



HAL
open science

Contribution à la formulation et à l'évaluation de liposomes d'ATP

Véronique Vincourt Vincourt-Vitse

► **To cite this version:**

Véronique Vincourt Vincourt-Vitse. Contribution à la formulation et à l'évaluation de liposomes d'ATP. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P651 . tel-00806758

HAL Id: tel-00806758

<https://theses.hal.science/tel-00806758>

Submitted on 2 Apr 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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ECOLE DOCTORALE DU MEDICAMENT

ANNEE 2012

N°

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Présentée et soutenue publiquement par

VINCOURT-VITSE Véronique

Le jeudi 29 mars 2012

Titre :

CONTRIBUTION A LA FORMULATION ET A L'EVALUATION DE LIPOSOMES D'ATP

Jury :

Pr Alain Astier (Rapporteur)

Pr Véronique Rosilio (Rapporteur)

Pr Jean Claude Chaumeil

Pr Daniel Scherman

Pr Robert Farinotti

Dr Gilles Dumortier (Directeur de Thèse)

Dr Virginie Escriou

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Chaumeil J.C., pour m'avoir fait l'honneur de me confier ce travail et m'avoir permis de le réaliser au sein du Laboratoire de Recherche et Développement Galénique de l'AGEPS. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Scherman D. ainsi que Mme le Dr Escriou V., pour la mise en place des cultures cellulaires et leurs précieux conseils dans le développement de ce projet au sein du Laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique et de l'Imagerie, UMR 8151 CNRS - U1022 Inserm. Merci également à l'ensemble des équipes de ce laboratoire pour leur contribution pratique ou leurs conseils Melle Largeau C., le Dr Richard C., le Dr Bessodes et le Dr Mignet N.

Aux Pr Astier A. et Pr Rosilio V. pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Soyez assuré de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Dr Dumortier G., directeur de cette thèse, pour l'encadrement de l'ensemble du travail et en particulier pour sa rigueur et sa disponibilité. Recevez le témoignage de ma très grande reconnaissance.

A l'ensemble de l'équipe de l'AGEPS et du Laboratoire de Galénique pour leur écoute et leur appui.

Au Dr Nabil El-Kateb, pour sa participation à la réflexion sur le sujet et ses judicieuses recommandations.

Aux Dr Sandrine Graff et Dr Christine Charrueau, pour leurs encouragements tout au long de ce travail et leurs conseils avisés, constamment appréciés.

A Pascale Deligeon et Hanène Oueslati, pour leur concours à travers tous les échanges animés au cours de nos travaux de recherche.

A Mélanie Fauvel, Romy Linossier, Céline Chu, Gaëlle Breton et Pauline Roller pour tous ces moments partagés au cours de l'internat.

A Qiao Wen Yang, pour avoir suscité mon attrait pour la recherche. Reçois toute mon amitié.

A l'ensemble des équipes pharmaceutiques que j'ai pu rencontrer au cours de mon internat, pour leur accueil et leur disponibilité.

Enfin, à Thibault, à Benjamin et à mes parents, pour leur présence et leur soutien indéfectible

Publications réalisées à partir de la thèse :

1-Tep K, Korb V, Richard C, Escriou V, Largeau C, **Vincourt V**, Bessodes M, Guellier A, Scherman D, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand. J Liposome Res. 2009;19(4):287-300.

2-**Vincourt V**, Nguyen L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Freeze-drying of ATP entrapped in cationic, low lipid liposomes.

Cryobiology. 2010;60(3):262-70.

3-**Vincourt V**, Escriou V, Largeau C, Bessodes M, Scherman D, Chaumeil JC, Dumortier G.

Altered HepG2 cell models using etomoxir versus tert-butyl hydroperoxide.

Cell Biol Toxicol. 2011;27(5):363-70.

Communications affichées issues de la thèse :

Vincourt V, Escriou V, Largeau C, Scherman D, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Model of impaired energetic status to reproduce cellular stress of hepatocyte.

44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, Denmark, April 22 – 26, 2009.

Vincourt V, Tep K, Korb V, Richard C, Escriou V, Largeau C, Scherman D, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand to enhance cellular energy status for hepatic applications.

44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, April 22 – 26, 2009.

Vincourt V, Nguyen L, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Freeze drying process for highly diluted cationic conventional liposomes.

PharmSciFair, Nice, June 8-12, 2009.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS :	4
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX	7
INTRODUCTION et CONTEXTE DE LA THESE	8
Contexte hospitalier du sujet	9
Relation entre statut énergétique et la greffe hépatique	13
Mise en place du projet	15
OBJECTIFS	19
TRAVAUX ANTERIEURS (i) LYOPHILISATION DES LIPOSOMES	23
1. Principales étapes de la lyophilisation.....	26
1.1. Congélation.....	26
1.1.1. Influence de la vitesse de refroidissement sur les structures des lyophilisats de liposomes	28
1.1.2. Influence de la vitesse de refroidissement sur la capacité de rétention.....	29
1.1.3. Influence de la vitesse de refroidissement sur les lipides membranaires et les lyoprotecteurs.....	29
1.2. Sublimation.....	29
1.3. Dessiccation secondaire.....	32
2. Paramètres spécifiques aux liposomes.....	33
2.1. Nature des lipides	33
2.2. Caractéristiques du liposome	34
3. Optimisation de la formulation des lyophilisats.....	34
3.1. Rôle et intérêt des lyoprotecteurs.....	35
3.1.1. Caractéristiques des lyoprotecteurs.....	35
3.1.1.1. Action des agents lyoprotecteurs sur la prévention de la fusion au cours de la lyophilisation	35
3.1.1.2. Action des agents lyoprotecteurs sur la prévention du changement de phase lors de la lyophilisation et de la reconstitution.....	36
3.1.2. Critère de choix de l'agent lyoprotecteur	37
3.1.3. Facteurs modifiant l'action des agents lyoprotecteurs.....	39
3.2. Rôle et intérêt d'un agent texturant.....	40
3.3. Conditions de conservation des lyophilisats	40
4. Essais et contrôles	41
4.1. Essais réalisés sur le lyophilisat.....	41
4.1.1. Differential Scanning Calorimetry	41
4.1.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou FTIR	42
4.1.3. Mesure de la teneur en eau résiduelle du lyophilisat.....	42
4.1.4. Porosité du lyophilisat.....	43
4.2. Essais réalisés après reconstitution	43
4.2.1. Taille et Potentiel zêta.....	43
4.2.2. Evaluation de la dégradation des lipides	43
4.2.3. Stabilité de l'agent encapsulé	43

4.2.4. Dosage du soluté encapsulé.....	44
Conclusion concernant les travaux antérieurs sur la lyophilisation des liposomes	45
TRAVAUX ANTERIEURS (ii): MODELE CELLULAIRE HEPATIQUE ET ETUDE DE L'INTERACTION AVEC LES LIPOSOMES	46
1. Généralités sur les modèles cellulaires hépatiques	47
2. Cultures d'hépatocytes primaires <i>in vitro</i>	48
1.1. Méthode d'obtention des hépatocytes	48
1.2. Culture des hépatocytes	49
1.2.1. Différents types de cultures.....	49
1.2.2. Milieux de cultures.....	50
1.2.3. Différents supports	50
1.2.4. Densité cellulaire.....	51
1.2.5. Cocultures.....	51
3. Lignées cellulaires	53
3.1. Classification des lignées cellulaires hépatiques	53
3.2. Intérêts de la lignée HepG2.....	53
3.3. Mise en culture	54
3.4. Conditions de conservation	54
4. Foie bioartificiel à base d'hépatocytes en culture	54
5. Techniques de contrôle	54
6. Autres modèles hépatiques	56
6.1. Foie isolé perfusé	56
6.2. Coupes de foie	56
7. Avantages et limites des différents modèles	56
8. Application des cultures cellulaires à l'évaluation des liposomes incluant des ligands hépatiques.....	57
Travaux expérimentaux: ARTICLE 1	63
Travaux expérimentaux: ARTICLE 2	64
Travaux expérimentaux : ARTICLE 3	65
DISCUSSION	66
1 Contribution des travaux au sein du projet d'amélioration du statut énergétique du greffon hépatique par liposome d'ATP.....	67
2 Contribution au développement de forme stable de liposome d'ATP.....	69
2.1 Originalité de l'objectif et du schéma expérimental.....	69
2.2 Contribution scientifique	70
2.2.1 Concentration lipidique	71
2.2.2 Données sur l'influence de la composition des liposomes sur la lyophilisation	71
2.3 Perspectives de poursuite de développement d'une forme lyophilisée de liposomes d'ATP	73
3 Contribution à l'évaluation de liposomes d'ATP	76
3.1 Originalité du modèle des cultures cellulaires HepG2 altérées par l'ajout d'agent interférent	77

3.2	Contribution scientifique à l'étude des cultures cellulaires HepG2 altérées par l'ajout d'agent interférent.....	78
3.3	Perspectives de poursuite de modèle à statut énergétique altéré.....	79
CONCLUSION.....		81
BIBLIOGRAPHIE		84

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGEPS : Agence Générale des Equipements et Produits de Santé

ApoE : Apolipoprotéine E

ARNm : ARN messenger

ASGPr : Récepteur aux asialoglycoprotéines

ATP : Adénosine Triphosphate

CF : Carboxyfluorescéine

Chol : Cholestérol

CHS-ED-LA : (5-Cholesten-3 β -yl) 4-oxo-4-[2-(lactobionyl amido) ethylamido] butanoate

DDA : Dimethyldioctadecylammonium

Dil : 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMPC : Dimyristoyl phosphatidylcholine

DOPC : Dioleoyl phosphatidylcholine

DOPE : Dioleoyl phosphatidylethanolamine

DOPS : Dioleoyl phosphatidylsérine

DOTAP : Dioleoyl trimethylammonium propane

DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine

DPPE : Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine

DPPG : Dipalmitoyl phosphatidylglycerol

DSC : Differential Scanning Calorimetry

DSPG : Distearoyl phosphatidylglycerol

EPC: Egg phosphatidylcholine

ERO : Espèces réactives de l'Oxygène

Eto : Etomoxir

FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fuc-C4-Chol: cholesten-5-yloxy-N-[4-[(1-imino-2-D-thiofucosyl-ethyl)amino]butyl]formamide, (5-Cholesten-3 β -yl) 4-oxo-4- [2-actobionyl amido) ethylamido] butanoate

Gal: Galactose

Gal-C4-Chol: cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-D-thiogalactosylethyl)formamide, (5-Cholesten-3 β -yl) 4-oxo-4- [2 (lactobionyl amido) ethylamido] butanoate

Gal-Ligand : Ligands des ASGPr avec résidus galactosylés

GalNac: N-acétylgalactosamine
GPr: Récepteurs aux particules galactosylées
GSH : Glutathion
HepG2: Cellules d'hépatocarcinome humain
HSPC: Hydrogenated soybean phosphatidylcholine
IL : Interleukine
Lact-Ligand: Ligands des ASGPr avec résidus lactosylés
LCO-Tyr-GalNac3: Lithocholic oleate-Tyrosine N-acetylgalactosamine
LDH: Lactate deshydrogenase
LDL: Low Density Lipoprotein
LPS: Lipopolysaccharides
Lyop/lip: Lyoprotecteur/lipide (ratio masse/masse)
Man-C4-Chol: cholesten-5-yloxy-N-[4-[(1-imino-2-D-thiomannosyl-ethyl)amino]butyl]formamide, (5-Cholesten-3 β -yl) 4-oxo-4- [2-(lactobionyl amido) ethylamido] butanoate
MEM: Minimum Essential Medium
MPEG-DSPE: (Methoxypolyethylene glycol) Distearoyl phosphatidylethanolamine
MTT: bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NR : Non renseigné
NS: Non significatif
PC: Phosphatidylcholine
PEG : Polyéthylène Glycol
PG: Phosphatidylglycerol
PL: Phospholipides
POPC: Palmitoyloléoyl phosphatidylcholine
PS: Phosphatidylserine
SEM: Scanning Electron Microscopy
SPC: Soybean phosphatidylcholine
tbooh: Tert-butyl hydroperoxyde
Tc: Température de collapse
TDB: Trehalose 6,6'-dibehenate
Tg: Température de transition vitreuse
Tm: Température de transition de phase
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
UW: University of Wisconsin (solution)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule du ligand lactosylé destiné à interagir avec les ASGPr.....	18
Figure 2: Evolution de la taille des liposomes d'ATP (SPC/Chol/DOTAP/DOPE +/- ligand) conservés à 4 °C (L1 : Gal-ligand, L2 : Lact-ligand) (Moyenne + écart-type, n=3).	18
Figure 3 : Stabilité de l'ATP liposomal (SPC/Chol/DOTAP/DOPE +/- ligand) conservé à 4 °C (L1 : Gal-ligand, L2 : Lact-ligand) (Moyenne + écart-type, n=3). Les taux sont présentés en pourcentage par rapport à la concentration observée à J0.....	18
Figure 4: Evolution de la température de l'étagère (shelf temperature) et de la température du produit (product temperature) au cours du cycle de lyophilisation (Nail, Jiang et al. 2002).	26
Figure 5: Photographie de lyophilisats de liposomes de DPPC obtenus avec une vitesse de refroidissement soit rapide (à gauche) soit lente (à droite) par Scanning Electron Microscopy (SEM) (van Winden, Zhang et al. 1997).....	28
Figure 6: Représentation schématique des couplages de transferts de chaleur et de matière (Marin and René 2000).....	30
Figure 7: Diagrammes Pression-Température de l'eau pure et d'une solution aqueuse (Marin and René 2000).31	31
Figure 8: Lyophilisateur Alpha 1-4 Christ	31
Figure 9: Facteurs influençant le procédé de lyophilisation (Torchilin and Weissig 2002).	32
Figure 10: Thermogramme d'un phospholipide obtenu en DSC (Gregoriadis, 1993), la flèche indique le sens endothermique.....	33
Figure 11: Diagramme de phase eau/lyoprotecteur (Marin and René 2000).....	36
Figure 12 : Effet de différents sucres sur la rétention de l'isocitrate dans des liposomes de POPC/PS en présence d'1 g de sucre par g de lipide.....	37
Figure 13: Thermogrammes de liposomes lyophilisés de DPPC obtenus avec des ratios différents de Chol (ratio molaire), encadré : thermogramme du Chol seul (Ohtake, Schebor et al. 2005).....	41
Figure 14 - Cycle de croissance d'une lignée cellulaire en culture <i>in vitro</i>	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Solutions utilisées pour la conservation des greffons hépatiques	12
Tableau 2 : Exemples de principes actifs sous forme de liposomes commercialisés ou en cours de développement (Les spécialités apparaissant en grisé correspondent à une présentation sous forme de lyophilisat) NR : Non renseigné	25
Tableau 3: Récapitulatif des paramètres de lyophilisation des liposomes décrits dans la littérature, NR : Non renseigné	27
Tableau 4: Caractéristiques des lyoprotecteurs NR : Non renseigné.....	38
Tableau 5: Récapitulatif concernant les composants et additifs des milieux cellulaires	52
Tableau 6: Avantages et limites des différents modèles cellulaires	57
Tableau 7: Modèle cellulaire ou autre évaluation de forme liposomale incluant un ligand hépatocytaire (1 ^{er} partie) (en grisé apparaissent les travaux utilisant des cultures cellulaires).....	60
Tableau 8: Modèle cellulaire ou autre évaluation de forme liposomale incluant un ligand hépatocytaire (2 ^{eme} Partie) (en grisé apparaissent les travaux utilisant des cultures cellulaires).....	61
Tableau 9 : Principales étapes de développement et d'évaluation de formes liposomales destinées à un ciblage hépatique (liste non exhaustive). En grisé, figurent les essais menés antérieurement dans le cadre général du projet.	68
Tableau 10: Principaux points clés de la lyophilisation des liposomes décrits par van Winden (van Winden 2003)	70

INTRODUCTION et CONTEXTE DE LA THESE

Ce travail rentre dans un vaste projet relatif à l'amélioration du statut énergétique des cellules hépatiques. L'introduction vise dans un premier temps à replacer le sujet vis-à-vis du contexte de santé publique correspondant à la greffe hépatique. Dans un deuxième temps, le rôle joué par l'ATP (Adénosine Triphosphate) sera précisé lors de la conservation du greffon hépatique mais également de manière plus large dans la viabilité cellulaire. Ces données constituent le rationnel de notre hypothèse expérimentale. Enfin, nous précisons les objectifs de cette thèse qui constitue une contribution à ce projet de recherche et développement.

Contexte hospitalier du sujet

L'amélioration du statut énergétique des cellules hépatiques est, en effet, une question majeure en termes d'enjeu clinique lors de la conservation du greffon avant la transplantation. Le foie joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de la coagulation, de la régulation de la pression oncotique et de l'épuration de l'organisme. La greffe est envisagée chez les patients en insuffisance hépatique terminale résultant de problèmes chroniques (cirrhose, hépato-carcinome, hépatite C), d'installation progressive ou d'une défaillance hépatique d'apparition soudaine (hépatite fulminante). Cette décision relève d'un comité expert qui décide si l'indication de la greffe est retenue en fonction de l'évaluation du patient. En 2010, les résultats de l'agence de biomédecine montraient un nombre de 1092 greffes hépatiques réalisées. La durée d'attente est un élément critique. Estimée sur l'ensemble de la cohorte des malades inscrits entre 2007 et 2008 à l'exclusion des malades inscrits en super-urgence et des greffes issues de donneurs vivants, la durée médiane de séjour en liste d'attente avant greffe hépatique est de 4,2 mois contre 3,6 mois pour la période 2003-2006, avec un taux de 5,6% de décès chez les patients en attente de greffes en 2008 (Agence_de_Biomédecine, 2009). L'Agence de Biomédecine, autrefois baptisée Etablissement Français des Greffes jusqu'en 2005, assure un encadrement strict et rigoureux dans la gestion des prélèvements et des greffes réalisés. Elle est organisée en quatre centres de régulation et d'appui, ainsi qu'un pôle national de répartition des greffons.

Par an en moyenne, 3000 patients sont susceptibles d'être prélevés, avec environ 50% de donneurs effectifs. Plus de la moitié des patients recensés sont décédés d'un accident vasculaire cérébral. Actuellement, la majorité des greffons provient de donneurs en état de mort encéphalique. Ce type de décès est rare : il représente moins de 1 % des morts survenant à l'hôpital. Pour faire face à la pénurie de greffon, les prélèvements sur personne décédée après arrêt cardiaque sont autorisés

depuis le décret du 2 août 2005. Cependant, des travaux récents aux Etats Unis montrent que la survie des greffons est moins bonne quand ceux-ci proviennent de donneurs décédés par arrêt cardiaque (Grewal et al., 2009, Quintela et al., 2005, Monbaliu et al., 2005). La transplantation hépatique dite « à donneur vivant » propose une alternative face à la pénurie de greffons, ce qui explique l'engouement actuel pour cette technique. Elle consiste à effectuer un prélèvement d'une partie du foie chez un membre de la famille pour en réaliser la transplantation chez le patient en attente de greffe. Le foie a comme caractéristique de pouvoir être partagé en territoires autonomes qui ont la capacité de se régénérer (Jousset et al., 2009, Scatton et al., 2009, Belghiti, 2002). Enfin, une autre technique appelée, « transplantation de foie partiel : "split" et domino » peut être employée. Un foie entier, prélevé chez un donneur en mort encéphalique ou dans le cadre d'un programme domino, s'il est suffisamment volumineux, peut être divisé en deux pour être donné à deux receveurs.

Si les enjeux cliniques sont particulièrement importants, l'aspect économique l'est également en regard des budgets alloués. Le coût total des greffes en France est estimé à 150 millions d'euros par an (Paillet et al., 2007). Concernant la transplantation hépatique, une étude a été menée par les Hospices Civils de Lyon, sur 66 patients transplantés entre 1996 et 1999, dont les indications déclarées étaient des cirrhoses alcooliques et des cirrhoses post hépatite C (Paillet et al., 2007). Cette étude a mis en évidence un coût moyen de 52 000 euros, pour une même durée de séjour qui variait entre 11 et 66 jours avec une moyenne de 24 jours. Ce montant qui tient compte du suivi post greffe pendant 2 ans rassemble les coûts pondérés par la durée du séjour (personnel, matériel...), les coûts fixés par l'« échelle nationale des coûts 2000 » (anesthésie, blocs opératoires...) et les coûts individuels (traitements, examens de laboratoire, examens de radiologie...).

Il ressort que toutes les stratégies doivent être mises en place pour augmenter les chances de survie du patient et la réussite de la greffe. Les échecs lors des transplantations peuvent s'expliquer par des problèmes immunologiques mais aussi par une altération du greffon au cours de sa conservation. Les conditions de conservation doivent assurer une protection du greffon des effets de l'ischémie mais aussi préparer le greffon à sa transplantation. L'arrêt brutal de la vascularisation d'un greffon à 37°C favorisant une nécrose cellulaire, une diminution préalable de la température permet de limiter les dommages liés à l'ischémie. La diminution de la température réduit les besoins en oxygène de 95% et les activités enzymatiques d'un facteur 10 (Szajner et al., 2006, INSERM, 2009). Les solutions de conservation dans lesquelles sont immergés les organes prélevés contribuent à ralentir le métabolisme cellulaire, en inhibant l'activité enzymatique, à l'origine de la dégradation du greffon. Le maintien de l'homéostasie du calcium, la prévention du gonflement cellulaire et l'équilibrage du pH constituent également les objectifs des solutions de conservation. Toutes ces contraintes expliquent la complexité des formulations proposées, qui permettent de conserver le foie pendant 12 voire 20

heures (Brokelman et al., 1999, Pokorny et al., 2004). L'organe peut être confronté à deux types d'ischémie. D'autre part, l'ischémie chaude a lieu quand l'organe n'est plus perfusé mais qu'il n'est pas encore réfrigéré. Cette période est mal tolérée et génère une nécrose cellulaire rapide. Elle concerne également le prélèvement sur donneur vivant. D'autre part, l'ischémie froide touche essentiellement les cellules non parenchymateuses. L'atteinte initiale des cellules sinusoidales et des cellules de Küpffer est à l'origine des premiers dysfonctionnements observés au niveau du greffon (diminution du statut énergétique, formation d'un œdème, perturbation du métabolisme calcique, accumulation de protons et modification du cytosquelette) (Lemasters et al., 2002, Kim et al., 2003, Lanir et al., 1988, Schon et al., 1998, Kupiec-Weglinski and Busuttil, 2005).

La phase de reperfusion se caractérise par un afflux massif d'oxygène, dans un contexte où la cellule est en état d'anoxie. Les enzymes dont l'activité a été précédemment affaiblie, doivent lutter contre la production importante des espèces réactives de l'oxygène (ERO), superoxyde et hydroxyle, à l'origine de la peroxydation des lipides membranaires. Cette oxydation membranaire entraîne la libération des médiateurs de l'inflammation : leucotriènes, thromboxane A2 et du facteur activant les plaquettes (Montalvo-Jave et al., 2008). Une atteinte de la membrane vasculaire perturbe l'équilibre de la coagulation favorisant un contexte pro agrégant, freinant la revascularisation. Les plaquettes concourent également à ce phénomène en libérant des cytokines et du NO, à l'origine de la formation de peroxy-nitrite ONOO⁻, initiateur potentiel de l'apoptose des cellules endothéliales (Montalvo-Jave et al., 2008).

Sur un plan chirurgical, les premiers essais datent sur l'animal du début des années 1960 (El-Wahsh, 2007, Kukral et al., 1962). Très rapidement, il a été observé que la réussite de la transplantation était liée à nature de la solution de conservation. La composition des solutions de conservation actuelles est basée sur un rationnel scientifique. Face à tous les effets néfastes constatés lors du syndrome de l'ischémie-reperfusion, les solutions de conservation fournissent des éléments assurant une protection de l'organe prélevé (Tableau 1). Les caractéristiques de ces solutions ont fait l'objet d'une synthèse approfondie dans le cadre de la thèse d'exercice (Vincourt, 2010). Il ressort que ces solutions visent à prévenir l'œdème cellulaire, l'accumulation intracellulaire du calcium, l'acidose et l'apparition des lésions oxydatives (Neveux et al., 1997, Vreugdenhil et al., 1991, Boudjema et al., 1990). Actuellement sont commercialisées les solutions de l'University of Wisconsin (UW), Celsior[®], Custodiol[®] et IGL-1[®] pour la transplantation hépatique. Les solutions de conservation d'organe sont des produits thérapeutiques annexes définis par l'article L1261-1 du code de la santé publique.

La solution UW constitue le « Gold Standard » en transplantation hépatique. La solution est administrée via une perfusion par la veine porte et le réseau biliaire ; l'organe est ensuite mis dans un conteneur dans lequel de la solution est ajoutée. La solution HTK (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate) ou Custodiol[®], caractérisée par une teneur importante en histidine et tryptophane et

une composition électrolytique atypique, assure une perfusion facilitée par l'absence de composé de haut poids moléculaire. Initialement destinée à la cardioplégie, la solution Celsior[®] a connu un développement dans la conservation des poumons et plus récemment du foie, des reins et du pancréas. Elle se caractérise par la présence de glutamate comme substrat énergétique et de l'histidine qui lutte contre l'acidose et la surcharge calcique. Pour des raisons logistiques, plusieurs auteurs proposent le développement d'une solution de préservation « multi organes » et les travaux de Karam suggèrent Celsior[®] à cet effet (Karam et al., 2005). Concernant la solution IGL-1[®] formulée par l'Institut Georges Lopez (IGL), sa composition pallie les inconvénients de la solution UW, à savoir l'inversion des concentrations en Na⁺ et K⁺ et l'absence d'hydroxyéthylamidon.

	Solution UW	Solution Celsior[®]	Solution HTK Custodiol[®]	Solution Eurocollins[®]	Solution IGL-1[®]
	Intracellulaire	Extracellulaire	?	Intracellulaire	Extracellulaire
Electrolytes	K ⁺ 120mM	K ⁺ 15mM	K ⁺ 9mM	K ⁺ 115mM	K ⁺ 25mM
	Na ⁺ 30mM	Na ⁺ 100mM	Na ⁺ 15mM	Na ⁺ 10mM	Na ⁺ 120mM
	Mg ²⁺ 5mM	Mg ²⁺ 13mM	Mg ²⁺ 4mM	Cl ⁻ 15mM	Mg ²⁺ 5mM
	SO ₄ ²⁻ 5mM	Ca ²⁺ 0,25mM	Ca ²⁺ 0,015mM		SO ₄ ²⁻ 5mM
		Cl ⁻ 40mM	Cl ⁻ 50mM		
Imperméants	Lactobionate Raffinose	Lactobionate Mannitol	Mannitol	Glucose	Lactobionate Raffinose
Agents oncotiques	Hydroxyéthyl amidon				PEG 35000
Substrats énergétiques	Adénosine	Glutamate	α-Cétoglutarate		Adénosine
Ajustement du pH	Phosphate	Histidine	Histidine Tryptophane	Bicarbonate Phosphates	Phosphate
Anti oxydants	Glutathion Allopurinol	Glutathion			Glutathion Allopurinol
Utilisation	A filter + ajout	Prêt à l'emploi	Prêt à l'emploi	A mélanger	Prêt à l'emploi
Greffes	Foie, rein, pancréas, cœur, poumon	Cœur, poumon, foie, rein	Cœur, foie, rein, poumon, pancréas	Rein, foie, pancréas	Rein, foie, pancréas

Tableau 1: Solutions utilisées pour la conservation des greffons hépatiques

Relation entre statut énergétique et la greffe hépatique

Concernant notre projet, l'altération du statut énergétique du greffon hépatique semble un élément critique. L'ischémie froide génère une déplétion en glucose et en oxygène, à l'origine de la diminution de la synthèse hépatique d'ATP, par phosphorylation oxydative. En 24 heures à 4°C, le stock d'ATP chute de près de 90%. La concentration moyenne de l'ATP dans les hépatocytes humains varie entre 8,5 et 12,2 mmol/10⁶ cellules (Ostrowska et al., 2000). Dans les débuts de l'ischémie, la glycolyse prend le relais, assurant une restauration des taux d'ATP de l'ordre de 15 à 20%. L'ischémie prolongée favorise le découplage de la phosphorylation oxydative, avec un effondrement du potentiel de membrane mitochondriale, à l'origine de l'activation de la F1F0 ATPase (Lemasters et al., 2002, Kim et al., 2003). Cette déplétion en ATP conditionne l'essentiel des perturbations observées et constitue un des éléments-clés sur lesquels les solutions de conservation doivent agir. En effet, un taux d'ATP élevé avant implantation est en faveur du succès de la transplantation (Lanir et al., 1988). En outre, l'ATP joue un rôle important dans les mécanismes complexes de nécrose ou d'apoptose. Le niveau du taux en ATP conditionne la mort cellulaire en l'orientant soit vers la nécrose, soit vers l'apoptose. Ainsi les travaux de Latta ont montré que la mort des cellules hépatiques, via le récepteur aux TNF nécessite un certain niveau d'ATP (Latta et al., 2007). L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale intervient également dans les deux phénomènes. La transition de perméabilité mitochondriale favorise la diminution de l'ATP à l'origine de la nécrose. Cependant l'ouverture des pores est à l'origine du gonflement des mitochondries, de la libération du cytochrome C et donc de l'activation de la cascade des capsases. A ce niveau, le taux d'ATP conditionne les événements, et un taux d'ATP d'environ 10% de la valeur normale engage la cellule dans un processus d'apoptose. L'ischémie favorise dans un premier temps la nécrose ; cependant, si des substrats sont présents, la glycolyse anaérobie permet de remonter les taux d'ATP d'environ 15 à 20% de la valeur normale, c'est à dire à un niveau suffisant pour déclencher l'apoptose. Ces phénomènes sont donc interconnectés, d'où le concept de « nécroapoptose » (Lemasters et al., 2002).

