurs schématisé l'ensemble du dispositif expérimental de traitement. Deux amplificateurs RF de puissance (400 W, 55 dB ; 1040L, Electronics and Innovation Ltd., Rochester, NY, Etats-Unis) permettent d'amplifier les signaux produits par les générateurs de fonction. Les puissances directe et réfléchiée sont mesurées aux bornes des deux transducteurs à l'aide de deux wattmètres (Mesure de puissance et réflectomètre NAP avec tête de mesure de puissance 1950, Rhode et Schwarz, Munich, Allemagne). Les tensions appliquées aux deux transducteurs sont également mesurées à l'aide d'un oscilloscope (Wavesurfer 422, LeCroy, Chestnut Ridge, NY, Etats-Unis).

L'insonification de la tumeur se fait après avoir disposé le rat dans le support de façon à ce que sa tumeur dépasse par la fenêtre acoustique du support (c.f figures 5.8 et 5.7). Le traitement par ultrasons se fait en balayant la tumeur à la vitesse d' 1mm/s. Ce balayage se fait par déplacement de l'ensemble rat-support relié à des platines motorisées pilotées par informatique. Nous avons mis au point un programme pour permettre à l'opérateur

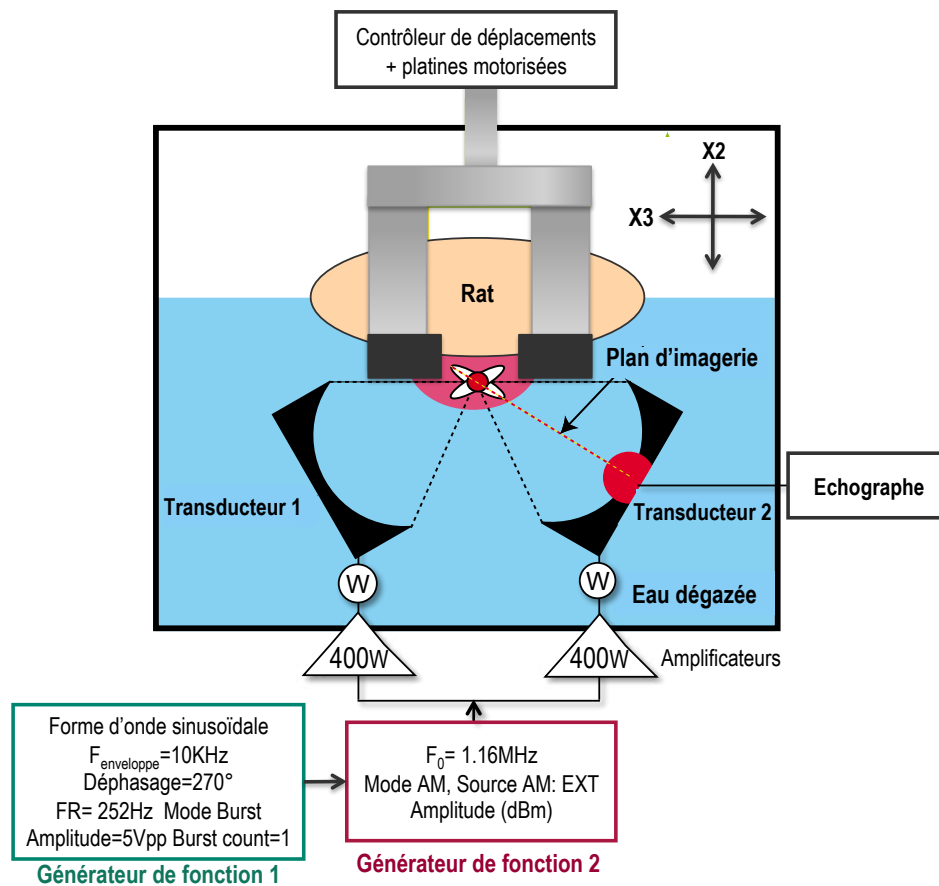


FIGURE 5.8 – Représentation schématique du dispositif expérimental.

de procéder à la sélection du volume de chaque tumeur, de spécifier les conditions de traitement (vitesse de balayage, espacement des plans...) avant de lancer le traitement automatisé.

La sélection du volume tumoral se fait à l'aide de l'échographe. La zone focale étant préalablement repérée par une flèche sur l'échographe, l'opérateur déplace le rat de façon à visualiser la tumeur et amener la flèche sur les zones à traiter. Il procède d'abord à une sélection des extrémités de la tumeur sur l'axe 1 (c.f figure 5.9) en repérant leurs coordonnées avec le programme. Le programme se place ensuite automatiquement sur le plan médian de l'axe 1 afin que l'opérateur sélectionne cette fois les extrémités de la tumeur sur l'axe 2 et 3. Un volume parallélépipédique est ainsi défini pour le traitement (c.f figure 5.9).

La tumeur est balayée plan par plan en partant du coin inférieur gauche de la tumeur (c.f figure 5.10 a). Ce balayage de la tumeur peut-être complet ou partiel si l'opérateur augmente l'espacement entre les plans. Une marge de sécurité de une fois et demi la dimension de la zone focale est prise sur l'axe 3 quand la platine change de direction de façon à tourner dans l'eau et non sur l'interface eau/peau de façon à éviter des brûlures sur la peau (c.f figure 5.10 b).

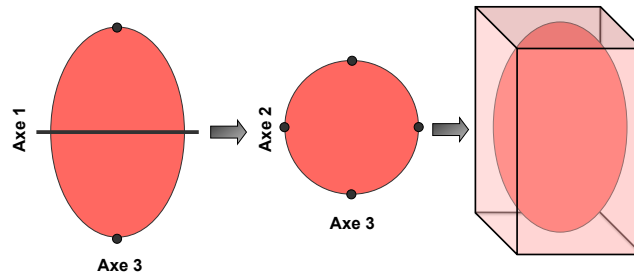
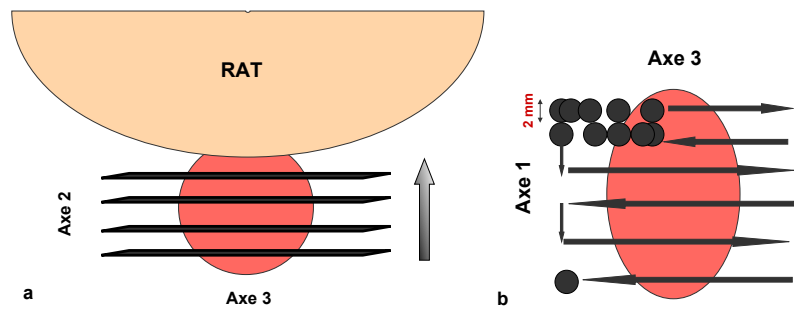


FIGURE 5.9 – Repérage du volume tumoral à traiter.

FIGURE 5.10 – (a) Balayage complet de la tumeur par plan  $(x_2, x_3)$  d'épaisseur de 2 mm environ (b) Mode de balayage d'un plan de tumeur.

Le dispositif ultrasonore génère de la cavitation inertielle de manière très régulière ; le dosage de la cavitation n'est donc pas essentiel dans ce nouveau dispositif.

C'est ce que montre la figure 5.11 qui présente des tests de TA (a) et des tests sur les liposomes *Epi1\_12D* (b) réalisés toujours suivant la même méthodologie que celle présentée dans le chapitre 2. Ces tests ont été réalisés en plaçant des échantillons (réservoirs de pipettes pasteurs comme utilisé auparavant) à la focale des deux transducteurs. La condition d'exposition ultrasonore utilisée pour ces tests est la condition B (décrite en détail dans la section suivante) qui a une  $I_{spta} = 156 \text{ W/cm}^2$  et un  $RC = 2,5\%$ .

On voit, pour les expériences de TA, que l'on a une relation linéaire entre les concentrations de HTA produites et le temps d'insonification. La corrélation obtenue est excellente ( $R_2 = 99\%$ ). Par contre, ces tests ayant été réalisés sur une seule journée, la reproductibilité des mesures qui peuvent dépendre des conditions extérieures n'a pas été évalué. Il est logique que la régression soit de type linéaire comparativement aux résultats présentés dans les chapitres *in vitro* avec une courbe de régression puissance, car on reste sur des concentrations de HTA modérées.

Les tests réalisés sur les liposomes *Epi1\_12D*, réalisés également sur une seule journée, montrent une excellente corrélation avec le temps. Ces test confirment que l'on induit *in vitro* dans ce dispositif, pour la formulation de liposomes sélectionnée, le largage de doxorubicine par l'application d'ultrasons d'intensité modérée.

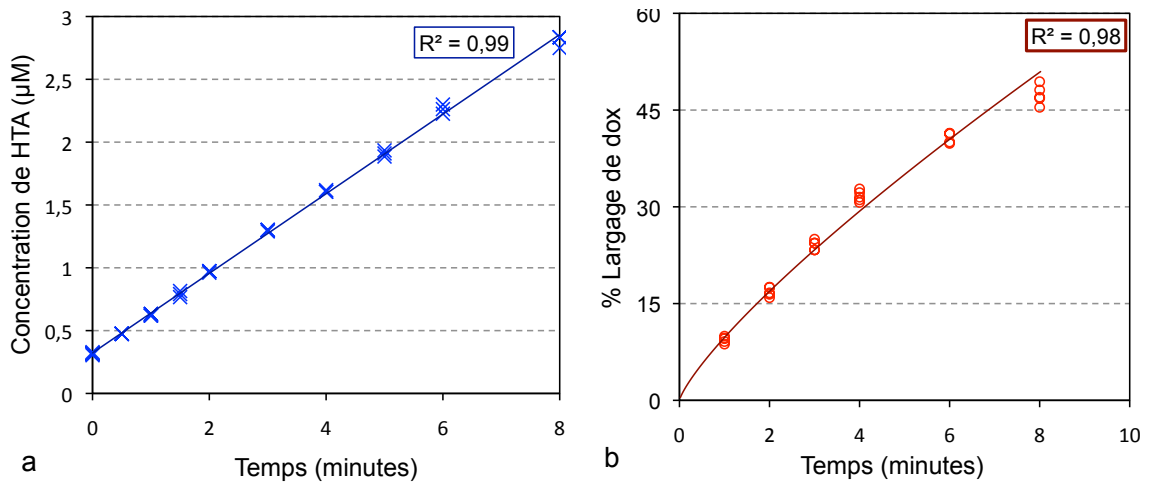


FIGURE 5.11 – (a) Concentration de HTA formé en fonction du temps d'insonification dans le système confocal (b) Pourcentage de largage de doxorubicine des liposomes Epi1\_12D en fonction du temps d'insonification dans le système confocal. Les conditions d'insonification utilisées sont les conditions d'insonification B décrites dans la section suivante. Les échantillons de chaque courbe sont effectués sur une seule journée d'expérimentation

### 5.3.3 Etude des effets induits sur la tumeur par différentes conditions d'exposition ultrasonores.

#### 5.3.3.1 Matériel et méthodes

Le modèle animal et tumoral et le matériel nécessaire à l'implantation des tumeurs sont décrits section 4.2.3.1. Le matériel et les méthodes d'anesthésie restent les mêmes que ceux des deux premières études *in vivo* et sont décrits section 4.5.2.0.8.

Le nombre total de rats Copenhague utilisés dans cette étude est de 51.

7 rats servent à l'amplification des tumeurs.

Aucune injection de médicament sous forme liposomale ou non n'est effectué dans cette étude.

#### Etude préliminaire

Une étude préliminaire sur 9 rats est tout d'abord réalisée afin de déterminer les modalités de traitement ainsi que les amplitudes (A) et les rapports cycliques (RC) qui vont être testés dans l'étude principale. La fréquence de répétition et la vitesse de balayage de la tumeur ont été fixées respectivement à 252 Hz et à 1 mm/s lors de tests préalables sur des morceaux de viande ; tout comme l'ont été les plages d'amplitudes et de rapport cycliques qui seront testés.

Deux critères de sélection sont choisis pour cette étude. Premièrement, l'observation de zones hyper-échogènes transitoires associées à de la cavitation lors du traitement. Ces zones doivent être localisées dans la tumeur à la focale des deux transducteurs pointée par une flèche sur les images échographiques. La cavitation à l'interface eau-peau ne doit

pas avoir lieu pour les tirs profonds et doit-être limitée autant que possible pour les tirs proches de la surface de la tumeur. Le second critère de sélection est l'observation des dommages induits juste après le traitement. Ces dommages doivent être minimales. Au final, 3 conditions d'expositions (A,B,C) devront être retenues pour l'étude principale.

Les rats sont répartis en 3 groupes de 3 rats et sont traités à J9 après implantation :

- . groupe 1 : première sélection des A et RC. D'abord sur des tirs fixes puis en balayant la tumeur (sur un seul plan).
- . groupe 2 : sélection finale des A et RC en balayant la tumeur (sur un seul plan).
- . groupe 3 : effet d'un second balayage sur le même plan de tumeur avec les conditions d'exposition sélectionnées.

Les paramètres ultrasonores testés dans cette étude préliminaire varient selon les plages suivantes :

- .  $RC = 1 \%$  : de  $A = 2$  dBm à 8 dBm (amplitude à l'entrée de l'amplificateur) correspondant à  $I_{sppa} = 4955$  à  $15670$  W/cm<sup>2</sup> et à des pressions pic  $p_{pic} \approx 12$  à  $22$  Mpa ( $I_{spta} \approx 50$  à  $157$  W/cm<sup>2</sup>)
- .  $RC = 2,5 \%$  : de  $A = 2$  à 3 dBm correspondant à  $I_{sppa} = 4955$  à  $6240$  W/cm<sup>2</sup> correspondant à  $p_{pic} \approx 12$  à 14 Mpa ( $I_{spta} \approx 124$  à  $156$  W/cm<sup>2</sup>)
- .  $RC = 5 \%$  : de  $A = 0$  à 3 dBm correspondant à  $I_{sppa} = 3125$  à  $6240$  W/cm<sup>2</sup> correspondant à  $p_{pic} \approx 10$  à 14 Mpa ( $I_{spta} \approx 156$  à  $312$  W/cm<sup>2</sup>)

Pour rendre plus lisibles la présentation des tests et leurs résultats nous utiliserons les amplitudes d'entrées en dBm dont les correspondances en  $I_{sppa}$  et  $p_{pic}$  sont données ci-dessus.

### Etude principale

L'étude principale est menée sur 35 rats. Elle va permettre de tester 3 paramètres ultrasonores retenus dans l'étude préliminaire en effectuant soit un balayage complet de la tumeur soit un balayage partiel (c.f section 5.3.2). Le balayage partiel consiste à laisser une "tranche" non traitée de 1mm entre chaque plan/tranche traitée (l'épaisseur de la tranche traitée correspond à la dimension latérale de la tâche focale soit  $\approx 2$  mm). Les critères de suivi après traitement restent les même que ceux décrits précédemment section 4.5.2.0.8 à savoir l'évolution de la surface tumorale et suivi du poids des animaux. Les animaux sont traités à J10 après implantation et sont suivis jusqu'à J25 (jours de suivi : J11, J14, J18, J22, J25). Un rat de chaque groupe est euthanasié à J12 afin d'effectuer des analyses histologiques pour évaluer la nécrose des tissus tumoraux induite par le traitement ultrasonore.

Les rats sont répartis en 7 groupes de 5 rats :

- . groupe 4 : témoin (pas d'irradiation)

### 5.3. DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'EXPOSITION ULTRASONORES 189

- groupe 5 : traitement A balayage complet
- groupe 6 : traitement A balayage partiel
- groupe 7 : traitement B balayage complet
- groupe 8 : traitement B balayage partiel
- groupe 9 : traitement C balayage complet
- groupe 10 : traitement C balayage partiel

Seules deux conditions d'insonification devront être retenues à l'issu de ces tests pour effectuer l'étude sous IRM pour laquelle nous devons limiter le nombre de rats à traiter en raison de grands temps d'acquisition des séquences IRM.

#### 5.3.3.2 Résultats et discussion

##### Etude préliminaire

Les résultats de cette étude sont présentés figure 5.12. La sélection s'est effectuée sui-

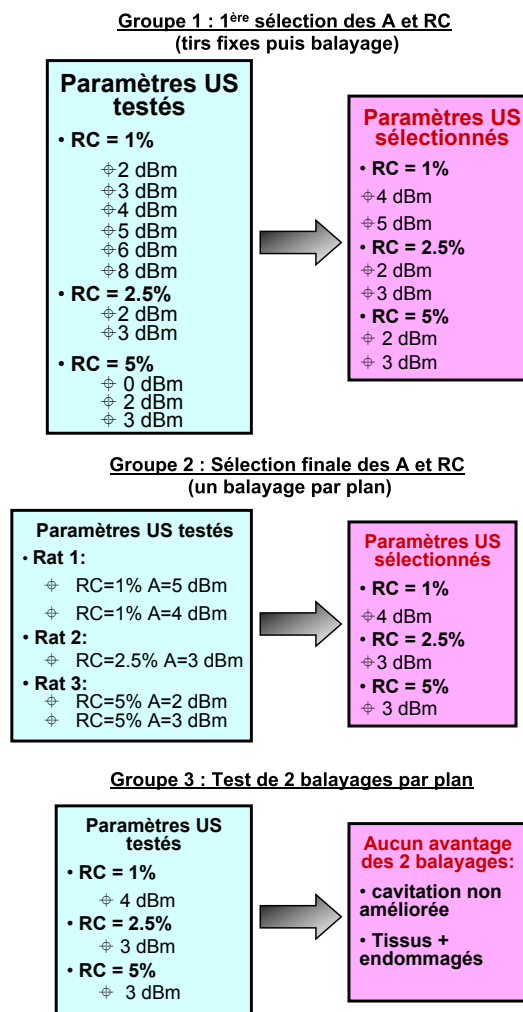


FIGURE 5.12 – Tests réalisés sur les 3 groupes de rats de l'étude préliminaires et sélection de 3 conditions d'exposition à l'issu de ces tests.



vant les critères énoncés dans la section Matériel et méthodes. Un second balayage de la tumeur n'apportant aucun bénéfice et des dommages plus importants des tissus tumoraux, un balayage unique de la tumeur est retenu comme modalité de traitement.

Les conditions d'insonification retenues pour l'étude principale sont :

- . A :  $RC = 1\%$ ,  $A = 4dBm$ ,  $I_{sppa} = 7855 \text{ W/cm}^2$ ,  $p_{pic} \approx 15,5 \text{ Mpa}$   
( $I_{spta} = 79 \text{ W/cm}^2$ )
- . B :  $RC = 2,5\%$ ,  $A = 3dBm$ ,  $I_{sppa} = 6240 \text{ W/cm}^2$ ,  $p_{pic} \approx 14 \text{ Mpa}$   
( $I_{spta} = 156 \text{ W/cm}^2$ )
- . C :  $RC = 5\%$ ,  $A = 3dBm$ ,  $I_{sppa} = 6240 \text{ W/cm}^2$ ,  $p_{pic} \approx 14 \text{ Mpa}$   
( $I_{spta} = 312 \text{ W/cm}^2$ )

avec  $RF = 252Hz$  et la vitesse de balayage fixée à  $1mm/s$ .

### Etude principale

Les images des analyses histologiques et le pourcentage de nécrose tumorale associé sont présentés figure 5.13) ainsi que l'aspect des tumeurs avant, juste après et deux jours après traitement. Les images des tumeurs choisies pour chaque groupe sont les plus représentatives de ce qui est observé dans le groupe. Les pourcentages de nécroses tumorales issus de l'analyse histologique varient de 4% pour le rat du groupe témoin à 94% pour le rat du groupe 9. Notons que pour un rat du G10 La tumeur s'est entièrement résorbée.

Au vu des pourcentages de nécrose et de l'aspect des tumeurs (tumeurs brûlées ou quasi résorbées) les conditions d'exposition du groupe G9 et G10 sont exclues d'office (condition C balayage complet ou partiel). Pour le rat issu du groupe G8, les analyses histologiques révèlent, en plus du pourcentage de nécrose de 64%, une ulcération de la tumeur et une nécrose étendue sur une bande traversant toute la tumeur. Cet impact important sur la tumeur n'est pas approprié pour étudier l'efficacité d'un traitement combiné de liposomes et d'ultrasons, la condition d'exposition appliquée au groupe 8 est elle aussi exclue.

