



Synthèse de nanocapsules polymères pour la détection de tumeurs solides par échographie et IRM du Fluor : vers un outil théranostique

Odile Diou

► To cite this version:

Odile Diou. Synthèse de nanocapsules polymères pour la détection de tumeurs solides par échographie et IRM du Fluor : vers un outil théranostique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114854 . tel-00907145

HAL Id: tel-00907145

<https://theses.hal.science/tel-00907145>

Submitted on 21 Nov 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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1191

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 20/11/2012

par

Odile DIOU

Synthèse de nanocapsules polymères pour la détection de tumeurs solides par échographie et IRM du Fluor : vers un outil théranostique

Directeur de thèse :

Co-directeur de thèse :

Nicolas TSAPIS

Elias FATTAL

C.R. (Université Paris Sud)

Pr. (Université Paris Sud)

Composition du jury :

Rapporteurs :

Marie-Pierre KRAFFT

D.R. (Institut Sandron, Université de Strasbourg)

Sébastien LECOMMANDOUX

Pr. (LCPO, Université Bordeaux 1)

Examinateurs :

Nathalie MIGNET

C.R. (Université Paris Descartes)

Véronique ROSILIO

Pr. (Institut Galien, Université Paris Sud)

Franck LETHIMONNIER

Chercheur (Neurospin, CEA Saclay)

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Docteur Nicolas Tsapis pour m'avoir fait confiance très tôt dans la conduite de mon projet, qui m'a fait profiter d'une remarquable ouverture d'esprit et m'a transmis son insatiable curiosité scientifique.

Je remercie le Professeur Elias Fattal pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de l'équipe des « fragiles ». Je suis heureuse d'avoir pu côtoyer une personnalité hors pair d'un point de vue scientifique et humain.

Je remercie le Docteur Marie Pierre Krafft et le Professeur Sébastien Lecommandoux pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que le Professeur Véronique Rosilio et les Docteurs Nathalie Mignet et Franck Lethimonnier pour avoir examiné mon travail. En général je remercie les membres de mon jury pour avoir apporté un regard critique sur mon travail.

Je remercie très chaleureusement le Docteur Annie Brûlet pour sa patience, son expertise en diffusion des neutrons et sa passion qu'elle communique si facilement.

Un grand merci à Estelle Morvan pour sa flexibilité lors des dosages RMN et pour ses conseils toujours très judicieux.

Merci aux Docteurs Julien Valette et Céline Giraudeau qui ont su se montrer disponibles et ont permis d'acquérir les plus belles images de ce travail.

Merci à toute l'équipe du Laboratoire d'Imagerie Paramétrique : les Docteurs Lori Bridal, Nicolas Taulier, Sara Jafari, Romain Berti ainsi que Ksénia Astafyeva et Thomas Payen qui m'ont tant apporté en acoustique et avec qui il a été si agréable de mener les expérimentations ou de discuter lors de réunions constructives.

Merci au Docteur Christine Vauthier pour son encadrement lors des expérimentations d'activation du complément. Merci au Docteur Sandrine Zanna pour avoir mené les expérimentations d'XPS et pour m'avoir aidé dans l'interprétation des spectres.

Merci aux chimistes : les Docteurs Nicolas Mackiewicz et Julien Nicolas pour m'avoir transmis leur savoir de façon très pédagogique.

Remerciements

Merci à Gérard Péhau-Arnaudet pour sa souplesse sa bonne humeur et surtout ton humour. Je savais qu'en venant faire de la CryoTEM je passerai un moment très sympathique repartirai avec de belles images.

Je remercie Valérie Domergue ainsi que toutes les personnes de l'animalerie pour leur aide et leurs conseils avisés lors des expérimentations animales. A ce propos, un grand merci aussi aux Docteurs Rym Skanji et Simona Mura pour leur disponibilité, leur calme et leur maîtrise des techniques.

Merci à Ilenia Batistella pour son sérieux et sa gentillesse lors de son stage. Merci à Vianney Delplace pour son autonomie et sa créativité qui ont permis une belle avancée dans le projet mais aussi pour son humour et sa voix si mélodieuse.

Merci au Docteur Caroline Robic pour nous avoir permis d'explorer une piste intéressante et de l'avoir suivie de près par de très utiles échanges de mails.

Merci à Nathalie Ménard, Olivier Cauchois, Laura De Miguel, Silvia Mazzafero, Giovanna Giacalone, Ludivine Mousnier, Bettina Ralay-Ranaivo, Nadia Abed, Valentina Agostoni, Bénédicte Sacko-Pradines, Christelle Zandanel, Regina Reul, Ludivine Bol, Violetta Rodriguez Ruiz, Romain Canioni, Chantal Al Sabbagh, Thais Leite, Leticia Arago sans qui ces trois années passées au laboratoire n'auraient pas eu le même goût. Une pensée particulière à Rym Skanji, Nadège Grabowski et Amélie Dufay-Wojcicki avec qui j'ai partagé des moments uniques au laboratoire et ailleurs.

Un grand merci à ma famille qui m'a entourée et soutenue pendant ces belles années de thèse et qui m'a tant choyée pendant la période de rédaction.

Enfin, merci à Vincent pour avoir été si présent en étant parfois si loin, pour m'interdire de baisser les bras et d'avoir toujours cru en moi.

Sommaire

Liste des abréviations.....7

Introduction générale.....9

Travaux antérieurs.....13

1. Les capsules polymères pour la pharmaceutique.....14
1.1. Définitions et applications.....14
1.2. Les procédés de formation : les méthodes chimiques, mécaniques et physico-chimique.....15
1.2.1. Les techniques chimiques.....16
1.2.2. Une technique mécanique : l'atomisation séchage.....17
1.2.3. Les techniques physico-chimiques.....18
1.2.3.1. Hydratation et nanoprecipitation.....18
1.2.3.2. L'assemblage couche par couche.....20
1.2.3.3. La coacervation.....22
1.2.3.4. L'émulsion-évaporation de solvant.....23
1.3. Le contrôle de la morphologie : un défi à relever.....25
1.3.1. Le système 1 : la goutte d'émulsion.....26
1.3.2. Le système 2 : la goutte qui s'évapore.....27
1.3.3. Le système 3 : la capsule qui se fige.....29
2. L'encapsulation dans le contexte de la théranostique du cancer.....34
2.1. L'importance de la détection.....34
2.1.1. L'échographie.....34
2.1.2. L'IRM.....36
2.2. Pour imager et traiter : l'essor des systèmes nanothéranostiques.....38
Targeted nanotheranostics for personalized cancer therapy.....38
3. L'élaboration d'un système nanothéranostique innovant pour l'échographie et l'IRM du Fluor.....55
3.1. L'agent de contraste.....55
3.2. Le système vecteur.....57
3.3. Comment intégrer la thérapie au système.....58
3.4. Le modèle biologique.....58

Travaux expérimentaux.....73**Chapitre 1 : Nanocapsules polymères furtives pour l’Imagerie par Résonance Magnétique du Fluor.....75**

Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ^{19}F-MRI.....77
1. Introduction.....79
2. Materials and methods.....82
2.1. Materials.....82
2.2. Sample Preparation.....82
2.3. Size and Zeta potential.....82
2.4. Transmission Electron Microscopy.....83
2.5. Scanning Electron Microscopy.....83
2.6. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR.....83
2.7. Sodium cholate determination by spectrophotometry.....84
2.8. Stability of nanocapsules over time.....84
2.9. X-ray Photoelectron Spectroscopy.....85
2.10. Complement Activation.....85
2.11. ^{19}F MRI.....86
2.11.1. <i>In vivo</i> accumulation study.....86
2.11.2. <i>In vivo</i> tumor imaging.....86
3. Results and discussion.....87
3.1. Formulation process.....87
3.2. Morphology.....88
3.3. Nanocapsule purification.....89
3.4. Stability.....90
3.5. Nanocapsule PEGylation.....91
3.6. Evaluation of complement activation.....93
3.7. <i>In vivo</i> ^{19}F Magnetic Resonance Imaging.....94
3.7.1. Kinetic study.....94
3.7.2. <i>In vivo</i> tumor imaging.....96
4. Conclusion.....97

Chapitre 2 : Optimisation de la morphologie des capsules pour l'imagerie ultrasonore.....103

Formulation optimization of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents: impact on their acoustic response.....105

1. Introduction.....	107
2. Materials and methods.....	109
2.1. Materials.....	109
2.2. Sample preparation.....	109
2.3. Compressibility measurements.....	109
2.3.1. Volumetric measurements.....	109
2.3.2. Ultrasound velocity measurements.....	110
2.4. Size and Zeta potential.....	110
2.5. Transmission Electron Microscopy.....	110
2.6. Cyo-Transmission Electron Microscopy.....	111
2.7. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR spectroscopy.....	111
2.8. Small Angle Neutrons Scattering.....	111
2.8.1.1. SANS data collection.....	111
2.8.1.2. SANS data modelling.....	112
2.9. Acoustic characterization at high frequency.....	113
2.10. In vivo ultrasound imaging.....	114
3. Results and discussion.....	115
4. Conclusion.....	125

Chapitre 3 : Introduction d'une molécule bioactive pour le traitement et/ou le ciblage spécifique de la tumeur.....131

Chapitre 3A : Introduction d'une molécule bioactive pour le traitement de la tumeur.....133
1. Encapsulation d'une molécule modèle : le paclitaxel.....133
2. Encapsulation d'une molécule d'intérêt : le 5-Fluorouracil.....134

Sommaire

Chapitre 3B : Introduction d'une molécule bioactive pour le ciblage spécifique de la tumeur.....	138
Top-down versus bottom-up RGD-decoration of PEGylated nanocapsules, containing a fluorinated core, for $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting.....	138
1. Introduction.....	140
2. Materials and methods.....	143
2.1. Materials.....	143
2.2. Synthesis of PLA- <i>b</i> -PEG-RGD.....	143
2.3. Characterization of PLA- <i>b</i> -PEG-RGD.....	144
2.4. Differential Scanning Calorimetry experiments.....	145
2.5. Nanocapsule Preparation.....	145
2.6. Functionalization on preformed nanocapsules of PLA- <i>b</i> -PEG-COOH.....	145
2.7. RGD coupling efficiency on preformed nanocapsules by ^1H NMR spectroscopy.....	146
2.8. Size and Zeta potential.....	146
2.9. CryoTEM.....	146
2.10. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR spectroscopy.....	147
2.11. Binding test with radiolabelled echistatin.....	147
3. Results and discussion.....	149
4. Conclusion.....	156
Discussion générale.....	161
Conclusion générale.....	187

Abréviations

5-FU	5-Fluorouracil
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADV	<i>Acoustic Droplet Vaporization</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAF	Facteur d'Activation du Complément
CEST	<i>Chemical Exchange Saturation Transfer</i>
Cryo-MET	Microscopie Electronique à Transmission après Cryo-fixation
CS (SC)	Cholate de Sodium
DC	Cellules Dendritiques
DDL (DLS)	Diffusion Dynamique de la Lumière
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dox	Doxorubicine
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage
DTPA	Acide Diéthylène Triamine Penta acétique
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-diméthyl aminopropyl)carbodiimide
EPR	Effet de Perméation et de Rétention accrue
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HD	Hexadécane
HIFU	<i>High Intensity Focused Ultrasound</i>
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HUVEC	Cellules Humaines de l'Endothélium Ombilical
i.p.	Intrapéritonéal
i.v.	Intraveineuse
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50%
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MEB (SEM)	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MFH	<i>Magnetic Fluid Hyperthermia</i>
MPS	Système des Phagocytes Mononucléés
MSE	Multi Echo de Spin
NC	Nanocapsule
NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimide sodique
NP	Nanoparticule
PAGE	<i>Poly(acrylamide) Gel Electrophoresis</i>
PB- <i>b</i> -POE	Poly(butadiène)- <i>b</i> -Poly(oxide d'éthylène)
PBS	Tampon Phosphate Salin

Abréviations

PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDI	Indice de Polydispersité
PDMS	Poly(diméthylsiloxane)
PEG- <i>b</i> -PMCL	Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(ϵ -caprolactone de γ -méthyle)
PEI	Poly(éthylène imine)
PFC	Perfluorocarbone
PFCE	Ether de perfluorocouronne
PFH	Perfluorohexane
PFOB	Bromure de Perfluoroctyl
PFP	Perfluoropentane
PHDCA-PEG	Poly(éthylène glycol)- <i>co</i> -Poly(hexadecyl cyanoacrylate)
PLA	Poly(acide lactique)
PLA- <i>b</i> -PEG	Poly(acide lactique)- <i>b</i> - Poly(éthylène glycol)
PLA- <i>b</i> -PMPC	Poly(acide lactique)- <i>b</i> -Poly(phosphorylcholine de 2-méthacryloyl oxyéthyle)
PLGA	Poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique)
PLGA- <i>b</i> -PEG	Poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique)- <i>b</i> -Poly(éthylène glycol)
PLLA	Poly(L-acide lactique)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
POE- <i>b</i> -PBD	Poly(oxide d'éthylène- <i>b</i> -polybutadiène)
POE-POP-POE	Poly(oxide d'éthylène)- <i>b</i> -Poly(oxide de propylène)- <i>b</i> -Poly(oxide d'éthylène)
PS- <i>b</i> -PB	Poly(styrène)- <i>b</i> -Poly(butadiène)
PS- <i>b</i> -POE	Poly(styrène)- <i>b</i> -Poly(oxide d'éthylène)
PVA	Alcool polyvinyle
PVDF	Poly(fluorure de vinylidène)
RES	Système Réticulo-Endothélial
RGD	Arginine-Glycine-Acidé aspartique
SANS	Diffusion des neutrons aux petits angles
SDS	Laurylsulfate de sodium
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i>
SPIO	Oxyde de fer superparamagnétique
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide Trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
UCA	Agents de contraste ultrasonores
US	Ultrasons
XPS	Spectrophotométrie des rayons X

Introduction générale

Introduction générale

Dans les pays industrialisés, le vieillissement généralisé de la population s'accompagne d'une augmentation du taux de mortalité par cancer, qui pourrait y devenir la première cause de décès. Depuis l'introduction du concept de « magic bullet » par Paul Ehrlich au début du 20^{ème} siècle, de nouvelles stratégies ciblées ont été développées pour détecter et combattre la maladie au stade le plus précoce. Plusieurs générations de vecteurs naturels ou synthétiques, qui encapsulent des molécules thérapeutiques et/ou de contraste se sont succédées pour atteindre de façon toujours plus spécifique la tumeur. La miniaturisation de ces systèmes et la multiplication de leurs capacités sont les préoccupations du 21^{ème} siècle. C'est dans ce contexte que les systèmes nanothéranostiques ont été conçus. En franchissant les barrières : anatomiques (endothélium, membranes cellulaires), physiologiques (foie, reins), chimiques (solubilité, stabilité) et cliniques (efficacité, toxicité) rencontrées lors de leur administration par voie intraveineuse, les systèmes nanothéranostiques s'accumulent préférentiellement dans la tumeur, évitant les tissus sains. Un traitement personnalisé du cancer pourrait alors voir le jour.

Au sein de l'Institut Galien Paris-Sud, des agents de contraste de taille nanométrique avaient été développés, lors des thèses d'Emilia Pisani et de Raquel Diaz-Lopez. Ils étaient constitués d'une coque polymère biocompatible et biodégradable renfermant un cœur liquide fluoré. La preuve de concept *in vitro* de l'utilisation de ces nanocapsules pour l'échographie et l'Imagerie par Résonance Magnétique du Fluor (IRM du ¹⁹F) avait été apportée. Néanmoins, lorsque les nanocapsules étaient administrées *in vivo* par voie intraveineuse, aucune augmentation significative du contraste de la tumeur n'était observée, aussi bien par échographie qu'IRM du ¹⁹F. La quantité accumulée dans l'organe malade était inférieure aux seuils de détection des deux techniques d'imagerie. De plus, le potentiel thérapeutique des nanocapsules était nul. L'objectif de ce travail de thèse est de faire évoluer la structure des nanocapsules de PFOB existantes pour tendre progressivement vers un système théranostique pour le traitement ciblé et l'imagerie, par échographie et IRM du Fluor, des tumeurs solides.

Le manuscrit se divise en deux parties. Une première partie bibliographique situera le contexte général de l'étude. Tout d'abord, nous nous intéresserons aux procédés de fabrication des capsules polymères pour l'industrie pharmaceutique, en mettant en évidence leurs avantages et limitations. Ceci permettra au lecteur de mieux comprendre notre choix de l'émulsion-évaporation, dont le mécanisme sera décrit plus en détails. Puis l'encapsulation dans le contexte de la nanothéranostique sera présentée, en insistant sur l'intérêt des deux modalités d'imagerie : l'IRM du ¹⁹F et l'échographie. Enfin, nous développerons la méthodologie adoptée en détaillant le choix des matériaux utilisés pour chaque composante du système, ainsi que le modèle biologique. La deuxième

Introduction générale

partie du manuscrit concernera les travaux expérimentaux. Les résultats seront exposés, sous la forme de trois publications, conformément à notre démarche de construction, pas à pas, du système nanothéranostique. Il faudra tout d'abord résoudre la problématique de l'administration intraveineuse des nanocapsules de PFOB et de leur accumulation dans la tumeur. Pour améliorer les capacités des nanocapsules en tant qu'agent de contraste, les exigences spécifiques de chacune des deux modalités : l'IRM du Fluor, étudiée dans le chapitre 1 et l'échographie, étudiée dans le chapitre 2, devront être considérées. Enfin, il faudra apporter une fonction thérapeutique à l'outil diagnostique par l'introduction de molécules chimiothérapeutiques ou la fonctionnalisation en surface des nanocapsules par un ligand spécifique d'une cible biologique déterminée (chapitre 3). A la fin du manuscrit, une discussion générale permettra de confronter nos résultats avec ceux obtenus dans la littérature pour dégager les forces et les faiblesses de notre approche et envisager de nouvelles perspectives d'étude.

Travaux antérieurs

1. Les capsules polymères pour la pharmaceutique

1.1. Définitions et applications

Selon J. Richard et J.P. Benoît, « la microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active ». Les matériaux enrobant sont des protéines, des lipides, des polymères naturels ou synthétiques. L'encapsulation assure le stockage, la protection et un certain contrôle de la libération de la matière active, dont la nature dépend de l'application visée (Richard *et al.* 2000).

C'est en 1931, que les chimistes Bungenberg de Jong et Kaas forment les premières capsules de gélatine par coacervation (Bungenberg de Jong 1949). Du laboratoire à l'échelle industrielle, cette technique a été développée dans les années 1940, par une société américaine fabriquant des caisses enregistreuses (National Cash Register). Les capsules de gélatine, encapsulaient un colorant ou une encre, puis étaient déposées sur des feuilles de papier autocopiant, papier sans carbone multi-volant, encore utilisé pour les blocs factures ou carnets de commande (Green 1957). Les brevets correspondants ont ensuite été utilisés par BASF et Fuji Photo Film (Kuchner *et al.* 1979; Miyamoto *et al.* 1981). Depuis, les techniques d'encapsulation n'ont cessé de se développer, d'être optimisées et adaptées à de nombreux domaines : agro-alimentaire, cosmétique, pharmacie, peinture, aérospatiale, électronique ou textile. Le nombre annuel de publications scientifiques (articles ou brevets) a été multiplié par 10 depuis l'année 1975 (Boh 2008).

Dans l'industrie pharmaceutique, les premiers principes actifs incorporés dans des capsules de gélatine, furent l'aspirine, la vitamine B2 et la pénicilline (Phares *et al.* 1964). L'utilisation de polymères synthétiques, comme matériau enrobant, apparut dans les années 1970, lorsque Fong *et al.* décrivirent pour la première fois la méthode de formation de microsphères de polyester (Fong 1979). En 1980, le procédé fut transposé à l'échelle industrielle pour encapsuler une hormone peptidique la nafareline au sein de microsphères de Poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), afin d'assurer la libération contrôlée du peptide après administration parentérale (Sanders *et al.* 1984; Sanders *et al.* 1985). En général, dans l'industrie pharmaceutique, l'encapsulation vise à réduire la toxicité et les effets secondaires d'un principe actif, à augmenter sa solubilité et/ou sa stabilité et à favoriser une libération contrôlée, prolongée et éventuellement ciblée. Le contexte global de restrictions des dépenses de santé publique, le poids de la concurrence et des autorités réglementaires ainsi que l'importance du coût lié à la création d'un nouveau médicament, encouragent l'industrie pharmaceutique à se tourner de plus en plus vers l'élaboration de nouvelles formulations de principe actifs existants. La valeur ajoutée peut-être apportée par les systèmes d'encapsulation. Dans la littérature, ces derniers sont envisagés pour différentes voies

d'administration : orale, pulmonaire, parentérale et pour le traitement de nombreuses pathologies : cancer, maladies cardiovasculaires, vaccins. Plusieurs médicaments encapsulés par des polymères existent déjà sur le marché français. Le Decapeptyl Depot® (Ferring Pharm USA), par exemple, est une formulation de triptorelin et de PLGA, préconisée dans le traitement du cancer de la prostate ou de l'infertilité de la femme.

En général, l'encapsulation désigne indistinctement la préparation de capsules ou de sphères. A ce stade, il importe de faire la distinction entre les deux morphologies. Une capsule est caractérisée par sa structure cœur-couronne. La matière active (solide, liquide ou gazeuse) est confinée au cœur tandis que le matériau polymère constitue, autour, une membrane. La sphère, quant à elle, contient la matière active sous forme dispersée au sein d'une matrice polymère (Figure 1). Il faut noter que la morphologie capsule minimise la quantité de matériel enrobant administré, par rapport à la structure de type sphère. Elle sera alors privilégiée dans la suite de l'étude. La nature et la morphologie (taille, forme, porosité) de la capsule sont déterminantes en vue de leur utilisation en milieu biologique. C'est pourquoi il est indispensable de contrôler l'architecture par des procédés simples, peu coûteux et transposables à l'échelle industrielle.

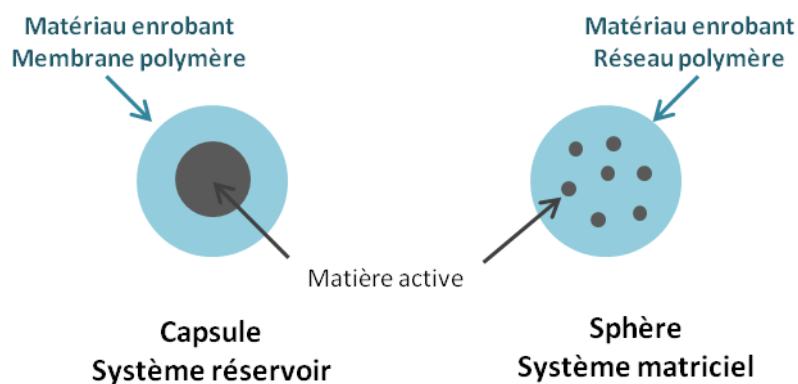


Figure 1 : Morphologie des particules : type capsule ou sphère.

1.2. Les procédés de formation : les méthodes chimiques, mécaniques et physicochimiques

Lors de l'encapsulation d'un principe actif, sa stabilité et son efficacité biologique doivent être conservées. Les caractéristiques des capsules doivent être contrôlées et obtenues de manière reproductible. L'efficacité d'encapsulation et la teneur de la capsule en principe actif doivent être suffisamment élevées pour justifier un tel procédé. Enfin, les quantités résiduelles de solvant organique doivent correspondre aux normes en vigueur fixées par la Pharmacopée européenne.

Les procédés d'encapsulation ont été classifiés de manière intéressante par Richard *et al.* en fonction de leur domaine de réalisation : chimique, mécanique et physico-chimique (Richard *et al.* 2000). Les exemples décrits concernent souvent l'élaboration de microcapsules car les mécanismes

de formation sont plus aisément décrits et illustrés, notamment par la microscopie. Néanmoins, ces procédés peuvent, pour la plupart, être adaptés à la formation de nanocapsules, privilégiées, si on envisage une administration par voie intraveineuse (Mora-Huertas *et al.* 2010).

1.2.1. Les techniques chimiques

Dans le cas particulier des techniques chimiques d'encapsulation, le matériau enrobant est synthétisé *in situ*, par une réaction de polymérisation interfaciale (Figure 2). La polycondensation interfaciale est la réaction la plus ancienne. Elle a été industrialisée dès 1959, par Dupont pour la fabrication des bas de nylon en fibres polyamides. La polycondensation interfaciale a ensuite été adaptée pour permettre l'encapsulation d'une matière active (hydrophile ou hydrophobe). Dans ce cas, la réaction met en jeu deux monomères, l'un étant soluble dans la phase organique tandis que l'autre est dissous en phase aqueuse. La polycondensation a ensuite lieu à l'interface eau/huile au sein d'émulsions directe ou inverse, en fonction de la solubilité de la matière active. La polycondensation interfaciale a été largement décrite (Wittbecker *et al.* 1959; Deasy 1984) et adaptée à de nombreux polymères : polyamides (Beaman *et al.* 1959), polyuréthanes (Wittbecker *et al.* 1959), polysulfonamides (Sundet *et al.* 1959). Des enzymes ont été encapsulées au cœur de membrane de polyamide, polymérisée en émulsion inverse (Chang *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2010). Persico *et al.* choisissent le sens direct pour former des capsules de polyamide au cœur huileux (Persico *et al.* 2005) (Figure 3). Les polymérisations radicalaires et anioniques peuvent également être menées à l'interface eau/huile et conduire à la formation de capsules (al Khouri *et al.* 1986; Lambert *et al.* 2000).

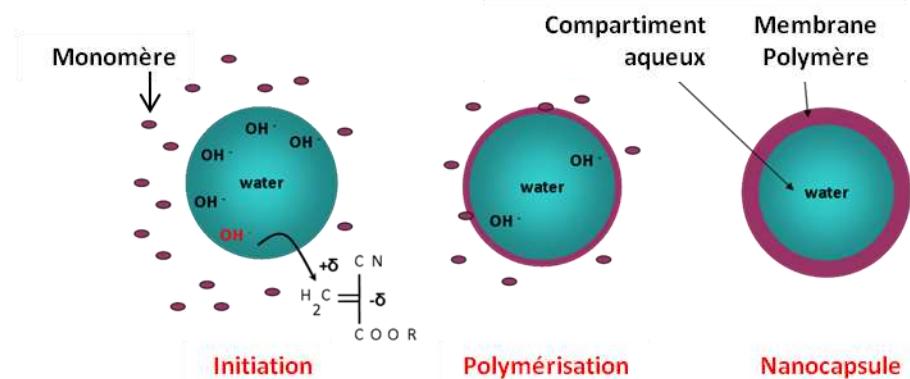


Figure 2 : Formation de capsules de poly(alkyl cyanoacrylate) à cœur aqueux par polymérisation interfaciale (Fattal *et al.* 2012).

De nombreux paramètres du procédé doivent être ajustés car ils vont directement influer sur les propriétés de la membrane en termes de rigidité, d'épaisseur ou de perméabilité, liés à la densité de réticulation (Persico *et al.* 2005) ou au taux de cristallinité du polymère (Wagh *et al.* 2009). Tout d'abord, les coefficients de partage des monomères dans leurs phases, déterminent le lieu de

formation et la morphologie du film polymère (Janssen *et al.* 1992; Janssen *et al.* 1992). La concentration initiale des monomères et la température gouvernent la cinétique de la réaction. Enfin les paramètres inhérents à tout procédé d'émulsion doivent être pris en compte : type et vitesse d'agitation, nature et concentration de l'agent tensioactif (Choi *et al.* 2002; Siddhan *et al.* 2007). La taille finale des capsules obtenues (de 1 à 100 µm) dépend directement de la taille de l'émulsion formée initialement.

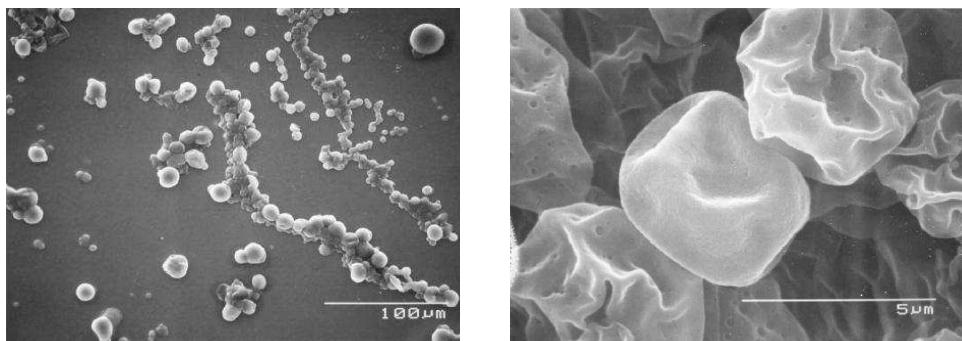


Figure 3 : Clichés MEB de microcapsules de polyamide contenant un cœur huileux d'huile de jojoba.
Droite : Les propriétés mécaniques de la membrane sont évaluées après application d'ultrasons.

Après polymérisation interfaciale, les quantités résiduelles de monomères, oligomères ou tensioactifs, éventuellement toxiques, doivent être éliminées par des étapes fastidieuses de purification des capsules. Pour contrer cette limitation, d'autres méthodes permettent de former la membrane de la capsule à partir de polymères préformés. Elles sont décrites dans la suite.

1.2.2. Une technique mécanique : l'atomisation-séchage

La première formulation injectable, produite par atomisation-séchage (« spray drying »), fut commercialisée par Sandoz dans les années 1970. Il s'agissait de microsphères de PLGA-g-D Glucose pour la vectorisation de bromocriptine (Parlodel®) (Gianola *et al.* 1991). Lors du procédé, la solution contenant le principe actif et le polymère, est atomisée sous forme d'aérosol au moyen d'air ou d'azote comprimé, à travers une chambre de dessiccation. Les gouttes de cet aérosol sont ensuite séchées grâce à un flux d'air chaud. Pour assurer la morphologie capsule, la solution initiale doit être une émulsion. Des capsules vides ou des particules cœur-membrane ont pu être obtenues (Yin *et al.* 2009; Liu *et al.* 2011) (Figures 4 et 5).

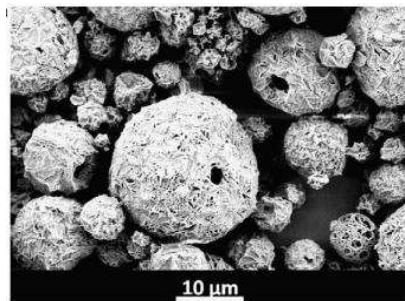


Figure 4 : Cliché MEB de microcapsules de PLA obtenues par nébulisation séchage.

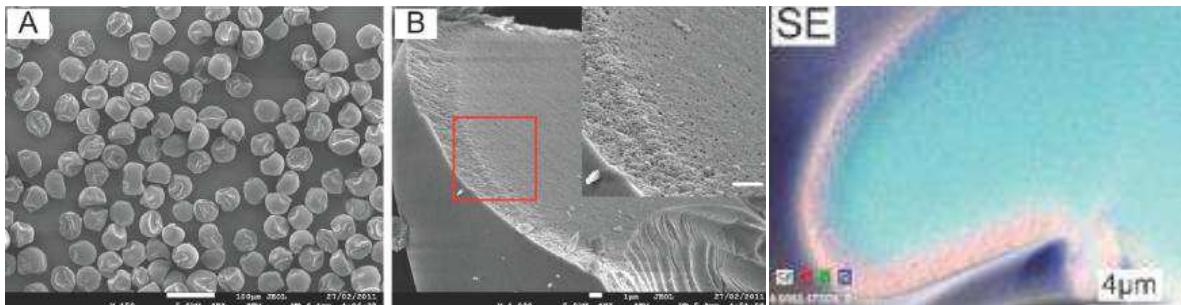


Figure 5 : A) et B) Clichés MEB de microcapsules d'Eudragit contenant un cœur de silice obtenues par nébulisation-séchage. SE) Cartographie élémentaire par MEB pour les atomes C, O et Si.

Cette méthode a été adaptée à de nombreux polymères biocompatibles et biodégradables tels que le Poly(acide lactique) (PLA), le Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), la gélatine, les polysaccharides et à des principes actifs lipophiles ou hydrophiles (stéroïdes, protéines, peptides) (Cohen *et al.* 1989; Schmiedel *et al.* 1989). Cette technique est rapide, peu coûteuse et facilement transposable à l'échelle industrielle. Les inconvénients de la méthode sont : la dispersité des tailles de capsules obtenues ainsi que les pertes liées à l'adhésion des particules sur les parois de la chambre d'atomisation et à leur auto-agrégation. Des méthodes d'atomisation séchage en phase aqueuse ont été envisagées puisqu'elles permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques. Elles nécessitent néanmoins des températures de séchage élevées ($>100^{\circ}\text{C}$) qui peuvent entraîner la dégradation des principes actifs encapsulés, dénaturation des protéines par exemple.

1.2.3. Les techniques physico-chimiques

1.2.3.1. Hydratation et nanoprecipitation

Certains polymères amphiphiles, de masse molaire et fraction hydrophobe/hydrophile données, s'auto-assemblent en solution pour former des capsules à cœur aqueux. Ces capsules ont été nommées polymersomes par analogie avec les liposomes. L'auto-assemblage est un procédé spontané, c'est-à-dire qu'il ne nécessite pas d'apport externe d'énergie. La force motrice est l'effet hydrophobe, qui vise à diminuer l'énergie libre globale du système en augmentant son entropie. Lorsque le copolymère amphiphile est porté en milieu aqueux, les molécules d'eau sont expulsées du bloc hydrophobe, conduisant le copolymère à s'assembler de façon à minimiser l'interface entre le

bloc hydrophobe et le bloc hydrophile. Les deux principales méthodes expérimentales sont la dissolution directe (ou hydratation de film) et la nanoprecipitation (ou déplacement de solvant).

La première méthode consiste simplement à hydrater le copolymère, sous forme massique (poudre) ou sous forme d'un film mince préformé, méthode historique de préparation des liposomes (Kukula *et al.* 2002). La cinétique de l'auto-assemblage dépend des propriétés chimiques (masse molaire, fraction hydrophile) et physiques (température de transition vitreuse, T_g , température de fusion, T_m) du copolymère. Les inconvénients principaux de la méthode sont liés à la faible reproductibilité et la polydispersité des capsules obtenues (Sanson *et al.* 2010). Comme pour les liposomes, la polydispersité peut être améliorée par extrusion. La deuxième méthode fait intervenir l'utilisation d'un co-solvant miscible à l'eau (acétone, DMSO, THF). Le copolymère est d'abord solubilisé dans le co-solvant. Cette phase organique est ensuite ajoutée de façon contrôlée (seringue, goutte à goutte) à une phase aqueuse de plus grand volume (non solvant du polymère). Enfin, le co-solvant résiduel est éliminé par dialyse ou évaporation sous pression réduite (Figure 6, (Fattal *et al.* 2012)). De nombreux paramètres (sens et vitesse d'addition, ratios volumiques des deux phases, concentration du polymère) déterminent les caractéristiques de la capsule formée (taille, polydispersité) (Lince *et al.* 2008; Sanson *et al.* 2010) ainsi que ses capacités d'encapsulation (Letchford *et al.* 2007). Avec un copolymère amphiphile, la nanoprecipitation conduit à la formation de capsules à cœur aqueux. Il est aussi possible d'obtenir des capsules à cœur huileux, en solubilisant, au préalable, dans le co-solvant, une huile : benzoate de benzyle (Fessi *et al.* 1989) ou perfluorocarbone (PFC) (Diou *et al.* 2012), par exemple.

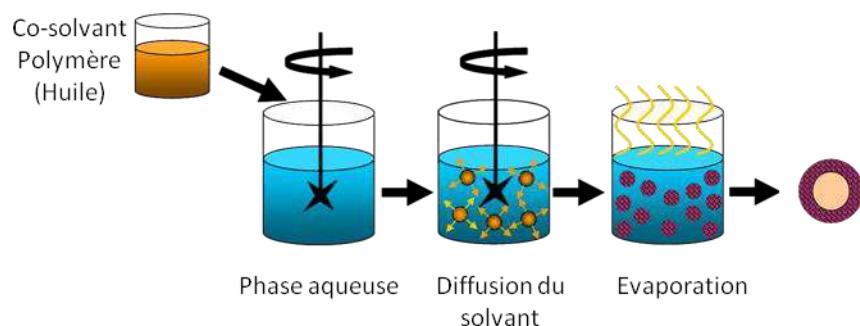


Figure 6 : Formation de capsules à cœur aqueux ou huileux par nanoprecipitation.

Les substances encapsulées par nanoprecipitation sont aussi variées que les anticancéreux (Ahmed *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2009), les protéines thérapeutiques, les siRNA (petits acides ribonucléiques interférents), pour la thérapie génique (Christian *et al.* 2009; Kim *et al.* 2009) ou des molécules fluorescentes pour l'imagerie médicale comme les porphyrines (Ghoroghchian *et al.* 2006) (Figure 7 gauche) ou les quantum dots (Liu *et al.* 2012) (Figure 7 droite).

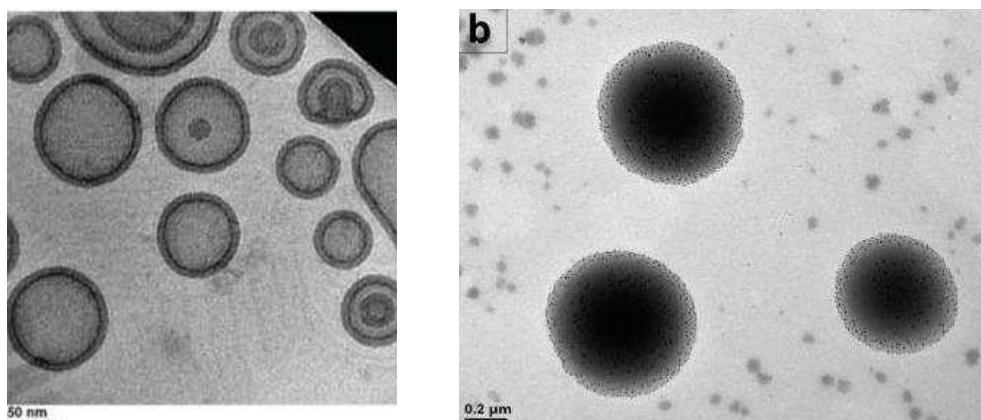


Figure 7 : Gauche : Cliché Cryo-MET de polymersomes de PEO-*b*-PBD, préparés par hydratation de film. Les molécules fluorescentes sont encapsulées dans la membrane hydrophobe. Droite : Cliché MET de polymersomes de PLA-*b*-PMPC, préparés par nanoprecipitation. Les quantum-dots hydrophiles (contraste négatif) se situent de part et d'autre de la membrane ainsi que dans le compartiment aqueux central.

1.2.3.2. L'assemblage couche par couche

La construction d'une membrane polymère autour d'un cœur solide peut se faire par additions successives dans la phase aqueuse de polyélectrolytes de charges opposées. Les forces motrices de l'assemblage seront les interactions électrostatiques ainsi que les liaisons hydrogènes (Shi *et al.* 2001). Ainsi Khopade *et al.* ont déposé successivement des couches de polymères non biodégradables : le poly(styrène sulfonate), (PSS), chargé négativement et le poly(amidoamine) dendrimère de 4^{ème} génération, (PAMAM), chargé positivement, sur des microparticules support sphériques de mélamine formaldéhyde. En conditions acides, le cœur est facilement dégradé laissant libre une cavité centrale aqueuse. De plus, la membrane est perméable, des chaînes de dextran sulfonate peuvent alors diffuser au cœur de la capsule. La doxorubicine, principe actif hydrophile, a ensuite été introduite en excès. Les capsules se dégonflent puis se regonflent sous l'effet de la pression osmotique pour finalement contenir en leur cœur, un complexe ionique fort entre les molécules de dextran et la doxorubicine, chargée positivement (Khopade *et al.* 2002) (Figure 8). La méthode d'assemblage couche par couche a été adaptée à des polymères biocompatibles et biodégradables comme le chitosan, la cellulose, le sulfate de chondroïtine et la poly(L-lysine) (Zhao *et al.* 2008; Xie *et al.* 2009).

Travaux antérieurs

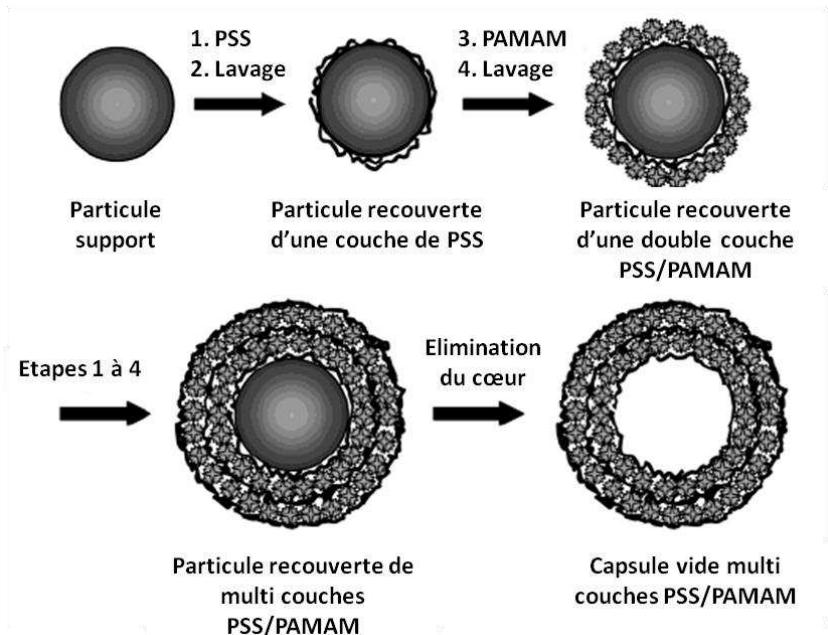


Figure 8 : Représentation schématique du procédé d'encapsulation couche par couche.

Une approche intéressante a été étudiée par Zhao *et al.* pour soigner les patients atteints d'hyperglycémie ou de diabète. Ils ont recouvert des cristaux d'hydrocortisone en déposant alternativement des couches d'insuline et d'alginate (Figure 9). A pH physiologique, l'insuline et l'alginate sont chargées négativement, la capsule est alors désassemblée, conduisant à la libération des deux principes actifs (Zhao *et al.* 2011). Les inconvénients liés à la méthode d'assemblage couche par couche sont relatifs aux difficultés de purification et de concentration des capsules ainsi qu'à la lourdeur du procédé multi-étapes (Sablon 2008). En effet, chaque dépôt doit être suivi par l'élimination du polymère en excès pour éviter la formation compétitive d'agrégats polyélectrolytes en complément des capsules.

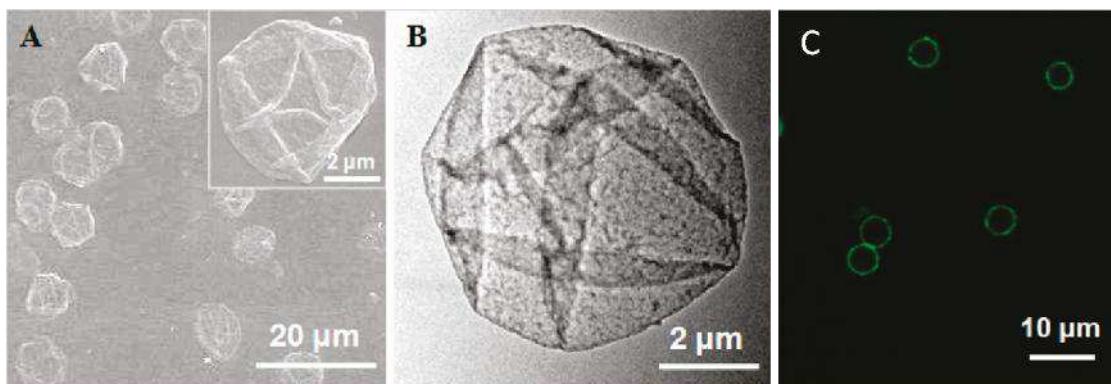


Figure 9 : A et B : Clichés MEB de capsules de $(\text{insuline/alginate})_5$. C : Microscopie confocale de capsules préparées avec de l'alginate marqué.

Les deux méthodes décrites ci-dessus ne nécessitent pas d'apport externe d'énergie. Il n'en est pas de même pour la coacervation et l'émulsion-évaporation, décrites par la suite.

1.2.3.3. La coacervation

Dans les années 1960, Phares et Sperandio ont été les pionniers dans le domaine de l'encapsulation de principes actifs par coacervation. Ils proposèrent ainsi de nouvelles formulations d'acide acétylsalicylique et de pénicilline à base de gélatine (Phares *et al.* 1964). La coacervation est un phénomène colloïdal qui implique la dispersion du principe actif A, la désolvatation progressive du polymère B constitutif de la membrane de la capsule, par ajout d'un troisième composant C, agent de coacervation (Figure 10-1). Deux types de coacervation existent selon la solubilité du polymère en phase aqueuse ou organique.

En phase aqueuse, la précipitation du polymère B est provoquée par addition d'éthanol, d'un sel (sulfate de sodium), ou variation de la température ou du pH : coacervation simple, ou par addition d'un deuxième polymère B', de charge opposée au premier : coacervation complexe. Lamprecht *et al.* ont utilisé cette dernière technique avec deux polymères B et B' naturels : la gomme arabique et la gélatine pour former des capsules au cœur huileux (Figure 11) (Lamprecht *et al.* 2000). Le procédé d'encapsulation se fait en 3 étapes. Au cours de la première étape, l'agent de coacervation, C, va entraîner la formation d'un système triphasique : une phase coacervat (riche en polymère), une phase pauvre en polymère et une phase riche en principe actif, maintenues sous agitation (Figure 10-1). Dans la deuxième étape, la phase riche en polymère précipite sous forme de microgouttes à la surface des particules de principe actif (Figure 10-2). Ces microgouttes fusionnent pour former une membrane continue, qui durcit, après désolvatation complète du polymère, ou par des réactions de réticulation (Figure 10-3) (Benita 2006). Les polymères couramment utilisés pour cette technique sont : le chitosan et la gélatine (chargés positivement), la gomme arabique et les polyphosphates (chargés négativement).

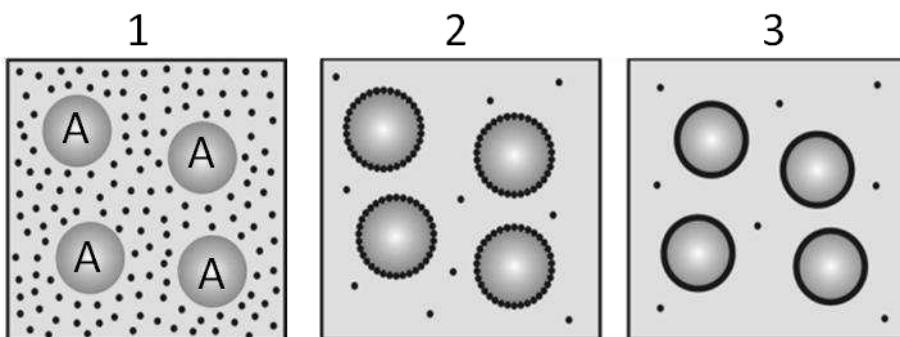


Figure 10 : Représentation schématique du procédé de coacervation conduisant à la formation de microcapsules. 1 : Particules de principe actif dispersé, A, en présence d'un polymère B (•). 2 : Précipitation du polymère sous forme de microgouttes, autour de A. 3 : Fusion de la membrane.

Parce que les polymères utilisés pour l'encapsulation pharmaceutique sont souvent insolubles dans l'eau (polyesters), des techniques de coacervation en phase organique existent. Dans ce cas, la désolvatation du polymère est provoquée par un changement de température, l'ajout d'un non solvant du polymère B, ou d'un autre polymère B'. Les inconvénients liés à la méthode de

coacervation sont les quantités importantes de solvant organiques nécessaires et difficiles à éliminer (Thomasin *et al.* 1998) ainsi que le caractère collant des capsules qui peuvent ensuite s'agréger (Nihant *et al.* 1995).



Figure 11 : Images de microscopie confocale des capsules de gomme arabique et de gélatine. Gauche : Le cœur huileux est marqué grâce au rouge Nil et permet de distinguer les capsules vides des capsules pleines. Droite : La membrane est marquée par l'utilisation de gélatine fluorescente.

1.2.3.4. L'émulsion-évaporation de solvant

Lors du procédé d'émulsion, le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant organique volatil (dichlorométhane, chloroforme...). Cette solution est émulsifiée contre un volume important de phase aqueuse, stabilisée par un tensioactif : Poly(alcool de vinyle), cholate de sodium (SC), Pluronic, etc.). Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation.

Le procédé d'émulsion-évaporation peut être combiné au phénomène de coacervation (Loxley *et al.* 1998; Dowding *et al.* 2004). Dans ce cas, le polymère constitutif de la membrane, noté précédemment B, est dissous dans une solution comprenant un bon solvant (de B) volatil (b.s.) ainsi qu'un non solvant (de B) non volatil (n.s.). Cette phase organique est ensuite dispersée au sein d'une phase aqueuse, stabilisée par un tensioactif, pour former une émulsion directe. Le solvant volatil est évaporé, la composition de la goutte évolue jusqu'à atteindre la courbe binodale du diagramme ternaire pour le système : b.s. (ex. CH_2Cl_2), n.s. (ex. hexadécane), polymère (ex. PMMA) (Figure 12), ce qui conduit à la séparation de phase du polymère au sein de la goutte (coacervat). Une interface supplémentaire bon solvant/non solvant est créée. Les gouttelettes riches en polymère migrent vers l'interface solvant/eau où elles coalescent pour former une membrane emprisonnant le non solvant non volatil en son cœur (Figure 12, (Loxley *et al.* 1998)). Ainsi Loxley *et al.* ont formé des capsules de Poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), contenant un cœur d'hexadécane (HD) (Figure 13). Le rôle du non solvant peut aussi être joué par un autre liquide (huile, PFC) de faible solubilité avec la phase organique (Pisani *et al.* 2006; Lertsutthiwong *et al.* 2008). Dans ce cas, le principe actif peut-être encapsulé dans la membrane hydrophobe de polymère (Rapoport *et al.* 2011) ou dissous dans le cœur lipophile. Ainsi Bae *et al.* ont incorporé du paclitaxel dans le cœur de lipidiol® (acides gras iodés extraits de l'huile d'œillette, 1^{er} agent de contraste pour les rayons X, développé par Guerbet) de

Travaux antérieurs

nanocapsules de poloxamère (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO) (Bae *et al.* 2007). Cette méthode de coacervation au sein d'une émulsion a été récemment adaptée par Atkin *et al.* avec une émulsion indirecte pour former des capsules au cœur aqueux (Atkin *et al.* 2004).