Afin de pallier l'altération du statut énergétique du greffon hépatique, les solutions de conservation ont été spécialement élaborées dans l'objectif de maintenir les taux en ATP. Les acides aminés utilisés dans le cadre de la production de l'énergie selon un mode anaérobie par la voie de transamination mitochondriale sont présents dans les solutions Celsior[®] avec l'acide glutamique, et l' α -cétoglutarate (issu de la désamination du glutamate, un acide aminé) dans le cas de la solution Custodiol[®]. Cet apport peut également être envisagé par l'ajout d'un précurseur de l'ATP, telle que l'adénosine, comme dans les solutions UW et IGL 1[®].

Par ailleurs, afin de rendre l'apport d'ATP plus efficient, différentes équipes ont formulé des liposomes d'ATP afin d'améliorer le statut énergétique cellulaire. En effet, l'ATP est très sensible à l'hydrolyse enzymatique (Gordon, 1986), ce qui le rend instable dans les liquides biologiques (Puisieux et al., 1994). Si l'ATP peut être hydrolysé *in vitro*, cette réaction est très significativement accélérée *in vivo*. L'ATP est rapidement métabolisé par des ectoenzymes à la surface des cellules endothéliales (Gordon, 1986). Des Ecto- Ca^{2+} (Mg^{2+})-ATPase sont, en effet, présentes à la surface de la membrane cellulaire. En outre, l'ATP extracellulaire peut être également hydrolysé en ADP par des ecto-ATP-diphosphohydrolases (ectoapyrase). Par ailleurs, l'ATP qui est très hydrophile et chargé très négativement à pH physiologique, ne peut pas traverser facilement la membrane plasmique. Une vectorisation cellulaire s'avère donc nécessaire par exemple à l'aide de liposomes (Arakawa et al., 1998, Konno et al., 1996, Laham et al., 1988b, Laham et al., 1988a, Liang et al., 2004a, Liang et al., 2004b, Verma et al., 2005a, Xu et al., 1990, Skiba-Lahiani, 1995). Différents résultats, obtenus dans des travaux avec des liposomes d'ATP sur des modèles expérimentaux d'ischémie, justifient de l'intérêt de cette forme vectorisée (Rossignol et al., 1988). En 1987, Laham A. (Laham et al., 1987) est le premier auteur à étudier les potentialités thérapeutiques de l'ATP vectorisé sous forme de liposomes. L'objectif était de recharger en énergie, le cerveau ischémié de rat grâce à un apport de liposomes d'ATP, par injection intra-carotidienne. Ces travaux ont montré que l'administration de liposomes d'ATP était associée à une meilleure tolérance des épisodes ischémiques cérébraux. Les travaux de Chapat et al. (Chapat et al., 1991) ont déterminé les taux plasmatiques d'ATP sur un modèle de cerveau ischémié après administration d'ATP libre ou encapsulé dans des liposomes. La libération prolongée de l'ATP à partir des liposomes pourrait expliquer, du moins partiellement, les résultats observés. Concernant l'ischémie myocardique, Verma et al. ont démontré l'effet bénéfique des liposomes d'ATP à partir du modèle du cœur isolé de rat (amélioration des paramètres hémodynamiques après un épisode ischémique transitoire) (Verma et al., 2005b). Ces résultats ont été confirmés sur un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin (administration intra-carotidienne liposomes d'ATP), la surface des tissus endommagés étant réduite avec les liposomes d'ATP, ce qui n'a pas été le cas avec des liposomes « blancs » ou lors de l'injection d'une solution tampon de contrôle (Verma et al., 2005a). Tous ces travaux confirment la meilleure efficacité par rapport à l'ATP seul. Néanmoins, l'origine de cette amélioration reste encore à préciser. Probablement, une meilleure biodisponibilité (stabilité par rapport aux ATPases plasmatiques) et/ou une plus grande captation cellulaire est à l'origine de ces résultats.

Mise en place du projet

Au vu de ces données bibliographiques, un projet a été élaboré par l'Unité Recherche et Développement Galénique (responsable, Pr Chaumeil J.C.) au sein de l'unité UPRES EA 2498 (Laboratoire de la Biologie de la Nutrition, responsable, Pr Cynober L). La première étape de ce projet avait pour objectif de formuler puis d'évaluer des liposomes d'ATP avec ou ligand spécifique, l'ApoE. Les premiers travaux de Neveux et *al.* (Neveux et al., 2000, Neveux et al., 2002), ont évalué les effets des liposomes d'ATP sur le statut énergétique et le métabolisme du foie de rat conservé à 4°C. Ils ont été réalisés en deux temps : les liposomes d'ATP ont d'abord été testés sur le foie isolé perfusé à 37°C puis dans des conditions de conservation hypothermique dans une solution UW à 4°C. En pré-requis, les expériences menées sur le foie isolé perfusé à 37°C, ont permis d'analyser dans quelle mesure les liposomes d'ATP pouvaient être utilisés pour améliorer le contenu énergétique du foie sain. En comparaison avec l'ATP libre, la captation hépatocellulaire n'a été améliorée que lorsque la molécule était encapsulée dans des liposomes. De plus, l'utilisation oxydative des acides aminés et la captation du glucose (substrat énergétique) ont été réduites. Aucun effet toxique au niveau hépatique, secondaire aux vésicules liposomales d'ATP, n'a été observé. Lors de la conservation du foie à 4°C, l'administration de liposomes d'ATP a été associée à la diminution de la production de transaminases. La diminution du contenu hépatique en ATP a été réduite mais non complètement contrôlée (liposomes-ATP : 524 ± 45 vs. contrôle : 364 ± 06 nmol/g). En perspective à ces travaux, il est apparu nécessaire d'améliorer la captation hépatocytaire des liposomes d'ATP, c'est-à-dire de mieux cibler les liposomes vers les hépatocytes.

Le ciblage des liposomes est généralement obtenu par l'incorporation de ligands spécifiques de diverses natures tels que des anticorps, des peptides, des hormones ou des sucres. Des immunoliposomes d'ATP incorporant des anticorps monoclonaux antimyosine ont permis l'obtention de résultats très intéressants dans le cadre du modèle d'ischémie cardiaque (Verma et al., 2005a, Verma et al., 2005b). La présence ou non de ligand conditionne la captation du liposome vers les hépatocytes au détriment d'autres organes ou d'autres cellules hépatiques telles que les cellules de Küpffer. Au niveau hépatocytaire, les apolipoprotéines d'une part, et les ligands aux asialoglycoprotéines d'autre part, ont fait l'objet d'évaluation concernant leur capacité de ciblage.

L'apoE (Apolipoprotéine E) joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques comme ligand des récepteurs des Low Density Lipoprotein (LDL), des Very Low Density Lipoprotein (VLDL) et des remanants. Elle est synthétisée par les hépatocytes mais également par les monocytes-macrophages. Cette protéine permet de mimer le devenir des lipoprotéines dans la circulation offrant ainsi un meilleur ciblage des liposomes vers les hépatocytes. Dans le prolongement des travaux antérieurs menés par Neveux et al. (Neveux et al., 2002, Neveux et al., 2000), Chaïb et al.

(Chaib et al., 2003) ont montré que les liposomes d'ATP incluant de l'apoE amélioraient la fonctionnalité des foies perfusés de cobaye. Le taux de capture des liposomes d'ATP associés à l'apoE était supérieur à celui des liposomes d'ATP sans ligand et était d'autant plus important que la concentration en apoE était élevée (ATP-apoE-Liposome : $-9,17 \pm 0,69$ vs ATP-Liposome : $-6,40 \pm 0,88$ nmol/min/g). Néanmoins, la revue de la littérature souligne que le nombre des travaux associant l'apoE avec les liposomes reste à ce jour très limité (Yan et al., 2005, Korb et al., 2008).

La très grande majorité des travaux réalisés sur le ciblage hépatocytaire a mis à profit les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPr) que ce soit sous forme de liposome ou de lipoplexes (Arangoa et al., 2003, Bandyopadhyay et al., 1999, Carriere et al., 2004, Fumoto et al., 2005, Hattori et al., 2000, Higuchi et al., 2006, Hou et al., 2003, Jin et al., 2005a, Jin et al., 2005b, Kawakami et al., 2001, Kawakami et al., 2000b, Kawakami et al., 1998, Managit et al., 2005, Matsukawa et al., 2000, Murao et al., 2002, Putz et al., 2005, Rensen et al., 2001, Shimada et al., 1997, Sliedregt et al., 1999, Sun et al., 2005, Terada et al., 2006, Wang et al., 2006a). Les cellules du foie sont, en effet, pourvues de nombreux récepteurs qui sont impliqués dans l'endocytose de multiples composants. Les récepteurs à galactose (Gal) des asialoglycoprotéines sont les premières lectines connues (Soukharev et al., 2000) et sont principalement présents sur les cellules parenchymateuses du foie (Park et al., 2003, Park et al., 1998, Clarke and Weigel, 1985). Les asialoglycoprotéines se lient aux ASGPr par l'intermédiaire des vésicules recouvertes de clathrine (Geuze et al., 1983).

L'ASGPr est une lectine hépatique calcium dépendante. Selon les espèces, sa structure est composée de deux ou trois sous-unités homologues HL1 (Hepatic Lectin 1) et HL2. Dans toutes les espèces, ces sous unités sont des lectines de type C transmembranaires d'environ 300 acides aminés (AA) de type II: elles sont composées d'un court domaine $-NH_2$ terminal cytoplasmique (40 AA), d'un signal d'ancrage membranaire interne (20 AA), d'une extrémité $-COOH$ extracellulaire (220 AA) contenant le domaine de reconnaissance des carbohydrates (« carbohydrate recognition domain ») qui fixe le galactose (Gal) et le N-acétylgalactosamine (GalNac) (Wu et al., 1998) .

Chez l'homme, deux sous-unités (HH1 et HH2) sont associées en tétramères afin que le récepteur devienne fonctionnel. La sous-unité majoritaire (HH1, 41 kDa) est sept fois plus abondante que la sous-unité mineure (HH2, 50 kDa). Les récepteurs se localisent majoritairement au niveau de la surface basolatérale (sinusoïdale, zone constituée de microvillosités) des hépatocytes, en contact avec la circulation sanguine. Un modèle de la structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires des deux sous-unités du ASGPr a été proposé (Bianucci and Chiellini, 2000). Il est intéressant de noter dans le cadre de notre projet expérimental que, chez le rat, le récepteur fonctionnel est constitué de trois sous-unités (RHL-1, 41,5 kDa; RHL-2, 49 kDa; et RHL-3, 54 kDa) complexées sous forme d'un hexamère. RHL-1 est la sous-unité majeure (70-80 % de la masse totale de récepteur).

Les ASGPr ne sont pas spécifiques de l'hépatocyte car ils ont aussi été repérés à la surface des macrophages. Ils sont dans ce cas composés d'un seul type de sous unité (42 kDa) formant des oligomères. Toutefois, ces deux types de récepteurs ont des substrats préférentiels différents. Les récepteurs hépatiques ont une affinité pour le GalNac très supérieure à celle pour le Gal. Dans le cas des récepteurs des macrophages, l'affinité est la même pour les deux substrats (Iobst and K., 1996). Des récepteurs homologues, appelés récepteurs aux particules galactosylées (GPr) ont été détectés sur les cellules de Küpffer et les macrophages péritonéaux. Leurs caractéristiques diffèrent toutefois de celles des ASGPr. Les GPr ont une affinité pour les particules galactosylées, qui augmente quand la taille des particules s'accroît alors que l'affinité des ASGPr ne dépend pas de la taille du ligand (Biessen et al., 1994). Les GPr reconnaissent le GalNac et le fucose.

Les ASGPr humains ont été détectés dans les lignées cellulaires comprenant les cellules du tissu hépatique telles que les cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2), les lignées cellulaires intestinales épithéliales telles que les Caco2 (Sasaki et al., 1994), ainsi que la lignée Jurkat de cellules T (Park et al., 1998) et celle du tissu testiculaire Tera-1 (Monroe and Huber, 1994).

La synthèse et l'incorporation des ligands aux ASGPr ont fait l'objet de deux Master 2 de Recherche Spécialité Formulation et Production des Médicaments dans le cadre du Parcours Pharmacotechnie et Biopharmacie (Université Paris Sud, responsable Pr Fattal E.) (Korb, 2006, Tep, 2007). Ces travaux ont été menés dans les laboratoires de l'AGEPS (Agence Générale des Equipements et Produits de Santé) au sein de l'unité UPRES EA 2498 (Laboratoire de la Biologie de la Nutrition, responsable, Pr Cynober) en étroite collaboration avec Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et de l'Imagerie (CNRS UMR8151 - INSERM U1022, responsable Pr Scherman D.). Ces travaux ont comporté une partie de formulation galénique et de synthèse chimique. Au niveau de la composition, une étude préalable de stabilité de l'ATP a conduit à travailler à température ambiante au cours des différentes étapes de fabrication et à conserver les fractions liposomales à 4°C pour limiter les pertes. Différentes formules à base de phosphatidylcholine de soja (SPC) (60-65%), cholestérol (Chol) (30-35%) associées ou non à des lipides chargés (5 ou 10%) soit négativement (Phosphatidylglycérol : PG) soit positivement [Octadécylamine : ODA, Dioleoyl triméthylammonium propane (DOTAP), Dérivés polyaminés] avec ou sans ATP ont été fabriquées. Les formules comportant un lipide positif type DOTAP sont apparues répondre aux critères prédéfinis de taille (i) adaptée afin de diffuser facilement à travers l'espace de Disse et potentiel zêta positif (ii) afin d'interagir avec la membrane cellulaire légèrement chargée négativement.

Il a été possible de synthétiser un ligand original lactosylé (Lact-ligand) proche du Gal-C4-Cholestéryl (Figure 1). Les liposomes ainsi formulés en plus de la SPC et du Chol comportaient DOTAP 5 %, DOPE (Dioleoyl phosphatidylethanolamine) 0,5 % et Lact-Ligand (2,5%). L'incorporation du ligand a été

vérifiée par un test d'agglutination avec la ricine dont la spécificité de réaction a été contrôlée par sa réversibilité en présence d'un excès de galactose.

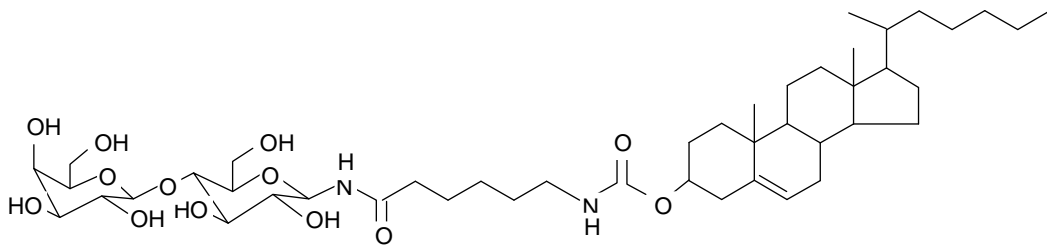


Figure 1 : Formule du ligand lactosylé destiné à interagir avec les ASGPr

A ce stade du projet, deux problématiques ont été soulevées, la première concernait l'instabilité des caractéristiques des liposomes et de l'ATP au-delà de 48 heures (Figure 2 et Figure 3) et la seconde correspondait à la nécessaire mise en place d'un modèle cellulaire d'évaluation. Ces deux thèmes sont à l'origine des travaux de cette thèse.

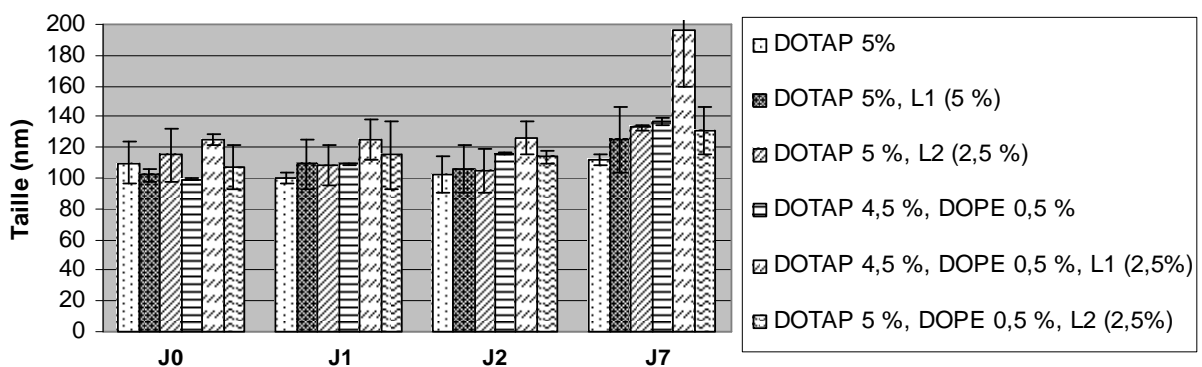


Figure 2: Evolution de la taille des liposomes d'ATP (SPC/Chol/DOTAP/DOPE +/- ligand) conservés à 4 °C (L1 : Gal-ligand, L2 : Lact-ligand) (Moyenne \pm écart-type, n=3).

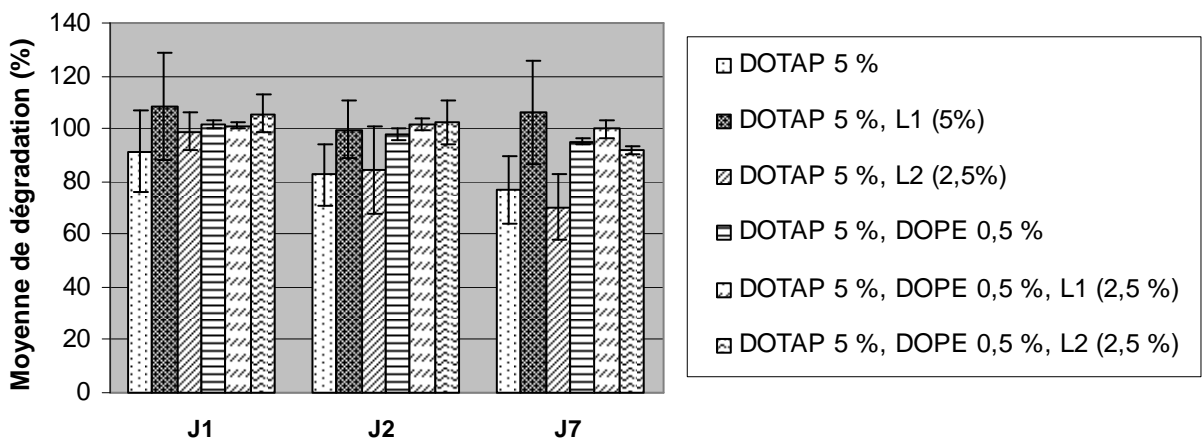


Figure 3 : Stabilité de l'ATP liposomal (SPC/Chol/DOTAP/DOPE +/- ligand) conservé à 4 °C (L1 : Gal-ligand, L2 : Lact-ligand) (Moyenne + écart-type, n=3). Les taux sont présentés en pourcentage par rapport à la concentration observée à J0.

OBJECTIFS

Suite aux premiers travaux et au vu de la littérature scientifique, il ressort que :

- (i) L'amélioration du statut énergétique pourrait augmenter le taux de réussite des greffes ou peut être, prolonger la durée de conservation du greffon.
- (ii) L'ATP comme molécule clé dans les flux énergétiques pourrait améliorer la viabilité cellulaire. Ceci implique une mise en forme susceptible de protéger l'ATP de l'hydrolyse et de faciliter son entrée dans la cellule.
- (iii) La formulation liposomale couplée à une vectorisation pourrait cibler efficacement les hépatocytes par l'intermédiaire de ligands aux ASGPr.

A ce stade du projet, diverses formulations satisfont aux critères suivants :

- (i) Taille de l'ordre de 100 nm afin de diffuser au sein de l'espace de Disse
- (ii) Potentiel zêta positif afin d'interagir avec la membrane cellulaire
- (iii) Incorporation d'un ligand lactosylé susceptible d'interagir avec les ASGPr.

Néanmoins, deux problèmes majeurs ont été soulevés :

- (i) Hydrolyse de l'ATP au sein de la forme liposomale et augmentation de la taille malgré une conservation à 2°C-8°C sur un intervalle d'une semaine
- (ii) Nécessité de mettre en place un modèle cellulaire adapté pour vérifier l'interaction entre les liposomes et les cellules.

Comme cela a été détaillé dans l'introduction, le projet d'amélioration du statut énergétique des cellules hépatiques est principalement à orientation appliquée. Il répond à une problématique clinique et par conséquent doit satisfaire à des objectifs à la fois de développement et de recherche. L'Unité de Recherche et Développement Galénique de l'AGEPS prend en considération ces deux aspects. L'objectif de ce travail est ainsi double :

Objectif de développement d'une forme lyophilisée de liposome d'ATP :

Le développement consiste à mettre à disposition des formulations adaptées au besoin des utilisateurs. Les critères à privilégier sont un transport peu coûteux sous une forme peu volumineuse, une conservation à température ambiante et mode d'administration facilitée. Dans le cadre du développement de notre forme liposomale d'ATP, l'instabilité observée malgré une conservation entre 2°C et 8°C, constitue un premier challenge.

***La partie bibliographique** présentera les données de la littérature afin de répondre à cette problématique. Cette partie décrira la place de la lyophilisation dans les stratégies de stabilisation des liposomes, les paramètres critiques de cette opération ainsi que les principaux résultats décrits dans la littérature. Ces travaux antérieurs permettront de justifier et de définir notre démarche expérimentale.*

***La partie expérimentale** est détaillée dans la publication *Freeze-drying of ATP entrapped in cationic, low lipid liposomes. Cryobiology. 2010* (1^{er} auteur Véronique Vincourt) et s'articule en deux parties. La première phase a été conduite avec des liposomes blancs et la seconde avec des liposomes d'ATP qui ont été lyophilisés.*

Objectif de recherche et d'évaluation des liposomes d'ATP à l'aide d'un modèle cellulaire :

Le volet recherche et évaluation s'intéressera à la mise en place d'un modèle cellulaire hépatique. Il est important, en effet, de mettre en évidence l'interaction entre la forme vectorisée et la cellule hépatocytaire.

Une partie bibliographique présentera une synthèse des données sur les modèles hépatocytaires existant puis des travaux publiés sur l'étude de l'interaction entre liposome et cellules hépatiques.

La partie expérimentale est détaillée dans deux articles dans lesquels notre contribution est différente.

(i) Le premier article "Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand" (J Liposome Res. 2009, 6^{ème} auteur : V. Vincourt). L'interaction entre les liposomes et les HepG2 y est étudiée. Notre contribution en tant que 6^{ème} auteur a consisté à rendre quantitatif l'internalisation des liposomes marqués à la DOPE-Rhodamine en procédant à une extraction préalable des lipides. Cet article montre les limites des cellules HepG2 en condition de culture standard pour évaluer l'impact des liposomes d'ATP sur le statut énergétique. Il justifie la nécessité de mettre en place un modèle cellulaire à statut énergétique altéré, qui est l'objectif du dernier article.

(ii) Le dernier article présenté dans cette thèse, « Altered HepG2 cell models using etomoxir versus tert-butyl hydroperoxide », (Cell Biol Toxicol. 2011, 1^{er} auteur V. Vincourt). Ce travail s'intéresse à l'évaluation d'un modèle utilisant l'étomoxir sur des cellules HepG2 en conditions normo ou hypothermiques et de le comparer à un agent induisant un stress oxydant le tert-butyl hydroperoxide.

TRAVAUX ANTERIEURS (i)
LYOPHILISATION DES LIPOSOMES

Une étude de stabilité des liposomes a souligné un problème de modification des caractéristiques liposomales (taille et potentiel zêta) au-delà de 48h et une rapide hydrolyse de l'ATP, supérieure à 10% à 24h. L'optimisation de la stabilité des formulations liposomales constitue un challenge en Pharmaceutique sur lequel reposent de possibles transpositions industrielles. En étudiant le mode de présentation et de conservation des principales spécialités disponibles ou en cours de développement (Tableau 2), plusieurs procédés semblent applicables dont la lyophilisation/reconstitution. Cette technique offre en particulier la plus longue durée de conservation, qui peut aller jusqu'à 4 ans dans le cas de la spécialité Visudyne[®]. Elle stabilise les liposomes en les gardant dans des conditions anhydres et dans une atmosphère inerte (Ugwu et al., 2005, Nounou et al., 2005). La lyophilisation est la technique envisagée pour conserver les liposomes d'ATP grâce au maintien d'une humidité résiduelle faible et à l'absence d'oxygène, éléments favorables à la conservation des phospholipides et de l'ATP. Néanmoins, ce procédé galénique induit un stress physicochimique important, pouvant facilement déstabiliser la structure de membrane phospholipidique. Un travail de mise au point est par conséquent indispensable.

Pour des liposomes contenant des principes actifs lipophiles associés à la membrane ou des liposomes blancs à reconstituer avec une solution de principe actif, il existe une plus grande souplesse dans le choix des paramètres (van Winden, 2003, Chen et al., 2010). L'optimisation de la lyophilisation de liposomes contenant des principes actifs hydrosolubles constitue, quant à elle, un objectif difficile à atteindre. Les spécifications requises sont l'obtention d'un lyophilisat à très faible teneur en eau résiduelle, de haute porosité permettant une reconstitution rapide et assurant une stabilité et une rétention intraliposomale du principe actif ainsi que le respect des composants et des caractéristiques propres aux liposomes. Une étude bibliographique a donc été réalisée afin de préciser les différentes étapes de la lyophilisation des liposomes, les moyens d'optimiser les paramètres du procédé et les critères de choix des adjuvants pouvant concourir à la stabilisation du lyophilisat. En outre, la description des spécifications attendues et des contrôles correspondant servira de support afin de définir les différentes phases de notre plan expérimental appliqué aux liposomes d'ATP.

Spécialité / Laboratoire	Principe	Forme	Taille	Excipient	Autres Excipients	Conservation
AMBISOME [®] / Gilead (Vidal [®] , 2007)	Amphotéricine B	Poudre lyophilisée de liposomes	~<100 nm	HSPC, Chol, DSPG	αtocophérol, saccharose, succinate disodique hexahydraté, NaOH et HCl qsp pH 5 à 6.	36 mois entre 2 à 8°C
CAELYX [®] / Schering Plough (Vidal [®] , 2007)	Doxorubicine	Dispersion liposomale à diluer	~100 nm	MPEG-DSPE, HSPC, Chol	Sulfate d'ammonium, saccharose, histidine, HCl, NaOH, eau PPI	20 mois entre 2 à 8°C
DAUNOXOME [®] / Giléad (McTiernan et al., 2006, Vidal [®] , 2007)	Daunorubicine	Dispersion liposomale à diluer	~40-60 nm	DSPC, Chol	Acide citrique, saccharose, glycine, chlorure de calcium dihydraté, NaCl et/ou HCl, eau PPI	12 mois entre 2 à 8°C
DEPOCYTE [®] / Skyepharma (Rueda Dominguez et al., 2005, Vidal [®] , 2007)	Cytarabine	Suspension stérile multivésiculaire	~20 µm	DOPC, DPPG, Chol	Trioléine, eau PPI	24 mois entre 2 et 8°C
DEPODUR [®] / Endo Pharmaceutical (Endo-Pharmaceuticals, 2006)	Morphine	Suspension stérile multivésiculaire	~17-23 µm	DOPC, Chol, DPPG,	Tricapryline, trioléine, NaCl 0,9%	2 à 8°C
DOXIL [®] / Ortho Biotech (Ortho-Biotech, 2007)	Doxorubicine	Dispersion liposomale à diluer	~100 nm	MPEG-DSPE, HSPC, Chol	Sulfate d'ammonium, saccharose, histidine, HCl, NaOH, eau PPI	2 à 8°C
EPAXAL [®] / Berna Biotech (Berna-Biotech, 2007a)	Antigène de l'hépatite A	Suspension de liposomes	NR	Lécithines et céphaline	NaCl, eau PPI	NR
INFLEXAL [®] V / Berna Biotech (Berna-Biotech, 2007b)	Hémagglutinine de la grippe	Suspension de liposomes	NR	Lécithines	NaCl, sels de phosphate, eau PPI	NR
JUNOVAN [®] / IDM Pharma (Cremer, 2006)	Muramyl Tripeptide	Poudre lyophilisée de liposomes	~2-5 µm	POPC, DOPS	NR	NR
LEP ETU [®] / Néopharm (Zhang et al., 2005)	Paclitaxel	Poudre lyophilisée de liposomes	~150 nm	DOPC, DMPC, DSPC, cardiolipine, Chol	Saccharose, NaCl, succinate d'αtocophéryl	12 mois entre 2 et 8°C et à 25°C
MARQIBO [®] / Hana Biosciences (Inex-Pharmaceuticals and Enzon-Pharmaceuticals, 2004)	Vincristine	NR	~100 nm	Sphingomyéline (liposome rigide) + Chol	NR	NR
MYOCET [®] / Zeneus (Petit, 2004, Vidal [®] , 2007)	Doxorubicine	Lyophilisat de doxorubicine + tampon	~150-250 nm	EPC, Chol	Lyophilisat : lactose /Dispersion liposomale : acide citrique, eau PPI, NaCl / Solution tampon : eau PPI, carbonate de sodium	18 mois entre 2 à 8°C
VISUDYNE [®] / Novartis Europharm (Vidal [®] , 2007)	Vertéporfine	Poudre lyophilisée de liposomes	~100 nm	DMPC, PG de jaune d'œuf	Palmitate d'ascorbyl, lactose, butylhydroxytoluène	48 mois à t°<25°C

Tableau 2 : Exemples de principes actifs sous forme de liposomes commercialisés ou en cours de développement (Les spécialités apparaissant en grisé correspondent à une présentation sous forme de lyophilisat) NR : Non renseigné

1. Principales étapes de la lyophilisation

La lyophilisation est basée sur la sublimation de la glace contenue dans des solutions ou des suspensions, préalablement solidifiées par congélation, que l'on souhaite « assécher ». Elle conserve le produit dans des conditions anhydres, évitant ainsi les processus d'hydrolyse et de prolifération bactérienne. Le principe de séchage par lyophilisation repose sur des variations de pression et de température (Figure 4).