Les groupes 5, 6, 7 ayant des pourcentages de nécroses tumorales plus limités (variant de 31 à 42%) sont retenus provisoirement. Notons que pour le G6 la nécrose se situe sur une bande centrale traversant la tumeur alors que pour les G5 et G7 la nécrose est localisée sur un quartier de la tumeur. On remarque aussi que les balayages partiels de la tumeur pour les paramètres A et B induisent contre toute attente plus de dommages que les balayages complets de la tumeur. Cependant, l'analyse histologique n'étant effectuée que sur un rat de chaque groupe, il convient de prendre ces résultats avec précaution.

Intéressons nous maintenant à l'impact des traitements sur la croissance tumorale. Les moyennes par groupes et l'écart type des surfaces tumorales centrées (à J10) sont présentées figure 5.14 en fonction du temps.

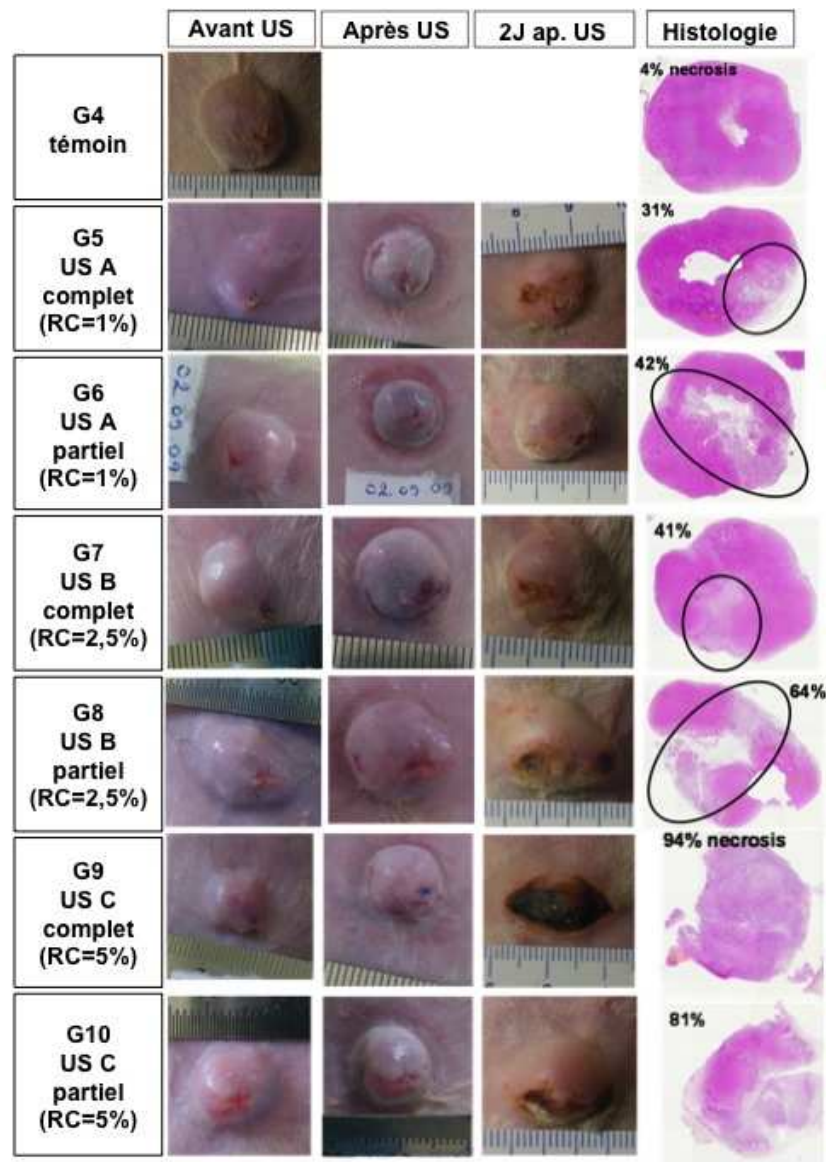


FIGURE 5.13 – Aspect des tumeurs avant et après traitement pour tous les groupes. Pourcentages de nécrose provenant des analyses histologiques des tissus tumoraux prélevés sur le premier rat de chaque groupe sacrifié 48h après le traitement ultrasonore.

Les ralentissements de la croissance tumorale les plus importants sont observés pour le G9 et le G10 (c.f figure 5.14 a), ce qui confirme les résultats de l'analyse histologique quand à l'exclusion de la condition d'exposition C ayant le rapport cyclique le plus élevé. Le groupe 8 n'induit pas de ralentissement de la croissance tumorale mais a été rejeté au vu du pourcentage de nécrose obtenu. Les groupes 5, 6, 7 présélectionnés semblent avoir des surfaces tumorales équivalentes sauf à J14 où le groupe 5 a des surfaces tumorales un peu plus élevées que celles des deux autres groupes (c.f figure 5.14 b). Le groupe 6 ( $RC = 1\%$  balayage partiel) présente des surfaces tumorales équivalentes au groupe 7 ( $RC=1\%$  balayage complet) pour tous les jours de suivi. Ce groupe induisait un

pourcentage de nécrose a peu près équivalent à celui du groupe 7 mais dans une bande centrale traversant la tumeur, ce qui peut empêcher la diffusion de chimiothérapie lors d'un traitement combiné ultrasons et liposomes. Nous préférons exclure ce groupe. Les groupes 5 et 7 étant tous deux équivalents au groupe témoin (c.f 5.14 c), il n'induisent *a priori* pas de ralentissement de la surface tumorale.

Les deux conditions d'insonification associées au groupe 5 et 7 sont par conséquent retenues pour l'étude IRM, à savoir les conditions A et B avec un balayage complet de la tumeur.

Notons que les poids des rats ont été suivis au cours de cette étude (non représentés). Aucune perte de poids significative n'est observée pour les groupes sélectionnés.

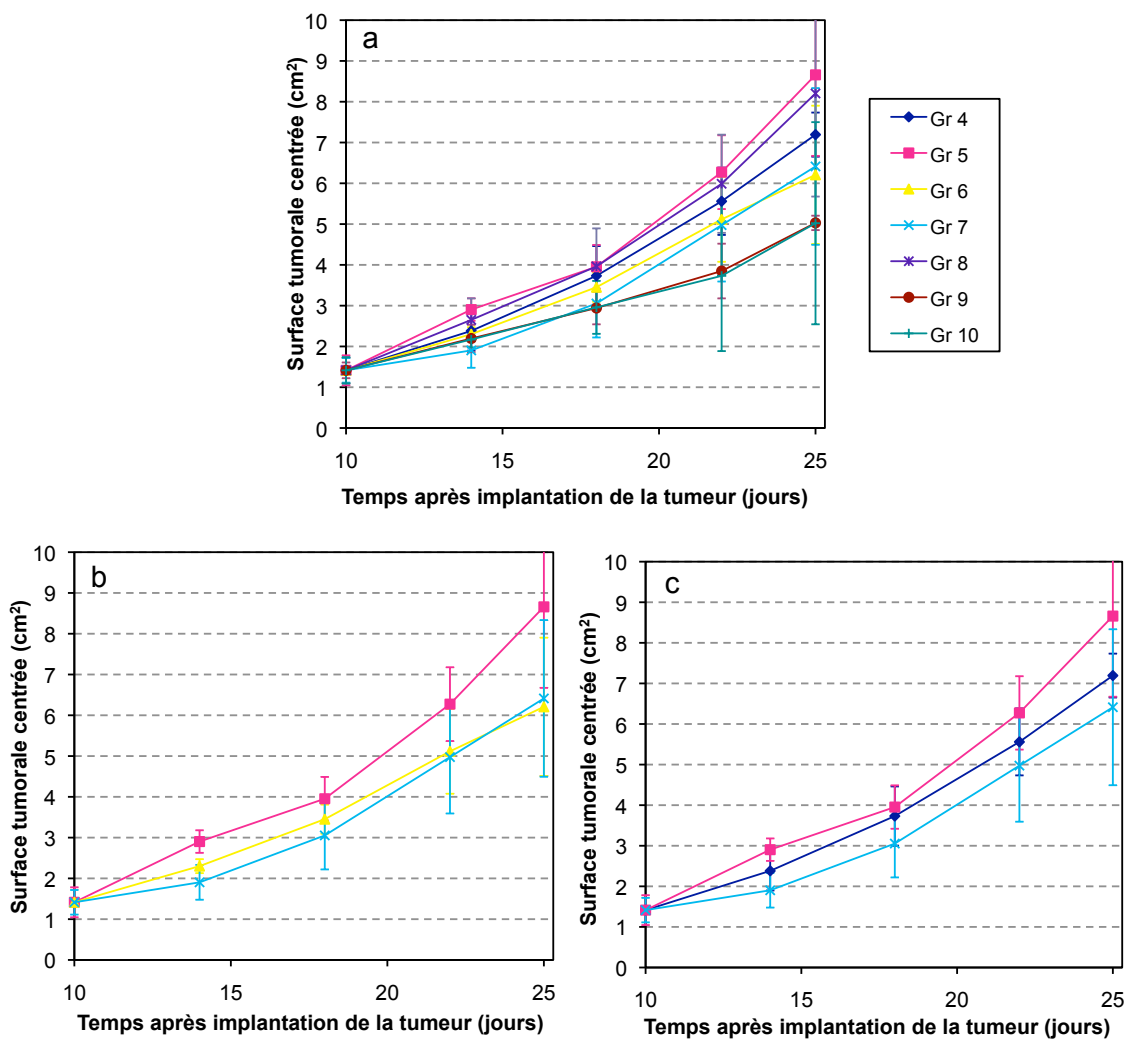


FIGURE 5.14 – Evolution des surfaces tumorales centrées moyennes par groupe au cours du temps après traitement ultrasonore à J10. Les barres d'erreurs représentent les écarts types.

### 5.3.4 Etude sous IRM du largage induit par les conditions d'expositions ultrasonores.

Une étude IRM est menée afin de déterminer si les paramètres ultrasonores choisis permettent de libérer le contenu des liposomes *in vivo*. Cette étude permettra aussi de vérifier s'il y a bien accumulation des liposomes dans la tumeur.

#### 5.3.4.1 Matériel, méthodes et rappels théoriques

Des liposomes de la formulation *Epi2.8D* sont chargés avec deux solutions d'agents de contraste IRM différentes à base de lanthanides. Ces liposomes avaient été préalablement préparés avant les expériences de bio distribution, c'est pourquoi ce ne sont pas les liposomes de la formulation *Epi1.12D* sélectionnée qui sont utilisés.

Une solution de gadolinium-DTPA-BMA (Gd) est chargée dans le corps aqueux des liposomes tandis qu'une solution de dysprosium-DTPA-BMA (Dy) est chargée dans la bi-membrane. En utilisant les séquences IRM appropriées, le Gd permet d'étudier le largage du contenu des liposomes tandis que le Dy permet d'étudier l'accumulation des liposomes.

Nous avons mené préalablement une étude *in vitro* en mélangeant dans des échantillons de sang des liposomes chargés avec du Dy ou avec du Dy + Gd à diverses concentrations. Cette étude a permis de déterminer les marqueurs appropriés (à savoir le Dy + Gd), leur dosage et les séquences IRM adaptées pour visualiser les liposomes intacts et le largage de leur contenu (après ajout de triton-X pour dissoudre la membrane).

Dans cette étude, les deux grandeurs d'intérêt sont le temps de relaxation longitudinal T1 et le temps de relaxation transversal avec susceptibilité magnétique T2\*.

Rappelons ce qu'elles signifient. Lorsqu'un corps est soumis au champ magnétique d'un IRM, les vecteurs moments magnétiques élémentaires des protons ( $\vec{M}_0$ ) s'alignent avec le vecteur champ magnétique initial  $\vec{B}_0$  de l'appareil (c.f figure 5.15 a). Lorsqu'on envoie de l'énergie sous forme d'une onde électromagnétique de fréquence appropriée, les protons sont mis en résonance magnétique, on parle de résonance magnétique nucléaire (RMN) [Tan01]<sup>[1]</sup>. En pratique, cela se traduit par un basculement des vecteurs magnétiques  $\vec{M}_0$  (c.f figure 5.15 b) en tournant autour de la direction  $\vec{B}_0$  (mouvement de précession). Les protons relaxent ensuite l'énergie acquise et les vecteurs moments magnétique retournent vers leur alignement initial  $\vec{B}_0$  par un mouvement de précession. Les composantes longitudinales  $M_z$  (c.f figure 5.15 c) mettent un temps donné pour revenir à l'équilibre, de même que les composantes transversales  $M_{xy}$  mettent un certain temps pour revenir à l'équilibre initial. Ce retour à l'équilibre est caractérisé par des temps de relaxation. Le

---

[1] Jean-Yves Tanguy. Cours d'imagerie médicale. introduction pratique au diagnostic morphologique: L'IRM, 2001.

temps de relaxation longitudinal (T1) est le temps nécessaire pour que 63% ( $1-e^{-1}$ ) des moments magnétiques des protons du corps placé dans l'IRM reviennent à l'équilibre. T2\* est une mesure de la décroissance du signal transverse lorsqu'il reste 37% ( $e^{-1}$ ) du signal transversal.

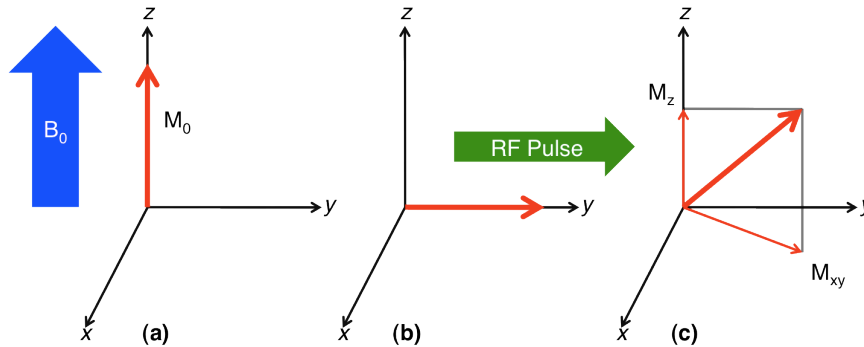


FIGURE 5.15 – Représentation du vecteur moment magnétique  $\vec{M}_0$  d'un proton. (a) Etat initial :  $\vec{M}_0$  aligné avec  $\vec{B}_0$  suivant l'axe z (b) L'application d'une onde RF (électromagnétique) fait basculer le vecteur suivant l'axe y en tournant autour de z (c) Le vecteur revient à son état initial (a) en tournant autour de l'axe z. La composante  $M_z$  du vecteur en rotation est la composante longitudinale, la composante  $M_{xy}$  est la composante transversale. Source : rapport de stage d'Andrew Fowler.

Les propriétés magnétiques du Gd affectent le temps de relaxation T1. La relaxivité du Gd est dépendante de l'eau présente dans les tissus. Si on encapsule le Gd, il n'est pas en contact avec l'eau des tissus et sa relaxivité sera différente. Le temps de relaxation T1 diminue quand le Gd est en contact avec l'eau et donc lorsqu'il est libéré des liposomes. On utilise souvent le taux de relaxation R1 qui est l'inverse du temps de relaxation T1 ; lorsque les liposomes libèrent le Gd, R1 augmente.

Le Dy affecte la susceptibilité magnétique et donc le temps T2\*. Plus la quantité de liposomes s'accumulant dans la tumeur est importante, plus la quantité de Dy augmente et plus le T2\* diminue. Dans cette étude, les temps de relaxation T2\* mesurés et les taux de relaxation R1<sup>2</sup> calculés à partir des mesures de T1 sont cartographiés en images (en niveaux de gris) permettant de visualiser respectivement l'accumulation des liposomes et la libération de leur contenu. Pour les images représentant T2\*, une diminution de l'intensité d'une zone (zone plus foncée) correspond à l'accumulation de liposomes dans cette zone. Pour les images représentant R1<sup>2</sup>, une augmentation de l'intensité d'une zone de l'image (zone plus claire) signifie une libération dans cette zone du Gd contenu dans les liposomes.

Le traitement des images et leur analyse ont été réalisés par Andrew Fowler dans le cadre de son stage de Master 2.

### 5.3. DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'EXPOSITION ULTRASONORES 195

Dans cette étude, le modèle tumoral (Dunning AT-2) est le même que celui utilisé dans les autres études sauf que pour des raisons pratiques d'imagerie, la tumeur est implantée sur la patte arrière droite de chaque rat Copenhague. 6 rats sont utilisés dans cette étude. 4 rats reçoivent une injection de liposomes à J10 après implantation de la tumeur (dosage de 6 mg/Kg). Tous les rats reçoivent un traitement ultrasonore A ou B (c.f section précédente) 48 h après injection en IV (déterminé par l'étude de bio-distribution).

Les traitements reçus par chaque rat sont détaillés ci-dessous :

- . rat 1 et rat 2 : injection + traitement ultrasonore B ( $RC = 2,5\%$ )
- . rat 3 et rat 4 : injection + traitement ultrasonore A ( $RC = 1\%$ )
- . rat 5 : traitement ultrasonore A ( $RC = 1\%$ )
- . rat 6 : traitement ultrasonore B ( $RC = 2,5\%$ )

L'imagerie IRM a été réalisée à ANIMAGE dans un IRM 7 Teslas (Bruker). Des images IRM sont réalisées sous anesthésie gazeuse (isofluorane) à J10, à J12 avant traitement ultrasonore et à J12 après traitement ultrasonore.

Sans entrer dans les détails, les séquences IRM pour les mesures de  $T2^*$  sont des séquences en multi-écho de gradient et pour les mesures de  $T1$  sont des séquences en inversion récupération.

#### 5.3.4.2 Résultats et discussion

##### Analyse des images $T2^*$

Pour tous les rats ayant reçu une injection de liposomes, on observe sur les images cartographiant  $T2^*$ , une diminution très forte de l'intensité dans la tumeur en comparant les images prises à J10 et à J12 avant traitement. Ce changement visuel correspond à une diminution moyenne du  $T2^*$  de 1 ms. La figure 5.16 montre les images pour les rats 1 et 2 en comparaison avec un rat témoin n'ayant pas reçu d'injection. On voit en haut à gauche de chaque image une forme ronde correspondant à la tumeur entourée par un cercle rouge. A J10 au moment de l'injection, avant que les liposomes se soient accumulés dans la tumeur, la tumeur est de couleur claire pour le rat 1, rat 2 et le rat témoin. 48 heures après, les tumeurs des rats sont de couleurs sombre pour les rats 1 et 2 alors qu'elle reste de couleur claire pour le rat témoin. Ce changement d'intensité montre l'accumulation des liposomes dans la tumeur 48 heures après injection et confirme les résultats de l'étude de bio distribution. De plus, ces tests apportent une information supplémentaire à savoir qu'au moins une partie des liposomes n'a pas libéré son contenu 48 h après injection.

On notera que l'accumulation est moins homogène dans la tumeur du rat 2, ce qui est sans doute dû à un centre nécrotique.