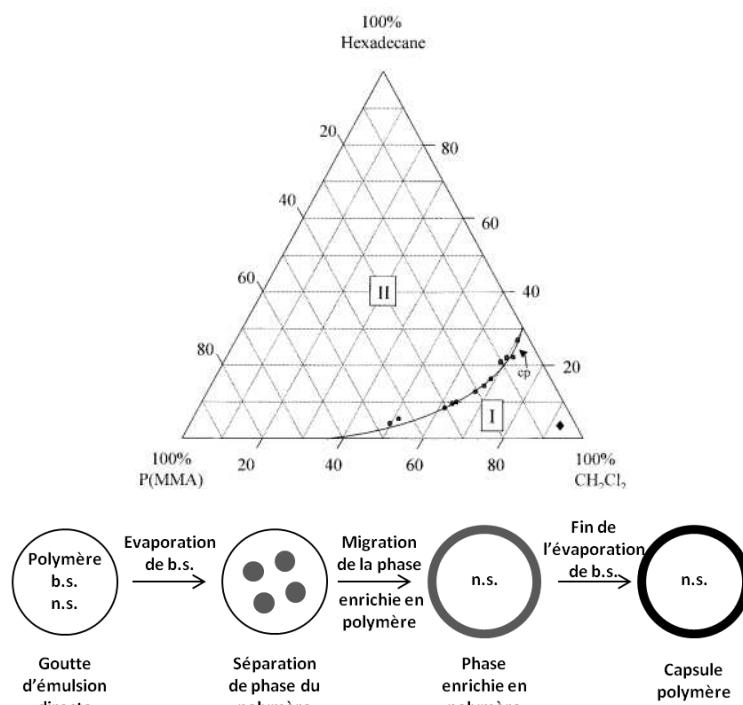


Figure 12 : Haut : Diagramme de phase ternaire empirique pour le système PMMA/HD/CH₂Cl₂. I and II indiquent les régions mono et biphasiques. Les axes sont exprimés en % massiques. Bas : Représentation schématique du procédé d'émulsion-évaporation combiné à la coacervation.
b.s. : bon solvant, n.s. : non solvant

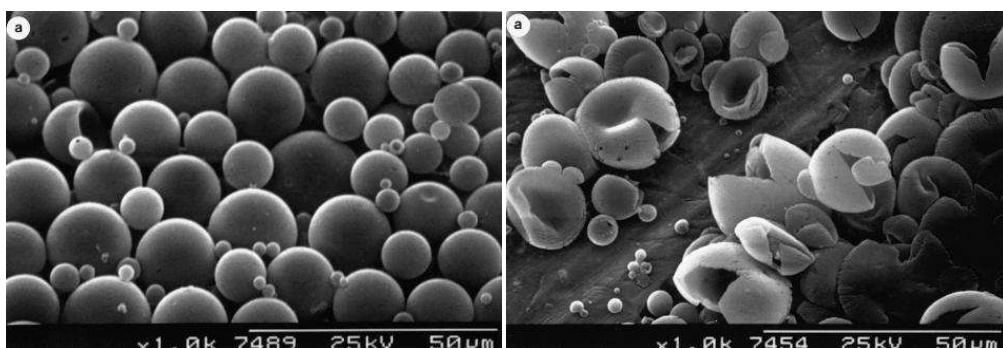


Figure 13 : Images MEB de microcapsules de PMMA obtenues par le procédé décrit figure 12.
Gauche/Droite : Avant/Après fracture sous pression.

Une autre méthode permet d'obtenir des capsules au cœur aqueux. Il s'agit de la double émulsion, procédé en deux étapes au cours duquel une phase aqueuse contenant un tensioactif est émulsifiée sous cisaillement important (sonication, homogénéisateur haute pression) au sein d'une phase organique contenant le polymère. Puis cette émulsion inverse est à nouveau cisaillée, dans des conditions plus douces (agitation magnétique) pour obtenir une émulsion indirecte-direkte. Cette

technique permet l'encapsulation de molécules hydrophiles (anatoxine diptérique, insuline) et a été adaptée à de nombreux polymères biocompatibles (Poly(acide lactique), Poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA)) (Singh *et al.* 1991) et copolymères à blocs amphiphiles Poly(éthylène glycol)-*b*-Poly(ϵ -caprolactone de γ -méthyle), (PEG-*b*-PMCL), et Poly(styrène)-*b*-Poly(oxide d'éthylène), (PS-*b*-PEO), dont l'utilisation permet de mieux contrôler l'épaisseur de la membrane (Hayward *et al.* 2006; Foster *et al.* 2010).

L'inconvénient de la méthode d'encapsulation par émulsion-évaporation réside dans l'utilisation courante de solvants chlorés toxiques et très volatils, dont les quantités résiduelles peuvent être supérieures aux seuils tolérés par la pharmacopée européenne, 600 ppm pour le dichlorométhane et 60 ppm pour le chloroforme. Lagarce *et al.* ont ainsi privilégié l'utilisation d'acétate d'éthyle, moins毒ique, pour l'encapsulation d'oxaliplatine dans du PLGA (Lagarce *et al.* 2005). Néanmoins ce remplacement peut entraîner une diminution du rendement d'encapsulation (Herrmann *et al.* 1995) dû à la relativement bonne solubilité du solvant dans l'eau, et donc sa diffusion rapide.

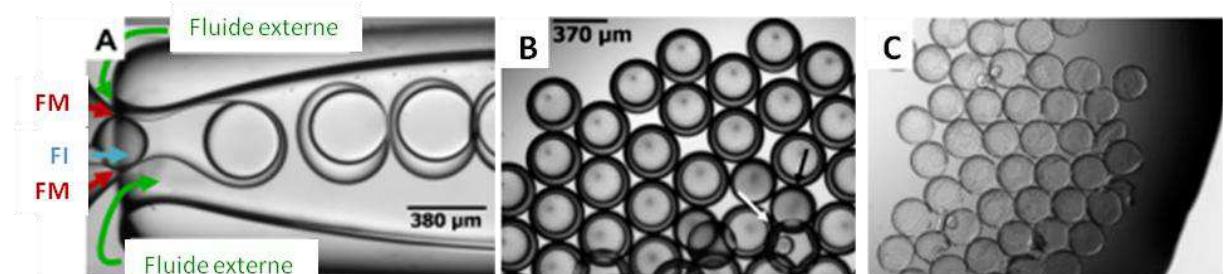


Figure 14 : Formation de l'émulsion double en microfluidique (A). Images de microscopie des gouttes monodisperses obtenues à la sortie du dispositif (B) puis après évaporation du solvant (C).

FM : Fluide du milieu et FI : Fluide Interne

Une approche intéressante du procédé d'émulsion-évaporation est très étudiée en ce moment car elle permettrait, à l'échelle industrielle, la production reproductible de capsules monodisperses avec des taux d'encapsulation élevés en principes actifs. Il s'agit de la microfluidique. Les émulsions sont formées goutte à goutte par l'intermédiaire de capillaires injectant les différentes phases (Figure 14, (Foster *et al.* 2010)).

1.3. Le contrôle de la morphologie : un défi à relever

Dans cette partie, nous nous intéresserons plus en détails au procédé d'émulsion-évaporation car c'est celui qui nous permettra, dans la partie expérimentale, de former les capsules polymères d'intérêt au cœur liquide fluoré. Les propriétés de ce liquide fluoré seront détaillées dans la troisième partie du chapitre 1. Ici nous pouvons l'assimiler à une huile de faible solubilité dans la phase organique. La formation de la capsule peut être décomposée en trois étapes au cours

desquelles des phénomènes thermodynamiques et cinétiques ont lieu, ils détermineront les caractéristiques de la capsule finale (Figure 15). Le premier système considéré est une goutte d'émulsion directe : la phase organique solubilisant l'huile et le polymère, est dispersée dans une phase aqueuse et stabilisée par des tensioactifs. Le deuxième système concerne la phase d'évaporation, dynamique, au cours de laquelle une première séparation de phase a lieu (nucléation de gouttes d'huile dans la phase organique). A la fin de l'évaporation, le polymère précipite pour former une membrane solide autour d'une goutte d'huile, système 3.

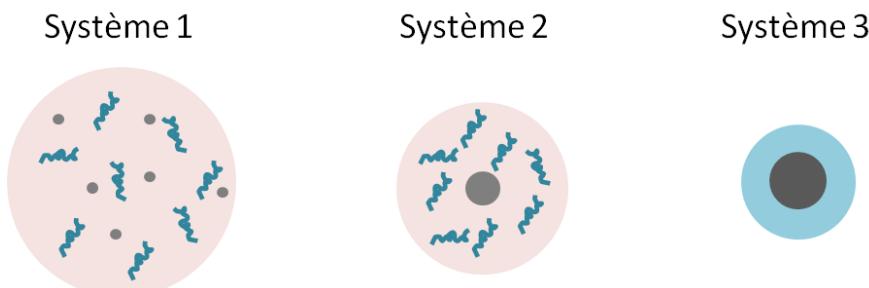


Figure 15 : Les 3 systèmes considérés lors de la décomposition des différentes étapes du procédé d'émulsion-évaporation.

1.3.1. Le système 1 : la goutte d'émulsion

Durant l'émulsification, la phase organique est cisaillée par différents procédés : homogénéisateur haute pression, tige de sonication, disperseur Ultra Turrax, ce qui conduit à la formation de gouttes stabilisées par un tensioactif. Si ce dernier est judicieusement choisi, la stabilité cinétique du système est assurée (pas de phénomène de coalescence, mûrissement d'Oswald) et la taille de la goutte d'émulsion, $d_{\text{émulsion}}$ détermine directement la taille finale de la capsule (Rosca *et al.* 2004). La goutte est une solution macroscopique de polymère (C_{polym}) contenant une huile (C_{huile}). En général, la solubilité d'un polymère en solvant dépend de sa structure (ramification, régularité, masse molaire en nombre M_n), de la température et du taux de cristallinité. En 1944, Flory Huggins décrivit les solutions macromoléculaires régulières en introduisant un paramètre d'interaction χ . Le polymère est considéré en bon solvant si $\chi < \chi_c$ et en solvant idéal si $\chi = \chi_c$ (Sauviat *et al.* 1981). Pour une température donnée χ_c est défini tel que : $\chi_c = \frac{1}{2}(1 + \frac{1}{\sqrt{x}})^2$ où x est le degré de polymérisation du polymère.

Pour un polymère de haut poids moléculaire x tend vers l'infini et χ_c tend vers 0.5, cette condition est souvent nommée θ . Néanmoins χ_c est un terme purement enthalpique et ne tient pas compte de la contribution entropique, à l'énergie libre de mélange. Le modèle ne permet pas de prédire le comportement des polymères en solvant polaire (acétone, butanone). De plus, il ne tient pas compte du volume exclu de la pelote de polymère. Ainsi un autre modèle a été décrit par Flory et Krigbaum. L'expression de χ_c est modifiée telle que $\chi_c = \frac{1}{2} - \Psi(1 - \frac{\theta}{T})$, où Ψ et θ sont indépendants

de la température, propres au couple polymère/solvant et peuvent être déterminés expérimentalement avec la méthode du point trouble. Pour les polyesters, polymères couramment utilisés dans l'encapsulation pharmaceutique, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane ou l'acétone peuvent être considérés comme des bons solvants à température ambiante (Thomasin *et al.* 1998; Mark 1999). En ce qui concerne l'huile, ici de faible poids moléculaire, la solubilité dans le solvant organique est prédictive par la loi de Hildebrand et Scott qui pose $\Delta H_M = V\Phi_1\Phi_2(\delta_1 - \delta_2)^2$ avec δ_1 et δ_2 , les paramètres de solubilité du solvant organique et de l'huile. Ces derniers sont définis comme la racine carrée de l'énergie de cohésion de la molécule donnée. La dissolution du composé est assurée si $\Delta H_M - T\Delta S_M < 0$ c'est-à-dire si $(\delta_1 - \delta_2)$ est faible. Les interactions polymère-huile sont en revanche peu décrites. Pour des quantités de polymère et de solvant données, la concentration de l'huile est définie grâce au diagramme de phase ternaire (telle que région I, Figure 12).

1.3.2. Le système 2 : la goutte qui s'évapore

Le système décrit précédemment n'est pas figé, le solvant volatil est progressivement éliminé par évaporation. En général, la température étant plus faible que le point d'ébullition du solvant, le procédé se fait en deux étapes : 1) diffusion du solvant dans la phase aqueuse et 2) évaporation à l'interface eau/air (McGinity *et al.* 1997). Pour exemple, la solubilité du dichlorométhane dans l'eau est d'environ 2%.

L'impact des conditions d'évaporation sur la morphologie de l'objet final n'est pas à négliger et a été étudié par de nombreux auteurs (Jeyanthi *et al.* 1996; Freitas *et al.* 2005). Yang *et al.* ont constaté une augmentation de la taille des particules de PLGA/albumine (BSA), de leur polydispersité et une diminution de leur densité en augmentant la température d'évaporation pour se rapprocher du point d'ébullition du solvant volatil (Yang *et al.* 2000). Si les conditions d'évaporation sont violentes (forte agitation, température élevée, flux d'air, rapport phase aqueuse/phase organique élevé), un gradient de concentration en polymère peut apparaître au sein du film. La surface de la goutte est plus concentrée que son cœur (Figure 16). Pour certains polymères (mélange PLGA/PEG) ceci peut entraîner la formation d'une « peau » (Yang *et al.* 2000). La diffusion du solvant à travers la peau peut se révéler difficile, ce qui conduit à une évaporation incomplète et des capsules gonflées en solvant. En revanche, l'évaporation rapide, favorise le caractère amorphe de la matrice de polymère qui assure une bonne dispersion, à l'échelle moléculaire, ainsi qu'une libération prolongée, du principe actif encapsulé dans la membrane de polymère (Izumikawa *et al.* 1991). Rosca *et al.* ont tout de même noté qu'une vitesse d'évaporation élevée conduit aussi à la diffusion rapide du principe actif vers la surface de la goutte affectant l'efficacité d'encapsulation et favorisant l'effet de « burst » lors de la libération (Rosca *et al.* 2004).

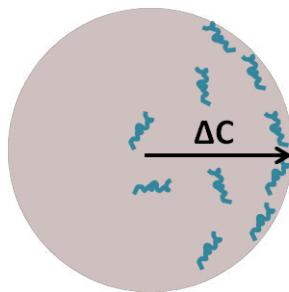


Figure 16 : Représentation schématique du gradient de concentration au sein de la goutte lors de l'évaporation du solvant.

Si les conditions d'évaporation sont douces, le film de polymère s'amincit progressivement. En conditions de bon solvant, les chaînes de polymère sont mobiles et s'organisent au sein du film. Si le polymère est régulier (par exemple de D-PLA ou L-PLA), ces conditions favorisent sa cristallisation, ce qui assure une moins bonne dispersion d'un principe actif (par rapport au cas amorphe). De plus, lors de l'évaporation la goutte est soumise à de fortes contraintes, illustrées par Rosca *et al.* via un facteur $\alpha_t = \frac{d_i}{d_f}$ lié directement aux dimensions de la goutte au début (d_i) et à la fin de l'évaporation (d_f) (Rosca *et al.* 2004). Le caractère cassant de la croûte cristalline en formation peut faire apparaître des fractures et des inhomogénéités de surface sur la capsule (Figure 17) (Chung *et al.* 2001).

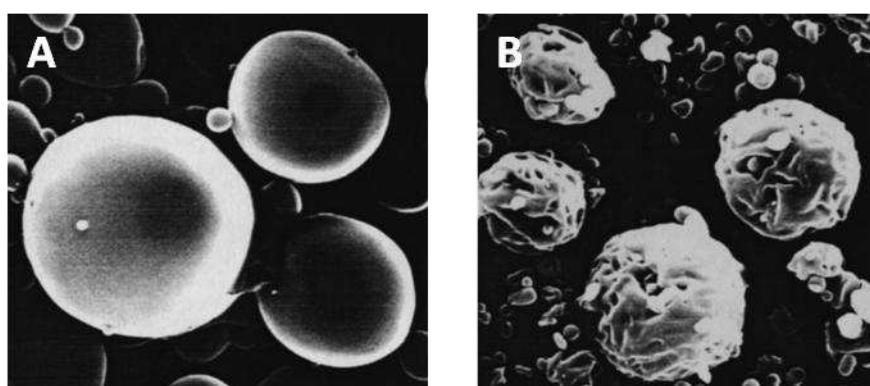


Figure 17 : Cliché MEB de capsules de PLLA préparées par émulsion-évaporation. A : La vitesse d'évaporation est rapide, la surface des capsules est lisse. B : La vitesse d'évaporation est normale, la surface est fissurée laissant des capsules poreuses.

Pour conclure, le phénomène d'évaporation est complexe. Il importe donc de bien choisir les conditions en fonction du polymère (cristallinité, T_g ...) et du solvant considérés afin d'optimiser les propriétés de la capsule finale.

Au fur et à mesure de l'évaporation, une nouvelle interface huile/solvant est créée. En effet, lorsque la limite de solubilité de l'huile dans le solvant est atteinte (cas des PFC développé par la

suite), il y a séparation de phase et nucléation au sein de la goutte. Les phénomènes interfaciaux qui interviennent vont alors jouer un rôle crucial pour la morphologie finale.

1.3.2.1. Le système 3 : la capsule qui se fige

Plusieurs équipes ont étudié les conditions de mouillage lors de la phase d'évaporation et les ont reliées à la morphologie de la capsule finale. Torza et Mason ont considéré le système ternaire suivant : une goutte de deux liquides non miscibles phases 1 et 3 portées au contact de 2, non solvant de 1 et 3 et décrivirent en détails son évolution à l'équilibre. Ils calculèrent les coefficients d'étalement des différentes phases, en fonction des tensions interfaciales respectives : $S_i = \gamma_{jk} - (\gamma_{ij} + \gamma_{ik})$. Les tensions interfaciales étant déterminées expérimentalement par la méthode de la goutte pendante ou de la lame de Wilhelmy par exemple. Puis ils ont défini des conditions de mouillage en fixant $\gamma_{12} > \gamma_{23}$ (impliquant $S_1 < 0$) qui permettent de prédire la morphologie finale de l'objet (Figure 18) :

Cas 1 : Si $S_1 < 0$; $S_2 < 0$ et $S_3 > 0$ les conditions de mouillage sont satisfaites : la phase 3 recouvre un cœur de phase 1. Les particules adoptent la morphologie cœur-couronne.

Cas 2 : Si $S_1 < 0$; $S_2 < 0$ et $S_3 < 0$ Cas intermédiaire pour lequel la phase 3 mouille partiellement la phase 1. Le cœur de phase 1 est décentré, les particules adoptent une morphologie double hémisphère.

Cas 3 : Si $S_1 < 0$; $S_2 > 0$ et $S_3 < 0$ Cas extrême pour lequel deux gouttelettes de solvant 2 contiennent séparément les phases 1 et 3 (Torza *et al.* 1970).

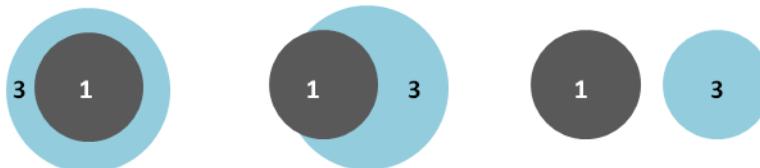


Figure 18 : Morphologies attendues par Torza et Mason selon le signe des paramètres d'étalement S_1 , S_2 et S_3 . Cas 1 (gauche), cas 2 (milieu) et cas 3 (droite).

La théorie de Torza et Mason a été adaptée au système ternaire qui nous intéresse à savoir : l'huile (phase 1), la solution de polymère en bon solvant (phase 3) et la phase aqueuse dispersante (phase 2). Néanmoins, dans certains cas cette théorie échoue à la prédiction des morphologies (Pisani *et al.* 2008). Ceci est principalement dû au fait qu'elle ne considère que des morphologies à l'équilibre thermodynamique et qu'elle ne décrit que le comportement de petites molécules aux coefficients de diffusion élevés, alors que les polymères, de par leur masse, ont une mobilité réduite. Une autre théorie a été développée par Sundberg *et al.* qui permet de traiter le cas des polymères. Ils ont considéré les variations d'énergie libre aux interfaces d'un système ternaire : $G = \sum \gamma_{ij} A_{ij}$

Travaux antérieurs

favorisant la morphologie de plus basse énergie. Ils ont de plus montré que, dans certaines conditions d'évaporation, des morphologies cinétiquement favorables peuvent être privilégiées (Sundberg *et al.* 1990).

Le tensioactif joue un rôle déterminant au cours de cette dernière étape du procédé. Tout d'abord, il importe de bien le choisir. Ainsi Pisani *et al.* ont montré que la morphologie cœur-couronne était largement favorisée par l'utilisation de cholate de sodium, alors que le taurocholate de sodium, pourtant de structure chimique semblable, conduit à la formation de capsules double hémisphère (Pisani *et al.* 2008). La concentration du tensioactif détermine aussi la morphologie finale des capsules. Hayward *et al.* ont fait évoluer la morphologie de capsules de Poly(styrène)-*b*-Poly(oxide d'éthylène) (PS-*b*-PEO) en faisant varier la quantité de tensioactif laurylsulfate de sodium (SDS). Les capsules sont sphériques avec une surface rugueuse, pour de faibles concentrations de SDS. Elles se déforment progressivement et deviennent allongées puis filaires, en multipliant par 10 la concentration initiale de SDS (Zhu *et al.* 2009). Enfin si on utilise des copolymères à bloc amphiphiles, en tant qu'agent tensioactif, la nature du bloc hydrophobe peut influer sur la composition de surface des capsules. Ainsi Jeon *et al.* forment des particules à partir d'un mélange de PS et de Poly(styrène)-*b*-Poly(butadiène) (PS-*b*-PB). Une phase aqueuse stabilisée par du PS-*b*-PEO permet d'obtenir des particules dont la surface est enrichie en PS. Alors que cette dernière est enrichie en PB avec du PB-*b*-PEO, comme tensioactif. Les auteurs ont conclu que le bloc du PS-*b*-PB, le plus compatible avec le tensioactif, s'oriente vers la surface des particules (Jeon *et al.* 2008).

Si le polymère enrobant possède lui-même des propriétés de stabilisation interfaciale (cas des copolymères amphiphiles), c'est au cours de l'évaporation qu'il va progressivement migrer vers l'interface et remplacer le tensioactif. D'autres phénomènes vont alors entrer en jeu et influer sur les caractéristiques de la capsule finale, notamment en termes d'homogénéité d'épaisseur de la membrane. Plusieurs équipes ont mis en évidence des conditions de mouillage partiel du film de polymère sur le cœur aqueux lorsqu'il s'agit d'émulsions doubles de copolymère à blocs amphiphiles. Ceci se traduit par un paramètre d'étalement S_3 (Figure 18) légèrement négatif (Lorenceanu *et al.* 2005; Shum *et al.* 2008). Phénomène d'autant plus important que l'évaporation est rapide.

Hayward *et al.* ont envisagé l'évolution de ces conditions de mouillage lors de l'évaporation d'émulsions doubles de PS-*b*-PEO et PB-*b*-PEO. Dans certains cas : évaporation rapide ou concentration élevée en polymère, le film de polymère ne mouille plus correctement la goutte d'eau interne et forme une lentille riche en polymère (Figure 19, (Hayward *et al.* 2006)). En variant la fraction bon/mauvais solvant pour des polymersomes de Poly(acide lactique)-*b*-Poly(éthylène glycol) (PLA-*b*-PEG), Shum et al ont mis en évidence une force d'adhésion entre les deux monocouches de copolymère, plus précisément entre les blocs de PLA, en bleu sur le schéma, telle que

$\Delta F = 2\gamma_m^o(1 - \cos \theta_c^o)$ où γ_m^o est l'énergie interfaciale eau-solvant pour la phase aqueuse externe et θ_c^o l'angle de contact correspondant. Cette force d'attraction entraîne la formation d'un film mince composé d'une double couche de PLA-*b*-PEG (Shum *et al.* 2011). Cette force a déjà été utilisée pour entraîner l'agrégation stable, sans coalescence, de gouttes d'émulsions d'eau dans l'huile stabilisées par des phospholipides (Phosphatidylcholine d'oeuf) (Poulin *et al.* 1998). Le solvant est alors déplété (exclu) de ces zones d'adhésion et emporté de l'autre côté de la goutte, entraînant ainsi le démouillage. Hayward *et al.* ont démontré que cette énergie d'adhésion augmente bien lorsque l'évaporation a lieu (Hayward *et al.* 2006).

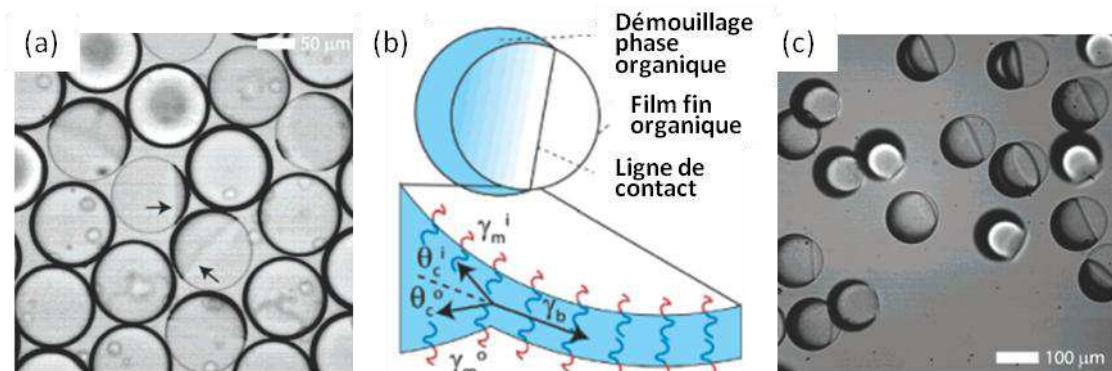


Figure 19 : a et c) Clichés de microscopie optique mettant en évidence le phénomène de démouillage lors de l'évaporation du solvant d'une émulsion double, pour des concentrations respectivement faibles (0,1%) et élevées (1,5%) de PS-PEO. Les flèches indiquent le front de solvant qui s'évapore marquant distinctement la ligne de contact. b) Représentation schématique du mouillage partiel et de l'organisation des chaînes de polymère dans le film mince.

Foster *et al.* ont envisagé un scénario légèrement différent, faisant suite aux conditions de mouillage partiel du film de polymère sur la goutte d'eau interne, au sein d'émulsion double. Dans leur cas, les instabilités interfaciales ayant lieu au cours de l'évaporation entraînent des inhomogénéités d'épaisseur de membrane (figure 20D). Au début de l'évaporation, la densité de chaînes de polymère aux interfaces MF/IF (solvant/eau interne) et MF/OF (solvant/eau externe) sont égales aussi bien dans la zone d'excès de polymère qu'au sein du film mince de polymère. Il en résulte l'égalité des tensions interfaciales dans les deux zones distinctes de la goutte, c'est-à-dire $\gamma_e = \gamma_i$ (Figure 20A). Au fur et à mesure de l'évaporation, la zone déjà en excès de polymère va s'enrichir d'autant plus, diminuant localement l'énergie interfaciale entre MF/OF. Le film mince, quant à lui, est déjà saturé en polymère, γ_i reste donc constant. Au sein de la même goutte, il y a alors déséquilibre des tensions interfaciales avec $\gamma_e < \gamma_i$ (Figure 20B). Cet état transitoire est caractérisé par l'apparition d'instabilités de type Marangoni au sein de la goutte qui vont conduire à un flux de solvant dans le sens du gradient de tension de surface. Ceci induit des fluctuations d'épaisseur au sein du film mince de

Travaux antérieurs

polymère et laisse des zones enrichies (patches) ou déplétées en polymère après évaporation complète du solvant (Figure 20C) (Foster *et al.* 2010).

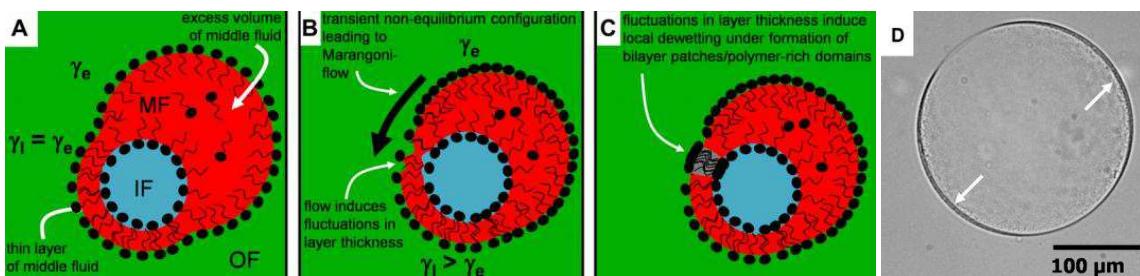


Figure 20 : A-C : Schéma décrivant les différents phénomènes conduisant à la création d'inhomogénéités d'épaisseur au sein de la membrane de polymère (PEG-*b*-PMCL), mises en évidence par les flèches blanches sur l'image de microscopie (D).
MF : solvant ; OF : eau externe ; IF : eau interne

Pisani *et al.*, ont mis en évidence la présence d'instabilités de surface pour des capsules à cœur huileux perfluoré, formées à partir d'un mélange de PLGA/PLGA-*b*-PEG. Lorsque la quantité de PLGA-*b*-PEG dans le mélange devient supérieure à 10 %, des protrusions apparaissent en surface de la capsule. Ces dernières résultent de la nécessité pour la capsule, de créer de la surface pour pouvoir orienter toutes les chaînes de PEG, hydrophiles, vers l'interface lors de l'évaporation du solvant (Figure 21, (Pisani *et al.* 2009)).

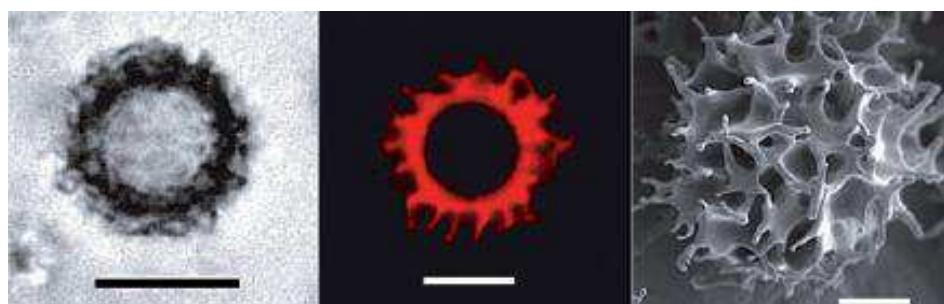


Figure 21 : De gauche à droite : Microscopie optique, confocale et électronique à balayage de capsules de PLGA/PLGA-*b*-PEG (80/20) (obtenues par émulsion-évaporation. Les barres d'échelle représentant respectivement 10 ; 5 et 2 μm.

Pour conclure, à toutes les étapes du procédé d'émulsion-évaporation, la morphologie des capsules peut être impactée. Les capsules peuvent être déformées ou leurs performances diminuées. C'est pourquoi il est indispensable de contrôler tous les paramètres tels que : le tensioactif (nature, concentration), les conditions d'évaporation, le polymère enrobant (nature, concentration) afin d'optimiser le rendement et la dispersité des capsules obtenues.

Travaux antérieurs

Dans cette première partie, nous avons montré qu'il était possible de former des capsules polymères à cœur huileux ou aqueux à visée pharmaceutique par différents procédés chimiques, mécaniques et physico-chimiques. Le procédé d'émulsion-évaporation est particulièrement intéressant car il est simple, rapide et peut être adapté à de nombreux polymères enrobant et principes actifs. Néanmoins, il fait intervenir des phénomènes physico-chimiques complexes, dont il est indispensable d'anticiper les effets, afin de mieux contrôler la morphologie finale de la capsule. Dans la suite, nous nous intéressons à des capsules polymère, contenant un cœur liquide fluoré, utilisées comme agents théranostiques pour l'imagerie et le traitement du cancer.

2. L'encapsulation dans le contexte de la théranostique du cancer

L'incidence des principaux cancers (poumon, sein, prostate, colon) est en augmentation constante en Europe où 3,2 millions nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Cette augmentation est liée à l'allongement de l'espérance de vie ainsi qu'à une exposition accrue aux agents cancérogènes (tabac, alimentation, stress, rayonnement). Elle génère une hausse du nombre d'examens à des fins diagnostiques, effectués de plus en plus tôt, dans le but d'améliorer le pronostic vital du patient et d'envisager rapidement une démarche thérapeutique plus adaptée et personnalisée. De plus, les tissus tumoraux sont parfois difficilement discernés des tissus sains, ou sont localisés dans des zones peu accessibles. C'est pourquoi, l'utilisation d'agents de contraste est souvent requise pour localiser et décrire précisément la nature et la structure de la tumeur. Ainsi près de 14 millions d'examens sont effectués chaque année, en Europe, avec des produits de contraste. Développer, améliorer les techniques d'imagerie médicales et en faciliter l'accès est un enjeu de santé publique. Ce dernier peut être illustré par l'évolution de la prise en charge du cancer du sein. 40 millions de femmes de plus de 50 ans devraient profiter d'un dépistage systématique qui permettrait une augmentation du nombre de rémission sans récidive. Dans cette partie, nous nous intéresserons donc à l'encapsulation dans le contexte de l'imagerie et de la thérapie du cancer.

Deux méthodes d'imagerie ont été choisies car elles sont non invasives et complémentaires : l'échographie et l'IRM du Fluor. Les avantages de la première sont sa simplicité, son faible coût, et sa large disponibilité. L'IRM du Fluor, apporte, quant à elle, de bonnes performances en termes de sensibilité et de résolution spatiale. Nous détaillerons d'abord le principe et les opportunités des deux méthodes. Puis nous ferons un état de l'art des systèmes nanométriques conçus pour, à la fois imager et traiter le cancer par échographie et IRM, ainsi appelés systèmes nanothéranostiques.

2.1. L'importance de la détection

2.1.1. L'échographie

Depuis plus de 30 ans, l'échographie médicale permet de distinguer les tumeurs solides des kystes bénins, notamment dans le cas du cancer du sein, réduisant ainsi le nombre de biopsies nécessaires (Stavros *et al.* 1995). Cette technique a aussi prouvé son efficacité pour la détection de masses tumorales au niveau du côlon ou d'un rétrécissement anormal de la paroi intestinale ((Richardson *et al.* 1998), Figure 22). Elle peut être utilisée en complément ou en remplacement d'examens endoscopiques (Martinez-Ares *et al.* 2005).



Figure 22 : Image échographique de l'abdomen à 3,5MHz révélant la présence d'une zone tumorale hypoéchogène (délimitée par les flèches).

L'examen échographique est flexible, peu coûteux, permet d'obtenir des images en temps réel et peut être effectué chez le patient sans nécessiter d'hospitalisation. Néanmoins, la méthode est opérateur-dépendante et certains organes restent difficiles à imager notamment le crâne (réflexion importante des os), le pancréas et les poumons, qui contiennent une trop grande quantité de gaz.

L'échographie est basée sur la réflexion d'une onde ultrasonore incidente (i_1) lorsqu'elle rencontre une interface entre deux milieux (1 et 2) de propriétés mécaniques différentes. Dans ce cas, une partie de l'amplitude acoustique, se propageant dans le milieu 1 est rétro-diffusée (r_1), l'autre est transmise au milieu 2 (t_2) (Figure 23). On définit alors l'impédance acoustique d'un milieu telle que $Z_i = \rho_i c_i$ où ρ_i est la densité et c_i la vitesse acoustique de l'onde dans le milieu i . L'amplitude de l'onde réfléchie à l'interface 1-2 augmente avec la différence d'impédance $Z_1 - Z_2$. Par définition, la fréquence de l'onde ultrasonore incidente, générée par le transducteur médical, est supérieure à 1 MHz. En clinique elle est souvent inférieure à 18 MHz. Plus la fréquence est élevée, meilleure est la résolution de l'image échographique mais plus grande est aussi l'atténuation du signal par absorption. La profondeur d'exploration est ainsi réduite de 10 à 3 cm en augmentant la fréquence de 5 à 12 MHz.

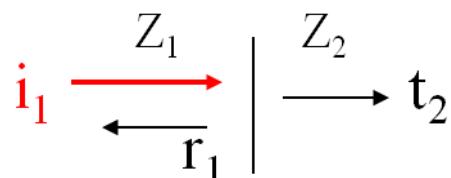


Figure 23 : Représentation schématique de la propagation d'une onde acoustique à l'interface entre deux milieux d'impédance acoustique Z_1 et Z_2 .

L'effet visé par les agents de contraste ultrasonore est une augmentation de l'intensité rétro-diffusée par la création d'une nouvelle interface réfléchissante. Deux types de réflexions peuvent ici être distinguées. D'une part, la réflexion passive est basée sur la différence d'impédance acoustique définie précédemment. La section efficace de diffusion d'un agent de contraste est définie telle que :

$\sum_d = \frac{4\pi}{9} k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{3}{4} \frac{(\rho_d - \rho)^2}{(\rho_d + \rho)^2} \right]$ où k est le vecteur de l'onde incidente, R le rayon de l'agent de contraste, κ_d et κ sont les compressibilités de l'agent de contraste et du milieu respectivement et ρ_d et ρ les densités de l'agent de contraste et du milieu. Ainsi l'échogénicité (capacité à rétro-diffuser les ultrasons) d'un agent de contraste est d'autant meilleure que son diamètre est élevé et que ses propriétés physiques diffèrent de celles du tissu environnant. Néanmoins la taille des agents de contraste est limitée par leur mode d'administration, un maximum de 6 à 8 μm sera admis s'ils sont injectés par voie intraveineuse. D'autre part, l'agent de contraste peut aussi agir comme un réflecteur actif en devenant lui-même une source ponctuelle émettrice d'ultrasons. Ceci est valable si l'effet des ultrasons entraîne une modification périodique du volume de l'agent de contraste. C'est dans cette problématique, que de nombreux agents de contraste ont été développés et commercialisés tels que des microbulles gazeuses : Sonovue® ou Definity® (Tranquart *et al.* 2007), qui se compriment ou se dilatent suivant le sens de la pression acoustique. Les oscillations de la microbulle sont d'autant plus rapides que la fréquence de l'onde incidente se rapproche de la fréquence de résonnance caractéristique de la microbulle (Figure 24).

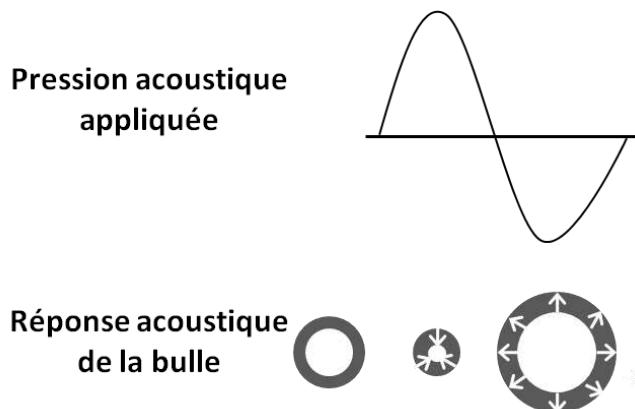


Figure 24 : Représentation schématique de la compression et dilatation d'une microbulle sous l'effet de la pression acoustique.

2.1.2. L'IRM

Le principe de l'IRM repose sur un phénomène quantique pouvant être observé pour certains noyaux atomiques à spin nucléaire non nuls, tels que le ^1H ($S=1/2$) ou le ^{19}F ($S=1/2$), qui nous intéressent ici plus particulièrement. Ces noyaux sont caractérisés par un moment magnétique, μ , tel que : $\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$ où γ est le rapport gyromagnétique. On peut noter que γ_{H} et γ_{F} sont très proches : $\gamma_{\text{H}}=267,513\times 10^6$ rad.s $^{-1}$ T $^{-1}$ et $\gamma_{\text{F}}=251,815\times 10^6$ rad.s $^{-1}$ T $^{-1}$. En l'absence de champ magnétique externe, l'orientation des moments magnétiques au sein d'un échantillon est aléatoire et isotrope. Il en résulte une aimantation nulle à l'échelle macroscopique. Après application d'un champ magnétique d'amplitude B_0 , les moments magnétiques s'orientent dans les directions parallèle ou antiparallèle au champ, ce

qui correspond aux états énergétiques excité et fondamental distants de $\Delta E = \frac{1}{2\pi} \gamma h B_0$ (h étant la constante de Plank). La répartition des moments magnétiques sur les deux niveaux d'énergie n'étant pas symétrique, une aimantation totale réside au sein de l'échantillon : $\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_v \vec{\mu}$ où V est le volume de l'échantillon. Un champ magnétique variable B_1 , perpendiculaire à B_0 , est ensuite appliqué, de façon transitoire, au système sous la forme d'une impulsion électromagnétique radio fréquence. L'aimantation est alors écartée de sa position d'équilibre pour entrer dans un mouvement de précession autour de B_0 , à la fréquence de Larmor telle que $f_0 = \frac{1}{2\pi} \gamma B_0$ (Figure 25A). A la fin de l'impulsion radio fréquence, le retour de l'aimantation à sa position d'équilibre, appelé relaxation, se fait selon deux temps caractéristiques $T1$ (relaxation longitudinale) et $T2$ (relaxation transversale) (Figure 25B).

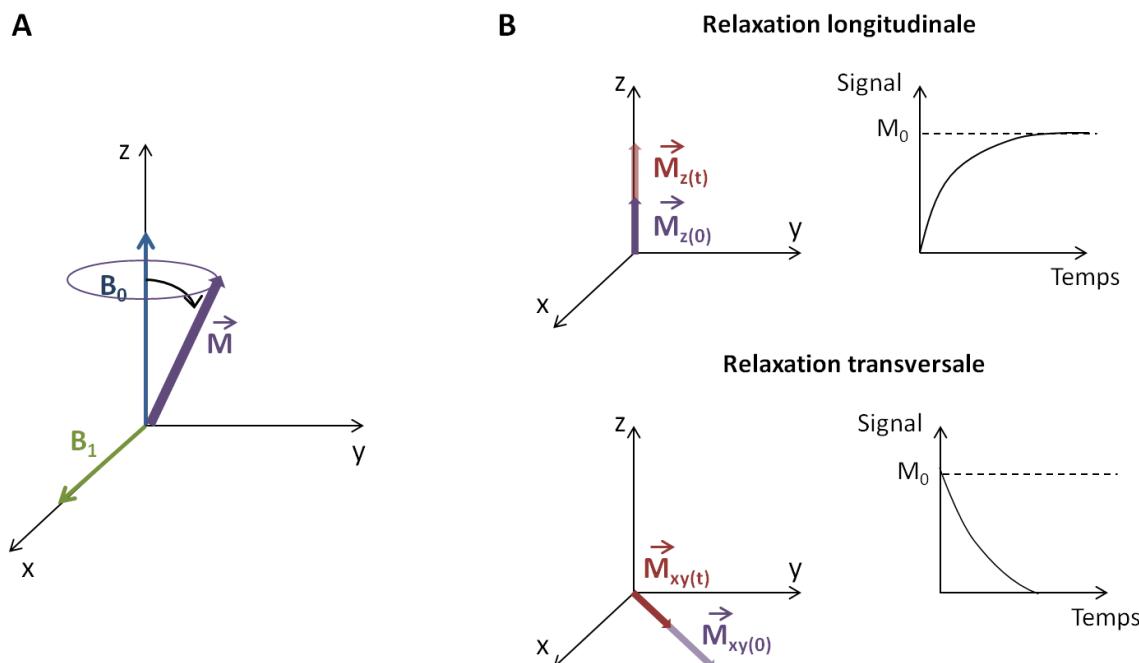


Figure 25 : A) Bascule de l'aimantation après application d'un champ magnétique B_1 . B) relaxation de l'aimantation selon z : longitudinale et dans le plan xy : transversale.

Les temps de relaxation varient en fonction des interactions entre le proton et l'extérieur (distance avec les autres atomes, impuretés, température...) et donc nous renseigne sur l'environnement de ces noyaux (changements de concentration, de phase, de structure ou d'organisation du milieu) traduit par différents de niveaux de gris sur les images. En IRM on peut obtenir des images complémentaires pondérées en $T1$ et $T2$. Les agents de contraste paramagnétiques à base de gadolinium ou de manganèse vont avoir pour effet de diminuer le $T1$, ce qui se traduit sur l'image, par une augmentation de l'intensité du signal (zones blanches). Les agents de contraste

superparamagnétiques comme les SPIO, sont responsables d'une diminution du T2, ce qui se traduit par une diminution de l'intensité des zones adjacentes (assombrissement). En clinique, l'IRM du proton est utilisée principalement pour la détection des cancers du cerveau (métastases du sein), des os et de la moelle épinière (Figure 26, (Aime *et al.* 2005)).

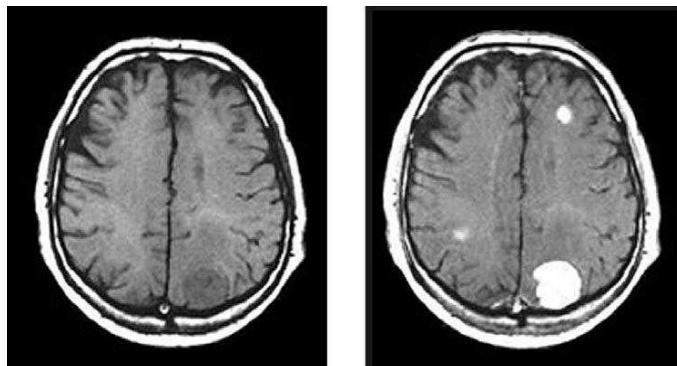


Figure 26 : Détection de métastases cérébrales, en contraste positif par IRM du proton avant et après injection intraveineuse d'un complexe de gadolinium.

Seulement quatre ans après l'acquisition de la première image en IRM du ^{1}H , en 1977, l'image *in vitro* d'un tube de fluorure de sodium est obtenue en IRM du Fluor par Holland *et al.* (Holland *et al.* 1977). Le Fluor est présent à l'état de trace au sein des organismes vivants. Sa concentration totale au sein du corps humain est inférieure à 10^{-6} mol/L (dents, os, ligaments) alors qu'elle atteint 88 mol/L pour le proton. Ainsi la détection d'un agent de contraste fluoré se fera sans bruit de fond et sa concentration sera directement proportionnelle à l'intensité totale du signal, avantage considérable par rapport à l'IRM du proton. La méthode est très sensible (seuil de 1 mM). Toutefois l'accumulation de l'agent de contraste fluoré dans les tissus d'intérêt est souvent faible, la méthode requiert une résolution basse et des temps d'acquisition longs. De plus, la construction d'antennes, accordées sur la fréquence de Larmor du Fluor, doit être adaptée et facilement intégrée aux IRM cliniques. L'IRM du ^{19}F reste encore une modalité marginale mais offre des opportunités intéressantes en termes d'imagerie moléculaire et quantitative.

2.2. Pour imager et traiter : l'essor des systèmes nanothéranostiques

Depuis quelques années, des systèmes qui encapsulent à la fois un agent de contraste, pour l'imagerie, et une molécule bioactive, pour la thérapie, du cancer ont été conçus. L'article de revue dont le titre est : "Targeted nanotheranostics for personalized cancer therapy" décrit des systèmes nanothéranostiques, qui ont été développés spécialement pour l'IRM et/ou l'échographie, en insistant sur leurs forces et leurs faiblesses. L'article permet aussi de comprendre les exigences propres à l'administration intraveineuse et les solutions aux nombreuses limitations qui y sont liées.

Targeted nanotheranostics for personalized cancer therapy

Odile Diou^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}, Elias Fattal^{1,2}

Expert Opinion on Drug Delivery

¹ Univ Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

Abstract

Introduction: The development of nanomedicine, during the last 10 years have given rise to novel delivery systems among which multifunctional platforms called nanotheranostics that are designed to simultaneously diagnose and cure cancer. These systems can be built using the large panel of biocompatible and biodegradable materials. The recent advances of imaging modalities even enable targeted nanotheranostics to probe molecular structures on specific cells opening the doors to personalized cancer therapy.

Areas covered: This review presents the different requirements nanotheranostics should fulfill to achieve an optimized anticancer therapy. It focuses on two imaging modalities: MRI and ultrasonography used to visualize drug delivery, release and efficacy. The advantages and limitations of these two methods are considered. The review will enable the readers to virtually tune a nanotheranostic system according to the nature of the targeting tissue and the availability of imaging modality.

Expert opinion: Despite great perspectives, described for nanotheranostic systems in personalized cancer therapy, the imaging techniques still face technological issues, such as high sensibility and good spatial and temporal resolutions. Active targeting should consider better specificity and low immunogenicity of the ligand selected, to be more efficient.

Keywords: nanotheranostics, ¹H MRI, ¹⁹F MRI, ultrasonography, chemotherapy, stimuli-sensitive release, drug efficacy monitoring, personalized medicine

Introduction

Cancer results from uncontrolled growth of mutated cells in the body. The disease is characterized by 1) a rapid proliferation of genetically altered cells, which access to immortality, 2) the invasion of adjacent tissues by creating a network of anarchical blood vessels (angiogenesis) and in some cases 3) the spreading of malignancy in other parts of the body (metastasis). According to the most recent numbers, provided by the GLOBOCAN project, 7.6 million people have died from cancer (13% of all death) in 2008. Pessimistic predictions, from the International Agency for Research on Cancer; raise the number of cancer incidence from 12.7, in 2008, to 21.3 million in 2030. By now, the methods, used for detection and treatment, lack effectiveness and specificity and most of the anticancer drugs induce side effects. Furthermore, when the treatment fails, the absence of satisfying modality for treatment monitoring and feedback slows down the decision making to change the strategy.

Nanotheranostic systems were recently developed to overcome these problems. The word theranostic was first mentioned in the literature in 2002 and has been the topic of around 270 papers during this last decade. Nanotheranostic platforms are designed to image nanocarriers biodistribution, to survey and map the extent of disease, to deliver the treatment and to monitor in real time the mechanism of action and the efficacy of treatment (Ponce *et al.* 2007; de Smet *et al.* 2011). In brief, treatment will be tailored to « Administer the right drug to the right patient at the right moment » (Bates 2010).

Nanotheranostic systems typically consist of a carrier, an imaging label and a bioactive molecule, such as a target-specific entity or chemotherapeutic drug (Figure R1). The carrier at best should be made of biodegradable and biocompatible materials, because the mechanisms of degradation and elimination are more predictable and toxicity is better controlled. This is the case of liposomes and the majority of polymeric nanoparticles whereas other types of materials, with unknown biological issues, have been used to design dendrimers, carbon nanotubes or Metal Organic Frameworks. The carrier also provides an optimal biodistribution, and delivers two payloads: the imaging probe (metallic nanoparticles, quantum dots, fluorophores...) and the bioactive molecule (peptides, proteins, nucleic acids or chemotherapeutic drugs). Many reviews already referenced the numerous possible combinations of these three elements, their synthesis and features (Bae *et al.* 2011; Barreto *et al.* 2011; Kateb *et al.* 2011).

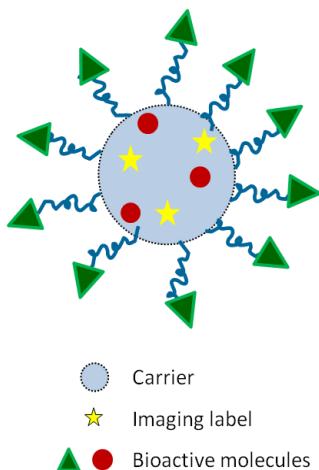


Figure R1: The three components of a typical nanotheranostic system: the carrier, the imaging label and the bioactive molecule.

This review will focus on nanotheranostics in combination with two complementary and non invasive imaging modalities: Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging (MRI). Ultrasonography is cost-effective, portable and provides real-time anatomical information. Magnetic Resonance Imaging imparts deep penetration into soft tissues with high contrast and better sensitivity. Both of these techniques have been used to directly treat, activate or monitor the therapy. A special attention will be given here to ^{19}F MRI, which is a recently developed but very promising technique. It offers excellent signal to noise ratio and eases the quantification of contrast agent or therapeutic molecules (Keupp *et al.* 2011). ^{19}F MRI is not commonly used in clinics because radiofrequency coils, tuned for Fluorine are not commercialized yet, their construction building process is still at the academic stage (Hu *et al.* 2011). ^{19}F MRI can be combined with ^1H MRI to obtain anatomical information (Neubauer *et al.* 2008).