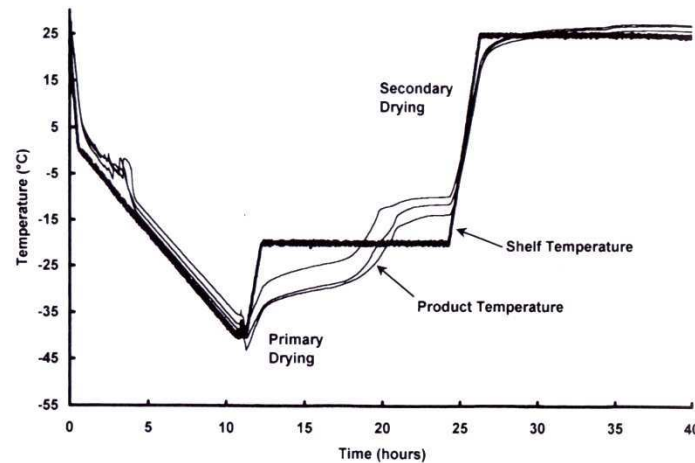


Figure 4: Evolution de la température de l'étagère (shelf temperature) et de la température du produit (product temperature) au cours du cycle de lyophilisation (Nail, Jiang et al. 2002).

1.1. Congélation

La congélation est considérée comme l'étape cruciale et limitante de la lyophilisation car elle conditionne la structure cristalline finale, la stabilité et l'état physique du produit fini (faible taux de siccité, grande surface spécifique, capacité optimale de réhydratation). La congélation vise à obtenir une structure facilitant l'évacuation de la glace sous forme de vapeur d'eau lors de la sublimation.

Selon les conditions opératoires, deux processus peuvent se mettre en place, respectivement la nucléation et la croissance cristalline. La nucléation correspond à la formation des petits cristaux conférant au lyophilisat une grande surface spécifique. A l'inverse, la croissance cristalline génère un petit nombre de grands cristaux à l'origine d'une structure macro-poreuse. L'optimisation de la congélation consiste à déterminer la température cible et la vitesse de refroidissement. Cette température doit être principalement fixée en fonction du diagramme ternaire de la solution et des caractéristiques du lyoprotecteur utilisé (Température de transition vitreuse ou Tg). Elle varie suivant les auteurs de -40°C à -196°C (azote liquide), comme le montre le Tableau 3. Néanmoins, les modalités de congélation doivent faire l'objet d'une étude préalable vis-à-vis de la surface d'échange et de la vitesse de refroidissement par l'intermédiaire d'une sonde thermique.

Type de lipides	Taille nm	Vitesse de congélation	Cycle lors de la sublimation et de la dessiccation	Auteurs
EPC	1000 à 2500	- rapide : -20°C	Séchage pendant 12h (pression non précisée)	(Bridges and Taylor, 2001)
EPC	133	- rapide : -80°C	NR	(Wolkers et al., 2004)
EPC	100-200	- rapide : -40°C	-40°C pendant 48h puis 25°C (pression non précisée)	(Alexopoulou et al., 2006)
EPC, Chol	50	- rapide : -45°C	-25°C pendant 24h à 0,4 Pa puis augmentation progressive jusqu'à 25°C avec un palier à -5°C à 7 Pa	(Yang et al., 2006)
SPC/HSPC	100	-lente : 0,5°C/min	-40°C pendant 48h puis augmentation progressive jusqu'à 25°C (1°C/min) à 20 Pa	(Cui et al., 2006) (Li and Deng, 2004)
PC	50	- rapide : -40°C	-40°C pendant 12h à 1,3N/m ² puis augmentation jusqu'à 4°C à 0,6N/m ²	(Komatsu et al., 2001)
PC	NR	- rapide : -45°C	-45°C pendant 18h à 1,3 Pa puis augmentation jusqu'à 25°C à 0,4 Pa	(Suzuki et al., 1996)
SPC, PS	200	- rapide : -50°C	-50°C pendant 48h puis 25°C pendant 24h à 20 Pa	(Wang et al., 2006b)
PC, Chol	5000	NR	-40°C pendant 24h à 12 Pa, puis augmentation jusqu'à -20°C à 1 Pa	(Glavas-Dodov et al., 2005)
DPPC +/- PS, PG	100	- rapide : azote liquide	-40°C pendant 30h à 10-13 Pa, puis augmentation progressive jusqu'à 20°C avec des paliers à -30°C et -16°C à 1 Pa.	(van Winden and Crommelin, 1999)
DPPC	200	- rapide : azote liquide	NR	(Tsvetkova et al., 1998)
DPPC +/- Chol	100	- rapide : azote liquide	-40°C à 30 mTorr (4 Pa)	(Ohtake et al., 2006)
DPPC +/- DPPG	100	- lente : 0,5 °C/min - rapide : azote liquide	-40°C pendant 30h à 10-13 Pa, puis augmentation progressive jusqu'à 20°C avec des paliers à -30°C et -16°C à 1 Pa.	(van Winden et al., 1997)
DPPC/DPPG +/- Chol	100 à 1000	- rapide : azote liquide	-40°C à 10-13 Pa puis augmentation progressive jusqu'à 4°C avec des paliers à -30°C et -16°C à 1 Pa.	(Zhang et al., 1997)
DPPC/DPPE +/- Chol	150	- rapide : azote liquide	-40°C à 30 mTorr (4 Pa)	(Ohtake et al., 2005)
DOPC	NR	- rapide : -45°C	-35°C pendant 24h puis 25°C (pression non précisée)	(Ugwu et al., 2005)
DDA, TDB	200-400	- lente : 0,70°C/min	-40°C pendant 22h à 0,340 mBar (34 Pa), puis augmentation jusqu'à 20°C à 0,021mBar (2,1 Pa)	(Christensen et al., 2007)
DOTAP	190	- lente : 10°C/h - rapide : azote liquide	-40°C pendant 24h, puis augmentation progressive jusqu'à 20°C avec des paliers à -20°C et 0°C à 5 Pa.	(Aso and Yoshioka, 2005)
PL synthétiques +/- Chol	100	- lente : 0,5 °C/min - rapide : -70°C	-40°C pendant 6h à 0,5 Torr (66 Pa) ; puis augmentation progressive jusqu'à 20°C avec des paliers à -30°C et à -16°C	(Mohammed et al., 2006)
DMPG	NR		-52°C pendant 48h à 0,004mbar (0,4 Pa)	(Sweeney et al., 2005)

Tableau 3: Récapitulatif des paramètres de lyophilisation des liposomes décrits dans la littérature, NR : Non renseigné

1.1.1. Influence de la vitesse de refroidissement sur les structures des lyophilisats de liposomes

Cependant, l'influence de la vitesse de lyophilisation reste encore un sujet assez controversé. Van Winden et al. (van Winden et al., 1997) ont cherché à évaluer l'influence de la vitesse de congélation sur la structure finale du lyophilisat de liposomes de DPPC. Un refroidissement rapide dans l'azote liquide donnait des lyophilisats présentant une structure ordonnée (Figure 5). Pour les lyophilisats obtenus par refroidissement lent (0,5°C/min), les cavités formées étaient désordonnées et plus larges, correspondant aux traces laissées par les gros cristaux de glace après sublimation contrairement à ce qu'on aurait pu prévoir et la surface spécifique était d'autant plus réduite que le refroidissement était lent.

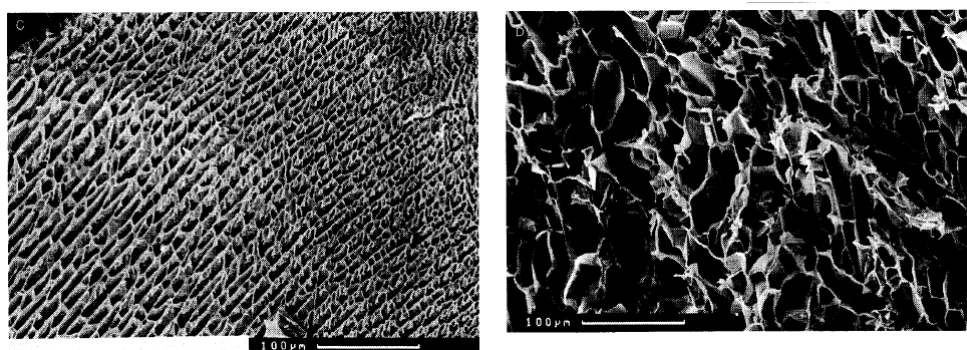


Figure 5: Photographie de lyophilisats de liposomes de DPPC obtenus avec une vitesse de refroidissement soit rapide (à gauche) soit lente (à droite) par Scanning Electron Microscopy (SEM) (van Winden, Zhang et al. 1997).

Un autre paramètre essentiel est à prendre en compte dans la détermination de la vitesse optimale de refroidissement et résulte du fait que les congélations de l'eau extra et intraliposomale ne s'opèrent pas de manière identique. Deux mécanismes opposés sont alors à prendre en considération nécessitant de définir une vitesse intermédiaire ni trop rapide ni trop lente. Lors d'une congélation trop lente, en raison de l'inertie du transfert thermique, l'eau à l'extérieur des liposomes cristallise en premier, la membrane agissant alors comme un « rempart » vis-à-vis de la glace formée. L'eau à l'intérieur du liposome est ainsi protégée et reste encore à l'état de surfusion vers -10°C. Ces phénomènes ont ainsi pour conséquence délétère d'induire une déshydratation (ou « choc ») osmotique des liposomes (Frajeville, 1994). Une congélation rapide semblerait plus appropriée. Néanmoins si celle-ci est trop brusque, on constate la formation de cristaux de glace à l'intérieur du liposome, entraînant des lésions de la paroi.

1.1.2. Influence de la vitesse de refroidissement sur la capacité de rétention

La vitesse de refroidissement sur la capacité de rétention semble agir différemment selon les caractéristiques et la nature des liposomes. Des travaux menés avec des liposomes de DPPC, de 100 nm ont abouti à une meilleure capacité de rétention de la carboxyfluorescéine (CF), lorsque la vitesse de refroidissement était lente (0,5°C/min) (van Winden et al., 1997). En revanche, pour des Small Unilamellar Vesicle (SUV) de DEPC (30 nm), Hays et al. (Hays et al., 2001) ont remarqué une capacité de rétention plus importante du soluté encapsulé pour des vitesses rapides de congélation (20 à 50°C/min). Les auteurs expliquaient qu'une congélation rapide diminuait la durée d'exposition des liposomes à une température proche de la température de transition de phase (T_m) des phospholipides, paramètre dont l'importance sera présentée ultérieurement.

1.1.3. Influence de la vitesse de refroidissement sur les lipides membranaires et les lyoprotecteurs

L'influence de la vitesse de refroidissement semble dépendre du type de lipides entrant dans la structure de la bicouche : en effet l'impact négatif d'une congélation rapide serait plus important pour des liposomes formés avec des lipides rigides tel que DPPC (Torchilin and Weissig, 2002). A l'inverse, les liposomes préparés avec des phosphatidylcholines d'œuf (EPC) y sont moins sensibles. La vitesse de congélation a également une influence sur les lyoprotecteurs. Aso et al. (Aso and Yoshioka, 2005) ont constaté qu'une vitesse lente de refroidissement (-10°C/h jusqu'à -50°C) de liposomes cationiques à base de DOTAP associés à du tréhalose donnait des matrices présentant une faible viscoélasticité, favorable à la stabilité du lyophilisat, à la différence de ceux obtenus à une vitesse rapide.

Dans le cadre de notre travail expérimental, une fois la formulation établie, la température de congélation et la vitesse de refroidissement sont les paramètres clés à définir.

1.2. Sublimation

La sublimation vise à extraire l'eau libre et correspond à une réaction endothermique dont l'apport énergétique est réalisé par les étagères du lyophilisateur. La sublimation permet d'éliminer entre 80 et 90% d'eau sous forme de vapeur d'eau, qui se condense ensuite dans le condenseur ou « piège » de température et tension de vapeur inférieures à celles régnant au sein de l'enceinte. Après congélation, dès que la pression partielle en eau est suffisamment basse, la sublimation des cristaux de glace situés à la surface commence. Au cours de la dessiccation, le front de sublimation s'enfonce progressivement séparant la couche supérieure sèche de la couche encore congelée. Les transferts

thermiques s'effectuent par conduction au sein de la couche sèche. Lors de la sublimation, si le produit congelé n'a pas une structure homogène, la matière sèche située dans la partie haute va créer un obstacle à l'évacuation de la vapeur d'eau. Le gradient de température existant entre le plateau et le front de sublimation, illustré sur la Figure 6, conditionne la vitesse de sublimation. La vitesse dépend également de la différence de température entre l'enceinte du lyophilisateur et le piège (i.e $\sim -60^{\circ}\text{C}$ à -80°C , bien en dessous de celle de l'enceinte).

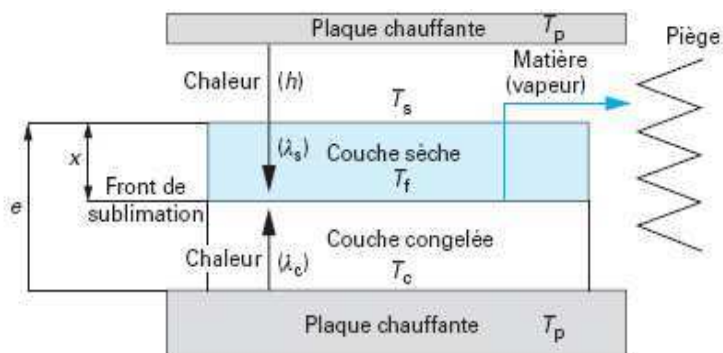


Figure 6: Représentation schématique des couplages de transferts de chaleur et de matière (Marin and René 2000).

Comme nous le verrons par la suite, la température au front de sublimation doit être inférieure de 4°C à la T_g du système final. La pression à appliquer dans l'enceinte, qui conditionne la température au front de sublimation, peut être lue sur la courbe du diagramme température pression (Figure 7). Ce diagramme fixe les conditions expérimentales à appliquer lors du processus de lyophilisation : il est nécessaire de travailler dans des conditions de faibles températures et pressions de vapeur, en dessous du point triple. Il est important de rappeler que tout ajout de soluté déplace les courbes de changement d'état et le point triple, ce qui nécessite d'adapter les paramètres de pression et de température. Néanmoins, si ce point a été étudié avec des solutions simples (Marin and René, 2000), il n'a pas été retrouvé de travaux spécifiques appliqués aux liposomes.

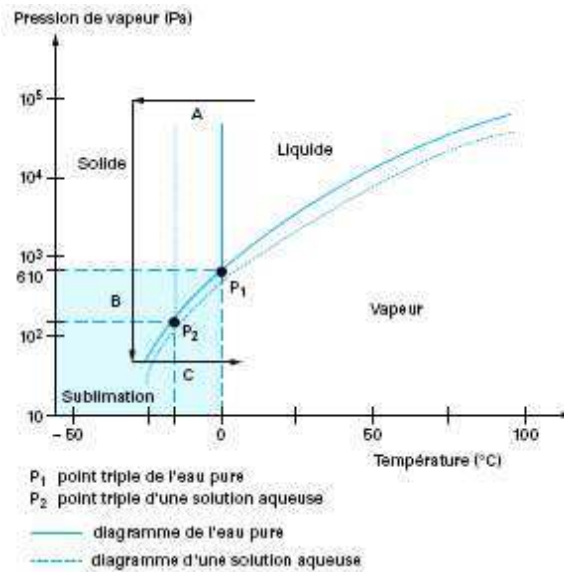


Figure 7: Diagrammes Pression-Température de l'eau pure et d'une solution aqueuse (Marin and René 2000).

Comme cela est noté sur le récapitulatif du Tableau 3, la pression résiduelle ne dépasse généralement pas 66 Pa. Les auteurs précisent rarement les raisons du choix de ce paramétrage. Cette dépression est associée à une température de l'étagère (shelf temperature) paramétrée entre -25°C et -52°C (Figure 8). Néanmoins, cette température doit être de quelques degrés supérieurs à la température du produit en cours de sublimation, afin d'assurer le transfert de chaleur vers le produit. Cette valeur devra être définie en fonction de la Tg du lyoprotecteur utilisé.

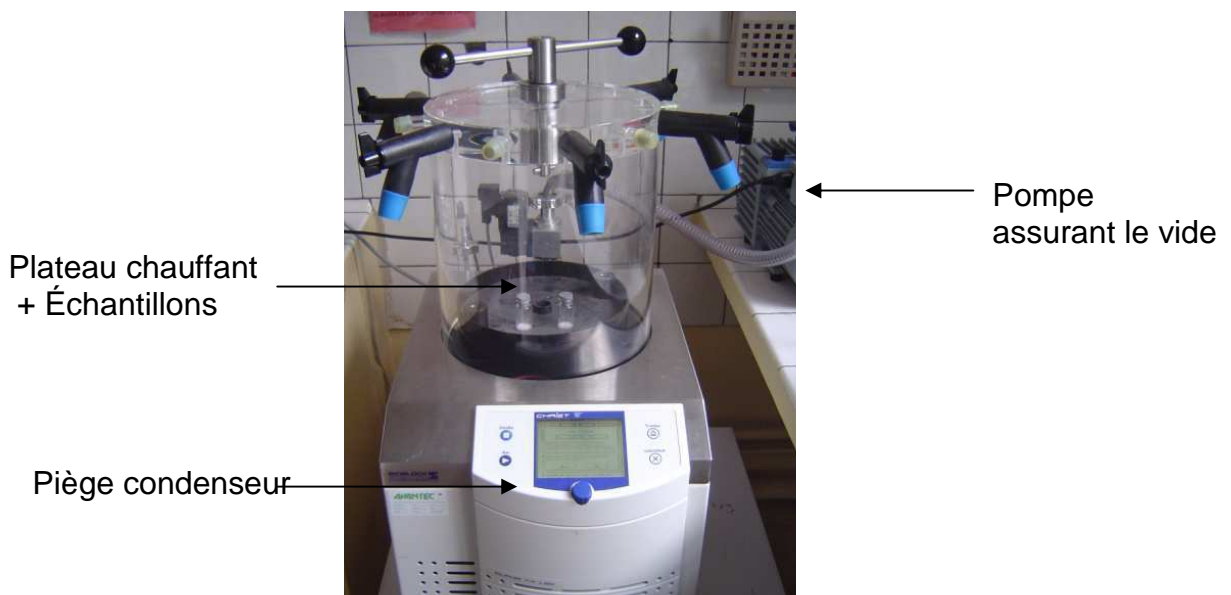


Figure 8: Lyophilisateur Alpha 1-4 Christ

1.3. Dessiccation secondaire

Cette phase vise à éliminer l'eau résiduelle. Lorsque la sublimation est terminée, le gradient de température n'existe plus et la dessiccation du produit est assurée par le vide maintenu dans l'enceinte. La fraction d'eau résiduelle va subir une étape de déshydratation secondaire. Il faut, en effet, beaucoup plus d'énergie pour éliminer l'eau liée car celle-ci est associée par des liaisons plus ou moins fortes de type Van der Waals, London ou liaison hydrogène. La dessiccation secondaire nécessite par conséquent des niveaux de pression plus faible et de température plus élevée, que lors de la sublimation. La dessiccation finale doit être suffisante pour éliminer l'eau interstitielle sans dégradation du produit. En fin de lyophilisation, une faible teneur en eau résiduelle et une porosité élevée expliquent sa très forte hygroscopie et son aptitude à se réhydrater avec de faibles quantités d'eau en l'espace de quelques secondes. Dans la plupart des travaux, la température du plateau est augmentée par paliers successifs sur une durée totale de l'ordre de 24 à 72 heures (Tableau 3). Comme pour la sublimation, cette augmentation progressive est directement liée à la valeur T_g du lyoprotecteur comme cela sera détaillé par la suite. L'analyse du transfert de chaleur et de masse doit être étudiée afin d'optimiser le processus (Nail et al., 2002) (Figure 9).

Dans notre développement expérimental, la détermination des différents paramètres (pression, température) et la durée de chacune des phases de dessiccations primaire et secondaire seront à définir afin d'obtenir un lyophilisat répondant aux spécificités attendues. Il faut également prendre en compte les caractéristiques propres aux liposomes.

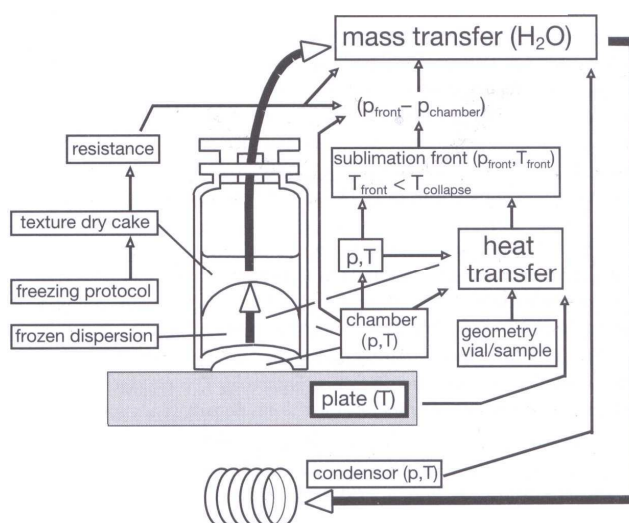


Figure 9: Facteurs influençant le procédé de lyophilisation (Torchilin and Weissig 2002).

2. Paramètres spécifiques aux liposomes

Les caractéristiques du liposome et notamment les propriétés de la membrane impliquent certaines conditions à respecter si on désire l'obtention d'un lyophilisat répondant à nos spécifications.

2.1. Nature des lipides

Nous avons vu précédemment qu'une vitesse de congélation rapide altère beaucoup plus les membranes composées de lipides hydrogénés, tels les DPPC ou les HSPC alors que les liposomes moins rigides sont moins sensibles à cette vitesse.

Chaque phospholipide est caractérisé par une température de transition de phase, qui conditionne son comportement lors de la lyophilisation. Cette température dépend de la nature des chaînes hydrocarbonées (longueur et degré d'insaturation), de la nature de la tête polaire du phospholipide mais également de la quantité d'eau associée, paramètre dont la teneur va être modifiée lors de la lyophilisation.

On distingue trois états : l'état cristallin, l'état gel ordonné et l'état liquide cristallin désordonné en fonction de la température et du degré d'hydratation. Des lipides hydratés à faible température s'organisent en un réseau cristallin. Quand on augmente la température jusqu'à la température de sous transition (30°C en dessous de la T_m), les lipides passent à l'état gel, état plus expansé et l'eau pénètre à l'intérieur des bicouches. A l'état gel, les chaînes hydrocarbonées sont très serrées empêchant la fuite du principe actif encapsulé (Torchilin and Weissig, 2002, Gregoriadis, 1993, Lee et al., 2002). Une augmentation de la température favorise les répulsions entre chaînes hydrocarbonées et à partir de la T_m , les lipides passent de l'état gel à l'état liquide cristallin. Les lipides sont alors dans un état fluide plus perméable, favorisant la fuite des solutés encapsulés. Ces transitions sont visibles sur les thermogrammes obtenus en Differential Scanning Calorimetry (DSC) (Figure 10).

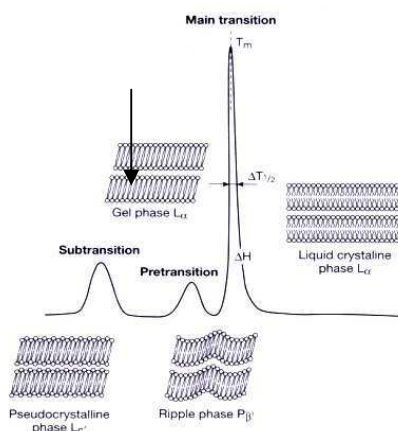


Figure 10: Thermogramme d'un phospholipide obtenu en DSC (Gregoriadis, 1993), la flèche indique le sens endothermique

A l'état hydraté, les liposomes possèdent un T_m plus bas que sous forme non hydratée. Ainsi lors de la lyophilisation des liposomes, la T_m augmente. En effet, l'eau liée aux têtes polaires des phospholipides est éliminée ce qui facilite le rapprochement des chaînes d'acides gras et donc l'augmentation des interactions hydrophobes entre les chaînes hydrocarbonées. Il faut donc apporter plus d'énergie au système pour les dissocier.

Lors de la réhydratation du système, la température constitue un facteur clé. Si cette température est au dessus de la T_m des liposomes hydratés et en dessous de la T_m des liposomes déshydratés, une transition de phase se produit lors de la réhydratation. Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite du contenu intraliposomal. Le changement de phase lors de la réhydratation du système est un élément fondamental à éviter (Ohtake et al., 2006).

2.2. Caractéristiques du liposome

Une revue de la littérature a montré que des liposomes de taille intermédiaire, comprise entre 100 et 200 nm permettaient une meilleure rétention du soluté encapsulé (Gregoriadis, 1993, Crowe and Crowe, 1988, Harrigan et al., 1990, van Winden, 2003). Par ailleurs il a été constaté, lors du processus de lyophilisation, une augmentation de la taille des liposomes par expansion des phospholipides dans la bicouche. L'ajout de lyoprotecteur permet de pallier cette augmentation (Stevens and Lee, 2003). La charge a également une influence sur la stabilité du liposome et posséderait une action préventive bénéfique lors de la lyophilisation. Cependant le choix de la charge reste assez discuté dans la littérature (Nakamori et al., 1993). Les liposomes chargés présentent l'avantage de moins fusionner grâce aux répulsions électrostatiques. La charge négative apparaît souvent comme étant plus favorable à la stabilité du liposome (Crowe and Crowe, 1988). Cependant ce choix reste assez discuté. En effet pour des liposomes d'EPC, l'ajout de PG, chargé négativement, diminue la rétention d'un soluté encapsulé hydrophile tandis que l'ajout de PS l'augmente. La plupart des publications font appel à des liposomes neutres.

Dans le cadre de notre projet, il conviendra de suivre attentivement l'évolution de ces deux paramètres (i.e. taille et potentiel zêta).

3. Optimisation de la formulation des lyophilisats

Si la lyophilisation est un moyen *in fine* de stabiliser les liposomes en les conservant à l'état sec, ce processus est en lui-même délétère pour leur structure. En particulier, la congélation génère des transitions de phase et des chocs osmotiques. En outre, la perte d'eau lors de la dessiccation induit une perte d'intégrité de la membrane par phénomène de rupture de la bicouche, fusion et

agrégation. Ces mécanismes aboutissent à la perte du soluté encapsulé car la stabilité de la bicouche est principalement conditionnée par les interactions de type liaison hydrogène entre l'eau et les têtes polaires. La stabilisation au cours du procédé de lyophilisation est principalement menée à bien en intégrant dans la formule un protecteur de lyophilisation appelé agent lyoprotecteur. Toutefois, d'autres composés peuvent s'avérer utiles comme les agents texturants.

3.1. Rôle et intérêt des lyoprotecteurs

3.1.1. Caractéristiques des lyoprotecteurs

Afin de mieux comprendre l'action du lyoprotecteur, il convient de rappeler que la fuite du contenu intraliposomal résulte de deux mécanismes essentiels : d'une part, la fusion des liposomes directement liée au stress de la lyophilisation et d'autre part, une modification de la perméabilité de la bicouche lipidique en relation avec un changement de phase des lipides. Pour Crowe et al. (Crowe et al., 1997), la maîtrise de ces deux phénomènes est indispensable pour stabiliser les liposomes et empêcher toute fuite de solutés.