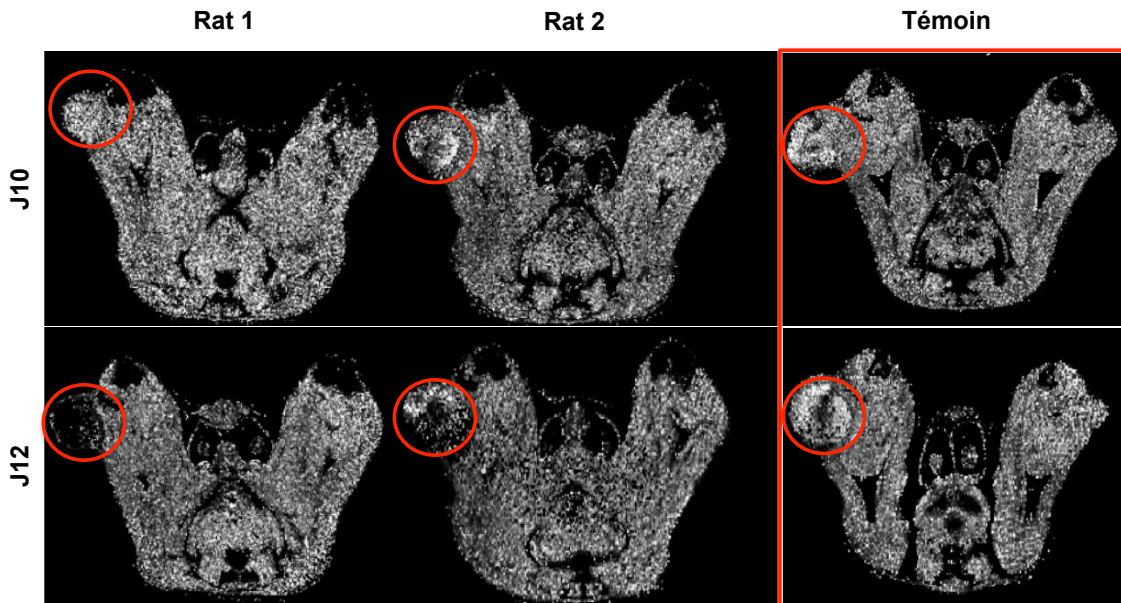


FIGURE 5.16 – Images  $T2^*$  à J10 et à J12 avant traitement ultrasonore.

### Analyse des images $R1^2$

Pour les rats ayant reçu le traitement ultrasonore A, aucune augmentation significative de l'intensité n'est observée dans la tumeur sur les images  $R1^2$  (c.f figure 5.17). Les mesures confirment l'aspect visuel avec des variations de l'intensité dans la tumeur inférieures à 3%. Il ne semble donc pas y avoir eu libération du Gd contenu dans les liposomes suite au traitement ultrasonore. Notons que le rat témoin de ce groupe a une tumeur atrophié, ce qui n'en fait pas le témoin idéal.

Pour les rats ayant reçu le traitement ultrasonore B, une augmentation importante de l'intensité dans la tumeur est observée sur les images  $R1^2$  pour les rats 1 et 2 (c.f figure 5.18). Notons qu'une augmentation d'intensité est également observée dans la tumeur du rat témoin n'ayant pas reçu de liposomes. Ce changement d'intensité n'est pas significative si on normalise par rapport au bruit de l'image. Au niveau des mesures, on a une augmentation de l'intensité lumineuse dans la tumeur de  $\approx 43\%$  pour le rat 1 et de  $\approx 21\%$  pour le rat 2 en comparaison avec le rat témoin qui a une diminution de l'intensité dans la tumeur de  $\approx 4\%$ . Les diminutions de temps de relaxations  $T1$  calculés entre les images réalisées avant et après traitement ultrasonores sont de 248 ms, 179 ms et 36 ms pour le rats 1, le rat 2 et le rat témoin respectivement. Ces résultats montrent qu'il y a eu largage de Gd dans la tumeur pour le rats ayant reçu le traitement ultrasonore B.

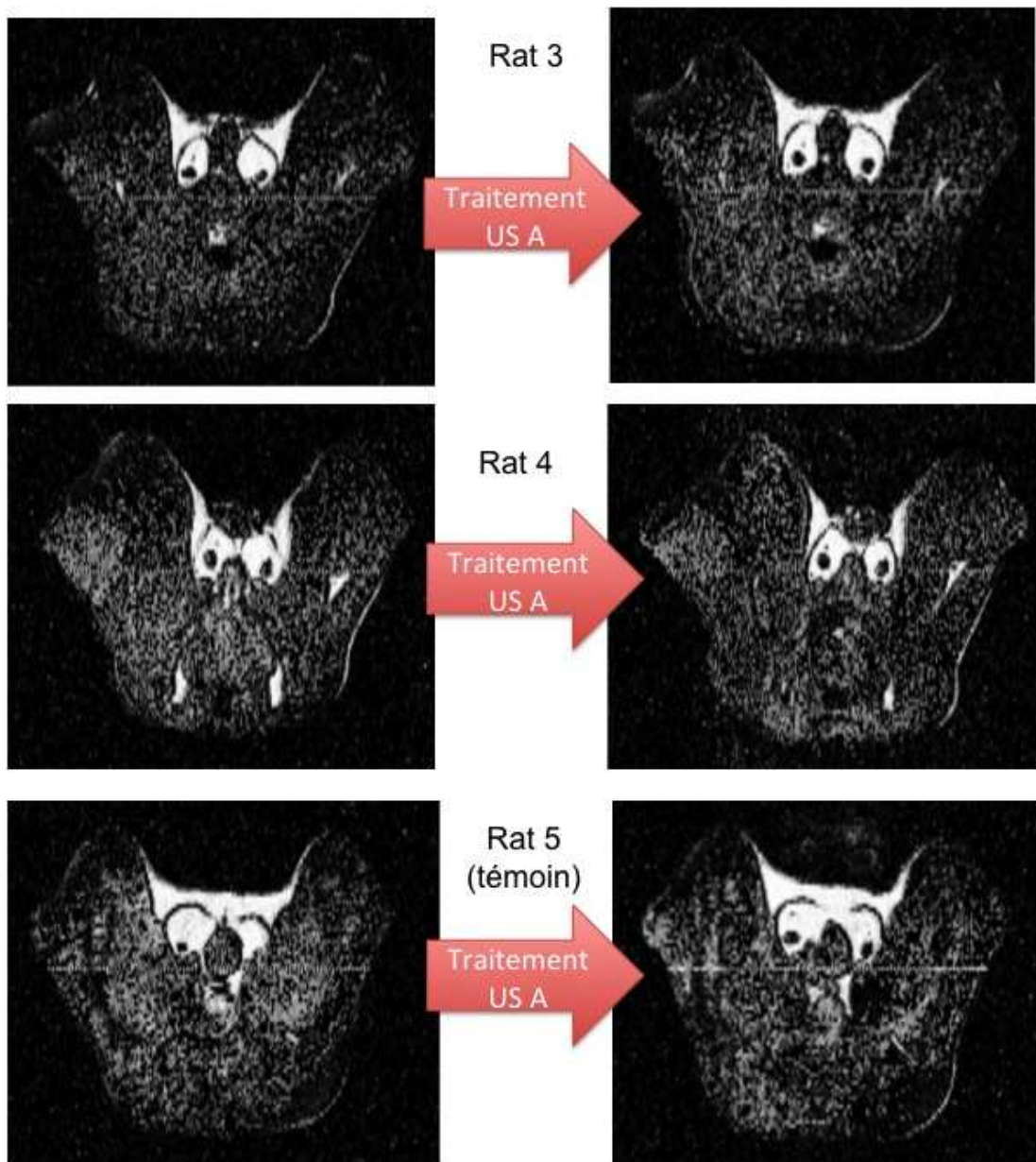


FIGURE 5.17 – Images  $R1^2$  à J12 avant et après traitement ultrasonore A. Seuls les rats 3 et 4 ont reçus une injection de liposomes à J10.

Pour résumer, les résultats obtenus en appliquant le traitement ultrasonore B se distinguent nettement de ceux obtenus en appliquant le traitement ultrasonore A. En effet, dans le premier cas, on a sur l'image  $R1^2$  une nette augmentation de l'intensité ultrasonore dans la tumeur associée à un largage de Gd dans les tissus alors que dans le second cas, aucune variation significative de l'intensité est observée.



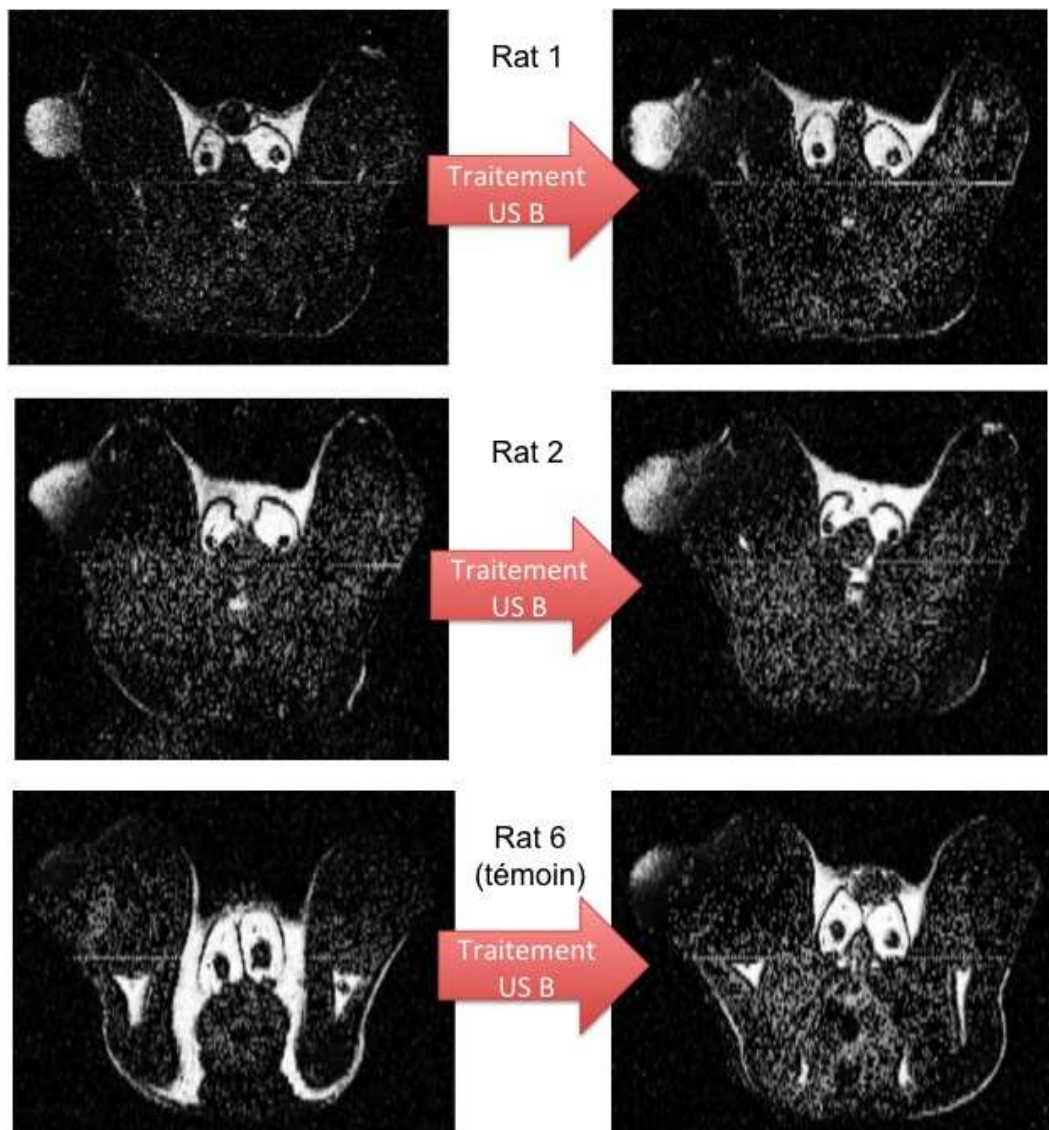


FIGURE 5.18 – Images  $R1^2$  à  $J12$  avant et après traitement ultrasonore B. Seuls les rats 1 et 2 ont reçus une injection de liposomes à  $J10$ .

### 5.3.5 Conclusion

Dans cette section nous avons tout d'abord présenté le nouveau dispositif mis au point pour améliorer les conditions d'irradiations. Nous avons mené une première étude *in vitro* afin de déterminer les conditions d'insonification adéquates pour traiter la tumeur sans induire de dommages importants des tissus. A l'issue de cette étude deux conditions d'exposition nommées A et B ont été retenues. Ensuite, une étude IRM a permis de sélectionner la condition d'exposition ultrasonore B pour laquelle nous avons observé le largage d'agent de contraste encapsulé dans des liposomes. C'est par conséquent cette condition d'exposition ultrasonore qui sera appliquée dans l'étude d'efficacité que nous allons maintenant présenter.

## 5.4 Etude de l'efficacité de la délivrance par ultrasons de doxorubicine encapsulée

### 5.4.1 Introduction

L'étude précédente a permis de vérifier la fiabilité du dispositif ultrasonore mis en place et de déterminer les conditions d'exposition ultrasonores n'ayant pas d'impact sur la croissance tumorale. Elle a aussi permis, grâce aux tests IRM réalisés, de sélectionner une condition d'exposition ultrasonore permettant *a priori* d'induire le largage du contenu de liposomes injectés dans la tumeur.

Une étude complète est nécessaire pour étudier l'efficacité de traitements combinant injection de liposomes de la formulation sélectionnée à différentes doses et insonification de la tumeur, comparativement à d'autres traitements tels que des injections de liposomes.

### 5.4.2 Matériel et méthodes

Le dispositif ultrasonore a été décrit section 5.3.2.

Le modèle animal et tumoral et le matériel nécessaire à l'implantation des tumeurs sont décrits section 4.2.3.1.

Le matériel, les méthodes d'anesthésie et d'injection des rats restent les mêmes que ceux des deux premières études *in vivo* et sont décrits section 4.5.2.0.8.

La formulation de liposomes utilisée est la formulation *Epi1\_12D* sélectionnée dans l'étude de bio distribution (c.f section 5.2). Le lot de liposomes utilisé pour l'étude contient 1mg/ml de doxorubicine.

#### 5.4.2.1 Animaux, groupes de traitement et suivi après traitement

Pour cette étude, 45 rats Copenhague sont répartis en 5 groupes de 9 rats :

- . groupe 1 : témoin ultrasons
- . groupe 2 : doxorubicine liposomale à 3 mg/Kg
- . groupe 3 : doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg
- . groupe 4 : doxorubicine liposomale à 3 mg/Kg + ultrasons
- . groupe 5 : doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg + ultrasons

Les liposomes sont injectés à J10 en IV et le traitement ultrasonore (condition d'exposition sélectionnée dans l'étude précédente) est effectué 48 h après injection. En effet, l'étude de bio distribution a permis de déterminer que ce temps de 48 h correspond à la captation intra tumorale maximale de liposomes.

Les critères de suivi restent les mêmes que dans les précédentes études (c.f section 4.5.2.0.8). Les jours de suivis sont : J14, J17, J21, J24, J28, J31 et J33. Des analyses

statistiques complètes, réalisées suivant le modèle présenté en Annexe 1, sont effectuées avant le traitement à J10, pendant toute la durée du suivi après traitement et enfin à J33 jour de l'euthanasie.

### 5.4.3 Résultats et discussion

#### 5.4.3.1 Observations liées au traitement et au suivi

Le développement de la tumeur a été suivi aussi longtemps que possible. Par rapport à la seconde étude *in vivo* du chapitre 4, le point limite de suivi a été révisé à J40 au lieu de J60 pour éviter que l'animal ne souffre à cause de l'apparition de métastases au niveau du thymus. Néanmoins, l'étude a été stoppée à J33 car les tumeurs du groupe témoin ultrasons dépassaient la taille critique de 3 cm de diamètre. Lors de l'autopsie, un seul animal présentait des métastases au niveau du thymus (rat 9 du groupe 2).

#### 5.4.3.2 Aspect visuel des tumeurs après traitement

Nous avons étudié l'impact du traitement ultrasonore sur la tumeur ainsi que l'aspect de la tumeur après traitement lors de l'étude de détermination des conditions d'exposition ultrasonore. La figure 5.13 (image du groupe G7) montre l'aspect typique d'une tumeur après insonification dans les conditions de cette étude.

Seul le rat 6 du groupe 5 présente la particularité de ne plus avoir de tumeur apparente à J17 (c.f figure 5.19). Une zone de nécrose est visible mais la surface abdominale est plane. Ce rat a été gardé en observation pour contrôler l'éradication totale de la tumeur. Une croissance tumorale a été observé à J52 et l'animal est mort à J76. A l'autopsie, des tumeurs sous cutanées étaient présentes au niveau des creux des pattes avant et au niveau abdominal. Aucun autre organe ne présentait de métastases. Pour ces différentes raisons, l'animal a été exclu des analyses statistiques à partir de J17.

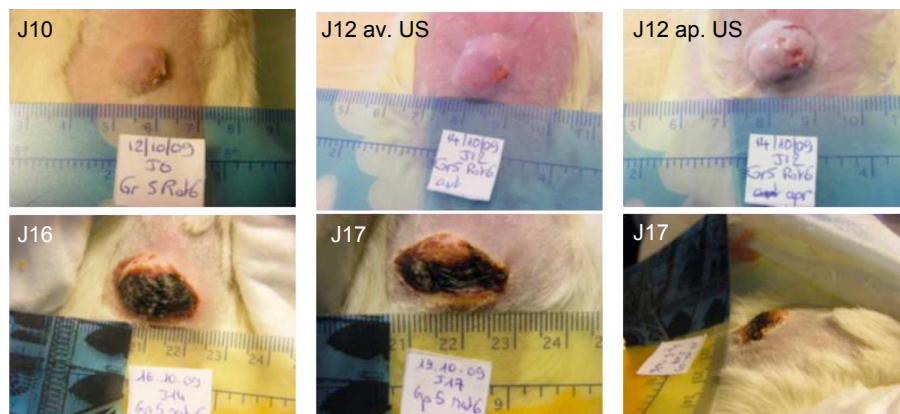


FIGURE 5.19 – Suivi de J10 à J17 du rat 6 groupe 5.

### 5.4.3.3 Etude des surfaces tumorales des différents groupes

Avant traitement à J10, les analyses statistiques montrent l'homogénéité de l'ensemble des mesures de surface tumorales (test de Levène :  $p = 0,61$ ) et la normalité de leur distribution (test de Shapiro-Wilk,  $p = 0,89$ ). Par contre, le test d'égalité des moyennes des groupes (ANOVA,  $p=0,0002$ ) rejette l'hypothèse d'équivalence des groupes avant traitement. Le test t de Student montre que le groupe 1 (témoin US) est significativement différent des autres groupes pour les mesures de surface tumorale à J10 (c.f figure 5.20). L'équivalence des groupes est rétablie si l'on exclut le groupe 1 de l'étude statistique. Ce problème pourrait provenir d'une mauvaise répartition initiale des rats dans les différents groupes.

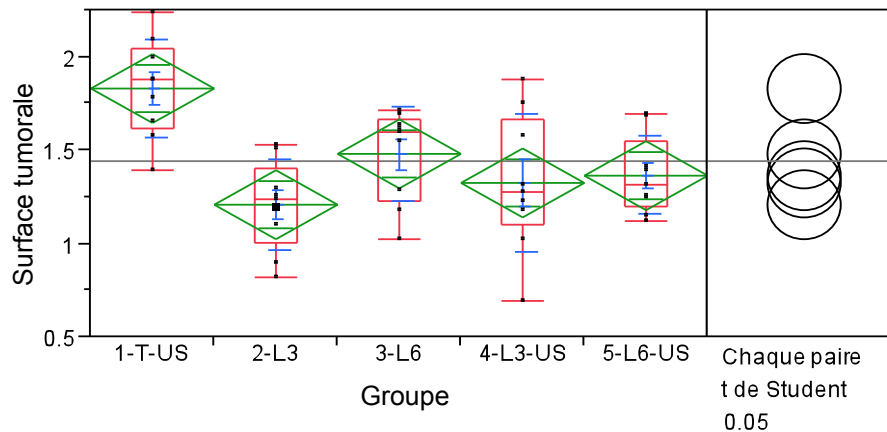


FIGURE 5.20 – Comparaison des surfaces tumorales des différents groupes à J10. Se référer à l'Annexe 2 pour la signification des différentes représentations.

Afin d'étudier l'évolution des surfaces tumorales après traitement, on va translater les courbes pour que les moyennes des groupes à J10 soient centrées sur la moyenne des surfaces des groupes 2 à 5 (c.f figure 5.20)

L'analyse statistique des données au cours du temps montre que la variance des surfaces tumorales des groupes croît avec le temps. Une transformation logarithmique est par conséquent appliquée à l'ensemble des données afin de rendre la variabilité temporelle des groupes homogène.