We will first present the physiological barriers, encountered by the nanotheranostics after systemic administration and how they can be overcome. We will then discuss the different strategies, which are currently developed for tumor targeting and show how nanotheranostics can report the tumor condition. Finally, we will provide an overview of the therapeutic approaches to treat malignant tissues. In brief, the different abilities of nanotheranostic systems will be described at each step, from injection to evaluation of treatment efficacy.

1. Nanotheranostics overcome the physiological barriers

After intravenous injection, nanotheranostic systems are subjected to several physiological processes and mass transfers within the body. They may be removed or destroyed before reaching the targeted disease site. It is therefore very important to understand the role of physiological barriers in order to predict the fate of exogenous nanotheranostics and their biodistribution.

Nanotheranostics are usually prepared as suspension in water or buffer solution. *In vitro* stability measurements, assessed in different media, allow predicting stability issues that could arise after administration (Fang *et al.* 2009). Aggregation, hydrolysis or cleavage of the nanotheranostic may indeed occur in the vascular compartment in the presence of salts, proteins and enzymes. Micelle-based carriers may also collapse upon dilution in the blood stream (Bhadra *et al.* 2005). Nanotheranostics below 10 nm are filtered out from the blood stream by rapid clearance through the glomerular capillaries of kidneys. Up to 500nm and depending on the surface properties of the nanotheranostic system (charges, hydrophilicity, shape) opsonization may occur, followed by macrophage uptake and segregation in organs such as liver, spleen and bone marrow. Different strategies were used to reduce the opsonization process including surface modification with polymers either natural, as polysaccharides (dextran, heparin, chitosan) (Alhareth *et al.* 2012; Amoozgar *et al.* 2012) or synthetic, as polyethylene glycol (PEG) (Jokerst *et al.* 2011). Extending the plasmatic half life increases the probability for nanotheranostic systems to accumulate passively in the tumor by the Enhanced Permeation and Retention (EPR) Effect, which consists in the escape through leaky vasculature and the maximal retention due to defective lymphatic drainage. An interesting study about PEGylated liposomes (90 nm) labeled with gadolinium (Gd) chelates (¹H MRI probe) and loaded with siRNA demonstrated that the nanotheranostic accumulation in the tumor was sufficient after 24 hours to reduce the growth of malignant cells (Kenny *et al.* 2011). Nanotheranostic systems consisting in hyperbranched-star amphiphilic fluoropolymers micelles were designed for ¹⁹F MRI and doxorubicin (Dox) delivery (Du *et al.* 2008; Du *et al.* 2008). Because of their smaller size, these micelles may extravasate more efficiently through fenestrated neovessels than larger particles. As shown by authors, they presented high loading capacities of Dox and good Signal to Noise Ratios (SNR) in MRI (Du *et al.* 2008; Du *et al.* 2008). Unfortunately, the imaging acquisition was time consuming, due to the limited ¹⁹F concentration in the tumor and not transposable to clinics (several hours). The same strategy was further developed using PEG grafted Poly(acrylic acid)-*b*-Poly(styrene)-co-Poly(2,3,4,5,6-pentafluorostyrene) (PAA-*b*-(PS-co-PPFS)), to increase the Fluorine content on the polymer backbone, thus facilitate the imaging and to enhance the stealthiness of the

micelle. However this strategy revealed to be deceitful again, in terms of signal intensity with MRI (Nystrom *et al.* 2009).

Passive targeting encounters some limitations. In most cases, the proportion of nanotheranostics, which effectively reaches the tumor site, is rather low compared to the injected dose (Diou *et al.* 2012). Moreover, hydrophilic PEGylated surfaces certainly protect the nanotheranostics from plasma proteins adsorption but also hamper internalization. Finally the degree of tumor vascularization and porosity of vessels depend on the tumor type and the stage of development (Bae *et al.* 2011). All the strategies to concentrate nanotheranostic systems in tumors cannot rely only on the EPR effect (Figure R2). Other strategies are needed to increase nanoparticle distribution within the tumor.

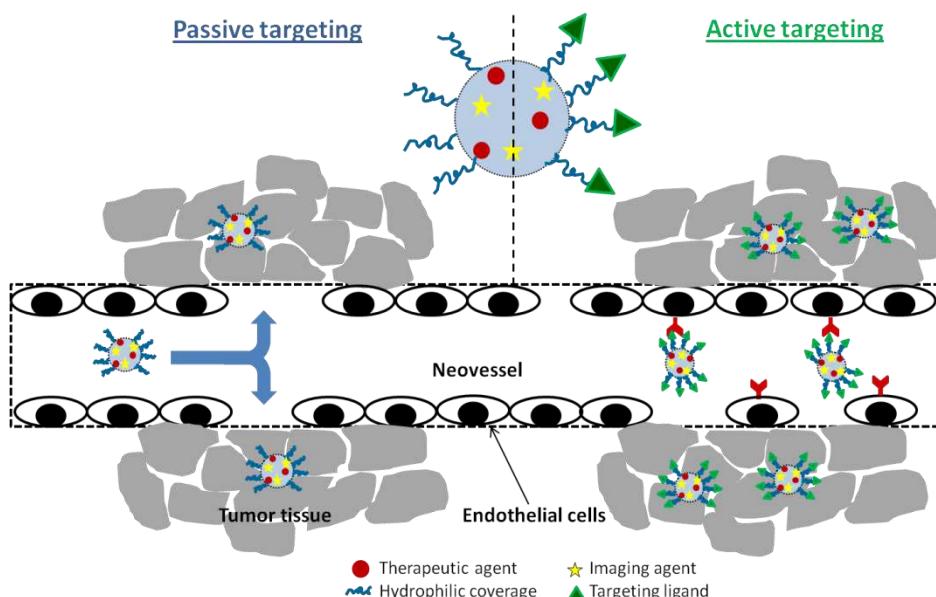


Figure R2: Passive and active targeting strategies for nanotheranostics to reach the tumor.

2. Nanotheranostics targeting the malignant cells

Active targeting overcomes the limitations above mentioned, by specifically attracting and/or binding nanotheranostics to malignant tissues hence increasing their local concentration. Different physical, chemical or biological approaches can be considered to, respectively, attract nanotheranostics by applying an external driving force (magnet); attach targeting ligands to the surface or to benefit of cells recruitment in the inflammatory tumor site.

The possibility to target a solid tumor with liposomes loaded with Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) nanoparticles by using an external gradient magnetic field was reported by several authors (Kuznetsov *et al.* 2001; Fortin-Ripoche *et al.* 2006). The magnet is typically positioned over the subcutaneously implanted tumor, leading to an accumulation of the nanotheranostics. In one

case, particles' concentration was increased by 2.9 times (Kuznetsov *et al.* 2001). In another case, the enhancement of the negative contrast was observed. The signal intensity decreased by $57 \pm 12\%$ instead of only $20 \pm 5\%$ without magnetic guidance (Gultepe *et al.* 2010). This physical approach, added to the EPR effect, enhances nanotheranostic accumulation in the tumor. Nevertheless, this type of targeting is difficult to translate into clinics in situations where the magnet needs to be implanted because of the depth of the tumor site. This is the reason why the main approach consisting in targeting malignant tissue at the molecular scale, without the need of physical means, was importantly considered.

The most commonly developed chemical approach of active targeting is based on the ligand-receptor recognition that allows molecular imaging (Figure R2). The type of ligand used in nanotheranostic systems includes peptides (Medarova *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2010), proteins (Bartlett *et al.* 2007), aptamers (Wang *et al.* 2008) or small molecules such as folic acid (Yang *et al.* 2010). Advantages of active targeting are numerous. Non specific binding is avoided or at least minored compared to ligand-receptor interactions. An interesting ^{19}F MRI nanoprobe was developed by Takaoka *et al.* in which a head-ligand, such as biotin, coupled with CF_3 tail groups formed controlled aggregates in water. When specific recognition of the protein occurred, the aggregate disassembled, the CF_3 groups recovered mobility hence the ^{19}F MRI probe was turned on (Takaoka *et al.* 2011). Another advantage resides in the possibility to distinguish bound from unbound nanosystem by properly setting the imaging parameters. The ^{19}F signal of vitronectin modified Perfluoro Crown Ether (PFCE) emulsion circulating in the bloodstream was suppressed by a well-chosen diffusion weighted MRI sequence, underlying the selective targeting of integrins $\alpha_v\beta_3$ *in vivo* (Waters *et al.* 2008). The number of targeting ligands on one nanosystem can be optimized to benefit from cooperative effect as noticed by Anderson *et al.* with a highly echogenic decafluorobutane bubbles covalently coupled to a cRGD (cyclic Arg-Gly-Asp) peptide. They numbered $\approx 8.2 \times 10^6$ molecules of cRGD/bubble, which exhibited a fivefold higher adhesion to immobilized integrins, relative to non-targeted bubble or aspecific-targeted bubble (Anderson *et al.* 2011). Marsh *et al.* characterized *in vitro* and *ex vivo*, the interaction between biotinylated Perfluorooctyl bromide (PFOB) nanoemulsion and avidin surfaces. They showed that multivalency increased the density of bound nanotheranostics to a surface, thus creating an extra reflective layer, which enhanced the imaging capabilities of the contrast agent for ultrasonography (Marsh *et al.* 2007). Finally, active targeting increases cellular uptake of nanotheranostics because it favors receptor-mediated endocytosis, as noticed by Kok *et al.* with a cRGD-nanoemulsion of PFCE. These authors studied the intracellular trafficking of their system by ^1H and ^{19}F MR imaging and spectroscopy. The targeted emulsion was internalized into vesicles in the perinuclear region whereas non targeted emulsions

were more evenly distributed within the cytoplasm (Kok *et al.* 2011). The only downside aspect of active targeting is that it is often based on a probabilistic hypothesis. Biomarkers such as RGD peptides or folic acid are overexpressed by endothelial cells on neovessels or epithelial cells. Jokerst *et al.* considered that the differential of expression, between targeted and non-targeted tissues, of 2 to 10 was sufficient to ensure active targeting (Jokerst *et al.* 2011). Nevertheless, healthy tissues may be affected. The expression level of the biomarkers also highly depends on the genetic pool of the patient and the disease development. Instead of overexpressed receptors, one should prefer, when it is possible, exclusive receptors for malignant cells, such as glypican (GPC), which is absent on normal adult tissue but highly expressed (80%) on hepatocellular carcinoma. Park *et al.* chose this strategy and evidenced the specific uptake by Hep G2 cancer cells using PEGylated SPIO nanoparticles coated with anti-GPC3 antibody (Park *et al.* 2011).

Cell therapy was recently considered as a new approach to achieve active targeting. The first strategy exploits the tumor homing properties of mesenchymal stem cells. As a wounded site, the tumor microenvironment consists of many signaling factors characteristic of an inflammatory site, such as vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, interleukin-6, cyclophilin-B (El-Haibi *et al.* 2010). Stem cells are then recruited to contribute to the healing process and promote tumorigenesis. They can be employed as nanoparticle carriers to actively deliver the therapeutic payload and the imaging agent to the tumor site. Indeed, stem cells were expanded and incubated *in vitro* with SPIO nanoparticles. These ¹H MRI contrast agents were internalized by endocytosis, entailing the cells themselves to serve as imaging agents. The labeling was almost 100% effective and had no effect on cell viability and proliferation (Chen *et al.* 2011). Stem cells were also loaded either with PFCE or PFOB nanoemulsions. Once injected together, it was possible to differentiate and accurately quantify the two types of stem cells *in vivo*, because of the unequivocal and unique spectral signature of PFCE and PFOB via ¹⁹F MR spectroscopy (Partlow *et al.* 2007; Ruiz-Cabello *et al.* 2008) (Figure R3).

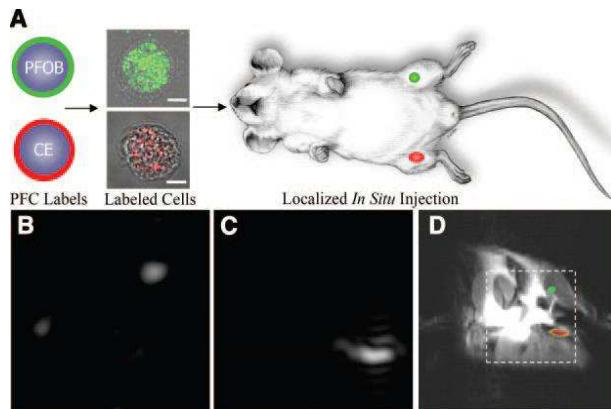


Figure R3: A) Stem cells were loaded either with PFOB or PFCE emulsions and injected into mouse thigh skeletal right or left muscle. B-C) ^{19}F MR imaging at 11.7 T (4 min scan time) by selecting the appropriate RF excitation frequencies for PFOB (B) and for PFCE (C). D) Overlay of B and C images onto a conventional ^1H anatomical image reveals PFOB and PFCE labelled cells localized to the left and right leg, respectively (Partlow *et al.* 2007).

Dendritic cells (DCs) are mainly used for cancer immunotherapy which can be loaded with relevant antigens as well as nanoparticles. After injection into patients, the DCs migrate to lymph nodes and stimulate T cells to activate an immune response. The functionality of DC strongly depends on their migratory ability. During one first clinical trial, the DCs were loaded with SPIO and administered to patients with melanoma. In spite of a very elegant protocol, the quantification of cells was hardly possible with MRI alone, thus requiring the additional use of scintigraphy (de Vries *et al.* 2005). ^{19}F MRI, which allows absolute quantification, was suggested to avoid the use of invasive imaging method. In this attempt, a commercially available Perfluorocarbon (PFC) emulsion (CS 1000 Celsense, USA) was taken up by DCs, without cell toxicity and without the need of electroporation or transfer agents. The authors demonstrated the advantage of fluorinated contrast agent over typical ^1H MRI contrast agents, such as iron oxide or gadolinium, to suppress the background signal and improve the detection sensitivity of cells (Bonetto *et al.* 2011). Macrophages or monocytes were also used for cell trafficking after *in vivo* injection. They were loaded with PFCE emulsion and shown to detect and monitor by ^{19}F MRI, graft rejection after solid organ transplantation (Hitchens *et al.* 2011) and with Perfluorohexane (PFH) emulsion to image the cell capture by atherosclerotic plaque using ultrasonography (Kornmann *et al.* 2008).

3. Nanotheranostics for tumor reporting

Nanotheranostic systems targeted to neovessels should characterize the extent of angiogenesis and the delineation of the solid tumor (Kircher *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2011). Moreover, they should provide clear information about the specific tumor microenvironment (hypoxia, pH, enzymatic functions and hypercalcaemia). Indeed, poorly organized tumor vasculature

and high oxygen demand of proliferative tumor cells are responsible for the common hypoxia of solid tumors. Hypoxic tumor cells are more resistant to radiotherapy and chemotherapy than their well-oxygenated counterparts (Davda *et al.* 2006). Thus, mapping and understanding the degree of oxygenation in the targeted area is critical before considering the therapeutic aspects. As a matter of fact, PFCs combined with ¹⁹F MRI were widely used for this purpose because of their high ability to dissolve oxygen. As oxygen possesses a paramagnetic effect (Parhami *et al.* 1983), the partial pressure of dissolved O₂ (p_{O₂}) in PFCs is linearly correlated with the ¹⁹F longitudinal relaxivity (r₁) of PFCs at a given temperature. Oxymetry studies were developed with hexafluorobenzene (Diepart *et al.* 2011; Liu *et al.* 2011) directly injected into the tumor or with PFOB or perfluorodecalin encapsulated within nanoemulsions injected intravenously (Mason *et al.* 1994; Giraudeau *et al.* 2012). Thanks to the good spatial resolution of ¹⁹F MRI, Diepart *et al.* evidenced heterogeneities in terms of oxygen consumption within the tumor and claimed they were able to anticipate the resistance to treatment of the poorly oxygen-supplied regions (Diepart *et al.* 2011).

Other features of the tumor are its stimulated enzymatic activity (Aguilera *et al.* 2009) and acidic microenvironment. Indeed, protons are highly produced due to the intense metabolic activity of the tumor (glycolysis, glutaminolysis, ATP hydrolysis). Moreover, they are retained at high level, because of the poor lymphatic drainage, thus decreasing the local pH (Vaupel *et al.* 1989). Numerous nano-¹⁹F MRI probes were designed to respond accordingly to this pH variation. Oishi *et al.* developed a pH-sensitive PEGylated nanoparticle, containing a fluorinated gel core. At neutral pH, the probe was turned off because of the packed structure of the core, which hinders the motion of ¹⁹F. At acidic pH, the fluorinated core recovered flexibility and the probe was turned on (Oishi *et al.* 2007). Mizukami *et al.* benefited of the strong metabolic activity of the tumor. They engineered ¹⁹F MRI probe composed of a Fluorine containing group and a Gd-chelate, separated by a hydrolase cleavable linker, which was demonstrated to be sensitive to protease, caspase-3 and β-galactosidase. The interaction of the paramagnetic gadolinium with the ¹⁹F moiety causes a shortening of the T₂ by paramagnetic relaxation enhancement and, as a consequence the ¹⁹F MR signal is attenuated. After hydrolysis by enzymes and subsequent release of Fluorine group, the ¹⁹F signal increased (Mizukami *et al.* 2008). Finally, Calcium plays a significant role as a secondary messenger in cellular signaling pathways. Cell transition from normal to malignant state is a multi stage process characterized by a major reorganization of active and passive Ca²⁺ cellular transport through pumps, exchangers and canals (Berridge *et al.* 2003). Atanasijevic *et al.* developed a calcium-sensitive ¹H MRI contrast agent: nanoparticles loaded with calmodulin (calcium binding protein) and SPIO. In the presence of calcium ions, nanoparticles aggregated and created transverse relaxivity changes (r₂) on MR imaging (Atanasijevic *et al.* 2006).

4. Nanotheranostics for cancer therapy

Once targeted, imaged and mapped, tumors should be treated and malignant cells eliminated. To achieve this goal, three different strategies may be considered: i) mechanical ablation (by surgery or physical external input), ii) chemotherapy or iii) biological disruption using gene therapy for instance.

As for surgery, nanotheranostic systems, containing an imaging probe, diagnose the tumor type, location and margins. As a matter of fact, the use of imaging methods can be considered as a stage of treatment, when it monitors and guides the tumor resection. Intraoperative imaging during surgery is particularly interesting because it assesses the extent of the tumor in real-time, improves the completeness of tumor removal and reduces injury to the surrounding healthy tissues (Kircher *et al.* 2003). Unfortunately, some patients are unable to undergo surgical resection because of their poor physical condition or in case the tumor is not accessible. Thermal ablation might be an alternative solution to treat them. This method consists in applying a focused beam of thermal energy on tumor tissues, implying protein denaturation and coagulation necrosis. High Intensity Focused Ultrasounds (HIFU) can generate this energy. The technology has been used on thousands of patients for the treatment of uterine fibroids, liver, breast, pancreatic and other cancers (Orsi *et al.* 2010). It was moreover shown that the administration of US contrast microbubbles (Optison®) considerably lowered the energy threshold, by a factor of 12, for tissue damage with HIFU. Without contrast agents, an increase of 11.4°C was necessary to induce necrotic lesions, with 50% chance, whereas only a 5.9°C heating was required with Optison®. US contrast microbubbles enhanced the local energy absorption involving other mechanical mechanisms, like cavitation (McDannold *et al.* 2006). Furthermore to accurately estimate the ablation margins by ultrasonography, during the ablation procedure, heat-sensitive decafluoropentane bubbles which become hyperechogenic above 55°C, were engineered (Huang *et al.* 2010). The thermal energy can also be produced by an alternative high-frequency magnetic field mediated by exothermic injected magnetic particles, so called Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH). Well-targeted to the tumor, the magnetic nanoparticles should precisely direct and control the heating at the cellular scale (Lartigue *et al.* 2011). Several studies evidenced a significant reduction in tumor growth in mice (Hilger *et al.* 2002; Rachakatla *et al.* 2010). MFH-based clinical trial was successfully conducted by Jordan *et al.* with patients affected by prostate carcinoma. After injection of SPIO nanoparticles, the radio-frequency treatment was monitored by ¹H MRI and Computed Tomography (Gneveckow *et al.* 2004).

Traditionally, nanotheranostics are designed to carry chemotherapeutics such as doxorubicin, paclitaxel and so forth. Drugs are incorporated by physical entrapment, in the aqueous or hydrophobic compartment of the carrier, or by chemical conjugation. These formulations led to a

considerably increased local concentration of drug in the tumor, compared to free drug injections (Blanco *et al.* 2011; Waite *et al.* 2012). Well-targeted, the nanotheranostic can release its payload in the tumor, by passive diffusion or self-degradation (*e.g.* hydrolysis for PLGA nanoparticles). Several nanotheranostic systems already proved their efficacy *in vivo*, in terms of tumor growth reduction. Among them, the SPIO platforms are highly represented (Yang *et al.* 2007; Yu *et al.* 2011). Yu *et al.* designed crosslinked SPIO nanoparticles functionalized with aptamers and loaded with doxorubicin. They evidenced a 53 % relative signal enhancement in the tumor 2 hours after injection, persisting even 48 hours later, and a reduction of the tumor growth by a factor two (Figure R4). Rapoport *et al.* used PFCE nanoemulsions loaded with paclitaxel to image, by ^{19}F MRI, and to treat orthotopically inoculated pancreatic tumor. They underlined their difficulties to attribute the ^{19}F MR signal to the tumor, liver tissues or liver metastases. A better specific targeting approach would solve this problem. Nevertheless they demonstrated the high therapeutic potential of their system by a substantial tumor regression and metastases suppression using ultrasound mediated chemotherapy (Figure R5) (Rapoport *et al.* 2011). Instead of the usual drugs, Soman *et al.* reported the delivery of a cytolytic peptide: melittin, by a PFOB lipid nanoparticle, imaged by ^{19}F MR molecular imaging (Soman *et al.* 2008). Moreover, the system allowed accumulation of melittin in murine tumors *in vivo* and a dramatic reduction in tumor growth without any apparent signs of toxicity (Soman *et al.* 2009). Imaging the drug release is of utmost importance to achieve effective treatment. This is easily done *in vitro* or *ex vivo* (Kamm *et al.* 1996; Eisenbrey *et al.* 2009; Gautier *et al.* 2012) but the examples are scarcer *in vivo*. Onuky *et al.* visualized by ^1H MRI in xenograft mice, the release of 5-Fluorouracil from PLGA nanoparticles, carrying additional two imaging probes: Gd-DTPA and SPIO (Onuki *et al.* 2010). Viglianti *et al.* performed a particularly relevant and meticulous analysis of the release of doxorubicin from liposomes, co-encapsulated with manganese as the MRI contrast agent. They linearly correlated the increase of longitudinal relaxivity (r_1) by MR spectroscopy to the doxorubicin local concentrations in the tumor, by confronting the HPLC and histological measurements (Figure R6). This method is a promising approach for imaging drug efficacy and real-time evaluation of chemotherapeutic protocols (Viglianti *et al.* 2006).

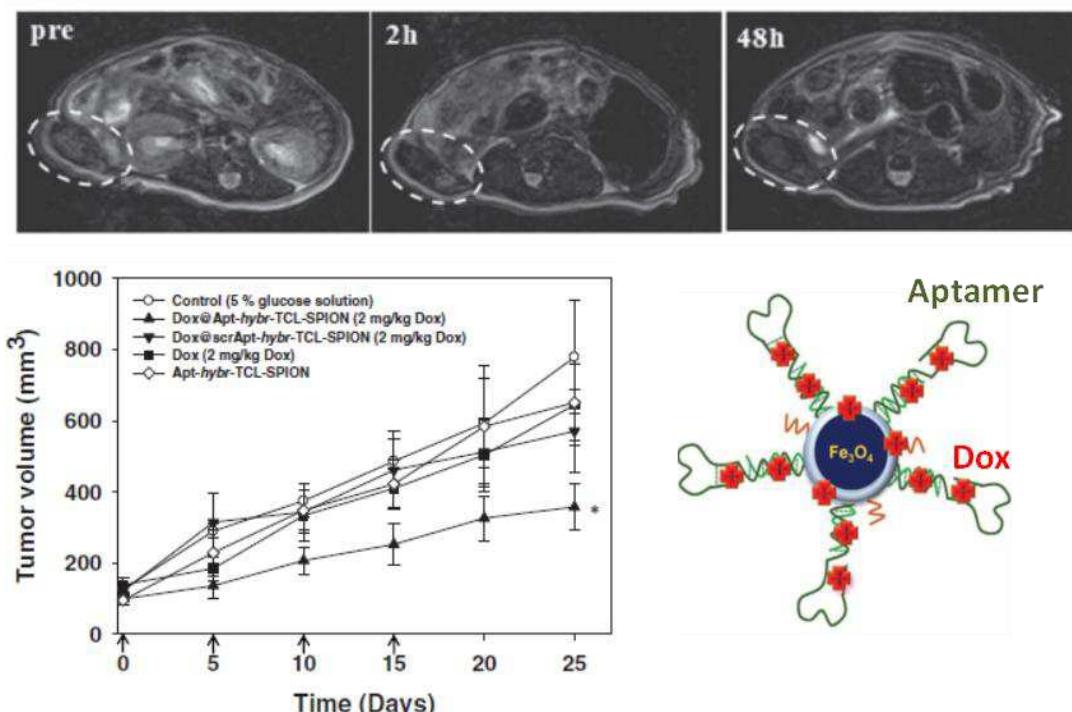


Figure R4: Top) T₂-weighted fast-spin echo images in the tumor (dashed circle) before injection and 2 and 48 hours later. Bottom) Tumor growth for 25 days proving the antitumor activity of aptamer conjugated nanoparticles loaded with doxorubicin, which is represented on the right side (Yu *et al.* 2011).

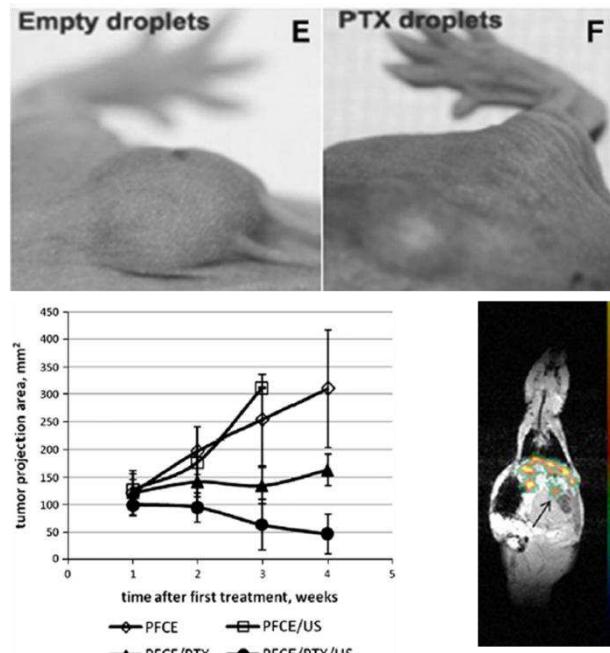


Figure R5: Top) Photographs of the subcutaneous tumor twelve days after treatment, which consisted in systemic administration of empty or paclitaxel loaded droplets followed by focused ultrasound application. Bottom) Evolution of the tumor size for pancreatic cancer bearing mice treated with either empty (open symbols) or PTX-loaded PFCE nanodroplets (closed symbols). ¹⁸F MR image superimposed with anatomical ¹H MR image of a coronal slice of the mouse after 4 systemical injections (every 2 hours) of PFCE nanodroplets (Rapoport *et al.* 2011).

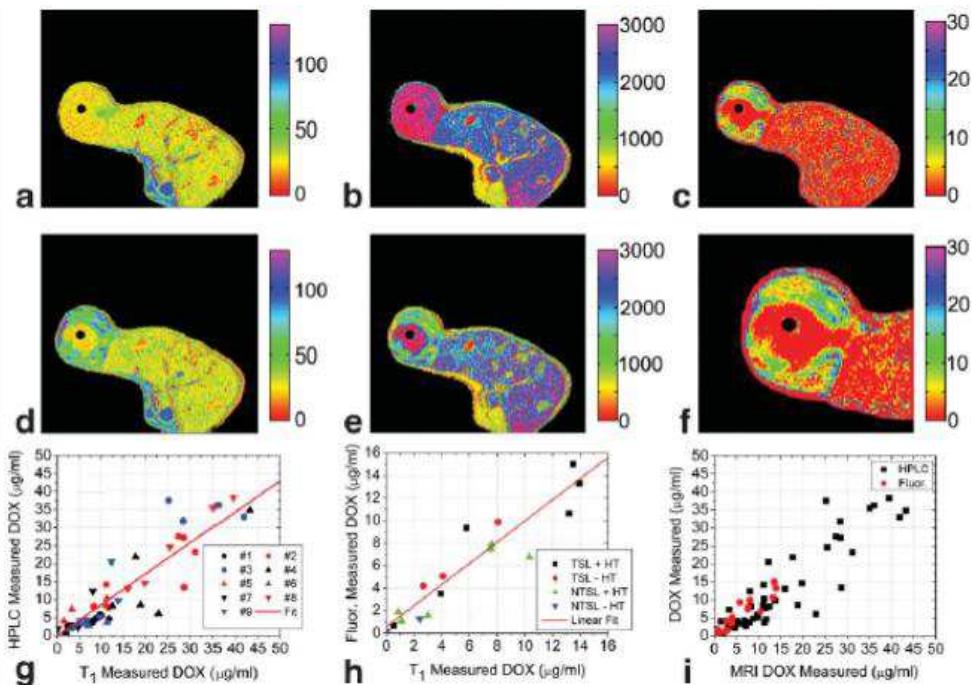


Figure R6: a),d)Raw signal intensity maps show axial views of the rat bearing tumor with a central heating catheter at t=0min (a) and t=45min (d) after dox loaded liposomes injection. b) and e) T1 converted maps from a) and d) respectively. c) Calculated Dox concentration from images b and e. f) Enlarged image of c) showing the heterogeneity in drug delivery within the tumor. g), h)Linear correlation between HPLC and histological respectively with relaxivity measurements validated [Dox] measurements. i) Overlay of g and h showing the precision and accuracy of MRI for measuring Dox at low concentrations (Viglianti *et al.* 2006).

Beside passive approaches, active control of release is possible through several means. It is possible at first to exploit the high enzymatic activity and acidic conditions of the tumor microenvironment. This effect was exploited by Castelletto *et al.* by covalently binding a drug to a micellar carrier. The drug was released by hydrolytic cleavage due to chymotrypsin (Castelletto *et al.* 2010). pH-sensitive nanoparticles of fluorinated dendrimers, imaged by ¹⁹F MRI, were disassembled at pH 6, enabling controlled release of physically entrapped payload (Criscione *et al.* 2009). Acidic pH can affect the drug molecule itself. For example, protonation of doxorubicin (Dox) increased its water solubility, thus weakened interactions with hydrophobic targeted SPIO nanoparticle and speeded up the release (Zou *et al.* 2010).

Some authors also demonstrated the huge benefit of ultrasounds on the release of Dox from polymeric nanobubbles of Perfluoropentane (PFP), hence increasing tumor inhibition *in vivo* (Du *et al.* 2011). Several other groups used ultrasounds as an external force to actively trigger drug release (Chappell *et al.* 2008; Anderson *et al.* 2011). Two different effects should be considered apart: the assimilated sonoporation and the direct cavitation. In the first case, the drug was loaded within a liquid/solid nanoparticle. The application of oscillating Low Frequencies US, created air bubbles nuclei within the particle (in membrane or aqueous core of liposome for example). These small air

bubbles cavitated, thus opening transient pores through the drug carrier, allowing small therapeutic molecules to diffuse in more efficiently (Schroeder *et al.* 2009; Klibanov *et al.* 2010). In the second case, the drug was initially encapsulated in a nanoparticle containing a gaseous core. The nanotheranostic system underwent oscillations followed by a cavitation process, exploded, and released its therapeutic payload (Eisenbrey *et al.* 2009).

Finally, the external input of energy may induce a phase transition in the nanotheranostic. Many PFC liquid core nanoparticles were designed to become gaseous when insonified, because of the combined effects of local increased acoustic pressure and temperature. This phenomenon is called the Acoustic Droplet Vaporization (ADV). Several groups evidenced the droplet to bubble conversion, followed by cavitation, inducing the release of camptothecin or thrombin for example (Fang *et al.* 2009; Fabiilli *et al.* 2010). Usually PFP or PFH are used for ADV because of their low boiling points: T=29°C and T=59°C respectively. Nevertheless, Rapoport and Mohan reported ADV with their PFCE-core nanoparticles, while the boiling point of PFCE is 146°C. In another way, phase transition can concern the carrier instead of the imaging agent. This concept was applied to liposomes, which undergo a gel-to-liquid phase transition at a critical temperature. Above this temperature, the mobility of lipids is increased within the membrane and small molecules can diffuse throughout. The heating stimulus can be provided either by pulsed-HIFU (Dromi *et al.* 2007; Negussie *et al.* 2011) or by hyperthermia with an oscillating magnetic field (Babincova *et al.* 2002). Langereis and Grüll monitored, by MR-HIFU, the controlled release of drug from a temperature-sensitive liposome with commutative imaging capabilities. Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) signal is replaced by ¹⁹F MRI signal upon reaching the melting temperature of the lipid membrane, after sonication (Langereis *et al.* 2009; Grull *et al.* 2012).

Gene delivery is seriously considered for cancer therapy because more than just regulating its propagation, it tackles the disease from the causes and origins. DNA delivery, mediated by a plasmid, aims to replace a damaged gene with a functional counterpart, to restore normal cell function or to induce a new function. On the contrary, SiRNA delivery aims to knockdown the expression of proteins such as oncogenes. Many nanotheranostics were designed to deliver plasmid DNA or siRNA (Liu *et al.* 2010; Veiseh *et al.* 2010; Kievit *et al.* 2011). Magnetic nanoparticles targeted to breast adenocarcinomas using the EPPT (Glu-Pro-Pro-Ther) peptide, were loaded with siRNA to induce apoptosis of malignant cells, and thus reduced significantly the tumor growth (Kumar *et al.* 2010). 3D cultured breast cancer cells, which well-mimic the *in vivo* conditions and provide reproducible and controlled experimental conditions were imaged by ¹⁹F MRI. This study allowed Bartusik *et al.* to distinguish the more efficient therapeutic formulation of Herceptin-targeted emulsions containing a core of PFC and lipoplex, complexing the plasmid (Bartusik *et al.* 2010; Bartusik *et al.* 2010). Lee *et al.*

used manganese doped iron oxide nanoparticles for SiRNA delivery. They underlined the problem to monitor the intracellular transfection by ^1H MRI. This requires indeed probing the deep inside of the cell structure and MRI spatial resolution is not low enough: innate limit is 100 μm . Fluorescent imaging was needed for subcellular trafficking (Lee *et al.* 2009).

Conclusion

Nanotheranostic systems provide a unique opportunity to hinder devastating effects of cancer, which affects millions of people yearly. They can be designed to specifically interact with malignant cells, image them, trigger a therapeutic response and monitor it in real-time. The treatment protocol (dosing, type and time) can be adjusted based on tumor and off-target tissue accumulation. The nanotheranostics will be upgraded from preclinical research to clinical application if the toxicity issues are better predicted and the scale-up and engineering of these complex structures are profitable. Microfluidic platforms were already mentioned to synthesize, in reproducible manner, a substantial batch of nanoparticles and screen their biophysicochemical features (Valencia *et al.* 2010).

Expert Opinion

In the last 20 years, progress in formulation science and physico-chemistry has allowed the controlled and reproducible production of nanoparticles. Additional knowledge in organic and biomolecular chemistry has rendered possible surface modification (*i.e.* decoration) of nanoparticles, reducing their clearance by the immune system and making them more compatible with *in vivo* uses. By this multidisciplinary approach, multifunctional nanocarriers were designed and imaging probes, as well as therapeutic agents were custom-built incorporated. Cancer is a worldwide public health concern and significant health care resources are spent on diagnosis. Sooner the detection of the tumor better is the chance of remission without relapse. In this context, nanotheranostics offer a panel of solutions for the development of personalized cancer therapy. MRI and ultrasonography are used to detect a broad range of cancers (breast, colon, brain...). Nevertheless the use of these techniques in combination with nanotheranostics agents is challenging, mostly because the local concentration reached in the tumor is often below the sensibility detection range. Indeed, echogenicity suffer from the downscaling to nanometer range of contrast agents. That is the reason why commercialized ultrasound contrast agents still consist in microbubbles. Concerning MRI, an interesting move was made toward the Fluorine imaging. In this case, there is no endogeneous background signal and the signature of exogeneous fluorinated contrast agent is unique and specific, lowering the detection sensibility to 1mM. But MRI still lack of spatial resolution. Computed

Travaux antérieurs

tomography based Fluorine may be a solution but many researchers prefer to focus on fluorescence imaging. The therapeutic efficacy of nanotheranostics was successfully demonstrated, mostly in an indirect way, considering for instance the tumor regression. Nevertheless, direct imaging of drug release at the targeted site still remains difficult. The choice of the targeted strategy should be seriously considered. However, to achieve this goal, the specificity of biomarkers should be improved and ligands that do not induce immunogenic response should be designed. Finally, to provide personalized medicine, the patient condition should be considered. The intravenous administration requires hospitalization, which generates important costs and is less flexible than ambulatory care. Thus it would be interesting to develop needless approaches of nanotheranostic administration. The pulmonary route is attractive because it is non invasive and allow both local treatment for lung cancer and systemic drug absorption via lung capillaries. Additional to personalized medicine, ensuring convenience and improving the quality of life would be optimistic promises to numerous patients.

Conscients de l'étendue des possibilités offertes mais aussi des contraintes liées à la conception d'un outil nanothéranostique, une méthodologie a été construite, afin de choisir judicieusement les différentes composantes du système. Cette méthodologie est développée dans la partie suivante.

3. L'élaboration d'un système nanothéranostique innovant pour l'échographie et l'IRM du Fluor

L'objectif de ce travail est de proposer une formulation de capsules nanométriques, administrées par voie intraveineuse, pour permettre la détection de tumeurs solides par IRM du ^{19}F et échographie ainsi que la vectorisation d'un agent anticancéreux. Pour ce faire, le nanosystème théranostique doit répondre à un certain nombre d'exigences liées à sa faisabilité *in vivo* (voie d'administration, considérations pathologiques, toxicité) et à ses performances en termes d'imagerie et de thérapie. Dans cette partie, nous développerons la méthodologie adoptée en détaillant le choix des matériaux utilisés pour chaque composante du système, ainsi que le modèle biologique.

3.1. L'agent de contraste

Evoqués au cours de l'état de l'art concernant les systèmes nanothéranostiques (partie 2.2), les perfluorocarbures (PFC) ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs depuis la fin des années 1960. En 1966, Clark et Gollan démontrent qu'une souris peut vivre plusieurs heures immergée dans un bain de PFC saturé en oxygène et imaginent ainsi le concept de respiration liquidienne (Clark *et al.* 1966). Le champ d'application des PFC s'est ensuite élargi aux techniques d'imagerie : tomodensitométrie, radiographie, échographie et à l'oxymétrie. Les perfluorocarbures sont des molécules synthétiques, chaînes carbonées insaturées, linéaires ou cycliques, comportant de nombreux atomes de Fluor, validant leur utilisation en IRM du ^{19}F . En ce qui concerne leurs propriétés physiques, les PFC sont caractérisés par une faible tension de surface, une densité élevée, une bonne mouillabilité des surfaces et une faible solubilité dans l'eau et les liquides physiologiques (Diaz-Lopez *et al.* 2010). Ils peuvent être liquides ou gazeux à température ambiante. Les PFC sont inertes chimiquement et biologiquement : ils ne sont pas métabolisés et souvent directement excrétés par les poumons. Enfin, leur capacité de solubilisation des gaz tels que l'oxygène ou le dioxyde de carbone est très élevée, jusqu'au 2/3 de leur volume (c'est-à-dire trois fois celle du sang).

Le Perfluoroctyl bromure, noté PFOB, est un PFC de choix car il est biocompatible et autorisé par la Food and Drug Administration (NDA# 020091, août 1993). Son élimination est lente du fait de sa rétention accrue au niveau du foie et de la rate, sa demi-vie y est de 5 jours (Mattrey *et al.* 1982). L'utilisation du PFOB est illustrée dans près de 140 articles scientifiques et par plusieurs développements à l'échelle industrielle. Oxygent[®], par exemple, est une formulation de PFOB pouvant être utilisée en tant que liquide de remplacement sanguin : alternative plus flexible (stabilité sur 2 ans à température ambiante), universelle et impliquant moins de risques de contamination que les transfusions classiques (Spahn *et al.* 1999). La formulation a passé avec succès les études

Travaux antérieurs

cliniques de phase II et III, néanmoins sa commercialisation a brutalement été suspendue en 2010 par la faillite d'Alliance Pharmaceutical. Du point de vue de l'imagerie, le spectre de résonnance du PFOB ($C_8F_{17}Br$) est complexe puisque les noyaux fluorés ne sont pas chimiquement équivalents (Figure 27). Des artefacts de déplacements chimiques (images répliquées non superposées) ainsi que des pertes de signal, provoquées par les couplages entre les groupes CF_3 et CF_2 (en position d) altèrent la qualité de l'image obtenue en IRM du ^{19}F (Sotak *et al.* 1993).

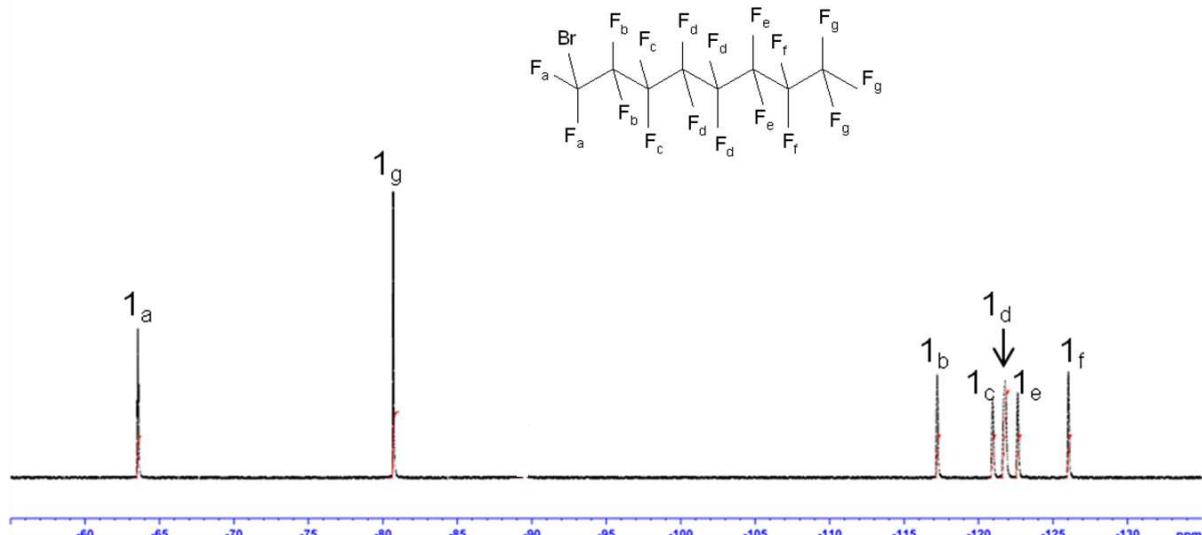


Figure 27 : Spectre en spectroscopie ^{19}F par résonnance magnétique du PFOB.

Néanmoins une séquence multi écho de spin (MSE) spécifique du PFOB a été mise au point lors de la thèse de Céline Giraudeau et permet de s'affranchir de ces problèmes écartant donc toute entrave à l'utilisation du PFOB en IRM du ^{19}F (Giraudeau 2012).

En ce qui concerne l'échographie, le PFOB est caractérisé par une densité élevée ($d=1.93 \text{ g/cm}^3$) et une faible vitesse acoustique ($v=597 \text{ m/s à } 37^\circ\text{C}$) (Marsh *et al.* 2002). La différence d'impédance acoustique entre le PFOB ($Z=1.15 \times 10^6 \text{ kg.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) et les tissus mous, tels qu'une tumeur, ($Z=1.66 \times 10^6 \text{ kg.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) est significativement élevée (de l'ordre de 30 %), créant ainsi une interface rétrodiffusante. Les gouttes de PFOB peuvent donc être considérées comme des diffuseurs passifs. De plus, le caractère liquide du PFOB, confère aux agents de contraste le contenant, une certaine stabilité *in vivo* par rapport aux systèmes gazeux. Le PFOB étant très peu soluble dans le sang, son encapsulation est indispensable pour assurer sa vectorisation vers la cible biologique, ici la tumeur, après son injection par voie intraveineuse.

3.2. Le système vecteur

Plusieurs systèmes vecteurs du PFOB existent dans la littérature. Ils peuvent être classés en deux groupes : les émulsions, lipidiques (Marsh *et al.* 2007; Soman *et al.* 2008) ou stabilisées par un tensioactif fluoré (Bertilla *et al.* 2004; Chadel 2011), et les capsules à coque polymère. Cette dernière approche reste peu étudiée alors qu'elle possède des avantages certains en termes de stabilité dans les milieux biologiques, de rémanence dans la circulation sanguine (Rapoport *et al.* 2011) et de versatilité chimique de la surface. En échographie, l'encapsulation permet d'enrichir la réponse acoustique car elle fait intervenir une interface supplémentaire ayant des propriétés mécaniques aisément modulables. En ce qui concerne l'imagerie du Fluor, il a été montré que la signature spectrale et les temps de relaxation du PFOB sont très peu modifiés après encapsulation (Pisani *et al.* 2008; Giraudeau 2012). La séquence MSE spécifique ainsi qu'une antenne adaptée, disponibles à Neurospin sur un aimant de 4,7 T permettront donc d'imager les capsules. Le choix du polymère s'est ensuite porté sur le PLGA-*b*-PEG et le PLA-*b*-PEG, qui sont biocompatibles, biodégradables, largement commercialisés ou aisément synthétisables (Nijenhuis *et al.* 1992). De plus la faisabilité de la formation de nanocapsules de PLGA/PFOB par un procédé d'émulsion-évaporation a été évaluée précédemment et considéré comme rapide et reproductible (Pisani *et al.* 2006).

Les capsules devant être vectorisées et accumulées dans les tissus tumoraux, deux stratégies de ciblages ont été envisagées, tirant profit des caractéristiques spécifiques des tissus malins. Le mécanisme du développement tumoral a été étudié pour plusieurs types cellulaires. Il peut être simplifié et résumé comme suit. Tout d'abord, les cellules natives sont en forte croissance puisqu'elles ont un potentiel de réplication infini et ne connaissent pas l'apoptose. Ayant atteint une taille de l'ordre de 150 mm³, la tumeur a appauvri son environnement proche et doit développer son propre réseau vasculaire pour subvenir à ses besoins en nutriments et oxygène : c'est l'angiogénèse. Les néovaisseaux se développent de façon anarchique et défective. L'endothélium est fenestré. Si les capsules de PFOB sont furtives et circulent suffisamment longtemps dans le sang, elles pourront passer à travers les pores de l'endothélium et s'accumuler dans les tissus tumoraux. Il s'agit de l'effet EPR, décrit plus précisément dans la partie 2.2 de ce chapitre et sur lequel se basent les stratégies de ciblage passif. De plus l'endothélium tumoral surexprime certains marqueurs biologiques, tels que les intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui sont des protéines d'adhésion. De nombreux groupes ont choisi le peptide RGD (Arg-Gly-Asp), ligand spécifique d' $\alpha_v\beta_3$, pour développer une stratégie efficace de ciblage actif des tissus tumoraux (Hsu *et al.* 2006; Schnell *et al.* 2009). En décorant la capsule polymère de peptides RGD, on pourra favoriser son interaction avec les néovaisseaux et délimiter les contours de la tumeur ou décrire sa perfusion (Winter *et al.* 2008). La concentration locale en agents de contraste devrait être accrue, ce qui permettrait d'augmenter le rapport signal/bruit en imagerie par IRM et

échographie. De plus, l'immobilisation des nanocapsules sur une surface a un intérêt certain en échographie puisqu'elle permet de créer une surface réfléchissante (Marsh *et al.* 2007). En IRM du ¹⁹F, on pourra éventuellement discriminer les nanocapsules circulantes des nanocapsules fixées grâce à une séquence de spectroscopie pondérée en diffusion, comme celle développée par Waters *et al.* pour imager une tumeur de l'oreille chez la souris avec des particules fonctionnalisées d'éther de perfluorocouronne (PFCE) (Waters *et al.* 2008).

3.3. Comment intégrer la thérapie au système

De nombreux systèmes vecteurs basés sur la technologie des nanoparticules de PLA, PLGA et de leurs copolymères PEGylés associés, ont montré leur efficacité en termes de rendement d'encapsulation de principes actifs. Les molécules chimiothérapeutiques telles que le paclitaxel ou la camptothécine sont privilégiées car elles seront aisément encapsulées au sein de la matrice de polymère par interactions hydrophobes (McCarron *et al.* 2008; Danhier *et al.* 2009). En revanche l'encapsulation de molécules hydrophiles reste majoritairement réservée au cœur aqueux des liposomes ou polymersomes. Plusieurs groupes ont néanmoins élaboré des stratégies pour augmenter le taux d'incorporation de molécules hydrophiles au sein de membranes polymères. Il s'agit de modifier le coefficient de partage eau/huile du principe actif, en favorisant l'espèce moléculaire du couple acide-base, pour la doxorubicine par exemple (Sanson *et al.* 2010). On peut aussi le co-encapsuler avec un principe actif hydrophobe (Gupte *et al.* 2004), ou former des paires d'ions (Dalwadi *et al.* 2009). Dans l'étude présentée ici, nous allons vérifier qu'il est possible d'encapsuler une molécule hydrophobe modèle : le paclitaxel. Puis nous avons décidé de relever le défi de l'encapsulation d'une molécule hydrophile, le 5-Fluorouracil (5-FU), préconisée dans le traitement du cancer colorectal, auquel nous allons nous intéresser plus particulièrement dans la partie suivante.

3.4. Le modèle biologique

Le cancer colorectal se situe au troisième rang mondial en termes d'incidence (après le sein et la prostate). En Europe il touche 250 000 personnes chaque année, ce qui représente 9 % du nombre total de cancers détectés. Il est aussi l'un des plus meurtriers puisque la survie à un an de 72 %, chute à 54 % à 5 ans. Les facteurs promoteurs avérés sont : la sédentarité, une alimentation trop riche (en sucre, graisses animales, fer), la consommation excessive d'alcool et le tabagisme. Le type de traitement dépend du stade de progression de la maladie. La chirurgie est préconisée dans la plupart des cas, suivie ou non d'une chimiothérapie, systématique à partir du stade 3 de développement. Cette dernière consiste en l'administration, par perfusion, d'une dose de 300 à 600

Travaux antérieurs

mg/m²/jour (posologie classique) de 5-Fluorouracil (ou analogues) qui peut être accompagnée dans certains cas d'oxaliplatine (Labianca *et al.* 2010). Lorsque le principe actif est administré libre, la faible valeur d'IC₅₀ (7,5 µM à 6 h) est responsable d'une toxicité élevée envers les tissus malades mais aussi sains. Garg *et al.* ont montré l'intérêt d'encapsuler le 5-FU dans des liposomes ciblés sans diminuer l'efficacité de la molécule (IC₅₀=7,31 µM à 6 h) mais en l'orientant exclusivement vers la tumeur, ce qui pourrait réduire les effets secondaires (Garg *et al.* 2009).