3.1.1.1. Action des agents lyoprotecteurs sur la prévention de la fusion au cours de la lyophilisation

Cette action est reliée au phénomène de vitrification. Quand les cristaux grossissent au cours de la congélation, ils génèrent un encombrement stérique défavorable et peuvent entraîner des dommages aux substances que l'on cherche à congeler (Tsvetkova et al., 1998, Crowe et al., 1994). Les liposomes risquent de perdre leur intégrité sous la pression exercée par la croissance cristalline qui s'effectue à leur contact. L'ajout d'un lyoprotecteur pallie ce problème en créant une interface entre le système à congeler et l'eau. Ce phénomène dépend directement de la T_g , qui caractérise le passage d'un corps d'un état liquide viscoélastique à un état vitreux ou solide amorphe. La T_g est principalement déterminée par DSC. Pour que le lyoprotecteur soit efficace, celui-ci doit être à l'état vitreux. En effet, le lyoprotecteur passe à l'état vitreux avant que l'eau ne commence à cristalliser et protège le liposome en amortissant la croissance cristalline. A l'inverse, au-delà de la T_g , le lyoprotecteur perd sa structure vitreuse et les liposomes ne sont plus isolés dans la matrice. Il a été constaté que la fuite des solutés encapsulés suivait une cinétique de type Arrhénius au-delà de la T_g (Sun et al., 1996). La Figure 11 illustre la variation de la T_g , en fonction de la teneur en eau du système qui évolue constamment durant le processus en cours de la lyophilisation. La T_g' est la température de transition vitreuse observée au maximum de concentration en matières sèches C_g' .

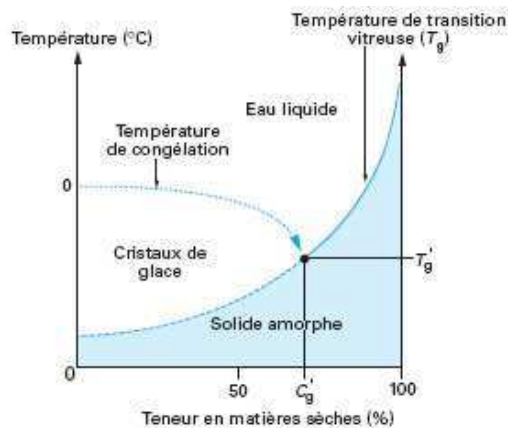


Figure 11: Diagramme de phase eau/lyoprotecteur (Marin and René 2000)

Ainsi, lors de la lyophilisation, la teneur en eau diminue et la T_g du système augmente, l'eau agissant comme un plastifiant (Angell, 2002). Le maintien de la température du produit en dessous de la T_g du système est essentiel pour éviter l'effondrement de la structure tout au long des dessiccations primaire et secondaire. Pour atteindre cet objectif, la température de sublimation lors de la dessiccation primaire doit être inférieure à T_g d'environ 4-5°C d'après la plupart des auteurs (Torchilin and Weissig, 2002, van Winden, 2003). Au cours des différentes phases de la dessiccation secondaire, le réchauffement du plateau doit le plus lent possible afin de maintenir la température du produit toujours largement en dessous de la T_g (Rambhatla et al., 2005). Au cours de la conservation, ce paramètre est également important car il conditionne la stabilité du lyophilisat (température de conservation inférieure de 20 à 30°C à la T_g du système final (van Winden, 2003)). Une forte humidité résiduelle liée à une T_g plus faible favorise une instabilité du lyophilisat (te Booy et al., 1992).

3.1.1.2. Action des agents lyoprotecteurs sur la prévention du changement de phase lors de la lyophilisation et de la reconstitution

Les agents lyoprotecteurs favorisent le maintien des lipides dans la même phase (gel ou cristalline liquide) au cours du processus de lyophilisation ou lors de la reconstitution. La nécessité d'un agent protecteur dépend de la valeur de T_m des phospholipides employés. Comme nous l'avons préalablement décrit, au cours de la lyophilisation, la perte en eau est associée à une augmentation de la T_m. Lors de la lyophilisation, les lyoprotecteurs se substituent aux molécules d'eau et interagissent avec les têtes polaires des phospholipides. Ils contribuent ainsi à maintenir la membrane de phospholipides dans la même phase, aussi bien au moment de la déshydratation que lors de la remise en suspension des liposomes lyophilisés.

3.1.2. Critère de choix de l'agent lyoprotecteur

Plusieurs paramètres orientent le choix d'un lyoprotecteur adapté à la problématique des liposomes. Les lyoprotecteurs, molécules de petite taille (Crowe et al., 1985, Ohtake et al., 2006), sont essentiellement des sucres : mono, di ou oligosaccharides. Il convient, principalement, de sélectionner un excipient amorphe présentant une Tg élevée (Lueckel et al., 1998b). Le Tableau 4 regroupe les différents sucres possédant une action lyoprotectrice sur les liposomes. L'effondrement de structure se produit quand on chauffe le produit au-delà de la température de collapse, qui est supérieure de quelques degrés à la Tg (Rambhatla et al., 2005).

Les sucres les plus efficaces sont les disaccharides (Figure 12) mais le tréhalose correspond au lyoprotecteur le plus usité car associé aux meilleurs taux d'encapsulation (Gregoriadis, 1993). Certains auteurs ont remarqué que le saccharose est aussi efficace mais une quantité supérieure est nécessaire pour une même efficacité (Crowe and Crowe, 1988, Gregoriadis, 1993). Les monosaccharides présentent l'inconvénient ne pas pouvoir interagir suffisamment en raison de leur petite taille. D'autres substances comme le mannitol ont été testées mais elles ne sont pas suffisamment efficaces lors de la lyophilisation des liposomes. Ainsi, le mannitol se place au cœur des liposomes et il n'interagit donc pas avec les têtes polaires des phospholipides (Wang et al., 2006b).

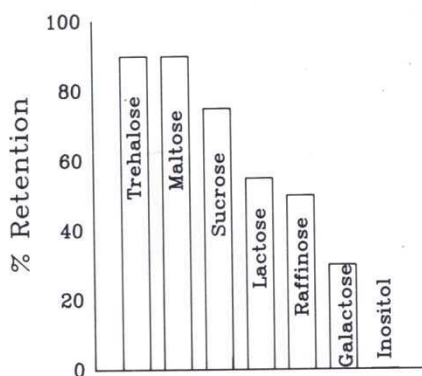


Figure 12 : Effet de différents sucres sur la rétention de l'isocitrate dans des liposomes de POPC/PS en présence d'1 g de sucre par g de lipide

Type	Avantages	Inconvénients	Auteurs
Glucose	Effet protecteur sur DPPC Diminue la Tm	- Faible effet sur les DOPC et EPC - Molécule trop petite pour faire des interactions - Pas d'effet par vitrification	(Suzuki et al., 1996, Crowe et al., 1997, Tsvetkova et al., 1998)

Sorbitol		Molécule trop petite pour faire des interactions	(Torchilin and Weissig, 2002)
Tréhalose	Tg élevée ; grande efficacité	Coût élevé	(Ohtake et al., 2004a, Ohtake et al., 2006)
Saccharose	Efficacité proche du tréhalose mais à des ratios sucrose/lipides plus élevés	Diminution de la Tm et inhibition de la fusion à de faible ratio non suffisante	(Ohtake et al., 2006, Yang et al., 2007, Cacula and Hinch, 2006)
Raffinose et oligosaccharides	Augmentation de la Tg et de la protection avec le degré de polymérisation		(Hinch et al., 2003)
Maltose et Maltodextrine	Effet protecteur sur DPPC à de faible ratio sucre/lipide	Peu d'effet sur les EPC	(Suzuki et al., 1996)
Glycanes et Fructanes	Effet protecteur fonction du degré de polymérisation	Moins forte diminution des Tm par les glycanes	(Hinch et al., 2002)
Hydroxy Ethyl Amidon	Tg élevée	- Ne diminue pas la Tm - N'interagit pas avec la membrane	(Tsvetkova et al., 1998)

Tableau 4: Caractéristiques des lyoprotecteurs NR : Non renseigné

Le tréhalose agit par l'intermédiaire de trois mécanismes concourant à la stabilisation des liposomes au cours de la lyophilisation:

- Tg élevée (-30°C) qui lui confère une grande efficacité et lui permet d'éviter la fusion des liposomes (Crowe and Crowe, 1988).
- Diminution maximale de la Tm quand la membrane est à l'état liquide cristallin. En outre, il a été noté que l'état fluide de la membrane donne une meilleure accessibilité pour le tréhalose aux têtes polaires des phospholipides, lui permettant ainsi d'interagir davantage avec la membrane (Ohtake et al., 2006).
- Absence de liaison intramoléculaire au sein de sa structure, ce qui favorise de nombreuses interactions avec les autres molécules (Lelong, 2007).

D'après Crowe et al., la stabilité des liposomes ne dépend pas de la concentration en lyoprotecteur mais plutôt du ratio lyoprotecteur/lipide (lyop/lip). Des expériences de dilution au 100^{ème} avec un ratio tréhalose/lipide constant n'ont pas montré de différence de capacité à retenir la CF par rapport

aux suspensions non diluées. Une augmentation du ratio sucre/lipides favorise une élévation de la Tg du système (Ugwu et al., 2005). Cependant, une diminution du taux d'encapsulation de la substance peut survenir pour des ratios élevés (Mugabe et al., 2006). Pour le tréhalose, le ratio optimal généralement admis est d'environ deux grammes de tréhalose par gramme de phospholipides (Crowe et al., 1985).

A côté des sucres, très peu d'essais ont été menés, par exemple, avec des acides aminés comme lyoprotecteurs (Mohammed et al., 2007, Lueckel et al., 1998a). Les acides aminés n'interagissent pas par des liaisons hydrogènes mais ils stabilisent les lyophilisats par des interactions électrostatiques. Néanmoins, des travaux menés sur des liposomes avec la lysine utilisée comme lyoprotecteur présentent des résultats similaires à ceux obtenus avec le tréhalose, avec l'avantage d'avoir une molécule différente d'un sucre. Il faut également prendre en compte le fait que les acides aminés présentent généralement une transition vitreuse basse.

3.1.3. Facteurs modifiant l'action des agents lyoprotecteurs

La localisation de l'agent lyoprotecteur est un élément essentiel à prendre en considération. Lors d'un ajout de tréhalose à des liposomes préformés, celui-ci se répartit de part et d'autre de la membrane avec une encapsulation du tréhalose de l'ordre de 10% (Gregoriadis, 1993). La présence d'un lyoprotecteur d'un seul côté de la membrane n'est pas suffisante et sa distribution de part et d'autre de la membrane semble nécessaire. Cependant cette répartition est un sujet controversé : Crowe et al. (Crowe et al., 1985) ont remarqué qu'une grande quantité à l'intérieur des liposomes en tréhalose n'était pas forcément nécessaire. A l'inverse pour d'autres auteurs, une plus forte concentration en tréhalose à l'intérieur du liposome par rapport au compartiment extérieur semblerait associée à une diminution de la Tm plus importante comparée aux autres répartitions étudiées (Ohtake et al., 2006).

De manière générale, les éléments contenus dans la solution liposomale à congeler peuvent modifier la Tg du système. S'il a été montré que les liposomes ne modifiaient pas significativement la Tg, il n'en est pas de même pour les petites molécules comme le chlorure de sodium, qui la diminue (van Winden, 2003). L'introduction de ce type d'électrolytes doit être limitée par conséquent. D'autres ions présentent en revanche présentent une action synergique avec les lyoprotecteurs, comme cela a été décrit avec les ions phosphates, ceci s'expliquant par une augmentation de la Tg (Ohtake et al., 2004a, Ohtake et al., 2004b, Wolkers et al., 2004). Les interactions sucres-phosphate peuvent être visualisées par Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) : augmentation de l'interaction entre les hydrogènes des sucres et le groupement phosphate. L'effet du phosphate sur les complexes

sucres – phosphates est sensible aux variations de pH. Cependant, selon Wolkers et al. (Wolkers et al., 2004), si l'ajout d'ions phosphates augmente la capacité de rétention du soluté encapsulé lors de l'étape de lyophilisation, celui-ci présenterait un effet néfaste sur la conservation des liposomes.

Le principal facteur modifiant l'action des agents lyoprotecteurs correspond à la composition lipidique. Par exemple, l'efficacité du tréhalose dépend du type de lipides. Ce disaccharide est plus efficace sur les liposomes à base de DPPC que sur ceux de DPPE (Ohtake et al., 2005). L'abaissement de la T_m de liposomes à base de DPPE est moins prononcé parce que ce type de phospholipides privilégie les interactions intramoléculaires à celles avec le tréhalose. Selon certains auteurs, l'ajout d'agent lyoprotecteur n'est pas toujours indispensable pour des PC synthétiques rigides type DSPC (T_m d'environ 55 à 58°C) (avec ou sans Chol) à l'inverse des liposomes à base de PC ou de PC/PG/Chol (Ntinenou et al., 2006, Torchilin and Weissig, 2002).

Le Chol joue également un rôle significatif. De façon générale, il fluidifie les phospholipides en phase gel et les condense en phase fluide : on a donc un continuum dans l'organisation des lipides, il n'y a plus de transition « franche ». Vis-à-vis des liposomes déshydratés, le Chol abaisse la T_m généralement mais cette diminution par ajout croissant de Chol n'est plus significative en présence de tréhalose. Il apporte également de la stabilité par son action antioxydante (Ohtake et al., 2006, Parasassi et al., 1995).

3.2. Rôle et intérêt d'un agent texturant

Les agents de ballastre (bulking agent) ou agents texturants comme le mannitol permettent de donner du volume et une consistance bien définie au lyophilisat. Toutefois, la littérature mentionne rarement l'utilisation d'agent de ballastre pour la lyophilisation des liposomes. La préparation doit contenir au minimum 2% et au maximum 30 % d'éléments solides, qui constitueront ensuite le support du lyophilisat après le séchage (« cake »). Cependant, ces substances sont souvent de nature cristalline (Lueckel et al., 1998a, Cavatur et al., 2002, Pyne et al., 2002), comme le mannitol qui cristallise pour des vitesses de congélation élevées.

3.3. Conditions de conservation des lyophilisats

Après la dessiccation secondaire à faible pression, un gaz est réintroduit (van Winden and Crommelin, 1999, Sun et al., 1996, Crowe and Crowe, 1988). En général pour la lyophilisation des liposomes, l'azote (voire l'argon) est le gaz le plus utilisé (van Winden, 2003). Un sertissage sous vide est également envisageable afin d'éviter les réactions d'oxydation, en particulier des phospholipides.

En raison de l'hygroscopicité importante du lyophilisat, une atmosphère humide doit être évitée, la présence d'eau favorisant une diminution de la T_g.

4. Essais et contrôles

Outre la vérification du respect des paramètres du cycle de lyophilisation, des essais sont menés sur le produit fini avant et après réhydratation par de l'eau ou une solution tampon. Ces différents contrôles pourront être mis en place lors de notre phase de mise au point, mais également en routine afin de valider nos lots de fabrication.

4.1. Essais réalisés sur le lyophilisat

4.1.1. Differential Scanning Calorimetry

La DSC mesure les températures et les énergies associées à des événements thermiques du composé analysé (fusion, cristallisation, transition). La DSC étudie les T_m des phospholipides et les T_g des lyoprotecteurs (Kett et al., 2005). Elle compare les thermogrammes avant et après lyophilisation mais aussi vérifie la réduction de l'augmentation de la T_m des phospholipides par ajout de tréhalose ou de Chol (Christensen et al., 2007, Ohtake et al., 2005, Ohtake et al., 2006, Suzuki et al., 1996, Tsvetkova et al., 1998, Ugwu et al., 2005, van Winden et al., 1997, van Winden et al., 1998) (Figure 13).

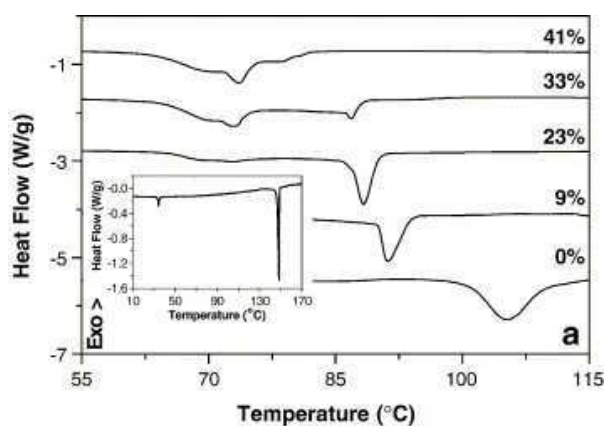


Figure 13: Thermogrammes de liposomes lyophilisés de DPPC obtenus avec des ratios différents de Chol (ratio molaire), encadré : thermogramme du Chol seul (Ohtake, Schebor et al. 2005)

Une augmentation rapide de la température (5 à 10°C/min) lors du scan permet d'obtenir une meilleure reproductibilité et sensibilité des résultats (Torchilin and Weissig, 2002). Il existe également des techniques comme la Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry (MTDSC) et la High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry (HSDSC) (van Winden et al., 1998).

Cette dernière décèle de faibles changements dans la ligne de base mais nécessite une augmentation de la température plus lente (1 à 2°C/min). Cette technique est utilisée pour les faibles transitions, sur lesquelles la vitesse de refroidissement a peu d'influence.

4.1.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou FTIR

La FTIR peut éventuellement apporter une information complémentaire. Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par la substance analysée. Elle détecte les vibrations caractéristiques de certaines liaisons chimiques afin d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. La FTIR détecte les températures de transition des lipides et visualise l'abaissement de la T_m par l'ajout de lyoprotecteur (Hincha et al., 2003, Ohtake et al., 2004a, Tsvetkova et al., 1998, van Winden et al., 1997). Elle étudie la diminution de la fréquence de vibration spécifique 1240 cm^{-1} du groupement phosphate des phospholipides lors de l'ajout d'un lyoprotecteur, s'expliquant par l'interaction qui s'opère entre les sucres et les têtes polaires des phospholipides.

La FTIR apporte des informations complémentaires à la DSC. Il en est de même pour la RMN et les diffractions aux rayons X, qui permettent d'étudier l'architecture moléculaire des lyophilisats.

4.1.3. Mesure de la teneur en eau résiduelle du lyophilisat

Une humidité résiduelle faible, de préférence inférieure à 1% favorise une T_g élevée du lyophilisat, lui conférant une plus grande stabilité (van Winden, 2003). Elle assure une forte hygroscopie facilitant la reconstitution du lyophilisat. La méthode de Karl Fischer est basée sur une réaction chimique d'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode dans une solution de méthanol ou de pyridine, la réaction nécessitant la présence d'eau. Le titrage peut être réalisé par volumétrie (volume de burette contenant la solution iodée) ou par coulométrie : l'iode participant à la réaction est généré directement dans la cellule de titrage par une oxydation électrochimique de l'iodure jusqu'à ce que de l'iode non réactif soit détecté. Cette technique dose précisément l'eau résiduelle dans le lyophilisat, qui est de l'ordre de 0,005 à 0,02 g d'eau par gramme de matière sèche (soit 0,5 à 2%).

D'autres méthodes permettent une évaluation simplifiée de l'eau résiduelle comme la mesure de la perte à la dessiccation ou méthode gravimétrique (Wolkers et al., 2004). Le lyophilisat est pesé avant et après séjour à l'étuve entre 103 +/- 2°C. On ne mesure pas la même grandeur que précédemment. En effet, lors de l'utilisation de la méthode gravimétrique, les substances volatiles peuvent être entraînées, ce qui fausse la valeur mesurée.

4.1.4. Porosité du lyophilisat

La porosimétrie par intrusion de mercure apprécie la porosité du lyophilisat et sa surface spécifique, qui conditionnent l'aptitude du lyophilisat à se réhydrater pour de faible quantité d'eau. Le mercure, liquide non mouillant, remplit les cavités du lyophilisat sous l'effet de la pression qu'on lui applique. On mesure le volume du mercure introduit, proportionnel au volume des pores du lyophilisat. L'adsorption gazeuse par la technique de BET (Brunauer, Emmeth, Teller) est une méthode alternative qui évalue la surface spécifique du lyophilisat (Rambhatla et al., 2005).

4.2. Essais réalisés après reconstitution

4.2.1. Taille et Potentiel zêta

Comme cela a été précisé au début de ce mémoire, la taille et le potentiel zêta de nos formulations liposomales étaient sujets à modification au cours du temps et correspondent par conséquent à deux caractéristiques clés à étudier. Une comparaison de la taille et du potentiel zêta des liposomes avant et après lyophilisation permet d'apprécier l'efficacité du lyoprotecteur et du procédé de fabrication. La mesure de la taille des liposomes sera effectuée à l'aide d'un Nanosizer[®], dont le principe de mesure est basé sur la diffusion de la lumière par les particules de taille inférieure au μm , comme les liposomes. La mesure du potentiel zêta reflète la charge des liposomes. La mesure du potentiel se fait par l'étude de la mobilité électrophorétique des liposomes à l'aide d'un même appareil.

4.2.2. Evaluation de la dégradation des lipides

Les lipides peuvent subir des réactions d'hydrolyse et d'oxydation au cours du stockage, d'où la nécessité de conserver les liposomes dans une atmosphère inerte, dépourvue d'humidité et à l'abri de la lumière et de la chaleur. Après la lyophilisation des liposomes, il est intéressant d'évaluer la dégradation des phospholipides et de doser les acides gras formés par chromatographie gazeuse. Diverses méthodes, afin d'explorer l'oxydation, sont également envisageables : absorbance en UV pour la détermination des conjugués diènes et triènes, détermination des endoperoxydes par l'acide thiobarbiturique (Torchilin and Weissig, 2002).

4.2.3. Stabilité de l'agent encapsulé

La stabilité de l'agent encapsulé est réalisée en particulier pour les molécules sensibles comme dans le cas de notre projet expérimental, l'ATP facilement hydrolysable en ADP. Ce dosage peut se réaliser

soit par chromatographie liquide soit par bioluminescence (méthode luciférine-luciférase) (Tep, 2007).

4.2.4. Dosage du soluté encapsulé

Une comparaison des taux d'encapsulation avant et après lyophilisation mesure l'impact de la fuite au cours de cette opération. En effet, le processus de lyophilisation, par des chocs osmotiques, altère la structure des liposomes et peut favoriser la fuite du soluté. Celle-ci peut également avoir lieu lors de la réhydratation du lyophilisat. Ce dosage fait appel à des méthodes de dialyse à l'équilibre, d'ultrafiltration, d'ultracentrifugation ou de chromatographie sur gel.

Conclusion concernant les travaux antérieurs sur la lyophilisation des liposomes

L'amélioration de la stabilité apparaît comme un enjeu essentiel dans le cadre du développement des liposomes d'ATP, afin d'envisager leur utilisation future pour la conservation des greffons hépatiques mais aussi à court terme pour faciliter les études sur les cultures cellulaires qui nécessitent jusqu'à présent une préparation extemporanée. La lyophilisation offre des perspectives intéressantes pour améliorer la stabilité des liposomes à moyen et long termes mais nécessite une maîtrise de nombreux paramètres liés au process et à la formulation.

Cette revue de la littérature définit les étapes principales qui ont servi de support à notre plan expérimental. Une de ces étapes essentielles consiste à sélectionner l'agent lyoprotecteur approprié et à définir sa concentration. Nos critères d'évaluation visent *in fine* à l'obtention d'un lyophilisat, qui, une fois rapidement reconstitué, ne présente pas de différence significative par rapport à la préparation initiale en termes de taille, potentiel zêta et de taux en ATP total et encapsulé.

**TRAVAUX ANTERIEURS (ii): MODELE
CELLULAIRE HEPATIQUE ET ETUDE DE
L'INTERACTION AVEC LES LIPOSOMES**

Cette partie bibliographique a pour objectif de préciser les différentes cultures cellulaires hépatocytaires existant. Celles-ci seront décrites vis-à-vis de leur mode d'obtention et de mise en culture, leurs caractéristiques et leur intérêt potentiel pour l'étude de liposomes vectorisés. Enfin, les cultures cellulaires seront comparées à des techniques plus conventionnelles comme celle du foie isolé perfusé.

De nombreux modèles cellulaires existent actuellement. Les cultures cellulaires de tissus, de cellules fraîchement isolées ou encore de lignées cellulaires établies, se distinguent des organes isolés *ex vivo* tel que le modèle de foie isolé et perfusé. Ces techniques sont principalement utilisées pour étudier l'hépatotoxicité des xénobiotiques.

1. Généralités sur les modèles cellulaires hépatiques

Deux sources de cellules sont possibles: les cellules isolées dans les liquides biologiques comme le sang et les cellules d'organes qu'il s'agit de séparer les unes des autres. Dans le cas des cellules circulantes, leur différence de densité permet l'utilisation d'un gradient de Ficoll avec centrifugation afin de les séparer. Dans le cas des cellules obtenues à partir d'organe ou de tissus, la culture sera réalisée à partir d'un fragment d'un organe. Un fragment de tissu peut être utilisé et les cellules se développent alors à partir du fragment à la surface du support baignant dans le milieu de culture. Lorsqu'il s'agit de la fragmentation de l'organe, le tissu est dissocié mécaniquement et enzymatiquement afin d'obtenir une suspension de cellules qui peut être purifiée. Les cellules sont mises en cultures (culture primaire) et peuvent ensuite être repiquées (culture secondaire) (Figure 14).

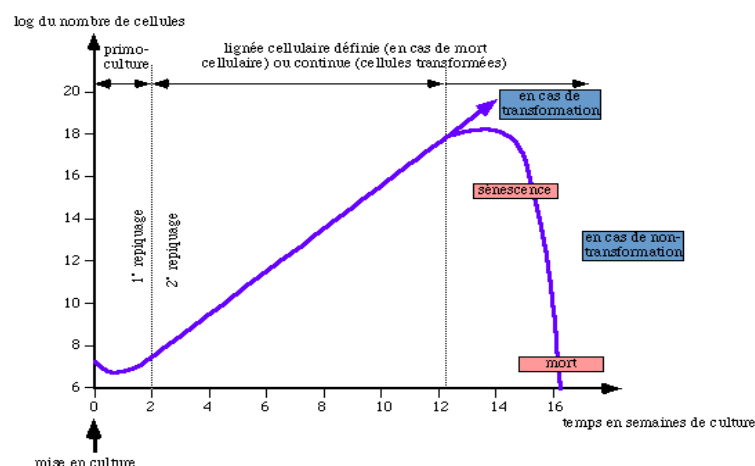


Figure 14 - Cycle de croissance d'une lignée cellulaire en culture *in vitro*

2. Cultures d'hépatocytes primaires *in vitro*

Les hépatocytes représentent 70% de la population cellulaire hépatique. La méthode d'isolement d'hépatocytes adultes par perfusion *in situ* d'une solution de collagénase a été appliquée à diverses espèces, y compris l'homme, et conduit à l'obtention de quantités importantes de cellules avec une excellente viabilité.

1.1. Méthode d'obtention des hépatocytes

Berry et al. (Berry and Friend, 1969) ont défini le protocole de base qui a tout d'abord servi pour les foies de rat. Cette méthode a ensuite été améliorée par Seglen (Seglen, 1979). La méthode consiste en une perfusion en deux étapes du foie *in situ* : le foie est d'abord perfusé par un tampon sans calcium à un débit beaucoup plus important que le débit sanguin afin de fragiliser les jonctions intercellulaires puis par une solution tamponnée de collagénase supplémentée en calcium, celui-ci permettant d'assurer l'activation de la collagénase pour digérer la matrice extracellulaire. Le tampon le plus fréquemment utilisé est l'HEPES. Les différents types cellulaires hépatocytaires (küpffer, hépatocytes et cellules endothéliales) sont ensuite isolés par leur différence de densité par centrifugation. Les organes peuvent être conservés au frais pendant plusieurs heures sans perte de viabilité. 40 à 60.10⁶ hépatocytes par gramme de tissu peuvent être recueillis grâce à cette méthode et la viabilité des cellules par le test au bleu tryptan est estimée entre 85 et 90%. Les cultures contiennent moins de 5 % de cellules non parenchymateuses.

Plusieurs facteurs déterminent la qualité de la perfusion (Desangle, 1992) :

- le pH des solutions, qui doit rester supérieur ou égal à 7,4 ;
- la température du perfusé au sortir du foie, qui doit être impérativement de 37°C ;
- le débit, qui doit être vérifié systématiquement ;
- l'oxygénation.

Par ailleurs, des hépatocytes de diverses espèces (porcins, lapins et chiens) ont été isolés avec le même protocole. Il a ensuite été adapté au foie humain soit à une portion du foie entier, soit à des biopsies.

Les fonctions des hépatocytes sont très variables d'une espèce à une autre. Des différences apparaissent entre autre au niveau de la distribution des enzymes (cytochrome P450), de la synthèse des triacylglycérols ou de la régulation du Chol.