Le modèle de régression choisi pour suivre l'évolution des surfaces tumorales de chaque groupe est de la forme :

$$\ln(\text{Surface Tumorale}) = A \cdot J^3 + B \cdot J^2 + C \cdot J + D \quad (5.1)$$

avec :

- . J le nombre de jours après implantation
- . A,B,C,D coefficients dont les valeurs sont ajustées pour décrire l'évolution temporelle de chaque groupe.

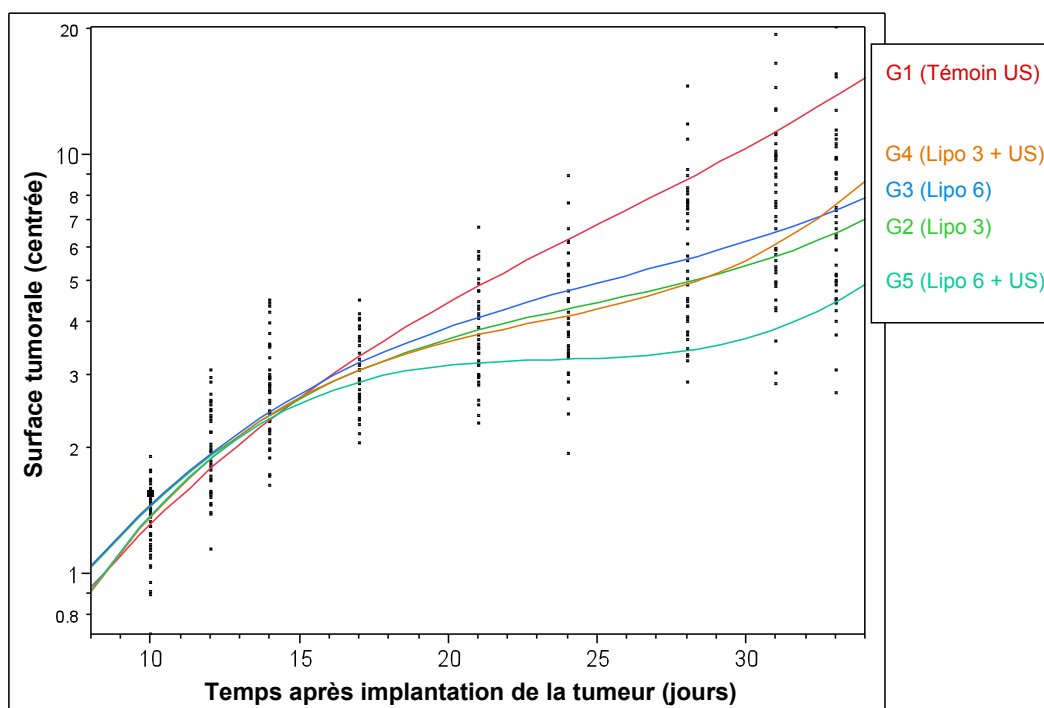


FIGURE 5.21 – Evolution au cours du temps des surfaces tumorales pour tous les groupes de rats traités (injection à J10 et/ou traitement ultrasonore à J12). Axe des ordonnées à l'échelle logarithmique. Les courbes de régression ont des équations de la forme 5.1.

Les différentes courbes de régression représentant l'évolution des surfaces de chaque groupe au cours du temps sont données figure 5.21. L'évolution des différents groupes jusqu'à J14 est similaire. Après J14, le groupe 1 (témoin ultrasons) se démarque nettement des autres groupes avec une évolution quasi linéaire (en échelle log) des surfaces tumorales au cours du temps (coefficient quasi nuls  $A = 0,0001$  et  $B = 0,008$  dans l'équation 5.1). Ce comportement confirme que le traitement ultrasonore a très peu d'influence sur la croissance tumorale comme cela été démontré dans l'étude précédente (c.f section 5.3.2).

Pour les autres groupes, on voit nettement l'effet du traitement (liposomes seuls ou ultrasons + liposomes) à partir de J17.

On remarque que les groupes ayant reçu uniquement une injection de liposomes (G2 et G3) présentent le même type d'évolution au cours du temps. De même, les groupes ayant reçu une combinaison des deux traitements (G4 et G5) ont des courbes avec des points d'inflexion similaires.

Le degré de ralentissement de la surface tumorale au cours du temps semble cependant varier avec les groupes. Il convient de comparer les groupes à l'aide de leur intervalle de confiance à 95% pour différencier l'efficacité des différents traitements appliqués.

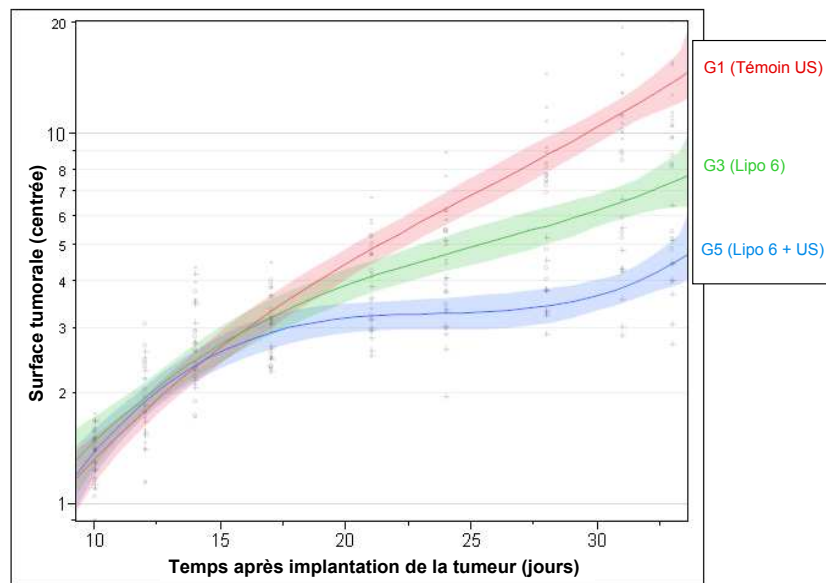


FIGURE 5.22 – Comparaison des courbes de régression des surfaces tumorales en fonction du temps des groupes 1, 3, 5 à l'aide leur intervalle de confiance à 95%.

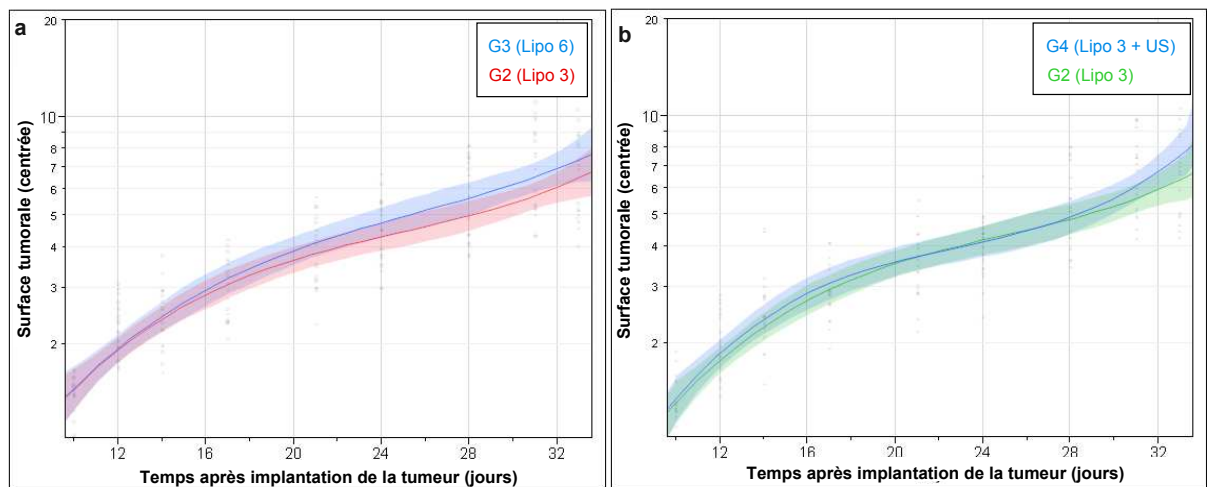


FIGURE 5.23 – Comparaison des courbes de régression des surfaces tumorales en fonction du temps des groupes 2 et 3 (a) ou des groupes 2 et 4 (b) à l'aide leur intervalle de confiance à 95%.

Le graphique 5.23 (a) montre que les intervalles de confiance des groupes 2 et 3 (liposomes seuls) se recouvrent, ce qui indique que la variation de la dose de liposomes injectée n'induit pas de différence significative du ralentissement de la croissance tumorale. Pourtant, la concentration de doxorubicine mesurée dans la tumeur est bien plus importante pour la dose de liposomes à 6 mg/Kg que pour la dose de liposomes à 3 mg/Kg (c.f section 5.2.3.2). Dans l'étude *in vivo* précédente (c.f section 4.6.3.0.20), on avait un ralentissement de la croissance tumorale bien plus important à 6 mg/kg qu'à 3 mg/Kg pour des niveaux (maximums) similaires de concentrations de doxorubicine dans la tumeur (c.f figure 4.13). Les deux études ayant été réalisées en utilisant deux

formulations de liposomes différentes, il semblerait que ce soit la composition de la paroi lipidique qui influe sur la cinétique de libération de doxorubicine dans la tumeur. La bio distribution ne permet toutefois pas de connaître cette cinétique vu qu'elle dose indifféremment la doxorubicine encapsulée ou non. Il n'est donc pas possible de comparer la cinétique des deux formulations. L'observation des courbes montre cependant que dans la présente étude, l'effet de l'injection des liposomes sur la croissance tumorale n'est visible qu'à partir de J17 soit 7 jours après l'injection. Dans l'étude précédente (c.f figure ) l'effet sur la croissance tumorale semble être beaucoup plus rapide après injection et est bien plus marquée à J17 que dans la présente étude. Il pourrait par conséquent y avoir un important largage spontané des liposomes de la 1<sup>ère</sup> génération très peu de temps après l'injection qui induirait cet effet sur la croissance tumorale. La nouvelle génération serait plus stable avec un faible largage spontané dans la tumeur après accumulation. Le manque de synergie entre les ultrasons et la doxorubicine liposomale de la précédente étude pourrait par conséquent provenir d'un largage spontané des liposomes dès accumulation dans la tumeur.

Par ailleurs, la figure 5.22 montre que l'injection de liposomes à 6 mg/kg (G3) ralentit significativement la croissance tumorale par rapport au groupe témoin. L'injection de 3 mg/Kg (G2) a par conséquent le même effet significatif sur la croissance tumorale car les groupes G2 et G3 ont un effet équivalent (c.f figure 5.23 a).

Le graphique 5.23 (b) montre que l'application du traitement ultrasonore après injection à 3 mg/Kg (G4) n'induit aucun effet significatif en comparaison avec une injection de la même dose de doxorubicine encapsulée (G2).

Par contre, le graphique 5.22 montre que l'application du traitement ultrasonore après injection à 6 mg/Kg (G5) ralentit fortement la croissance tumorale en comparaison avec une injection équivalente seule (G3). Par conséquent, on observe un effet synergétique entre le traitement ultrasonore et l'injection de liposome pour une dose de doxorubicine encapsulée de 6 mg/Kg. Il y aurait donc eu un largage de doxorubicine induit par ultrasons et/ou une augmentation de la captation de doxorubicine par les cellules cancéreuses sous l'action des ultrasons et supposément de la cavitation ultrasonore.

Cet effet n'est pas constaté à 3 mg/kg. A cette dose, il se pourrait que le largage induit par ultrasons ne soit pas assez important pour induire un effet cytotoxique élevé sur les cellules cancéreuses (en comparaison avec l'effet de l'injection de liposomes seuls à cette même dose). On peut expliquer ce phénomène par une interaction entre les ultrasons et les liposomes qui doit-être plus faible à la dose de doxorubicine de 3 mg/Kg qu'à la dose de 6 mg/Kg vu que les liposomes sont deux fois moins nombreux pour le plus petit dosage au moment de l'insonification (c.f section 5.2.3.2).

La différence significative observée au cours du temps entre les groupes 3 et 5 est confirmée à J33 (jour du sacrifice) par le test de Tukey-Kramer (c.f figure 5.24) avec

un paramètre  $p = 0,013 < 0,05$ . De même, l'équivalence entre les groupes 2 et 4 est confirmée par ce test à J33 ( $p = 0,79 > 0,05$ ). La synergie du traitement liposomes et ultrasons est donc confirmée pour la dose de doxorubicine de 6 mg/Kg uniquement. Le groupe 5 ( $L6 + US$ ) est également significativement différent du groupe 4 ( $L3 + US$ ) d'après le test de Tuckey-Kramer ( $p = 0,019$ ). Par contre, ce dernier test montre que le groupe 5 n'est pas significativement différent du groupe 2 ( $L3$ ). Aux alentours de J33, on a en effet une pente un peu plus forte pour la courbe de régression du groupe 5 que pour celle du groupe 2. Par contre, quelques jours avant, la différence entre les deux groupes était bien significative. Le test de Tuckey-Kramer montre également l'équivalence des groupes 2, 3 et 4 à J33 (c.f figure 5.24).

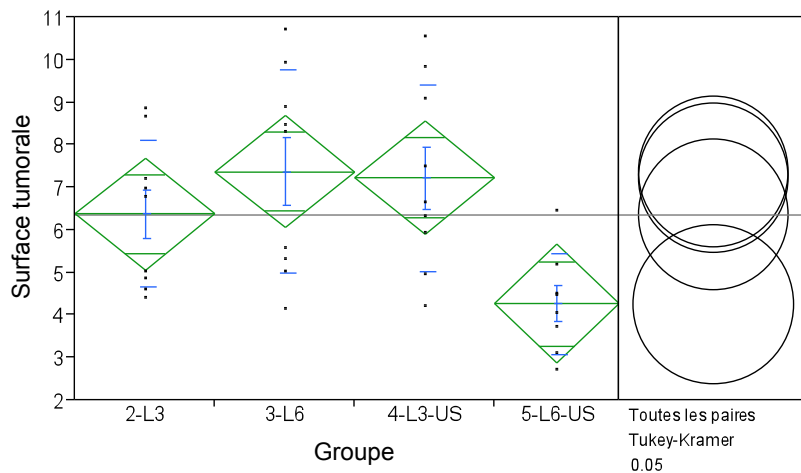


FIGURE 5.24 – Comparaison des surfaces tumorales des différents groupes à J33.

#### 5.4.3.4 Comparaison du poids des tumeurs excisées

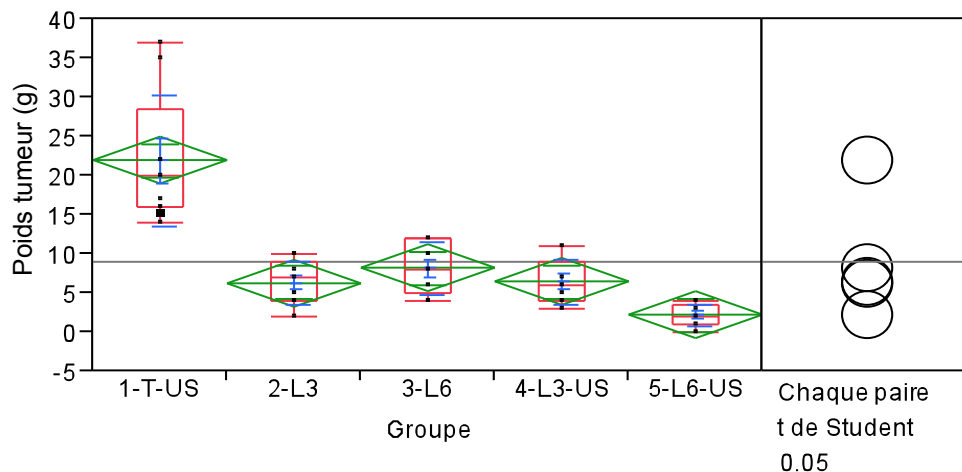


FIGURE 5.25 – Comparaison du poids des tumeurs excisées à J33 des différents groupes de rats.



La figure 5.25 montre une variabilité importante du poids des tumeurs excisées pour le groupe témoin avec une "boîte à moustache" très large (ou diagramme d'observation des valeurs aberrantes voir Annexe 2) et un écart type très élevée. Cette observation est confirmée par le test de Levène qui montre que les variances ne sont pas homogènes. En excluant le groupe témoin, on retrouve l'homogénéité des variances entre les groupes. Le test de Tuckey-Kramer montre que le groupe 5 ( $L6 + US$ ) est significativement différent de tous les autres groupes (c.f figure 5.26) à J33. De plus, la différence avec le groupe 3 ( $L6$ ) est hautement significative ( $p = 0,0008$ ), ce qui confirme la synergie entre le traitement ultrasonore et le traitement de doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg. Notons que les groupes 2,3,4 sont également équivalents en terme de poids des tumeurs à J33.

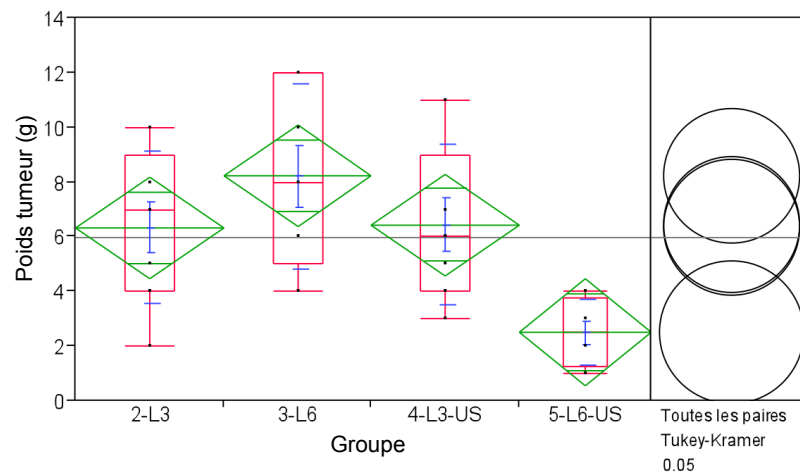


FIGURE 5.26 – Comparaison du poids des tumeurs excisées à J33 des différents groupes de rats. Le groupe 1 est exclu.

#### 5.4.3.5 Evolution du poids des rats

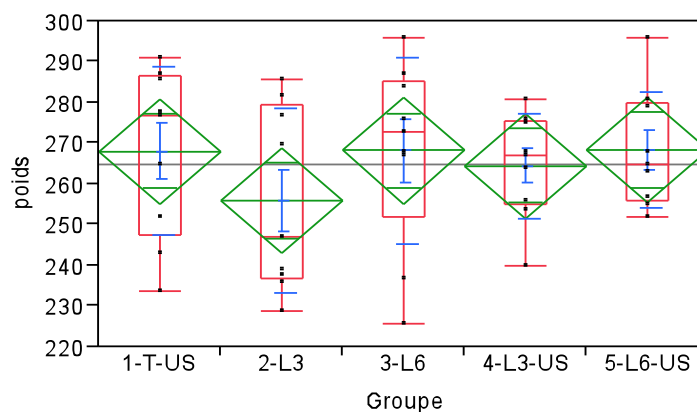


FIGURE 5.27 – Comparaison du poids des rats des différents groupes à J10.

Avant traitement à J10, les groupes ont des variances homogènes des mesures du poids des animaux (test de Levène :  $p = 0,14$ ) et leur poids moyen est équivalent (Anova :  $p = 0,60$ ). De plus, la distribution de l'ensemble des mesures du poids des animaux suit une loi normale (test de Shapiro-Wilk :  $p = 0,09$ ). Tous les groupes de rats choisis sont donc équivalents en terme de poids des animaux (c.f figure 5.27).