Les cellules CT26 sont des cellules immortalisées murines du cancer du colon. Dans l'étude qui va suivre nous avons donc choisi un modèle d'étude du cancer colorectal en inoculant les cellules CT26 par voie sous cutanée chez la souris nude. La croissance tumorale peut être ainsi facilement suivie par des mesures au pied à coulisse. L'administration des nanocapsules théranostiques pourra ensuite être réalisée dans la veine caudale. Les cellules CT26 ont l'avantage d'exprimer les intégrines α_vβ₃ rendant possible l'imagerie et la thérapie ciblées (Seguin *et al.* 2012). De plus on profite du caractère hypoéchogène des tumeurs en ultrasonographie. Enfin, ces tumeurs sont bien vascularisées comme le démontrent des études d'immunomarquage avec l'anticorps CD31 (Seguin *et al.* 2012) ainsi que des observations par échographie après injection de microbulles Sonovue®.

Le procédé d'émulsion évaporation est simple, rapide et reproductible. Dans le passé, la technique a déjà été utilisée pour former des nanocapsules polymère de PFOB. Les phénomènes physico-chimiques mis en jeu sont complexes mais aussi très bien décrits dans la littérature, support utile pour une meilleure compréhension de notre système en particulier : nanocapsules de polyester renfermant un cœur de PFOB. Depuis leur apparition il y a quelques années, les outils nanothéranostiques pour le traitement personnalisé du cancer sont aujourd'hui nombreux. Néanmoins, aucun système ne combine à la fois thérapie et imagerie ciblées des tumeurs par échographie et IRM du ¹⁹F. Un défi de taille était donc toujours à relever.

Bibliographie

- Aguilera, T. A., Olson, E. S., Timmers, M. M., Jiang, T. and Tsien, R. Y. "Systemic in vivo distribution of activatable cell penetrating peptides is superior to that of cell penetrating peptides." *Integr Biol (Camb)* 1(5-6): 371-381 (2009)
- Ahmed, F., Pakunlu, R. I., Brannan, A., Bates, F., Minko, T. and Discher, D. E. "Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug." *Journal of Controlled Release* 116(2): 150-158 (2006)
- Aime, S., Botta, M. and Terreno, E. "Gd(III)-based contrast agents for MRI." *Advances in Inorganic Chemistry - Including Bioinorganic Studies, Vol 57* 57: 173-237 (2005)
- al Khouri, N., Fessi, H., Roblot-Treupel, L., Devissaguet, J. P. and Puisieux, F. "[An original procedure for preparing nanocapsules of polyalkylcyanoacrylates for interfacial polymerization]." *Pharm Acta Helv* 61(10-11): 274-281 (1986)
- Alhareth, K., Vauthier, C., Bourasset, F., Gueutin, C., Ponchel, G. and Moussa, F. "Conformation of surface-decorating dextran chains affects the pharmacokinetics and biodistribution of doxorubicin-loaded nanoparticles." *Eur J Pharm Biopharm* 81(2): 453-457 (2012)
- Amoozgar, Z., Park, J., Lin, Q. and Yeo, Y. "Low molecular-weight chitosan as a pH-sensitive stealth coating for tumor-specific drug delivery." *Mol Pharm* 9(5): 1262-1270 (2012)
- Anderson, C. R., Hu, X., Zhang, H., Tlaxca, J., Declerques, A. E., Houghtaling, R., Sharma, K., Lawrence, M., Ferrara, K. W. and Rychak, J. J. "Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent." *Invest Radiol* 46(4): 215-224 (2011)
- Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P. and Jasenoff, A. "Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14707-14712 (2006)
- Atkin, R., Davies, P., Hardy, J. and Vincent, B. "Preparation of aqueous core/polymer shell microcapsules by internal phase separation." *Macromolecules* 37(21): 7979-7985 (2004)
- Babincova, M., Cicmanec, P., Altanerova, V., Altaner, C. and Babinec, P. "AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy." *Bioelectrochemistry* 55(1-2): 17-19 (2002)
- Bae, K. H., Chung, H. J. and Park, T. G. "Nanomaterials for cancer therapy and imaging." *Mol Cells* 31(4): 295-302 (2011)
- Bae, K. H., Lee, Y. and Park, T. G. "Oil-encapsulating PEO-PPO-PEO/PEG shell cross-linked nanocapsules for target-specific delivery of paclitaxel." *Biomacromolecules* 8(2): 650-656 (2007)
- Barreto, J. A., O'Malley, W., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H. and Spiccia, L. "Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy." *Adv Mater* 23(12): H18-40 (2011)
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A. and Davis, M. E. "Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15549-15554 (2007)
- Bartusik, D. and Tomanek, B. "Application of ¹⁹F magnetic resonance to study the efficacy of fluorine labeled drugs in the three-dimensional cultured breast cancer cells." *Arch Biochem Biophys* 493(2): 234-241 (2010)
- Bartusik, D. and Tomanek, B. "Detection of fluorine labeled herceptin using cellular (¹⁹F) MRI ex vivo." *J Pharm Biomed Anal* 51(4): 894-900 (2010)
- Bates, S. "Progress towards personalized medicine." *Drug Discov Today* 15(3-4): 115-120 (2010)
- Beaman, R. G., Morgan, P. W., Koller, C. R., Wittbecker, L. and Magat, E. E. "Interfacial polycondensation, III Polyamides." *Journal of Polymer Science* 40(137): 329-336 (1959)
- Benita, S. "Microencapsulation Methods and industrial applications". New York, *Taylor and Francis Group* (2006)
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529 (2003)

Travaux antérieurs

- Bertilla, S. M., Thomas, J. L., Marie, P. and Krafft, M. P. "Cosurfactant effect of a semifluorinated alkane at a fluorocarbon/water interface: impact on the stabilization of fluorocarbon-in-water emulsions." *Langmuir* 20(10): 3920-3924 (2004)
- Bhadra, D., Bhadra, S. and Jain, N. K. "Pegylated lysine based copolymeric dendritic micelles for solubilization and delivery of artemether." *J Pharm Pharm Sci* 8(3): 467-482 (2005)
- Blanco, E., Hsiao, A., Ruiz-Esparza, G. U., Landry, M. G., Meric-Bernstam, F. and Ferrari, M. "Molecular-targeted nanotherapies in cancer: enabling treatment specificity." *Mol Oncol* 5(6): 492-503 (2011)
- Boh, B., Sumiga, B. "Microencapsulation technology and its applications in building construction materials." *Materials and Geoenvironment* 55(3): 329 (2008)
- Bonetto, F., Srinivas, M., Heerschap, A., Mailliard, R., Ahrens, E. T., Fidgor, C. G. and de Vries, I. J. "A novel (19)F agent for detection and quantification of human dendritic cells using magnetic resonance imaging." *Int J Cancer* 129(2): 365-373 (2011)
- Bungenberg de Jong, H. G. "Colloid Science II". New-York, Elsevier (1949)
- Castelletto, V., Kendrick, J. E., Hamley, I. W., Olsson, U. and Cenker, C. "PEGylated amyloid peptide nanocontainer delivery and release system." *Langmuir* 26(14): 11624-11627 (2010)
- Chadel, S. "Formulation et caractérisation d'émulsions fluorées pour le diagnostic médical." *Ecole doctorale des sciences chimiques* (2011)
- Chang, T. M. and Prakash, S. "Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms." *Mol Biotechnol* 17(3): 249-260 (2001)
- Chappell, J. C., Song, J., Burke, C. W., Klibanov, A. L. and Price, R. J. "Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis." *Small* 4(10): 1769-1777 (2008)
- Chen, R., Yu, H., Jia, Z. Y., Yao, Q. L. and Teng, G. J. "Efficient nano iron particle-labeling and noninvasive MR imaging of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *Int J Nanomedicine* 6: 511-519 (2011)
- Choi, S. H. and Park, T. G. "Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers." *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 13(10): 1163-1173 (2002)
- Christian, D. A., Cai, S., Bowen, D. M., Kim, Y., Pajerowski, J. D. and Discher, D. E. "Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(3): 463-474 (2009)
- Chung, T. W., Huang, Y. Y. and Liu, Y. Z. "Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres." *International Journal of Pharmaceutics* 212(2): 161-169 (2001)
- Clark, L. C., Jr. and Gollan, F. "Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure." *Science* 152(3730): 1755-1756 (1966)
- Cohen, G. and Dubois, J.-L. "Nouvelles microsphères injectables biodégradables procédé de préparation et suspensions injectables les renfermant." 2654337 (1989)
- Criscone, J. M., Le, B. L., Stern, E., Brennan, M., Rahner, C., Papademetris, X. and Fahmy, T. M. "Self-assembly of pH-responsive fluorinated dendrimer-based particulates for drug delivery and noninvasive imaging." *Biomaterials* 30(23-24): 3946-3955 (2009)
- Dalwadi, G. and Sunderland, B. "An ion pairing approach to increase the loading of hydrophilic and lipophilic drugs into PEGylated PLGA nanoparticles." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(2): 231-242 (2009)
- Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N., Crokart, N., Pourcelle, V., Freichels, H., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. and Preat, V. "Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel." *Journal of Controlled Release* 140(2): 166-173 (2009)
- Davda, S. and Bezabeh, T. "Advances in methods for assessing tumor hypoxia in vivo: implications for treatment planning." *Cancer Metastasis Rev* 25(3): 469-480 (2006)

Travaux antérieurs

- de Smet, M., Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M. and Grull, H. "Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: an in vivo proof-of-concept study." *J Control Release* 150(1): 102-110 (2011)
- de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., Barentsz, J. O., Verdijk, P., van Krieken, J. H., Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Bonenkamp, J. J., Boezeman, J. B., Adema, G. J., Bulte, J. W. M., Scheenen, T. W. J., Punt, C. J. A., Heerschap, A. and Fidgor, C. G. "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy." *Nature Biotechnology* 23(11): 1407-1413 (2005)
- Deasy, P. B. "Microencapsulation and related drug processes". New York, *Mercel Dekker* (1984)
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N. and Fattal, E. "Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI." *Pharm Res* 27(1): 1-16 (2010)
- Diepart, C., Magat, J., Jordan, B. F. and Gallez, B. "In vivo mapping of tumor oxygen consumption using (19)F MRI relaxometry." *NMR Biomed* 24(5): 458-463 (2011)
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C. and Fattal, E. "Long-circulating perfluoroctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI." *Biomaterials* 33(22): 5593-5602 (2012)
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C. and Fattal, E. "Long-circulating perfluoroctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by (FMRI)-F-19." *Biomaterials* 33(22): 5593-5602 (2012)
- Dowding, P. J., Atkin, R., Vincent, B. and Bouillot, P. "Oil core-polymer shell microcapsules prepared by internal phase separation from emulsion droplets. I. Characterization and release rates for microcapsules with polystyrene shells." *Langmuir* 20(26): 11374-11379 (2004)
- Dromi, S., Frenkel, V., Luk, A., Traughber, B., Angstadt, M., Bur, M., Poff, J., Xie, J., Libutti, S. K., Li, K. C. and Wood, B. J. "Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect." *Clin Cancer Res* 13(9): 2722-2727 (2007)
- Du, L., Jin, Y., Zhou, W. and Zhao, J. "Ultrasound-triggered drug release and enhanced anticancer effect of doxorubicin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide)-methoxy-poly(ethylene glycol) nanodroplets." *Ultrasound Med Biol* 37(8): 1252-1258 (2011)
- Du, W., Nystrom, A. M., Zhang, L., Powell, K. T., Li, Y., Cheng, C., Wickline, S. A. and Wooley, K. L. "Amphiphilic hyperbranched fluoropolymers as nanoscopic 19F magnetic resonance imaging agent assemblies." *Biomacromolecules* 9(10): 2826-2833 (2008)
- Du, W., Xu, Z., Nystrom, A. M., Zhang, K., Leonard, J. R. and Wooley, K. L. "19F- and fluorescently labeled micelles as nanoscopic assemblies for therapeutic delivery." *Bioconjug Chem* 19(12): 2492-2498 (2008)
- Eisenbrey, J. R., Huang, P., Hsu, J. and Wheatley, M. A. "Ultrasound triggered cell death in vitro with doxorubicin loaded poly lactic-acid contrast agents." *Ultrasonics* 49(8): 628-633 (2009)
- El-Haibi, C. P. and Karnoub, A. E. "Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(4): 399-409 (2010)
- Fabiilli, M. L., Lee, J. A., Kripfgans, O. D., Carson, P. L. and Fowlkes, J. B. "Delivery of water-soluble drugs using acoustically triggered perfluorocarbon double emulsions." *Pharm Res* 27(12): 2753-2765 (2010)
- Fang, C., Bhattacharai, N., Sun, C. and Zhang, M. "Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media." *Small* 5(14): 1637-1641 (2009)
- Fang, J. Y., Hung, C. F., Hua, S. C. and Hwang, T. L. "Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells." *Ultrasonics* 49(1): 39-46 (2009)
- Fattal, E., Hillaireau, H., Mura, S., Nicolas, J. and Tsapis, N. "Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery", *Springer* (2012)
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. and Benita, S. "Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement." *International Journal of Pharmaceutics* 55(1): R1-R4 (1989)

Travaux antérieurs

- Fong, J. W. "Processus for preparation of microspheres." 4166800 (1979)
- Fortin-Ripoche, J. P., Martina, M. S., Gazeau, F., Menager, C., Wilhelm, C., Bacri, J. C., Lesieur, S. and Clement, O. "Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: Feasibility." *Radiology* 239(2): 415-424 (2006)
- Foster, T., Dorfman, K. D. and Davis, H. T. "Giant biocompatible and biodegradable PEG-PMCL vesicles and microcapsules by solvent evaporation from double emulsion droplets." *J Colloid Interface Sci* 351(1): 140-150 (2010)
- Freitas, S., Merkle, H. P. and Gander, B. "Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology." *Journal of Controlled Release* 102(2): 313-332 (2005)
- Garg, A., Tisdale, A. W., Haidari, E. and Kokkoli, E. "Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide." *International Journal of Pharmaceutics* 366(1-2): 201-210 (2009)
- Gautier, J., Munnier, E., Paillard, A., Herve, K., Douziech-Eyrolles, L., Souce, M., Dubois, P. and Chourpa, I. "A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting." *Int J Pharm* 423(1): 16-25 (2012)
- Ghoroghchian, P. P., Lin, J. J., Brannan, A. K., Frail, P. R., Bates, F. S., Therien, M. J. and Hammer, D. A. "Quantitative membrane loading of polymer vesicles." *Soft Matter* 2(11): 973-980 (2006)
- Gianola, D., Pedroncelli, A., Montini, M., Tengattini, F., Pagani, M. D., Cortesi, L., Cappi, M. P., Gherardi, F., Lancranjan, I. and Pagani, G. "A new oral slow release form of bromocriptine, Parlodel SRO, in the chronic treatment of 26 hyperprolactinemic patients." *Gynecol Endocrinol* 5(3): 213-216 (1991)
- Giraudeau, C. "RMN d'émulsions fluorées : développements méthodologiques et application à l'évaluation de l'oxymétrie et de la biodistribution dans le foie et la rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale dans le cerveau du rongeur." *Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes* (2012)
- Giraudeau, C., Djemai, B., Ghaly, M. A., Boumezbeur, F., Meriaux, S., Robert, P., Port, M., Robic, C., Le Bihan, D., Lethimonnier, F. and Valette, J. "High sensitivity 19F MRI of a perfluorooctyl bromide emulsion: application to a dynamic biodistribution study and oxygen tension mapping in the mouse liver and spleen." *Nmr in Biomedicine* 25(4): 654-660 (2012)
- Gneveckow, U., Jordan, A., Scholz, R., Bruss, V., Waldfner, N., Ricke, J., Feussner, A., Hildebrandt, B., Rau, B. and Wust, P. "Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation-system MFH 300F for clinical magnetic fluid hyperthermia." *Med Phys* 31(6): 1444-1451 (2004)
- Green, B. K. "Oil-containing microscopic capsules and method of making them" 2800458 (1957)
- Grull, H. and Langereis, S. "Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound." *J Control Release* 161(2): 317-327 (2012)
- Gultepe, E., Reynoso, F. J., Jhaveri, A., Kulkarni, P., Nagesha, D., Ferris, C., Harisinghani, M., Campbell, R. B. and Sridhar, S. "Monitoring of magnetic targeting to tumor vasculature through MRI and biodistribution." *Nanomedicine (Lond)* 5(8): 1173-1182 (2010)
- Gupte, A. and Ciftci, K. "Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres." *International Journal of Pharmaceutics* 276(1-2): 93-106 (2004)
- Hayward, R. C., Utada, A. S., Dan, N. and Weitz, D. A. "Dewetting instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions." *Langmuir* 22(10): 4457-4461 (2006)
- Herrmann, J. and Bodmeier, R. "Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions." *International Journal of Pharmaceutics* 126(1-2): 129-138 (1995)
- Hilger, I., Hiergeist, R., Hergt, R., Winnefeld, K., Schubert, H. and Kaiser, W. A. "Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study." *Invest Radiol* 37(10): 580-586 (2002)

Travaux antérieurs

- Hitchens, T. K., Ye, Q., Eytan, D. F., Janjic, J. M., Ahrens, E. T. and Ho, C. "19F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells." *Magn Reson Med* 65(4): 1144-1153 (2011)
- Holland, G., Bottomley, P. and Hinshaw, W. "F-19 magnetic resonance imaging." *Journal of Magnetic Resonance* 28(1): 133-136 (1977)
- Hsu, A. R., Hou, L. C., Veeravagu, A., Greve, J. M., Vogel, H., Tse, V. and Chen, X. "In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in an orthotopic glioblastoma model." *Mol Imaging Biol* 8(6): 315-323 (2006)
- Hu, L., Hockett, F. D., Chen, J., Zhang, L., Caruthers, S. D., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "A generalized strategy for designing (19)F/(1)H dual-frequency MRI coil for small animal imaging at 4.7 Tesla." *J Magn Reson Imaging* 34(1): 245-252 (2011)
- Huang, J., Xu, J. S. and Xu, R. X. "Heat-sensitive microbubbles for intraoperative assessment of cancer ablation margins." *Biomaterials* 31(6): 1278-1286 (2010)
- Izumikawa, S., Yoshioka, S., Aso, Y. and Takeda, Y. "Preparation of Poly(L-Lactide) Microspheres of Different Crystalline Morphology and Effect of Crystalline Morphology on Drug Release Rate." *Journal of Controlled Release* 15(2): 133-140 (1991)
- Janssen, L. J. J. M. and Te Nijenhuis, K. "Encapsulation by interfacial polycondensation, I. The capsule production and a model for wall growth." *Journal of membrane science* 65(1-2): 59-68 (1992)
- Janssen, L. J. J. M. and Te Nijenhuis, K. "Encapsulation by interfacial polycondensation, II. The membrane wall structure and the rate of the wall growth." *Journal of membrane science* 65(1-2): 69-75 (1992)
- Jeon, S. J., Yi, G. R. and Yang, S. M. "Cooperative Assembly of Block Copolymers with Deformable Interfaces: Toward Nanostructured Particles." *Advanced Materials* 20(21): 4103-- (2008)
- Jeyanthi, R., Thanoo, B. C., Metha, R. C. and DeLuca, P. P. "Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery." *Journal of Controlled Release* 38(2-3): 235-244 (1996)
- Jokerst, J. V. and Gambhir, S. S. "Molecular imaging with theranostic nanoparticles." *Acc Chem Res* 44(10): 1050-1060 (2011)
- Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. and Gambhir, S. S. "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy." *Nanomedicine (Lond)* 6(4): 715-728 (2011)
- Kamm, Y. J., Heerschap, A., Rosenbusch, G., Rietjens, I. M., Vervoort, J. and Wagener, D. J. "5-Fluorouracil metabolite patterns in viable and necrotic tumor areas of murine colon carcinoma determined by 19F NMR spectroscopy." *Magn Reson Med* 36(3): 445-450 (1996)
- Kateb, B., Chiu, K., Black, K. L., Yamamoto, V., Khalsa, B., Ljubimova, J. Y., Ding, H., Patil, R., Portilla-Arias, J. A., Modo, M., Moore, D. F., Farahani, K., Okun, M. S., Prakash, N., Neman, J., Ahdoot, D., Grundfest, W., Nikzad, S. and Heiss, J. D. "Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy?" *Neuroimage* 54 Suppl 1: S106-124 (2011)
- Kenny, G. D., Kamaly, N., Kalber, T. L., Brody, L. P., Sahuri, M., Shamsaei, E., Miller, A. D. and Bell, J. D. "Novel multifunctional nanoparticle mediates siRNA tumour delivery, visualisation and therapeutic tumour reduction in vivo." *J Control Release* 149(2): 111-116 (2011)
- Keupp, J., Rahmer, J., Grasslin, I., Mazurkewitz, P. C., Schaeffter, T., Lanza, G. M., Wickline, S. A. and Caruthers, S. D. "Simultaneous dual-nuclei imaging for motion corrected detection and quantification of 19F imaging agents." *Magn Reson Med* 66(4): 1116-1122 (2011)
- Khopade, A. J. and Caruso, F. "Stepwise self-assembled poly(amidoamine) dendrimer and poly(styrenesulfonate) microcapsules as sustained delivery vehicles." *Biomacromolecules* 3(6): 1154-1162 (2002)
- Kievit, F. M. and Zhang, M. "Cancer nanotheranostics: improving imaging and therapy by targeted delivery across biological barriers." *Adv Mater* 23(36): H217-247 (2011)
- Kim, Y., Tewari, M., Pajerowski, J. D., Cai, S., Sen, S., Williams, J. H., Sirsi, S. R., Lutz, G. J. and Discher, D. E. "Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides." *Journal of Controlled Release* 134(2): 132-140 (2009)

Travaux antérieurs

- Kircher, M. F., Mahmood, U., King, R. S., Weissleder, R. and Josephson, L. "A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation." *Cancer Res* 63(23): 8122-8125 (2003)
- Klibanov, A. L., Shevchenko, T. I., Raju, B. I., Seip, R. and Chin, C. T. "Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery." *J Control Release* 148(1): 13-17 (2010)
- Kok, M. B., de Vries, A., Abdurrachim, D., Prompers, J. J., Grull, H., Nicolay, K. and Strijkers, G. J. "Quantitative (1)H MRI, (19)F MRI, and (19)F MRS of cell-internalized perfluorocarbon paramagnetic nanoparticles." *Contrast Media Mol Imaging* 6(1): 19-27 (2011)
- Kornmann, L. M., Curfs, D. M., Hermeling, E., van der Made, I., de Winther, M. P., Reneman, R. S., Reesink, K. D. and Hoeks, A. P. "Perfluorohexane-loaded macrophages as a novel ultrasound contrast agent: a feasibility study." *Mol Imaging Biol* 10(5): 264-270 (2008)
- Kuchner, K., Pawliczek, J. B. and Pommer, E.-H. "Fungicide." 4172119 (1979)
- Kukula, H., Schlaad, H., Antonietti, M. and Forster, S. "The formation of polymer vesicles or "peptosomes" by polybutadiene-block-poly(L-glutamate)s in dilute aqueous solution." *Journal of the American Chemical Society* 124(8): 1658-1663 (2002)
- Kumar, M., Yigit, M., Dai, G., Moore, A. and Medarova, Z. "Image-guided breast tumor therapy using a small interfering RNA nanodrug." *Cancer Res* 70(19): 7553-7561 (2010)
- Kuznetsov, A. A., Filippov, V. I., Alyautdin, R. N., Torshina, N. L. and Kuznetsov, O. A. "Application of magnetic liposomes for magnetically guided transport of muscle relaxants and anti-cancer photodynamic drugs." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225(1-2): 95-100 (2001)
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F. and Wils, J. "Colon cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* 74(2): 106-133 (2010)
- Lagarce, F., Renaud, P., Faisant, N., Nicolas, G., Cailleux, A., Richard, J., Menei, P. and Benoit, J. P. "Baclofen-loaded microspheres: preparation and efficacy testing in a new rabbit model." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59(3): 449-459 (2005)
- Lambert, G., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Gulik, A. and Couvreur, P. "Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides." *Pharm Res* 17(6): 707-714 (2000)
- Lamprecht, A., Schafer, U. F. and Lehr, C. "Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49(1): 1-9 (2000)
- Langereis, S., Keupp, J., van Velthoven, J. L., de Roos, I. H., Burdinski, D., Pikkemaat, J. A. and Grull, H. "A temperature-sensitive liposomal 1H CEST and 19F contrast agent for MR image-guided drug delivery." *J Am Chem Soc* 131(4): 1380-1381 (2009)
- Lartigue, L., Innocenti, C., Kalaivani, T., Awwad, A., Sanchez Duque Mdel, M., Guari, Y., Larionova, J., Guerin, C., Montero, J. L., Barragan-Montero, V., Arosio, P., Lascialfari, A., Gatteschi, D. and Sangregorio, C. "Water-dispersible sugar-coated iron oxide nanoparticles. An evaluation of their relaxometric and magnetic hyperthermia properties." *J Am Chem Soc* 133(27): 10459-10472 (2011)
- Lee, J. H., Lee, K., Moon, S. H., Lee, Y., Park, T. G. and Cheon, J. "All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery." *Angew Chem Int Ed Engl* 48(23): 4174-4179 (2009)
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongroonngamsang, N., Rojsitthisak, P. and Nimmannit, U. "Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil." *Carbohydrate Polymers* 74(2): 209-214 (2008)
- Letchford, K. and Burt, H. "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65(3): 259-269 (2007)

Travaux antérieurs

- Lince, F., Marchisio, D. L. and Barresi, A. A. "Strategies to control the particle size distribution of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications." *J Colloid Interface Sci* 322(2): 505-515 (2008)
- Liu, G., Swierczewska, M., Lee, S. and Chen, X. "Functional Nanoparticles for Molecular Imaging Guided Gene Delivery." *Nano Today* 5(6): 524-539 (2010)
- Liu, G. Y., Liu, X. S., Wang, S. S., Chen, C. J. and Ji, J. "Biomimetic Polymersomes as Carriers for Hydrophilic Quantum Dots." *Langmuir* 28(1): 557-562 (2012)
- Liu, S., Shah, S. J., Wilmes, L. J., Feiner, J., Kodibagkar, V. D., Wendland, M. F., Mason, R. P., Hylton, N., Hopf, H. W. and Rollins, M. D. "Quantitative tissue oxygen measurement in multiple organs using ¹⁹F MRI in a rat model." *Magn Reson Med* 66(6): 1722-1730 (2011)
- Liu, W., Wu, W. D., Selomulya, C. and Chen, X. D. "Facile spray-drying assembly of uniform microencapsulates with tunable core-shell structures and controlled release properties." *Langmuir* 27(21): 12910-12915 (2011)
- Lorenceau, E., Utada, A. S., Link, D. R., Cristobal, G., Joanicot, M. and Weitz, D. A. "Generation of polymerosomes from double-emulsions." *Langmuir* 21(20): 9183-9186 (2005)
- Loxley, A. and Vincent, B. "Preparation of Poly(methylmethacrylate) Microcapsules with Liquid Cores." *J Colloid Interface Sci* 208(1): 49-62 (1998)
- Mark, J. E. "Polymer Data Handbook". New York, *Oxford University Press, Inc* (1999)
- Marsh, J. N., Hall, C. S., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. "Temperature dependence of acoustic impedance for specific fluorocarbon liquids." *J Acoust Soc Am* 112(6): 2858-2862 (2002)
- Marsh, J. N., Partlow, K. C., Abendschein, D. R., Scott, M. J., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes." *Ultrasound in Medicine and Biology* 33(6): 950-958 (2007)
- Martinez-Ares, D., Martin-Granizo Barrenechea, I., Souto-Ruzo, J., Yanez Lopez, J., Pallares Peral, A. and Vazquez-Iglesias, J. L. "The value of abdominal ultrasound in the diagnosis of colon cancer." *Rev Esp Enferm Dig* 97(12): 877-886 (2005)
- Mason, R. P. and Antich, P. P. "Tumor oxygen tension: measurement using Oxygent as a ¹⁹F NMR probe at 4.7 T." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22(4): 1361-1367 (1994)
- Mattrey, R. F., Long, D. M., Multer, F., Mitten, R. and Higgins, C. B. "Perfluorooctylbromide: a reticuloendothelial-specific and tumor-imaging agent for computed tomography." *Radiology* 145(3): 755-758 (1982)
- McCarron, P. A., Marouf, W. M., Quinn, D. J., Fay, F., Burden, R. E., Olwill, S. A. and Scott, C. J. "Antibody targeting of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles to tumor cells." *Bioconjug Chem* 19(8): 1561-1569 (2008)
- McDannold, N. J., Vykhodtseva, N. I. and Hynynen, K. "Microbubble contrast agent with focused ultrasound to create brain lesions at low power levels: MR imaging and histologic study in rabbits." *Radiology* 241(1): 95-106 (2006)
- McGinity, J. W. and O'Donnell, P. B. "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique." *Adv Drug Deliv Rev* 28(1): 25-42 (1997)
- Medarova, Z., Rashkovetsky, L., Pantazopoulos, P. and Moore, A. "Multiparametric monitoring of tumor response to chemotherapy by noninvasive imaging." *Cancer Res* 69(3): 1182-1189 (2009)
- Miyamoto, A. and Matsukawa, H. "Color developing ink." 4263047 (1981)
- Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Hori, Y., Tochio, H., Walchli, M., Shirakawa, M. and Kikuchi, K. "Paramagnetic relaxation-based ¹⁹F MRI probe to detect protease activity." *J Am Chem Soc* 130(3): 794-795 (2008)
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. and Elaissari, A. "Polymer-based nanocapsules for drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 385(1-2): 113-142 (2010)
- Negussie, A. H., Yarmolenko, P. S., Partanen, A., Ranjan, A., Jacobs, G., Woods, D., Bryant, H., Thomasson, D., Dewhirst, M. W., Wood, B. J. and Dreher, M. R. "Formulation and characterisation of magnetic resonance imageable thermally sensitive liposomes for use with

Travaux antérieurs

- magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound." *International Journal of Hyperthermia* 27(2): 140-155 (2011)
- Neubauer, A. M., Myerson, J., Caruthers, S. D., Hockett, F. D., Winter, P. M., Chen, J., Gaffney, P. J., Robertson, J. D., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "Gadolinium-modulated 19F signals from perfluorocarbon nanoparticles as a new strategy for molecular imaging." *Magn Reson Med* 60(5): 1066-1072 (2008)
- Nihant, N., Grandfils, C., Jerome, R. and Teyssie, P. "Microencapsulation by Coacervation of Poly(Lactide-Co-Glycolide) .4. Effect of the Processing Parameters on Coacervation and Encapsulation." *Journal of Controlled Release* 35(2-3): 117-125 (1995)
- Nijenhuis, A. J., Grijpma, D. W. and Pennings, A. J. "Lewis Acid-Catalyzed Polymerization of L-Lactide - Kinetics and Mechanism of the Bulk-Polymerization." *Macromolecules* 25(24): 6419-6424 (1992)
- Nystrom, A. M., Bartels, J. W., Du, W. and Wooley, K. L. "Perfluorocarbon-loaded Shell Crosslinked Knedel-like Nanoparticles: Lessons regarding polymer mobility and self assembly." *J Polym Sci A Polym Chem* 47(4): 1023-1037 (2009)
- Oishi, M., Sumitani, S. and Nagasaki, Y. "On-off regulation of 19F magnetic resonance signals based on pH-sensitive PEGylated nanogels for potential tumor-specific smart 19F MRI probes." *Bioconjug Chem* 18(5): 1379-1382 (2007)
- Onuki, Y., Jacobs, I., Artemov, D. and Kato, Y. "Noninvasive visualization of in vivo release and intratumoral distribution of surrogate MR contrast agent using the dual MR contrast technique." *Biomaterials* 31(27): 7132-7138 (2010)
- Orsi, F., Arnone, P., Chen, W. and Zhang, L. "High intensity focused ultrasound ablation: a new therapeutic option for solid tumors." *J Cancer Res Ther* 6(4): 414-420 (2010)
- Parhami, P. and Fung, B. M. "F-19 Relaxation Study of Perfluoro Chemicals as Oxygen Carriers." *Journal of Physical Chemistry* 87(11): 1928-1931 (1983)
- Park, J. O., Stephen, Z., Sun, C., Veiseh, O., Kievit, F. M., Fang, C., Leung, M., Mok, H. and Zhang, M. "Glypican-3 targeting of liver cancer cells using multifunctional nanoparticles." *Mol Imaging* 10(1): 69-77 (2011)
- Partlow, K. C., Chen, J., Brant, J. A., Neubauer, A. M., Meyerrose, T. E., Creer, M. H., Nolta, J. A., Caruthers, S. D., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons." *FASEB J* 21(8): 1647-1654 (2007)
- Persico, P., Carfagna, C., Danicher, L. and Frere, Y. "Polyamide microcapsules containing jojoba oil prepared by inter-facial polymerization." *Journal of Microencapsulation* 22(5): 471-486 (2005)
- Phares, R. E., Jr. and Sperandio, G. J. "Coating Pharmaceuticals by Coacervation." *J Pharm Sci* 53: 515-518 (1964)
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V. and Tsapis, N. "Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface." *J Colloid Interface Sci* 326(1): 66-71 (2008)
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E. and Tsapis, N. "Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG." *Soft Matter* 5(16): 3054-3060 (2009)
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B. T., Beloeil, J. C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S. L. and Fattal, E. "Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging." *Advanced Functional Materials* 18(19): 2963-2971 (2008)
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. and Fattal, E. "Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization." *Langmuir* 22(9): 4397-4402 (2006)

Travaux antérieurs

- Ponce, A. M., Viglianti, B. L., Yu, D., Yarmolenko, P. S., Michelich, C. R., Woo, J., Bally, M. B. and Dewhirst, M. W. "Magnetic resonance imaging of temperature-sensitive liposome release: drug dose painting and antitumor effects." *J Natl Cancer Inst* 99(1): 53-63 (2007)
- Poulin, P. and Bibette, J. "Adhesion of water droplets in organic solvent." *Langmuir* 14(22): 6341-6343 (1998)
- Rachakatla, R. S., Balivada, S., Seo, G. M., Myers, C. B., Wang, H., Samarakoon, T. N., Dani, R., Pyle, M., Kroh, F. O., Walker, B., Leaym, X., Koper, O. B., Chikan, V., Bossmann, S. H., Tamura, M. and Troyer, D. L. "Attenuation of mouse melanoma by A/C magnetic field after delivery of bi-magnetic nanoparticles by neural progenitor cells." *ACS Nano* 4(12): 7093-7104 (2010)
- Rapoport, N., Nam, K. H., Gupta, R., Gao, Z., Mohan, P., Payne, A., Todd, N., Liu, X., Kim, T., Shea, J., Scaife, C., Parker, D. L., Jeong, E. K. and Kennedy, A. M. "Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions." *Journal of Controlled Release* 153(1): 4-15 (2011)
- Richard, J. and Benoît, J.-P. "Microencapsulation." *Techniques de l'ingénieur* J2(J2210) (2000)
- Richardson, N. G., Heriot, A. G., Kumar, D. and Joseph, A. E. "Abdominal ultrasonography in the diagnosis of colonic cancer." *Br J Surg* 85(4): 530-533 (1998)
- Rosca, I. D., Watari, F. and Uo, M. "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation." *Journal of Controlled Release* 99(2): 271-280 (2004)
- Ruiz-Cabello, J., Walczak, P., Kedziorek, D. A., Chacko, V. P., Schmieder, A. H., Wickline, S. A., Lanza, G. M. and Bulte, J. W. "In vivo "hot spot" MR imaging of neural stem cells using fluorinated nanoparticles." *Magn Reson Med* 60(6): 1506-1511 (2008)
- Sablon, K. "Single-component polymer nanocapsules for drug delivery application." *Nanoscale Research Letters* 3(7): 265-267 (2008)
- Sanders, L. M., Kent, J. S., McRae, G. I., Vickery, B. H., Tice, T. R. and Lewis, D. H. "Controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue from poly(d,L-lactide-co-glycolide) microspheres." *J Pharm Sci* 73(9): 1294-1297 (1984)
- Sanders, L. M., McRae, G. I., Vitale, K. M. and Kell, B. A. "Controlled delivery of an LHRH analogue from biodegradable injectable microspheres." *Journal of Controlled Release* 2: 187 (1985)
- Sanson, C., Schatz, C., Le Meins, J. F., Brulet, A., Soum, A. and Lecommandoux, S. "Biocompatible and biodegradable poly(trimethylene carbonate)-b-poly(L-glutamic acid) polymersomes: size control and stability." *Langmuir* 26(4): 2751-2760 (2010)
- Sanson, C., Schatz, C., Le Meins, J. F., Soum, A., Thevenot, J., Garanger, E. and Lecommandoux, S. "A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes." *Journal of Controlled Release* 147(3): 428-435 (2010)
- Sauviat, M. and Cohen-Addad, J. P. "Polyisobutylene: fractional precipitation from binary solvent induced by non-solvent addition." *Polymer* 22(4): 461-464 (1981)
- Schmiedel, J. K. and Sandow, R. "Procédé de préparation de microcapsules biodégradables contenant des peptides et des protéines solubles dans l'eau et les microcapsules obtenues par ledit procédé." EP0315875 (1989)
- Schnell, O., Krebs, B., Carlsen, J., Miederer, I., Goetz, C., Goldbrunner, R. H., Wester, H. J., Haubner, R., Popperl, G., Holtmannspotter, M., Kretzschmar, H. A., Kessler, H., Tonn, J. C., Schwaiger, M. and Beer, A. J. "Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography." *Neuro Oncol* 11(6): 861-870 (2009)
- Schroeder, A., Kost, J. and Barenholz, Y. "Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes." *Chem Phys Lipids* 162(1-2): 1-16 (2009)
- Seguin, J., Nicolazzi, C., Mignet, N., Scherman, D. and Chabot, G. G. "Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours." *Tumour Biol* (2012)
- Shi, X. Y. and Caruso, F. "Release behavior of thin-walled microcapsules composed of polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* 17(6): 2036-2042 (2001)

Travaux antérieurs

- Shum, H. C., Kim, J. W. and Weitz, D. A. "Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability." *J Am Chem Soc* 130(29): 9543-9549 (2008)
- Shum, H. C., Santanach-Carreras, E., Kim, J. W., Ehrlicher, A., Bibette, J. and Weitz, D. A. "Dewetting-induced membrane formation by adhesion of amphiphile-laden interfaces." *J Am Chem Soc* 133(12): 4420-4426 (2011)
- Siddhan, P., Jassal, M. and Agrawal, A. K. "Core content and stability of n-octadecane-containing polyurea microencapsules produced by interfacial polymerization." *Journal of Applied Polymer Science* 106(2): 786-792 (2007)
- Singh, M., Singh, A. and Talwar, G. P. "Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable poly(D,L-lactide) microcapsules." *Pharm Res* 8(7): 958-961 (1991)
- Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., Marsh, J. N., Lanza, G. M., Heuser, J. E., Arbeit, J. M., Wickline, S. A. and Schlesinger, P. H. "Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth." *J Clin Invest* 119(9): 2830-2842 (2009)
- Soman, N. R., Lanza, G. M., Heuser, J. M., Schlesinger, P. H. and Wickline, S. A. "Synthesis and characterization of stable fluorocarbon nanostructures as drug delivery vehicles for cytolytic peptides." *Nano Lett* 8(4): 1131-1136 (2008)
- Sotak, C. H., Hees, P. S., Huang, H. N., Hung, M. H., Krespan, C. G. and Raynolds, S. "A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy." *Magn Reson Med* 29(2): 188-195 (1993)
- Spahn, D. R., van Brempt, R., Theilmeier, G., Reibold, J. P., Welte, M., Heinzerling, H., Birck, K. M., Keipert, P. E. and Messmer, K. "Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Emulsion Study Group." *Anesthesiology* 91(5): 1195-1208 (1999)
- Stavros, A. T., Thickman, D., Rapp, C. L., Dennis, M. A., Parker, S. H. and Sisney, G. A. "Solid Breast Nodules - Use of Sonography to Distinguish Benign and Malignant Lesions." *Radiology* 196(1): 123-134 (1995)
- Sundberg, D. C., Casassa, A. P., Pantazopoulos, J., Muscato, M. R., Kronberg, B. and Berg, J. "Morphology Development of Polymeric Microparticles in Aqueous Dispersions .1. Thermodynamic Considerations." *Journal of Applied Polymer Science* 41(7-8): 1425-1442 (1990)
- Sundet, S. A., Murphey, W. A. and Speck, S. B. "Interfacial polycondensation. IX. Polysulfonamides." *Journal of Polymer Science* 40(137): 389 (1959)
- Takaoka, Y., Kiminami, K., Mizusawa, K., Matsuo, K., Narasaki, M., Matsuda, T. and Hamachi, I. "Systematic study of protein detection mechanism of self-assembling 19F NMR/MRI nanoprobes toward rational design and improved sensitivity." *J Am Chem Soc* 133(30): 11725-11731 (2011)
- Thomassin, C., Ho, N. T., Merkle, H. P. and Gander, B. "Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations." *J Pharm Sci* 87(3): 259-268 (1998)
- Thomassin, C., Merkle, H. P. and Gander, B. "Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 2. Parameters determining microsphere formation." *J Pharm Sci* 87(3): 269-275 (1998)
- Torza, S. and Mason, S. G. "Three-phase interactions in shear and electrical fields." *Journal of Colloid Interface Science* 33(1): 67 (1970)
- Tranquart, F., Correas, J. M. and Bouakaz, A. "Echographie de contraste". Paris, France (2007)
- Valencia, P. M., Basto, P. A., Zhang, L., Rhee, M., Langer, R., Farokhzad, O. C. and Karnik, R. "Single-step assembly of homogenous lipid-polymeric and lipid-quantum dot nanoparticles enabled by microfluidic rapid mixing." *ACS Nano* 4(3): 1671-1679 (2010)
- Vaupel, P., Kallinowski, F. and Okunieff, P. "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." *Cancer Res* 49(23): 6449-6465 (1989)

Travaux antérieurs

- Veiseh, O., Kievit, F. M., Fang, C., Mu, N., Jana, S., Leung, M. C., Mok, H., Ellenbogen, R. G., Park, J. O. and Zhang, M. "Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery." *Biomaterials* 31(31): 8032-8042 (2010)
- Viglianti, B. L., Ponce, A. M., Michelich, C. R., Yu, D., Abraham, S. A., Sanders, L., Yarmolenko, P. S., Schroeder, T., MacFall, J. R., Barboriak, D. P., Colvin, O. M., Bally, M. B. and Dewhirst, M. W. "Chemodosimetry of in vivo tumor liposomal drug concentration using MRI." *Magn Reson Med* 56(5): 1011-1018 (2006)
- Wagh, S. J., Dhumal, S. S. and Suresh, A. K. "An experimental study of polyurea membrane formation by interfacial polycondensation." *Journal of Membrane Science* 328(1-2): 246-256 (2009)
- Waite, C. L. and Roth, C. M. "Nanoscale drug delivery systems for enhanced drug penetration into solid tumors: current progress and opportunities." *Crit Rev Biomed Eng* 40(1): 21-41 (2012)
- Wang, A. Z., Bagalkot, V., Vasiliou, C. C., Gu, F., Alexis, F., Zhang, L., Shaikh, M., Yuet, K., Cima, M. J., Langer, R., Kantoff, P. W., Bander, N. H., Jon, S. and Farokhzad, O. C. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy." *ChemMedChem* 3(9): 1311-1315 (2008)
- Waters, E. A., Chen, J., Yang, X., Zhang, H., Neumann, R., Santeford, A., Arbeit, J., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "Detection of targeted perfluorocarbon nanoparticle binding using ¹⁹F diffusion weighted MR spectroscopy." *Magn Reson Med* 60(5): 1232-1236 (2008)
- Winter, P. M., Schmieder, A. H., Caruthers, S. D., Keene, J. L., Zhang, H. Y., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. "Minute dosages of alpha(^{nu})beta(3)-targeted fumagillin nanoparticles impair Vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits." *Faseb Journal* 22(8): 2758-2767 (2008)
- Wittbecker, E. L. and Katz, M. "Interfacial polycondensation, VII Polyurethanes." *Journal of Polymer Science* 40(137): 367 (1959)
- Wittbecker, E. L. and Morgan, P. W. "Interfacial polycondensation. I." *Journal of Polymer Science* 40(137): 289 (1959)
- Xie, Y. L., Wang, M. J. and Yao, S. J. "Preparation and characterization of biocompatible microcapsules of sodium cellulose sulfate/chitosan by means of layer-by-layer self-assembly." *Langmuir* 25(16): 8999-9005 (2009)
- Yang, J., Lee, C. H., Ko, H. J., Suh, J. S., Yoon, H. G., Lee, K., Huh, Y. M. and Haam, S. "Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer." *Angew Chem Int Ed Engl* 46(46): 8836-8839 (2007)
- Yang, X., Grailer, J. J., Rowland, I. J., Javadi, A., Hurley, S. A., Steeber, D. A. and Gong, S. "Multifunctional SPIO/DOX-loaded wormlike polymer vesicles for cancer therapy and MR imaging." *Biomaterials* 31(34): 9065-9073 (2010)
- Yang, Y. Y., Chia, H. H. and Chung, T. S. "Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method." *Journal of Controlled Release* 69(1): 81-96 (2000)
- Yang, Y. Y., Chung, T. S., Bai, X. L. and Chan, W. K. "Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method." *Chemical Engineering Science* 55(12): 2223-2236 (2000)
- Yin, W. and Yates, M. Z. "Encapsulation and sustained release from biodegradable microcapsules made by emulsification/freeze drying and spray/freeze drying." *J Colloid Interface Sci* 336(1): 155-161 (2009)
- Yu, M. K., Kim, D., Lee, I. H., So, J. S., Jeong, Y. Y. and Jon, S. "Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles." *Small* 7(15): 2241-2249 (2011)
- Zhang, Y. and Rochefort, D. "Comparison of emulsion and vibration nozzle methods for microencapsulation of laccase and glucose oxidase by interfacial reticulation of poly(ethyleneimine)." *Journal of Microencapsulation* 27(8): 703-713 (2010)
- Zhao, J., Cui, Y., Wang, A., Fei, J., Yang, Y. and Li, J. "Side effect reduction of encapsulated hydrocortisone crystals by insulin/alginate shells." *Langmuir* 27(4): 1499-1504 (2011)

Travaux antérieurs

- Zhao, Q. and Li, B. "pH-controlled drug loading and release from biodegradable microcapsules." *Nanomedicine* 4(4): 302-310 (2008)
- Zheng, C., Qiu, L. Y. and Zhu, K. J. "Novel polymersomes based on amphiphilic graft polyphosphazenes and their encapsulation of water-soluble anti-cancer drug." *Polymer* 50(5): 1173-1177 (2009)
- Zhu, J. T., Ferrer, N. and Hayward, R. C. "Tuning the assembly of amphiphilic block copolymers through instabilities of solvent/water interfaces in the presence of aqueous surfactants." *Soft Matter* 5(12): 2471-2478 (2009)
- Zou, P., Yu, Y., Wang, Y. A., Zhong, Y., Welton, A., Galban, C., Wang, S. and Sun, D. "Superparamagnetic iron oxide nanotheranostics for targeted cancer cell imaging and pH-dependent intracellular drug release." *Mol Pharm* 7(6): 1974-1984 (2010)

Travaux expérimentaux

Travaux expérimentaux

Dans les travaux antérieurs, l'intérêt des nanocapsules polymères de perfluorocarbone pour l'imagerie ultrasonore et par résonance magnétique du Fluor, a été démontré. Ainsi des nanocapsules de PLGA renfermant un cœur de PFOB ont été élaborées au laboratoire par le procédé d'émulsion-évaporation lors des thèses d'Emilia Pisani et de Raquel Diaz-Lopez. Les paramètres de la formulation avaient été optimisés pour obtenir de façon reproductible et rapide des nanocapsules de morphologie et de taille contrôlées. Les propriétés physico-chimiques, acoustiques et de furtivité *in vitro* semblaient a priori satisfaire les exigences fixées par les deux modalités d'imagerie. Néanmoins, *in vivo* il était impossible d'imager la tumeur. Ceci était probablement dû à l'échec de la stratégie de ciblage passif choisie.

Le travail expérimental de thèse présenté ici, avait pour objectif initial de faire évoluer la structure des nanocapsules de PFOB pour tendre progressivement vers un système théranostique pour l'imagerie moléculaire bimodale et le traitement des tumeurs solides, en prenant l'exemple du cancer du côlon. On s'est alors appuyé sur les différents outils de construction du système théranostique, décrits dans la troisième partie des travaux antérieurs (Figure 1). Le premier enjeu était d'assurer la furtivité des nanocapsules pour favoriser leur accumulation dans la tumeur par ciblage passif (effet EPR). La surface des nanocapsules a donc été modifiée en utilisant un polymère à blocs PLGA-*b*-PEG et l'efficacité du nouvel agent de contraste ainsi obtenu, a été démontrée grâce à l'IRM du ^{19}F (Figure 1.1). Ces résultats sont présentés dans le chapitre 1. Dans le deuxième chapitre, les propriétés physico-chimiques ont été optimisées et mises en relation avec les propriétés acoustiques des nanocapsules, dans le but d'imager la tumeur par échographie (Figure 1.2). Enfin, dans le troisième chapitre deux molécules bioactives ont respectivement été introduites pour assurer d'une part, le rôle thérapeutique des nanocapsules (Figure 1.3a), et d'autre part, le ciblage spécifique de l'angiogénèse tumorale (Figure 1.3b).

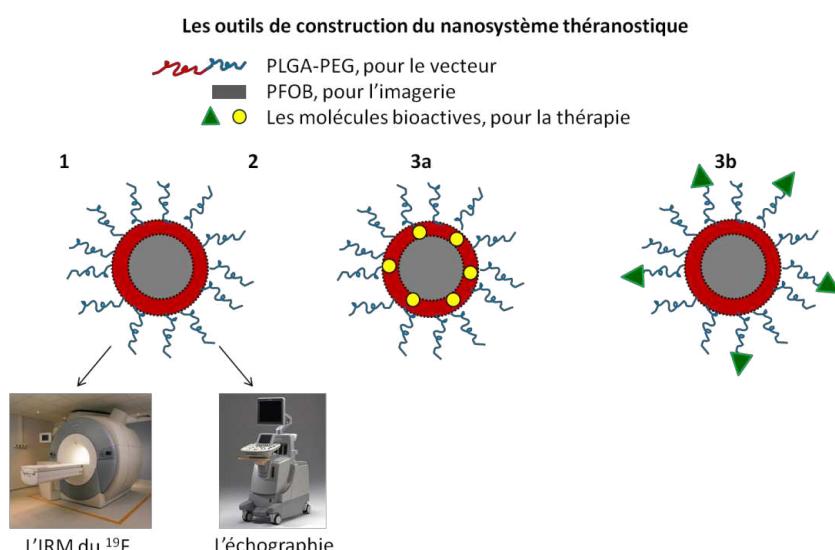


Figure 1 : Représentation schématique de l'évolution de la structure des nanocapsules polymère de PFOB au cours de la thèse

Chapitre 1

Nanocapsules polymères furtives pour l’Imagerie par Résonance Magnétique du Fluor

Le Poly(éthylène glycol) (PEG) est souvent utilisé pour recouvrir la surface de nanosystèmes, injectés par voie intraveineuse, et envisager par la suite, une stratégie de ciblage passif des tumeurs. Dans le but de concevoir des nanocapsules de PFOB furtives, le PLGA, utilisé dans le passé, a été ici remplacé par le copolymère à blocs, PEGylé, correspondant : PLGA-*b*-PEG. Dans un premier temps, il fallait s’assurer que les caractéristiques physico-chimiques et l’efficacité d’encapsulation du PFOB, pour les nanocapsules de PLGA-*b*-PEG, étaient bien semblables à celles obtenues auparavant avec le PLGA. Les techniques de diffusion dynamique de la lumière et de microscopies électroniques, à transmission et à balayage ainsi que la spectroscopie par résonance magnétique du Fluor ont alors été utilisées. Dans un second temps, il fallait vérifier que le remplacement du polymère enrobant, conduisait bien à une modification en surface des nanocapsules, par spectrophotométrie des rayons X. Enfin, les performances des nanocapsules, en termes de furtivité, ont été évaluées *in vitro*, par des mesures d’activation du complément et *in vivo*, par l’étude des cinétiques d’accumulation dans les organes du système réticulo-endothélial (foie et rate) par IRM du ¹⁹F.