La proportion d'hépatocytes au niveau du foie est plus importante chez l'homme (80 %, (Gates et al., 1961)) que chez le rat (60 %, (Daoust, 1958)). Ces cellules sont de taille plus importante chez l'homme par rapport au rat ou au chien (Rohr et al., 1976). Enfin, les hépatocytes humains sont fonctionnellement plus stables que les hépatocytes de rongeurs en culture primaire conventionnelle. Cependant, les sources d'hépatocytes humains restent limitées.

1.2. Culture des hépatocytes

Les hépatocytes ont une durée de vie différente selon les types de culture. Il est donc indispensable de leur apporter les nutriments nécessaires à leur survie.

1.2.1. Différents types de cultures

Culture en suspension

Les hépatocytes isolés sont mis en suspension dans une solution saline simple oxygénée. Ce type de culture est en général utilisé pour des études biochimiques ou pharmacologiques et permet des études de courte durée.

Culture standard

Celle-ci correspond à la culture monocouche sur plastique dans un milieu de culture simple, généralement supplémenté selon le but étudié. Les cellules sont laissées quelques heures en culture avant utilisation afin de leur permettre une récupération fonctionnelle après isolement. Cette méthode est largement utilisée pour des études sur le métabolisme, en pharmacologie ou en toxicologie. Cependant, avec cette technique, les hépatocytes ont une viabilité de 5 à 10 jours au delà desquels apparaît une dédifférenciation des cellules ainsi qu'une diminution progressive de la synthèse protéique.

Culture tridimensionnelle

Les techniques de culture cellulaire en trois dimensions restituent la structure tridimensionnelle physiologique des cellules ainsi que leurs rapports réciproques. Les « gap-junctions », indispensables à la communication intercellulaire sont ainsi conservés. Ainsi, les cellules maintiennent plus efficacement les synthèses protéiques et de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (Calne et al., 1972). La croissance des hépatocytes sur des surfaces à base de collagène améliore leur survie. La technique du « sandwich de collagène » augmente la durée de vie et la fonctionnalité des cultures d'hépatocytes de rat (Nail et al., 2002). Cette méthode permet de se dispenser des facteurs de croissance et améliore la viabilité des cellules qui gardent leur fonctionnalité entre 3 et 6 semaines. D'autres supports favorisent le maintien de la différenciation des cellules tel que le Matrigel®.

membrane de gel à base de laminine, ou le chitosan, polymère biocompatible dérivé de la désacylation de la chitine.

1.2.2. Milieux de cultures

Des milieux standards ont été élaborés pour les cultures cellulaires : Eagle's Basal Medium (Eagle, 1955), Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (Eagle, 1959), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) entre autres. Ces milieux définis enrichis en facteurs divers tels que des hormones et facteurs de croissance aboutissent à l'obtention de cellules dans un état métabolique plus proche de l'*in vivo* (Tableau 5). Ces suppléments sont nécessaires afin d'accroître la survie cellulaire et le maintien des fonctions spécifiques. Ces milieux de culture ne permettent cependant qu'un maintien transitoire de certaines fonctions différenciées. Le milieu spécifique pour hépatocytes normaux développé par Enat et al. assure une croissance sélective des cellules parenchymateuses aboutissant à des cultures contenant 95% d'hépatocytes (Gatmaitan et al., 1983, Enat et al., 1984).

1.2.3. Différents supports

A l'état physiologique, le pôle basal des hépatocytes est en contact direct avec une membrane constituée de collagène, de laminine, de fibronectine et de protéoglycannes. Les hépatocytes en culture ont une forte affinité pour différents supports qui incluent le collagène de type I et IV, due à l'existence de récepteurs spécifiques à leur surface ; l'héparane-sulfate ou les bio-matrices.

Reproduites *in vitro*, ces interactions ont pour conséquence un temps d'attachement très rapide, une meilleure adhésion cellulaire et un meilleur étalement des cellules au support, un maintien de la morphologie hépatocytaire et une conservation des fonctions différenciées au cours du temps.

Le nombre de cellules attachées ainsi que la qualité de l'étalement des cellules au support matriciel est fonction de la concentration en collagène recouvrant les flacons de culture. Une concentration de l'ordre de 0,05 à 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ est en général conseillée pour un résultat maximal (Desangle, 1992).

Comme évoqué précédemment, la survie dépend du mode de culture mais également de la nature des matériaux employés. Les hépatocytes fraîchement isolés et maintenus en suspension peuvent être utilisés uniquement pour des expériences de courte durée ne dépassant généralement pas quatre heures. Ensemencés sur du plastique, ces cellules survivent environ huit jours mais perdent précocement leurs marqueurs fonctionnels. Leur utilisation est limitée à trois jours avec une efficacité maximale entre 24 et 48 heures. Ensemencés sur du collagène ou des bio-matrices, les hépatocytes survivent jusqu'à douze à quinze jours montrant l'intérêt de tels supports (Desangle, 1992).

1.2.4. Densité cellulaire

Le nombre de cellulesensemencées conditionne l'attachement des hépatocytes au support. Un hépatocyte en culture reforme des desmosomes et des tight-junctions avec ses voisins. Une faible densité constitue un facteur limitant pour la croissance alors qu'une forte densité entraîne la perte de nombreuses fonctions différenciées et une chute des ARNm codant pour les protéines du cytosquelette des hépatocytes.

Une densité de $1,5 \times 10^5$ cellules/cm² (soit environ 4 millions pour un flacon de 25 cm²) est idéale pour obtenir une culture cellulaire confluente sans formation d'une double couche pouvant se détacher au bout de 24 heures d'incubation. Un large volume d'incubation, supérieur à 2,5 ml, permet de maximiser l'attachement des cellules (Desangle, 1992).

1.2.5. Cocultures

Afin d'améliorer leur survie, les hépatocytes peuvent être associés dans une même culture avec d'autres types cellulaires telles que les cellules sinusoidales, les fibroblastes et plus particulièrement avec les cellules épithéliales biliaires qui permettent de préserver les potentialités fonctionnelles des hépatocytes. Le contact direct entre les deux types cellulaires est nécessaire. Il fait intervenir une glycoprotéine membranaire spécifique et entraîne une accumulation de protéines matricielles. Les hépatocytes co-cultivés sont capables de synthétiser des composants de la matrice cellulaire, ce qui n'a pas été démontré dans les cultures pures (Goulet et al., 1988).

La densité cellulaire à laquelle sontensemencés les hépatocytes, influence la survie et le fonctionnement de ces cellules. A très faible densité, les hépatocytes se détachent précocement et ont une synthèse active d'ADN. Par cette méthode, les hépatocytes survivent jusqu'à trois semaines à partir desquelles leur activité diminue graduellement.

Composant	Rôle
Composés minéraux (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺ , Cl ⁻ , Mg ⁺⁺ ,.....)	Indispensables à la régulation de l'isotonie et au potentiel membranaire, au mécanisme de passage membranaire et aux réactions enzymatiques
Métaux	Indispensables à certaines réactions enzymatiques (Fe, Cu, Co.....)
Glucose	Indispensable comme source d'énergie (1g/L D-Glucose ou équivalent). Maintien des taux normaux d'alcool déshydrogénase, Réduction de l'apparition de la glutamyltransférase, Modulation des taux de ARNm....
Acides aminés (AA)	Indispensables car biosynthèse impossible <i>in vitro</i> [8 AA essentiels + tyrosine, lysine, arginine, histidine]
Vitamines	Indispensables à certaines fonctions cellulaires (Vitamine C, Riboflavine, Pyridoxal...)
Sérum bovin	Apport de facteurs mitogènes indispensables
Streptomycine- Pénicilline	Prévention de la contamination par bactéries à Gram positif et négatif
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Allongement de la longévité des hépatocytes et rôle cryoprotecteur
Glutamine	Amélioration de la croissance et de la survie des hépatocytes
Glutamate	Amélioration de la réponse des hépatocytes et de la sensibilité aux mitogènes
Dexaméthasone	Maintien de la survie, de la morphologie et des fonctions différenciées, Augmentation de la transcription de la matrice protéique (collagène)
Acide linoléique	Préservation des fonctions intercellulaires
Sélénium	Maintien de la survie et des fonctions différenciées
Proline	Aide à la synthèse de l'ADN
Facteurs de croissance :	
Insuline	Augmentation de l'anabolisme protéique, de l'attachement cellulaire et de la survie, Maintien des fonctions différenciées
EGF (Epidermal Growth Factor)	Action sur la morphologie et le maintien des fonctions spécifiques

Tableau 5: Récapitulatif concernant les composants et additifs des milieux cellulaires

3. Lignées cellulaires

Beaucoup de lignées cellulaires sont isolées de cultures tumorales ou sont immortalisées grâce à l'utilisation d'oncogène.

3.1. Classification des lignées cellulaires hépatiques

Trois catégories se distinguent (Barlovatz-Meinmon and Adolphe, 2003):

- Les lignées d'hépatome indifférenciées qui sont incapables, à confluence, d'exprimer au moins un marqueur fonctionnel spécifique des hépatocytes. Les lignées BRL-1, RLEC, HTC, WBF344 sont d'origine murine, la lignée BLC/PRFs ou lignée Alexeter est d'origine humaine.
- Les lignées différenciées, peu stables à confluence, qui expriment une ou plusieurs fonctions hépatocytaires à confluence. Les fonctions les plus souvent retrouvées sont l'albumine et la transferrine. L'αfoetoprotéine est retrouvée en quantité importante dans les lignées HepG2, Hep3B et HuH7. Ces lignées ont pour caractéristiques principales un renouvellement cellulaire régulier.
- Les lignées à haute capacité de différenciation sont stables. Les clones Faza 967 et FU55, issus d'hépatome de Ruber de rat sont classés dans cette catégorie.

3.2. Intérêts de la lignée HepG2

Les lignées cellulaires permettent d'étudier le rôle de chacun des paramètres de l'expérience ainsi que les caractéristiques des cellules telles que leurs récepteurs spécifiques. La lignée des HepG2, issue d'hépatocarcinome humain, a conservé la plupart des fonctions des hépatocytes humains et notamment les enzymes de phase I et II impliquées dans les processus d'activation et de détoxification des xénobiotiques. Très utilisées dans les études de toxicité hépatique, cette lignée a aussi fait l'objet de nombreuses études évaluant les liposomes possédant un ligand avec un terminal Gal car ces cellules expriment en quantité importante les récepteurs ASGPr à leur surface. Leur principal avantage qui est commun à toutes les cultures d'origine tumorale, est leur capacité à former une lignée cellulaire continue dont les caractéristiques sont une croissance rapide en 12 à 24 heures, un rendement élevé et un clonage facile.

3.3. Mise en culture

Les milieux de cultures utilisés sont les milieux standards MEM et DMEM auxquels peuvent être rajoutés de la glutamine, des antibiotiques tels que la pénicilline et la streptomycine, du pyruvate de sodium et des aminoacides non essentiels (Frisch et al., 2004, Carriere et al., 2004).

3.4. Conditions de conservation

Les cultures cellulaires ayant une viabilité limitée, il convient de disposer de méthode de stockage, temporaire ou prolongée. Deux méthodes peuvent être envisagées : le stockage temporaire par hypothermie ou le stockage à long terme par congélation. La cryoconservation augmente la durée de vie des cultures cellulaires, les cellules conservent en effet l'intégralité de leurs propriétés après décongélation (Birraux et al., 2002).

4. Foie bioartificiel à base d'hépatocytes en culture

Il est obtenu selon une méthodologie proche de celle des hépatocytes en culture. Ce type de cellule est surtout utilisé dans les foies bioartificiels internes (FBAI) qui permettent l'épuration du plasma et du sang sur une membrane d'hémodialyse ou d'hémofiltration contenant des hépatocytes isolés.

Les cellules qui peuvent être utilisées dans ces systèmes sont de deux sortes (Samuel, 2003):

- soit des hépatocytes d'origine humaine obtenus à partir de lignées tumorales. Ceux-ci posent le problème du risque de contact entre le patient et les lignées de cellules tumorales. Ce système a été arrêté suite à la parution de résultats non concluants.
- soit à base d'hépatocytes de porc.

La problématique de ce système est qu'à l'heure actuelle, la culture et le maintien de la viabilité des hépatocytes restent difficiles. En outre, aucun travail n'utilise encore ce modèle dans l'évaluation des liposomes.

5. Techniques de contrôle

Celles ci visent à s'assurer d'une part de la viabilité (voire de la multiplication cellulaire) et d'autre part du niveau de différenciation cellulaire (Desangle, 1992). Ces contrôles sont régulièrement effectués en particulier lors de changement de milieu ou au cours des repiquages. Une modification de la valeur du pH du milieu de culture ou la diminution de la concentration en CO₂, quoique non spécifique, révèle une très probable surmortalité cellulaire. Des marqueurs plus spécifiques

s'attachent à étudier le nombre, la morphologie, la viabilité membranaire ainsi qu'au métabolisme cellulaire. Il est à noter que ces mêmes méthodes sont également mises en œuvre pour étudier la cytotoxicité de différents composés. Ces résultats répondent à des normes qui diffèrent selon l'espèce considérée. Ils définissent et valident le modèle. Ces tests ne donnant pas tous les mêmes résultats, il est recommandé d'en utiliser plusieurs afin de s'assurer de la viabilité de la culture cellulaire.

-Comptage et morphologie cellulaires :

Ils peuvent se réaliser soit par comptage direct au microscope optique à l'aide de cellule (type Malassez) soit par cytométrie de flux. La morphologie, le développement cellulaire et l'adhésion au support peuvent ainsi être observés. En outre, la cytométrie de flux apporte des informations intrinsèques sur la cellule comme la granularité.

-Viabilité cellulaire :

La viabilité cellulaire est principalement étudiée via la perméabilité membranaire à divers colorants et à l'étude du métabolisme cellulaire. L'augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire constitue un test simple et rapide qui témoigne d'un dommage membranaire. Les colorants sont de deux natures différentes. D'une part les colorants vitaux ou d'exclusion diffusent exclusivement dans les cellules mortes et reflètent ainsi la mortalité cellulaire. Ces colorants sont soit non fluorescents type bleu tryptan ou éosine Y soit fluorescents (érythrosine B, bromure d'éthidium). D'autre part, les colorants supravitaux ou d'exclusion ne pénètrent que dans les cellules vivantes. Certains présentent des spécificités soit d'un organe cellulaire soit d'une enzyme cellulaire. Le rouge neutre, la rhodamine 123 sont respectivement spécifiques des lysosomes et de la mitochondrie. D'autres colorants supravitaux nécessitent d'être métabolisés comme le bromure de diméthylthiazoldiphényltétrazolium (MTT). Ce dernier est transformé sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de bleu de formazan. Ainsi la formation de ces cristaux reflète le métabolisme mitochondrial. Outre l'utilisation de ce type de colorants, certaines mesures peuvent également déterminer la viabilité cellulaire via son niveau métabolique. Des tests spécifiques sont parfois réalisés comme l'incorporation de la thymidine tritiée au niveau de l'ADN ou l'utilisation de sonde fluorescente. Les mesures des taux de protéines et de l'ATP intracellulaire sont plus fréquemment mises en place en routine. En particulier, le taux de sécrétion d'albumine dans le milieu de culture ou encore de la transferrine reflète l'activité fonctionnelle des hépatocytes. Ces protéines peuvent être dosées spécifiquement par immunonéphélométrie qui prend en compte l'agglutination suite à l'ajout d'un anticorps spécifique.

6. Autres modèles hépatiques

6.1. Foie isolé perfusé

Ce modèle se rapproche plus de la situation *in vivo*. La technique du foie isolé perfusé a été décrite pour la première fois par Miller (Griffin and Miller, 1973). Cette technique a été utilisée par Neveux et al. (Neveux et al., 2000) pour tester des liposomes d'ATP et mettre en évidence l'augmentation des réserves énergétiques. Généralement, le foie de rat est utilisé mais l'expérience a également été validée avec le foie de cobaye (Chaib et al., 2004). L'inconvénient de ce modèle réside principalement dans l'absence d'information concernant la cible cellulaire atteinte.

6.2. Coupes de foie

Les coupes de foie sont obtenues à partir de biopsies de foie qui peuvent être d'origine humaine. Cette technique se rapproche des conditions *in vivo*. Elle a surtout été utilisée dans les études de toxicologie et notamment les études sur le métabolisme des principes actifs (Powis et al., 1989, Shimizu et al., 2005). Facile et rapide, cette technique n'a cependant pas servi à évaluer des liposomes.

7. Avantages et limites des différents modèles

Le Tableau 6 présente les caractéristiques des différents modèles précédemment exposés. Peu d'études comparent les différents modèles hépatiques *in vitro* entre eux. Powis et al. (Powis et al., 1989) et Cervenkova et al. (Cervenkova et al., 2001) ont montré que les coupes de foie se rapprochent le mieux de la situation *in vivo* pour les études de métabolisme par rapport aux hépatocytes isolés. De même, Perkins et al. (Perkins et al., 2006) ont démontré que les coupes de foie et les hépatocytes primaires expriment leur gène différemment suggérant une différence fondamentale dans leur physiopathologie.

Au niveau des lignées cellulaires, une meilleure transfection est observée pour les HepG2 que pour les hépatocytes primaires car la lignée tumorale semble se diviser plus facilement (Park et al., 2003). Aucune comparaison entre les différents modèles n'a été effectuée en ce qui concerne l'évaluation des liposomes. La validation la plus certaine des modèles *in vitro* se fait par comparaison à posteriori des processus observés *in vivo*.

Modèles hépatocytaires	Avantages	Limites
Hépatocytes isolés en suspension	<ul style="list-style-type: none"> - Fonctionnement proche de l'hépatocyte <i>in vivo</i> - Evaluation de plusieurs molécules à différentes concentrations à partir d'une même population cellulaire - Cryoconservation possible - Etudes interspèces possibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité fonctionnelle dépendante de la composition du milieu d'incubation
Hépatocytes primaires en culture	<ul style="list-style-type: none"> - Fonctions exprimées pendant plusieurs jours - Cryoconservation possible - Etudes interspèces possibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Altérations fonctionnelles et morphologiques des cellules après les premières heures de culture puis détérioration et mort cellulaire si le milieu d'incubation n'est pas complété - Manipulation et standardisation de la méthode difficiles - Isolement du contexte physiologique (système clos)
Lignées cellulaires non modifiées	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre important de cellules disponibles - Certaines fonctions sont préservées - Cryoconservation possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Activités enzymatiques perdues ou diminuées - Génotype instable
Cellules génétiquement modifiées	<ul style="list-style-type: none"> - Expression d'une ou plusieurs enzymes d'origine humaine - Disponible principalement pour les cytochromes - Nombre important de cellules disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Usage spécifique - Quantité d'enzymes non physiologique
Coupes de foie	<ul style="list-style-type: none"> - Organisation tissulaire et interactions cellule-matrice et cellule-cellule conservées - Etude sur foie humain à partir de biopsie - Evaluation de plusieurs molécules à différentes concentrations à partir d'une même population cellulaire - Activité métabolique intacte jusqu'à 3 jours - Cryoconservation possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacités vitale et fonctionnelle variables suivant les conditions expérimentales
Foie isolé perfuse	<ul style="list-style-type: none"> - Maintien de l'architecture tridimensionnelle de l'organe - Possibilité de recueillir la bile et d'en effectuer son analyse - Etude cinétique de courte durée 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficile à mettre en œuvre - Intégrité fonctionnelle contrôlée par la mesure de marqueurs métaboliques et biochimiques, le perfusât doit être oxygéné et son pH contrôlé en permanence - Utilise un nombre important d'animaux - Expériences sur foie humain isolé difficiles à envisager - Viabilité de 4 à 6 heures

Tableau 6: Avantages et limites des différents modèles cellulaires

8. Application des cultures cellulaires à l'évaluation des liposomes incluant des ligands hépatiques

Pour vérifier la bonne accessibilité du ligand et l'efficacité de la forme vectorisée, plusieurs stratégies sont en général mises en place : la vérification de l'incorporation du matériel liposomal à l'intérieur de la cellule (i), la mise en place d'études pharmacocinétiques (ii) ou d'un modèle expérimental (iii).

Chacune de ces étapes concoure à démontrer la spécificité sur le plan de l'organe mais aussi vis-à-vis du type cellulaire. La nature de l'interaction qui se développe entre le liposome et les cultures cellulaires est généralement étudiée en première intention. Les hépatocytes de rats et les HepG2 sont à ce jour les modèles les plus souvent testés avec des liposomes préalablement marqués (Shimizu et al., 1997, Khatri et al., 2005, Shi et al., 2006, Murao et al., 2002, Kawano et al., 2002) (Tableaux 7 et 8).

L'utilisation de sonde permet de vérifier l'incorporation soit des lipides soit du contenu des liposomes à l'aide d'agent radiomarqué ou fluorescent. Ce marquage est fréquemment associé à l'utilisation de la microscopie confocale. Les principaux lipides radiomarqués sont le [14C]-glycerol trioleate (Khatri et al., 2005, Wu et al., 1998, Matsukawa et al., 2000) et le [3H]cholesteryl (Hattori et al., 2000, Kawakami et al., 2000a, Kawakami et al., 2001, Kawakami et al., 2000b, Managit et al., 2005, Murao et al., 2002, Sliedregt et al., 1999, Rensen et al., 2001, Shimada et al., 1997). D'autres auteurs leur préfèrent des sondes fluorescentes tels que le 1,1'-dilinoylel-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate [DiI](Kawano et al., 2002, Maitani et al., 2001) ou le N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl phosphatidylethanolamine) (NBD-PE)(Khatri et al., 2005). De manière similaire, l'incorporation du contenu liposomal est étudiée soit par radiomarquage. (e.g. [3H]inulin(Tsuji et al., 1991, Yu and Lin, 2000)) soit par une sonde fluorescente (e.g. calcéine (Shimizu et al., 1997, Shimizu et al., 1996, Shimizu et al., 1998a), fluorescéine (Shi, Qi et al. 2006)).

Concernant l'agent pharmacologique encapsulé dans ces travaux, leur choix repose sur des pathologies majeures comme le cancer ou le stress oxydant qui pourrait clairement bénéficier d'une vectorisation vers le foie et plus spécifiquement l'hépatocyte. Beaucoup de ces principes actifs appartiennent à la classe des anticancéreux comme la doxorubicine (Maitani et al., 2001, Shimizu et al., 1998b, Wang et al., 2006a), l'adriamycine (Hou et al., 2003), le 5-Fluorouracil (Jin et al., 2005a, Jin et al., 2005b), l'aracitine C ou ses dérivés lipophiles (Terada et al., 2006)) et l'acide rétinoïque (Shimizu et al., 2003, Takahashi et al., 2003). A titre d'illustration, Maitani et al.(Maitani et al., 2001) ont démontré l'incorporation cellulaire de doxorubicine à l'aide des liposomes comportant comme ligand un dérivé du sterylglucoside.

La spécificité de l'interaction entre le liposome et la cellule via les ASGPr est fréquemment recherchée. Yu et al. (Yu and Lin, 2000) ont ainsi préincubé des liposomes d'inuline incluant comme ligand le palmitoyl-asialofétuine avec ou sans de l'asialofétuine. En présence de ce ligand à l'état libre, l'effet était annulé. L'ajout de Gal en excès est également utilisé pour vérifier cette interaction (Managit et al., 2005). Une incorporation non spécifique peut être également repérée sur un autre type de culture cellulaire par exemple avec des macrophages du système réticuloendothéliale

(Terada et al., 2006) ou des cellules n'exprimant pas les ASGPr comme des lignées de fibroblastes (NIH3T3) (Yu and Lin, 2000).

Suite à ces études menées en culture cellulaire, des études pharmacocinétiques sont réalisées soit à l'aide du modèle du foie isolé perfusé (Chaib et al., 2003) soit la plupart du temps avec des animaux en laboratoire (rats ou souris) (Sasaki et al., 1994, Sasaki et al., 1995). Ces études fournissent des données sur la clairance hépatique et la spécificité d'organe et de cellule (parenchymateuse ou non). Elles valident ou non l'intérêt de la formulation (Sliedregt et al., 1999, Tsuji et al., 1991, Sasaki et al., 1994, Sasaki et al., 1995, Shimizu et al., 1997, Shimizu et al., 1996, Jin et al., 2005a, Hattori et al., 2000, Wu et al., 1998) (Khatri, Rawat et al. 2005; Longmuir, Robertson et al. 2006) (Mandal and Das, 2005, Kawakami et al., 2000a, Kawakami et al., 2000b, Wang et al., 2006a). Ces essais permettent de sélectionner les ligands les plus performants en particulier selon la nature de l'espaceur et les concentrations les plus adaptées au sein de la composition (Sasaki et al., 1994, Sasaki et al., 1995). Ces études pharmacocinétiques peuvent être complétées par un modèle expérimental. Mandal et al. (Mandal et al., 2002, Mandal and Das, 2005) ont développé un modèle d'hépatotoxicité avec le tétrachlorure de carbone.

Ligands hépatocytaires	Principe actif, marqueur,	Modèle d'étude	Auteurs
Apolipoprotéine E	ATP	*Foie isolé perfusé	(Chaib et al., 2003)
	Liposome marqué	*Etude de distribution (IV)	(Yan et al., 2005)
Asialofétuine	Adriamycine		(Hou et al., 2003)
CHS-ED-LA	Doxorubicine	*Etude de distribution (IV)	(Wang et al., 2006a)
Dérivé du polysaccharides-cholesterol	Liposome marqué	*Culture cellulaire de cancer du colon	(Matsukawa et al., 2000)
Galactosylcéramide	5-Fluorouracil	*Modèle expérimental de tumeur	(Jin et al., 2005a)
		*Culture cellulaire: HepA	
	5-Fluorouracil	*Etude de distribution (IV)	(Jin et al., 2005b)
Gal-C4-Chol	Prostaglandine E1, Probucol	*Etude de distribution (IV)	(Hattori et al., 2000)
		*Etude de distribution (IV)	(Kawakami et al., 2000a)
		*Modèle d'hépatite fulminante (souris)	
		*Etude de distribution (IV)	(Kawakami et al., 2001)
	Liposome marqué	*HepG2, Etude de distribution (IV)	(Managit et al., 2005)
	Liposome marqué	*HepG2, Etude de distribution (IV)	(Murao et al., 2002)
	Dérivé de l'ara-C	*HepG2, Macrophage	(Terada et al., 2006)
Gal-C4-Chol, Man-C4-Chol, Fuc-C4-Chol	Liposome marqué	*Etude de distribution (IV)	(Kawakami et al., 2000b)
Gal-PEG lipids	Liposome marqué	*Etude de distribution (IV)	(Shimada et al., 1997)
Glycolipide	Liposome marqué	*Culture primaire d'hépatocytes de rat	(Sliedregt et al., 1999)
		*Etude de distribution (IV)	
HBs Ag lié au N-glutarylphosphatidyl ethanolamine	(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) phosphatidyl-ethanolamine	*Etude de distribution (IV)	(Khatri et al., 2005)
		*Hépatocytes de rat, HepG2	
LCO-Tyr-GalNAc ₃		*Culture primaire d'hépatocytes de rat	(Rensen et al., 2001)
		*Etude de distribution (IV)	
Lithocholytaurine	Liposome marqué	*Culture primaire d'hépatocytes de rat	(Putz et al., 2005)

Tableau 7: Modèle cellulaire ou autre évaluation de forme liposomale incluant un ligand hépatocytaire (1^{er} partie) (en grisé apparaissent les travaux utilisant des cultures cellulaires)

Ligands hépatocytaires	Principe actif, marqueur,	Modèle d'étude	Auteurs
Man-C4-Chol	Liposome marqué	*Etude de distribution (IV)	(Kawakami et al., 2004)
Palmitate -Asialofetaine	Vitamine E	*Culture primaire d'hépatocytes de rat *Etude de distribution (IV) *Modèle d'hépatite fulminante (souris)	(Wu et al., 1998)
Palmitoyl-Asialofetaine	Inuline	*HepG2	(Yu and Lin, 2000)
p-aminophényl galactoside	Ac. mesodimer-captosuccinique	*Souris préexposée au chlorure de cadmium	(Behari and Nihal, 2000)
p-aminophényl α-D galactopyranoside	Quercetine	*Etude de distribution (IV) *Modèle d'hépatite fulminante (souris)	(Mandal and Das, 2005)
p-aminophényl α-D mannoside	Quercetine	*Modèle d'hépatite fulminante (souris)	(Mandal et al., 2002)
Peptide du Plasmodium berghei:	Calcéine et lipides fluorescents	*Etude de distribution (IV)	(Longmuir et al., 2006)
Stéaryl glycyrrhizine	Liposome marqué	*Culture primaire d'hépatocytes de rat	(Osaka et al., 1994)
Stéaryl glycyrrhizine	Inuline	*Etude de distribution (IV)	(Tsuji et al., 1991)
Stérylglycoside (soja)	Dil	*HepG2	(Kawano et al., 2002)
	Doxorubicine	*HepG2	(Maitani et al., 2001)
	Liposome marqué	*HepG2, *Etude de distribution (IV)	(Qi et al., 2005)
	Fluorescéine	* HepG2 *Foie isolé perfusé	(Shi et al., 2006)
	Calcéine		(Shimizu et al., 1996)
	Calcéine	*Culture primaire d'hépatocytes de rat *Etude de distribution (IV)	(Shimizu et al., 1997)
	Calcéine	*Culture primaire d'hépatocytes de rat	(Shimizu et al., 1998b)
	Doxorubicine	*Modèle expérimental de tumeur	(Shimizu et al., 1998a)
	Acide rétinoïque	*Modèle expérimental de tumeur	(Shimizu et al., 2003)
	Fenretinide	*HepG2	(Shimizu et al., 2005)

Tableau 8: Modèle cellulaire ou autre évaluation de forme liposomale incluant un ligand hépatocytaire (2^{ème} Partie) (en grisé apparaissent les travaux utilisant des cultures cellulaires)

Conclusion concernant les travaux antérieurs sur les modèles cellulaires hépatiques et application à l'évaluation de liposomes destinés au ciblage spécifique

L'incorporation de ligand au sein des liposomes conduit à une meilleure sélectivité vis-à-vis du foie et de la cellule cible (i.e. hépatocyte). Le développement récent de ligands ayant une affinité pour les ASGPr est à l'origine de nombreux travaux qui ont clairement souligné leur intérêt *in vitro* et *in vivo*. A l'instar d'immunoliposomes d'ATP récemment utilisés dans le cadre d'épisodes ischémiques cardiaques, la formulation de liposomes incorporant un ligand galactosylé pourrait offrir des perspectives intéressantes afin d'améliorer la conservation hypothermique du greffon hépatique. Néanmoins, ce projet préalablement initié nécessite de définir l'influence de l'incorporation du ligand vis-à-vis des principales caractéristiques liposomales. Par ailleurs, l'utilisation de cultures cellulaires, principalement les HepG2, semble avantageusement remplacer les modèles comme le foie isolé perfusé. Elle apporte des informations de grand intérêt sur la captation cellulaire en précisant les mécanismes qui concourent au devenir de l'agent encapsulé dans la cellule. Elle conduit d'une part à démontrer la spécificité de l'interaction et d'autre part à vérifier que le statut énergétique cellulaire est amélioré *in fine*.