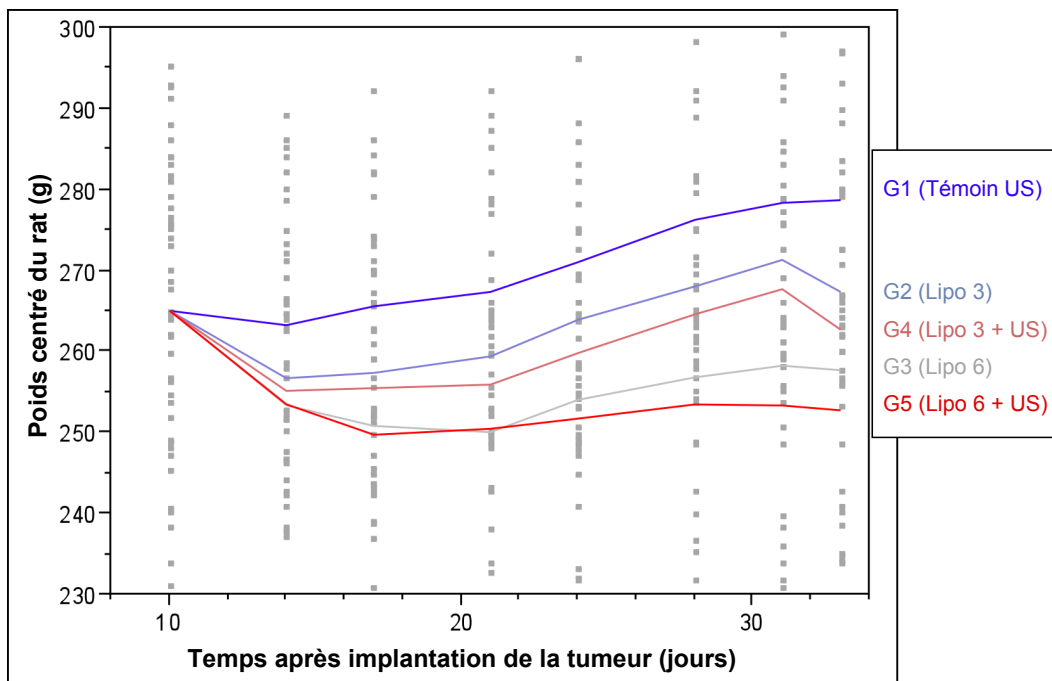


FIGURE 5.28 – Evolution du poids des rats des différents groupes au cours du temps.

La figure 5.28 montre une perte de poids significative pour tous les groupes hormis le groupe témoin ultrasons dans les jours qui suivent l'injection des liposomes. Cette perte de poids peut aller jusqu'à environ 6% du poids de l'animal à J17 pour le groupe 5. En moyenne les groupes ayant reçu une injection de doxorubicine liposomale à 6 mg/Kg perdent un peu plus de poids que les groupes ayant reçu une injection de doxorubicine liposomale à 3 mg/Kg mais cette différence n'est pas significative. Une reprise de poids est amorcée pour les groupes ayant reçu la plus faible dose de liposomes à partir de J21 jusqu'à J33 mais une nouvelle perte de poids semble s'amorcer ensuite pour ces groupes. Le poids des rats des groupes ayant reçu une injection à la plus forte dose semble stable au cours du temps après J17. Le traitement ultrasonore seul n'induit pas une perte de poids significative (et montre même une prise de poids sans doute liée à la croissance de la tumeur), ceci montre qu'il a peu d'effets sur les rats traités du moins en terme de poids des animaux.

Les pertes de poids liées aux traitements appliqués sont globalement analogues à ceux obtenus dans l'étude précédente (c.f figure 4.38) avec notamment une perte de poids de

l'ordre de 8% pour le groupe ayant reçu une dose à 6 mg/Kg de doxorubicine liposomale en combinaison avec des ultrasons (contre 6% dans la présente étude). Seul les rats du groupe ayant reçu un traitement combiné à une dose 3 mg/Kg de doxorubicine liposomale perdaient 15% de leur poids en début de traitement mais le récupéraient rapidement. Le traitement ultrasonore seul n'induisait pas non plus de perte de poids significative.

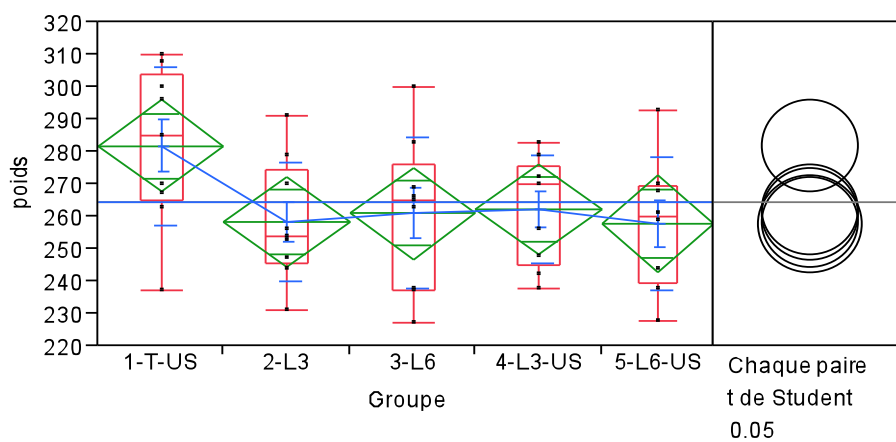


FIGURE 5.29 – Comparaison du poids des rats des différents groupes à J33.

Une analyse statistique complète du poids des rats le jour du sacrifice montre que le poids des rats de tous les groupes sont analogues mis à part ceux du groupe témoin (voir figure 5.29). Ce groupe diffère légèrement des autres groupes. L'encapsulation de la doxorubicine a donc rempli son rôle en évitant une perte de poids importante chez les animaux.

#### 5.4.4 Conclusion

Dans cette étude, nous avons pu démontrer un effet synergétique important entre le traitement ultrasonore appliqué et une injection de doxorubicine liposomale à une dose de 6 mg/kg. Cette synergie a pu être prouvée non seulement sur les mesures de surfaces tumorales mais aussi sur la pesée des tumeurs excisées à la fin de l'étude.

Cet effet n'a pas été observé pour une dose de 3 mg/Kg. L'interaction entre les ultrasons et la plus faible quantité de liposomes à ce dosage est sans doute trop limitée pour induire un important largage de doxorubicine.

## 5.5 Conclusion générale

Un traitement ultrasonore efficace entraînant la délivrance de chimiothérapie encapsulée dans les tissus tumoraux a été élaboré. Nous avons abouti à ce résultat grâce à une série d'études permettant d'optimiser le traitement.

Premièrement, l'étude de bio distribution et de cinétique sanguine a permis de démontrer que la formulation de 3<sup>ème</sup> génération (*Epi1.12D*) avait une longue durée de vie dans la circulation sanguine et une accumulation intra-tumorale plus importante que la formulation de 1<sup>ère</sup> génération (*Epi2.8D*). C'est par conséquent cette formulation, par ailleurs la plus sono-sensible des deux, qui a été sélectionnée pour tester l'efficacité du traitement ultrasonore. L'étude de bio distribution a de plus confirmé une accumulation intra-tumorale maximale aux alentours de 50h après injection pour tous les dosages et formulations testées.

Deux études ont ensuite été menées pour déterminer les conditions d'exposition ultrasonores appropriées à une application sur les tissus tumoraux avec le nouveau dispositif de traitement mis au point. Ce nouveau dispositif ultrasonore, permet de caviter de façon plus localisée et à de moindres puissances que le dispositif précédent. La première étude a menée à la sélection de deux conditions d'exposition induisant une nécrose modérée de la tumeur et n'affectant pas sa croissance tumorale. La seconde étude a permis de mesurer par imagerie IRM, grâce à l'injection de liposomes contenant des agents de contraste IRM, que l'une des deux conditions ultrasonores appliquées (condition B) permettait de libérer (au moins partiellement) le contenu de liposomes dans la tumeur.

Pour finir, la condition d'irradiation sélectionnée a été appliquée sur les tumeurs de rats d'une étude visant à tester l'efficacité du traitement ultrasonore combiné avec une injection de liposomes de la formulation de 3<sup>ème</sup> génération. Les résultats de cette étude ont montré un effet synergétique significatif entre l'application des ultrasons et l'injection de doxorubicine liposomale à une dose de 6 mg/Kg. Cet effet n'a pas été observé pour un dosage de 3 mg/Kg sans doute à cause d'une plus faible interaction entre les ultrasons et les liposomes à ce dosage.



# Conclusion et Perspectives

Cette thèse présentait deux objectifs principaux. Le premier consistait à mettre au point un dispositif *in vitro* permettant de contrôler et de doser la cavitation inertielle de façon à induire de manière reproductible la libération du contenu de liposomes. Ceci notamment dans l'optique de sélectionner les formulations de liposomes les plus sensibles aux ultrasons. Le second objectif consistait à trouver la dosimétrie ultrasonore et liposomale appropriée pour des essais *in vivo* et à tester l'efficacité d'un traitement combinant l'injection de doxorubicine liposomale et l'insonification de la tumeur.

En premier lieu, nous avons conçu un dispositif comportant un dosage de la cavitation inertielle basé sur un filtrage analogique entre l'émission fondamentale et le premier harmonique du bruit large bande émis lors de ce régime de cavitation. Nous avons validé la dose de cavitation ainsi définie en dosant les radicaux hydroxyles produits lors de l'implosion des bulles de cavitation avec une solution de téréphthalate. Une large gamme de conditions d'exposition ultrasonores pulsées a été explorée dans différentes conditions expérimentales. Si ces nombreux tests ont permis de montrer une excellente corrélation entre les concentrations de HTA obtenues et la dose de cavitation à rapport cycle et fréquence de répétition fixés (l'intensité étant variable), ils ont mis en évidence des différences significatives des quantités de HTA produites sous des conditions d'expositions ayant des rapports cycliques et des fréquences de répétition éloignés. Ces différences et les mécanismes qui en sont à l'origine ont été analysées à la lumière de la littérature où des tendances similaires avaient pu être observées dans des conditions expérimentales proches de celles que nous avons employées.

La dose de cavitation a été ensuite appliquée au suivi du largage sous ultrasons de doxorubicine encapsulée dans diverses formulations de liposomes. Tous les tests ont montré une très haute corrélation entre le taux de doxorubicine libérée et la dose de cavitation permettant de conclure que la cavitation inertielle est un mécanisme essentiel de cette libération. Les tests réalisés dans ce système étant très reproductibles, la comparaison des diverses formulations de liposomes testées s'est faite de manière fiable et aisée une fois le système validé.

En second lieu, nous avons fait évoluer le dosage de la cavitation inertielle en implémentant un filtrage numérique et une sauvegarde en temps réel des données brutes avant filtrage. Cette évolution du système permet un plus grand contrôle et une plus grande flexibilité dans l'acquisition de la dose de cavitation. Nous avons notamment ajouté un seuil bas dans le dosage de la cavitation pour éliminer les bruits parasites. La sauvegarde des données brutes permet une analyse spectrale que l'ancien dispositif ne pouvait assurer. La nouvelle dose de cavitation définie (NDC) a été, tout comme la première, validée par de nombreux tests de téréphtalate et appliquée au largage de doxorubicine encapsulée. Les corrélations entre les concentrations de HTA produites et la NDC se sont révélées excellentes tout comme la corrélation entre le taux de libération de doxorubicine et la NDC pour les différentes formulations de liposomes testées. Nous avons étudié l'impact des changements des conditions ultrasonores pulsées sur la libération de doxorubicine encapsulée et nous avons trouvé les mêmes tendances de variations que les concentrations de HTA produites pour ces mêmes paramètres ultrasonores. Tous ces résultats confirment le rôle majeur de la cavitation inertielle dans la libération du contenu des liposomes.

Nous nous sommes ensuite spécifiquement intéressés à l'influence de la température de l'échantillon sur les résultats obtenus. Nous avons constaté une augmentation moyenne des quantités de HTA produites avec la température à NDC constante associée à une croissance importante de la variabilité des concentrations de HTA mesurées. Les tests sur les liposomes à diverses températures ont permis de montrer une augmentation significative du largage de doxorubicine avec la température à NDC donné malgré une stabilité importante de ces liposomes à ces mêmes températures en l'absence d'ultrasons.

Les perspectives d'études *in vitro* sur le dispositif mis au point sont nombreuses. Elles consistent essentiellement à rechercher de manière plus poussée les mécanismes impliqués dans les différents phénomènes observés. La première étape consiste à analyser les spectres des signaux bruts recueillis pour tous les échantillons insonifiés présentés dans le chapitre 3. Pour tous les signaux recueillis il sera important de mesurer le niveau du bruit blanc sur tout le spectre et sa distribution spectrale, de mesurer l'amplitude d'éventuels sous-harmoniques et ultra-harmoniques présents et éventuellement celle des harmoniques. Il sera intéressant de regarder l'évolution de ces grandeurs au cours d'un même pulse ultrasonore pour identifier des mécanismes comme, par exemple, l'excitation transitoire au début de chaque pulse décrit par Leighton (c.f section 2.3.3.1) qui est souvent observable sur l'affichage instantané du bruit large bande filtré en cour d'expérimentation. L'analyse de l'évolution des grandeurs tout au long de l'insonification nous donnera également de précieux indices : régularité de la cavitation inertielle, évolution de l'activité de cavitation au cours du temps (une diminution de l'activité de cavitation pouvant impliquer des mécanismes tels que le dégazage de l'échantillon), etc. Concernant les expériences à température ambiante que ce soit celles réalisées avec du

TA ou avec des liposomes, il serait intéressant de comparer les mesures de ces différents indicateurs avec soit les niveaux de HTA produits, soit le taux de largage induit par l'application des différents paramètres afin de répondre à plusieurs interrogations. Par exemple, à dose de cavitation égale des niveaux plus élevés de bruit blanc induisent-ils plus de production de HTA et de libération de doxorubicine que des niveaux plus faibles pendant un temps plus long ? La cavitation "régulière" induit-elle plus d'effets que la cavitation "irrégulière" ?

Il sera très certainement instructif de comparer chacune des grandeurs spectrales mesurées aux différentes températures testées pour essayer de comprendre l'impact de celles-ci sur la cavitation dans le milieu. Il serait par ailleurs intéressant de répéter ces expériences en plus grand nombre avec un dispositif permettant un maintien plus précis de la température dans le milieu pour préciser les résultats obtenus.

D'autres expériences pourront être menées afin d'identifier quel(s) mécanisme(s) exact(s) engendré(s) par la cavitation inertielle serait impliqué dans la libération du contenu des liposomes. On pourrait par exemple produire des radicaux libres grâce à un dispositif UV dans une solution contenant des liposomes et observer si on a une quelconque libération des liposomes. Ces tests peuvent être couplés avec une agitation du milieu qui pourrait favoriser un largage en cas de fragilisation de la membrane des liposomes par les radicaux libres. Des tests en température peuvent être par ailleurs menés en introduisant une agitation dans le milieu pour tenter de comprendre si c'est une fragilisation de la membrane qui est induite par un échauffement du milieu ou si c'est la cavitation inertielle qui a un impact plus important sur les liposomes à haute température.

Des tests poussés pourront être menés en cavitation stable afin de comprendre si ce régime de cavitation et les effets qui y sont associés (forces de cisaillement, microcourants, forces de Bjerknes..) sont capables de libérer le contenu des liposomes. Des tests ont déjà pu être réalisés dans le dispositif de cavitation régulé de Jean-Louis Mestas (insonification continue, transducteur plan  $f_0 = 500 \text{ kHz}$ , ondes stationnaires) et ont montré de petits pourcentages de libération en cavitation stable ( $\approx 3\%$  en 10 minutes,  $\approx 12\%$  en 1H à  $I_{spta}(\text{moyen}) = 0.12 \text{ W/cm}^2$  contre  $\approx 35\%$  en 10 minutes en cavitation inertielle à  $I_{spta}(\text{moyen}) = 0.80 \text{ W/cm}^2$  dans le même système pour la formulation *Epi1.12D*). Cependant une petite production de radicaux libres a pu être mesurée dans les mêmes conditions et il est difficile d'attribuer de façon certaine le largage observé à la cavitation stable.

Des images d'échantillons de liposomes avant et après insonification dans notre système en cryo-microscopie électronique structurale permettrait de voir ce qu'il advient des liposomes après insonification : structures intactes ou complètement détruites ? formation de micelles ? Le résultats de ces tests donneraient des indications précieuses sur les mécanismes de libération.



Les deux campagnes complètes d'études *in vivo* menées au cours de la thèse ont permis de tester l'efficacité de traitements combinant l'insonification d'une tumeur AT – 2 Dunning implantée chez le rat Copenhague et l'injection de liposomes contenant de la doxorubicine à différents dosages.

La première campagne d'études *in vivo* menées avec la première génération de liposomes a permis, après sélection d'une formulation et de dosages adéquats avec les études de bio-distribution, d'évaluer la faisabilité et l'impact de divers traitement sur les tumeurs. Premièrement, ces études ont permis de montrer le bénéfice de l'encapsulation de la doxorubicine avec la formulation de liposomes utilisée. Deuxièmement, elles ont permis d'éprouver le système de mesure de la dose de cavitation *in vivo* en montrant qu'il était possible de délivrer une dose de cavitation de manière reproductible avec le système implémenté. Deux doses différentes ont ainsi pu être appliquées 48h après injections des liposomes (pic d'accumulation intra-tumorale déterminé par l'étude de bio-distribution). L'application des ultrasons n'a pas permis d'augmenter l'efficacité du traitement de doxorubicine liposomale mais a tout du moins permis de rendre ce traitement plus reproductible d'un animal à l'autre et donc plus fiable. Les hypothèses sur ce manque d'efficacité sont nombreuses, nous retiendrons la faible sono-sensibilité de la formulation de liposomes utilisée et une dosimétrie ultrasonore sans doute pas assez optimisée.

Dans la seconde campagne d'étude *in vivo*, nous avons par conséquent mené un grand nombre de tests de façon à optimiser au maximum le traitement ultrasonore. De plus, les liposomes de 3<sup>ème</sup> génération sélectionnés durant une nouvelle étude de bio-distribution ont une sono-sensibilité très supérieure à la formulation de liposomes utilisée dans les premières études. Nous avons également mis en place un dispositif confocal permettant d'induire une cavitation plus localisée et régulière à des intensités ultrasonores modérées. Ainsi, nous avons sélectionné une condition d'irradiation adaptée au traitement visé en menant tout d'abord une étude complète *in vivo* évaluant l'impact de différentes conditions d'exposition ultrasonores sur la tumeur, suivie de tests IRM permettant, grâce à l'encapsulation d'agents de contraste IRM, de mesurer l'accumulation des liposomes et la libération de leur contenu dans les tissus tumoraux. A la suite de cette étude, nous avons démontré une importante synergie entre l'injection des liposomes à 6 mg/kg et le traitement ultrasonore optimisé. A 3 mg/kg, nous n'avons pas observé de synergie sans doute à cause d'une plus faible interaction entre les ultrasons et les liposomes à ce dosage.

L'objectif principal des futures études *in vivo* sera de reproduire les résultats obtenus et d'améliorer encore l'efficacité du traitement.

Pour cela, diverses combinaisons de traitement seront testées sachant que le dosage de 6 mg/kg est définitivement retenu, étant donné qu'aucun résultat concluant n'a été obtenu avec le dosage de 3 mg/kg. On pourra en particulier effectuer une double application d'ultrasons sur la tumeur. Ces applications pourront se faire aux moments où l'accu-

mulation intra-tumorale des liposomes est importante dans la tumeur, à savoir dans la fourchette de temps 24H-75H après injection. Un premier traitement juste avant l'injection pourrait favoriser l'accumulation des liposomes dans la tumeur. Une éventuelle augmentation de l'accumulation des liposomes dans les tissus tumoraux pourraient être dû à deux effets comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1. Premièrement, la cavitation permet d'augmenter la perméabilité des vaisseaux tumoraux et par conséquent d'augmenter l'extravasation des liposomes dans les tissus tumoraux. Une faible hyperthermie ( $\approx +4^{\circ}C$ ) peut renforcer cette perméabilisation et augmenter le flux sanguin et donc l'extravasation des nanoparticules.

Une étude sous IRM avec les liposomes de 3<sup>ème</sup> génération permettrait une sélection optimale des paramètres ultrasonores pour augmenter l'accumulation des liposomes dans la tumeur et pour ensuite libérer leur contenu.