Les résultats ont montré que l’utilisation du PLGA-*b*-PEG, permet de conserver la taille et la morphologie des nanocapsules et d’augmenter leur capacité d’encapsulation du PFOB. De plus, la PEGylation réussie de la surface, a causé la diminution du facteur d’activation du complément et le ralentissement de la capture *in vivo* des nanocapsules par le foie et la rate. Enfin, il a été prouvé que ces nouvelles nanocapsules PEGylées apportent un avantage certain pour l’imagerie de la tumeur par IRM du ¹⁹F. La dose accumulée dans les tissus malades, 7 h après injection intraveineuse, a pu être quantifiée par cette technique, elle est égale à 1 % de la dose administrée.

**Long-circulating perfluoroctyl bromide nanocapsules
for tumor imaging by ^{19}F -MRI**

Biomaterials, 33 (2012) 5593-5602

Odile Diou^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}, Céline Giraudeau³, Julien Valette^{3,4}, Claire Gueutin^{1,2}, Fanchon Bourasset⁵, Sandrine Zanna⁶, Christine Vauthier^{1,2}, Elias Fattal^{1,2}

¹ Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8612, LabEx LERMIT, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France.

² CNRS, UMR 8612, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France.

³ Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Institut d’Imagerie Biomédicale (I²BM), NeuroSpin, CEA Saclay, Bât. 145, F-91191, Gif-sur-Yvette cedex, France.

⁴ Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Institut d’Imagerie Biomédicale (I²BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCen), 18 route du panorama, BP n°6, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France.

⁵ Univ Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France.

⁶ Laboratoire de Physico Chimie des Surfaces, CNRS ENSCP (UMR 7045), Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP), 11 rue Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Abstract

PLGA-*b*-PEG nanocapsules containing a liquid core of perfluorooctyl bromide were synthesized by an emulsion-evaporation process and designed as contrast agents for ¹⁹F MRI. Physico-chemical properties of plain and PEGylated nanocapsules were compared. The encapsulation efficiency of PFOB, estimated by ¹⁹F NMR spectroscopy, is enhanced when using PLGA-*b*-PEG instead of PLGA. PLGA-*b*-PEG nanocapsule diameter, measured by Dynamic Light Scattering is around 120nm, in agreement with Transmission Electron microscopy (TEM) observations. TEM and Scanning Electron Microscopy (SEM) reveal that spherical core-shell morphology is preserved. PEGylation is further confirmed by Zeta potential measurements and X-ray Photoelectron Spectroscopy. *In vitro*, stealthiness of the PEGylated nanocapsules is evidenced by weak complement activation. Accumulation kinetics in the liver and the spleen was performed by ¹⁹F MRI in mice, during the first 90 minutes after intravenous injection. In the liver, plain nanocapsules accumulate faster than their PEGylated counterparts. We observe PEGylated nanocapsule accumulation in CT26 xenograft tumor 7 hours after administration to mice, whereas plain nanocapsules remain undetectable, using ¹⁹F MRI. Our results validate the use of diblock copolymers for PEGylation to increase the residence time of nanocapsules in the blood stream and to reach tumors by the Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect.

Keywords: ¹⁹F MRI; PFOB; nanocapsules; PEGylation; EPR effect

1. Introduction

From the 1970s, perfluorocarbons (PFCs) have been considered of great interest for clinical applications. They were initially developed as gas/oxygen carriers for lung ventilation or as blood substitutes (Shaffer *et al.* 1996; Castro *et al.* 2010). Their high fluorine content, chemical inertness and variable physico-chemical properties, such as molecular weight, density or boiling point, widen their field of applications. Their potential as contrast agents is now well established as illustrated by their use in many different imaging modalities (Diaz-Lopez *et al.* 2010). Mattrey and al. injected perfluoroctyl bromide (PFOB) in rabbits to detect liver-abscesses with Computed Tomography (Mattrey *et al.* 1991). Perfluorohexyl bromide and PFOB helped to diagnose small-bowel obstruction during X-Ray examination (Wootton *et al.* 1993). Angiogenesis of breast cancer tumor was evidenced by ultrasonography with nanodroplets of perfluoropentane ($T_b=28^\circ\text{C}$), which convert to highly echogenic nanobubbles upon heating to physiological temperatures (Gao *et al.* 2008). Finally, Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) emulsions were used for Magnetic Resonance Imaging either to label immunotherapeutic cells and follow their migration after administration or to visualize and quantify the development of neovasculature on atherosclerotic plaques (Ahrens *et al.* 2005; Waters *et al.* 2008).

The benefits of fluorine in MRI compared to proton-based imaging are numerous. ^{19}F has a spin $\frac{1}{2}$ nucleus and a gyromagnetic ratio very close to the proton. Thus, for a given magnetic field value, the spin precesses at almost the same frequency, yielding a high sensitivity and allowing the use of proton spectrometer to detect fluorine. Moreover ^{19}F is found only in trace amounts in biological tissues, meaning that there is no endogenous background signal and that the signature of an exogenous fluorinated contrast agent is unique and specific. The choice of PFCs for ^{19}F MRI is crucial. PFOB is one of the most interesting because it is a FDA-approved dense liquid with a low diffusion coefficient into blood, increasing its residence time in the circulation as compared to other PFCs. Nevertheless, as observed for perfluorodecalin and perfluorohexane, PFOB has non equivalent fluorine nuclei, which induce a multi peak resonance spectrum leading to chemical shift artefacts with replicated images (Srinivas *et al.* 2010), and signal loss during echo time due to spin coupling. The recent design of a specific ^{19}F MRI multi spin echo (MSE) sequence allowed using PFOB as an MRI contrast agent while eliminating much of the restrictions associated with non-equivalent coupled nuclei (Giraudeau *et al.* 2010).

Although most PFOB-based ^{19}F MRI contrast agents consist in emulsions (Caruthers *et al.* 2006; Giraudeau *et al.* 2012), we have focused on recently developed polymeric nanocapsules of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), encapsulating PFOB (Pisani *et al.* 2008; Pisani *et al.* 2008). The biodegradable polymeric shell ensures a good stability of the system, along with mechanical strength (Wang *et al.* 2010; Pamula *et al.* 2011) as compared to emulsions. In addition, polymer chemistry offers versatility of chemical moieties, which can be further functionalized with targeted ligands (Dhar *et al.* 2008) and a loading compartment is made available in the shell for any lipophilic drug (Gomez-Gaete *et al.* 2007; Park *et al.* 2009). Preliminary *in vitro* ^{19}F MRI experiments revealed that encapsulation of PFOB within PLGA nanocapsules does not modify its contrast properties and may provide a significant contrast enhancement at 9.4 T (Pisani *et al.* 2008).

The *in vivo* use of PLGA/PFOB nanocapsules is however limited by their rather hydrophobic surface. After intravenous administration, PLGA nanocapsules undergo opsonization followed by rapid elimination by the mononuclear phagocyte system (MPS). Capsules end up mostly in the liver and the spleen and passive tumor targeting, based on the enhanced permeation and retention effect (Yuan *et al.* 1995) cannot be achieved. To increase the plasmatic half life of nanocapsules, different strategies have been considered including surface modification of nanoparticles either with polysaccharides (dextran, heparin, chitosan) (Labarre *et al.* 2005; Lemarchand *et al.* 2006) or polyethylene glycol (PEG) chains (Gref *et al.* 1995). The hydrophilic shell located on nanoparticle surface prevents opsonization by steric repulsion of blood proteins. PEG is FDA approved and PEGylation may be obtained by different methods such as physical adsorption, covalent grafting on preformed nanoparticles (Nobs *et al.* 2003) or direct formulation using PEG-copolymers (Calvo *et al.* 2001). In the case of PLGA/PFOB capsules, decoration of the shell by PEGylated phospholipids was considered (Diaz-Lopez *et al.* 2008; Diaz-Lopez *et al.* 2009; Diaz-Lopez *et al.* 2010). This last strategy revealed deceitful. Since capsule mechanism of formation is exquisitely sensitive to interfacial phenomena (Pisani *et al.* 2008) it was difficult to yield a good PEG coverage. The best PEG coverage obtained by this method expressed as the minimum surface occupied by one PEG chain, was 100nm^2 . As PEG chains have a large range of motion, they may adopt a mushroom configuration or leave free spaces between each other allowing blood protein adsorption. In any case, the phospholipid strategy revealed unfavorable to reduce uptake by the MPS (Diaz-Lopez *et al.* 2010).

Our study focuses on the use of PLGA-*b*-PEG₅₀₀₀ diblock copolymer instead of PLGA to formulate PFOB nanocapsules. PFOB encapsulation within a polymer shell is exquisitely sensitive to the interfacial properties of both the polymer and the surfactant chosen, therefore requiring optimisation (Pisani *et al.* 2008). The encapsulation of PFOB will be optimized by comparing two formulation pathways: nanoprecipitation and emulsion-evaporation. The physico-chemical properties of the PEGylated nanocapsules will be assessed to validate their potential stealthiness after intravenous administration. Finally plain and PEGylated nanocapsules accumulation in liver, spleen and tumor will be measured by ¹⁹F MRI to evidence the PEGylation efficacy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Methylene chloride (CH_2Cl_2) RPE-ACS 99.5% and Acetone 99.8% were provided by Carlo Erba Reactifs (France). Sulfuric Acid ACS Reagent 95-98% and CDCl_3 (99.96 atom % D) were provided by Sigma Aldrich (France). Poly(lactide-co-glycolide) Resomer RG502 (intrinsic viscosity 0.16-0.24 dl/g ; $M_n = 9\ 500-15\ 000$ g/mol) and poly(ethylene glycol)-*b*-block-poly(DL-lactide-co-glycolide) 50:50 Resomer RGP d 50105 (intrinsic viscosity 0.72 dl/g ; PLGA $M_n=45\ 000$ g/mol containing 10 wt% of PEG $M_n = 5\ 000$ g/mol) were obtained from Boehringer-Ingelheim (Germany). Poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 30\ 000-70\ 000$ g/mol, 89 % hydrolyzed) and sodium cholate (SC) were purchased from Sigma-Aldrich. Perfluorooctyl bromide (PFOB) and Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) were purchased from Fluorochim (UK). Water was purified using a RIOS/Synergy system from Millipore (France).

2.2. Sample Preparation

Nanocapsules were prepared either by nanoprecipitation or emulsion-evaporation. In both cases, the polymer (100 mg) was dissolved into the organic phase along with 60 μL of PFOB and placed in a thermostated bath maintained at 20°C. For nanoprecipitation, the aqueous phase (20 mL) was added quickly to the organic phase (acetone/ CH_2Cl_2 : 9.4 mL/0.6mL) with a syringe and needle, or opposite. For emulsion-evaporation, the organic phase (4 mL CH_2Cl_2) was emulsified into 20 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1min and then a vibrating metallic tip (IBP7677, Ultrasons, Annemasse, France) at 180 V, for 1 min over ice. Solvents were then evaporated by magnetic stirring at 300 rpm for about 3 h (for emulsion-evaporation) to overnight (for nanoprecipitation) in a thermostated bath (20°C). Plain and PEGylated nanocapsules were prepared respectively with PLGA and PLGA-*b*-PEG copolymers. For plain nanocapsules, an incubation with PVA (1% w/v) for 5 days at 4°C is necessary, prior to the purification step, in order to replace sodium cholate by PVA and prevent further aggregation. Both types of nanocapsules were then washed by ultracentrifugation for 1 hour, at T=4°C and at 6 860 g, 27 440 g for PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules respectively (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The pellet was finally resuspended in water.

2.3. Size and Zeta potential

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of the nanocapsules, were measured by quasi elastic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Suspensions were diluted in water filtered over a 0.22 μm membrane. Measurements were performed in

triplicate at 20°C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering. The counting time was set at 60s. Zeta potential measurements were carried out with the same instrument, at 25°C, in 1 mM NaCl.

2.4. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was performed at CCME (Orsay, France) using a Philips EM208 operating at 80 kV. Suspensions of nanocapsules (1 mg/mL) were deposited on copper grids covered with a formvar film (400 mesh) for 2 min. The excess solution was blotted off using filter paper and grids were air dried before observation. Images were acquired using a high-resolution camera, Advantage HR3/ 12GO4 (AMT-Hamamatsu).

2.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was performed using a LEO 1530 (LEO Electron Microscopy Inc, Thornwood, NY) operating between 1 and 3 kV with a filament current of about 0.5 mA. Washed and freeze dried nanocapsules were deposited on carbon conductive double-sided tape (Euromedex, France). They were coated with two palladium-platinum layers of ca. 1 nm using a Cressington sputter-coater 208HR with a rotary-planetary-tilt stage, equipped with an MTM-20 thickness controller. An In-lens detector has been used for imaging.

2.6. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR

Fresh unpurified capsules were freeze dried for 24-48 h using an Alpha 1-2 LD plus freeze-dryer (Christ). Lyophilisates were then dissolved into CDCl_3 containing perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) as an internal standard ($[\text{PFCE}] = 0.76\text{mmol/L}$). The amount of PFOB $n_{\text{PFOB}}^{\text{NMR}}$ was determined after integration of the peak at -81 ppm corresponding to the CF_3 group and normalization by the area of the PFCE peak at -89.5 ppm. Encapsulation efficiency η_{encaps} was calculated as follows:

$$\eta_{\text{encaps}} = \frac{n_{\text{PFOB}}^{\text{NMR}}}{n_{\text{PFOB}}^{\text{max}}} \quad \text{with} \quad n_{\text{PFOB}}^{\text{max}} = \frac{m_{\text{PFOB}}^{\text{feed}}}{M_{\text{PFOB}}} \frac{m_{\text{NC}}}{m_{\text{PFOB}}^{\text{feed}} + m_{\text{Polymer}}^{\text{feed}} + m_{\text{SC}}^{\text{feed}}}$$

where $m_{\text{PFOB}}^{\text{feed}}$, $m_{\text{Polymer}}^{\text{feed}}$, $m_{\text{SC}}^{\text{feed}}$ are the initial masses of the components introduced in the organic phase, m_{NC} corresponds to the mass of capsules recovered after freeze-drying and M_{PFOB} is the molecular weight of PFOB (498.96 g/mol).

2.7. Sodium cholate determination by spectrophotometry

The method used for sodium cholate assay was originally proposed by Mosbach and al. (1954) and then used by Dalwadi *et al.* (Mosbach *et al.* 1954; Dalwadi *et al.* 2007). Concentrated solutions were prepared by dissolving 25 to 125 mg of sodium cholate up to 10mL of water. Aliquots of 40 μ L of each solution were pipetted accurately into a 20mL volumetric flask, which is completed with freshly prepared 65% w/v sulfuric acid solution. Absorbance of the solution was measured at 320nm using a UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu UV-2101PC). Absorbance as a function of concentration of sodium cholate in sulfuric acid solution was plotted as a calibration curve over a concentration range from 5.0 to 25.0 μ g/mL ($y=33.225x+0.0101$, $R^2=0.9999$).

A 25 μ L sample was taken from just-prepared nanocapsules suspension or supernatant of washed nanocapsules and placed into a 20mL volumetric flask. Final volume was completed with the 65% w/v sulfuric acid solution. Absorbance was measured at 320nm. The amount of sodium cholate was calculated using the calibration curve mentioned above. Experiment was done in triplicate for each sample.

To validate the accuracy of the method, a protocol derived from standard addition method, was used. Various volumes (from 5 to 13 μ L) of suspension and 20 μ L of the standard solution of sodium cholate ($[SC]=5 \text{ } \mu\text{g/mL}$) were mixed into a 10 mL volumetric flask, completed with the 65% w/v sulfuric acid solution. Absorbance was plotted versus total concentration of sodium cholate ($y=33.021x+0.0087$, $n=3$ for PLGA and $y=34.508x+0.0144$ for PLGA-*b*-PEG). Assuming that only sodium cholate absorbs at 320 nm, the relative error on the attenuation coefficient is $\Delta\epsilon/\epsilon_0=0.61\%$ (with PLGA samples) and $\Delta\epsilon/\epsilon_0=3.86\%$ (with PLGA-*b*-PEG samples). It can be admitted that nanocapsules alone do not absorb at the considered wavelength.

2.8. Stability of nanocapsules over time

After purification, nanocapsules were dispersed in PBS and incubated at 37°C under stirring. Size variation of nanocapsules was followed with time by dynamic light scattering, as previously described. Simultaneously, aliquots of 2mL were taken out, freeze-dried and redispersed in CDCl₃. The volume of PFOB remaining encapsulated was evaluated by ¹⁹F NMR.

2.9. X-ray Photoelectron Spectroscopy

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to determine the surface composition of NPs. Powder of raw PLGA and PLGA-*b*-PEG polymers and lyophilisates of washed nanoparticles were deposited on the grid. A Thermo Electron Escalab 250 spectrometer with a monochromated radiation (1486.6 eV) was used. For all samples, a survey spectrum was recorded over a binding energy range of 0 to 1100 eV, the analyzer pass energy was 100 eV. In all cases the survey spectra only revealed the presence of oxygen (O1s 533 eV) and carbon (C1s 285 eV). C1s core was analysed in more details from 280 to 295 eV and pass energy of 20 eV. The spectrometer was calibrated against Au 4f7/2 at 84.1 eV. The photoelectron take-off angle (angle of the surface with the direction in which the photoelectrons are analyzed) was 90°. Curve fitting of the spectra was performed with the Thermo Electron Avantage software.

2.10. Complement Activation

The complement activation of PEGylated and non PEGylated nanocapsules was evidenced by evaluating the conversion of C3 into C3a and C3b by a 2-D immunoelectrophoresis method, as described by others (Kazatchkine 1986; Labarre *et al.* 2005). Human serum was obtained after calcifying plasma from healthy donors, and stored at -80°C until use. Nanocapsule suspensions were incubated, under gentle agitation, for 1 h at 37°C with 50 µL human serum and 50 µL Veronal Buffer, containing 0.15mM calcium chloride and 0.5mM magnesium chloride (VBS²⁺). To ensure a valid comparison of the different suspensions, concentrations in nanocapsules were adjusted to obtain an equal surface area of S = 1000 cm² and 2000 cm² in 100µL. After incubation, 7 µL of each sample were subjected to a first electrophoresis on 1% agarose gel in tricine buffer (pH = 8.6). The migration was achieved using Pharmacia LKR Multiphor (600 V, 8.8 mA, and 5 W) for 1.5 hours. The second-dimension electrophoresis was carried out for 18 hours, on Gelbond films in 1 % agarose gel plates containing a polyclonal antibody to human C3 (Complement C3 antiserum rose in goat, Sigma, France), recognizing C3 as well as C3a and C3b. The films were finally dried and stained with Coomassie blue to reveal the presence of the proteins, which have reacted with the antibody (Sigma). The complement activation factor (CAF) was then calculated from the ratio of the total area of the peaks attributed to C3a and C3b over the sum of the areas of the peaks attributed to C3a+b and to C3. This ratio was then normalized on a scale ranging from 0 to 100 in which 100 indicated total activation, obtained with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles (Vauthier *et al.* 2011) and 0 the spontaneous activation, measured in absence of nanocapsules.

$$CAF = \frac{C3_{a+b}}{C3 + C3_{a+b}}$$

2.11. ^{19}F MRI

2.11.1. *In vivo accumulation study*

Six-week-old females *Foxn1nu* (nu/nu) mice weighing from 20 to 22 g were purchased from Harlan (France). Animal procedures were in accordance with the recommendations of the EEC (86/609/CEE) and the French National Committee (decree 87/848) for the care and use of laboratory animals. Animals were anesthetized with ketamine and domitor. The ^{19}F Imaging was performed on a 7-T small-animal MRI scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) using a double-tuned, $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ 3.2-cm-diameter, linear, birdcage coil, built at Neurospin (CEA, Saclay, France). Anatomic ^1H images were recorded at the beginning of the experiment to localize the organs. The multi spin echo imaging sequence (TE = 15.5 ms, TR = 4000 ms, 60 echoes one 16mm-thick slices, $0.63 \times 0.94 \text{ mm}^2$ in-plane resolution) was used for ^{19}F imaging. It takes into account NMR properties of PFOB to maximize sensitivity (Giraudeau *et al.* 2010). Images were acquired every 4.5 minutes after intravenous infusion of the nanocapsules in the tail vein ($200\mu\text{L}$ $C_{\text{PFOB}}=120\text{mM}$ and 55mM respectively for plain and PEGylated nanocapsules). An external reference was placed close to the right flank of the mouse for signal calibration. Concentration of PFOB was measured as a function of time in the liver and spleen for 1.5 hours, multiplied by the volume of organs ($V_{\text{liver}}=1\text{mL}$ and $V_{\text{spleen}}=150\mu\text{L}$) and normalised by the injected dose.

2.11.2. *In vivo tumor imaging*

Murine colon carcinoma cell line CT26.WT was purchased from ATCC (Molsheim, France). Four-week-old females *Fox1nu* (nu/nu) mice weighing around 20g were purchased from Harlan. The colon tumor model was established by injecting 3.10^5 cells (in $100 \mu\text{L}$ cell culture medium) subcutaneously into the right flank of the animal. Twelve days after tumor inoculation ($V_{\text{tumor}}>150\text{mm}^3$), PLGA and PLGA-PEG nanocapsules were injected in the tail vein ($200\mu\text{L}$, $C_{\text{PFOB}}=82.5\text{mM}$). 7 hours after the injection, the mouse was anesthetized with i.p. injection of ketamine and domitor and placed inside the coil. After acquisition of anatomical ^1H images, ^{19}F acquisitions were performed with the previously described MSE MRI sequence. Total acquisition time was 35min. Concentration of PFOB was measured in the liver, spleen and tumor multiplied by the volume of organs and normalised by the injected dose.

3. Results and Discussion

3.1. Formulation process

PLGA/PFOB nanocapsules were previously prepared by an emulsion-evaporation process which allowed modulating capsule diameter and thickness by simply varying the sonication power, the sodium cholate (SC) concentration or the PLGA/PFOB proportions (Pisani *et al.* 2006; Pisani *et al.* 2008). Another process has been fully reviewed in the literature to produce polymeric capsules: solvent displacement method, often called nanoprecipitation. Since it is a spontaneous process, the energy input is reduced. Besides, the use of surfactants may be optional and purification issues may be avoided. Considering these advantages and the amphiphilic nature of PLGA-*b*-PEG, nanoprecipitation was considered as an alternative to produce PLGA-*b*-PEG/PFOB nanocapsules. The mixture of acetone and methylene chloride (9.6mL/0.4mL) was chosen to ensure miscibility with water and full solubility of PFOB as well as PLGA-*b*-PEG. Sodium cholate (SC) was optionally added to the aqueous phase in order to compare the two processes in the very same conditions. The different formulations characteristics such as hydrodynamic diameter (d_H), polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency of PFOB (η_{encaps}) are presented in Table 1.

Table 1 : Characteristics of nanocapsules obtained by nanoprecipitation (n=2).

	% SC (w /v)	d_H (nm)	PDI	η_{encaps} (%)
Solvent in water	0	122 ± 3	0.37	70 ± 1
	1.5	120 ± 2	0.31	73 ± 2
Water in solvent	0	145 ± 0.1	0.16	31 ± 2
	1.5	178	0.19	30 ± 3

The order of addition of each phase was investigated. It is shown that when the solvent is poured in the water phase, nanoparticles of around 120 nm with high PDI values are obtained: 0.31 and 0.37 with and without SC respectively. The high polydispersity values can be explained by the very quick diffusion of the organic phase into the aqueous one followed by rapid and turbulent capsule formation, as already observed (Sanson *et al.* 2010). In addition, the PFOB encapsulation efficiency is high: $\eta_{encaps} = 73 \pm 2\%$ and $70 \pm 1\%$ with and without SC respectively. Nevertheless, the nanoparticles recovery is low (48 and 41 %), as seen by weighing freeze dried samples before and after filtration (0.45 µm). Optical microscopy reveals the presence of microcapsules of 2-6 µm. In the opposite way, adding the aqueous phase to the solvent leads to slightly larger but less polydisperse objects. In this case, suspensions are turbid which is surprising since suspensions of nanocapsules are usually very transparent as PFOB refractive index is 1.30 (25°C) close to the one of water (Tressaud 2008). Nanoparticles and nanocapsules are probably formed all together, which is also evidenced by the low encapsulation efficiencies: $\eta_{encaps}= 30 \pm 3\%$ and $31 \pm 2\%$, respectively with and without SC.

Influence of sodium cholate on nanocapsule characteristics was also determined. This surfactant seems to have a little influence on size and polydispersity of the objects, however it controls their morphology. In absence of SC, acorn morphologies, in which a hemisphere of liquid PFOB coexists with a hemisphere of solid PLGA-PEG, are observed by optical microscopy. Actually, PLGA-*b*-PEG is a poor stabilizer for the methylene chloride-water interface compared to sodium cholate. The interfacial tension is lowered from 28.2 mN/m to 17.5 mN/m in presence of 25 mg/mL copolymer, while it reaches 8.1mN/m, when the aqueous phase contains 1.5 w/v % of SC (Pisani *et al.* 2008; Pisani *et al.* 2009).

Table 2 : Characteristics of nanocapsules obtained by the emulsion evaporation process and after the purification step (n=3).

		d_H (nm)	PDI	ζ (mV)	η_{encaps} (%)
PLGA-PEG	After preparation	121 ± 2	0.18	-16±6	85 ± 4
	After purification	123 ± 4	0.16	-29±11	-
PLGA	After preparation	130 ± 3	0.24	-70±19	63 ± 7
	After purification	175 ± 0.2	0.18	0±5	-

To conclude, none of the studied nanoprecipitation conditions fulfils the requirements for the production of PLGA-*b*-PEG nanocapsules in terms of size ($d_H \sim 150$ nm), polydispersity (PDI<0.20) and PFOB encapsulation efficiency. Emulsion-evaporation conditions seem to be more satisfying, considering Table 2. With PLGA-*b*-PEG, the objects are around 120nm, have a low PDI (0.18) and very high encapsulation efficiency (85 ± 4%), suggesting that the majority of the objects corresponds to nanocapsules. When PLGA is used, capsules are almost of the same size $d_H = 130$ nm but are more polydisperse, PDI=0.24, and encapsulate a reduced quantity of PFOB: $\eta_{encaps} = 63 \pm 7$ %. Independently of the polymer used, the encapsulation efficacy of PFOB is much higher as compared with other studies: Srinivas *et al.* only succeeded to encapsulate 8% of PFOB in PLGA using the very same process (Srinivas *et al.* 2010). This difference most probably arises from the use of PVA as surfactant instead of SC. The relevance to formulate PLGA-*b*-PEG by an emulsion-evaporation process is thus confirmed in order to produce PEGylated nanocapsules and will be used in the following of the article.

3.2. Morphology

PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules were observed by Scanning Electron Microscopy. Images show spherical objects with sizes in good agreement with the hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering (Figure 1). In addition, smooth surfaces are observed for both nanocapsules. For PLGA-*b*-PEG nanocapsules, this result contrasts with previous experiments showing that

microcapsules obtained by emulsion-evaporation present spongy/porous surfaces (Pisani *et al.* 2009). The porous morphology was arising from the necessity to create surface to accommodate all PEG chains in the aqueous environment. Since nanocapsules possess a smooth surface, one can assume that the specific surface of nanocapsules is large enough for all PEG chains to be exposed to the aqueous environment.

Morphological analysis was completed by Transmission Electronic Microscopy imaging, which confirms that the core-shell structure is preserved with PLGA-*b*-PEG. The PFOB core appears in grey, whereas the polymeric shell seems darker. The intrinsic contrast between PFOB and PLGA-*b*-PEG has already been observed for PLGA nanocapsules. However, the shell of the PLGA-*b*-PEG nanocapsules appears more diffuse than the one for PLGA, considering previously published pictures (Pisani *et al.* 2006). The PEG chains are fully hydrated, lowering the contrast between the shell and water, leading to a blurry surface (Figure 1).

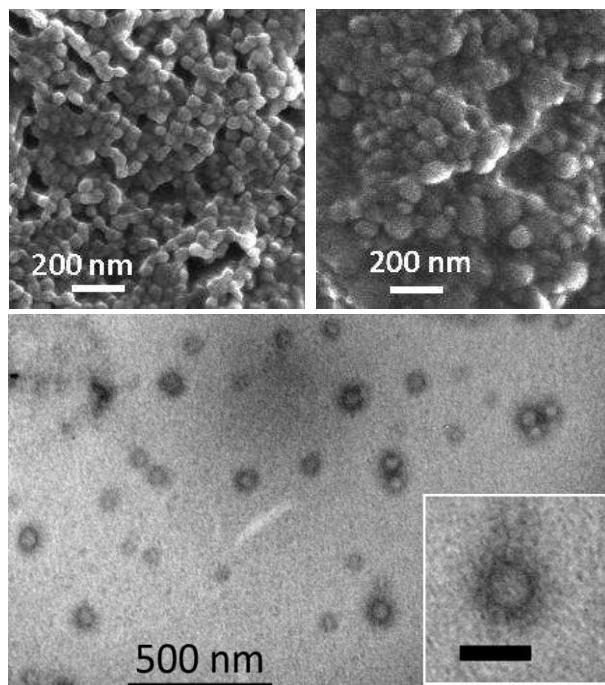


Figure 1: Top: SEM images of PLGA (left) and PLGA-*b*-PEG (right) nanocapsules Bottom: TEM images of PLGA-*b*-PEG nanocapsules with intrinsic negative contrast of the polymer. The insert is a zoom on one capsule (scale bar 100 nm). The PFOB core is surrounded by a cloudy shell.

3.3. Nanocapsule purification

Sodium cholate, a bile salt is obviously tolerable by intestinal cells when given orally but is reported to destabilize cell membranes, and cause hemolysis in the blood at concentration of 1 to 20 mM (Child *et al.* 1986; Ilani *et al.* 1990). An intravenous administration of nanocapsules requires ensuring SC removal. PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsule suspensions were purified by ultracentrifugation to remove SC. The concentration of SC in native suspension and supernatant were measured by UV-

spectrophotometry in H_2SO_4 at 320nm (Table 3). In water, since SC has no chromophore, the molecule cannot be quantified by spectrophotometry. However, when dissolved in concentrated sulfuric acid solution, dehydration of the alcohol functions occurs, giving alkene functions. Thanks to the double bonds, quantification by spectrophotometry is made possible.

Table 3 : SC Concentration, calculated from the measured absorbance at 320 nm, in the just prepared suspensions of PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules and in their supernatants collected after ultracentrifugation. Data correspond to mean \pm SD, n=3.

		[SC] (mM)
Suspension	PLGA-PEG	29.01 ± 1.28
	PLGA	28.94 ± 0.28
Supernatant	PLGA-PEG	29.15 ± 1.02
	PLGA	28.80 ± 0.12

Sodium cholate was efficiently removed by this method since $99.45 \pm 1\%$ (PLGA-*b*-PEG) and $99.55 \pm 1\%$ (PLGA) of the initial amount in suspension, is recovered in the supernatant. The remaining SC, $[\text{SC}] \leq 0.15$ mM, can be neglected. It is very close to the detection limit of UV spectrophotometry, around 10^{-4} M, 10 times lower than reported haemolytic dose (Child *et al.* 1986; Ilani *et al.* 1990).

After purification, PLGA-*b*-PEG nanocapsules preserve both their size and low polydispersity (Table 2). No aggregation occurs during the centrifugation, probably thanks to steric repulsions of PEG chains. After purification, PLGA-*b*-PEG nanocapsules zeta potential decreases from -15.6 mV to -29.3 mV, since surface charges are no longer screened by the concentrated sodium cholate. Indeed, when the same initial amount of SC is added to the purified formulation, the zeta potential recovers almost perfectly its initial value ($\zeta = -15.9$ mV). For PLGA nanocapsules, size increases from 130.4 ± 3 nm to 175.1 ± 0.2 nm and the zeta potential becomes neutral ($\zeta = -0.02$ mV) due to the presence of residual PVA chains on nanocapsule surface, as already observed (Diaz-Lopez *et al.* 2010; Essa *et al.* 2010). Strong interaction by hydrogen bonding between PVA and PLGA are favoured during incubation.

3.4. Stability

PLGA copolymers are known for their biodegradability and biocompatibility. The degradation is characterized by random hydrolytic scission of the polyester backbone. The higher the glycolide content, the faster the degradation. For PLGA 50:50, final products: lactic and glycolic acids are detected from the first day in the medium (Zweers *et al.* 2004). In this case, *in vitro* degradation of PLGA-*b*-PEG nanocapsules was assessed by following the size and PFOB content variations in PBS buffer (pH=7.4) at 37°C (Figure 2). At the beginning of the study, nanocapsules are slightly bigger than reported in table 2, $d_H = 154 \pm 2$ nm. This increase in size can be explained by a higher swelling of

the shell due to formation of carboxylic acid and hydroxyl groups among PLGA in PBS. Then the size remains almost constant for 120 h. Small variations of the PFOB concentration occur during the first 48h. Between 48 h and 120 h, drop of the PFOB content and appearance of aggregates in the suspensions, evidence the disintegration of the nanocapsules. Considering the relative loss of PFOB, it can be estimated that only around 11% of nanocapsules are destroyed after 120h, the remaining ones preserve their sizes.

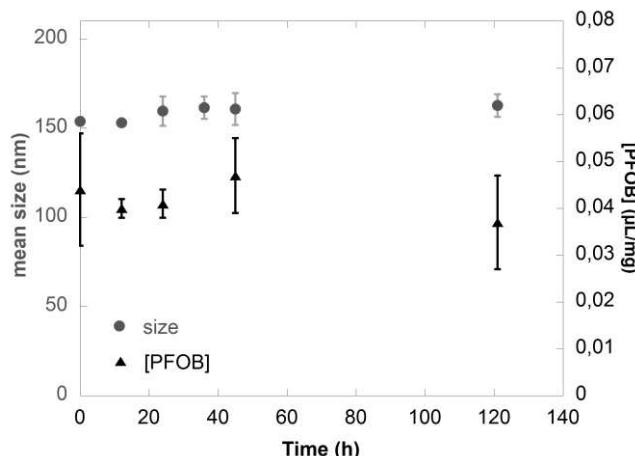


Figure 2: Evolution of size and PFOB concentration during the incubation of PLGA-PEG nanocapsules in PBS buffer at 37°C.

3.5. Nanocapsule PE Gylation

To ascertain the presence of PEG moieties on PE Gyated nanocapsule surface, XPS experiments were performed. The high resolution C1s region was recorded and peak fitted for the raw polymers PLGA and PLGA-*b*-PEG, as references and for nanoparticles of both types. Some of the parameters were set during peak fitting. First the binding energy positions of peaks were located according to the literature (Jeong *et al.* 2000; Essa *et al.* 2010). Secondly, the intensities of ester and methine peaks were strained to be equal, since PLGA 50:50 comprises both functions in the same proportion (Shakesheff *et al.* 1997). PLGA spectra indicates 3 distinct peaks namely aliphatic carbon (C-C) at 285 eV, methine carbon (O=C-C*-O) at 287.0 eV and ester carbon (O=C-O) at 289.2 eV. Meanwhile 4 C1s peaks appear on the PLGA-*b*-PEG spectra, the additional peak resulting from an ether group (C-O) at 286.2 eV, characteristic of PEG (Figure 3). The insertion of this fourth peak slightly shifts the peak binding energies of methine and ester carbons to higher energies, respectively 287.3 eV and 289.4 eV. We obtained excellent agreement between experimental and curve fit data for the raw PLGA-*b*-PEG polymer. For the PLGA-*b*-PEG nanoparticles, the half-height width of peaks is larger, enlightening the amorphous state of the polymeric shell. Table 4 summarizes atomic composition for the C1s peak fitting results. Considering the chemical formula of the used $\text{PLGA}_{346}\text{-}b\text{-PEG}_{114}$, the theoretical value of the ratio between atomic percentages of ether carbon and ether and ester carbons taken together, is 24.8%. The experimental value is 26.2%. The small difference may be explained by the

rather high polymolecularity of the copolymer. This ratio is increased to 38.1% for the PLGA-*b*-PEG nanoparticles. Ether functions enrichment reveals that PEG chains are surface oriented in the case of nanoparticles (Dong *et al.* 2004). This is probably occurring during the emulsion-evaporation process. As the PLGA-*b*-PEG reaches its solubility limit in methylene chloride, it migrates to the interface and exposes the hydrophilic PEG moieties toward the aqueous phase (Pisani *et al.* 2009). Assuming all PEG chains are present at nanocapsule surface, the available surface for each PEG chain, S^{PEG} , can be

$$\text{evaluated as follows: } S^{PEG} = \frac{m_{NC} S_{sp}^{NC}}{N_{PEG}} \quad \text{and} \quad S_{sp}^{NC} = \frac{6}{d_H \rho}$$

where m_{NC} is the weight of nanocapsules obtained at the end of the process ($m_{NC}=140$ mg), N_{PEG} is the total number of PEG chains in the final formulation, easily calculated from m_{NC} and $\eta_{encaps}=85\%$, S_{sp}^{NC} is the specific surface area of nanocapsules estimated from d_H , the hydrodynamic diameter of nanocapsule ($d_H=120$ nm) and ρ , the density of nanocapsule, measured by densimetry, $\rho = 1.5$ g/cm³. Finally, one PEG chain occupies an area of around 5 nm² at nanocapsule surface. This value is very close to 2 nm², which is considered as the optimal surface to ensure minimal adsorption of opsonins (Vittaz *et al.* 1996).

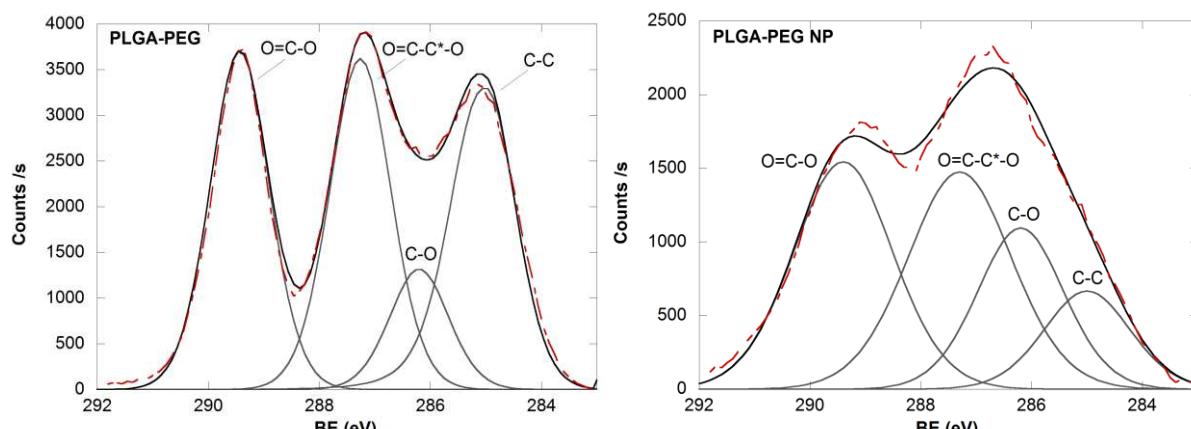


Figure 3: High resolution XPS spectra of C1s region for the raw PLGA-*b*-PEG polymer (left) and the corresponding nanoparticles (right). Red dashed line corresponds to experimental data whereas black full lines represent the fits.

Table 4 : Relative atomic percentages from the area under the curves of fitted peaks, whose positions in binding energy appear in the brackets.

	Atomic % of C1s, high resolution			
	Aliphatic C-C	Ether C-O	Methine O=C-C*-O	Ester O=C-O
PLGA	16.60 (285 eV)	0	41.70 (287.0 eV)	41.70 (289.2 eV)
PLGA NPs	19.75 (285 eV)	0	40.42 (287.0 eV)	39.83 (289.2 eV)
PLGA- <i>b</i> -PEG	29.69 (285 eV)	10.54 (286.2 eV)	30.03 (287.3 eV)	29.73 (289.4 eV)
PLGA- <i>b</i> -PEG NPs	12.55 (285 eV)	20.61 (286.2 eV)	33.42 (287.3 eV)	33.42 (289.4 eV)

3.6. Evaluation of complement activation

The complement system ensures the innate immune response, which consists in non-specific recognition of foreign bodies (i.e. opsonisation). Complement activation cascade is complex and consists in a chain of bio-chemical reactions (Law *et al.* 1997; Moghimi *et al.* 2011). One triggering factor is the binding and the conformational changes of the plasma protein C3. The native form is then cleaved into two fragments: C3a and C3b. 2D immunoelectrophoresis was used to compare the relative amount of these three species after incubation of PEGylated and plain nanocapsules in serum. The capacity of the different nanocapsules to trigger complement activation was evaluated. The influence of the surface area (A/ 1000 and B/ 2000cm²) was studied by changing the concentration of nanocapsules in the incubated serum. The four gels obtained (Figure 4) show the presence of two peaks. The higher one, on the left side corresponds to the native C3 protein, while the large double peak on the right side reveals the activation of the protein with production of the two smaller fragments: C3a and C3b.

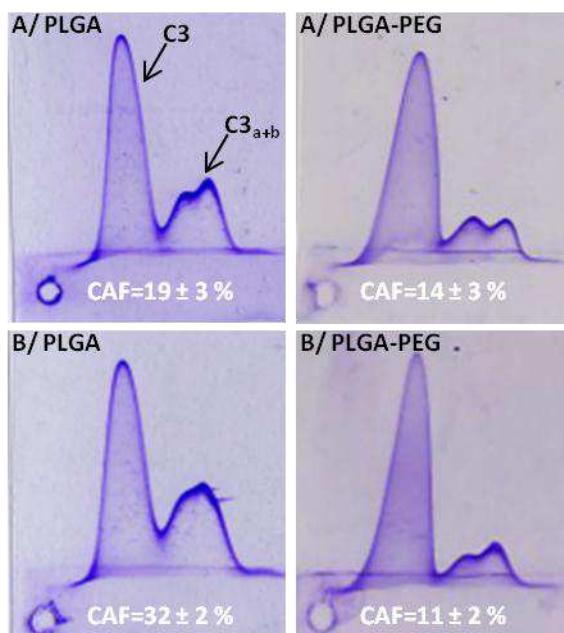


Figure 4 : Profiles of complement activation for PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules as revealed by 2D electrophoresis of C3 antigen and their corresponding CAF values. Concentrations of nanocapsules were chosen to obtain a surface area of A/ 1000 cm² and B/ 2000 cm².
 $CAF=C3_{a+b}/(C3+C3_{a+b})$.

At low surface area (1000 cm²), the two types of nanocapsules induce a similar and weak activation of the complement activation, evidenced on the electrophoregram by a larger C3 peak as compared with C3a and C3b. One obtains a CAF value of 19 ± 3 % for PLGA and an even lower one for PLGA-*b*-PEG: CAF=14 ± 3 %. Since the CAF difference is of the same order of magnitude as the experimental error, around 5 %, the two types of nanocapsules cannot really be distinguished (Vauthier *et al.* 2011). The residual PVA coating on PLGA nanocapsules might protect plasma protein

adsorption by steric repulsion (Arima *et al.* 2010). At higher surface area (2000 cm^2), the difference between PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules becomes clearer. On one hand, PLGA-*b*-PEG activation remains very low (CAF=11 ± 2 %). On the other hand, for PLGA, the right peak increases noticeably and the activation is moderate (CAF value is 32 ± 2 %).

Low activation of PEGylated nanocapsules, even at very high concentration ($S_{\text{spé}} \sim 2000 \text{ cm}^2$ $C_{\text{NC}} = 66.7 \text{ mg/mL}$) is noticeable. From a complement activation point of view, PEG coverage is more efficient than PVA coating. The hydrophilic chains probably adopt a brush conformation and prevent serum protein adsorption more efficiently. Since the *in vitro* evaluation of complement activation is considered to be predictive of the *in vivo* fate of nanocapsules after intravenous administration (Vonarbourg *et al.* 2006): PLGA-*b*-PEG nanocapsules should therefore be more stealth than PLGA ones.

3.7. In Vivo ^{19}F Magnetic Resonance Imaging

3.7.1. Kinetic study

In vivo ^{19}F MR imaging was performed in four mice after intravenous injection of PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules. After 4 hours, both types of nanocapsules are mainly accumulated in the spleen and liver (data not shown). Since the chosen MRI sequence does not allow any observation of the vascular compartment, the ^{19}F signal only arises from the immobilized nanocapsules in the tissues (Giraudeau *et al.* 2012). Liver and spleen uptake kinetics were studied in more details for the first 90 minutes after intravenous injection.

For the spleen, kinetic profiles for PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules do not follow any characteristic trend and interanimal variability is high (data not shown). This probably arises from the complex mechanism of spleen capture and the numerous functions of the organ (erythrocyte conditioning and maintenance, platelet storage, immune functions...) which can interfere with each other. In any case, after 90 minutes the fractions of nanocapsules accumulated are 5.3 ± 0.2 % and 5.7 ± 1.7 % for PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules, respectively. These values are very similar for both types of nanocapsules and in agreement with those found for poloxamer coated polystyrene or PHDCA-*b*-PEG nanoparticles of the same size (Demoy *et al.* 1999; Calvo *et al.* 2001). Splenic uptake is often compared to a filtering or a sieving process, particularly effective to remove poorly opsonized antigens, therefore it does not depend on the nanoparticles surface properties (Slatter 2002).

For the liver, the kinetic profiles present less interanimal variability. The fraction of nanocapsules accumulated in the liver increases continuously as a function of time until it reaches a plateau value of 12.5 % of injected dose for PLGA capsules. For PLGA-*b*-PEG capsules, accumulation increases until

16.1 % of the injected dose after 90 minutes but the plateau is probably not reached yet (Figure 5). A two-compartment model was chosen for experimental data fitting, meaning that nanocapsules are transferred from the bloodstream to the liver compartment. The time dependency of the nanocapsule concentration (via PFOB concentration) in the organ is given by the following formula:

$$C_{PFOB}(t) = C_0^{\text{liver}} [1 - \exp(-k_{\text{liver}} t)]$$

The fitted values of C_0^{liver} and k^{liver} are reported in table 5. R values are higher than 0.94 for the 4 mice, confirming the accuracy of the fits.

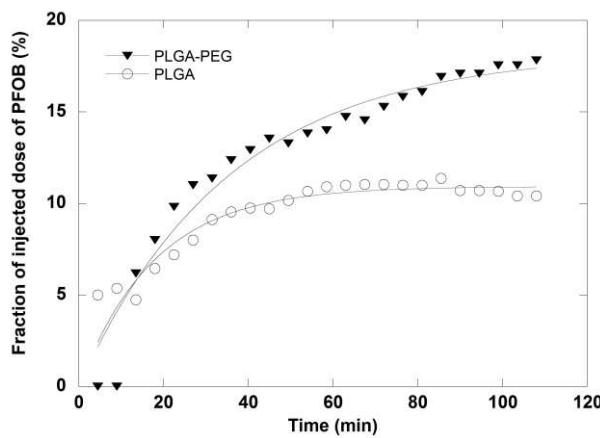


Figure 5: Evolution of the PFOB concentration in the liver, as measured by ^{19}F MRI during the first 90 minutes following the IV administration of PLGA or PLGA-*b*-PEG nanocapsules.

Table 5 : Fitted kinetic parameters for PLGA and PLGA-*b*-PEG nanocapsules in the liver (n=2).

	PLGA	PLGA- <i>b</i> -PEG
C_0^{liver} (Fraction of injected dose)	$12.4 \pm 2.2\%$	$16.1 \pm 3.1\%$
k^{liver} (min^{-1})	0.051 ± 0.008	0.029 ± 0.0008

The half-life absorption constant k^{liver} is calculated as: $t_{1/2} = \ln(2)/k^{\text{liver}}$. PLGA nanocapsules fit yields $t_{1/2}^{\text{PLGA}} = 13.6$ min whereas PEGylated nanocapsules circulate longer with $t_{1/2}^{\text{PLGA-}b\text{-PEG}} = 23.9$ min. These results confirm the efficacy of our strategy for stealthiness. Accumulation occurs in approximately the same time for PLGA nanocapsules as compared to polysaccharide-coated nanoparticles ($t_{1/2}=14\text{min}$) (Lacava *et al.* 2002) or PEGylated PFOB emulsions ($t_{1/2}=11.7\text{min}$) (Giraudieu *et al.* 2012). The rate of liver accumulation is divided by 1.8 for PLGA-*b*-PEG nanocapsules. For PLGA, the liver uptake starts to saturate after one hour whereas nanocapsules keep accumulating after 90 minutes for PLGA-*b*-PEG. Most probably PLGA-*b*-PEG nanocapsules remain in the blood circulation after 90 minutes. These results agreed with the complement activation results.

3.7.2. In vivo tumor imaging

CT26 cells are highly tumorigenic at doses ranging from 10^5 to 4×10^6 cells. Subcutaneously inoculated, they produce well vascularized tumors. Dense angiogenic network was evidenced from day 7 after inoculation (Brattain *et al.* 1980; Beatty *et al.* 2000). *In vivo* ^{19}F MR imaging was achieved in five mice 7 hours after intravenous injection of PLGA (2 mice) and PLGA-*b*-PEG (3 mice) nanocapsules. For PLGA capsules, after 7 hours the fractions of injected dose in the spleen ($1.75 \pm 0.2\%$) and liver ($9.70 \pm 2.5\%$) are lower than values obtained 90 minutes after injection. Nanocapsules accumulated in these organs are progressively eliminated and the circulating fraction probably starts to degrade. On the contrary, for PLGA-*b*-PEG nanocapsules, fractions found in the organs 7 hours after injection are higher than those found 90 minutes after injection: $6.8 \pm 1.9\%$ in the spleen and $18.9 \pm 1.5\%$ in the liver. Nanocapsule elimination from the liver and spleen is compensated by their continuous uptake (Figure 6).