Travaux expérimentaux: ARTICLE 1

Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand.

Tep K, Korb V, Richard C, Escriou V, Largeau C, **Vincourt V**, Bessodes M, Guellier A, Scherman D, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G.

J Liposome Res. 2009;19(4):287-300.

Travaux expérimentaux: ARTICLE 2

Freeze-drying of ATP entrapped in cationic, low lipid liposomes.

Vincourt V, Nguyen L, Chaumeil JC, Dumortier G.

Cryobiology. 2010;60(3):262-70

Travaux expérimentaux : ARTICLE 3

Altered HepG2 cell models using etomoxir versus tert-butylhydroperoxide.

Vincourt V, Escriou V, Largeau C, Bessodes M, Scherman D, Chaumeil JC, Dumortier G.

Cell Biol Toxicol. 2011;27(5):363-70.

DISCUSSION

1 Contribution des travaux au sein du projet d'amélioration du statut énergétique du greffon hépatique par liposome d'ATP

Notre hypothèse de travail repose sur l'espoir que suscite l'amélioration du statut énergétique lors de la conservation du greffon hépatique. Notre rationnel est basé sur les données de la littérature suggérant l'intérêt de la vectorisation de l'ATP, en particulier sur des modèles d'ischémies cardiaques.

Les travaux antérieurs nous ont permis de construire un schéma expérimental. Différentes étapes nécessaires au développement et à l'évaluation de liposomes destinés au ciblage hépatique peuvent être ainsi identifiées (tableau 9).

Dans un premier temps, celles-ci concernent la mise à disposition d'une formulation stable dont les ligands sont facilement accessibles.

Dans un deuxième temps, différentes techniques sont mises à profit pour leur évaluation sur culture cellulaire, puis organe ou greffon isolé, avant d'envisager des essais chez l'animal sur un modèle expérimental de greffe. Dans le cadre du projet d'amélioration du statut énergétique du greffon hépatique par liposome d'ATP, notre contribution fait suite plus précisément aux travaux préalables qui avaient conduit à la formulation de liposomes incluant un ligand lactosylé. Par rapport au tableau 9, notre participation débute ainsi à la cinquième étape du schéma expérimental (étude de la stabilité).

Au niveau de la formulation, nous avons retenu, au vu de la littérature, le procédé de lyophilisation pour stabiliser nos liposomes d'ATP, correspondant à l'étape 5 du tableau 8. Vis à vis de l'évaluation des liposomes d'ATP, notre démarche a consisté à étudier l'interaction avec des cellules HepG2, correspondant aux étapes 7 (a), (b), (c) et (d).

Notre discussion générale rappellera l'originalité de nos objectifs et de notre démarche. Nous préciserons en quoi les données que nous avons rassemblées répondent à nos objectifs initiaux et comment ceux ci peuvent contribuer à faire progresser ce projet. En outre, de manière plus large, nous présenterons également les points forts de ce travail qui peuvent être pertinents vis-à-vis du développement et de la recherche dans le domaine de la vectorisation hépatique.

DEVELOPPEMENT DE LA FORME LIPOSOMALE POUR UN CIBLAGE DE L'HEPATOCYTE
<p>1-Formulation de la composition lipidique Taille inférieure à 100 nm afin de diffuser à travers l'espace de Disse Charge légèrement positive pour interagir avec la membrane plasmique Phospholipide avec une Tc bas pour favoriser la flexibilité nécessaire à une diffusion satisfaisante</p>
<p>2-Choix du ligand Naturel (e.g. ApoE) Semi-synthétique (e.g. Palmitoyl asialoféтуine) Synthétique (e.g. Lact-ligand) Le choix doit porter sur l'ancrage lipidique, la longueur et la nature de l'espaceur (C2-C6) et le type du sucre (Sugar head) de structure appropriée (Mono or poly-antenne)</p>
<p>3-Méthode d'incorporation du ligand Par simple contact (pré-incubation) (e.g. ApoE) Par liaison covalente (e.g. HbsAg) Mélange direct avec les autres composants lipidiques (e.g. Lact-ligand)</p>
<p>4-Vérification de l'incorporation du ligand Détermination indirecte en mesurant la fraction non liée du ligand Détermination d'un produit de réaction intermédiaire formé lors de la fixation aux liposomes Test d'agrégation entre le galactose et <i>Ricinus communis</i> pour les ligands aux ASGPr plus réversibilité par ajout de galactose libre</p>
<p>5-Etude de la stabilité Mise en place, si besoin, de stratégies de stabilisation (e.g. pegylation, lyophilisation)</p>
EVALUATION DE LA FORME LIPOSOMALE POUR UN CIBLAGE DE L'HEPATOCYTE
<p>6-Sondes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> Sonde hydrophile fluorescente (détection de la pénétration du contenu à l'intérieur de la cellule) (e.g. calcéine) Sonde lipidique (détection de la pénétration des composés lipidiques du liposome) (e.g. ¹⁴C-labeled glycerol trioleate)</p>
<p>7-Culture cellulaire (a) Test de toxicité cellulaire (MTT dye test sur HepG2) (b) Détermination de l'internalisation sur cellule (e.g. hépatocyte primaire de rat, HepG2) (c) Spécificité vis à vis du récepteur (contrôle négatif avec des cellules ne portant pas de ASGPr comme les lignées SK-Hep1) (d) Mise en place d'un modèle cellulaire expérimental (e.g. ajout d'un agent oxydant)</p>
<p>8-Etude sur organe ou pharmacocinétique Viabilité sur greffon Foie isolé perfusé (e.g. rat) Animal : Biodistribution, Clairance hépatique, Sélectivité cellulaire (ratio entre le tissu parenchymateux ou non) Sélectivité liée à la nature du récepteur (e.g. préinjection d'asialoféтуine)</p>
<p>8- Modèles expérimentaux Hépatotoxicité (e.g. CCl₄) Greffe de foie</p>

Tableau 9 : Principales étapes de développement et d'évaluation de formes liposomales destinées à un ciblage hépatique (liste non exhaustive). En grisé, figurent les essais menés antérieurement dans le cadre général du projet.

2 Contribution au développement de forme stable de liposome d'ATP

Cette contribution consiste à proposer une forme stable de liposome d'ATP. La forme lyophilisée facilite le transport (i.e. faible volume), la conservation (i.e. température ambiante) et l'utilisation (i.e. reconstitution rapide). Actuellement, des spécialités liposomales sous cette forme sont ainsi disponibles. La lyophilisation concourt principalement à limiter la dégradation des lipides (e.g. hydrolyse des phospholipides) ou de l'agent encapsulé, qui est dans notre projet l'ATP. Ce dernier point est particulièrement important sachant que l'adénosine produit à partir de l'hydrolyse de l'ATP peut être métabolisé en promoteur de radicaux libres comme l'hypoxantine (Vajdova et al., 2002).

En revanche, une littérature abondante fait état d'une possible perte de l'intégrité du liposome qui aboutit à une transition de phase ou une fusion au cours de cette opération. Ces phénomènes se matérialisent par une modification des caractéristiques organoleptiques telle que la taille (et/ou de sa distribution) et par une fuite de l'agent encapsulé parfois consécutive. Cette dernière est particulièrement critique dans le cas de molécules hydrophiles.

En outre, dans le cadre du développement de notre formulation, l'opération devait prendre en considération des caractéristiques spécifiques: une taille proche de 100 nm, un potentiel zêta légèrement positif et une capacité à maintenir l'ATP à l'intérieur du liposome. Seul l'ATP restant encapsulé constitue la fraction d'intérêt susceptible d'interagir efficacement avec les cellules.

2.1 Originalité de l'objectif et du schéma expérimental

Par rapport à l'objectif général préalablement défini, nous avons opté pour une approche originale susceptible de contribuer à fournir des données expérimentales intéressantes dans le cadre du développement d'une forme liposomale :

(i) Spécificité de la composition de la formule de départ (faible concentration lipidique, utilisation de lipide cationique et de phospholipide de nature variée)

La composition combinait du Chol (32,5% m/m) et un lipide cationique (i.e. DOTAP : 5% m/m) avec un phospholipide (62,5% m/m) d'origine soit naturelle (phosphatidylcholine de soja [SPC] ou d'œuf [EPC]) soit hydrogénée (HSPC). Cette formulation comportait une faible concentration initiale en phospholipide soit 5 mM.

(ii) Démarche expérimentale centrée sur le maintien de la taille

Si notre schéma méthodologique était proche de celui décrit par van Winden (van Winden, 2003) (Tableau 10), notre approche différait néanmoins des autres publications. En effet, le critère principal de sélection reposait sur l'absence de modification significative de la taille (et/ou de sa distribution)

avant et après lyophilisation. Il convient, à nouveau, de rappeler que la taille est une caractéristique qui détermine la biodistribution des liposomes (i.e. diffusion à travers l'espace de Disse).

1- Taille à optimiser (100 à 200 nm)
2- Optimisation du procédé de congélation (vitesse et mode de congélation)
3- Formule liposomale (a) Ballastre compris entre 2 et 30% (b) Choix du lyoprotecteur et du ratio lyop/lip (c) Réduction la quantité de NaCl (d) Choix de la composition lipidique afin d'augmenter la rigidité du liposome
4 – Optimisation des paramètres du cycle de lyophilisation (température et pression de sublimation)

Tableau 10: Principaux points clés de la lyophilisation des liposomes décrits par van Winden (van Winden 2003)

Afin de se conformer à cette méthodologie, la taille initiale a été choisie pour satisfaire aux exigences de diffusion à travers l'espace de Disse et à l'intervalle préconisé par cet auteur (i.e. 100 à 200 nm). La vitesse de congélation a été également modulée pour répondre au deuxième critère. Quelle que soit la formulation, l'item concernant le ballastre a été respecté avec une masse sèche minimale de 2%. Préalablement, un cycle de lyophilisation a été validé et était caractérisé par un plateau de sublimation de température comprise entre -40°C et -30°C sur une durée d'environ 1h30, puis une remontée en température du produit pour atteindre celle du plateau vers 15°C. Le plateau correspondant à la dessiccation secondaire avait pour température et durée, 20°C et 4 h, respectivement.

Toujours selon la même démarche, il a été recherché la composition lipidique et la nature du lyoprotecteur (et le ratio lyop/lip) les plus adaptées à notre problématique. Les spécifications attendues étaient celles décrites dans le mémoire bibliographique, principalement l'obtention d'un lyophilisat de caractéristiques organoleptiques satisfaisantes, facilement redispersible, d'humidité relative inférieure à 2% et assurant le maintien des principales propriétés liposomales (taille, potentiel zêta, absence de fuite). Une première phase a été conduite avec des liposomes blancs afin de sélectionner la formulation la plus adaptée, suivie par une seconde avec des liposomes encapsulant une molécule hydrophile soit un marqueur (i.e. calcéine) soit l'ATP.

2.2 Contribution scientifique

Ces travaux fournissent des résultats intéressants en vue du développement de forme liposomale stable. En particulier, notre étude précise la relation pouvant exister entre le ratio lyop/lip et d'autres éléments clés comme la concentration lipidique et la nature de la phosphatidylcholine. Les données

citées ci-dessous apportent des informations pouvant être considérées comme nouvelles ou pertinentes sur l'influence de divers facteurs concourant au maintien de la taille :

- (i) Impact négatif de faible concentration initiale en lipide
- (ii) Intérêt des phosphatidylcholines naturelles par rapport aux composés hydrogénés
- (iii) Confirmation de l'intérêt du mode de congélation lente pour les liposomes à base de phosphatidylcholines hydrogénées.
- (iv) Intérêt de l'addition des lyoprotecteurs pour pallier l'impact négatif de la faible concentration initiale en lipide ou de l'emploi de phosphatidylcholines hydrogénées.

2.2.1 Concentration lipidique

Notre travail démontre que la concentration lipidique est un facteur essentiel à prendre en compte. Il a ainsi été montré que l'abaissement de la concentration lipidique représentait un facteur délétère, induisant une augmentation de la taille des liposomes après lyophilisation. En effet, notre échantillon liposomal était très dilué du fait de l'utilisation de la chromatographie sur gel afin de séparer les formes libre et encapsulée (i.e. concentration en phospholipide ~5mM). Nos résultats montrent que des ratios lyop/lip plus élevés (5:1 à 15:1 pour les phosphatidylcholines naturelles) étaient nécessaires pour stabiliser la taille lorsque la concentration lipidique initiale était faible.

Si peu de travaux sont disponibles sur l'influence de la modification de la taille après lyophilisation lorsque de faibles concentrations lipidiques sont employées, des données sont, en revanche, plus nombreuses concernant la fuite des solutés encapsulés. Néanmoins, la plupart des auteurs a généralement utilisé des concentrations lipidiques plus élevées, de l'ordre de 5 à 55 mM (van Winden and Crommelin, 1999, Ohtake et al., 2006, Montanari et al., 2009). Tanaka et al. (Tanaka et al., 1991) ont montré que la rétention de carboxyfluorescéine dans les liposomes EPC à une concentration lipidique inférieure à 2 mM nécessitait une concentration importante en lyoprotecteurs.

2.2.2 Données sur l'influence de la composition des liposomes sur la lyophilisation

La composition initiale des liposomes combinait une phosphatidylcholine, la SPC, du Chol et un lipide chargé positivement, le DOTAP.

***Influence liée au choix de la phosphatidylcholine**

La première évaluation portait sur la SPC car les phosphatidylcholines naturelles sont plus flexibles et diffusent ainsi plus efficacement à travers l'espace de Disse (Tep et al., 2009). Un autre type de

phosphatidylcholine naturelle a été pris en considération dans notre étude : l'EPC. L'emploi de l'EPC s'est révélé globalement moins efficace pour maintenir la taille même si les résultats étaient relativement similaires. Ces légères différences s'expliquent probablement du fait de leur composition lipidique distincte. L'EPC est caractérisée par une constitution en acide gras saturé quantitativement plus importante (40%) que pour les SPC (20%), pouvant ainsi rigidifier la structure de la bicouche. Malgré le maintien de la taille durant la lyophilisation, ni l'EPC ni la SPC n'ont réussi à prévenir la fuite en calcéine ou en ATP. Ces pourcentages de fuite sont à comparer à d'autres études. Par exemple, Komatsu et al. ont trouvé une rétention de calcéine de l'ordre de 45% avec des liposomes EPC en présence de maltose au ratio 5:1 (Komatsu et al., 2001). Van Winden a mis en évidence une rétention de CF évaluée à 50% avec des liposomes EPC en présence de tréhalose au ratio 4:1 (van Winden et al., 1997). A l'inverse, d'autres auteurs ont noté des valeurs de rétention de calcéine bien supérieures (80%-90%) en utilisant des liposomes EPC en présence de maltose à un ratio massique élevé de 15:1 (Miyajima et al., 1986, Tanaka et al., 1991).

***Impact négatif de l'emploi des phosphatidylcholines hydrogénées**

Nos résultats indiquent, dans le cadre de notre formulation, un impact négatif de la substitution des phosphatidylcholines naturelles par l'HSPC. Il n'a été possible de stabiliser la taille des liposomes HSPC qu'en incorporant un ratio lyop/lip particulièrement élevé (25/1 pour le tréhalose). Ces données sont en relative contradiction avec les préconisations de certains auteurs comme van Winden (van Winden, 2003). Ce dernier propose de substituer les phosphatidylcholines naturelles par leurs dérivés hydrogénés afin d'optimiser la stabilité lors de la lyophilisation. Néanmoins, l'intérêt de cette substitution repose non pas sur le maintien de la taille, mais sur la réduction de la fuite du soluté encapsulé. Contrairement aux phosphatidylcholines naturelles, l'HSPC est plus stable et plus résistant aux phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation. Durant la lyophilisation, les lipides rigides que l'on retrouve en grande quantité dans l'HSPC, ne subissent pas de phase de transition, car ceux-ci restent à l'état gel durant tout le processus. Les conséquences délétères des phases de transition ainsi évitées, le relargage de principe actif serait alors uniquement dû à la fusion liposomale. En revanche, les liposomes constitués de phosphatidylcholines naturelles peuvent être à la fois déstabilisés par la fusion et le changement de phase. Ainsi, l'EPC ($T_m = -10^\circ\text{C}$ à l'état hydraté, 41°C à l'état non hydraté) subit une phase de séparation durant la lyophilisation.

Par ailleurs, notre travail confirme que la vitesse de congélation est un paramètre clé à optimiser dans le cas des phosphatidylcholines hydrogénées. Un meilleur maintien de la taille a été constaté lorsqu'un mode de congélation lente était appliqué aux liposomes en HSPC en présence de tréhalose en accord avec la littérature. Il a été largement démontré que les liposomes à bicouches rigides sont

plus enclins à être endommagés par une congélation rapide que lente (van Winden, 2003, Zuidam et al., 2002). En ce qui concerne les liposomes à bicouches flexibles (phosphatidylcholines fluides naturelles), une congélation lente n'apporte pas de bénéfices en comparaison d'une congélation rapide (van Winden et al., 1997). Certains auteurs ont même relevé une augmentation de la taille plus importante avec une congélation lente (Siow et al., 2007). Néanmoins, selon nos données expérimentales, l'influence de la vitesse de congélation, semblait diminuer au fur et à mesure que la concentration de disaccharides augmentait. En effet, plus le ratio lyop/lip était élevé, plus les résultats obtenus après congélation lente et rapide se rejoignaient avec les liposomes formulés avec l'HSPC.

***Influence du lyoprotecteur**

Le saccharose et le tréhalose ont été sélectionnés parmi les hydrates de carbones car les disaccharides sont plus efficaces que les monosaccharides. Comme cela a été détaillé dans la partie bibliographique, le mécanisme de protection repose sur la formation d'une matrice amorphe qui prévient les fusions et la formation de cristaux de glace. Les lyoprotecteurs protègent les liposomes, non seulement durant la congélation, mais aussi durant la dessiccation. Dans cette étape de dessiccation, les lyoprotecteurs remplacent l'eau en établissant des liaisons avec les groupements phosphates des phosphatidylcholines (Tsvetkova et al., 1998, Cacula and Hinch, 2006, Hinch et al., 2003).

Pour mettre en évidence l'influence de la nature du lyoprotecteur, la variation de la taille avant et après lyophilisation a été recherchée, avec les trois types de phosphatidylcholines.

Des résultats contradictoires ont été notés sur la nature du meilleur lyoprotecteur à utiliser selon la phosphatidylcholine. En effet, pour les phosphatidylcholines naturelles (respectivement SPC et EPC), des ratios plus élevés en tréhalose/lipide étaient nécessaires versus saccharose/lipide pour aboutir à une stabilisation équivalente de la taille. A l'inverse avec l'HSPC, le tréhalose est apparu plus efficace, mettant ainsi en évidence l'influence des différences entre phosphatidylcholines naturelles et hydrogénées. Dans le cas de l'HSPC, la supériorité du tréhalose serait due à une température de transition vitreuse T_g plus élevée pour le tréhalose (113°C) que pour le saccharose (65°C) (Crowe et al., 1996). En outre, nos expériences ont montré un comportement différent des liposomes HSPC pour lesquels une congélation rapide menait à une augmentation de la taille, quel que soit le lyoprotecteur utilisé, tandis qu'avec une congélation lente, le tréhalose apporterait une meilleure protection. Néanmoins, pour les liposomes d'HSPC, les tests ont été menés jusqu'au ratio 25:1 pour les deux lyoprotecteurs, sans pour autant trouver un ratio réellement optimal.

2.3 Perspectives de poursuite de développement d'une forme lyophilisée de liposomes d'ATP

Par rapport à nos objectifs, la principale problématique résultait de la fuite de l'agent encapsulé. Le tréhalose et le saccharose permettaient d'éviter l'augmentation de la taille, mais n'ont pas prévenu la fuite de la calcéine ou de l'ATP. Dans le cadre de notre étude, l'inhibition de la fusion a été efficace mais une transition de phase constante a probablement provoqué un relargage partiel. De plus, comme cela a été suggéré par Siow, la formation de glace extraliposomale et le processus de transition de phase se déroulent à la même température, entre -5°C et -10°C, ce qui est responsable de la fuite observée (Siow et al., 2007).

Le mécanisme de relargage reste encore mal explicité, car la fusion des membranes et l'abolition des phases de transition ne sont pas les seuls phénomènes contribuant à la fuite. Néanmoins, il ressort que le ratio nécessaire pour prévenir la fuite est parfois très supérieur à celui permettant le maintien de la taille. C'est ainsi que pour des liposomes EPC, Cacela et Hinch a noté que pendant la dessiccation, une plus grande quantité de lyoprotecteur était requise pour réduire la fuite que pour prévenir la fusion membranaire (Cacela and Hinch, 2006). Des résultats similaires ont été trouvés par Crowe avec des liposomes POPC dont la fuite était prévenue par une concentration en tréhalose plus de 10 fois supérieure à la concentration requise pour prévenir la fusion (Crowe et al., 1985). Seulement dans notre cas, l'augmentation du ratio lyop/lip pouvant induire une plus grande rétention, était limitée car elle aurait abouti à une valeur trop élevée de l'osmolarité. On pourrait également envisager une distribution asymétrique du lyoprotecteur des deux côtés de la membrane. Dans notre formulation, la concentration de lyoprotecteur était identique à l'intérieur comme à l'extérieur du liposome, comme cela est généralement le cas dans la littérature. Une modification de la température de transition de phase secondaire à une répartition asymétrique du lyoprotecteur pourrait contribuer à modifier le mécanisme de relargage (Ohtake et al., 2006). Ainsi, Crowe a mis en évidence un effet positif de la distribution asymétrique du tréhalose pour limiter les phénomènes de fuite avec des liposomes POPC (Crowe and Crowe, 1988).

D'autres stratégies se focalisent spécifiquement sur l'étape de réhydratation qui pourrait causer une fuite significative. Des expériences de "leak in" menées par Zhang et al. (Zhang et al., 1997) ont déterminé la pénétration liposomale d'un traceur hydrosoluble initialement solubilisé dans la solution de réhydratation. Cette technique étudie la perméabilité de la bicouche liposomale lors de la reconstitution et permet de comparer différents types de reconstitution. Elle possède l'avantage d'être simple mais reste éloignée du modèle expérimental.

Enfin, une optimisation des paramètres de la lyophilisation sur les formules maintenant la taille des liposomes pourrait contribuer à limiter la fuite de l'ATP. Cette évaluation correspond, par ailleurs, à la dernière étape préconisée par van Winden (van Winden, 2003). Selon les données disponibles dans la littérature, les paramètres physicochimiques du cycle de lyophilisation offrent de nombreuses

perspectives d'optimisation. L'abaissement des températures du produit et de la pression (<1 Pa) (Sweeney et al., 2005, Wang et al., 2006b) pourrait constituer un axe de développement. Par ailleurs, l'allongement de la durée de la dessiccation primaire jusqu'à 48 heures a été réalisé par certains auteurs (Alexopoulou et al., 2006, Cui et al., 2006, Li and Deng, 2004, Wang et al., 2006b). Enfin, la littérature fait part également de diverses expériences où la dessiccation secondaire est menée à de très faibles pressions (0,4 Pa) (Sweeney et al., 2005, Suzuki et al., 1996).

3 Contribution à l'évaluation de liposomes d'ATP

La principale contribution de ce volet a été de proposer un modèle cellulaire pour étudier l'interaction développée avec les liposomes vectorisés. En se basant sur les travaux antérieurs, la première phase d'évaluation de formes innovantes tels que les liposomes est généralement conduite à l'aide de culture cellulaire. Les modèles hépatiques les plus fréquemment utilisés sont les hépatocytes primaires de rat et la lignée HepG2 dont les différences ont été présentées dans la partie bibliographique. Le modèle HepG2 est souvent retenu dans les études du fait de la simplicité de sa mise en œuvre. Celui-ci a été utilisé dans le cadre de la publication de Tep et al. (participation en tant que 6^{ème} auteur) (Tep et al., 2009). Ce premier travail a mis en évidence non seulement un problème d'instabilité des liposomes à moyen terme mais également un manque de sensibilité du modèle HepG2 cultivé en conditions optimales. Les critères analysés ont été la quantification de l'incorporation cellulaire de DOPE-Rhodamine (i.e. marqueur de l'interaction) et le taux intracellulaire d'ATP (i.e. critère d'efficacité recherché *in fine*).

Brièvement, **l'originalité de ce premier travail** a été d'évaluer pour la première fois des liposomes vectorisés encapsulant l'ATP sur une culture cellulaire hépatique. Par le passé, rarement, des liposomes d'ATP avaient été mis en contact de culture cellulaire. Des liposomes d'ATP avaient été étudiés avec des cellules endothéliales humaines préalablement traitées par LPS et interféron γ (Han et al., 2001) ou avec des spermatozoïdes (Skiba-Lahiani et al., 1995).

La contribution scientifique de ce premier travail a été de proposer un plan de développement pharmacotechnique et d'évaluation cellulaire susceptible de valider l'efficacité *in vitro* de forme liposomale vectorisée. Il décrit la synthèse d'un ligand original le Lact-ligand et définit une méthode originale de quantification de la DOPE-Rhodamine qui permet une comparaison des différentes formules entre elles. Néanmoins, il n'a pas été retrouvé d'interaction spécifique (ou très limitée) avec la cellule HepG2 par rapport à des liposomes dépourvus de Lact-ligand. Il est possible que le ratio de Lac-ligand dans la composition liposomale (i.e. 2,5%) n'ait pas été suffisant pour interagir efficacement. En outre, les taux intracellulaires en ATP n'ont pas été modifiés, très certainement au regard des concentrations initialement très élevées des cellules cultivées en conditions optimales.

La poursuite de ce premier travail est liée à l'élaboration de notre plan expérimental et reprend le projet au niveau à l'étape 7(d) du Tableau 9. Un certain nombre de phases ont été finalisées comme la définition de la composition liposomale et la synthèse d'un ligand incorporé durant la phase de mélange des lipides et dont l'accessibilité a été vérifiée avec la ricine. La phase suivante d'évaluation

sur culture cellulaire a clairement suggéré que le modèle standard de cellules HepG2 en conditions optimales de culture n'apportait pas le niveau de sensibilité nécessaire à un apport exogène d'ATP. En effet, en condition de conservation du greffon, les taux d'ATP diminuent de façon considérable. L'objectif du second article traitant de l'évaluation des liposomes d'ATP répond à cette attente. Il a été émis l'hypothèse que la mise en présence des liposomes d'ATP avec des cellules « appauvries » en ATP permettrait de détecter de manière plus sensible un effet bénéfique des liposomes. Ainsi, plusieurs axes ont été explorés afin de réduire les taux d'ATP intracellulaire, sans altérer notablement la viabilité. L'etomoxir (Eto) a retenu notre attention afin d'atteindre notre objectif. L'Eto, inhibiteur de la carnitine palmitoyl transférase, bloque l'entrée des acides gras à chaînes longues dans la mitochondrie et leur β -oxydation (Ratheiser et al., 1991). Certains auteurs ont montré que l'Eto diminuait l'ATP sans altérer la viabilité cellulaire. Une concentration à 0,5mM avait entraîné à T_{24h} une diminution de l'ATP de 84% sans altérer la viabilité (Merrill et al., 2002). Ce modèle a fait l'objet d'une validation dans le cadre de notre projet.