A terme, des traitements combinant plusieurs injections de liposomes et plusieurs insonifications (suivant les résultats obtenus) pourront être testés avec pour objectif une amélioration encore plus importante de l'efficacité du traitement.

Une fois le traitement ultrasonore optimisé, on pourra comparer l'efficacité des liposomes de 3<sup>ème</sup> génération et des liposomes Caelyx en combinaison avec cette condition d'exposition afin d'étudier l'importance de la sono-sensibilité des liposomes pour la réussite du traitement.

Par ailleurs, le dernier dispositif d'acquisition des signaux et de dosage de la cavitation mis au point pourra être ajouté au dispositif d'irradiation confocal. Cet ajout permettra de suivre la cavitation pendant les expérimentations et effectuer une analyse spectrale des signaux bruts après traitement de façon à avoir un retour sur chacun des traitements effectués et mieux comprendre les mécanismes impliqués *in vivo*.



# Glossaire

**amorphe :**

En cristallographie, se dit d'une substance exempte de structure cristalline. On dit qu'un polymère est amorphe lorsque il n'y a pas d'arrangement ordonné de ses molécules.

**amphiphile :**

Une espèce chimique (que ce soit une molécule ou un ion) est dite amphiphile ou bien amphipathique lorsqu'elle possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe.

**athérosclérose :**

Maladie de la paroi artérielle caractérisée par une accumulation de lipides, de glucides complexes, de sang, de produits sanguins et de dépôts calcaires. Cette maladie atteint essentiellement la paroi interne des artères de type élastique (aorte et artères de gros calibre). Elle y entraîne des rétrécissements en plaque qui réduisent le calibre des artères et peuvent en provoquer l'obstruction.

**biodisponibilité :**

En pharmacologie, le terme biodisponibilité est utilisé pour décrire la fraction intacte d'une dose de médicament administrée qui atteint la circulation systémique. C'est une des principales propriétés pharmacocinétique des médicaments. Par définition, quand un médicament est injecté en intra-veineuse, sa biodisponibilité est de 100%. Par contre, quand un médicament est injecté par d'autres voies (orale, par exemple), sa biodisponibilité décroît (due à une absorption incomplète et au premier passage hépatique) ou peut varier d'un patient à l'autre (due aux variations inter-individus).

**clairance :**

Constante de proportionnalité qui relie la vitesse de transfert du principe actif à sa concentration dans un compartiment à un instant donné. Il peut s'agir d'une clairance d'élimination si l'on réfère à la vitesse de transfert vers l'extérieur de l'organisme (élimination) ou d'une clairance de distribution si l'on réfère à la vitesse de transfert entre le compartiment sanguin et des compartiments extravasculaires.

**colloïde :**

Un colloïde désigne toute substance comportant deux phases distinctes, et dont les particules d'une phase, discontinue, sont bien plus petites et sont diffusées dans l'autre phase. La stabilité d'une solution colloïdale résulte de l'équilibre entre les interactions attractives et les interac-

tions répulsives qui s'exercent sur les particules. Ces interactions dépendent notamment de la température, du pH et des électrolytes dissous.

**copolymère :**

Polymère issu de plusieurs espèces de monomères (voir polymère). On distingue plusieurs types de copolymères suivant la manière dont les motifs monomères sont répartis dans les chaînes moléculaires :

- copolymère statistique : les différents motifs monomères se mélangent en fonction de la réactivité et de la concentration de ceux-ci, c'est le cas le plus fréquent. Les propriétés mécaniques sont moyennées.
- copolymère séquencé (l'anglicisme copolymère à blocs est parfois utilisé) ou copolymère alterné : les monomères sont ordonnés ou groupés. il peut y avoir combinaison des propriétés mécaniques.

**conjugué :**

Réactif formé par liaison covalente entre deux molécules : par exemple, de la fluorescéine couplée à une molécule d'immunoglobuline.

**demi-vie :**

En pharmacologie, la demi-vie désigne par extension le temps nécessaire pour que la quantité d'une substance contenue dans un système biologique soit diminuée de la moitié de sa valeur initiale (par exemple la teneur d'un médicament dans le plasma sanguin).

**dialyse :**

Technique de purification de solutions. Le principe consiste à séparer deux solutions par une membrane. Cette membrane laisse passer le solvant et les solutés en dessous d'une certaine taille. Par effet de diffusion (due à l'agitation moléculaire) les petites molécules traverseront la membrane, tandis que les grosses molécules (souvent macromolécules) seront retenues d'un côté. La dialyse est souvent connue du grand public comme la dialyse médicale, qui est une méthode d'épuration du sang à travers une membrane.

**digesté :**

En chimie, produit obtenu par l'opération de la digestion.

**endocytose :**

Pénétration de matériel extracellulaire dans une cellule, par invagination de la membrane plasmique suivie de la formation de vésicules s'isolant dans le cytoplasme. Ce terme général couvre divers phénomènes tels que : phagocytose, anthrocytose, colloïdopexie, chromopexie, ultraphagocytose, pinocytose, etc.

**endosome :**

Les endosomes sont des sous compartiments de la cellule ou organites (organelles) sur lesquels les vésicules d'endocytose s'accrochent et fusionnent pour relarguer leur contenu. Les endosomes sont des compartiments qui permettent le tri des molécules internalisées. Celles-ci pourront avoir plusieurs devenir : repartir à la membrane plasmique (recyclage), être dégradées par des systèmes

de dégradation intracellulaire (protéasome par exemple), ou être redirigées vers d'autres compartiments intracellulaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc.) pour agir ailleurs dans la cellule.

**fréquence de répétition :**

Lorsque les ultrasons ne sont pas émis en continu, on est en régime pulsé. Les ondes sont émises par intermittence (on parle d'impulsions ou de train d'ondes) et la fréquence d'émission de ces impulsions est dénommée fréquence de répétition.

**glomérule :**

Peloton de capillaires sanguins entourant le tubule rénal à sa portion initiale dans le cortex du rein.

**hydrophile :**

Un composé est dit hydrophile (littéralement : qui aime l'eau) ou polaire quand il est soluble dans l'eau. Un composé est hydrophile par sa capacité à créer des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau (ex : ammoniac, alcools), ou par sa forte polarité (ex : acétone).

**hydrophobe :**

Un composé est dit hydrophobe (du grec hydro = eau , phóbos = peur) ou lipophile quand il est soluble dans les corps gras, mais insoluble dans l'eau. (Hydrophobe : Qui montre une forte répulsion pour l'eau, qui repousse l'eau.) Un composé hydrophobe, n'a pas la capacité de créer des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Il est aussi souvent apolaire, ou de faible polarité, ce qui signifie qu'il ne peut pas faire d'interactions électrostatiques avec l'eau, de type dipôle permanent/dipôle permanent (forces de Keesom) (l'eau étant très polaire, elle cherche à interagir avec des molécules polaires). En effet, la solubilité d'un composé dans un solvant dépend de manière générale des interactions qu'il peut avoir avec le solvant. Un composé hydrophobe est donc un composé qui ne peut pas interagir physiquement avec l'eau. Il est alors généralement plutôt soluble dans les solvants organiques, comme l'acétone, les hydrocarbures légers, avec lesquels il peut faire des interactions de Van der Waals de type dipôle induit/dipôle induit (forces de London). C'est une caractéristique de beaucoup de plastiques, qui sont imperméables à l'eau mais détruits par d'autres solvants.

**glutathion :**

Molécule formée d'acide glutamique, de cystéine et de glyco-colle, qui joue dans l'organisme un rôle important de transporteur d'hydrogène. Pratiquement toutes les cellules en contiennent une concentration élevée.

**homoscédacité :**

Homogénéité des variances.

**hémolyse :**

L'hémolyse est la destruction des globules rouges (G.R.) libérant l'hémoglobine (Hb) dans le plasma sanguin. C'est un état physiologique (chez tous les individus, les GR sont détruits au terme d'une vie qui est normalement de 120 jours). Cependant, dans certains cas, elle est exagérée

(la durée de vie des GR est inférieure à 120 jours), on parle alors d'hyper-hémolyse. À terme apparaît une anémie régénérative.

**interstitiel :**

Situé dans les espaces qui séparent certaines couches cellulaires ou tissulaires (fluide, tissu interstitiel). Qui concerne le tissu de soutien conjonctif et les vaisseaux entourant l'élément noble d'un organe.

**isosmotique :**

Se dit s'il y a égalité de pression osmotique entre le milieu externe et le milieu inférieur.

**isotonique :**

Qui a la même pression osmotique qu'un autre liquide pris comme terme de comparaison, le sang en règle générale. Exemple : soluté de chlorure de sodium à 9/1000. Un soluté de chlorure de sodium isotonique par comparaison aux larmes est dosé à 14/1000.

**lysosomes :**

Les lysosomes sont des organites cellulaires (mesurant de 0,2 à 0,5 microns) présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales à l'exception des hématies ("globules rouges"). Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intra-cellulaire (ou extra-cellulaire via exocytose dans le cas des chondroblastes, ostéoclastes et macrophages) grâce à trois types d'enzymes : des lipases, des protéases et des osidases.

**macrophage :**

(du grec : "gros mangeur", makros = grand, phagein = manger). Ce sont des cellules infiltrant les tissus. Ils proviennent de la différenciation de leucocytes sanguins, les monocytes. Les monocytes et les macrophages sont des phagocytes (cellules capables de phagocytose\*). Ils participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative via le phénomène d'opsonisation. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes. À l'instar des cellules dendritiques, ils sont capables de se comporter comme cellule présentatrice d'antigène. C'est une grosse cellule arrondie avec un noyau excentré et des vacuoles dans son cytoplasme. La propriété particulière des macrophages est leur très grande mobilité. La typologie des macrophages est établie en fonction de leurs différentes localisations et morphologies : les macrophages péritonéaux, les macrophages alvéolaires, les histiocytes (tissu conjonctif), les microglies (système nerveux), les cellules de Kupffer (foie), les ostéoclastes (os), les cellules de Langerhans (peau), les cellules épithélioïdes, les cellules géantes, les cellules dendritiques (noeuds lymphoïdes, thymus, rate).

**onde de choc :**

Lorsqu'une onde acoustique se propage sur une longue distance avec une forte amplitude, elle se déforme progressivement jusqu'à la formation d'une discontinuité appelée choc.

**oligomère :**

Produit constitué de molécules comportant un petit nombre d'une ou plusieurs espèces d'atomes ou de groupes d'atomes (motifs constitutionnels) reliés entre eux. Les oligomères ont pris une

importance considérable dans la chimie macromoléculaire et sont à la base de nombreux lubrifiants, de peintures et vernis, d'adhésifs et de produits pour recouvrement.

**osmose :**

Transfert d'eau d'une solution diluée (hypotonique) vers une solution concentrée (hypertonique) au travers d'une membrane semi-perméable (perméable à l'eau, mais non aux grosses molécules en solution). La pression osmotique est la force exercée, de chaque côté de la membrane à demi perméable qui les sépare, par deux liquides inégalement riches en molécules dissoutes.

**osmotique :**

Relatif à l'osmose.

**phagocytose :**

C'est le procédé par lequel les microbes sont détruits par certains globules blancs (ou leucocytes) : ce sont les phagocytes. Elle consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant. Elle concerne en général des éléments solides, contrairement à la pinocytose (autre type d'endocytose), et ne sert uniquement qu'à des monocytes macrophages et polynucléaires neutrophiles (éléments du système immunitaire). Les neutrophiles sont les premiers à se rendre sur le lieu de l'inflammation. Dans les heures qui suivent, ce sont les monocytes qui parviennent au sein du foyer inflammatoire. Ils y subissent une différenciation en macrophages, et vont persister pendant un laps de temps variable selon le site de l'inflammation, mais dans l'ensemble, beaucoup plus longtemps que les neutrophiles. Contrairement à ces derniers, les monocytes peuvent survivre après l'acte de phagocytose. La phagocytose est caractérisée par l'adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules de diamètre microscopique, puis par le rejet des déchets. Cette activité constitue un élément essentiel de l'immunité naturelle.

**polymère :**

(étymologie : du grec *pollus*, plusieurs, et *meros*, partie) substance composée de macromolécules ou monomères.

Lors de la réaction de polymérisation, lorsque chaque unité monomère est susceptible de se lier à deux autres, la réaction peut produire une chaîne linéaire (polymère linéaire) ou branchée et réticulée (polymère branché).

Dans le cas où le polymère est composé d'un seul type de monomère, ce qui est le cas le plus fréquent, on parle d'homopolymères. Si le polymère est composé de plusieurs espèces de monomères, on parle de copolymères. Voir "copolymères" pour plus de détails.

**pression de vapeur saturante :**

La pression de vapeur saturante ou tension de vapeur est la pression à laquelle la phase gazeuse d'une substance est en équilibre avec sa phase liquide ou solide. Elle dépend exclusivement de la température. Certains utilisent le terme "pression de vapeur", mais celui-ci est ambigu car il évoque la pression partielle de la vapeur. La pression de vapeur saturante est donc la pression partielle de la vapeur d'un corps pur à partir de laquelle une partie du corps pur passe sous forme liquide (ou solide). On dit aussi que c'est la pression maximale de sa vapeur "sèche" (c'est-à-dire sans phase liquide). Autrement dit, si la pression partielle de vapeur est inférieure à la pression de vapeur saturante, tout le corps pur est sous forme gazeuse. Inversement, si la pression partielle



de vapeur est supérieure à la pression de vapeur saturante, tout le corps pur est sous forme liquide.

**quenching :**

L'anglicisme "quenching" renvoie à tout processus qui diminue l'intensité de la fluorescence d'une substance donnée.

**rapport cyclique :**

Le rapport cyclique désigne, pour un phénomène périodique, le ratio entre la durée du phénomène sur une période et la durée de cette même période.

**résonance paramagnétique électronique :**

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de mesure physique locale permettant d'obtenir des informations concernant la nature des espèces magnétiques en présence, ainsi que des informations sur leurs concentrations et les interactions magnétiques entre elles. Son principe est analogue à celui de la résonance magnétique nucléaire (RMN), à la différence près qu'en RPE, ce sont les spins des électrons qui sont excités plutôt que les spins des noyaux atomiques. Il est préférable de désigner cette technique par l'expression résonance de spin électronique (RSE) (ESR en anglais pour electron spin resonance), car les interactions entre les spins en présence ne se limitent pas nécessairement à des interactions paramagnétiques, mais peuvent être, surtout dans des composés magnétiquement concentrés, ferromagnétiques, ferrimagnétiques ou antiferromagnétiques. Cela dit, la plupart des applications utilisant cette technique concerne des espèces paramagnétiques, d'où l'usage de "RPE" plus fréquent que celui de "RSE".

**réticulation :**

Procédé de liaison multiple intermoléculaire covalente ou ionique entre des chaînes de polymères.

**sinusoïde :**

Capillaire de type embryonnaire, de calibre irrégulier et dont la paroi est formée d'une simple lame endothéliale. On rencontre ces capillaires principalement dans le foie, mais aussi dans les glandes surrénales.

**système réticulo-endothélial (SRE) :**

Terme ancien désignant l'ensemble des cellules phagocytaires, d'origine mésenchymateuse dans les différents tissus. On distingue maintenant : les phagocytes, issus des monocytes (macrophages\* résidents des tissus conjonctifs de la rate, des ganglions lymphatiques, des alvéoles pulmonaires, du foie ou cellules de Kupffer); les cellules de soutien, à activité phagocytaire très faible (cellules réticulaires des organes hématopoïétiques, cellules endothéliales vasculaires, et fibroblastes).

**surnageant :**

Liquide clair qui demeure sur le dessus des particules sédimentées par la gravité ou la force centrifuge.

**thrombolyse :**

Dissolution du caillot de fibrine notamment par utilisation d'agents fibrinolytiques.

# Annexe 1 : Analyses statistiques

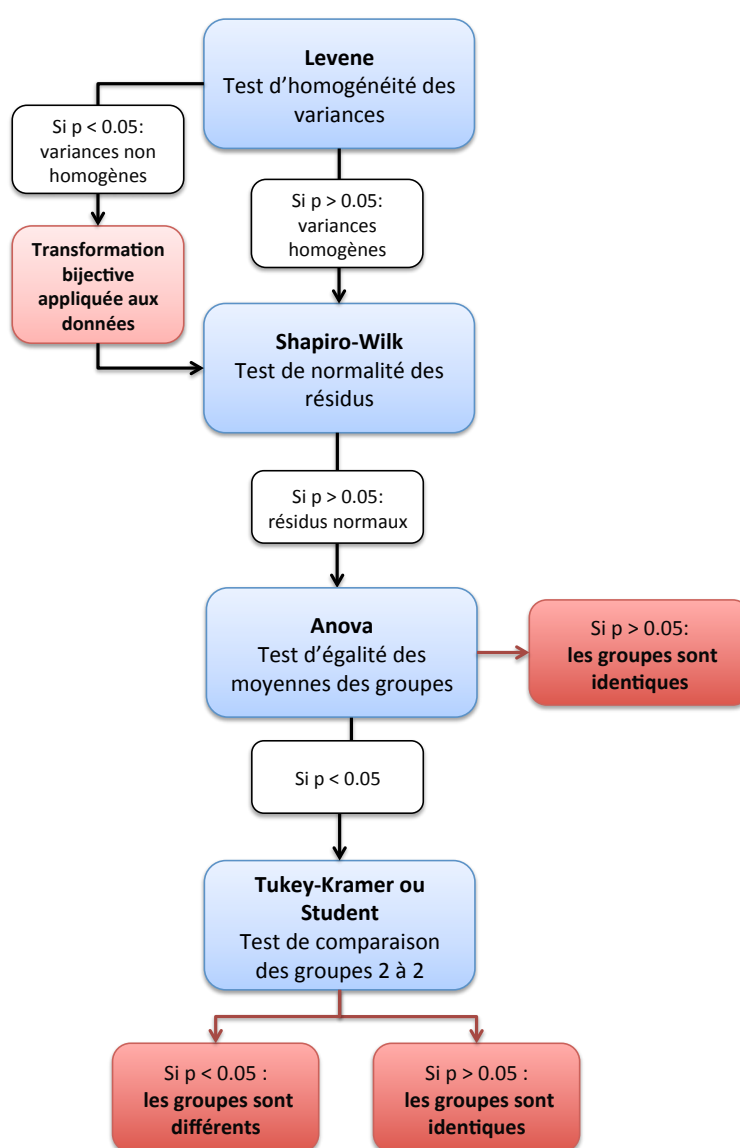


FIGURE 5.30 – Méthodologie des analyses statistiques effectuées



# Annexe 2 : Représentations statistiques

## 1. Diagramme d'observation des valeurs aberrantes

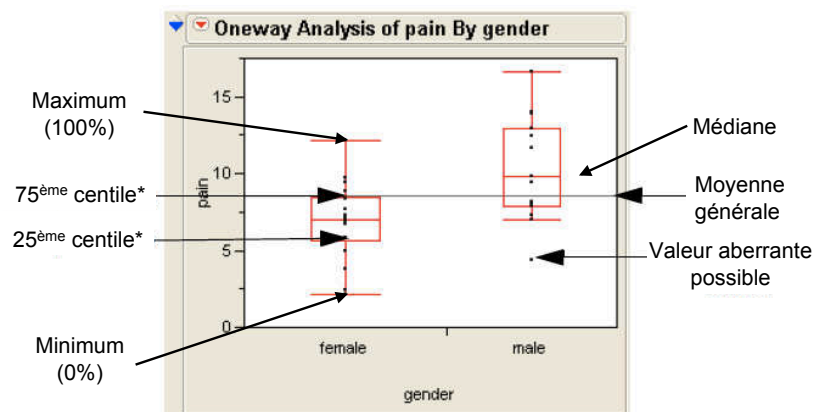


FIGURE 5.31 – Représentation permettant de localiser les valeurs aberrantes, les valeurs minimum et maximum ainsi que les valeurs comprises entre le 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> centile\*. \*centile : chacune des valeurs qui partagent un ensemble statistique ordonné en cent parties d'effectif égal.