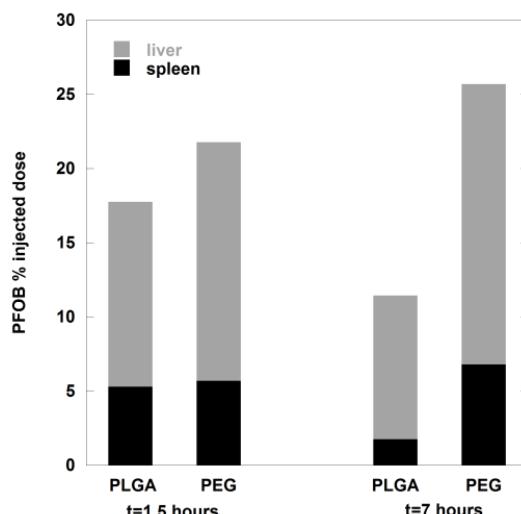


Figure 6: Cumulative PFOB accumulation in the liver and spleen 1.5 hours (left) and 7 hours (right) after nanocapsule injection.

Tumor accumulation confirms these results. For PLGA nanocapsules, the ^{19}F signal in the tumor does not exceed the background noise arising from the rest of the viscera. The detection limit was evaluated to be $C_{\text{PFOB}}=0.04\text{ mM}$ for 35 minutes of acquisition. For PLGA-*b*-PEG nanocapsules the intensity is weak in the tumor but the concentration of PFOB could be quantified: $C_{\text{PFOB}}= 0.19 \pm 0.02\text{ mM}$ (Figure 7), corresponding to about 1 % of the injected dose ($n=2$), of the same order of what is usually observed (Oyewumi *et al.* 2004; Lu *et al.* 2011).

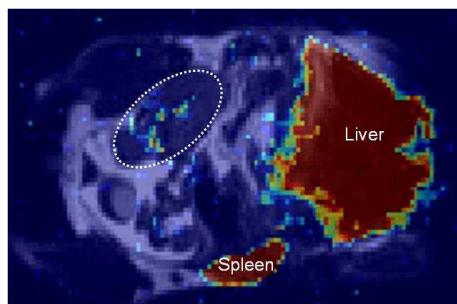


Figure 7 : ^{19}F MR image superimposed with anatomical ^1H MR image of a tail-head longitudinal cross section of a mouse 7 hours after intravenous injection of PLGA-*b*-PEG nanocapsules for a tumor of 720 mm^3 (white dotted circles).

Altogether, these results prove the efficacy of PEGylation to increase the residence time of nanocapsules in the blood stream, allowing them to reach tumors by EPR effect.

4. Conclusion

Encapsulation of PFOB with PEGylated nanocapsules of PLGA-*b*-PEG has been optimized by the solvent emulsion-evaporation method, leading to nanocapsules of about 120 nm with a high yield of encapsulation of PFOB around 80%. The PEG coverage seems rather dense allowing low complement activation *in vitro*. ^{19}F -MRI was used to follow the liver and spleen accumulation and revealed that PEGylated nanocapsules were circulating longer than their plain counterparts ($t_{1/2}^{\text{PLGA}}=13.6$ min and $t_{1/2}^{\text{PLGA-}b\text{-PEG}}=23.9$ min). This enhanced circulation time was further confirmed by the ability to detect implanted tumors 7 hours after PEGylated nanocapsule intravenous injection. These PEGylated nanocapsules appear promising for detecting tumors using the EPR effect using ^{19}F -MRI. Future studies will focus on nanocapsule accumulation as a function of tumor growth stage and the imaging time post-injection.

Acknowledgements

Authors acknowledge financial support from Fondation de l’Avenir (ET9-545). Authors would like to thank M-F Trichet for access to the SEM facility (ICMPE, Thiais, France), D Jaillard for TEM experiments, E. Morvan for her help with ^{19}F NMR spectroscopy, and N. Mignet and J. Seguin for providing fruitful advice for tumor growth. Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H. and Morel, P. A. "In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells." *Nat Biotechnol* 23(8): 983-987 (2005)
- Arima, Y., Kawagoe, M., Furuta, M., Toda, M. and Iwata, H. "Effect of swelling of poly(vinyl alcohol) layers on complement activation." *Biomaterials* 31(27): 6926-6933 (2010)
- Beatty, G. L. and Paterson, Y. "IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen." *Journal of Immunology* 165(10): 5502-5508 (2000)
- Brattain, M. G., Strobel-Stevens, J., Fine, D., Webb, M. and Sarrif, A. M. "Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties." *Cancer Research* 40(7): 2142-2146 (1980)
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaele, D., D'Angelo, J., Noel, J. P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J. P. and Couvreur, P. "Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery." *Pharm Res* 18(8): 1157-1166 (2001)
- Caruthers, S. D., Neubauer, A. M., Hockett, F. D., Lamerichs, R., Winter, P. M., Scott, M. J., Gaffney, P. J., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. "In vitro demonstration using ¹⁹F magnetic resonance to augment molecular imaging with paramagnetic perfluorocarbon nanoparticles at 1.5 Tesla." *Investigative Radiology* 41(3): 305-312 (2006)
- Castro, C. I. and Briceno, J. C. "Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials." *Artif Organs* 34(8): 622-634 (2010)
- Child, P. and Rafter, J. "Calcium enhances the hemolytic action of bile salts." *Biochim Biophys Acta* 855(3): 357-364 (1986)
- Dalwadi, G. and Sunderland, V. B. "Purification of PEGylated nanoparticles using tangential flow filtration (TFF)." *Drug Dev Ind Pharm* 33(9): 1030-1039 (2007)
- Demoy, M., Andreux, J. P., Weingarten, C., Gouritin, B., Guilloux, V. and Couvreur, P. "Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics." *Pharm Res* 16(1): 37-41 (1999)
- Dhar, S., Gu, F. X., Langer, R., Farokhzad, O. C. and Lippard, S. J. "Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45): 17356-17361 (2008)
- Diaz-Lopez, R., Libong, D., Tsapis, N., Fattal, E. and Chaminade, P. "Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluoroctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector." *J Pharm Biomed Anal* 48(3): 702-707 (2008)
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N., Libong, D., Chaminade, P., Connan, C., Chehimi, M. M., Berti, R., Taulier, N., Urbach, W., Nicolas, V. and Fattal, E. "Phospholipid decoration of microcapsules containing perfluoroctyl bromide used as ultrasound contrast agents." *Biomaterials* 30(8): 1462-1472 (2009)
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N., Santin, M., Bridal, S. L., Nicolas, V., Jaillard, D., Libong, D., Chaminade, P., Marsaud, V., Vauthier, C. and Fattal, E. "The performance of PEGylated nanocapsules of perfluoroctyl bromide as an ultrasound contrast agent." *Biomaterials* 31(7): 1723-1731 (2010)
- Dong, Y. C. and Feng, S. S. "Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs." *Biomaterials* 25(14): 2843-2849 (2004)
- Essa, S., Rabanel, J. M. and Hildgen, P. "Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75(2): 96-106 (2010)
- Gao, Z., Kennedy, A. M., Christensen, D. A. and Rapoport, N. Y. "Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy." *Ultrasonics* 48(4): 260-270 (2008)
- Giraudeau, C., Djemai, B., Ghaly, M. A., Boumezbeur, F., Meriaux, S., Robert, P., Port, M., Robic, C., Le Bihan, D., Lethimonnier, F. and Valette, J. "High sensitivity ¹⁹F MRI of a perfluoroctyl

- bromide emulsion: application to a dynamic biodistribution study and oxygen tension mapping in the mouse liver and spleen." *Nmr in Biomedicine* 25(4): 654-660 (2012)
- Giraudeau, C., Flament, J., Marty, B., Boumezbeur, F., Meriaux, S., Robic, C., Port, M., Tsapis, N., Fattal, E., Giacomini, E., Lethimonnier, F., Le Bihan, D. and Valette, J. "A New Paradigm for High-Sensitivity F-19 Magnetic Resonance Imaging of Perfluorooctylbromide." *Magnetic Resonance in Medicine* 63(4): 1119-1124 (2010)
- Gomez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A. and Fattal, E. "Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles." *Int J Pharm* 331(2): 153-159 (2007)
- Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R. H., Verbavatz, J. M. and Langer, R. "The Controlled Intravenous Delivery of Drugs Using Peg-Coated Sterically Stabilized Nanospheres." *Advanced Drug Delivery Reviews* 16(2-3): 215-233 (1995)
- Ilani, A. and Granoth, R. "The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts." *Biochim Biophys Acta* 1027(2): 199-204 (1990)
- Jeong, J. H., Lim, D. W., Han, D. K. and Park, T. G. "Synthesis, characterization and protein adsorption behaviors of PLGA/PEG di-block co-polymer blend films." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 18(3-4): 371-379 (2000)
- Kazatchkine, M., Hauptmann G., U.E. Nydegger. "Techniques du complément". Paris (1986)
- Labarre, D., Vauthier, C., Chauvierre, C., Petri, B., Muller, R. and Chehimi, M. M. "Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush." *Biomaterials* 26(24): 5075-5084 (2005)
- Lacava, L. M., Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Chaves, S. B., Garcia, V. A. P., Silva, O., Pelegrini, F., Buske, N., Gansau, C., Da Silva, M. F. and Morais, P. C. "Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252(1-3): 367-369 (2002)
- Law, S. K. and Dodds, A. W. "The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4." *Protein Science* 6(2): 263-274 (1997)
- Lemarchand, C., Gref, R., Passirani, C., Garcion, E., Petri, B., Muller, R., Costantini, D. and Couvreur, P. "Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems." *Biomaterials* 27(1): 108-118 (2006)
- Lu, P. L., Chen, Y. C., Ou, T. W., Chen, H. H., Tsai, H. C., Wen, C. J., Lo, C. L., Wey, S. P., Lin, K. J., Yen, T. C. and Hsieue, G. H. "Multifunctional hollow nanoparticles based on graft-diblock copolymers for doxorubicin delivery." *Biomaterials* 32(8): 2213-2221 (2011)
- Mattrey, R. F., Brown, J. J., Shelton, R. E., Ogino, M. T., Johnson, K. K. and Mitten, R. M. "Use of Perfluorooctylbromide (Pfob) to Detect Liver-Abscesses with Computed-Tomography - Safety and Efficacy." *Investigative Radiology* 26(9): 792-798 (1991)
- Moghimi, S. M., Andersen, A. J., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L. and Hunter, A. C. "Material properties in complement activation." *Adv Drug Deliv Rev* 63(12): 1000-1007 (2011)
- Mosbach, E. H., Kalinsky, H. J., Halpern, E. and Kendall, F. E. "Determination of deoxycholic and cholic acids in bile." *Arch Biochem Biophys* 51(2): 402-410 (1954)
- Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. and Allemann, E. "Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods." *International Journal of Pharmaceutics* 250(2): 327-337 (2003)
- Oyewumi, M. O., Yokel, R. A., Jay, M., Coakley, T. and Mumper, R. J. "Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice." *J Control Release* 95(3): 613-626 (2004)
- Pamula, E., Kokoszka, J., Cholewa-Kowalska, K., Laczka, M., Kantor, L., Niedzwiedzki, L., Reilly, G. C., Filipowska, J., Madej, W., Kolodziejczyk, M., Tylko, G. and Osyczka, A. M. "Degradation, Bioactivity, and Osteogenic Potential of Composites Made of PLGA and Two Different Sol-Gel Bioactive Glasses." *Annals of Biomedical Engineering* 39(8): 2114-2129 (2011)

- Park, J., Fong, P. M., Lu, J., Russell, K. S., Booth, C. J., Saltzman, W. M. and Fahmy, T. M. "PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin." *Nanomedicine* 5(4): 410-418 (2009)
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V. and Tsapis, N. "Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluoroctyl bromide: influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface." *J Colloid Interface Sci* 326(1): 66-71 (2008)
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E. and Tsapis, N. "Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG." *Soft Matter* 5(16): 3054-3060 (2009)
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B. T., Beloeil, J. C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S. L. and Fattal, E. "Perfluoroctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging." *Advanced Functional Materials* 18(19): 2963-2971 (2008)
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. and Fattal, E. "Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization." *Langmuir* 22(9): 4397-4402 (2006)
- Sanson, C., Schatz, C., Le Meins, J. F., Brulet, A., Soum, A. and Lecommandou, S. "Biocompatible and biodegradable poly(trimethylene carbonate)-b-poly(L-glutamic acid) polymersomes: size control and stability." *Langmuir* 26(4): 2751-2760 (2010)
- Shaffer, T. H. and Wolfson, M. R. "Liquid ventilation: an alternative ventilation strategy for management of neonatal respiratory distress." *Eur J Pediatr* 155 Suppl 2: S30-34 (1996)
- Shakesheff, K. M., Evora, C., Soriano, I. and Langer, R. "The adsorption of poly(vinyl alcohol) to biodegradable microparticles studied by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS)." *Journal of Colloid and Interface Science* 185(2): 538-547 (1997)
- Slatter, D., Ed. (2002). Texbook of small animal surgery, Elsevier.
- Srinivas, M., Cruz, L. J., Bonetto, F., Heerschap, A., Figdor, C. G. and de Vries, I. J. "Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging." *Biomaterials* 31(27): 7070-7077 (2010)
- Tressaud, A., Haufe, G. . "Fluorine and Health", Elsevier (2008)
- Vauthier, C., Persson, B., Lindner, P. and Cabane, B. "Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles." *Biomaterials* 32(6): 1646-1656 (2011)
- Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Verrecchia, T., Veillard, M., Puisieux, F. and Labarre, D. "Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators." *Biomaterials* 17(16): 1575-1581 (1996)
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C. and Benoit, J. P. "Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78(3): 620-628 (2006)
- Wang, L. S., Zhang, Z. P., Chen, H. C., Zhang, S. L. and Xiong, C. D. "Preparation and characterization of biodegradable thermoplastic Elastomers (PLCA/PLGA blends)." *Journal of Polymer Research* 17(1): 77-82 (2010)
- Waters, E. A., Chen, J. J., Allen, J. S., Zhang, H. Y., Lanza, G. M. and Wickline, S. A. "Detection and quantification of angiogenesis in experimental valve disease with integrin-targeted nanoparticles and 19-fluorine MRI/MRS." *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 10: - (2008)
- Wootton, S. L., Coley, B. D., Hilton, S. V., Edwards, D. K., Amberg, J. R. and Mattrey, R. F. "Value of Brominated Fluorocarbons for the Radiographic Diagnosis of Small-Bowel Obstruction - Comparison with Other Contrast Agents in Rats." *American Journal of Roentgenology* 161(2): 409-416 (1993)
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. "Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size." *Cancer Research* 55(17): 3752-3756 (1995)

Zweers, M. L., Engbers, G. H., Grijpma, D. W. and Feijen, J. "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)." *J Control Release* 100(3): 347-356 (2004)

Chapitre 2

Optimisation de la morphologie des capsules pour l'imagerie ultrasonore

L'échographie est une technique d'imagerie moins sensible que l'IRM du ^{19}F . C'est pourquoi, pour une même quantité de nanocapsules, accumulée dans la tumeur, aucune augmentation du contraste n'est constatée sur les images obtenues avec un échographe clinique, alors qu'un signal apparaissait en IRM du Fluor (Chapitre 1). A ce stade du projet, il était donc indispensable de reconsidérer la formulation pour essayer d'adapter les caractéristiques physico-chimiques aux propriétés acoustiques des nanocapsules afin d'augmenter l'échogénicité de ces dernières. En suivant la même stratégie que celle élaborée par Emilia Pisani avec des capsules de PLGA/PFOB, nous avons essayé de modifier l'épaisseur de la coque de PLGA-*b*-PEG pour moduler la compressibilité globale des nanocapsules. Pour des capsules plus compressibles, la diffusion passive est accentuée, comme le démontre l'expression de la section efficace de diffusion (travaux antérieurs 2.1.1). La diffusion active est aussi renforcée par une meilleure élasticité de la coque polymère. La caractérisation physico-chimique des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG, débutée dans le chapitre 1, a été ici approfondie grâce aux techniques de diffusion des neutrons aux petits angles, spectroscopie par résonance magnétique du Fluor et microscopie électronique à transmission, après cryofixation de l'échantillon (Cryo-MET). Ceci nous a permis de mieux comprendre et décrire le mécanisme de formation des nanocapsules par émulsion-évaporation. Enfin, la réponse acoustique a été évaluée *in vitro* grâce à un dispositif expérimental d'ultrasonographie hautes fréquences.

Selon les résultats, il apparaît impossible de modifier l'épaisseur des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG. Lorsque la concentration en polymère est faible, un probable démoillage du film de polymère survient à l'interface PFOB/eau, à la fin de l'évaporation. Ce phénomène tend à privilégier la formation de gouttes isolées de PFOB, stabilisées par le tensioactif (SC), plutôt que de nanocapsules à coques plus fines. Cet échec ne doit pas remettre en cause l'utilisation des nanocapsules pour l'imagerie ultrasonore des tumeurs. En effet, hors du cadre clinique actuel, c'est-à-dire pour les hautes fréquences, les nanocapsules possèdent des propriétés tout-à-fait intéressantes en termes d'intensité rétro-diffusée. Pour cette nouvelle technique, le seuil de sensibilité serait abaissé ce qui laisse envisager une meilleure détection d'une quantité, même faible, accumulée dans la tumeur.

**Formulation optimization of PEGylated nanocapsules
of perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents:
impact on their acoustic response.**

Odile Diou^{1,2}, Sara Jafari³, Thomas Payen³, Sharon Lori Bridal³, Annie Brûlet⁴, Gérard Pehau-Arnaudet⁵, Estelle Morvan⁶, Romain Berti³, Ksenia Astafyeva³, Nicolas Taulier³, Delphine Le Guillou³, Elias Fattal^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}

¹ Univ Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³ UPMC, Paris 6, Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623, Paris, France

⁴ Laboratoire Léon Brillouin, UMR12 CEA-CNRS, CEA Saclay, Gif sur Yvette, F-91191, France

⁵ Institut Pasteur, Plateforme de Microscopie Ultrastructurale de l'Institut Pasteur UMR3528

⁶ BioCIS, Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8076, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France

Abstract

PLGA-*b*-PEG nanocapsules containing a liquid core of perfluorooctyl bromide (PFOB) were synthesized by an emulsion-evaporation process and designed as ultrasound contrast agents (UCAs). PEGylated nanocapsules were intravenously injected to mice bearing CT26-allograft to image the tumor using a low frequency ultrasound device (7-14 MHz). The absence of significant contrast enhancement in the diseased area prompted us to evaluate two optimization strategies. The first strategy consists in modifying the formulation by varying the initial amount of polymer. The morphology of PEGylated nanocapsules was studied by electronic microscopy, Small Angle Neutron Scattering and ¹⁹F NMR spectroscopy and related to the acoustic properties of the nanocapsules to allow a better understanding of their formation mechanism. We show that using PLGA-*b*-PEG, it is impossible to tune the polymeric shell thickness of the UCA, most probably due to dewetting of the polymer layer at the PFOB/water interface for low polymer concentration. The second strategy was to evaluate nanocapsule acoustic response at high frequencies. Fruitful results were obtained *in vitro* in the 20-40 MHz range. The combination of these nanocapsules and high-frequency detection appears as a promising approach for *in vivo* tumor detection.

Keywords: Nanocapsules; Perfluorooctyl bromide; Ultrasonography; High Frequency Ultrasounds; Small Angle Neutron Scattering

1. Introduction

Contrast ultrasound imaging is a compelling technique as it is cost-effective, portable, provides real-time anatomical and molecular information and may be used in combination with therapy. Hence, it is the most worldwide used technique in terms of available devices (Schutt *et al.* 2003). Nevertheless, designing ultrasound contrast agents (UCAs) is complex, especially for tumor detection by passive targeting because antagonist properties are required.

For passive tumor targeting, an ideal ultrasound contrast agent should be smaller than 400 nm to extravasate from the neovessels and accumulate in the diseased tissue, through leaky endothelium. This accumulation occurs by the so-called enhanced permeation and retention (EPR) effect (Yuan *et al.* 1995). However, the small size, favourable for tumor accumulation by the EPR effect, is unfavourable for the acoustic response of the UCAs. Indeed, the more basic approach considers UCAs as passive diffusers. When a particle is insonified, the acoustic diffusion depends on the difference of acoustic velocity, density and absorption between the particle and its environment. In the case of the Born approximation, the larger the contrast agent, the higher the backscattered signal since the effective scattering area is proportional to the radius to the power 6 (Tranquart *et al.* 2007). Therefore, commercial ultrasound contrast agents mainly consist of microbubbles of sizes ranging from 1 to 6 μm (Schneider *et al.* 1995; Fisher *et al.* 2002). Larger UCAs would not be compatible with intravenous administration, since the diameters of blood vessels and lung capillaries are between 6 and 8 μm . Bloch *et al.* compared the acoustic response of nanometer and micrometer scaled UCAs. Polymer shelled nitrogen bubbles of 1.33 μm were shown to be more responsive to a train of acoustic pulses than their 740 nm counterparts (Bloch *et al.* 2005). Despite the benefits of large UCAs, several groups demonstrated satisfying echogenicity of sub-micronic UCAs *in vitro*, having a proper size for tumor targeting. Liu *et al.* observed an increase of 22 % of the average greyscale with antibody-targeted PLA nanoparticles (250nm), using conventional ultrasound B-mode imaging (Liu *et al.* 2007). Mendoza-Munoz *et al.* reached 15 dB enhancement with polymeric nanobubbles of 370 nm using a laboratory-build set-up at 10MHz (Nestor *et al.* 2011).

The choice of the shell material also influences the acoustic response. Lipidic surfactants or proteins were initially chosen because they create a soft membrane, which can undergo compression and dilatation phenomena and increase the backscattered intensity. It has been shown extensively that the more elastic shell, the better the contrast enhancement (Deng *et al.* 1998; Chumakova *et al.* 2008; Wheatley *et al.* 2010). Although, polymeric shells are usually less compressible than their lipidic counterparts, they present a better stability *in vivo* (Klibanov 2007) as well as under ultrasound waves (Nestor *et al.* 2011). In addition, for tumor targeting by the EPR effect, the contrast agent

should remain as long as possible in the blood circulation. Rapoport *et al.* perfectly illustrated the duality between shell elasticity and echogenicity versus good stability and persistence *in vivo*. They showed that nanocapsules prepared with crystalline PCL-*b*-PEG, generated a lower acoustic response at 1 MHz than their more amorphous PDLA-*b*-PEG counterparts. However, 40% of injected PCL-*b*-PEG nanocapsules remained in the blood circulation 6 hours after injection, while there were only 18% of PDLA-*b*-PEG nanocapsules (Rapoport *et al.* 2011).

In addition to UCA size, the effective scattering area is related to compressibility and density difference between the UCA and surrounding medium (Tranquart *et al.* 2007). Air or perfluorinated gases have been used as core materials to enhance the compressibility/density mismatch (Wheatley *et al.* 2006; Anderson *et al.* 2011) while, to ensure stability, liquid perfluorocarbon cores are preferable (Marsh *et al.* 2007) because of their higher resistance to pressure changes and mechanical stress (Dayton *et al.* 2002). Liquid perfluorocarbons present the additional advantage of allowing bimodal imaging by ¹⁹F MRI and ultrasonography (Pisani *et al.* 2008; Diaz-Lopez *et al.* 2010).

Considering all points listed above, our study focuses on the use of stealth UCAs for tumor imaging, consisting on a polymeric shell of PLGA-*b*-PEG, encapsulating a liquid core of PFOB. PLGA is amorphous and elastic and provides echogenicity to the shell. The PEG coverage promotes stability and prolonged circulation *in vivo*, while the PFOB core should further enhance the difference of the acoustic impedance between the UCA and the surrounding medium. Nanocapsules were imaged *in vivo* in mice using clinical ultrasound device. Two strategies were then developed to enhance the contrast in the tumor. The first one consisted in the optimization of the nanocapsule formulation. The morphology of PEGylated UCAs was studied by electronic microscopy, neutron scattering and ¹⁹F NMR spectroscopy and related to the acoustic properties of UCAs at low frequencies. In the second strategy, PEGylated nanocapsules acoustic response was evaluated *in vitro* at high frequencies to assess the potential of this technique for future *in vivo* experiments.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Methylene chloride (CH_2Cl_2) RPE-ACS 99.5% was provided by Carlo Erba Reactifs (France). D_2O and Trifluoro Acetic Acid (TFA) were provided by Sigma Aldrich (France). Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(DL-lactide-*co*-glycolide) 50:50 Resomer RGP d 50105 (intrinsic viscosity 0.72 dl/g ; PLGA $M_n=45\,000$ g/mol containing 10 wt% of PEG $M_n=5\,000$ g/mol) was obtained from Boehringer-Ingelheim (Germany). Sodium cholate (SC) was purchased from Sigma-Aldrich. Perfluorooctyl bromide (PFOB) was purchased from Fluorochim (UK). Water was purified using a using a RIOS/Synergy system from Millipore (France). NMR sample tube and coaxial insert were purchased from CortecNet (France).

2.2. Sample Preparation

Polymeric nanocapsules of PFOB were prepared by an emulsion-evaporation process described in details previously (Diou *et al.* 2012). Briefly, PLGA-*b*-PEG (from 60 mg to 100 mg) was dissolved into 4 mL of methylene chloride along with 60 μL of PFOB. The organic phase was emulsified into 20 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1min and then a vibrating metallic tip (IBP7677, Ultrasons, Annemasse, France) at 180V, for 1 min over ice. Solvent was evaporated by magnetic stirring. The native suspensions of nanocapsules were filtrated through 0.45 μm PVDF filters and if necessary, were purified by ultracentrifugation for 1 hour, at $T= 4^\circ\text{C}$ and at 27 440g (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter) to remove sodium cholate. The pellet was finally resuspended in water to the desired concentration. The nanocapsules differed from the initial weight of polymer: 100 mg, 80 mg and 60 mg, they will be noted respectively NC100, NC80 and NC60. Nanoparticles (NP) were prepared by the same process using 100 mg of PLGA-*b*-PEG but omitting the PFOB. Conversely, emulsion of PFOB was prepared by omitting the polymer.

2.3. Compressibility measurements

Nanocapsules (NC100, NC80 and NC60), nanoparticles and emulsion were prepared as described above. Native suspensions of nanocapsules and nanoparticles were filtered but not purified by ultracentrifugation.

2.3.1. Volumetric measurements

The densities of sodium cholate (ρ_0) and nanocapsules/nanoparticles suspensions or emulsion (ρ), were determined at 25°C using a vibrating tube Anton Paar DMA 500M digital densimeter (Graz,

Austria), with a precision of 10^{-5} g/mL. These measurements allow calculating the partial specific volume of nanocapsules/nanoparticles/emulsions (ν^0) by the formula: $\nu^0 = \frac{1}{\rho_0} - \frac{\rho - \rho_0}{\rho_0 C}$ Eq. 1 where C is the concentration of objects.

2.3.2. Ultrasound velocity measurements

Sound velocity measurements of nanocapsules/nanoparticles suspensions and of PFOB emulsion were carried out at 7.5 MHz by analyzing the amplitude – frequency characteristics of an ultrasonic resonator as described previously (Eggers 1992; Eggers *et al.* 1996). We employed an ultrasonic resonator cell with lithium niobate piezotransducers and a minimum sample volume of 0.8 mL. The temperature was controlled by an external water bath and was set at 25°C. For this type of acoustic resonators, the relative precision of sound velocity measurements at frequencies near 7 MHz is at least ± 0.15 cm/s. The analysis of the frequency characteristics of the resonator was performed by an Agilent model E5100 network/spectrum analyzer. The key characteristic of a solute directly derived from ultrasonic velocimetric measurements is the specific sound velocity increment, [u]:

$$[u] = \frac{u_1 - u_0}{u_0 C} \quad \text{Eq. 2}$$

where u_1 and u_0 are the ultrasound velocity in the suspension and in the solvent respectively

The partial specific adiabatic compressibility k_{NC}^0 of nanocapsules is finally deduced from the two previous measurements by the formula: $k_{NC}^0 = \frac{1}{\rho_0 u_0^2} (2\nu^0 - 2[u] - \frac{1}{\rho_0})$ Eq. 3

2.4. Size and Zeta potential

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of the nanocapsules, nanoparticles and emulsion droplets were measured by quasi elastic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Samples were diluted in water. Measurements were performed at 20°C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering. The counting time was set at 60s. Zeta potential measurements were carried out with the same instrument, at 25°C, in 1 mM NaCl. Measurements were performed in triplicate.

2.5. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was performed at CCME (Orsay, France) using a Philips EM208 operating at 80 kV. Purified suspensions of nanocapsules (1 mg/mL) were deposited on copper grids covered with a formvar film (400 mesh) for 2 min. The excess solution was blotted off using filter

paper and grids were air dried before observation. Images were acquired using a high-resolution camera, Advantage HR3/ 12GO4 (AMT-Hamamatsu).

2.6. CryoTEM

Purified nanocapsules (10 mg/mL) were deposited on Quantifoil Grids R2/2 (Quantifoil, Germany). The excess of solution was blotted off for 1.5 s using Whatman n°1 filter paper and the grids were frozen in liquid ethane using Leica EM GP automatic system (Leica, Austria). All samples were observed under low doses conditions on a JEOL 2100F Transmission Electron Microscope operating at 200 kV. Images were recorded on a Gatan US 4000 CCD camera (Gatan, USA) and measured using Gatan DigitalMicrograph.

2.7. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR spectroscopy

The NMR quantitative method using stem coaxial inserts was originally proposed by Henderson for ^{31}P compounds (Henderson 2002). It was adapted here for ^{19}F NMR, with a 5 mm dual probe $^{19}\text{F}/^1\text{H}$, to determine the precise concentration of PFOB directly in the aqueous suspension of nanocapsules. Native, filtrated and freeze dried nanocapsules suspensions were introduced in a usual 5mm-NMR sample tube. A same stem coaxial insert, containing TFA in D_2O as an external standard ($[\text{TFA}]=6.2\mu\text{mol/mL}$), was introduced in the sample tube. The experiment was performed on a Bruker Avance-300 (400 MHz) spectrometer. The total amount of PFOB in the suspension, n , was determined after integration of the peak at -80.8 ppm corresponding to the CF_3 group and normalization by the area of the TFA peak at -73.1 ppm. Absolute encapsulation efficiency η_{abs} was

$$\eta_{abs} = \frac{n}{n_0} \quad \underline{\text{Eq. 4}}$$

where n_0 is the initial amount of PFOB: 60 μL corresponding to $n_0=23.2 \text{ mmol}$.

2.8. Small Angle Neutrons Scattering

2.8.1. SANS data collection

Small Angle Neutron Scattering (SANS) measurements were performed on the PAXE spectrometer of the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEA-Saclay, France) equipped with a two dimension detector made of 64×64 cells of 1cm^2 surface area. We used two configurations: the first one with a sample-to-detector distance of $D = 2.045 \text{ m}$ and a neutron wavelength of $\lambda = 15 \text{ \AA}$ to cover a scattering vector (q) range of 2.7×10^{-3} - $2.7\times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$; the second one with $D=2.045 \text{ m}$ and $\lambda = 6 \text{ \AA}$ to cover a q

range of 6.3×10^{-3} - $7.4 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ or with $D=5 \text{ m}$ and $\lambda = 6 \text{ \AA}$ to cover a q range of 1.7×10^{-2} - $1.7 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Data regroupments were realized using the LLB PASINET software (Brulet *et al.* 2007).

Nanocapsules were filtered, purified and redispersed in the desired mixture of H_2O and D_2O at a final volume fraction of $\Phi_v=1\%$. Two mixtures were used to match or not the scattering length densities of the various components of the core/shell structure and to focus the contrast on selected features. Pure D_2O allowed observing the entire nanocapsule, having a high signal. The 40/60 (v/v) $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mixture matched the scattering length density of the PFOB core and enabled to focus on the polymeric shell along with the surface oriented PEG chains. SANS measurements were performed in 1 mm thick quartz cuvettes to minimize the incoherent scattering. All the scattered intensity curves were corrected from the incoherent background signal of their own dispersant and normalized by the incoherent signal delivered by a 1 mm gap water sample to account for the efficiency of the detector cells. Here we mainly discuss the SANS signal obtained with nanocapsules suspensions in the $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mixture.

2.8.2. SANS data modelling

The model taken to account for the scattering in the matching condition of the PFOB core is the hairy vesicle model developed by Pedersen (Pedersen 2000; Bang *et al.* 2006) to analyse scattering curves of block copolymer micelles of various shapes cores. This analytical model assumes shell radius and thickness with Gaussian distributions and Gaussian chains attached at the surface of the shell. The analysis of SANS data for nanocapsules in contrast matching condition of the core assumes a homogeneous core (PFOB), a shell of PLGA and PEG chains at the surface with fixed scattering length densities: $\rho_{\text{PFOB}}=3.63 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ $\rho_{\text{PLGA}}=\rho_s = 1.92 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ $\rho_{\text{PEG}}=\rho_c=0.57 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$. The form factor of hairy spherical vesicle contains four different terms: the self-correlation term of the shell, the self-correlation term of the chains, the cross-term between the shell and chains, and the cross term between chains. It can be expressed as Equation 5:

$$P_{\text{hairyvesicles}}(q) = \beta_s^2 F_{\text{shell}}(q) + N\beta_c^2 F_{\text{chain}}(q) + 2N\beta_s\beta_c\beta_{sc}(q) + N(N-1)\beta_c^2 S_{cc}(q)$$

Eq. 5

where N is the number of chains attached to the shell surface and β_s and β_c are the total excess scattering length of the shell and of the chains. They can be calculated as $\beta_s = V_s(\rho_s - \rho_{\text{solv}})$ and $\beta_c = V_c(\rho_c - \rho_{\text{solv}})$ respectively, where V_s and V_c are the volume of the shell and chains of radius of gyration R_g . ρ_s and ρ_c are the corresponding scattering length densities and ρ_{solv} is the scattering length density of the surrounding solvent (here a mixture of D_2O and H_2O) .

The normalized self-correlation term ($F_{shell}(q = 0) = 1$) of a vesicle of inner radius R_{core} and thickness T is given by Equation 6:

$$F_{shell}(q) = \frac{(V_{ext}\Phi(qR_{ext}) - V_{int}\Phi(qR_{int}))^2}{(V_{ext} - V_{int})^2} = (A_{shell}(q, R_{core}, T))^2$$

Eq. 6

Where $\Phi(qR) = \frac{3(\sin(qR) - qR \cos(qR))}{(qR)^3}$ $R_{ext} = R + T$ and $R_{int} = R_{core}$

The chains at the shell surface are assumed Gaussian and the self-correlation term is the Debye function (Debye 1947):

$$F_{chain}(q) = \frac{2(\exp(-x) - 1 + x)}{x} \quad x = q^2 R_g^2$$

Eq. 7

The interference term between the shell and the chains is

$$S_{sc}(q) = A_{shell}(q, R_{core}, T) \Psi(q, R_g) \frac{\sin(q(R_{core} + T + R_g))}{q(R_{core} + T + R_g)}$$

Eq. 8

where $A_{shell}(q, R_{core}, T)$ is the scattering amplitude of the shell. The function $\Psi(q, R_g) = \frac{1 - \exp(-x)}{x}$ where $x = q^2 R_g^2$ is the structure factor between chains (Hammouda 1992)

and the third term of the previous equation the scattering amplitude of an infinite thin shell of radius $R + T + R_g$.

The analytical expression of the form factor of hairy vesicle given in Eq. 1 was used to fit the experimental data using fitting routines of MATLAB libraries. The fit yields geometrical parameters of nanocapsules: the mean core radius R_{core} , the polydispersity of the core radius σ_{core} , the thickness of the shell T , the polydispersity of the thickness σ_T , the number of PEG chains N_{PEG} at the surface and the radius of gyration of PEG chains, R_g^{PEG} .

2.9. Acoustic characterization at high frequency

Purified suspensions of nanocapsules or nanoparticles were injected through a cylindrical, 0.4-mm diameter channel in an acoustically transparent gel pad (AquaFlex® ultrasound gel pad, Parker Labs; New Jersey, USA) immersed in filtered and degassed water ($24^\circ C < T < 26^\circ C$) at a controlled rate of 1 mm/s. A Lithium Niobate, 32-MHz center-frequency transducer (8-mm focal length, -20 dB fractional bandwidth) was placed such that the focal zone was centered within the channel. Independent sets of 256-emitted pulses at 20 and 40MHz were acquired 100 times, with 50 ms between each set, to

interrogate spatially independent samples of the suspension. Data were acquired within PRP (Peak Rarefactional Pressure) range from 1.28 to 2.01 MPa. Each backscattered signal was received by the transducer, digitized on an oscilloscope and transferred to a computer for signal processing using MATLAB. The Fourier transform was performed on a 1 μ s Hamming windowed segment of each signal centered at the focal zone of the transducer and padded to 2048-points to estimate the power spectral response. Power spectral densities (PSD) of received signals from the nanocapsule/nanoparticle suspension were normalized by the maximum of the fundamental component of the emitted pulse.

2.10. In vivo ultrasound imaging

A murine colon carcinoma cell line CT26.WT was kindly provided by N. Mignet (Seguin *et al.* 2012). Four, seven-week-old BalbC female mice weighing approximately 20 g were purchased from Harlan (Gannat, France). Animal procedures were in accordance with the recommendations of the EEC (86/609/CEE) and the French National Committee (decree 87/848) for the care and use of laboratory animals. The colon tumor model was established by injecting 5.10^5 cells (in 100 μ L PBS) subcutaneously into the right flank of the animal. Sixteen days after tumor inoculation, PLGA-*b*-PEG nanocapsules were injected intra-tumorally or intravenously through the retro-orbital sinus (50 μ L or 200 μ L, $C_{PFOB}=118$ mM). Directly after the injection and then 4 and 7 hours later, mice were anesthetized with 2 % (v/v) isoflurane in a 30/70 mix of O₂/NO₂ at a rate of 0.8 L per minute. Mice were then maintained under anesthesia with 1 % isoflurane through a mask. *In vivo* tumor imaging was performed using a ACUSON Sequoia 512 ultrasound system (Siemens Medical Solutions, Mountain View, CA, USA) in CPS mode with a broadband 14L7 probe at 7 and 14 MHz.

3. Results and discussion

PLGA/PFOB nanocapsules were previously imaged by ultrasonography in non linear mode (Tissue Harmonic Imaging) in the vena cava of the mouse liver after intravenous injection.(Pisani *et al.* 2008) However, due to their short half-life in the blood stream, these nanocapsules could not be used for tumor detection, as shown by ^{19}F MRI. PLGA was further replaced by PLGA-*b*-PEG copolymer yielding stealth nanocapsules that accumulated in the tumor by the EPR effect. The ^{19}F MRI contrast of the tumor was enhanced, proving nanocapsule potential for this imaging modality (Diou *et al.* 2012). PEGylated nanocapsule potential as UCAs however remained to be investigated. Intratumoral injection was first performed to insure the modification of the polymeric shell, PLGA-*b*-PEG instead of PLGA, did not alter the echogenicity of PFOB-filled nanocapsules. Before injection, the region of interest (ROI) appears dark while it becomes brighter after injection of PEGylated nanocapsules, using a Contrast Pulse Sequencing (CPS) mode (Figure 1).

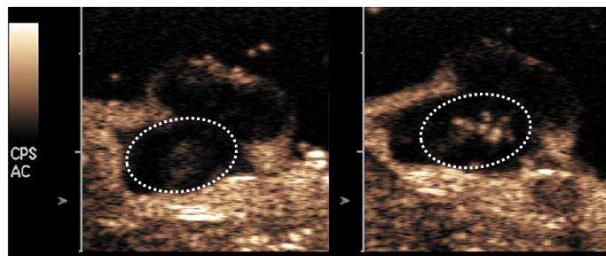


Figure 1: Ultrasound images of CT26 xenograft tumor in mouse obtained in CPS mode. The ROI at the center of the tumor (circled in white) appears dark before injection (left) and presents significant contrast enhancement after capsule injection (right).

PEGylated nanocapsules were further injected intravenously to mice bearing CT26 xenograft tumors. Although acquisition time (0 h, 4 h and 7 h), frequencies (7 and 14 MHz), and mechanical indices (0.6-1.9) were modulated, no significant contrast enhancement was observed in the tumor. PEGylated nanocapsules may not be echogenic enough to be detected at low local concentration (1% injected dose in the tumor) by ultrasonography, thus their design need to be further improved.

The shell contribution to the echogenicity of UCAs has been reported by several researchers (Chumakova *et al.* 2008; Wheatley *et al.* 2010; Rapoport *et al.* 2011). Compression and dilatation phenomena were mainly described for microbubbles but Chumakova *et al.* also observed oscillations with air filled PLGA nanocapsules. These UCA vibrate when they are submitted to an acoustic pressure field and can be considered as active diffusers, i.e. as ultrasonic point sources, which enhance the backscattered intensity. Thus, it is important to carefully choose the shell material as a function of its elastic properties, to promote a mechanic response of UCA to acoustic pressure (Deng

et al. 1998). PLGA has a low Young's Modulus in bulk: 0.63 GPa, (*Choi et al.* 2002) which is probably even lower as we consider 100 nm objects. Indeed Stafford *et al.* demonstrated bulk properties do not necessarily remain identical at nanometer scales and evidenced an order of magnitude decrease of elastic modulus for amorphous polymer films of less than 40 nm thick. (*Stafford et al.* 2006) In addition to the choice of PLGA, thinning the shell of nanocapsules previously allowed increasing the compressibility of UCA and consequently the echogenicity *in vitro* (*Pisani et al.* 2008).

Increasing the echogenicity by making the shell thinner, was considered here as a first strategy to enhance the acoustic response of PEGylated nanocapsules. In addition, PLGA-*b*-PEG is probably more elastic than PLGA since the glass transition temperature T_g , is reduced from 39°C to 27°C, respectively for PLGA and PLGA-*b*-PEG, due to the plasticising effect of PEG chains (*Ngai et al.* 1995; *Plazek et al.* 1995). Prior to emulsification the initial weight of PLGA-*b*-PEG in the organic phase was reduced from 100 mg to 60 mg, keeping the same amount of PFOB. The compressibility was studied as a function of polymer mass. PLGA-*b*-PEG nanoparticles, considered as a reference were found weakly compressible ($0.775 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$). For nanocapsules, the compressibility increased from $2.95 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$ to $4.34 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$ as the initial mass of polymer decreased from 100 mg to 60 mg. This increase of compressibility has already been related to a decrease of thickness to radius ratio for PLGA nano and micro capsules. PEGylated nanocapsules having approximately the same size, $d_h \sim 120 \text{ nm}$, we expect the shell thickness to decrease as the mass of polymer decreases (Figure 2).

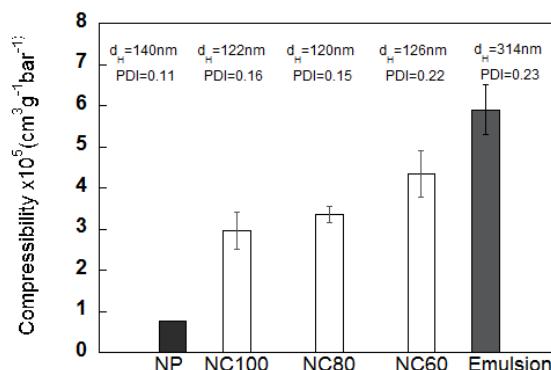


Figure 2: Adiabatic compressibility, size and polydispersity index (PDI) of different objects formed by the same emulsion-evaporation process: nanoparticles (NP), nanocapsules prepared with x amount of polymer (NCx) and emulsion.

To further investigate shell thinning, PLGA-PEG nanocapsules prepared with 100 mg or 60 mg of polymer were observed by Transmission Electron Microscopy. Images show spherical objects with core shell structure and sizes in good agreement with the hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering (Figures 2 and 3 left). Nanocapsule surface appears blurry since PEG chains are fully hydrated, thus lowering the contrast (Figure 3 left). To obtain accurate measurement of

shell thickness, samples were frozen and morphological analysis was completed by Cryo Transmission Electronic Microscopy imaging (Figure 3 right). The PFOB core, with high electronic density, appears black whereas the polymeric shell seems lighter. Many nanocapsules also present a white meniscus inside the core. Indeed, during sample preparation, the rapid freezing of nanocapsules causes solidification and shrinking of PFOB, which does not fill the polymeric shell cavity anymore. CryoTEM images show well-defined shells of measurable thickness. By contrast with PLGA nanocapsules, (Pisani *et al.* 2006) PEGylated nanocapsule thickness appears very polydisperse within a same sample. Moreover, nanocapsules prepared with 100 or 60 mg of polymer do not seem to be significantly different.

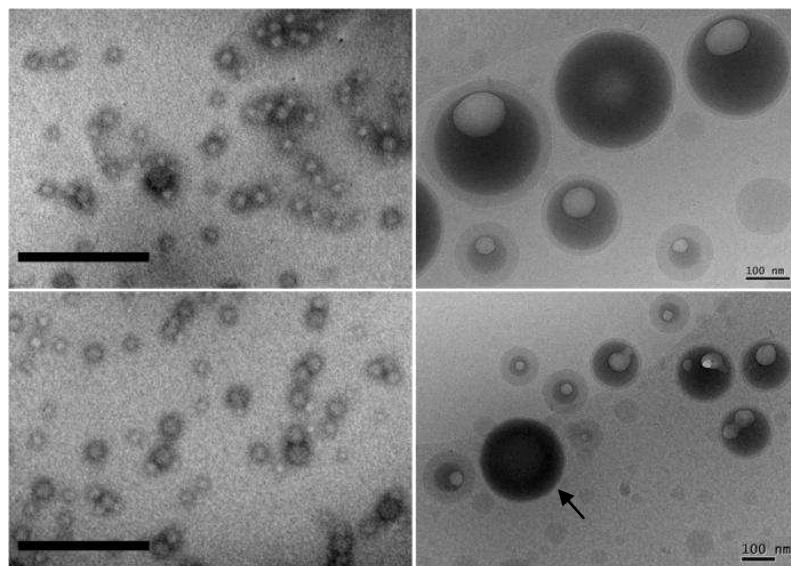


Figure 3: Left: TEM images of PEGylated nanocapsules, NC100 (top) and NC60 (bottom). The scale bar represents 500nm. Right: CryoTEM images of NC100 (top) and NC60 (bottom) with intrinsic negative contrast of the PFOB core. The black arrow shows an emulsion droplet of PFOB.

To statistically determine shell thickness, Small Angle Neutron Scattering (SANS) was used. SANS is a powerful technique to average geometrical parameters on a wide number of nanocapsules. Scanning a broad range of scattering vector allow depicting the nanocapsule at different length scales. In the Guinier domain ($q < 3 \times 10^{-3} \text{ Å}^{-1}$), the evolution of scattered intensity was approximated by Kratky as: $I(q) = I_0 \exp(-q^2 R_g^2 / 3)$. R_g is obtained from the slope of the curve $\ln(I(q))$ versus q^2 . Scattered intensity profiles, obtained for samples NC100, NC80 and NC60, dispersed in pure D₂O and in PFOB matching condition (H₂O/D₂O 40/60) were analysed at low q values and R_g was determined. Considering the above experiments (TEM, CryoTEM), which ensured the spherical nature of nanocapsules, the total radius can now be estimated as $R_{sphere}^2 = 5/3R_g^2$. In full contrast condition, R_{sphere} values are very close to R_h obtained by dynamic light scattering (Table 1). When the PFOB core

is matched, R_g values are smaller. In the H_2O/D_2O mixture, hydrogen bounding occurs, PEG chains therefore have almost the same contrast as the dispersant and are almost invisible. Wang *et al.* showed that the scattering intensity at low angle of a PEG_{5000} solution was dramatically reduced in a 66/44 H_2O/D_2O mixture being 10 % of the value in pure D_2O . (He *et al.* 2010) In our case, the difference between the gyration radii in D_2O and H_2O/D_2O would represent the gyration radius of PEG chains, around 10nm, in good agreement with Zackrickson *et al.* results (Zackrisson *et al.* 2005; Ramzi *et al.* 2008).

Table 1: Comparison of radii obtained by SANS in two matching conditions: full contrast (D_2O) and PFOB matching (H_2O/D_2O) and by dynamic light scattering for NC100, NC80 and NC60.

Solvent	D_2O			H_2O/D_2O	
Mass of polymer (mg)	$R_g \pm \sigma$ (nm)	R_{sphere} (nm) (5/3) $^{1/2} R_g$	R_H (nm) DLS	$R_g \pm \sigma$ (nm)	R_g^{PEG} (nm)
NC100	50.8 ± 0.4	65.5	64	40.8 ± 4.9	10.0
NC80	49.7 ± 1.4	64.0	62.5	40.4 ± 4.9	9.3
NC60	48.4 ± 1.3	62.5	61.5	38.2 ± 4.1	10.2

The scattering curves $I(q)$ for NC100, NC80 and NC60 in PFOB matching condition were fitted to Eq.5, the expression of the form factor of hairy vesicle. For the ease of reading, only one example: NC100, is given in Figure 4. The model (black line) satisfactorily fits the experimental data (red points). For the other samples NC80 and NC60 the fits are as satisfying as the presented one (Supporting information). In full contrast conditions, variations of intensity are smoother and fewer oscillations appear (Supporting information). In order to analyze these variations, we tried two other models: the core shell model, in which the core would be composed of PFOB and the shell of polymer (PLGA-*b*-PEG), and a hairy core shell model with PEG chains around. The corresponding scattered intensity curves cannot be fitted with meaningful parameters (R_{core} , T, and their distributions) with these two models. In conclusion, only the best fit parameters, obtained for nanocapsules in matching condition, are given in Table 2. They first confirm the 10 nm value for the radius of gyration of PEG. In addition, the core radius is almost the same for the three samples NC100, NC80 and NC60, ($R_{core} \approx 27$ nm). The standard deviation is high, confirming the high polydispersity index observed by dynamic light scattering (Figure 2). The thickness to radius ratios (T/R) were then calculated for each sample: T/R=0.44; 0.45 and 0.48 for NC100, NC80 and NC60 respectively, very similar one to another. The similarity of nanocapsules in terms of T/R was further evidenced by plotting $I(q) \cdot q^2$ versus q (Figure 4, inset). The first minimum corresponds to the first zero of the shell form factor given by $T = 2\pi / q$. Curves of NC100, NC80 and NC60 were y-translated to be more easily presented but they were initially superimposed. We demonstrated again the thickness value is the same for the three samples around 16 nm.

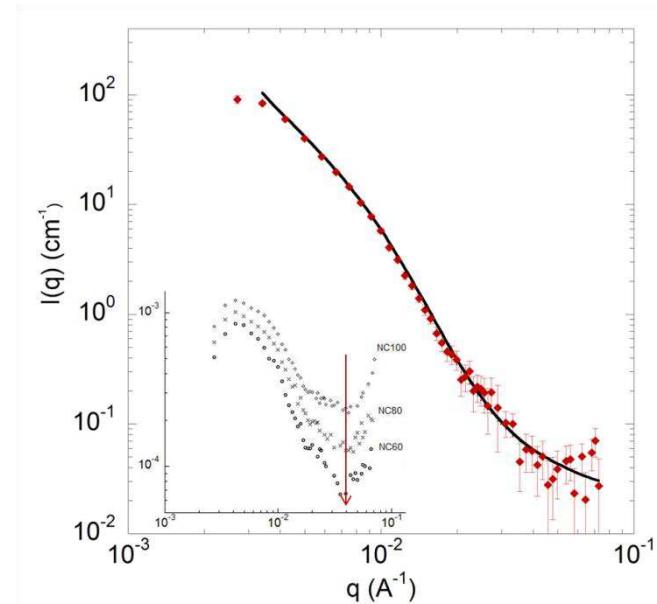


Figure 4: Experimental scattered intensity curve of NC100 (red diamonds) in contrast matching condition, fitted by Hairy Vesicle Model (black line) Inset: $I(q) \cdot q^2$ versus q plot for NC100, NC80 and NC60. The first minimum is underlined by the red arrow.