3.1 Originalité du modèle des cultures cellulaires HepG2 altérées par l'ajout d'agent interférent

L'originalité de notre travail repose sur les caractéristiques du modèle décrit comme altérant spécifiquement le statut énergétique en le combinant avec un autre facteur de stress important lors de la conservation du greffon : l'hypothermie. Il s'agissait aussi de préciser la concentration en Eto qui pouvait le mieux altérer spécifiquement le niveau énergétique. En outre, ce travail visait à valider ce modèle en le comparant avec un agent oxydant de référence, le *ter*-butyl hydroperoxyde (tbooh). Comme le H₂O₂, le tbooh favorise la peroxydation lipidique en entraînant la formation des espèces réactives de l'oxygène, dont le peroxyde d'hydrogène (Alia et al., 2005, Soszynski and Bartosz, 1997, Kim et al., 1998, Zhang et al., 2007). Le tbooh favorise également l'apoptose des cellules HepG2 par l'intermédiaire de l'accumulation du calcium (Kim et al., 1998). La concentration intracellulaire de ce cation conduit à augmenter la perméabilité des pores au niveau de la mitochondrie, à la libération du cytochrome c et à l'activation de la capsase (Kim et al., 2003). Il diminue le stock de GSH et les taux de protéines à groupement thiol et favorise l'augmentation des enzymes du stress oxydant (GSH peroxydase, GSH réductase, catalase et superoxyde dismutase).

Nos critères d'évaluation correspondaient à la viabilité (MTT test), un marqueur de la croissance cellulaire (taux de protéines) et au statut énergétique (taux intracellulaire en ATP).

3.2 Contribution scientifique à l'étude des cultures cellulaires HepG2 altérées par l'ajout d'agent interférent

En premier lieu, nous avons confirmé que la diminution de la température induisait un stress intense dès 20°C et a conduit à une destruction totale des cellules à 4°C. L'ajout des agents interférents n'avaient pas d'effet spécifique mais ont toutefois accéléré la diminution du statut énergétique et de la mortalité cellulaire. Ceci a pu être mis en évidence à une température intermédiaire (20°C) et à un temps précoce (T_{5h}).

L'influence de la concentration et du temps d'exposition à l'Eto a pu être définie. Il a été retrouvé un effet concentration dépendant vis-à-vis de l'Eto sur les différents paramètres. A 37°C, la plus faible concentration susceptible d'avoir un effet « toxique » fut 0,25 mM (T_{24h}, MTT Test) tandis que pour obtenir une action sur tous les paramètres dès T_{5h}, une concentration de 1 mM était requise. Toutefois, l'interaction entre la température et la concentration en Eto était plus difficile à mettre en évidence à 20°C et 4°C.

Le profil d'altération lié aux deux agents était proche, les taux d'ATP et la viabilité étant le plus souvent très fortement corrélés. Le tbooh n'a été testé qu'à une seule concentration (i.e. 0,2 mM). Cette dernière est généralement retenue pour induire des altérations proches de celles dues aux espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont générées lors de l'ischémie qui se produit lors de la reperfusion (Haidara et al., 2008, Haidara et al., 2002, Kim et al., 1998). Les données expérimentales observées avec le tbooh étaient intéressantes vis-à-vis de nos objectifs car celui induisait une altération plus spécifique sur le statut énergétique à 37°C, T_{5h}. Dans ces conditions, le taux d'ATP était diminué d'un facteur 2,4 tandis que la viabilité n'était affectée que d'un tiers environ. Cela confirme que cet agent interfère avec le statut énergétique des cellules. Le tbooh est, par ailleurs, connu pour inhiber la phosphorylation oxydative (Krivakova et al., 2007).

L'action en partie oxydative de l'Eto rend compte de la similitude entre les deux agents mais sa cible pharmacologique reste complexe et encore mal définie à ce jour. Le développement de l'Eto comme principe actif potentiel a été précocement stoppé du fait d'effets indésirables d'ordre cardiaque ou hépatique (Merrill et al., 2002, Vickers, 2009, Yotsumoto et al., 2000, Vetter et al., 1995). Nos travaux ont abouti à deux éléments d'intérêt concernant l'Eto :

(i) Certaines concentrations (e.g. Eto 0,5 mM) ont conduit à 37°C à diminuer de façon particulièrement marquée et corrélée la viabilité et le statut énergétique. Cette donnée est, cependant, en contradiction avec celles de Merrill et al qui avait retrouvé une action spécifique sur les taux d'ATP et non sur la viabilité. Il faut souligner que les auteurs avaient évalué la viabilité grâce à la mesure de l'activité enzymatique des LDH. A la différence du dosage des LDH, qui traduit la souffrance cellulaire et la nécrose, le test au MTT reflète la viabilité des cellules par leur activité

mitochondriale et constitue un marqueur plus précoce de la toxicité cellulaire et plus particulièrement de la toxicité mitochondriale. L'Eto favorise également une diminution du rapport glutathion (GSH) réduit et oxydé mais le mécanisme par lequel l'Eto entraîne une diminution des taux d'ATP n'est pas élucidé à ce jour. Celle-ci pourrait s'expliquer, selon les auteurs, par une inhibition de la phosphorylation oxydative liée à une diminution du potentiel de membrane. Par ailleurs, l'Eto serait à l'origine d'une augmentation des esters d'acétyl-coA, qui sont des inhibiteurs potentiels de l'enzyme de la translocation des nucléotides adénosine dans la mitochondrie et favoriserait donc une diminution de l'entrée de l'ADP.

(ii) L'Eto fournit selon la concentration utilisée et le temps un vaste panel d'altération. Contrairement au tbooh, une toxicité cellulaire est apparue plus précocement que l'altération de l'état énergétique (Eto 1 mM, 37°C) ce qui est à mettre en relation avec l'hépatotoxicité retrouvée avec l'Eto lors du développement de cet agent (Merrill et al., 2002, Vickers, 2009, Yotsumoto et al., 2000, Vetter et al., 1995). Cet effet a été temps-dépendant avec une nette dégradation entre T_{5h} et T_{24h}.

3.3 Perspectives de poursuite de modèle à statut énergétique altéré

Par rapport à nos objectifs de départ, il n'a pas été possible de mettre en place un modèle cellulaire dont le seul statut énergétique serait altéré avec les HepG2 en présence d'Eto. Les modèles étudiés avec l'Eto ou le tbooh décrivaient, néanmoins, différentes atteintes du niveau énergétique et de la viabilité temps en fonction de leur concentration respective, de la durée d'incubation et de la température.

De manière générale, l'altération du statut énergétique déborde largement de la problématique de la conservation du greffon hépatique. Une diminution précoce de l'ATP est en effet retrouvée dans de nombreux contextes d'hépatotoxicité comme cela a été décrit lors de l'intoxication aigue au diclofénac (Bort et al., 1999). Il est donc nécessaire de mettre en place des modèles cellulaires reproduisant une altération précoce du statut énergétique. Les agents oxydants comme le tbooh et dans une certaine mesure l'Eto sont des modèles intéressants. Toutefois, les conditions expérimentales doivent être précisées avec exactitude car la spécificité de l'atteinte initiale énergétique n'est pas évidente à obtenir. La corrélation entre l'ATP et la viabilité du test au MTT a fait l'objet de publications et ces deux tests ne sont pas toujours substituables l'un à l'autre (Ulukaya et al., 2008). La baisse d'ATP semble être un marqueur plus précoce de souffrance cellulaire que la détermination de la viabilité (Castell et al., 1997).

Ces travaux doivent être poursuivis afin de se rapprocher de notre modèle expérimental. Ce modèle expérimental prend en compte une combinaison de stress comme l'abaissement de la température, l'hypoxie ou encore le stress oxydant. Un autre élément à prendre en compte est le fait que le greffon est mis en contact avec des milieux de culture comme la solution UW. Un travail ayant servi de thèse d'exercice a initié la réflexion sur l'intérêt de substituer le milieu de culture avec une solution de conservation mais a présenté ses limites (Vincourt, 2010). Au cours de ce travail, il a été retrouvé un impact positif de cette substitution comme cela pouvait être prévu d'après les données de la littérature (Pradeau et al., 2008, Southard et al., 1990, Pisarenko et al., 1985, Nardo et al., 2001, Karam et al., 2005). Il a également confirmé l'intérêt de l'ajout extemporané de GSH considéré comme un agent clé dans la composition de ces solutions (Guyomard et al., 1990, Vreugdenhil et al., 1991, Astier and Paul, 1989).

Un axe d'évaluation novateur pourrait consister à combiner plusieurs stress comme la substitution du milieu par une solution de conservation avec l'ajout de faible dose en agent interférent. Néanmoins à ce stade du projet, deux modèles cellulaires semblent s'imposer : l'un consisterait à poursuivre les investigations concernant l'ajout d'un agent agissant spécifiquement sur le statut énergétique et l'autre correspondrait à un modèle proche des conditions de la conservation du greffon associant hypothermie et hypoxie. Un modèle pertinent a été développé par Janssen et al. sur des hépatocytes humains (Janssen et al., 2003). Cette équipe a relevé une nécrose cellulaire, une dysfonction mitochondriale et une diminution d'ATP globalement similaires pour les solutions Celsior[®] et UW, avec une légère supériorité de la solution UW, qui se manifeste par des taux d'ATP augmentés d'au moins 50% par rapport à la solution Celsior[®], aux différents temps de l'ischémie. Ces différents modèles sont en réalité complémentaires. Le premier pourrait sélectionner les agents ou les formulations d'intérêt sur cellule HepG2 en recherchant les interactions et leur capacité à normaliser un statut énergétique préalablement altéré. Le second sur cellule hépatocytaire humaine est plus délicat à mettre en place dans le cadre d'un screening et serait réservé aux formulations d'intérêt car plus proche des conditions de conservation.

CONCLUSION

Cette thèse constitue une contribution au projet d'amélioration du statut énergétique de la cellule hépatique. La viabilité du greffon au cours de sa conservation est liée à son niveau énergétique dont les taux en ATP sont un bon reflet. Notre travail a rappelé successivement l'intérêt de la thématique de la greffe hépatique, le rôle joué par l'ATP et la nécessité d'un apport vectorisé pour restaurer le statut énergétique des hépatocytes.

Notre hypothèse de travail repose sur les travaux antérieurs menés sur des liposomes d'ATP en particulier sur le modèle d'ischémie cardiaque. Néanmoins, les phénomènes qui sont à l'origine de la perte de viabilité du greffon hépatique au cours de sa conservation sont de nature différente. Il est nécessaire de prendre en compte ces spécificités, en particulier l'hypoxie et l'hypothermie.

Un plan expérimental a été élaboré en une dizaine d'étapes qui comportent une phase de formulation puis d'évaluation *in vitro* puis *in vivo* des liposomes. Ces différentes phases ont pu être réalisées en raison de la pluridisciplinarité du laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique et de l'Imagerie, UMR 8151 CNRS - U1022 Inserm. Cette plateforme associe des compétences dans les nanotechnologies sur un plan pharmacotechnique, chimique et biologique. Cette unité a interagi avec la thématique développée par le secteur hospitalier via l'Unité de Recherche et Développement Galénique de l'AGEPS en relation avec le Laboratoire de Biologie de la Nutrition. La phase de formulation a conduit à retenir une forme de taille et de potentiel zêta adaptés incluant un ligand original aux ASGPr. Notre participation à ce projet est directement liée à deux problématiques majeures que l'on rencontre classiquement avec les liposomes, l'instabilité physicochimique et l'évaluation de l'interaction développée avec les cellules. Ces deux étapes sont en effet critiques dans le cadre des aspects recherche et développement du sujet. Des éléments ont été apportés à ces deux thématiques en précisant le rôle de certains paramètres clés au cours de la lyophilisation et en présentant des modèles HepG2 altérés par l'ajout d'agent interférant.

De nombreuses poursuites à ces travaux ont été proposées dans ce document afin de réduire la fuite de l'ATP lors de la lyophilisation et de rapprocher le modèle cellulaire des conditions expérimentales. Néanmoins, l'apport d'ATP sous forme de liposome, certes prometteur, reste confronté à nombreux challenges sur le plan technique mais également biologique. Une réflexion a été ainsi initiée au sein du laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique et de l'Imagerie sur d'autres stratégies afin d'améliorer le statut énergétique du greffon. L'ARN interférence, comme nouvelle approche thérapeutique, correspond à un angle de recherche très intéressant pour prévenir l'apoptose et le rejet de greffe. Dernièrement, il a été rapporté plusieurs cibles vers lesquelles les siRNA pourraient

être dirigés, en particulier certaines capsases. Des formulations innovantes à base de lipoplexe ont été développées au sein de ce laboratoire, qui pourraient être mises à profit dans le cadre de cette thématique. Ces formes pourraient bénéficier d'un ciblage par l'incorporation de ligand spécifique galactosylé. De manière similaire aux liposomes d'ATP, un plan expérimental de développement et d'évaluation pourrait être élaboré sur ces formes vectorisées comportant un volet de stabilité et d'évaluation sur cellule.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Agence_de_Biomédecine 2009. Bilan des activités de prélèvement et de greffe en France en 2008.
- 2) Alexopoulou, E., Georgopoulos, A., Kagkadis, K. A. & Demetzos, C. 2006. Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. *J Liposome Res*, 16, 17-25.
- 3) Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L. & Goya, L. 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol*, 19, 119-28.
- 4) Angell, C. A. 2002. Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. *Chem Rev*, 102, 2627-50.
- 5) Arakawa, A., Ishiguro, S., Ohki, K. & Tamai, M. 1998. Preparation of liposome-encapsulating adenosine triphosphate. *Tohoku J Exp Med*, 184, 39-47.
- 6) Arangoa, M. A., Duzgunes, N. & Tros de Ilarduya, C. 2003. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Ther*, 10, 5-14.
- 7) Aso, Y. & Yoshioka, S. 2005. Effect of freezing rate on physical stability of lyophilized cationic liposomes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 53, 301-4.
- 8) Astier, A. & Paul, M. 1989. Instability of reduced glutathione in commercial Belzer cold storage solution. *Lancet*, 2, 556-7.
- 9) Bandyopadhyay, P., Ma, X., Linehan-Stieers, C., Kren, B. T. & Steer, C. J. 1999. Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem*, 274, 10163-72.
- 10) Barlovatz-Meinmon, G. & Adolphe, M. 2003. Culture de cellules animales. In: éd., N. (ed.) *Culture de cellules animales*. Paris: INSERM.
- 11) Behari, J. R. & Nihal, M. 2000. Galactosylated liposomes as carriers for targeting meso-2,3-dimercaptosuccinic acid to cadmium storage sites in cadmium exposed mice. *Ind Health*, 38, 408-12.
- 12) Belghiti, J. 2002. [Adult living donor liver transplantation: why and how?]. *Gastroenterol Clin Biol*, 26, 1085-7.

- 13) Berna-Biotech 2007a. Epaxal[®], Information professionnelle du Compendium Suisse des Médicaments. Berne, Suisse.
- 14) Berna-Biotech 2007b. Inflexal[®] V, Information professionnelle du Compendium Suisse des Médicaments. Berne, Suisse.
- 15) Berry, M. & Friend, D. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.*, 43, 506-520.
- 16) Bianucci, A. M. & Chiellini, F. 2000. A 3D model for the human hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). *J Biomol Struct Dyn.*, 18, 435-51.
- 17) Biessen, E. A., Bakkeren, H. F., Beuting, D. M., Kuiper, J. & Van Berkel, T. J. 1994. Ligand size is a major determinant of high-affinity binding of fucose- and galactose-exposing (lipo)proteins by the hepatic fucose receptor. *Biochem J.*, 299, 291-6.
- 18) Birraux, J., Genin, B., Matthey-Doret, D., Mage, R., Morel, P. & Le Coultre, C. 2002. Hepatocyte cryopreservation in a three-dimensional structure. *Transplant Proc*, 34, 764-7.
- 19) Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gomez-Lechon, M. J. & Castell, J. V. 1999. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 288, 65-72.
- 20) Boudjema, K., Van Gulik, T. M., Lindell, S. L., Vreugdenhil, P. S., Southard, J. H. & Belzer, F. O. 1990. Effect of oxidized and reduced glutathione in liver preservation. *Transplantation*, 50, 948-51.
- 21) Bridges, P. A. & Taylor, K. M. 2001. The effects of freeze-drying on the stability of liposomes to jet nebulization. *J Pharm Pharmacol*, 53, 393-8.
- 22) Brokelman, W., Stel, A. L. & Ploeg, R. J. 1999. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation in the University of Wisconsin solution era. *Transplant Proc*, 31, 2087-90.
- 23) Cacela, C. & Hinch, D. K. 2006. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. *Biophys J*, 90, 2831-42.
- 24) Calne, R. Y., Dunn, D. C., Herbertson, B. M., Gordon, E. M., Bitter-Suermann, H., Robson, A. J., Macdonald, A. S., Davis, D. R., Smith, D. P., Reitter, F. H. & Webster, L. M. 1972. Liver preservation by single passage hypothermic "squirt" perfusion. *Br Med J*, 4, 142-4.
- 25) Carriere, M., Escriou, V., Jollet, A., Scherman, D., Azoulay, M. & Monneret, C. 2004. New synthetic glycolipids for targeted gene transfer: synthesis, formulation in lipoplexes and specific interaction with lectin. *Drug Deliv*, 11, 351-63.

- 26) Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X. & Bort, R. 1997. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cell Biol Toxicol*, 13, 331-8.
- 27) Cavatur, R. K., Vemuri, N. M., Pyne, A., Chrzan, Z., Toledo-Velasquez, D. & Suryanarayanan, R. 2002. Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solutions. *Pharm Res*, 19, 894-900.
- 28) Cervenkova, K., Belejova, M., Vesely, J., Chmela, Z., Rypka, M., Ulrichova, J., Modriansky, M. & Maurel, P. 2001. Cell suspensions, cell cultures, and tissues slices-important metabolic in vitro systems. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 145, 57-60.
- 29) Chaib, S., Charrueau, C., Neveux, N., Coudray-Lucas, C., Cynober, L. & De Bandt, J. P. 2004. Isolated perfused liver model: the rat and guinea pig compared. *Nutrition*, 20, 458-64.
- 30) Chaib, S., Charrueau, C., Neveux, N., Nakib, S., Chaumeil, J. C., Cynober, L. & De Bandt, J. P. 2003. Effect of apoE/ATP-containing liposomes on hepatic energy state. *Liver Int*, 23, 379-85.
- 31) Chapat, S., Frey, V., Claperon, N., Bouchaud, C., Puisieux, F., Couvreur, P., Rossignol, P. & Delattre, J. 1991. Efficiency of liposomal ATP in cerebral ischemia: bioavailability features. *Brain Res Bull*, 26, 339-42.
- 32) Chen, C., Han, D., Cai, C. & Tang, X. 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release*, 142, 299-311.
- 33) Christensen, D., Foged, C., Rosenkrands, I., Nielsen, H. M., Andersen, P. & Agger, E. M. 2007. Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 2120-9.
- 34) Clarke, B. L. & Weigel, P. H. 1985. Recycling of the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. ATP depletion blocks receptor recycling but not a single round of endocytosis. *J Biol Chem*, 260, 128-33.
- 35) Cremer, K. 2006. *APV Focus Group Drug Delivery* [Online]. Available: http://www.apv-mainz.de/fachgruppen/drugdel/APV_Newsletter_DrugDelivery_1_06.pdf.
- 36) Crowe, J. H. & Crowe, L. M. 1988. Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 939, 327-34.
- 37) Crowe, J. H., Leslie, S. B. & Crowe, L. M. 1994. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology*, 31, 355-66.
- 38) Crowe, J. H., Oliver, A. E., Hoekstra, F. A. & Crowe, L. M. 1997. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. *Cryobiology*, 35, 20-30.

- 39) Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C. & Appel, L. 1985. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch Biochem Biophys*, 242, 240-7.
- 40) Crowe, L. M., Reid, D. S. & Crowe, J. H. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J*, 71, 2087-93.
- 41) Cui, J., Li, C., Deng, Y., Wang, Y. & Wang, W. 2006. Freeze-drying of liposomes using tertiary butyl alcohol/water cosolvent systems. *Int J Pharm*, 312, 131-6.
- 42) Daoust 1958. The cell population of liver tissue and the cytological reference base. *Ann. Inst. Biol. Sci. Publ.*, 4, 3-10.
- 43) Desangle, V. 1992. Recherche d'un phénomène d'induction des cytochromes P450 par un xénobiotique: utilisation d'hépatocytes de rat adulte en culture cellulaire. Paris.
- 44) El-Wahsh, M. 2007. Liver graft preservation: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 6, 12-6.
- 45) Enat, R., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, L. A. & Reid, L. M. 1984. Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1411-5.
- 46) Endo-Pharmaceuticals 2006. Depodur[®] (morphine sulfate extended-release liposome injection). Chadds Ford, Etats-Unis.
- 47) Frajeville, F. 1994. *Lyophilisation des liposomes*. Paris 11.
- 48) Frisch, B., Carriere, M., Largeau, C., Mathey, F., Masson, C., Schuber, F., Scherman, D. & Escriou, V. 2004. A new triantennary galactose-targeted PEGylated gene carrier, characterization of its complex with DNA, and transfection of hepatoma cells. *Bioconjug Chem*, 15, 754-64.
- 49) Fumoto, S., Kawakami, S., Shigeta, K., Higuchi, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. 2005. Interaction with blood components plays a crucial role in asialoglycoprotein receptor-mediated in vivo gene transfer by galactosylated lipoplex. *J Pharmacol Exp Ther*, 315, 484-493.
- 50) Gates, G., Henley, K., Pollard, H., Schmidt, E. & Schmidt, F. 1961. The cell population of human liver. *J Lab Clin Med.*, 57, 182-4.
- 51) Gatmaitan, Z., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Biempica, L., Arias, I. M., Dudas, G., Leinwand, L. A. & Reid, L. M. 1983. Regulation of growth and differentiation of a rat hepatoma cell line by the synergistic interactions of hormones and collagenous substrata. *J Cell Biol*, 97, 1179-90.
- 52) Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J. & Schwartz, A. L. 1983. The pathway of the asialoglycoprotein-ligand during receptor-mediated endocytosis: a

morphological study with colloidal gold/ligand in the human hepatoma cell line, Hep G2. *Eur J Cell Biol.*, 32, 38-44.

- 53) Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S. & Hincal, A. A. 2005. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *Int J Pharm*, 291, 79-86.
- 54) Gordon, J. L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 233, 309-19.
- 55) Goulet, F., Normand, C. & Morin, O. 1988. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology*, 8, 1010-8.
- 56) Gregoriadis, G. 1993. *Liposome Technology*, Londres, Royaume Uni, CRC.
- 57) Grewal, H. P., Willingham, D. L., Nguyen, J., Hewitt, W. R., Taner, B. C., Cornell, D., Rosser, B. G., Keaveny, A. P., Aranda-Michel, J., Satyanarayana, R., Harnois, D., Dickson, R. C., Kramer, D. J. & Hughes, C. B. 2009. Liver transplantation using controlled donation after cardiac death donors: an analysis of a large single-center experience. *Liver Transpl*, 15, 1028-35.
- 58) Griffin, E. & Miller, L. 1973. Effects of hypothyroidism, hyperthyroidism, and thyroxine on net synthesis of plasma proteins by the isolated perfused rat liver. *J Biol Chem*, 248, 4716-4726.
- 59) Guyomard, C., Chesne, C., Meunier, B., Fautrel, A., Clerc, C., Morel, F., Rissel, M., Campion, J. P. & Guillouzo, A. 1990. Primary culture of adult rat hepatocytes after 48-hour preservation of the liver with cold UW solution. *Hepatology*, 12, 1329-36.
- 60) Haidara, K., Marion, M., Gascon-Barre, M., Denizeau, F. & Averill-Bates, D. A. 2008. Implication of caspases and subcellular compartments in tert-butylhydroperoxide induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 229, 65-76.
- 61) Haidara, K., Morel, I., Abalea, V., Gascon Barre, M. & Denizeau, F. 2002. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1542, 173-85.
- 62) Han, Y. Y., Huang, L., Jackson, E. K., Dubey, R. K., Gillepsie, D. G. & Carcillo, J. A. 2001. Liposomal atp or NAD⁺ protects human endothelial cells from energy failure in a cell culture model of sepsis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 110, 107-16.
- 63) Harrigan, P. R., Madden, T. D. & Cullis, P. R. 1990. Protection of liposomes during dehydration or freezing. *Chem Phys Lipids*, 52, 139-49.

- 64) Hattori, Y., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2000. Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting. *J Control Release*, 69, 369-377.
- 65) Hays, L. M., Crowe, J. H., Wolkers, W. & Rudenko, S. 2001. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology*, 42, 88-102.
- 66) Higuchi, Y., Kawakami, S., Fumoto, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2006. Effect of the particle size of galactosylated lipoplex on hepatocyte-selective gene transfection after intraportal administration. *Biol Pharm Bull*, 29, 1521-1523.
- 67) Hinch, D. K., Zuther, E., Hellwege, E. M. & Heyer, A. G. 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology*, 12, 103-10.
- 68) Hinch, D. K., Zuther, E. & Heyer, A. G. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta*, 1612, 172-7.
- 69) Hou, X. P., Wang, L., Wang, X. T. & Li, S. 2003. [Study on the hepatocytic cell targetability of liposomes]. *Yao Xue Xue Bao*, 38, 143-146.
- 70) Inex-Pharmaceuticals & Enzon-Pharmaceuticals 2004. Oncologic Drugs Advisory Committee, Marqibo.
- 71) INSERM, E. c. 2009. *Transplantations d'organe, quelles voies de recherche?*, Paris.
- 72) Iobst, S. T. & K., D. 1996. Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors. *J Biol Chem.*, 271, 6686-93.
- 73) Janssen, H., Janssen, P. H. & Broelsch, C. E. 2003. Celsior solution compared with University of Wisconsin solution (UW) and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) in the protection of human hepatocytes against ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int*, 16, 515-22.
- 74) Jin, Y., Li, J., Rong, L. F., Li, Y. H., Guo, L. & Xu, S. Y. 2005a. Anti-hepatocarcinoma effects of 5-fluorouracil encapsulated by galactosylceramide liposomes in vivo and in vitro. *World J Gastroenterol*, 11, 2643-6.
- 75) Jin, Y., Li, J., Rong, L. F., Lu, X. W., Huang, Y. & Xu, S. Y. 2005b. Pharmacokinetics and tissue distribution of 5-fluorouracil encapsulated by galactosylceramide liposomes in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 26, 250-6.
- 76) Jousset, N., Jacob, J. P., Gaudin, A., Mauillon, D., Penneau, M. & Rouge-Maillart, C. 2009. [Recovery of transportable organs after cardiac arrest]. *Presse Med*, 38, 740-4.

- 77) Karam, G., Compagnon, P., Hourmant, M., Despins, P., Duveau, D., Noury, D. & Boudjema, K. 2005. A single solution for multiple organ procurement and preservation. *Transpl Int*, 18, 657-63.
- 78) Kawakami, S., Hattori, Y., Lu, Y., Higuchi, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. 2004. Effect of cationic charge on receptor-mediated transfection using mannosylated cationic liposome/plasmid DNA complexes following the intravenous administration in mice. *Pharmazie*, 59, 405-8.
- 79) Kawakami, S., Munakata, C., Fumoto, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2000a. Targeted delivery of prostaglandin E1 to hepatocytes using galactosylated liposomes. *J Drug Target*, 8, 137-42.
- 80) Kawakami, S., Munakata, C., Fumoto, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2001. Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs. *J Pharm Sci*, 90, 105-13.
- 81) Kawakami, S., Wong, J., Sato, A., Hattori, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. 2000b. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta*, 1524, 258-265.
- 82) Kawakami, S., Yamashita, F., Nishikawa, M., Takakura, Y. & Hashida, M. 1998. Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 78-83.
- 83) Kawano, K., Nakamura, K., Hayashi, K., Nagai, T., Takayama, K. & Maitani, Y. 2002. Liver targeting liposomes containing beta-sitosterol glucoside with regard to penetration-enhancing effect on HepG2 cells. *Biol Pharm Bull*, 25, 766-70.
- 84) Kett, V., McMahon, D. & Ward, K. 2005. Thermoanalytical techniques for the investigation of the freeze drying process and freeze-dried products. *Curr Pharm Biotechnol*, 6, 239-50.
- 85) Khatri, K., Rawat, A., Mahor, S., Gupta, P. N. & Vyas, S. P. 2005. Hepatitis B surface protein docked vesicular carrier for site specific delivery to liver. *J Drug Target*, 13, 359-66.
- 86) Kim, J. A., Kang, Y. S., Kim, Y. O., Lee, S. H. & Lee, Y. S. 1998. Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. *Exp Mol Med*, 30, 137-44.
- 87) Kim, J. S., He, L., Qian, T. & Lemasters, J. J. 2003. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med*, 3, 527-35.
- 88) Komatsu, H., Saito, H., Okada, S., Tanaka, M., Egashira, M. & Handa, T. 2001. Effects of the acyl chain composition of phosphatidylcholines on the stability of freeze-dried small liposomes in the presence of maltose. *Chem Phys Lipids*, 113, 29-39.