## 2. Représentation en diamant

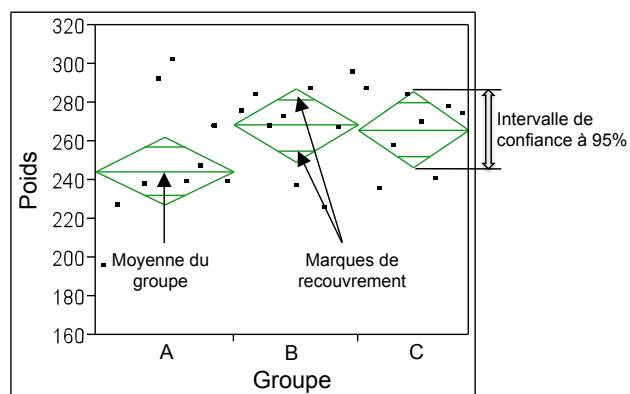


FIGURE 5.32 – Représentation en diamant. Pour deux groupes ayant le même nombre d'échantillons, les marques de recouvrement indiquent que les moyennes des deux groupes ne sont pas significativement différentes avec un niveau de confiance à 95%.

### 3. Représentation des erreurs et écart types

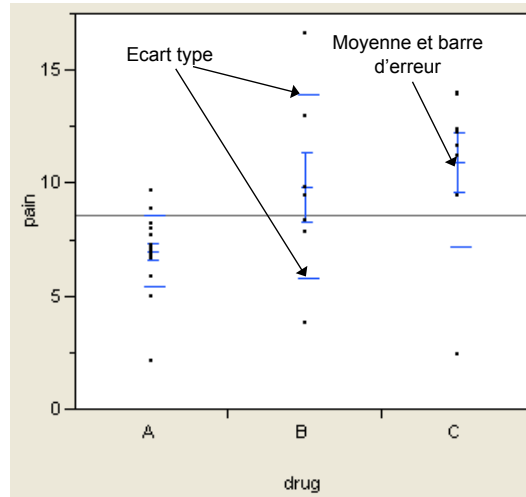


FIGURE 5.33 – Représentation des moyennes, barres d'erreur et écarts types par groupe.

### 4. Comparaison des groupes deux à deux

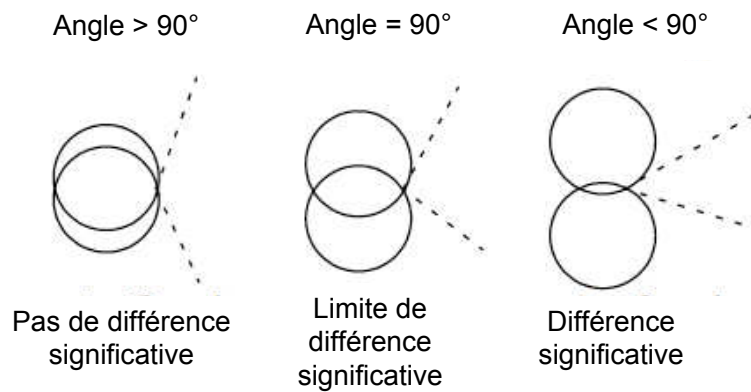


FIGURE 5.34 – Représentation en cercle permettant de comparer les groupes deux à deux suite à un test de Tukey-Kramer ou à un test *t* de Student. La taille des cercles correspondant aux groupes comparés varie suivant le nombre de données de chaque groupe.

# Publications et congrès

## Publications internationales

**Somaglino L**, Bouchoux G, Mestas JL, Lafon C, Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode : Application to In Vitro drug release from liposomes. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 18, N°2, Mars 2011, Pages 577-588 **disponible en ligne** [http ://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.009](http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.009)

Lafon C , **Somaglino L**, Bouchoux G, Chesnais S, Ngo J, Mestas JL, Nilssen EA, Chapelon JY, Fossheim S. Ultrasound mediated drug delivery : Feasibility studies in the AT2 Dunning rat tumor model with liposomal doxorubicin. **Soumis à *Ultrasound in Medecine and Biology* (UMB)**

## Publication nationale

Lafon C, **Somaglino L** , Bouchoux G , Chesnais S , Mestas JL , Matias A , Chapelon JY, Développement d'un dispositif expérimental ultrasonore pour le largage ciblé et contrôlé d'une chimiothérapie encapsulée. *Ingénierie et Recherche Biomédicale* 30 (2009) 171–173

## Congrès en 1<sup>er</sup> auteur

**Somaglino L**, Mestas JL, Moussatov A, Chesnais S, Ngo J, Fowler RA, Fossheim S, Nilssen EA, Chapelon JY, Lafon C. In vivo determination of pulsed ultrasound exposure conditions for ultrasound activated liposomal drug delivery in tumoured rats. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound, Tokyo, June 9-12, 2010 (poster)

**Somaglino L**, Bouchoux G, Mestas J, Matias A, Chapelon J, Lafon C. Validation of an acoustic Cavitation Dose in pulsed mode by the terephthalate dosimeter for in vitro drug delivery application. 9th ISTU, Aix en Provence, 24-26 September 2009 (communication orale)

**Somaglino L**, Bouchoux G, Chesnais S, Amdouni A, Mestas JL, Fossheim S, Nilssen EA, Chapelon JY, Lafon C. Combined effect of ultrasound and liposomal doxorubicin on AT2 Dunning tumor growth in rats : Preliminary results. 157th Meeting of the Acoust. Soc. Am., Portland, 18-22 May 2009 (communication orale)

**Somaglino L**, Bouchoux G, Mestas JL, Matias A, Chapelon JY, Lafon C. Mise au point d'un indice de cavitation pour le contrôle du largage d'une chimiothérapie sélective encapsulée dans un vecteur liposomal par ultrasons. Journées de Recherche en Imagerie et Technologies pour la Santé 18-19-20 mars 2009, Lille, 159-161 (poster)

**Somaglino L**, Bouchoux G, Mestas JL, Matias A, Chapelon JY, Lafon C. Definition of a cavitation index for real time monitoring during in vitro liposomal drug release. 156th Meeting of the Acoust. Soc. Am., Miami, 10-14 Novembre 2008, 124, 2485 (communication orale)

### Congrès en 2<sup>ème</sup> auteur

Lafon C, **Somaglino L**, Bouchoux G, Chesnais S, Mestas J, Fossheim S. Controlled ultrasound-induced delivery of doxorubicin from liposomes on AT2-Dunning tumors : Preliminary studies. 9th ISTU, Aix en Provence, 24-26 September 2009

Lafon C, **Somaglino L**, Bouchoux G, Chesnais S, Mestas JL, Matias A, Chapelon JY. Développement d'un dispositif expérimental ultrasonore pour le largage ciblé et contrôlé d'une chimio thérapie encapsulée. Journées de Recherche en Imagerie et Technologies pour la Santé 18-19-20 mars 2009, Lille, 117-119

Lafon C, **Somaglino L**, Bouchoux G, Mestas JL, Chapelon JY. Study of a Cavitation Index for in vitro monitoring of liposomal drug release. ICU, Santiago, January 12-17, 2009

### Autres congrès

Fowler R, Fossheim S, Canet E, Moussatov A, **Somaglino L**, Chesnais S, Lafon C. Monitoring In Vivo behavior of Sonosensitive Liposomes Using Encapsulated Lanthanide MRI Contrast Agents. World Molecular Imaging Congress, Kyoto, Japon, 8-11 septembre 2010

Moussatov A, Lafon C, Mestas JL, Chesnais S, Ngo J, **Somaglino L**, Chapelon JY. Stabilisation of cavitation zone for therapeutic applications. 10<sup>ème</sup> Congrès Français d'Acoustique, Lyon, 12-16 Avril 2010

Lafon C, Mestas JL, Moussatov A, **Somaglino L**, Chesnais S, Ngo J, Fossheim S, Nilssen EA, Chapelon JY. Combination of ultrasound and doxorubicin-loaded sonosensitive liposomes for treating tumors : Proof of concept in vivo. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound, Tokyo, June 9-12, 2010

# Bibliographie

- [AFGH63] W. A. Armstrong, R. A. Facey, D. W. Grant, and W. G. Humphreys. A TISSUE-EQUIVALENT CHEMICAL DOSIMETER SENSITIVE TO 1 RAD. *Can. J. Chem.* 41(6), page 1575–1577, 1963.
- [AH91] RE Apfel and CK Holland. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 17(2) :179–185, 1991.
- [AHMG97] M. Ashokkumar, R. Hall, P. Mulvaney, and F. Grieser. Sonoluminescence from aqueous alcohol and surfactant solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(50) :10845–10850, 1997.
- [AJJ05] TL Andresen, SS Jensen, and K Jorgensen. Advanced strategies in liposomal cancer therapy : Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *PROGRESS IN LIPID RESEARCH*, 44(1) :68–97, January 2005.
- [BDP88] J.C. Baboux, H. Djelouah, and M. Perdrix. Interferometric measurements of transient ultrasonic fields. application to hydrophone calibration. In *Ultrasonics Symposium, 1988. Proceedings., IEEE 1988*, pages 857–861 vol.2, 1988.
- [BGA09] A. Brotchie, F. Grieser, and M. Ashokkumar. Effect of power and frequency on Bubble-Size distributions in acoustic cavitation. *Physical Review Letters*, 102(8), 2009.
- [BHZ<sup>+</sup>09] M. A. Buldakov, M. A. Hassan, Q. L. Zhao, L. B. Feril, N. Kudo, T. Kondo, N. V. Litvyakov, M. A. Bolshakov, V. V. Rostov, N. V. Cherdyntseva, and P. Riesz. Influence of changing pulse repetition frequency on chemical and biological effects induced by low-intensity ultrasound in vitro. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3) :392–397, 2009.
- [Bje06] Vilhelm Bjerknes. *Fields of force : supplementary lectures, applications to meteorology*. Columbia University Press, 1906.
- [BJS<sup>+</sup>11] Evelien De Bel, Colin Janssen, Sanne De Smet, Herman Van Langenhove, and Jo Dewulf. Sonolysis of ciprofloxacin in aqueous solution : influence of operational parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1) :184–189, January 2011. PMID : 20627656.
- [BL08] P. Boyle and B. Levin. *World Cancer Report 2008*. IARC Nonserial Publication, 2008.
- [BSAF94] I. Bashir, K. Sikora, P. Abel, and C. S. Foster. ESTABLISHMENT AND IN-VIVO CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG-RESISTANT DUNNING r3327



- RAT PROSTATE-CARCINOMA CELL-LINES. *International Journal of Cancer*, 57(5) :719–726, 1994.
- [BSH<sup>+</sup>07] Derek W. Bartlett, Helen Su, Isabel J. Hildebrandt, Wolfgang A. Weber, and Mark E. Davis. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39) :15549–15554, September 2007. PMID : 17875985 PMCID : 1978218.
- [CBMC03] W. S. Chen, A. A. Brayman, T. J. Matula, and L. A. Crum. Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without optison (R). *Ultrasound in Medicine and Biology*, 29(5) :725–737, 2003.
- [CDF<sup>+</sup>00] P. Ciuti, N. V. Dezhkunov, A. Francescutto, A. I. Kulak, and G. Iernetti. Cavitation activity stimulation by low frequency field pulses. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7(4) :213–216, 2000.
- [CDIK98] P Ciuti, NV Dezhkunov, G Iernetti, and AI Kulak. Cavitation phenomena in pulse modulated ultrasound fields. *ULTRASONICS*, 36(1-5) :569–574, February 1998.
- [CFHR07a] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(2) :105–120, March 2007.
- [CFHR07b] CC Coussios, CH Farny, G Ter Haar, and RA Roy. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU) (vol 23, pg 105, 2007). *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*, 23(3) :327–327, May 2007.
- [CFM81] V. Ciaravino, H. G. Flynn, and M. W. Miller. PULSED ENHANCEMENT OF ACOUSTIC CAVITATION - a POSTULATED MODEL. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 7(2) :159–166, 1981.
- [CFP05] D. J. Casadonte, M. Flores, and C. Petrier. Enhancing sonochemical activity in aqueous media using power-modulated pulsed ultrasound : an initial study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(3) :147–152, 2005.
- [CH70] P. R. Clarke and C. R. Hill. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 47(2B) :649–653, February 1970.
- [CLG<sup>+</sup>07] J. X. Cui, C. L. Li, W. M. Guo, Y. H. Li, C. X. Wang, L. Zhang, Y. L. Hao, and Y. L. Wang. Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations : Is AUC predictive for toxicity and efficacy? *Journal of Controlled Release*, 118(2) :204–215, 2007.
- [CMV<sup>+</sup>92] J Y Chapelon, J Margonari, F Vernier, F Gorry, R Ecochard, and A Gelet. In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma dunning r3327. *Cancer Research*, 52(22) :6353–6357, November 1992. PMID : 1423282.
- [CR08] C. C. Coussios and R. A. Roy. Applications of acoustics and cavitation to non-invasive therapy and drug delivery. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 40 :395–420, 2008.

- [CW10] D Chen and JR Wu. An in vitro feasibility study of controlled drug release from encapsulated nanometer liposomes using high intensity focused ultrasound. *ULTRASONICS*, 50(8) :744–749, August 2010.
- [CWN<sup>+</sup>08] Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo (Georgia) Chen, and Dong M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5) :1310–1316, March 2008.
- [DCS08] Mark E Davis, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9) :771–782, September 2008. PMID : 18758474.
- [DFC<sup>+</sup>00] NV Dezhkunov, A Francescutto, P Ciuti, TJ Mason, G Iernetti, and AI Kulak. Enhancement of sonoluminescence emission from a multibubble cavitation zone. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 7(1) :19–24, January 2000.
- [DKBF99] P Dayton, A Klibanov, G Brandenburger, and K Ferrara. Acoustic radiation force in vivo : a mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 25(8) :1195–1201, October 1999. PMID : 10576262.
- [DMH<sup>+</sup>99] D C Drummond, O Meyer, K Hong, D B Kirpotin, and D Papahadjopoulos. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews*, 51(4) :691–743, December 1999. PMID : 10581328.
- [DOG<sup>+</sup>97] S M Demos, H Onyuksel, J Gilbert, S I Roth, B Kane, P Jungblut, J V Pinto, D D McPherson, and M E Klegerman. In vitro targeting of antibody-conjugated echogenic liposomes for site-specific ultrasonic image enhancement. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(2) :167–171, February 1997. PMID : 9040090.
- [DRM08] R Deckers, C Rome, and CTW Moonen. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING*, 27(2) :400–409, February 2008.
- [DSJ<sup>+</sup>99] J. Debus, J. Spoo, J. Jenne, P. Huber, and P. Peschke. Sonochemically induced radicals generated by pulsed high-energy ultrasound in vitro and in vivo. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 25(2) :301–306, 1999.
- [DZB<sup>+</sup>06] Paul A Dayton, Shukui Zhao, Susannah H Bloch, Pat Schumann, Kim Penrose, Terry O Matsunaga, Reena Zutshi, Alexander Doinikov, and Katherine W Ferrara. Application of ultrasound to selectively localize nanodroplets for targeted imaging and therapy. *Molecular Imaging : Official Journal of the Society for Molecular Imaging*, 5(3) :160–174, July 2006. PMID : 16954031.
- [EF63] Anthony Eller and H. G. Flynn. Rectified diffusion during nonlinear pulsations of cavitation bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 35(11) :1906, November 1963.
- [EL06] John K Erban and Joseph Lau. On the toxicity of chemotherapy for breast cancer : the need for vigilance. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(16) :1096–1097, August 2006. PMID : 16912256.
- [EMAM97] E. C. Everbach, I. R. S. Makin, M. Azadniv, and R. S. Meltzer. Correlation of ultrasound-induced hemolysis with cavitation detector output in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 23(4) :619–624, 1997.

- [ENR<sup>+</sup>10] Tove J Evjen, Esben A Nilssen, Sibylla Rognvaldsson, Martin Brandl, and Sigrid L Fosshem. Distearoylphosphatidylethanolamine-based liposomes for ultrasound-mediated drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(3) :327–333, August 2010. PMID : 20434558.
- [FAR04] Mohamed FARHAT. Cavitation et phenomenes d'interface, 2004. EPFL Laboratoire de Machines Hydrauliques Avenue de Cour 33 bis, CH1007 Lausanne, Suisse.
- [Fer08] KW Ferrara. Driving delivery vehicles with ultrasound. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 60(10) :1097–1102, June 2008.
- [FHR09] CH Farny, RG Holt, and RA Roy. TEMPORAL AND SPATIAL DETECTION OF HIFU-INDUCED INERTIAL AND HOT-VAPOR CAVITATION WITH a DIAGNOSTIC ULTRASOUND SYSTEM. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 35(4) :603–615, April 2009.
- [GMNP03] HR Guzman, AJ McNamara, DX Nguyen, and MR Prausnitz. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration : A unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 29(8) :1211–1222, August 2003.
- [Gra25] Augustus Bozzi Granville. *An essay on Egyptian mummies : with observations on the art of embalming among the ancient Egyptians*. 1825.
- [GTD<sup>+</sup>05] William J Gradishar, Sergei Tjulandin, Neville Davidson, Heather Shaw, Neil Desai, Paul Bhar, Michael Hawkins, and Joyce O'Shaughnessy. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(31) :7794–7803, November 2005. PMID : 16172456.
- [GWH<sup>+</sup>96] M H Gaber, N Z Wu, K Hong, S K Huang, M W Dewhirst, and D Papahadjopoulos. Thermosensitive liposomes : extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 36(5) :1177–1187, December 1996. PMID : 8985041.
- [HBN<sup>+</sup>97] W A Howard, A Bayomi, E Natarajan, M A Aziza, O el-Ahmady, C B Grissom, and F G West. Sonolysis promotes indirect Co-C bond cleavage of alkylcob(III)alamin bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 8(4) :498–502, August 1997. PMID : 9258447.
- [HCRP02] G. A. Husseini, D. A. Christensen, N. Y. Rapoport, and W. G. Pitt. Ultrasonic release of doxorubicin from pluronic p105 micelles stabilized with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *Journal of Controlled Release*, 83(2) :303–305, 2002.
- [HDA<sup>+</sup>96] Christy K. Holland, Cheri X. Deng, Robert E. Apfel, Jonathan L. Alderman, Leonardo A. Fernandez, and Kenneth J. W. Taylor. Direct evidence of cavitation in vivo from diagnostic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 22(7) :917–925, 1996.
- [Hen87] A. Henglein. SONOCHEMISTRY - HISTORICAL DEVELOPMENTS AND MODERN ASPECTS. *Ultrasonics*, 25(1) :6–16, 1987.