Table 2: Geometrical parameters for NC100, NC80 and NC60 obtained by curves fitting with Hairy Vesicle form Factor Model and calculated T/R. R is the total radius of NC given by $R=R_{\text{core}}+T$.

Mass of polymer (mg)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)	T (nm)	N_{PEG}	R_g^{PEG} (nm)	T/R
100	26.7 ± 39.3	21	1720	9.1	0.44
80	27.2 ± 40.4	23	1672	8.7	0.45
60	27.8 ± 39.4	26	1869	9.3	0.48

The similarity of NC100, NC80 and NC60 is further suggested by the number of PEG chains (N_{PEG}) at nanocapsule surface, which is about the same order of magnitude for NC100, NC80 and NC60 (Table 2). Interestingly, we can calculate the number of PLGA-PEG ($N_{\text{PLGA-}b\text{-PEG}}$) chains within the nanocapsule as follows:

$$N_{\text{PLGA-PEG}} = \frac{m_{\text{PLGA-PEG/NC}}}{M_{\text{PLGA-PEG}}} N_a \quad \text{with} \quad m_{\text{PLGA-PEG/NC}} = \frac{m_{\text{NC recovered}} - m_{\text{PFOB}}}{m_{\text{NC recovered}} / \rho_{\text{NC}} V_{\text{NC}}}$$

$M_{\text{PLGA-PEG}}$ is the molecular weight of PLGA-*b*-PEG (50 000g/mol).

$m_{\text{NC recovered}}$ corresponds to the mass of capsules recovered after preparation.

ρ_{NC} and V_{NC} are the density and volume of nanocapsules.

m_{PFOB} is the total weight of PFOB in the suspension, deduced from the encapsulation efficiency measurements.

These calculations for NC100 resulted $N_{\text{PLGA-PEG}}= 6093$ chains. It can be compared to the number of PEG chains at nanocapsule surface: 1720, revealing that only 28% of PEG chains are surface oriented during the emulsification-evaporation process.

SANS experiments revealing NC100, NC80 and NC60 possess the same T/R ratio, the increase of compressibility (Figure 2) definitely cannot be related to a decrease of T/R. To elucidate the compressibility increase, the PFOB content of suspensions was measured after each step of nanocapsules treatment: directly after preparation (native), after filtration and after freeze drying. PFOB encapsulation efficiency was calculated and reported in figure 5. For native suspension, encapsulation efficiencies are: $100 \pm 6\%$; $96 \pm 5\%$ and $97 \pm 1\%$ respectively for NC100, NC80 and NC60. Given standard deviations, one can consider that no loss of PFOB occurs during methylene chloride evaporation. After filtration, all samples lose from 20 to 30 % of their PFOB content, proving the presence of objects larger than membrane filter pore size (450 nm). Microscopic observations show that these objects are microcapsules containing a PFOB core, very similar to those obtained by Pisani *et al.* (Pisani *et al.* 2009). After freeze drying, the additional loss is no longer equivalent for the different samples, while it is only 7 % more for NC100; it is 31 % and 30 % respectively for NC80 and NC60. A careful observation of CryoTEM pictures of NC60 reveals the coexistence of nanocapsules together with PFOB droplets stabilized by sodium cholate (arrow on image). During freeze drying, these droplets evaporate (proved by ^{19}F NMR, data not shown), whereas PFOB remains in the nanocapsules, which possess a solid and harder polymeric shell. The loss of PFOB between the filtration and freeze drying steps, around 30 % for NC80 and NC60, would represent the amount of SC/PFOB droplets in the suspension. These droplets together with nanocapsules were not easily detectable by dynamic light scattering since the refractive index of PFOB is 1.33 (25°C) close to the one of water. Nevertheless the higher PDI value of NC60 (PDI=0.22) compared to NC100 (PDI=0.16) suggest a wider dispersion of sizes and eventually a second population of objects (Figure 2). The droplets were not detectable by SANS either, since contrast condition matched the PFOB core.

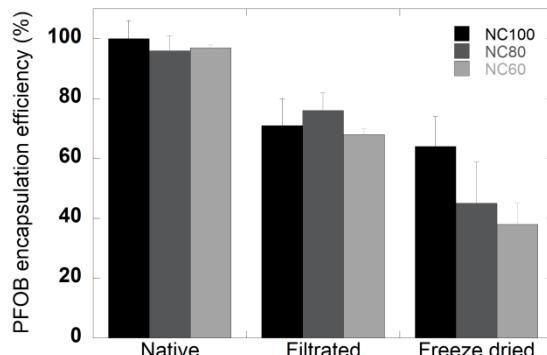


Figure 5: PFOB encapsulation efficiency diagram of NC suspensions (NC100, NC80 and NC60) at different steps of preparation. PFOB content is precisely measured by ^{19}F NMR.

CryoTEM observation of a pure SC/PFOB emulsion (without polymer) evidenced the softness of droplets and their ability to change shape when they are closely packed (figure 6). Mechanical

flexibility of PFOB droplets was confirmed by compressibility measurement: $5.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$. This value is twice higher than the one obtained for NC100. As described previously, there is no difference in size and thickness between NC100 and NC60, one can thus assume that NC60 suspension is a mixture of NC100-like nanocapsules and emulsion droplets of PFOB. Compressibility as an extensive property; the total compressibility of NC60 suspension is the sum of the compressibility values of the different components: $k_{NC60}^0 = (k_{NC100}^0 \varphi_{NC100} + k_E^0 \varphi_E) / (\varphi_{NC100} + \varphi_E)$.

k_{NC100} and k_E are the compressibility values of NC100 and the emulsion respectively (Figure 2). φ_{NC100} and φ_E correspond to the volume fractions of NC100 and emulsion in the NC60 sample. Considering the PFOB content of NC60 before and after freeze-drying, φ_{NC100} equals 38/68 and φ_E equals 30/68. One can then evaluate a theoretical value of k_{NC60} of $4.25 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$, very close to the experimental value $4.34 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$, comforting the hypothesis of the dual-composition of NC60 suspension: NC100-like capsules and emulsion droplets. Finally, we verified NC100 suspension was only composed of nanocapsules. In this case, the compressibility is given by the Laplace equation:

$$k = \frac{v^0}{\rho U^2} = \frac{v^0}{(\rho_{PLGA} \varphi_{shell} + \rho_{PFOB} \varphi_{core})(U_{PLGA} \varphi_{shell} + U_{PFOB} \varphi_{core})^2} \quad \text{Eq. 9}$$

where v^0 is the partial specific volume of nanocapsules measured after freeze drying

$\rho_{shell} = 1.22 \text{ g/mL}$ $\rho_{core} = 1.93 \text{ g/mL}$ are the densities of PLGA and PFOB

φ_{shell} and φ_{core} are the volume fractions of the shell and the core calculated with the SANS parameters (T and R_{core}).

U_{PLGA} and U_{PFOB} are the acoustic velocities PLGA and PFOB (Haiat et al. 2011)

This calculation gives a theoretical value of the NC100 compressibility, $k_{NC100}^{theo} = 2.60 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$ similar to the experimental one: $2.95 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1} \text{bar}^{-1}$. The error between theoretical and experimental values is about 12%, which is included in the experimental uncertainty.

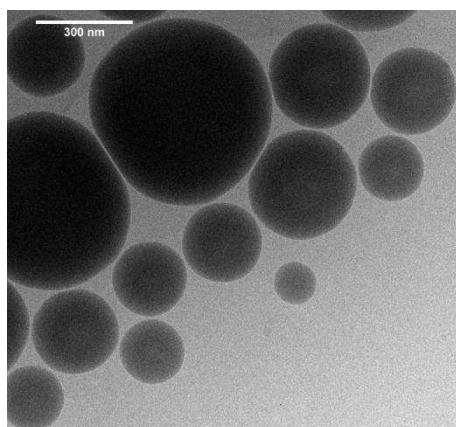


Figure 6: CryoTEM image of PFOB droplets stabilized by sodium cholate.

During the emulsification process, the methylene chloride droplets containing PFOB and polymer are fractioned by sonication. The number of droplets and their size are fixed by the sonication power and the viscosity of the organic phase. At this step, polymer chains and PFOB molecules are equally distributed within the droplets. Droplets are stabilized by sodium cholate, the polymer is located in the loose interfacial sublayer because of its high solubility in methylene chloride (Pisani *et al.* 2009). In NC100 emulsion, the droplets are richer in polymer than in NC60 emulsion (Figure 7, step 1 a and b).

In the case of NC100, there are enough PLGA-*b*-PEG chains to cover all interfaces. PFOB nucleates at the center of the organic droplet and the layer of methylene chloride is thinning as the evaporation occurs (Figure 7, step 2) (Pisani *et al.* 2008). PLGA-*b*-PEG reaches its solubility limit and migrates to the interface thus orientating the hydrophilic PEG moieties toward the aqueous phase. The driving force, fixing the equilibrium configuration of the suspension, is the minimization of the total interfacial tension (Wyman *et al.* 2011). Finally, PLGA-*b*-PEG precipitates and nanocapsules are formed (Figure 7, step 3a).

In the case of NC60, decreasing the PLGA-*b*-PEG/PFOB ratio results in PLGA-*b*-PEG concentration inhomogeneities and local dewetting. Within the same droplet, methylene chloride is either stabilized by SC alone: $\gamma_1=8.1\text{ mN/m}$, or by PLGA-*b*-PEG and SC together: $\gamma_2<7.2\text{ mN/m}$ (Pisani *et al.* 2009). One can note that γ_2 is probably overestimated as it was measured for $[\text{PLGA-}b\text{-PEG}]=100\text{ mg/mL}$. The actual concentration may be higher, but it is difficult to estimate accurately during the evaporation process (Figure 7, step 2b). The interfacial tension gradient ($\gamma_1 - \gamma_2$) may lead to Marangoni interfacial instabilities, as evidenced by Foster *et al.* with PEO-*b*-PCL polymersomes (Foster *et al.* 2010). The methylene chloride would flow away from the region of low surface tension, γ_2 to the region of high surface tension γ_1 (black arrows). Finally, the PLGA-*b*-PEG precipitates around one PFOB droplet, while another bare PFOB droplet is expelled into the aqueous phase. These PFOB droplets, stabilized by SC ($\gamma=15.6\text{ mN/m}$ at the PFOB/water interface) were already observed by Pisani et al for PLGA in the case of an excess of PFOB (Pisani *et al.* 2006). In brief, two different morphologies may form depending on the polymer initial concentration: nanocapsules and droplets of PFOB stabilized by SC (Figure 7, step 3b). This is confirmed by CryoTEM imaging (Figure 3).

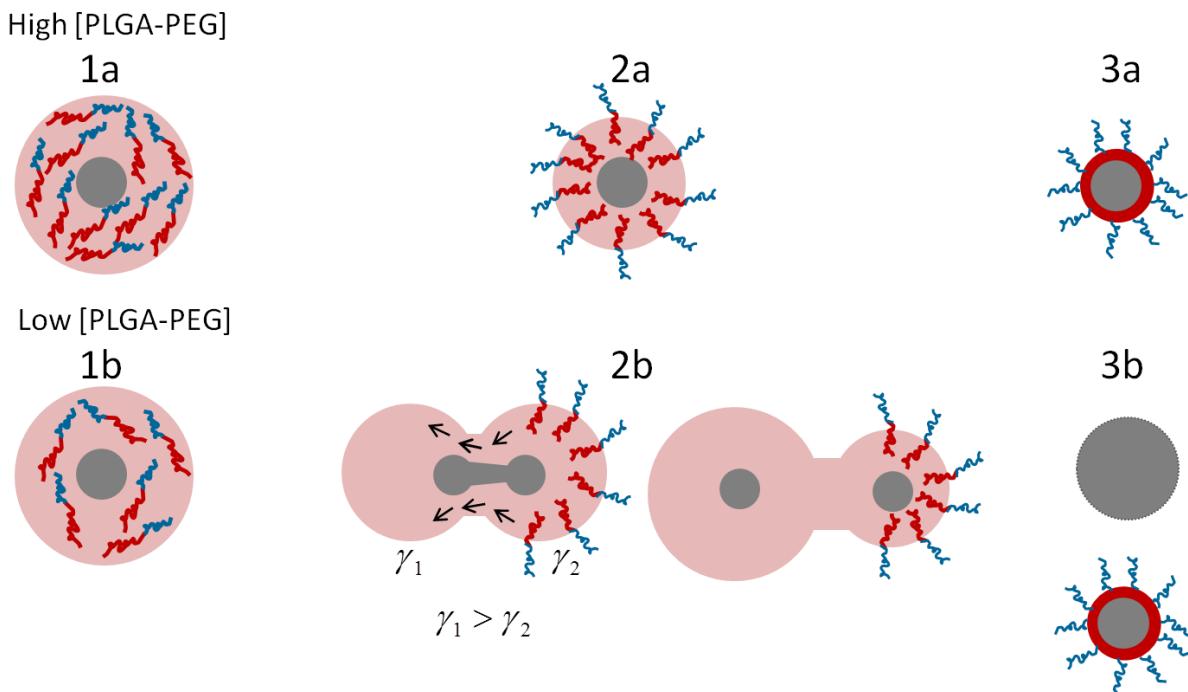


Figure 7: Schematic drawing that describes a possible mechanism for the formation of nanocapsules in case of NC100 (top) and NC60 (bottom). Step 1: Initial state, the polymer is dissolved in CH_2Cl_2 . Step 2: PLGA-*b*-PEG is moving to the interface as the solvent evaporates. Step 3: Final situation with nanocapsules NC100 and co-existence of NC60 and PFOB droplet for NC60.

Since increasing the echogenicity by thinning the shell of nanocapsules was not feasible for PLGA-*b*-PEG, another strategy was briefly studied. The idea was to focus on the detection method rather than on the contrast agent itself. Couture *et al.* have shown that high frequency ultrasounds (>20 MHz) are more suitable than clinical ones (7-14 MHz) for submicron droplets (Couture *et al.* 2006; Couture *et al.* 2006). Mendoza-Munoz *et al.* also related an increased level of backscattered echoes when high frequencies were used for nanoparticles detection (Nestor *et al.* 2011). Performances of PLGA-PEG/PFOB nanocapsules NC100 and NC60 were therefore evaluated in terms of their acoustic response. The Power Spectral Density (PSD), at 20 MHz (fundamental) and 40 MHz (second harmonic) was determined as the acoustic pressure varied from 1.28 to 2.01 MPa. Nanoparticles (NP) were considered as a linearly scattering control. The PSD for nanoparticles is low and does not depend on acoustic pressure; the mean values of PSD_{NP} are -53.1 ± 1.7 dB at the fundamental and -77.7 ± 1.7 dB at the second harmonic. Thus, the PSD_{NP} can be considered as the baseline. For nanocapsules at the fundamental frequency, the acoustic enhancements compared to NP, given by the difference of respective PSD: $\text{PSD}_{\text{NC}} - \text{PSD}_{\text{NP}}$ is constant as the pressure varies, mean values being 7.3 ± 1.4 dB and 5.4 ± 2.0 dB respectively for NC60 and NC100 (Figure 8 left). This confirms the improved echogenicity of nanocapsules compared to nanoparticles at high frequency due to the synergistic contribution of the acoustic impedance difference, which is created by the core of PFOB, and the elasticity of the polymeric shell. For the second harmonic, the enhancement of

PSD_{NC} compared to PSD_{NP} is increasing with acoustic pressure (Figure 8 right), reaching 7 dB at 2.01 MPa. This pressure dependant second harmonic content was already related to the non linear acoustic behavior of PFOB filled PLGA nanocapsules at high frequency (Jafari *et al.*). The same trends are obtained for NC60 and NC100, confirming there is no difference in terms of shell thickness as well as echogenicity between the two samples. Furthermore, the presence of PFOB droplets in NC60 does not influence the acoustic gain ($\text{PSD}_{\text{NC}}-\text{PSD}_{\text{NP}}$) at the second harmonic, in good agreement with Couture *et al.*, who showed that 300 nm droplets of PFH behave as linear scatterers (Couture *et al.* 2006).

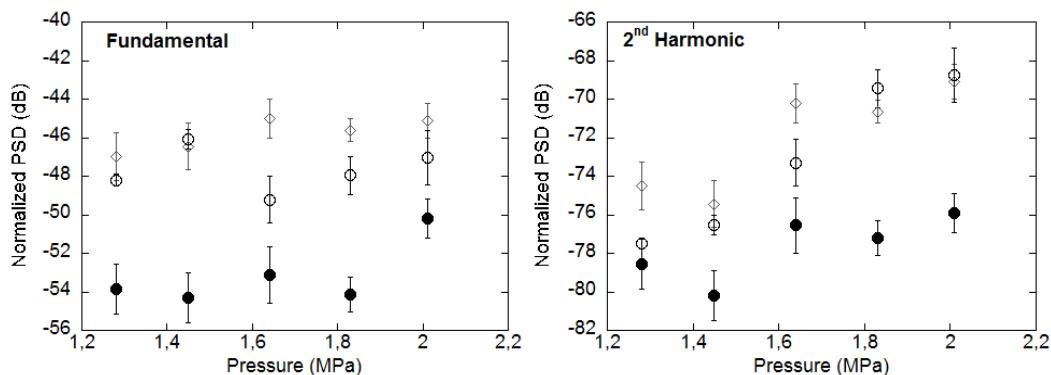


Figure 8: Normalized PSD as a function of acoustic pressure for nanoparticles (NP ●), and nanocapsules NC100 (○) and NC60 (◊) measured at 20MHz: fundamental frequency (left) and 40MHz: second harmonic (right).

In conclusion, the acoustic response of nanocapsules is interesting at the fundamental and the second harmonic and comparable to other polymeric shelled nanometric UCAs (Jafari *et al.* ; Ketterling *et al.* 2007). It would be possible to exploit linear and non linear behaviour of PLGA-*b*-PEG/PFOB nanocapsules to confirm their echogenicity at high frequencies, with a newly developed imaging system (Veo 2100, Visualsonics). In the future, the same experimental protocol as the one used for low frequencies, may reveal a higher contrast enhancement of the tumor.

4. Conclusion

In vivo imaging of PLGA-*b*-PEG/PFOB nanocapsules reveals that this system required further improvement to increase its echogenicity. Two strategies were evaluated. The first strategy considered the properties of the polymeric shell to render the nanocapsule more echogenic. Morphological features of different type of nanocapsules (NC100, NC80, NC60) were deeply studied by electronic microscopy, ¹⁹F NMR and neutrons scattering. We show that using PLGA-*b*-PEG, it is impossible to tune the polymeric shell thickness of the UCA. The second strategy was related to the use of high frequencies ultrasounds (20-40 MHz). The *in vitro* evaluation of PLGA-*b*-PEG/PFOB nanocapsules appears promising. *In vivo* experiments at those frequencies should be performed to confirm the potential of these nanocapsules for tumor detection.

5. Acknowledgements

Authors acknowledge financial support from ANR (Investissements d'Avenir, Nanobiotechnologies, nUCA project). Authors would like to thank N. Mignet and J. Seguin for providing fruitful advice for tumor growth. Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- Anderson, C. R., Hu, X., Zhang, H., Tlaxca, J., Decleves, A. E., Houghtaling, R., Sharma, K., Lawrence, M., Ferrara, K. W. and Rychak, J. J. "Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent." *Invest. Radiol.* 46(4): 215-224 (2011)
- Bang, J., Jain, S. M., Li, Z. B., Lodge, T. P., Pedersen, J. S., Kesselman, E. and Talmon, Y. "Sphere, cylinder, and vesicle nanoaggregates in poly (styrene-b-isoprene) diblock copolymer solutions." *Macromolecules* 39(3): 1199-1208 (2006)
- Bloch, S. H., Short, R. E., Ferrara, K. W. and Wisner, E. R. "The effect of size on the acoustic response of polymer-shelled contrast agents." *Ultrasound in Medicine and Biology* 31(3): 439-444 (2005)
- Brulet, A., Lairez, D., Lapp, A. and Cotton, J. P. "Improvement of data treatment in small-angle neutron scattering." *J. Appl. Crystal.* 40: 165-177 (2007)
- Choi, S. H. and Park, T. G. "Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers." *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 13(10): 1163-1173 (2002)
- Chumakova, O. V., Liopo, A. V., Andreev, V. G., Cicenaitis, I., Evers, B. M., Chakrabarty, S., Pappas, T. C. and Esenaliev, R. O. "Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo." *Cancer Letters* 261(2): 215-225 (2008)
- Couture, O., Bevan, P. D., Cherin, E., Cheung, K., Burns, P. N. and Foster, F. S. "Investigating perfluorohexane particles with high-frequency ultrasound." *Ultrasound Med. Biol.* 32(1): 73-82 (2006)
- Couture, O., Bevan, P. D., Cherin, E., Cheung, K., Burns, P. N. and Foster, F. S. "A model for reflectivity enhancement due to surface bound submicrometer particles." *Ultrasound Med. Biol.* 32(8): 1247-1255 (2006)
- Dayton, P. A., Allen, J. S. and Ferrara, K. W. "The magnitude of radiation force on ultrasound contrast agents." *J. Acoust. Soc. Am.* 112(5 Pt 1): 2183-2192 (2002)
- Debye, P. "Molecular-weight determination by light scattering." *J. Phys. Colloid. Chem.* 51(1): 18-32 (1947)
- Deng, C. X., Lizzi, F. L., Silverman, R. H., Ursea, R. and Coleman, D. J. "Imaging and spectrum analysis of contrast agents in the in vivo rabbit eye using very-high-frequency ultrasound." *Ultrasound Med. Biol.* 24(3): 383-394 (1998)
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N., Santin, M., Bridal, S. L., Nicolas, V., Jaillard, D., Libong, D., Chaminade, P., Marsaud, V., Vauthier, C. and Fattal, E. "The performance of PEGylated nanocapsules of perfluoroctyl bromide as an ultrasound contrast agent." *Biomaterials* 31(7): 1723-1731 (2010)
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C. and Fattal, E. "Long-circulating perfluoroctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI." *Biomaterials* 33(22): 5593-5602 (2012)
- Eggers, F. "Ultrasonic Velocity and Attenuation Measurements in Liquids with Resonators, Extending the Mhz Frequency-Range." *Acustica* 76(5): 231-240 (1992)
- Eggers, F. and Kaatze, U. "Broad-band ultrasonic measurement techniques for liquids." *Meas. Sci. Technol.* 7(1): 1-19 (1996)
- Fisher, N. G., Christiansen, J. P., Leong-Poi, H., Jayaweera, A. R., Lindner, J. R. and Kaul, S. "Myocardial and microcirculatory kinetics of BR14, a novel third-generation intravenous ultrasound contrast agent." *J. Am. Coll. Cardiol.* 39(3): 530-537 (2002)
- Foster, T., Dorfman, K. D. and Davis, H. T. "Giant biocompatible and biodegradable PEG-PMCL vesicles and microcapsules by solvent evaporation from double emulsion droplets." *J Colloid Interface Sci* 351(1): 140-150 (2010)
- Haiat, G., Berti, R., Galaz, B., Taulier, N., Amman, J. J. and Urbach, W. "Two-dimensional simulation of linear wave propagation in a suspension of polymeric microcapsules used as ultrasound contrast agents." *J. Acoust. Soc. Am.* 129(3): 1642-1652 (2011)

Chapitre 2 : Optimisation de la morphologie des capsules pour l'imagerie ultrasonore

- Hammouda, B. "Structure Factor for Starburst Dendrimers." *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* 30(12): 1387-1390 (1992)
- He, L. Z., Wang, H., Garamus, V. M., Hanley, T., Lensch, M., Gabius, H. J., Fee, C. J. and Middelberg, A. "Analysis of MonoPEGylated Human Galectin-2 by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering: Concentration Dependence of PEG Conformation in the Conjugate." *Biomacromolecules* 11(12): 3504-3510 (2010)
- Henderson, T. J. "Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents." *Anal. Chem.* 74(1): 191-198 (2002)
- Jafari, S., Diou, O., Mamou, J., Fattal, E., Tsapis, N. and Bridal, S. L. *submitted*
- Ketterling, J. A., Mamou, J., Allen, J. S., Aristizabal, O., Williamson, R. G. and Turnbull, D. H. "Excitation of polymer-shelled contrast agents with high-frequency ultrasound." *Journal of the Acoustical Society of America* 121(1): El48-El53 (2007)
- Klibanov, A. L. "Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents." *J Nucl Cardiol* 14(6): 876-884 (2007)
- Liu, J., Li, J., Rosol, T. J., Pan, X. and Voorhees, J. L. "Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro." *Phys Med Biol* 52(16): 4739-4747 (2007)
- Marsh, J. N., Senpan, A., Hu, G., Scott, M. J., Gaffney, P. J., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. "Fibrin-targeted perfluorocarbon nanoparticles for targeted thrombolysis." *Nanomedicine (London, U. K.)* 2(4): 533-543 (2007)
- Nestor, M. M., Kei, N. P. E., Guadalupe, N. A. M., Elisa, M. E. S., Adriana, G. Q. and David, Q. G. "Preparation and in vitro evaluation of poly(D, L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging." *Ultrasonics* 51(7): 839-845 (2011)
- Ngai, K. L. and Plazek, D. J. "Identification of Different Modes of Molecular-Motion in Polymers That Cause Thermorheological Complexity." *Rubber Chem. Technol.* 68(3): 376-434 (1995)
- Pedersen, J. S. "Form factors of block copolymer micelles with spherical, ellipsoidal and cylindrical cores." *J. Appl. Crystal.* 33(1): 637-640 (2000)
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V. and Tsapis, N. "Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluoroctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface." *J. Colloid Interface Sci.* 326(1): 66-71 (2008)
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E. and Tsapis, N. "Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG." *Soft Matter* 5(16): 3054-3060 (2009)
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B. T., Beloeil, J. C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S. L. and Fattal, E. "Perfluoroctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging." *Adv. Funct. Mat.* 18(19): 2963-2971 (2008)
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. and Fattal, E. "Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization." *Langmuir* 22(9): 4397-4402 (2006)
- Plazek, D. J., Chay, I. C., Ngai, K. L. and Roland, C. M. "Viscoelastic Properties of Polymers .4. Thermorheological Complexity of the Softening Dispersion in Polyisobutylene." *Macromolecules* 28(19): 6432-6436 (1995)
- Ramzi, A., Rijcken, C. J. F., Veldhuis, T. F. J., Schwahn, D., Hennink, W. E. and van Nostrum, C. F. "Core-shell structure of degradable, thermosensitive polymeric micelles studied by small-angle neutron scattering." *J. Phys. Chem. B* 112(3): 784-792 (2008)
- Rapoport, N., Nam, K. H., Gupta, R., Gao, Z., Mohan, P., Payne, A., Todd, N., Liu, X., Kim, T., Shea, J., Scaife, C., Parker, D. L., Jeong, E. K. and Kennedy, A. M. "Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions." *J. Control. Rel.* 153(1): 4-15 (2011)

Chapitre 2 : Optimisation de la morphologie des capsules pour l'imagerie ultrasonore

- Schneider, M., Arditi, M., Barrau, M. B., Brochet, J., Broillet, A., Ventrone, R. and Yan, F. "BR1: a new ultrasonographic contrast agent based on sulfur hexafluoride-filled microbubbles." *Invest. Radiol.* 30(8): 451-457 (1995)
- Schutt, E. G., Klein, D. H., Mattrey, R. M. and Riess, J. G. "Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42(28): 3218-3235 (2003)
- Seguin, J., Nicolazzi, C., Mignet, N., Scherman, D. and Chabot, G. G. "Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours." *Tumour Biol.* (2012)
- Stafford, C. M., Vogt, B. D., Harrison, C., Julthongpiput, D. and Huang, R. "Elastic moduli of ultrathin amorphous polymer films." *Macromolecules* 39(15): 5095-5099 (2006)
- Tranquart, F., Correas, J. M. and Bouakaz, A. "Echographie de contraste". Paris, France (2007)
- Wheatley, M. A., Forsberg, F., Dube, N., Patel, M. and Oeffinger, B. E. "Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging." *Ultrasound in Medicine and Biology* 32(1): 83-93 (2006)
- Wheatley, M. A. and Lewandowski, J. "Nano-sized ultrasound contrast agent: salting-out method." *Mol Imaging* 9(2): 96-107 (2010)
- Wyman, I., Njikang, G. and Liu, G. J. "When emulsification meets self-assembly: The role of emulsification in directing block copolymer assembly." *Progress in Polymer Science* 36(9): 1152-1183 (2011)
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. "Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size." *Cancer Res.* 55(17): 3752-3756 (1995)
- Zackrisson, M., Stradner, A., Schurtenberger, P. and Bergenholtz, J. "Small-angle neutron scattering on a core-shell colloidal system: A contrast-variation study." *Langmuir* 21(23): 10835-10845 (2005)

Supporting information

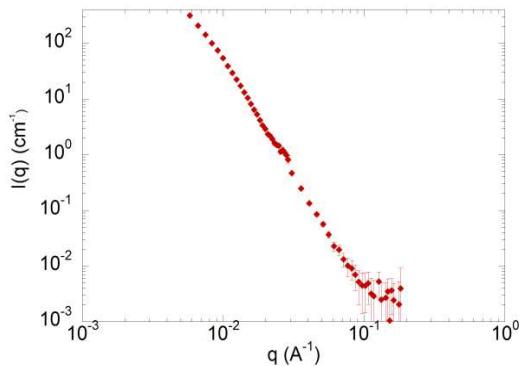


Figure S1: Experimental scattered intensity curve in full contrast condition of NC60.

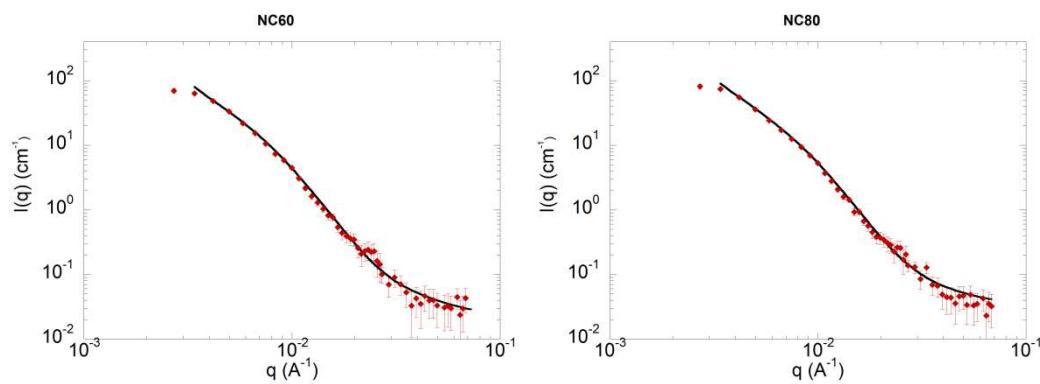


Figure S2: Experimental scattered intensity curve in contrast matching condition of NC60 and NC80 (red diamonds) fitted by Hairy Vesicle Model (black line).

Chapitre 3

Introduction d'une molécule bioactive pour le traitement et/ou le ciblage spécifique de la tumeur

Ce chapitre se décompose en deux parties A et B. La première concerne l'encapsulation d'un principe actif au sein de la coque polymère des nanocapsules, pour le traitement de la tumeur par chimiothérapie. La deuxième partie décrit la fonctionnalisation de surface des nanocapsules PEGylées par un peptide pour envisager le ciblage actif d'une protéine spécifique, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée par les néovaisseaux, en périphérie de la tumeur.

Deux principes actifs ont été étudiés : le Paclitaxel, considéré comme une molécule modèle et le 5-Fluorouracil, qui est habituellement préconisé, chez l'homme, pour traiter les tumeurs du côlon. Les nanocapsules ont été caractérisées en termes de taille, mesurée par diffusion de la lumière, et de teneur en principe actif, déterminée par chromatographie liquide, couplée à un détecteur UV, ou RMN du ^{19}F , respectivement pour le paclitaxel et le 5-Fluorouracil. L'encapsulation du paclitaxel, molécule hydrophobe, se révèle beaucoup plus prometteuse que celle du 5-Fluorouracil, hydrophile.

Deux stratégies de couplage du peptide sur la surface des nanocapsules ont été investiguées. Elles ont été nommées bottom-up et top-down pour décrire le sens de la démarche de construction du système théranostique. Les nanocapsules fonctionnalisées ont été caractérisées en termes de taille, par diffusion de la lumière, en termes de morphologie, par Cryo-MET et d'efficacité d'encapsulation du PFOB, par RMN du ^{19}F . La réussite du couplage a été validée et quantifiée grâce à une méthode originale de RMN du ^1H . Les résultats montrent que, la morphologie sphérique cœur-couronne des nanocapsules est difficile à maintenir après fonctionnalisation, aussi bien par l'approche bottom-up que par l'approche top-down. La stratégie top-down est la plus satisfaisante en termes de taux de couverture de peptide en surface. C'est pourquoi, l'affinité de ces nanocapsules pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, a été évaluée *in vitro*, sur des cellules humaines de l'endothélium vasculaire ombilical (HUVEC), par un test de compétition en présence d'échistatine radiomarquée, autre ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'intérêt des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG/PFOB pour l'imagerie des tumeurs solides a été démontré par IRM du Fluor et échographie dans les chapitres 1 et 2. Dans l'objectif final de concevoir des nanocapsules théranostiques, il fallait encore leur apporter une fonction thérapeutique. L'incorporation d'un principe actif ne peut guère être envisagée que dans la coque polymère de la capsule. En effet, en tant que perfluorocarbone, le PFOB est à la fois hydrophobe et lipophile et a une faible capacité de solubilisation (Scott 1948). Dans cette partie, nous avons rapidement vérifié que l'encapsulation d'un principe actif hydrophobe, tel que le paclitaxel était envisageable et aisément quantifiable par une méthode de chromatographie liquide. Nous nous sommes ensuite replacé dans la problématique du cancer du côlon, pathologie pour laquelle le 5-Fluorouracil (5-FU) est plus communément administré que le paclitaxel. Il faut préciser que les résultats présentés dans cette partie 3A sont le fruit d'une étude préliminaire, qui mérirerait d'être approfondie dans le futur.

1. Encapsulation d'une molécule modèle : le paclitaxel

Matériel et méthodes :

Les réactifs utilisés sont les mêmes que ceux évoqués dans les chapitres 1 et 2. Le PLGA-*b*-PEG RGP d50105 provient de Boehringer-Ingelheim (Allemagne), le PFOB de Fluorochem (Royaume-Uni) et le Paclitaxel de Chemos (Allemagne). Les solvants (dichlorométhane, acétone, acetonitrile) sont fournis par Carlo Erba Reactifs (France)

Le procédé de formulation des capsules est similaire à celui décrit dans les chapitres 1 et 2. Brièvement, dans 4 mL de dichlorométhane sont introduits progressivement : 6 à 18 mg de paclitaxel, 100 mg de polymère et 60 µL de PFOB. La phase organique est pré-émulsifiée contre 20 mL de solution aqueuse de cholate de sodium (1,5 % massique) 1 min au vortex. Puis les gouttelettes sont fractionnées par ultrasonication pendant 1 min. Le dichlorométhane est éliminé par évaporation sous pression réduite. Les suspensions sont ensuite filtrées sur PVDF 0,45 µm puis purifiées par ultracentrifugation à 20 000 tr/min pendant 1 h.

Pour doser le paclitaxel, une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse a été utilisée. La phase mobile est un mélange 50/50 d'acetonitrile/eau, le débit d'élution dans la colonne (Water Symmetry® C18 5 µm 4,6*150 mm) est de 1 mL/min.

Pour la méthode choisie le temps de rétention du paclitaxel est de 14,5 min et son absorbance maximale à 237 nm. Une droite d'étalonnage a été établie pour une gamme de concentrations de paclitaxel de 1,41 à 16,8 µg/mL telle que $y=(101,465x - 0,719) \times 10^3$ $r^2=0,9997$. Des solutions de polymère seul ainsi qu'un mélange de polymère et de paclitaxel sont préparés afin de vérifier l'absence d'interférences d'absorbance à la longueur d'onde considérée. Après purification, le culot de nanocapsules est solubilisé dans 2mL d'acétonitrile. L'échantillon est ensuite filtré sur 0.45 µm Poly(tétra-fluoro éthylène) (PTFE) et dilué dans la phase mobile de chromatographie.

Résultats :

La limite de solubilité du paclitaxel dans le dichlorométhane a été évaluée à 17,1 mg/mL (Singla *et al.* 2002). Plusieurs essais ont donc été menés pour des concentrations initiales de principe actif dans la phase organique, inférieures à cette limite : de 1,6 à 4,6 mg/mL. L'efficacité d'encapsulation ainsi que la quantité de principe actif sont déterminés grâce au dosage HPLC. Le rendement d'encapsulation semble peu dépendre de la quantité initiale de paclitaxel jusqu'à 10 mg. La molécule est partitionnée de façon égale dans l'eau et dans la membrane de polymère. A 5,3 mg pour 100 mg de polymère, la membrane est probablement saturée en paclitaxel, une teneur plus élevée semble être impossible à atteindre (Tableau 1).

Tableau 1 : Teneur en principe actif et efficacité d'encapsulation de différentes formulations de nanocapsules.

m_{PTX}^i (mg)	Teneur (mg)/100mg polymère	η^{PTX} (%)
6,3	3,3	52,6
10,0	5,3	52,8
18,4	5,3	29,0

2. Encapsulation d'une molécule d'intérêt : le 5-Fluorouracil

Matériel et méthodes :

Les réactifs utilisés sont les mêmes que ceux évoqués dans les chapitres 1 et 2. Le PLGA-*b*-PEG RGP d50105 provient de Boehringer-Ingelheim (Allemagne), le PFOB de Fluorochim (Royaume-Uni) et le 5-Fluorouracil de Sigma-Aldrich (France). Les solvants (dichlorométhane, acétone, acétonitrile) sont fournis par Carlo Erba Reactifs (France)

Le procédé de formulation est légèrement adapté pour le 5-Fluorouracil. Dans 4 mL d'un mélange d'acétone et de dichlorométhane (94/6) judicieusement choisi pour solubiliser tous les composants, sont introduits progressivement : 8 mg de 5-FU, 100 mg de polymère et 60 µL de PFOB.

La phase organique est pré-émulsifiée contre 20 mL de solution aqueuse de cholate de sodium (1,5 % massique) 1 min au vortex. Puis les gouttelettes sont fractionnées par ultrasonication pendant 1 min. Les solvants sont ensuite éliminés par évaporation sous pression réduite. Les suspensions sont filtrées sur PVDF 0.45µm puis purifiées par ultracentrifugation à 20 000 tr/min pendant 1 h.

La taille des nanocapsules est mesurée, à 20°C, par diffusion dynamique de la lumière à un angle de 173° avec un temps d'accumulation de 60 secondes (ZetaSizer NanoZS, Malvern). Le diamètre et l'indice de polydispersité sont déterminés en utilisant la méthode des Cumulants.

Le dosage du 5-FU dans les formulations est effectué par spectrométrie UV et RMN du Fluor. Les limitations et avantages de ces méthodes sont présentés successivement.

La molécule de 5-FU absorbe le rayonnement UV à la longueur d'onde caractéristique de 266 nm. Des mesures peuvent donc être aisément effectuées dans l'eau sur le surnageant après purification des capsules (Figure 1, courbe bleue claire). Néanmoins il est plus difficile de l'envisager sur le culot (courbe bleu foncé), les nanocapsules sans principe actif, absorbant aussi à cette longueur d'onde (courbe verte). Même si les capsules sont détruites et solubilisées dans un co-solvant du 5-FU, l'absorbance résiduelle du polymère introduit une erreur dans la détermination précise de la concentration de 5-FU.

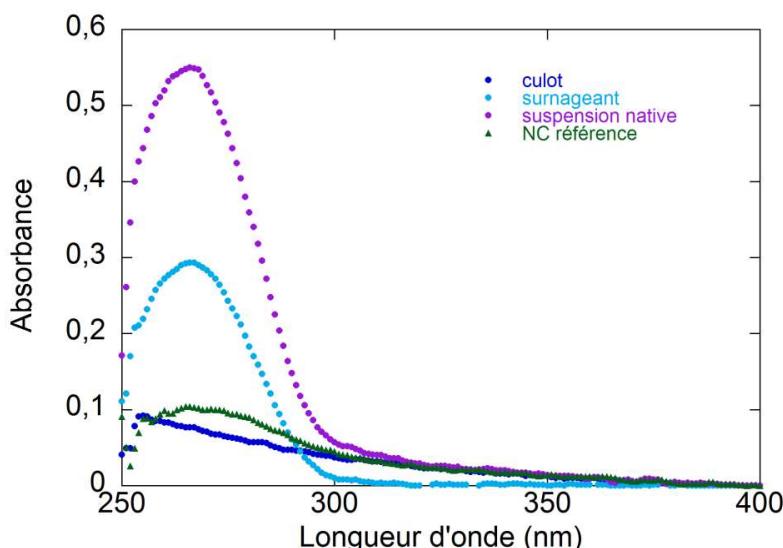


Figure 1 : Spectre UV d'une suspension aqueuse de nanocapsules préparées sans 5-FU (référence en vert) et avec 8 mg de 5-FU (violet) ainsi que ses culot et surnageant correspondants (en bleu).

Le développement d'une autre méthode de quantification était donc indispensable. Le déplacement chimique caractéristique du 5-FU est de -169,2 ppm. Pour mettre au point la méthode de dosage du 5FU par RMN, le temps de relaxation caractéristique de la molécule est mesuré dans l'eau (80/20 H₂O/D₂O). Il est de 5107 ms. Le paramètre d1 (temps de répétition de la séquence RMN) doit ensuite être adapté tel que d1>5T1. Le nombre de scans est ensuite choisi de façon à optimiser la sensibilité. Pour le 5FU, le seuil de détection obtenu avec 64 scans (NS) est d'environ 20 µg/mL.

(soit $0,15 \mu\text{mol/mL}$). L'échantillon à doser (nanocapsules ou étalons) est introduit dans un tube RMN standard de 5 mm, dans lequel est placé un insert coaxial qui contient une solution aqueuse deutérée d'acide trifluoroacétique ($[\text{TFA}]=5,09 \times 10^{-5} \text{ mol/mL}$). Une droite d'étalonnage du 5FU dans l'eau a été établie pour une gamme de concentrations de $4,6 \mu\text{mol/mL}$ à $49 \mu\text{mol/mL}$ et donne : $y=1499x+0,053$ $r^2=0,9993$. Par cette méthode, on peut envisager le dosage simultané du 5FU et du PFOB. Néanmoins cette méthode de quantification est limitée par son temps d'acquisition, de 30 min, imposé par des valeurs de d_1 et NS élevées.

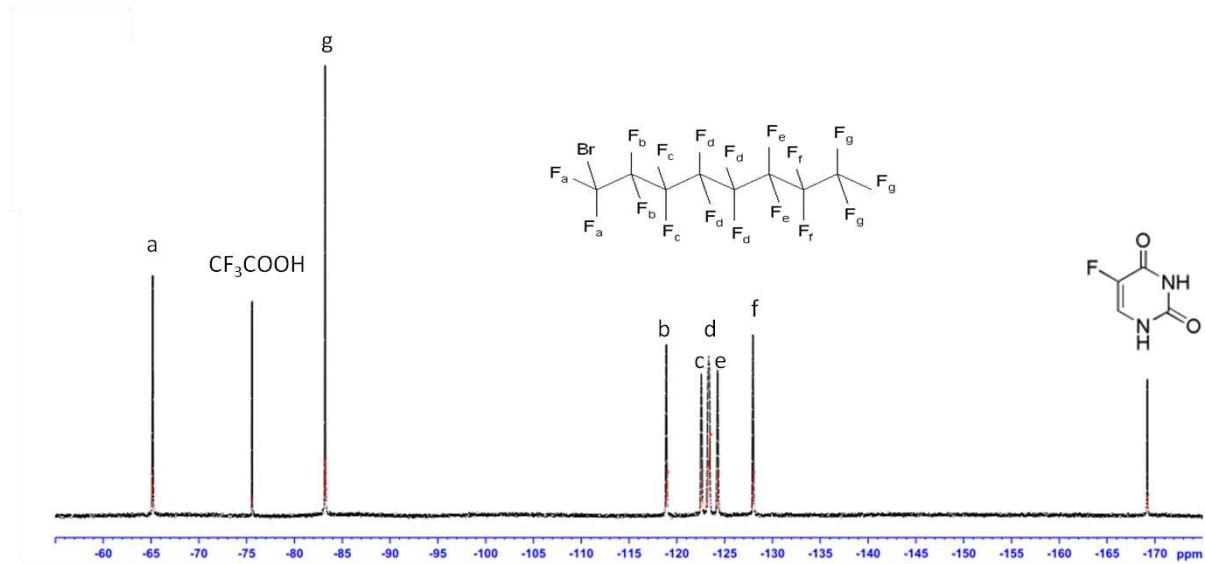


Figure 2 : Spectre RMN du Fluor d'une suspension de nanocapsules de PFOB préparées à partir d'une phase organique contenant du 5-FU. Un insert de TFA est incorporé dans le tube.

Résultats :

Bien que le 5-FU soit une molécule hydrophile, son encapsulation dans des particules de PLGA semble possible par des méthodes classiques de nanoprecipitation et d'émulsion-évaporation, comme l'attestent les travaux de Gupte et al. (Gupte *et al.* 2004), Zhang et al. (Zhang *et al.* 2007), Faisant et al. (Faisant *et al.* 2006). Le 5-FU est un acide faible de $\text{pK}_{\text{a}_1}=8$ et $\text{pK}_{\text{a}_2}=13$. La forme moléculaire (plus hydrophobe) est donc majoritaire à pH acide (Monnot *et al.* 1990; Singh *et al.* 2005) (Figure 3). L'incorporation du principe actif dans la coque de polymère PLGA devrait donc être favorisée. L'influence du pH de la phase aqueuse sur le taux d'encapsulation par émulsion-évaporation a été étudiée pour plusieurs valeurs de pH de la phase aqueuse (sans tampon pH=7,0 ; tampon citrate à pH=5,4 ; tampon NaOH à pH=8,0).

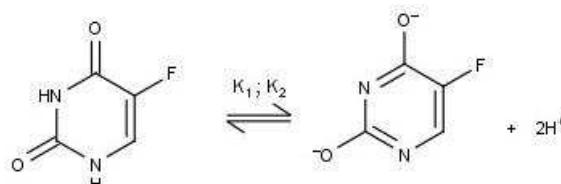


Figure 3 : Espèce moléculaire et ionisée de la molécule de 5-Fluorouracil.

Tableau 2 : Caractéristiques des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG/PFOB préparées avec 8 mg de 5-FU. Rapport de la quantité de 5-FU collectée dans le surnageant sur la quantité initiale utilisée (par UV).

pH	d _H (nm)	PDI	[5FU] _{surnageant} /[5FU] _{initial}
5,4	130	0,12	1,03
7	110	0,15	1,04
8	109	0,14	1,02

La taille et l'indice de polydispersité des nanocapsules purifiées sont peu influencés par le pH de la suspension. Le taux d'encapsulation paraît malheureusement être nul puisque la totalité du 5-Fu incorporé initialement dans la phase organique est retrouvé dans le surnageant après purification des nanocapsules. Toutefois, la technique de spectrophotométrie UV ne permet qu'une mesure indirecte de la teneur encapsulée. La mesure directe peut être effectuée par RMN du ¹⁹F sur le culot redispersé des nanocapsules ou nanoparticules, préparées dans les conditions classiques de pH (sans tampon pH=7) (Tableau 3).

Tableau 3 : Teneur et efficacité d'encapsulation du 5-FU pour des nanocapsules et nanoparticules de PLGA-*b*-PEG (par RMN du ¹⁹F).

	Teneur (µg)/100 mg polymère	η^{5FU} (%)
NC	37	0.47
NP	31	0.39

Comme présagé par spectrophotométrie UV, les quantités de 5-FU mesurées sont effectivement très faibles, et juste supérieures au seuil de détection de la méthode, qui a été évalué à 20 µg/mL.

Pour conclure, l'encapsulation du 5-FU suggérait des opportunités intéressantes pour la thérapie du cancer du côlon puisque la biodistribution de la molécule et sa libération auraient pu être suivies par imagerie ou spectroscopie de résonance magnétique du Fluor. Néanmoins, le procédé d'encapsulation n'est pas maîtrisé. La teneur en 5-FU est beaucoup trop faible pour que la formulation soit acceptable. La dose quotidienne moyenne de 5-FU administrée est en effet de 450 mg/m². On imagine alors ce que pourrait représenter la quantité correspondante en polymère. D'autres perspectives sont évoquées dans la discussion générale quant à l'utilisation des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG/PFOB en tant que vecteur thérapeutique.

Top-down *versus* bottom-up RGD decoration of PEGylated nanocapsules containing a fluorinated core, for $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting and imaging purposes

Odile Diou^{1,2}, Vianney Delplace^{1,2}, Nicolas Mackiewicz^{1,2}, Julien Nicolas^{1,2}, Caroline Robic³, Elias Fattal^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris Sud, LabEx LERMIT, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France.

² CNRS, UMR 8612, 5 rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France

³ Guerbet Research, BP 57400, 95943 Roissy CDG, France

Abstract

PEGylated polyester nanocapsules containing a liquid core of perfluorooctyl bromide (PFOB) were surface-functionalized with a RGD peptide for tumor targeting, by means of the specific interaction between this ligand and $\alpha_v\beta_3$ integrins, overexpressed by neovessels. The ligand was coupled to the block copolymer by two different synthetic pathways, called “top-down” and “bottom-up”. Both of the approaches used carbodiimide-assisted chemistry. The conditions of the reactions were optimized. The efficacy of coupling and the physico-chemical properties of the obtained nanocapsules were evaluated for each approach. The morphology of nanocapsules was studied by Cryo-TEM. The existence of objects with various shapes evidenced the occurrence of complex interfacial phenomena during the formulation process. The surface density of RGD at the nanocapsule surface was precisely determined with a reliable ^1H NMR quantification method. The “bottom-up” approach was more efficient, for RGD coupling, compared to its “top-down” counterpart. Nevertheless, the binding affinity of the RGD-functionalized nanocapsule was weak, when measured by a competitive test with radiolabelled echistatin. Further study with cyclic, instead of linear RGD peptide sequence, would be promising to design novel targeted contrast agent for ^{19}F MRI.

Keywords: PFOB nanocapsules, polylactide, active targeting, RGD, ^{19}F NMR

1. Introduction

Biocompatible and biodegradable polyesters, such as poly(ϵ -caprolactone) (PCL), poly(lactide) (PLA), poly(glycolide) (PGA), and their corresponding copolymers, such as poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) have been widely employed in the field of cancer nanotheranostics (Lammers *et al.* 2010; Kateb *et al.* 2011). Their ease of synthesis, by the well-known ring-opening polymerization process, provides a wide range of (co)polymers, with different architectures and molecular weights, reactive functions, mechanical and self-assembly properties, to design tailor-made nanocarriers (Nijenhuis *et al.* 1992). Nevertheless, these systems often lack persistence in the blood stream and specificity regarding tumor tissues, implying low signal when used as contrast agents for imaging, low treatment efficacy and occurrence of side effects. Consequently, an active targeting strategy should be considered to efficiently image and treat malignant cells. In this view, the most widespread approach is based on the ligand-receptor recognition. Hong and Montet showed that multivalent binding to the cell surface-receptors of tumor significantly enhanced the intracellular uptake and reduced non-specific uptake in off-target organs and associated side effects (Montet *et al.* 2006; Hong *et al.* 2007).