- 89) Konno, H., Matin, A. F., Maruo, Y., Nakamura, S. & Baba, S. 1996. Liposomal ATP protects the liver from injury during shock. *Eur Surg Res*, 28, 140-5.
- 90) Korb, V. 2006. *Formulation de liposomes d'ATP afin de maintenir le statut énergétique du greffon hépatique avant transplantation*. Université Paris Sud 11.
- 91) Korb, V., Tep, K., Escriou, V., Richard, C., Scherman, D., Cynober, L., Chaumeil, J. & Dumortier, G. 2008. Current data on ATP-containing liposomes and potential prospects to enhance cellular energy status for hepatic applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 25, 305-45.
- 92) Krivakova, P., Labajova, A., Cervinkova, Z. & Drahota, Z. 2007. Inhibitory effect of t-butyl hydroperoxide on mitochondrial oxidative phosphorylation in isolated rat hepatocytes. *Physiol Res*, 56, 137-40.
- 93) Kukral, J. C., Littlejohn, M. H., Williams, R. K., Pancner, R. J., Butz, G. W., Jr. & Starzl, T. E. 1962. Hepatic function after canine liver transplantation. *Arch Surg*, 85, 157-65.
- 94) Kupiec-Weglinski, J. W. & Busuttil, R. W. 2005. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc*, 37, 1653-6.
- 95) Laham, A., Claperon, N., Durussel, J. J., Fattal, E., Delattre, J., Puisieux, F., Couvreur, P. & Rossignol, P. 1987. Liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia in the rat. *Life Sci*, 40, 2011-6.
- 96) Laham, A., Claperon, N., Durussel, J. J., Fattal, E., Delattre, J., Puisieux, F., Couvreur, P. & Rossignol, P. 1988a. Intracarotidal administration of liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia. *Pharmacol Res Commun*, 20, 699-705.
- 97) Laham, A., Claperon, N., Durussel, J. J., Fattal, E., Delattre, J., Puisieux, F., Couvreur, P. & Rossignol, P. 1988b. Liposomally entrapped adenosine triphosphate. Improved efficiency against experimental brain ischaemia in the rat. *J Chromatogr*, 440, 455-458.
- 98) Lanir, A., Jenkins, R. L., Caldwell, C., Lee, R. G., Khettry, U. & Clouse, M. E. 1988. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology*, 8, 471-5.
- 99) Latta, M., Kunstle, G., Lucas, R., Hentze, H. & Wendel, A. 2007. ATP-depleting carbohydrates prevent tumor necrosis factor receptor 1-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 321, 875-83.
- 100) Lee, S. C., Yuk, H. G., Lee, D. H., Lee, K. E., Hwang, Y. I. & Ludescher, R. D. 2002. Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *J Biochem Mol Biol*, 35, 358-63.

- 101) Lelong, G. 2007. *Etude structurale et dynamique de solutions de sucre confinées. Thèse de doctorat. Sous la direction de Saboungi M.L.* Université d'Orléans.
- 102) Lemasters, J. J., Qian, T., He, L., Kim, J. S., Elmore, S. P., Cascio, W. E. & Brenner, D. A. 2002. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 4, 769-81.
- 103) Li, C. & Deng, Y. 2004. A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions. *J Pharm Sci*, 93, 1403-14.
- 104) Liang, W., Levchenko, T., Khaw, B. A. & Torchilin, V. 2004a. ATP-containing immunoliposomes specific for cardiac myosin. *Curr Drug Deliv*, 1, 1-7.
- 105) Liang, W., Levchenko, T. S. & Torchilin, V. P. 2004b. Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure. *J Microencapsul*, 21, 251-261.
- 106) Longmuir, K. J., Robertson, R. T., Haynes, S. M., Baratta, J. L. & Waring, A. J. 2006. Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence. *Pharm Res*, 23, 759-769.
- 107) Lueckel, B., Bodmer, D., Helk, B. & Leuenberger, H. 1998a. Formulations of sugars with amino acids or mannitol--influence of concentration ratio on the properties of the freeze-concentrate and the lyophilizate. *Pharm Dev Technol*, 3, 325-36.
- 108) Lueckel, B., Helk, B., Bodmer, D. & Leuenberger, H. 1998b. Effects of formulation and process variables on the aggregation of freeze-dried interleukin-6 (IL-6) after lyophilization and on storage. *Pharm Dev Technol*, 3, 337-46.
- 109) Maitani, Y., Kawano, K., Yamada, K., Nagai, T. & Takayama, K. 2001. Efficiency of liposomes surface-modified with soybean-derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells. *J Control Release*, 75, 381-9.
- 110) Managit, C., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2005. Effect of galactose density on asialoglycoprotein receptor-mediated uptake of galactosylated liposomes. *J Pharm Sci*, 94, 2266-2275.
- 111) Mandal, A. K. & Das, N. 2005. Sugar coated liposomal flavonoid: a unique formulation in combating carbontetrachloride induced hepatic oxidative damage. *J Drug Target*, 13, 305-15.
- 112) Mandal, A. K., Sinha, J., Mandal, S., Mukhopadhyay, S. & Das, N. 2002. Targeting of liposomal flavonoid to liver in combating hepatocellular oxidative damage. *Drug Deliv*, 9, 181-5.

- 113) Marin, M. & René, F. 2000. *Lyophilisation, dossier F3240*, Les techniques de l'ingénieur.
- 114) Matsukawa, S., Yamamoto, M., Ichinose, K., Ohata, N., Ishii, N., Kohji, T., Akiyoshi, K., Sunamoto, J. & Kanematsu, T. 2000. Selective uptake by cancer cells of liposomes coated with polysaccharides bearing 1-aminolactose. *Anticancer Res*, 20, 2339-44.
- 115) McTiernan, A., Whelan, J., Leahy, M. & Woll, P. J. 2006. A Phase II Nonrandomised Open-Label Study of Liposomal Daunorubicin (DaunoXome) in Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma*, 2006, 41080.
- 116) Merrill, C. L., Ni, H., Yoon, L. W., Tirmenstein, M. A., Narayanan, P., Benavides, G. R., Easton, M. J., Creech, D. R., Hu, C. X., McFarland, D. C., Hahn, L. M., Thomas, H. C. & Morgan, K. T. 2002. Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol Sci*, 68, 93-101.
- 117) Miyajima, K., Tomita, K. & Nakagaki, M. 1986. Effect of saccharides on the freezing and thawing of liposome dispersion. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 34, 2689-97.
- 118) Mohammed, A. R., Bramwell, V. W., Coombes, A. G. & Perrie, Y. 2006. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods*, 40, 30-8.
- 119) Mohammed, A. R., Coombes, A. G. & Perrie, Y. 2007. Amino acids as cryoprotectants for liposomal delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 30, 406-13.
- 120) Monbaliu, D., Crabbe, T., Roskams, T., Fevery, J., Verwaest, C. & Pirenne, J. 2005. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation*, 79, 1226-30.
- 121) Monroe, R. S. & Huber, B. E. 1994. The major form of the murine asialoglycoprotein receptor: cDNA sequence and expression in liver, testis and epididymis. *Gene*, 148, 237-44.
- 122) Montalvo-Jave, E. E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J. A., Pina, E. & Geller, D. A. 2008. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 147, 153-9.
- 123) Montanari, J., Roncaglia, D. I., Lado, L. A., Morilla, M. J. & Romero, E. L. 2009. Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration. *Int J Pharm*, 372, 184-90.
- 124) Mugabe, C., Azghani, A. O. & Omri, A. 2006. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharm*, 307, 244-50.

- 125) Muraio, A., Nishikawa, M., Managit, C., Wong, J., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2002. Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes in vivo: effect of lipid composition. *Pharm Res*, 19, 1808-14.
- 126) Nail, S. L., Jiang, S., Chongprasert, S. & Knopp, S. A. 2002. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm Biotechnol*, 14, 281-360.
- 127) Nakamori, K., Nakajima, T., Odawara, M., Koyama, I., Nemoto, M., Yoshida, T., Ohshima, H. & Inoue, K. 1993. Stable positively charged liposome during long-term storage. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 41, 1279-83.
- 128) Nardo, B., Catena, F., Cavallari, G., Montalti, R., Di Naro, A., Faenza, A. & Cavallari, A. 2001. Randomized clinical study comparing UW and Celsior solution in liver preservation for transplantation: preliminary results. *Transplant Proc*, 33, 870-2.
- 129) Neveux, N., De Bandt, J. P., Charrueau, C., Savier, E., Chaumeil, J. C., Hannoun, L., Giboudeau, J. & Cynober, L. A. 1997. Deletion of hydroxyethylstarch from University of Wisconsin solution induces cell shrinkage and proteolysis during and after cold storage of rat liver. *Hepatology*, 25, 678-82.
- 130) Neveux, N., De Bandt, J. P., Chaumeil, J. C. & Cynober, L. 2002. Hepatic preservation, liposomally entrapped adenosine triphosphate and nitric oxide production: a study of energy state and protein metabolism in the cold-stored rat liver. *Scand J Gastroenterol*, 37, 1057-63.
- 131) Neveux, N., De Bandt, J. P., Fattal, E., Hannoun, L., Poupon, R., Chaumeil, J. C., Delattre, J. & Cynober, L. A. 2000. Cold preservation injury in rat liver: effect of liposomally-entrapped adenosine triphosphate. *J Hepatol*, 33, 68-75.
- 132) Nounou, M. M., El-Khordagui, L. K. & Khalafallah, N. 2005. Release stability of 5-fluorouracil liposomal concentrates, gels and lyophilized powder. *Acta Pol Pharm*, 62, 381-91.
- 133) Ntimenou, V., Mourtas, S., Christodoulakis, E. V., Tsilimbaris, M. & Antimisiaris, S. G. 2006. Stability of protein-encapsulating DRV liposomes after freeze-drying: A study with BSA and t-PA. *J Liposome Res*, 16, 403-16.
- 134) Ohtake, S., Schebor, C. & de Pablo, J. J. 2006. Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 65-73.
- 135) Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S. P. & de Pablo, J. J. 2004a. Effect of pH, counter ion, and phosphate concentration on the glass transition temperature of freeze-dried sugar-phosphate mixtures. *Pharm Res*, 21, 1615-21.
- 136) Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S. P. & de Pablo, J. J. 2004b. Effect of sugar-phosphate mixtures on the stability of DPPC membranes in dehydrated systems. *Cryobiology*, 48, 81-9.

- 137) Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S. P. & de Pablo, J. J. 2005. Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochim Biophys Acta*, 1713, 57-64.
- 138) Ortho-Biotech 2007. Doxil, Product Information. Ratinan, Etats-Unis.
- 139) Osaka, S., Tsuji, H. & Kiwada, H. 1994. Uptake of liposomes surface-modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull*, 17, 940-3.
- 140) Ostrowska, A., Bode, D. C., Pruss, J., Bilir, B., Smith, G. D. & Zeisloft, S. 2000. Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank*, 1, 55-68.
- 141) Paillet, C., Chamouard, V., Nageotte, A., Boillot, O., Colin, C. & Dumortier, J. 2007. [Liver transplantation for chronic liver disease: hospital costs]. *Presse Med*, 36, 203-10.
- 142) Parasassi, T., Giusti, A. M., Raimondi, M., Ravagnan, G., Sapora, O. & Gratton, E. 1995. Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 19, 511-6.
- 143) Park, I. K., Kim, T. H., Kim, S. I., Park, Y. H., Kim, W. J., Akaike, T. & Cho, C. S. 2003. Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol)/DNA complexes by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm*, 257, 103-10.
- 144) Park, J. H., Cho, E. W., Shin, S. Y., Lee, Y. J. & Kim, K. L. 1998. Detection of the asialoglycoprotein receptor on cell lines of extrahepatic origin. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 304-11.
- 145) Perkins, E., Bao, W., Guan, X., Ang, C., Wolfinger, R., Chu, T., Meyer, S. & Inouye, L. 2006. Comparison of transcriptional responses in liver tissue and primary hepatocyte cell cultures after exposure to hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine. *BMC Bioinformatics*.
- 146) Petit, T. 2004. Toxicité cardiaque des anthracyclines. *Bull Cancer*, 91, 159-65.
- 147) Pisarenko, O. I., Solomatina, E. S., Ivanov, V. E., Studneva, I. M., Kapelko, V. I. & Smirnov, V. N. 1985. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardiol*, 80, 126-34.
- 148) Pokorny, H., Rasoul-Rockenschaub, S., Langer, F., Windhager, T., Rosenstingl, A., Lange, R., Konigsrainer, A., Ringe, B., Muhlbacher, F. & Steininger, R. 2004. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-centre observation study. *Transpl Int*, 17, 256-60.

- 149) Powis, G., Melder, D. C. & Wilke, T. J. 1989. Human and dog, but not rat, isolated hepatocytes have decreased foreign compound-metabolizing activity compared to liver slices. *Drug Metab Dispos.*, 17, 526-31.
- 150) Pradeau, D., Stocco, J. & Chaumeil, J. C. 2008. [Solutions for organ preservation and other cardioplegic liquid formulations. Role of the hospital pharmacist]. *Ann Pharm Fr*, 66, 1-18.
- 151) Puisieux, F., Fattal, E., Lahiani, M., Auger, J., Jouannet, P., Couvreur, P. & Delattre, J. 1994. Liposomes, an interesting tool to deliver a bioenergetic substrate (ATP). in vitro and in vivo studies. *J Drug Target*, 2, 443-8.
- 152) Putz, G., Schmider, W., Nitschke, R., Kurz, G. & Blum, H. E. 2005. Synthesis of phospholipid-conjugated bile salts and interaction of bile salt-coated liposomes with cultured hepatocytes. *J Lipid Res*, 46, 2325-38.
- 153) Pyne, A., Surana, R. & Suryanarayanan, R. 2002. Crystallization of mannitol below Tg' during freeze-drying in binary and ternary aqueous systems. *Pharm Res*, 19, 901-8.
- 154) Qi, X. R., Yan, W. W. & Shi, J. 2005. Hepatocytes targeting of cationic liposomes modified with soybean sterylglucoside and polyethylene glycol. *World J Gastroenterol*, 11, 4947-52.
- 155) Quintela, J., Gala, B., Baamonde, I., Fernandez, C., Aguirrezabalaga, J., Otero, A., Suarez, F., Fernandez, A. & Gomez, M. 2005. Long-term results for liver transplantation from non-heart-beating donors maintained with chest and abdominal compression-decompression. *Transplant Proc*, 37, 3857-8.
- 156) Rambhatla, S., Obert, J. P., Luthra, S., Bhugra, C. & Pikal, M. J. 2005. Cake shrinkage during freeze drying: a combined experimental and theoretical study. *Pharm Dev Technol*, 10, 33-40.
- 157) Ratheiser, K., Schneeweiss, B., Waldhausl, W., Fasching, P., Korn, A., Nowotny, P., Rohac, M. & Wolf, H. P. 1991. Inhibition by etomoxir of carnitine palmitoyltransferase I reduces hepatic glucose production and plasma lipids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 40, 1185-90.
- 158) Rensen, P. C., Sliedregt, L. A., Ferns, M., Kieviet, E., van Rossenberg, S. M., van Leeuwen, S. H., van Berkel, T. J. & Biessen, E. A. 2001. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 276, 37577-84.
- 159) Rohr, H. P., Lüthy, J., Gudat, F., Oberholzer, M., Gysin, C., Stalder, G. & Bianchi, L. 1976. Stereology: a new supplement to the study of human liver biopsy specimens. In: Popper H, S. F. (ed.) *Progress in liver diseases*. New York: Grune and Stratton.

- 160) Rossignol, P., Laham, A., Claperon, N., Delattre, J., Puisieux, F. & Couvreur, P. 1988. [Is energy supply to the brain by ATP possible? Preliminary studies in rats subjected to repeated ischemia]. *Bull Acad Natl Med*, 172, 1129-34.
- 161) Rueda Dominguez, A., Olmos Hidalgo, D., Viciano Garrido, R. & Torres Sanchez, E. 2005. Liposomal cytarabine (DepoCyte) for the treatment of neoplastic meningitis. *Clin Transl Oncol*, 7, 232-8.
- 162) Samuel, D. 2003. Bioartificial liver: present and future. *Transplantation*, 75, 1769-70.
- 163) Sasaki, A., Murahashi, N., Yamada, H. & Morikawa, A. 1994. Syntheses of novel galactosyl ligands for liposomes and their accumulation in the rat liver. *Biol Pharm Bull*, 17, 680-5.
- 164) Sasaki, A., Murahashi, N., Yamada, H. & Morikawa, A. 1995. Syntheses of novel galactosyl ligands for liposomes and the influence of the spacer on accumulation in the rat liver. *Biol Pharm Bull*, 18, 740-6.
- 165) Scatton, O., Sepulveda, A. & Soubrane, O. 2009. [Living donor liver transplantation]. *Presse Med*, 38, 1266-71.
- 166) Schon, M. R., Kollmar, O., Akkoc, N., Matthes, M., Wolf, S., Schrem, H., Tominaga, M., Keech, G. & Neuhaus, P. 1998. Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplant Proc*, 30, 2318-20.
- 167) Seglen, P. O. 1979. Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health*, 5, 551-60.
- 168) Shi, J., Qi, X. R., Yang, L., Fei, R. & Wei, L. 2006. [Liver targeting of cationic liposomes modified with soybean-derived sterylglucoside in vitro]. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 19-23.
- 169) Shimada, K., Kamps, J. A., Regts, J., Ikeda, K., Shiozawa, T., Hirota, S. & Scherphof, G. L. 1997. Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s. *Biochim Biophys Acta*, 1326, 329-41.
- 170) Shimizu, K., Asai, T., Fuse, C., Sadzuka, Y., Sonobe, T., Ogino, K., Taki, T., Tanaka, T. & Oku, N. 2005. Applicability of anti-neovascular therapy to drug-resistant tumor: suppression of drug-resistant P388 tumor growth with neovessel-targeted liposomal adriamycin. *Int J Pharm*, 296, 133-41.
- 171) Shimizu, K., Maitani, Y., Takahashi, N., Takayama, K. & Nagai, T. 1998a. Association of liposomes containing a soybean-derived sterylglucoside mixture with rat primary cultured hepatocytes. *Biol Pharm Bull*, 21, 818-22.
- 172) Shimizu, K., Maitani, Y., Takayama, K. & Nagai, T. 1996. Characterization of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing a soybean-derived

- sterylglucoside mixture by differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy, and enzymatic assay. *J Pharm Sci*, 85, 741-4.
- 173) Shimizu, K., Maitani, Y., Takayama, K. & Nagai, T. 1997. Formulation of liposomes with a soybean-derived sterylglucoside mixture and cholesterol for liver targeting. *Biol Pharm Bull*, 20, 881-6.
- 174) Shimizu, K., Qi, X. R., Maitani, Y., Yoshii, M., Kawano, K., Takayama, K. & Nagai, T. 1998b. Targeting of soybean-derived sterylglucoside liposomes to liver tumors in rat and mouse models. *Biol Pharm Bull*, 21, 741-6.
- 175) Shimizu, K., Tamagawa, K., Takahashi, N., Takayama, K. & Maitani, Y. 2003. Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture. *Int J Pharm*, 258, 45-53.
- 176) Siow, L. F., Rades, T. & Lim, M. H. 2007. Characterizing the freezing behavior of liposomes as a tool to understand the cryopreservation procedures. *Cryobiology*, 55, 210-21.
- 177) Skiba-Lahiani, M. 1995. *Effet "in vitro" de liposomes de dilauroylphosphatidylcholine (PC12) encapsulant ou non de l'ATP sur le mouvement et la réaction acrosomique de spermatozoïdes humains*. Paris XI.
- 178) Skiba-Lahiani, M., Auger, J., Terribile, J., Fattal, E., Delattre, J., Puisieux, F. & Jouannet, P. 1995. Stimulation of movement and acrosome reaction of human spermatozoa by PC12 liposomes encapsulating ATP. *Int J Androl*, 18, 287-94.
- 179) Sliedregt, L. A., Rensen, P. C., Rump, E. T., van Santbrink, P. J., Bijsterbosch, M. K., Valentijn, A. R., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., van Berkel, T. J. & Biessen, E. A. 1999. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem*, 42, 609-18.
- 180) Soszynski, M. & Bartosz, G. 1997. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radic Biol Med*, 23, 463-9.
- 181) Soukharev, S., Berlin, W., Hanover, J. A., Bethke, B. & Sauer, B. 2000. Organization of the mouse ASGR1 gene encoding the major subunit of the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Gene*, 241, 233-40.
- 182) Southard, J. H., van Gulik, T. M., Ametani, M. S., Vreugdenhil, P. K., Lindell, S. L., Pienaar, B. L. & Belzer, F. O. 1990. Important components of the UW solution. *Transplantation*, 49, 251-7.
- 183) Stevens, P. J. & Lee, R. J. 2003. Formulation kit for liposomal doxorubicin composed of lyophilized liposomes. *Anticancer Res*, 23, 439-42.
- 184) Sun, W. Q., Leopold, A. C., Crowe, L. M. & Crowe, J. H. 1996. Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys J*, 70, 1769-76.

- 185) Sun, X., Hai, L., Wu, Y., Hu, H. Y. & Zhang, Z. R. 2005. Targeted gene delivery to hepatoma cells using galactosylated liposome-polycation-DNA complexes (LPD). *J Drug Target*, 13, 121-8.
- 186) Suzuki, T., Komatsu, H. & Miyajima, K. 1996. Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1278, 176-82.
- 187) Sweeney, L. G., Wang, Z., Loebenberg, R., Wong, J. P., Lange, C. F. & Finlay, W. H. 2005. Spray-freeze-dried liposomal ciprofloxacin powder for inhaled aerosol drug delivery. *Int J Pharm*, 305, 180-5.
- 188) Szajner, S., Divoux, E., Faucher-Grassin, J. & Dupuis, A. 2006. Mise au point sur les solutions de conservation d'organes. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*, 6, 55-60.
- 189) Takahashi, N., Tamagawa, K., Shimizu, K., Fukui, T. & Maitani, Y. 2003. Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG-liposomes. *Biol Pharm Bull*, 26, 1060-3.
- 190) Tanaka, K., Takeda, T., Fujii, K. & Miyajima, K. 1991. Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 39, 2653-6.
- 191) te Booy, M. P., de Ruiter, R. A. & de Meere, A. L. 1992. Evaluation of the physical stability of freeze-dried sucrose-containing formulations by differential scanning calorimetry. *Pharm Res*, 9, 109-14.
- 192) Tep, K. 2007. *Evaluation de liposomes à l'aide de cultures cellulaires hépatiques : applications aux liposomes d'ATP dans le cadre de la conservation du greffon hépatique*. Université Paris Sud 11.
- 193) Tep, K., Korb, V., Richard, C., Escriou, V., Largeau, C., Vincourt, V., Bessodes, M., Guellier, A., Scherman, D., Cynober, L., Chaumeil, J. C. & Dumortier, G. 2009. Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand. *J Liposome Res*, 19, 287-300.
- 194) Terada, T., Iwai, M., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. 2006. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *J Control Release*, 111, 333-42.
- 195) Torchilin, V. P. & Weissig, V. 2002. *Liposomes a practical approach*, Oxford, Royaume Uni, Oxford University Press.
- 196) Tsuji, H., Osaka, S. & Kiwada, H. 1991. Targeting of liposomes surface-modified with glycyrrhizin to the liver. I. Preparation and biological disposition. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 39, 1004-8.

- 197) Tsvetkova, N. M., Phillips, B. L., Crowe, L. M., Crowe, J. H. & Risbud, S. H. 1998. Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ^{31}P NMR and FTIR studies. *Biophys J*, 75, 2947-55.
- 198) Ugwu, S., Zhang, A., Parmar, M., Miller, B., Sardone, T., Peikov, V. & Ahmad, I. 2005. Preparation, characterization, and stability of liposome-based formulations of mitoxantrone. *Drug Dev Ind Pharm*, 31, 223-9.
- 199) Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A. Y. & Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro*, 22, 232-9.
- 200) Vajdova, K., Graf, R. & Clavien, P. A. 2002. ATP-supplies in the cold-preserved liver: A long-neglected factor of organ viability. *Hepatology*, 36, 1543-1552.
- 201) van Winden, E. C. 2003. Freeze-drying of liposomes: theory and practice. *Methods in Enzymology*.
- 202) van Winden, E. C. & Crommelin, D. J. 1999. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. *J Control Release*, 58, 69-86.
- 203) van Winden, E. C., Talsma, H. & Crommelin, D. J. 1998. Thermal analysis of freeze-dried liposome-carbohydrate mixtures with modulated temperature differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci*, 87, 231-7.
- 204) van Winden, E. C., Zhang, W. & Crommelin, D. J. 1997. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. *Pharm Res*, 14, 1151-60.
- 205) Verma, D. D., Hartner, W. C., Levchenko, T. S., Bernstein, E. A. & Torchilin, V. P. 2005a. ATP-loaded liposomes effectively protect the myocardium in rabbits with an acute experimental myocardial infarction. *Pharm Res*, 22, 2115-20.
- 206) Verma, D. D., Levchenko, T. S., Bernstein, E. A. & Torchilin, V. P. 2005b. ATP-loaded liposomes effectively protect mechanical functions of the myocardium from global ischemia in an isolated rat heart model. *J Control Release*, 108, 460-71.
- 207) Vetter, R., Kott, M. & Rupp, H. 1995. Differential influences of carnitine palmitoyltransferase-1 inhibition and hyperthyroidism on cardiac growth and sarcoplasmic reticulum phosphorylation. *Eur Heart J*, 16 Suppl C, 15-9.
- 208) Vickers, A. E. 2009. Characterization of hepatic mitochondrial injury induced by fatty acid oxidation inhibitors. *Toxicol Pathol*, 37, 78-88.
- 209) Vidal[®]. E. d. 2007. *Vidal[®]*, Paris, France, Editions du Vidal[®].
- 210) Vincourt, V. 2010. *Influence des solutions de conservation d'organe sur des cultures cellulaires de HepG2*.

- 211) Vreugdenhil, P. K., Belzer, F. O. & Southard, J. H. 1991. Effect of cold storage on tissue and cellular glutathione. *Cryobiology*, 28, 143-9.
- 212) Wang, S. N., Deng, Y. H., Xu, H., Wu, H. B., Qiu, Y. K. & Chen, D. W. 2006a. Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin. *Eur J Pharm Biopharm*, 62, 32-8.
- 213) Wang, T., Deng, Y., Geng, Y., Gao, Z., Zou, J. & Wang, Z. 2006b. Preparation of submicron unilamellar liposomes by freeze-drying double emulsions. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 222-31.
- 214) Wolkers, W. F., Oldenhof, H., Tablin, F. & Crowe, J. H. 2004. Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1661, 125-34.
- 215) Wu, J., Liu, P., Zhu, J. L., Maddukuri, S. & Zern, M. A. 1998. Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficacy by labeling with asialofetuin in rodents. *Hepatology*, 27, 772-778.
- 216) Xu, G. X., Xie, X. H., Liu, F. Y., Zang, D. L., Zheng, D. S., Huang, D. J. & Huang, M. X. 1990. Adenosine triphosphate liposomes: encapsulation and distribution studies. *Pharm Res*, 7, 553-7.
- 217) Yan, X., Kuipers, F., Havekes, L. M., Havinga, R., Dontje, B., Poelstra, K., Scherphof, G. L. & Kamps, J. A. 2005. The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 57-62.
- 218) Yang, D., Zhu, J., Zheng, Y., Ge, L. & Zhang, G. 2006. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes. *Drug Dev Ind Pharm*, 32, 219-27.
- 219) Yang, T., Cui, F. D., Choi, M. K., Lin, H., Chung, S. J., Shim, C. K. & Kim, D. D. 2007. Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug Deliv*, 14, 301-8.
- 220) Yotsumoto, T., Naitoh, T., Kitahara, M. & Tsuruzoe, N. 2000. Effects of carnitine palmitoyltransferase I inhibitors on hepatic hypertrophy. *Eur J Pharmacol*, 398, 297-302.
- 221) Yu, H. Y. & Lin, J. H. 2000. Intracellular delivery of membrane-impermeable hydrophilic molecules to a hepatoblastoma cell line by asialoglycoprotein-labeled liposomes. *J Formos Med Assoc*, 99, 936-41.
- 222) Zhang, J. A., Anyarambhatla, G., Ma, L., Ugwu, S., Xuan, T., Sardone, T. & Ahmad, I. 2005. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 59, 177-87.

- 223) Zhang, W., van Winden, E. C., Bouwstra, J. A. & Crommelin, D. J. 1997. Enhanced permeability of freeze-dried liposomal bilayers upon rehydration. *Cryobiology*, 35, 277-89.
- 224) Zhang, W., Wang, M., Xie, H. Y., Zhou, L., Meng, X. Q., Shi, J. & Zheng, S. 2007. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc*, 39, 1332-7.
- 225) Zuidam, N. J., van Winden, E. C., de Vreeh, R. & Crommelin, D. J. 2002. Stability, storage, and sterilization of liposomes. *Liposomes a practical approach*. Oxford, Royaume Uni: Oxford University Press.