- [Hen95] A. Henglein. CHEMICAL EFFECTS OF CONTINUOUS AND PULSED ULTRASOUND IN AQUEOUS-SOLUTIONS. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(2) :S115–S121, 1995.
- [HHG92] A. Henglein, D. Herburger, and M. Gutierrez. SONOCHEMISTRY - SOME FACTORS THAT DETERMINE THE ABILITY OF a LIQUID TO CAVITATE IN AN ULTRASONIC-FIELD. *Journal of Physical Chemistry*, 96(3) :1126–1130, 1992.
- [HHT<sup>+</sup>99] R. L. Hong, C. J. Huang, Y. L. Tseng, V. F. Pang, S. T. Chen, J. J. Liu, and F. H. Chang. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in c-26 tumor-bearing mice : Is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clinical Cancer Research*, 5(11) :3645–3652, 1999.
- [HLZ00] Hilgenfeldt, Lohse, and Zomack. Sound scattering and localized heat deposition of pulse-driven microbubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 107(6) :3530–3539, June 2000. PMID : 10875397.
- [HM04] S. L. Huang and R. C. MacDonald. Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1665(1-2) :134–141, 2004.
- [HM08] Islam Hamad and S Moein Moghimi. Critical issues in site-specific targeting of solid tumours : the carrier, the tumour barriers and the bioavailable drug. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(2) :205–219, February 2008. PMID : 18248319.
- [HMMP06] DM Hallow, AD Mahajan, TE McCutchen, and MR Prausnitz. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 32(7) :1111–1122, July 2006.
- [HOP<sup>+</sup>06] Michael J Hassett, A James O'Malley, Juliana R Pakes, Joseph P Newhouse, and Craig C Earle. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(16) :1108–1117, August 2006. PMID : 16912263.
- [HP61] Din-Yu Hsieh and Milton S. Plesset. Theory of rectified diffusion of mass into gas bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 33(2) :206–215, February 1961.
- [HP08a] G. A. Hussein and W. G. Pitt. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10) :1137–1152, 2008.
- [HP08b] G. A. Hussein and W. G. Pitt. The use of ultrasound and micelles in cancer treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8(5) :2205–2215, 2008.
- [HRB98] Joachim Holzfuss, Matthias Ruggeberg, and Andreas Billo. Shock wave emissions of a sonoluminescing bubble. *Physical Review Letters*, 81(24) :5434, December 1998.
- [HRC<sup>+</sup>02] G. A. Hussein, N. Y. Rapoport, D. A. Christensen, J. D. Pruitt, and W. G. Pitt. Kinetics of ultrasonic release of doxorubicin from pluronic p105 micelles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 24(3-4) :253–264, 2002.
- [HS00] Shushi Higashi and Toshiaki Setoguchi. Hepatic arterial injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma with epirubicin aqueous solution as numerous vesicles

- in iodinated poppy-seed oil microdroplets : clinical application of water-in-oil-in-water emulsion prepared using a membrane emulsification technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1) :57–64, December 2000.
- [Hua08] S. L. Huang. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10) :1167–1176, 2008.
- [IAT<sup>+</sup>10a] Y. Iida, M. Ashokkumar, T. Tuziuti, T. Kozuka, K. Yasui, A. Towata, and J. Lee. Bubble population phenomena in sonochemical reactor : I estimation of bubble size distribution and its number density with pulsed sonication - laser diffraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2) :473–479, 2010.
- [IAT<sup>+</sup>10b] Yasuo Iida, Muthupandian Ashokkumar, Toru Tuziuti, Teruyuki Kozuka, Kyuichi Yasui, Atsuya Towata, and Judy Lee. Bubble population phenomena in sonochemical reactor : II. estimation of bubble size distribution and its number density by simple coalescence model calculation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2) :480–486, February 2010. PMID : 19819749.
- [IYTS05] Y. Iida, K. Yasui, T. Tuziuti, and M. Sivakumar. Sonochemistry and its dosimetry. *Microchemical Journal*, 80(2) :159–164, 2005.
- [JTNM03] Wang Junping, Kozo Takayama, Tsuneji Nagai, and Yoshie Maitani. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin e and cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics*, 251(1-2) :13–21, January 2003. PMID : 12527171.
- [KAG08] P. Kanthale, M. Ashokkumar, and F. Grieser. Sonoluminescence, sonochemistry (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yield) and bubble dynamics : Frequency and power effects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2) :143–150, 2008.
- [KBD00] G Kong, R D Braun, and M W Dewhirst. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery : effect of particle size. *Cancer Research*, 60(16) :4440–4445, August 2000. PMID : 10969790.
- [KBD01] G Kong, R D Braun, and M W Dewhirst. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Research*, 61(7) :3027–3032, April 2001. PMID : 11306483.
- [KDL<sup>+</sup>07] Azadeh Kheirloom, Paul A. Dayton, Aaron F. H. Lum, Erika Little, Eric E. Paoli, Hairong Zheng, and Katherine W. Ferrara. Acoustically active microbubbles conjugated to liposomes, characterization of a proposed drug delivery vehicle. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 118(3) :275–284, April 2007. PMID : 17300849 PMCID : 2662343.
- [KDS<sup>+</sup>06] Dmitri B. Kirpotin, Daryl C. Drummond, Yi Shao, M. Refaat Shalaby, Keelung Hong, Ulrik B. Nielsen, James D. Marks, Christopher C. Benz, and John W. Park. Antibody targeting of Long-Circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Research*, 66(13) :6732–6740, July 2006.
- [KKM88] T Karino, S Koga, and M Maeta. Experimental studies of the effects of local hyperthermia on blood flow, oxygen pressure and pH in tumors. *The Japanese Journal of Surgery*, 18(3) :276–283, May 1988. PMID : 3404776.

- [KLL89] J KOST, K LEONG, and R LANGER. Ultrasound-enhanced polymer degradation and release of incorporated substances-(controlled release drug delivery systems). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20) :7663–7666, October 1989.
- [KvEKK02] M. W. A. Kuijpers, D. van Eck, M. F. Kemmere, and J. T. F. Keurentjes. Cavitation-Induced reactions in High-Pressure carbon dioxide. *Science*, 298(5600) :1969–1971, December 2002.
- [Lea04] C Leaf. Why we're losing the war on cancer and how to win it. *FORTUNE*, 149(6) :76, March 2004.
- [Lei97] T. G. Leighton. *The acoustic bubble*. Academic Press, 1997.
- [Lei05] T. G. Leighton. What is ultrasound? In *Workshop on the Effects of Ultrasound and Infrasound Relevant to Human Health*, pages 3–83, Chilton, ENGLAND, 2005.
- [LK10] W Lauterborn and T Kurz. Physics of bubble oscillations. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, 73(10), October 2010.
- [LKMA05] J. Lee, S. Kentish, T. J. Matula, and M. Ashokkumar. Effect of surfactants on inertial cavitation activity in a pulsed acoustic field. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(35) :16860–16865, 2005.
- [LT03] HY Lin and JL Thomas. PEG lipids and oligo(ethylene glycol) surfactants enhance the ultrasonic permeabilizability of liposomes. *LANGMUIR*, 19(4) :1098–1105, February 2003.
- [LT04] HY Lin and JL Thomas. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. *LANGMUIR*, 20(15) :6100–6106, July 2004.
- [LWF+97] G M Lanza, K D Wallace, S E Fischer, D H Christy, M J Scott, R L Trousil, W P Cacheris, J G Miller, P J Gaffney, and S A Wickline. High-frequency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 23(6) :863–870, 1997. PMID : 9300990.
- [LWS+96] G M Lanza, K D Wallace, M J Scott, W P Cacheris, D R Abendschein, D H Christy, A M Sharkey, J G Miller, P J Gaffney, and S A Wickline. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*, 94(12) :3334–3340, December 1996. PMID : 8989148.
- [LYT+08] J. Lee, K. Yasui, T. Tuziuti, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. Spatial distribution enhancement of sonoluminescence activity by altering sonication and solution conditions. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(48) :15333–15341, 2008.
- [MAP+97] R. Mettin, I. Akhatov, U. Parlitz, C. D. Ohl, and W. Lauterborn. Bjerknes forces between small cavitation bubbles in a strong acoustic field. *Physical Review E*, 56(3) :2924, 1997.
- [MBA+09] J. El Maalouf, J. C. Bera, L. Alberti, D. Cathignol, and J. L. Mestas. In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions. *Ultrasonics*, 49(2) :238–243, 2009.
- [MBD09] H Maeda, G Y Bharate, and J Daruwalla. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3) :409–419, March 2009. PMID : 19070661.

- [MCHD03] Barbara Mui, Laurie Chow, Michael J Hope, and Nejat Duzgunes. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. In *Liposomes, Part A*, volume Volume 367, pages 3–14. Academic Press, 2003.
- [MEC<sup>+</sup>01] M. W. Miller, E. C. Everbach, C. Cox, R. R. Knapp, A. A. Brayman, and T. A. Sherman. A comparison of the hemolytic potential of optison (TM) and albumex (R) in whole human blood in vitro : Acoustic pressure, ultrasound frequency, donor and passive cavitation detection considerations. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 27(5) :709–721, 2001.
- [MH03] Philippe Marmottant and Sascha Hilgenfeldt. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936) :153–156, May 2003.
- [Mik05] George L Gabor Miklos. The human cancer genome project : one more misstep in the war on cancer. *Nature Biotechnology*, 23(5) :535–537, May 2005. PMID : 15877064.
- [MK09] Yasuhiro Matsumura and Kazunori Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*, 100(4) :572–579, April 2009. PMID : 19462526.
- [MLBZ94] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, and Y. Zhao. Dosimetry in sonochemistry : the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2) :S91–S95, 1994.
- [MM88] J. R. McLean and A. J. Mortimer. A CAVITATION AND FREE-RADICAL DOSIMETER FOR ULTRASOUND. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 14(1) :59–64, 1988.
- [MP08] V. Minsier and J. Proost. Shock wave emission upon spherical bubble collapse during cavitation-induced megasonic surface cleaning. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4) :598–604, April 2008.
- [MQ00] DL Miller and J Quddus. Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 97(18) :10179–10184, August 2000.
- [MT93] D. L. Miller and R. M. Thomas. A COMPARISON OF HEMOLYTIC AND SONOCHEMICAL ACTIVITY OF ULTRASONIC CAVITATION IN a ROTATING TUBE. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 19(1) :83–90, 1993.
- [MTR<sup>+</sup>98] G. Mark, A. Tauber, L. A. Rudiger, H. P. Schuchmann, D. Schulz, A. Mues, and C. von Sonntag. OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution - part II : terephthalate and fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(2) :41–52, 1998.
- [MVC<sup>+</sup>04] JL Mestas, L Villeneuve, S Chesnais, D Cathignol, L Alberti, and JY Blay. Correlation of the exposed-cell mortality with the transient cavitation noise in vitro. *2004 IEEE Ultrasonics Symposium, Vols 1-3*, pages 1816–1819, 2004.
- [NB07] C M H Newman and T Bettinger. Gene therapy progress and prospects : Ultrasound for gene transfer. *Gene Ther*, 14(6) :465–475, 2007.
- [Nyb82] W L Nyborg. Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *The British Journal of Cancer. Supplement*, 5 :156–160, March 1982. PMID : 6950752.

- [Nyb01] WL Nyborg. Biological effects of ultrasound : Development of safety guidelines. part II : general review. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 27(3) :301–333, March 2001.
- [OAI<sup>+</sup>06] Claus-Dieter Ohl, Manish Arora, Roy Ikink, Nico de Jong, Michel Versluis, Michael Delius, and Detlef Lohse. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophysical Journal*, 91(11) :4285–4295, December 2006.
- [OBB<sup>+</sup>10] Chris Oerlemans, Wouter Bult, Mariska Bos, Gert Storm, J Frank W Nijsen, and Wim E Hennink. Polymeric micelles in anticancer therapy : Targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, August 2010. PMID : 20725771.
- [OKG<sup>+</sup>99] Claus-Dieter Ohl, Thomas Kurz, Reinhard Geisler, Olgert Lindau, and Werner Lauterborn. Bubble dynamics, shock waves and sonoluminescence. *Philosophical Transactions : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357(1751) :269–294, February 1999.
- [OKH<sup>+</sup>09] K Okada, N Kudo, MA Hassan, T Kondo, and K Yamamoto. Threshold curves obtained under various gaseous conditions for free radical generation by burst ultrasound - effects of dissolved gas, microbubbles and gas transport from the air. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(4) :512–518, April 2009.
- [PCC<sup>+</sup>05] P. Paparel, L. Curiel, S. Chesnais, R. Ecochard, J. Y. Chapelon, and A. Gelet. Synergistic inhibitory effect of high-intensity focused ultrasound combined with chemotherapy on dunning adenocarcinoma. *Bju International*, 95(6) :881–885, 2005.
- [PCR<sup>+</sup>07] Laura Poissonnier, Jean-Yves Chapelon, Olivier Rouviere, Laura Curiel, Raymonde Bouvier, Xavier Martin, Jean Michel Dubernard, and Albert Gelet. Control of prostate cancer by transrectal HIFU in 227 patients. *European Urology*, 51(2) :381–387, February 2007. PMID : 16857310.
- [PDD<sup>+</sup>97] G. J. Price, F. A. Duck, M. Digby, W. Holland, and T. Berryman. Measurement of radical production as a result of cavitation in medical ultrasound fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2) :165–171, 1997.
- [PG00] R. Pecha and B. Gompf. Microimplosions : Cavitation collapse and shock wave emission on a nanosecond time scale. *Physical Review Letters*, 84(6) :1328, February 2000.
- [PHRP00] JD Pruitt, G Husseini, N Rapoport, and MG Pitt. Stabilization of pluronic p-105 micelles with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *MACROMOLECULES*, 33(25) :9306–9309, December 2000.
- [PHS04] William G. Pitt, Ghaleb A. Husseini, and Bryant J. Staples. Ultrasonic drug delivery, a general review. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1) :37–56, November 2004. PMID : 16296719 PMCID : 1361256.
- [PJLR92] Christian Petrier, Andre Jeunet, Jean Louis Luche, and Gilbert Reverdy. Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*, 114(8) :3148–3150, 1992.
- [PKH<sup>+</sup>07] Dan Peer, Jeffrey M. Karp, Seungpyo Hong, Omid C. Farokhzad, Rimona Margalit, and Robert Langer. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*, 2(12) :751–760, December 2007.



- [PL93] GJ PRICE and EJ LENZ. THE USE OF DOSIMETERS TO MEASURE RADICAL PRODUCTION IN AQUEOUS SONOCHEMICAL SYSTEMS. *ULTRASONICS*, 31(6) :451–456, November 1993.
- [PSKS98] RJ Price, DM Skyba, S Kaul, and TC Skalak. Delivery of colloidal, particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *CIRCULATION*, 98(13) :1264–1267, September 1998.
- [PUG<sup>+</sup>06] M Pong, S Umchid, AJ Guarino, PA Lewin, J Litniewski, A Nowicki, and SP Wrenn. In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. *ULTRASONICS*, 45(1-4) :133–145, December 2006.
- [RGK07] N Rapoport, ZG Gao, and A Kennedy. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 99(14) :1095–1106, July 2007.
- [RHBA98] S. A. Rabbani, P. Harakidas, T. Bowlin, and G. Attardo. Effect of nucleoside analogue BCH-4556 on prostate cancer growth and metastases in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 58(15) :3461–3465, 1998.
- [RMH<sup>+</sup>10] L Reslan, JL Mestas, S Herveau, JC Bera, and C Dumontet. Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 142(2) :251–258, March 2010.
- [RPT05] Carlota Oliveira Rangel.Yagui, Adalberto Pessoa, and Leoberto Costa Tavares. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 8(2) :147–165, 2005. PMID : 16124926.
- [RSS06] Manju Rawat, Deependra Singh, S Saraf, and Swarnlata Saraf. Nanocarriers : promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(9) :1790–1798, September 2006. PMID : 16946487.
- [RZCV06] BA Rabkin, V Zderic, LA Crum, and S Vaezy. Biological and physical mechanisms of HIFU-induced hyperecho in ultrasound images. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 32(11) :1721–1729, November 2006.
- [RZV05] BA Rabkin, V Zderic, and S Vaezy. Hyperecho in ultrasound images of HIFU therapy : Involvement of cavitation. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 31(7) :947–956, July 2005.
- [SAG05] D. Sunartio, M. Ashokkumar, and F. Grieser. The influence of acoustic power on multibubble sonoluminescence in aqueous solution containing organic solutes. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(42) :20044–20050, 2005.
- [SAG07] D. Sunartio, M. Ashokkumar, and F. Grieser. Study of the coalescence of acoustic bubbles as a function of frequency, power, and water-soluble additives. *Journal of the American Chemical Society*, 129(18) :6031–6036, 2007.
- [SAKR01] K S Soppimath, T M Aminabhavi, A R Kulkarni, and W E Rudzinski. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 70(1-2) :1–20, January 2001. PMID : 11166403.
- [SCBR09] E Soussan, S Cassel, M Blanzat, and I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter : Matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(2) :274–288, 2009.

- [SHG95] T SIEGAL, A HOROWITZ, and A GABIZON. DOXORUBICIN ENCAPSULATED IN STERICALLY STABILIZED LIPOSOMES FOR THE TREATMENT OF a BRAIN-TUMOR MODEL - BIODISTRIBUTION AND THERAPEUTIC EFFICACY. *JOURNAL OF NEUROSURGERY*, 83(6) :1029–1037, December 1995.
- [SHP07] D Stevenson-Abouelnasr, GA Husseini, and WG Pitt. Further investigation of the mechanism of doxorubicin release from p105 micelles using kinetic models. *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES*, 55(1) :59–66, March 2007.
- [SHT<sup>+</sup>09] A Schroeder, R Honen, K Turjeman, A Gabizon, J Kost, and Y Barenholz. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 137(1) :63–68, July 2009.
- [SIMH86] Alan Smith and Ian M. Hunneyball. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 30(2-3) :215–220, June 1986.
- [SMH<sup>+</sup>09] George J Shaw, Jason M Meunier, Shao-Ling Huang, Christopher J Lindsell, David D McPherson, and Christy K Holland. Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes. *Thrombosis Research*, 124(3) :306–310, July 2009. PMID : 19217651.
- [SRT<sup>+</sup>06] R. K. Schlicher, H. Radhakrishna, T. P. Tolentino, R. P. Apkarian, V. Zarnitsyn, and M. R. Prausnitz. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(6) :915–924, 2006.
- [STN<sup>+</sup>08] Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, and Kazuo Maruyama. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1-2) :49–55, April 2008. PMID : 18082343.
- [Sza04] Thomas L. Szabo. *Diagnostic ultrasound imaging : inside out*. Academic Press, 2004.
- [Tan01] Jean-Yves Tanguy. Cours d'imagerie medicale. introduction pratique au diagnostic morphologique : L'IRM, 2001.
- [TBWC09] Steliyan Tinkov, Raffi Bekeredjian, Gerhard Winter, and Conrad Coester. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(6) :1935–1961, June 2009. PMID : 18979536.
- [Tho06] Jean-Louis Thomas. Cour : les ultrasons en therapie, 2006. INSP,CNRS, UPMC, Denis Diderot UMR 7588 140, rue de Lourmel, Paris 15.
- [TMBC06] J. Tu, T. J. Matula, A. A. Brayman, and L. A. Crum. Inertial cavitation dose produced in ex vivo rabbit ear arteries with optison (R) by 1-MHz pulsed ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(2) :281–288, 2006.
- [Tor07] Vladimir P. Torchilin. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, 9(2) :E128–E147, 2007.
- [Tor09] Vladimir Torchilin. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3) :431–444, March 2009. PMID : 18977297.

- [TS90] Y TOMITA and A SHIMA. HIGH-SPEED PHOTOGRAPHIC OBSERVATIONS OF LASER-INDUCED CAVITATION BUBBLES IN WATER. *ACUSTICA*, 71(3) :161–171, July 1990.
- [TYL<sup>+</sup>08] T. Tuziuti, K. Yasui, J. Lee, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. Mechanism of enhancement of sonochemical-reaction efficiency by pulsed ultrasound. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(22) :4875–4878, 2008.
- [VAS<sup>+</sup>09] L Villeneuve, L Alberti, JP Steghens, JM Lancelin, and JL Mestas. Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 16(3) :339–344, March 2009.
- [VLB98] A Vercet, P Lopez, and J Burgos. Free radical production by manothermosonication. *ULTRASONICS*, 36(1-5) :615–618, February 1998.
- [VSM<sup>+</sup>01] S Vaezy, XG Shi, RW Martin, E Chi, PI Nelson, MR Bailey, and LA Crum. Real-time visualization of high-intensity focused ultrasound treatment using ultrasound imaging. *ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY*, 27(1) :33–42, January 2001.
- [vWKH<sup>+</sup>06] Annemieke van Wamel, Klazina Kooiman, Miranda Harteveld, Marcia Emmer, Folkert J ten Cate, Michel Versluis, and Nico de Jong. Vibrating microbubbles poking individual cells : drug transfer into cells via sonoporation. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 112(2) :149–155, May 2006. PMID : 16556469.
- [You89] F. Ronald Young. *Cavitation*. McGraw-Hill, September 1989.
- [YTL<sup>+</sup>08] K. Yasui, T. Tuziuti, J. Lee, T. Kozuka, A. Towata, and Y. Iida. The range of ambient radius for an active bubble in sonoluminescence and sonochemical reactions. *Journal of Chemical Physics*, 128(18) :12, 2008.