Non-covalent approaches were considered to combine the ligand of interest to the nanotheranostic system by means of electrostatic or hydrophobic interactions (Kocbek *et al.* 2007; Harris *et al.* 2010). Although these reactions are quick, because of their fast kinetic and the lack of gradual modification steps, the spatial orientations of ligands is difficult to control, and desorption after *in vivo* administration may occur. Alternatively, one can benefit from the use of the biotin-avidin ligation strategy, which exhibits the strongest non-covalent binding affinity ($K_d=4 \times 10^{-14} M$) to date (Green 1990). The biotin-avidin “sandwich technique” allowed functionalizing PEGylated chitosan nanoparticles, with OX-26 monoclonal antibody to target the transferring receptors (Aktas *et al.* 2005). However, covalent coupling is often preferred because of its greater stability and simplicity (neither biotinylation nor avidin functionalization with the desired ligand are required). Covalent coupling strategies on nanotheranostics were reviewed by Yu *et al.* (Yu *et al.* 2012). Three main reaction pathways have emerged. Michael addition using maleimide/thiol chemistry was often used, for example to decorate immunoliposomes with antibody for doxorubicin delivery in the tumor (Lu *et al.* 2011) or to functionalize silica nanoparticles, containing Gd chelates and quantum dots (QDs), with RGD peptide for bimodal 1H MR and fluorescence imaging (Koole *et al.* 2008). However this first strategy is limited to thiolated ligands. Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) also arouse considerable interest in the field. This coupling strategy belongs to the class of chemical reactions, often referred as click chemistry, that share several very important features: (i) a

very high efficiency in terms of both conversion and selectivity; (ii) mild experimental conditions; (iii) a simple workup and (iv) little or no by-products (Kolb *et al.* 2001). Nevertheless, prefunctionalization of both the nanocarriers and the ligand is required, degradation and/or loss of functionality of fragile molecules may occur (Thorek *et al.* 2009) and toxicity of Cu catalyst was implied in cases of hepatitis and neurological disorders (Wang *et al.* 2006). Finally, carbodiimide-assisted chemistry and especially the combination of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and *N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) represents the most widely employed coupling strategy (Pan *et al.* 2009) because of its numerous benefits over other ligation approaches: (i) the coupling reagents have little influence on the bioactivity of target molecules; (ii) the efficiency of the activation by NHS is nearly quantitative under mild conditions in water at ambient temperature and (iii) even if side reactions can occur and *O*-acylisourea intermediate can generate desired and undesired products (*e.g.* anhydride and *N*-acyl urea), they can be easily removed by washing with dilute acid or water (Wang *et al.* 2011).

To functionalize polymeric nanoparticle with ligand under EDC/NHS chemistry, two different pathways are possible (Shi *et al.* 2011). The first one is the “top-down” approach and consists in functionalizing preformed nanoparticles in aqueous suspension. Farokhzad *et al.* have chosen this strategy to form aptamer-conjugated PLGA-*b*-PEG nanoparticles for targeted delivery and controlled release of docetaxel. They demonstrated a 77 fold increase of binding to prostate cancer cells *vs* non-targeted polymeric nanoparticles (NPs) (Farokhzad *et al.* 2004) and *in vivo* efficacy in terms of survival (Farokhzad *et al.* 2006). However they finally reconsidered this strategy because of premature drug release during the formulation process and batch to batch variability on the NP surface properties. As a consequence, they have evaluated the “bottom-up” approach, which consists the ligand coupling on the copolymer, further self-assembled into the corresponding targeted NPs. Fahrokhzad *et al.* estimated this approach more controlled and reproducible, and translated their targeted polymeric NPs into development as a product candidate (Bind-014), which entered a phase I clinical trial.

RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid) peptide was often considered for active tumor targeting. RGD peptide binds to overexpressed $\alpha_v\beta_3$ integrins on invasive tumors, like melanomas and glioblastomas and has been hypothesized to be a key regulator of angiogenesis in tumor site (Felding-Habermann 2003) ensuring endothelial cell survival (Brooks *et al.* 1994). PEGylated PLGA nanocapsules of perfluorooctyl bromide (PFOB) were previously used to image colonic tumors by ^{19}F MRI. Nevertheless, the concentration of nanocapsules in the diseased tissue was only about 1% of the injected dose. We considered that the passive targeting strategy (*i.e.*, by the so-called EPR effect) was not efficient enough to provide high accumulation of the contrast agent, required for significant

intensity enhancement of the tumor (Diou *et al.* 2012). Therefore, an active targeting strategy has been envisioned. In this study, PEGylated PLGA nanocapsules, containing a PFOB liquid core, will be surface-functionalized with a RGD peptide. The EDC/NHS chemistry was chosen as the coupling technique, given its advantages, as previously discussed. To the best of our knowledge, articles concerning tumor imaging by ^{19}F MRI with RGD-targeted PFOB nanoparticles are rather scarce. Caruthers *et al.* recently detected and quantified, by ^{19}F and ^1H MRI, RGD-targeted PFOB emulsions in tumor, inoculated in the leg of rabbits. They related the local density of Fluorine to the degree of angiogenesis, correlating well with their physiopathological data (Caruthers *et al.* 2010).

The coupling of RGD on PEGylated PLGA nanocapsules will be optimized by comparing the “top-down” and “bottom-up” synthetic pathways (Figure 1). Since capsule morphology is exquisitely sensitive to interfacial phenomena, occurring during the formulation process, the nanocapsules will be imaged with CryoTEM, before and after surface modification. The PFOB encapsulation efficiency will be assessed by ^{19}F NMR. Finally, the advantages and limitations of both “bottom-up” and the “top-down” strategies will be discussed.

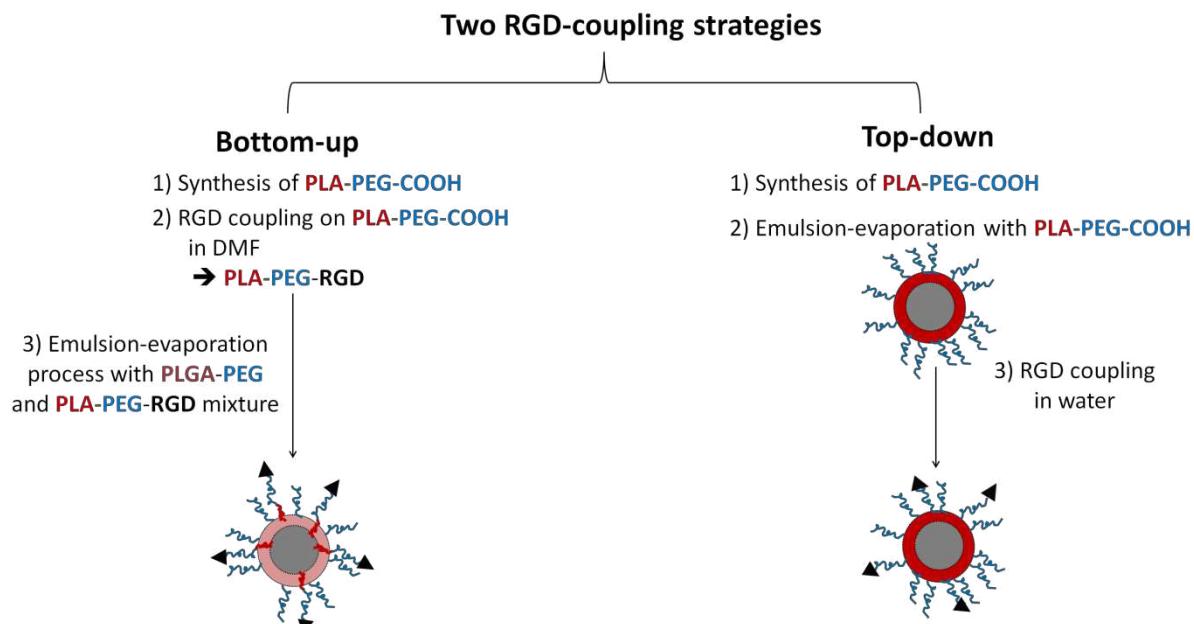


Figure 1: Schematic representation of the two studied strategies to functionalize PEGylated nanocapsules of PFOB with RGD peptide.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents were used without further purification. D,L Lactic acid was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). α -hydroxy- ω -carboxy poly(ethylene glycol) (HO-PEG-NHC(O)CH₂CH₂-COOH, simplified as HO-PEG-COOH, $M_n=4847$ g/mol) was purchased from Iris Biotech GmbH (Germany). Stannous 2-ethyl-hexanoate (stannous octoate, 95%), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), triethylamine (TEA) and sodium cholate were purchased from Sigma-Aldrich (France). Aspartic acid-Glycine-Arginine-Valine-Phenylalanine-Glycine (Asp-Gly-Arg-Val-Phe-Gly), RGD peptide, was a gift of Guerbet, France, synthesized by Bachem (Germany). Poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactide-*co*-glycolide) 50:50 Resomer RGP d 50105 (intrinsic viscosity 0.72 dl/g ; PLGA $M_n=50\,000$ g/mol containing 10 wt% of PEG $M_n=5\,000$ g/mol) was obtained from Boehringer-Ingelheim (Germany). Methylene chloride (CH₂Cl₂) RPE-ACS 99.5% was provided by Carlo Erba Reactifs (France). D₂O and Trifluoro Acetic Acid (TFA) were provided by Sigma Aldrich (France). Perfluorooctyl bromide (PFOB) was purchased from Fluorochem (UK). Water was purified using a using a RIOS/Synergy system from Millipore (France). NMR sample tube and coaxial insert were purchased from CortecNet (France).

2.2. Synthesis of PLA-*b*-PEG-RGD

The synthesis of poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) (PLA-*b*-PEG) depicted in Figure 2, involved a classic ring opening polymerization (ROP) of lactic acid from a hydroxyl end-functionalized poly(ethylene glycol) macroinitiator, in the presence of stannous octoate catalyst (Nijenhuis *et al.* 1992). Glassware and stir bar were dried at 150°C and cooled under a flow of dry nitrogen. To a 50 mL Schlenck tube equipped with ground glass joint and magnetic stir-bar were added lactic acid (7.5 g), HO-PEG-COOH (0.55 g) and stannous octoate catalyst (29.8 mg, 0.7 mol/mol PEG) dissolved into 10 mL of dried toluene. The tube was purged with dry N₂ gas, sealed with a glass stopper, and placed into a 110°C constant temperature oil bath. Polymerization was carried out for 55 min with continuous stirring, and then quenched by immersing the tube in a cold water bath. After evaporation of toluene, the product was purified by precipitation first into cold diethylether, to remove catalyst and unreacted lactide and secondly into water, to remove unreacted PEG. Two polymers P1 and P2 with different lengths of PLA block were synthesized. The final molecular weights were calculated from ¹H NMR spectra: $M_n^{P1} = 41\,810$ g/mol and $M_n^{P2} = 36\,770$ g/mol and dispersities (D) were evaluated by Size Exclusion Chromatography (SEC) as described below at $D^{P1} = 1.12$ and $D^{P2} = 1.14$ respectively.

¹H NMR (0-16 ppm; DMSO-d₆): PLA block δ = 1.48 ppm (m, CH₃) and δ = 5.21 ppm (m, CH) and PEG block δ = 3.52 ppm (m, CH₂-CH₂-O)

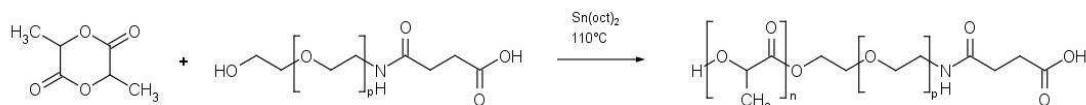


Figure 2: Synthesis of PLA-*b*-PEG-COOH by ROP in solution at 110°C.

PLA-*b*-PEG-COOH was then activated in a one-pot reaction with NHS in the presence of EDC at room temperature and conjugated to the amino-ended RGD peptide (Asp-Gly-Arg-Val-Phe-Gly), as reported before (Deng *et al.* 2006) (Figure 2). Briefly, PLA-*b*-PEG-COOH (0.2 g), NHS (1.2 mg, 2 mol/mol polymer), EDC (1.9 mg, 2 mol/mol polymer), TEA (100 µL) and RGD (10 mg, 2.5 mol/mol polymer) were simply dissolved into 5 mL of dimethylformamide (DMF). The solution was stirred overnight at room temperature, under nitrogen atmosphere. The final conjugated product was precipitated by excess cold ether then into water, to remove unreacted coupling agents and peptide, and freeze-dried for 15 h.

¹H NMR (0-10 ppm; DMSO-d₆): The resonance peaks of PLA block (1.46 ppm and 5.21 ppm) and PEG block (3.52 ppm) appeared together with the characteristic proton peaks of RGD : δ = 7.28 ppm (m, aromatic protons of Phenylalanine) and δ = 0.73 ppm (dd, O=C-CH-CH-(CH₃)₂ of Valine).

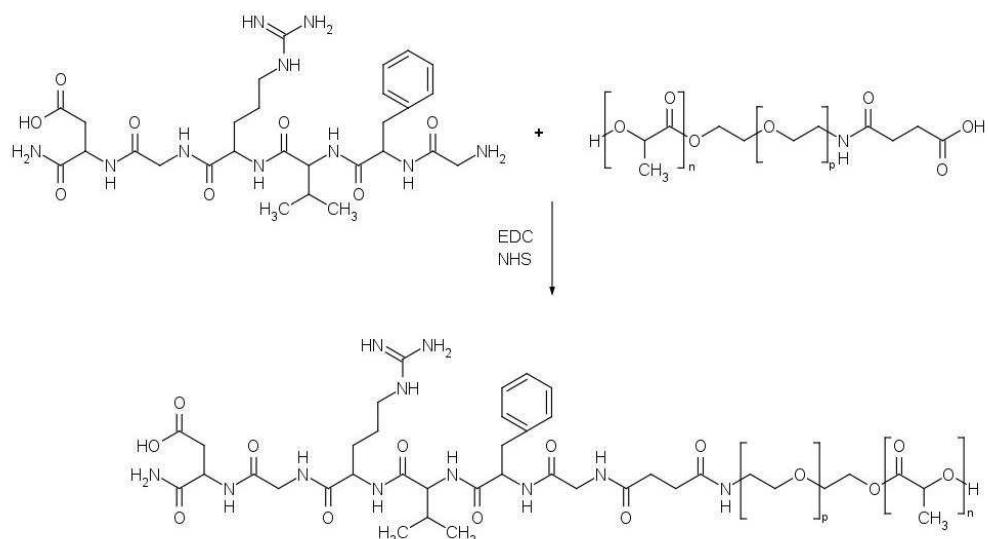


Figure 2: Peptide coupling of RGD (Asp-Gly-Arg-Val-Phe-Gly, M_w = 649 g/mol) and PLA-*b*-PEG-COOH using EDC/NHS chemistry.

2.3. Characterization of PLA-*b*-PEG-RGD

¹H NMR spectroscopy was performed in 5 mm diameter tubes in DMSO-d₆ (δ = 3.33 ppm) on a Bruker Avance-300 (400 MHz) spectrometer and was used to determine the number-average molecular weight (M_n) of the PLA-*b*-PEG copolymer. Size exclusion chromatography (SEC) was performed at

30°C with two columns (PL-gel 5 µm MIXED-D 300 x 7.5 mm) and a differential refractive index detector (Spectrasystem RI-150 from Thermo Electron Corp.). The eluent was chloroform (CHCl_3) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹ and toluene was used as a flow-rate marker. The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards from Polymer Laboratories, Varian Inc. (USA). It was used to determine the dispersity (D) of the copolymers.

2.4. Differential Scanning Calorimetry experiments

A differential scanning calorimeter (DSC 7, Perkin Elmer, USA) was used to measure the glass transitions temperatures (T_g) of PLA-*b*-PEG-COOH, PLGA-*b*-PEG and their blends. Prior to the samples scans, DSC was calibrated using Indium and n-decan references. Sample consisted in thin films of dried polymer. They were prepared from highly concentrated polymer solutions (100 mg/mL) in methylene chloride. The solution was deposited drop-by-drop on the DSC pan allowing gradual evaporation of the inorganic solvent. Thin films polymer samples were heated from 20°C to 150°C at a heating rate of 20°C/min and annealed for 3 minutes. They were rapidly cooled to -40°C at a cooling rate of 50°C/min. After few minutes equilibration, the samples were subsequently scanned from -40 to 100°C at a heating rate of 10°C/min.

2.5. Nanocapsule Preparation

Polymeric nanocapsules of PFOB were prepared by an emulsion-evaporation process described in details elsewhere (Diou *et al.* 2012). PLGA-*b*-PEG, PLA-*b*-PEG-COOH or a mixture of PLGA-*b*-PEG/PLA-*b*-PEG-RGD (100 mg) was dissolved into 4 mL of methylene chloride along with 60 µL of PFOB. The organic phase was emulsified into 20 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip (3374 Digital Sonifier, Branson Ultrasons, France) at 40 %, for 1 min over ice. Solvent was then evaporated by magnetic stirring. The native suspensions of nanocapsules were filtrated through 0.45 µm PVDF filters and purified by ultracentrifugation for 1 h, at 4°C and at 27 440 g (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter) to remove sodium cholate. The pellet was finally resuspended in water to the desired concentration.

2.6. Functionalization on preformed nanocapsules of PLA-*b*-PEG-COOH

After purification, nanocapsules (6.6×10^{-7} mol of PLA-*b*-PEG-COOH) were concentrated and dispersed in 0.8 mL of water. The carboxylic function reacted for 2.5 h with 100 µL of EDC solution (100, 50 or 10 molar equivalent to PLA-*b*-PEG-COOH) and 100 µL of NHS solution (100 or 20 molar equivalent to PLA-*b*-PEG-COOH). Then, 100 µL of a concentrated aqueous solution of RGD was added to the nanocapsule suspension (50 molar equivalent to PLA-*b*-PEG-COOH). The pH of the suspension

dropped to 4 and was adjusted to 8 with concentrated NaOH to ensure deprotonation of the terminal primary amine of RGD. A control reaction was carried out by omitting activation agents (EDC/NHS) and a complete precipitation occurred at that stage. The peptide conjugation reaction was maintained upon magnetic stirring at room temperature (20°C) for 13 h. Finally, nanocapsules were purified by extensive dialysis against 1 mM NaCl (Spectra Por dialysis membrane, Mwco = 50 000 g/mol) to remove the unreacted peptide and reagents.

2.7. RGD coupling efficiency on preformed nanocapsules by ^1H NMR spectroscopy

Standard solutions of RGD in DMSO-d₆ were accurately prepared in NMR sample tubes. An insert containing a solution of valine in D₂O ([valine] = 12.46 mM) was introduced. The integration of the valine peaks from δ = 0.45 to 0.52 ppm was calibrated to 6. The integration of the RGD peak at δ =0.73ppm, as a function of the RGD concentration was plotted as a calibration curve over a concentration range from 0.86 to 3.17 mM ($y = 4.163 \times R^2 = 0.999$). Nanocapsules were freeze-dried and dissolved into a minimal volume of DMSO-d₆ and placed into a NMR tube, containing the valine solution insert. Precise concentration of RGD was then deduced from the calibration curve. The

$$\text{coupling efficiency of RGD was calculated as follow: } \eta_{RGD} = \frac{n_{RGD}}{n_{PLA-b-PEG}}$$

where $n_{PLA-b-PEG}$ is the initial amount of polymer in the formulation, calculated with M_n measured by NMR. $n_{PLA-b-PEG}$ corresponds to the total amount of reactive COOH functions.

2.8. Size and Zeta potential

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of the nanocapsules were measured by quasi elastic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Samples were diluted in water. Measurements were performed at 20°C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering. The counting time was set at 60 s. Zeta potential (ζ) measurements were carried out with the same instrument, at 25°C, in 1 mM NaCl. Measurements were performed in triplicate.

2.9. CryoTEM

Purified nanocapsules (10 mg/mL) were deposited onto Quantifoil Grids R2/2 (Quantifoil, Germany). The excess of solution was blotted off for 0.7 s using Whatman n°1 filter paper and grids were frozen in liquid ethane using Leica EM GP automatic system (Leica, Austria). All samples were observed under low doses conditions on a JEOL 2100F Transmission Electron Microscope operating at 200 kV.

Images were recorded on a Gatan US 4000 CCD camera (Gatan, USA) and measured using Gatan DigitalMicrograph.

2.10. Determination of PFOB encapsulation efficacy by ^{19}F NMR spectroscopy

The NMR quantitative method using stem coaxial inserts was originally proposed by Henderson for ^{31}P compounds (Henderson 2002). It was adapted here for ^{19}F NMR, with a 5 mm dual probe $^{19}\text{F}/^1\text{H}$, to determine the precise concentration of PFOB directly in the aqueous suspension of nanocapsules. A same stem coaxial insert, containing TFA in D_2O as an external standard ($[\text{TFA}] = 6.1 \text{ mM}$), was introduced in the sample tube. The experiment was performed on a Bruker Avance-300 (400 MHz) spectrometer. The total amount of PFOB in the suspension, n , was determined after integration of the peak at -83.2 ppm corresponding to the CF_3 group and normalization by the area of the TFA peak

at -75.6 ppm. Absolute encapsulation efficiency η_{PFOB} was calculated as follows:
$$\eta_{\text{PFOB}} = \frac{n}{n_0}$$

where n_0 is the initial amount of PFOB: 60 μL corresponding to $n_0 = 23.2 \text{ mmol}$.

2.11. Binding test with radiolabelled echistatin

The binding study of functionalized nanocapsules was similar to the one performed by Kumar et al. (Kumar *et al.* 1997). HUVEC cells were amplified in Endothelium Basal Medium (EBM-2) supplemented with Endothelial Cell Growth Medium (EGM-2) additives (Lonza). A solution of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (25 nM) was added to the culture medium 16 h prior to the binding experiments to induce overexpression of $\alpha_v\beta_3$ integrins by the cells. HUVEC cells were suspended in binding buffer (20 mM tris (pH 7.4), 150 mM NaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.5% BSA) at a concentration of 4.10^6 cells/mL. 50 μL of this suspension were distributed in a 96 wells plate. 50 μL of solutions with increasing concentration of nanocapsules were added to each well. The control experiment was performed by replacing the nanocapsules by 50 μL of binding buffer. All the samples were prepared in duplicate. The plate was incubated for 2 h at room temperature under a gentle agitation. Then 50 μL of radiolabelled echistatin-125I-SIB solution ($C_{\text{echistatin}} = 3\text{nM}$ and AS = 17.59 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) were added, followed by a second period of 2 h incubation.

Each sample was collected and transferred into a 200 μL Eppendorf to be centrifuged at 12 000 rpm for 3 minutes. The eppendorf were frozen into liquid nitrogen then cut-off to measure the radioactivity of the pellet of cells and the supernatant with gamma counter. A competitive curve depicted the relative binding of radiolabelled echistatin, defined as the ratio between the

Chapitre 3B : Introduction d'une molécule bioactive pour le ciblage actif de la tumeur

radioactivity of the sample (nanocapsules+echistatin-¹²⁵I-SIB) and the radioactivity of the control (echistatin-¹²⁵I-SIB alone): Binding_{E-125I-SIB} = $\frac{\text{Sample radioactivity (cpm)}}{\text{Control radioactivity (cpm)}} \times 100$.

Data were analyzed with GraphPad Prism® 5.0 software, which provided the IC₅₀ values, corresponding to the concentration of nanocapsules inducing 50 % inhibition of the radiolabelled echistatin binding.

3. Results and discussion

The “bottom-up” approach consisted in first synthesizing a tailored-made polymer, with controlled M_n , low dispersity and functionalized chain ends for further RGD coupling. High molecular weight PLA and a sufficiently long PEG linker were chosen to direct the RGD moiety toward the water/polymer interface during the formation of nanocapsules and to prevent anchoring of the peptide inside the shell. RGD decorated nanocapsules were readily formulated with copolymer blends, containing the functionalized PLA-*b*-PEG-RGD and the commercially available PLGA-*b*-PEG polymer (Figure 1, left). The synthesis of PLA-*b*-PEG-RGD was successfully performed by a simple one-step reproducible protocol as attested by the presence of the two RGD characteristic peaks ($\delta = 7.28$ ppm: aromatic protons of phenylalanine and $\delta = 0.73$ ppm of valine) on the ^1H NMR spectrum of the purified product. Integration of the corresponding peaks compared to those of the PEG block, used as a reference, revealed that the PLA block remains intact under synthesis conditions ($M_{n,\text{NMR}}^{\text{PLA-}b\text{-PEG}} = 41\,810 \text{ g/mol}$, $M_{n,\text{NMR}}^{\text{PLA-}b\text{-PEG-RGD}} = 42\,897 \text{ g/mol}$) and a coupling efficiency of about 40%. SEC chromatograms of the copolymer prior and after coupling did not show any noticeable alteration of the copolymer molar mass upon functionalization (Figure 4).

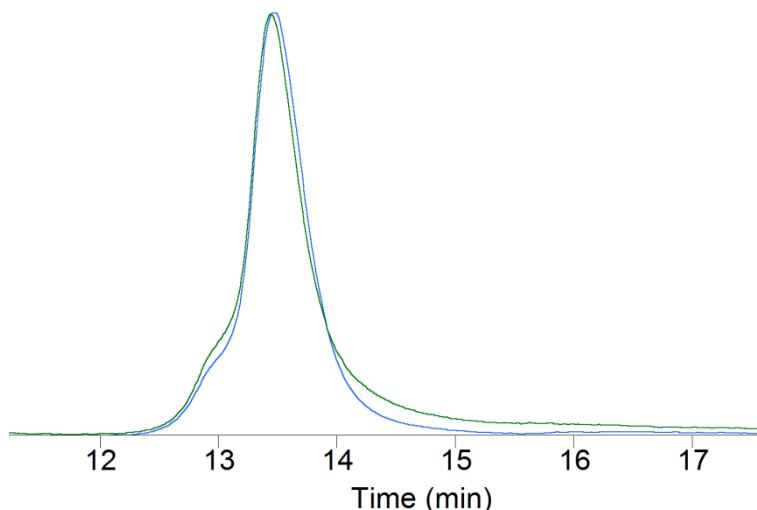


Figure 4: SEC chromatograms of PLA-*b*-PEG (blue) and PLA-*b*-PEG-RGD (green).

However, the copolymer after conjugation, exhibits a slightly lower retention time ($t_R^{\text{PLA-}b\text{-PEG}} = 13.48 \text{ min}$ and $t_R^{\text{PLA-}b\text{-PEG-RGD}} = 13.44 \text{ min}$), due to a higher hydrodynamic volume upon conjugation, but also a low molar mass tail, due to some interaction between the RGD moiety and the column packing.

After PLA-*b*-PEG-RGD synthesis, different amounts were blended with PLGA-*b*-PEG in the organic phase and nanocapsules containing a liquid core of PFOB, were formed by the emulsion-evaporation

process (Diou *et al.* 2012). At the considered initial concentrations, PLA-*b*-PEG-COOH and PLGA-*b*-PEG are fully soluble in methylene chloride. However, it has been shown that the homogeneous mixture of two copolymers may lead to phase nanoseparation as the evaporation proceeds (Matsumoto *et al.* 2005). Therefore, we have blended two structurally similar block copolymers: PLA-*b*-PEG-COOH and PLGA-*b*-PEG, in order to have low Flory-Huggins interaction parameter, which would favor polymers compatibility. As a consequence, with approximately the same molar masses, addition of PLA-*b*-PEG-RGD to PLGA-*b*-PEG matrices should induce the increase of the characteristic length of the domain without any change on its curvature. Moreover, PLA-*b*-PEG-COOH and PLGA-*b*-PEG are amorphous and have comparable glass transition temperatures, T_g ($T_g^{\text{PLA-}b\text{-PEG}} = 20.7^\circ\text{C}$ and $T_g^{\text{PLGA-}b\text{-PEG}} = 17.6^\circ\text{C}$). DSC experiments were carried on films, formed after evaporation of volatile solvent from polymer solutions of different weight fractions: PLA-*b*-PEG-COOH/PLGA-*b*-PEG (5/95) and PLA-*b*-PEG-COOH/PLGA-*b*-PEG (50/50). For both cases, thermal profiles showed only one glass transition temperature, which was very close to the one of PLGA-*b*-PEG. They were respectively 17.6°C for 5 % of PLA-*b*-PEG-COOH and 16.3°C for 50 % of PLA-PEG-*b*-COOH. PEG chains plasticize the mixture of copolymers and induced a decrease of the transition temperature. This comforts the potential compatibility between the PLA-*b*-PEG-COOH and PLGA-*b*-PEG copolymers inside the film and by analogy, inside the nanocapsule shell. The size of mixed nanocapsules ($d_H = 126 \text{ nm}$ and 131 nm) was only slightly increased, compared to PLGA-*b*-PEG reference nanocapsules ($d_H = 120 \text{ nm}$). The polydispersity index remained satisfying with values below 0.2. The Zeta potential decreased as the PLA-*b*-PEG-RGD ratio increased, which may be assigned to the deprotonated carboxy functions, remaining from the incomplete coupling reaction of PLA-*b*-PEG-COOH (Table 1).

Table 1: Characterization of nanocapsules prepared with a mixture of PLGA-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG-RGD.

% PLA-PEG-RGD	$N_{\text{RGD/capsules}}$	$d_H (\text{nm})$	PDI	$\zeta (\text{mV})$
0	0	120	0.14	-31 ± 10
5	122	126	0.19	-35 ± 9
25	609	131	0.18	-38 ± 10

The nanocapsules were then imaged by Cryogenic Transmission Electron Microscopy (CryoTEM). Nanocapsules prepared with 100 % of PLGA-*b*-PEG show well-defined core shell morphology. The PFOB core, with high electronic density, appeared black and was centered inside the lighter shell of PLGA-*b*-PEG. As noted previously (Chapter 2), the membrane thickness was polydisperse within the sample (Figure 5A). When 5 % (w/w) of PLA-*b*-PEG-RGD was introduced in the polymer mixture, a few acorn objects appeared together with nanocapsules (Figure 5B). At 25 % (w/w) of PLA-*b*-PEG-RGD, only acorn objects were observed (Figure 5C). To determine if the variation of

nanocapsule morphology was simply due to the insertion of a second polymer inside the PLGA-*b*-PEG film, nanocapsules prepared with 25 % of PLA-*b*-PEG-COOH were imaged (Figure 5D). Only acorn objects were detected. To conclude, RGD was not responsible of these morphological changes. Similar acorn objects were obtained in case of unsuitable surfactant (Pisani *et al.* 2006) or large weight fractions of two different polymers (poly(methyl methacrylate) and poly(styrene)) blended in a common solvent (toluene) (Saito *et al.* 2007) and were related to dewetting transition. In the present case, this phenomenon may be due to interfacial tension inhomogeneities among the droplet, wherein two different surface active copolymers coexist. In another way, small differences of solubility parameters of PLA-*b*-PEG-COOH and PLGA-*b*-PEG in methylene chloride may induce precipitation of one polymer before the other, as evaporation proceeds. Acorn objects are undesirable because they are probably less stable. Besides, non spherical particles induce higher complement activation (Moghimi *et al.* 2011) and faster Reticulo Endothelial System (RES) recognition. Finally, from a statistical point of view, ligand-integrin interactions occurrence is decreased if RGDs are clustered on one side of the particle. Thus, steric hindrance may happen when RGDs are too close to each other.

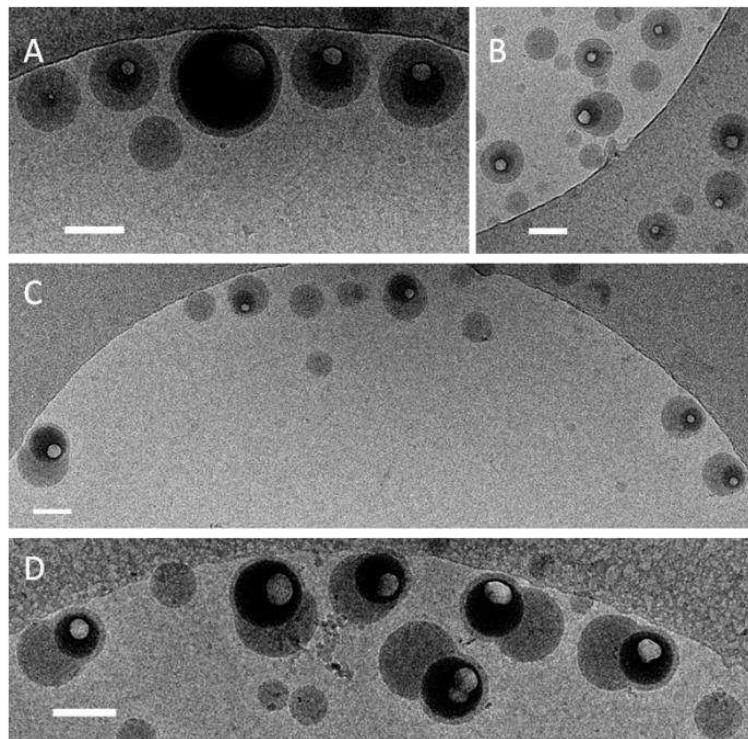


Figure 5: CryoTEM images of nanocapsules: A) PLGA-*b*-PEG B) PLGA-*b*-PEG + 5%PLA-*b*-PEG-RGD C) PLGA-*b*-PEG + 25% PLA-*b*-PEG-RGD and D) PLGA-*b*-PEG + 25% PLA-*b*-PEG-COOH (scales bars are 100nm).

To conclude, decoration of nanocapsule surface while maintaining a well-defined core shell morphology was only possible with 5 % of PLA-*b*-PEG-RGD. The corresponding number of RGDs per

capsule is estimated to be 112, which may be too low to favor active targeting *in vivo*. Indeed, Winter et al. reported high tumor accumulation and anti-angiogenic activity of their fumagillin loaded PFC nanoparticles, when they were each functionalized with 300 ligands (Winter *et al.* 2008). Therefore, the top-down strategy was considered to provide a better control of the nanoparticulate morphology together with a better RGD decoration, required for enhanced affinity for $\alpha_v\beta_3$ integrins.

First, PFOB nanocapsules were prepared with the synthesized PLA-*b*-PEG-COOH. Then, EDC and NHS were introduced to activate the carboxy moieties on PEG end-chains. Finally, the ligand was added in basic water ($\text{pH} = 8$) to favor the creation of stable amide bond by reaction of the succinimide-ended PEG and the terminal primary amine of RGD. Although many authors used this same strategy to functionalize nanoparticles, detailed information about the reaction conditions, such as concentration of nanoparticles and coupling reagents or pH, were rather scarce and strongly vary from one study to another. For instance, Sam *et al.* advise to use equivalent concentration of EDC and NHS, comprised between 5 and 10 mM, to limit the formation of the *N*-acylurea and anhydride side-products (Sam *et al.* 2010), whereas Wang *et al.* chose to use 10 times higher concentration with twice amount of NHS compared to EDC, to optimize the activation yield (Wang *et al.* 2011). In this context, we tried to use various amounts and ratios of EDC and NHS, expressed as the equivalent molar quantity of PLA-*b*-PEG-COOH chains. Amino-terminated molecule is always introduced in a large excess as it is the case here (50 molar equivalent of PLA-*b*-PEG-COOH). After the reaction and purification by dialysis, the pH recovered its neutral value. Nanocapsules did not aggregate and remain stable in water. The activation and coupling reactions did not induce any size or polydispersity increase, as attested by dynamic light scattering measurements. On the contrary, zeta potential values increased from -44.5 mV to around -38.0 mV, evidencing the successful coupling of deprotonated carboxy function to RGD. Before functionalization, Farohzad *et al.* measured a similar zeta potential value: -42 mV for their nanoparticles of PLA-*b*-PEG-COOH (Farokhzad *et al.* 2006). In addition, no loss of PFOB occurred as attested by the PFOB encapsulation efficiencies (Table 2). After characterization, nanocapsules were dissolved into DMSO and precise information about the chemical structure of the final product can be deduced. As PFOB is not soluble in DMSO, it sedimented at the bottom of the NMR tube, without disturbing the NMR measurement. Considering the NMR spectrum, the hydrophobic PLA block remained intact and was not hydrolyzed under basic conditions of the coupling reaction (before: $M_{n, \text{NMR}}^{\text{PLA}} = 32\ 568 \text{ g/mol}$ vs. after: $M_{n, \text{NMR}}^{\text{PLA}} = 37\ 824 \text{ g/mol}$) (Figure 6). The presence of the two characteristic peaks of RGD ($\delta = 7.28 \text{ ppm}$ corresponding to phenylalanine and $\delta = 0.73 \text{ ppm}$ corresponding to valine) attested the efficient coupling of RGD to the copolymer. The introduction of an insert, containing an external standard solution of valine, inside the sample tube, allowed the precise and reliable quantification of RGD content. The coupling

efficiency slightly depends on the EDC/NHS ratio. It was 15.6 % for ratio 1/1 and 14.3 % for 1/2. However large excess of activation agents was required to achieve around 15 % of activation.

Table 2: Characterization of functionalized nanocapsules, prepared by the “top-down” approach, at the end of the preparation and purification process.

EDC/NHS	η_{RGD} (%)	N _{RGD/capsules}	d _H (nm)	PDI	ζ (mV)	η_{PFOB} (%)
0	0	0	121	0.17	-45 ± 9	87
100/100	15.6	951	117	0.17	-38 ± 9	89
50/100	14.3	871	118	0.17	-38 ± 9	92
10/20	8.9	542	-	-	-	-

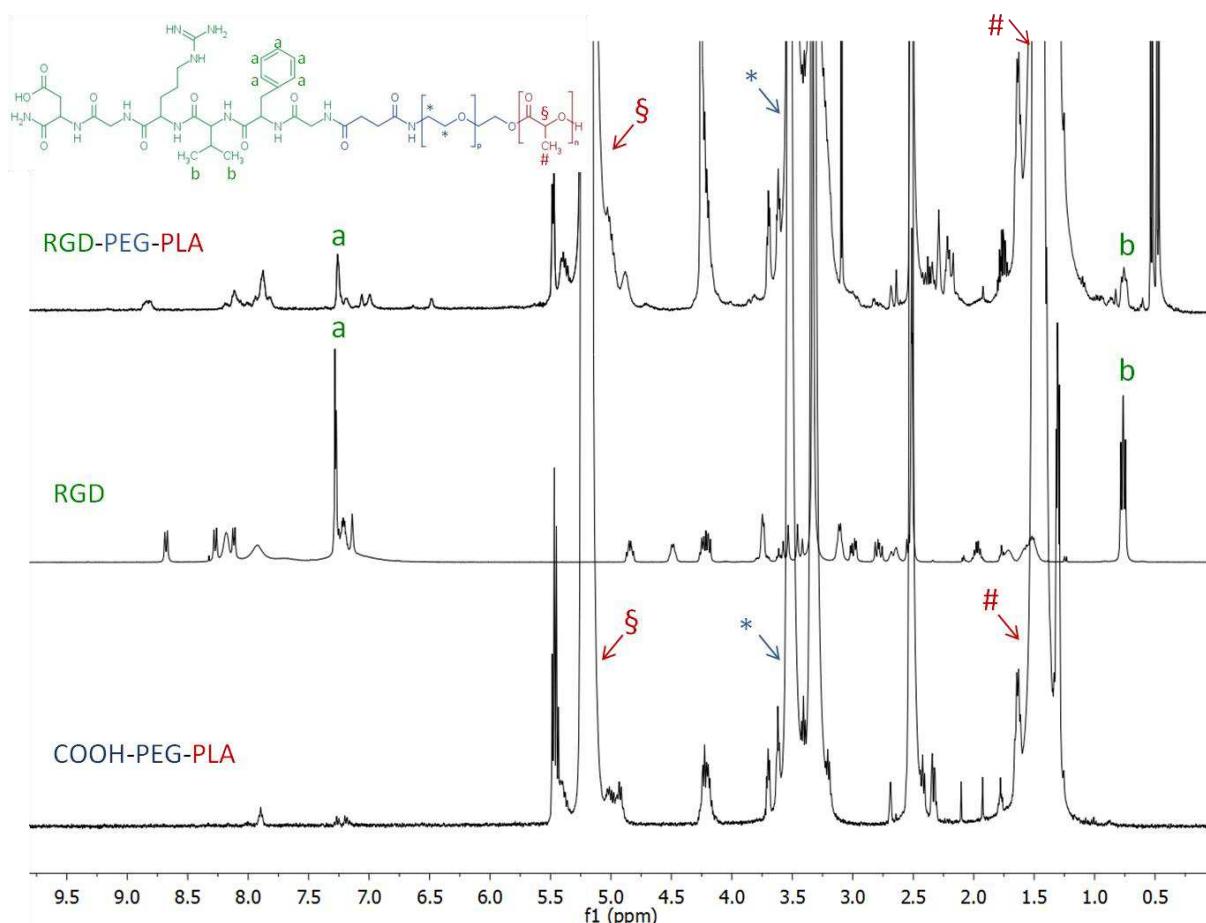


Figure 6: ^1H NMR spectra of PLA-*b*-PEG-RGD (top), RGD (middle) and PLA-*b*-PEG-COOH (bottom) in DMSO- d_6 . From 0 to 8 ppm: $\delta = 0.45$ ppm (CH_3 of valine in the insert); $\delta = 0.73$ ppm (b: CH_3 of valine on RGD); $\delta = 1.48$ ppm (#: CH_3 of PLA block); $\delta = 3.30$ ppm (DMSO); $\delta = 3.52$ ppm (*: CH_2 of PEG block); $\delta = 5.21$ ppm (§: CH of PLA block) and $\delta = 7.28$ ppm (a: aromatic protons of phenylalanine on RGD).

CryoTEM observations were carried on PLA-*b*-PEG-COOH nanocapsules prior to RGD functionalization. Contrarily to nanocapsules made of PLGA-*b*-PEG, those deriving from PLA-*b*-PEG-COOH were not all perfectly spherical (Figures 5A and 7A). Different morphologies were observed: spherical, oblate and “tears of wine” like. The electrostatic repulsions between

deprotonated carboxy functions, at nanocapsule surface, may induce an increase of the total surface area. Thus, the nanocapsules adopt more elongated shape to drive as many PLA-*b*-PEG-COOH chains as possible, at the water interface. In some cases instabilities occurred. If evaporation is not homogeneous, a rapid decrease of the interfacial tension at one side of the droplet causes the methylene chloride to flow away by Marangoni effect, dragging the solvated PLA-*b*-PEG-COOH chains to the other side of the droplet. As a consequence the “tears of wine” like droplets were formed. Besides, the contrast of the polymeric shell seemed to be lightened. The PLA-*b*-PEG-COOH capsules are probably less dense than their PLGA-*b*-PEG ($D>2$), with average $M_n= 50\,000$ g/mol contains smaller chains, which swelled up the shell of the capsule. The corresponding “wet-brush” model was already studied for copolymer/homopolymer blends (Dai *et al.* 1992). After functionalization, the morphology of the nanocapsules did not change. Spherical nanocapsules remained along with oblate and “tears of wine” like objects (Figure 7B).

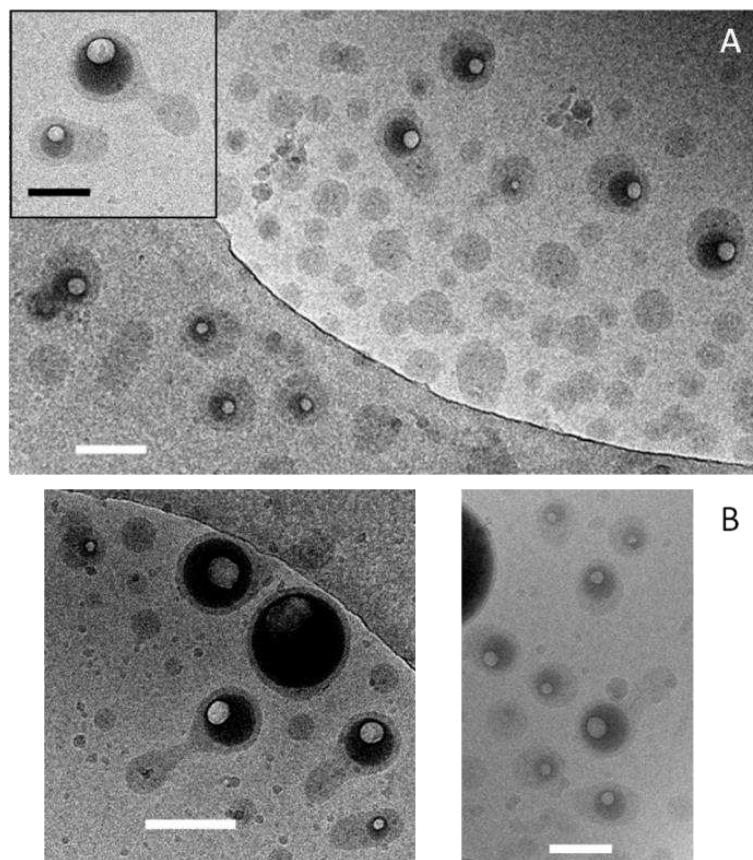


Figure 8: CryoTEM images of nanocapsules: A) PLA-*b*-PEG-COOH B) RGD functionalized nanocapsules scales bars are 100nm.

By the “top-down” approach, the functionalization efficiency was higher than the “bottom-up” approach as the number of RGDs at nanocapsule surface reached up to 950. Nevertheless, the spherical shape of particles was again difficult to maintain. Moreover, another important limitation

of this approach is the large excess quantity of required peptide. Kocbek and Natarajan, who used this technique with antibodies, noticed that typically, no more than 1 to 20 % of the initial amount of ligand could be coupled (Kocbek *et al.* 2007; Natarajan *et al.* 2008). The affinity of these functionalized-RGD nanocapsules for $\alpha_v\beta_3$ integrins, expressed by HUVEC cells, was evaluated by a competitive test with radiolabelled echistatin. The measured radioactivity was almost constant along the studied concentration range of nanocapsules (Figure 9). Hence, the binding of competitive radiolabelled echistatin was not inhibited by the functionalized nanocapsules. The slight decrease of radioactivity for large concentrations ($C = 25$ mg/mL) was also noted for non-functionalized PLGA-*b*-PEG nanocapsules, thus it did not depend on RGD coating. The observed lack of affinity of functionalized nanocapsules may be explained by several hypotheses. First, RGD containing protonated function at pH 7, electrostatic interactions between RGD and carboxylated moieties, remaining from non-functionalized polymer chains, may compete with ligand-receptor interactions. Second, the used peptide coupling strategy was not specific. Up to now, we assumed the primary amine of the glycine, at the end of the peptide chain, was the most reactive moiety to carboxy functions. Nevertheless, coupling reaction on one or the other NH_2 -containing amino acids would result in dramatic loss of ligand activity (Fisher *et al.* 1993). Finally, the low value of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for the considered linear RGD sequence may imply the weak affinity of the nanocapsules. Indeed, the IC_{50} of the initial monovalent peptide is 80 μM while it was evaluated at 382 nM, by a similar competitive test with HUVEC, for cyclic RGD sequence c(RGDfK) (Temming *et al.* 2006).

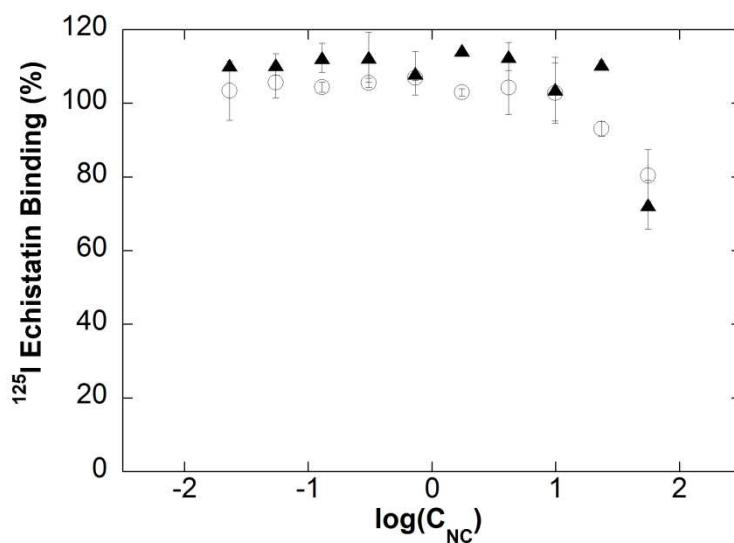


Figure 9: Binding affinity was detected by competition between ^{125}I -Echistatin and increasing concentrations of bare (circles) and RGD-functionalized (triangles) nanocapsules for $\alpha_v\beta_3$ integrins on HUVEC. Concentrations were expressed in mg/mL.

4. Conclusion

PEGylated nanocapsules of perfluoroctyl bromide were decorated with RGD peptide by the “bottom-up” and the “top-down” strategies. We evidenced, by Cryo-TEM, that a slight change of polymeric shell material strongly influenced the nanocapsules morphologies. While, the use of copolymers blends induced the formation of acorn morphologies, PLA-*b*-PEG-COOH lead to spherical, oblate and “tears of wine”-like objects. Further investigations should be performed to better explain the involved interfacial mechanisms. Finally, no specific binding affinity was measured for nanocapsules, despite their successful RGD coating, obtained by the “top-down” approach. The future use of cyclic-RGD peptide would certainly enhance the ligand-integrin recognition ability, in order to design an innovative contrast agent for *in vivo* tumor detection by ^{19}F MRI.

5. Acknowledgements

Authors acknowledge financial support from ANR (Investissements d'Avenir, Nanobiotechnologies, nUCA project). Authors would like to thank Estelle Morvan for fruitful advices about quantification through ^1H and ^{19}F NMR and Gérard Péhau-Arnaudet for CryoTEM experiments. Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- Aktas, Y., Yemisci, M., Andrieux, K., Gursoy, R. N., Alonso, M. J., Fernandez-Megia, E., Novo-Cardalal, R., Quinoa, E., Riguera, R., Sargon, M. F., Celik, H. H., Demir, A. S., Hincal, A. A., Dalkara, T., Capan, Y. and Couvreur, P. "Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26." *Bioconjug Chem* 16(6): 1503-1511 (2005)
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G. and Cheresh, D. A. "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* 79(7): 1157-1164 (1994)
- Caruthers, S. D., Winter, P. M., Wickline, S. A., Lanza, G. M. and Keupp, J. "MR molecular imaging of angiogenesis using targeted perfluorocarbon nanoparticles." *Medicamundi* 54(2): 5-13 (2010)
- Dai, K. H., Kramer, E. J. and Shull, K. R. "Interfacial Segregation in 2-Phase Polymer Blends with Diblock Copolymer Additives - the Effect of Homopolymer Molecular-Weight." *Macromolecules* 25(1): 220-225 (1992)
- Deng, C., Tian, H., Zhang, P., Sun, J., Chen, X. and Jing, X. "Synthesis and characterization of RGD peptide grafted poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)-b-poly(L-glutamic acid) triblock copolymer." *Biomacromolecules* 7(2): 590-596 (2006)
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C. and Fattal, E. "Long-circulating perfluoroctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI." *Biomaterials* 33(22): 5593-5602 (2012)
- Faisant, N., Akiki, J., Siepmann, F., Benoit, J. P. and Siepmann, J. "Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory." *International Journal of Pharmaceutics* 314(2): 189-197 (2006)
- Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P. W., Richie, J. P. and Langer, R. "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6315-6320 (2006)
- Farokhzad, O. C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T. N., Lavan, D. A. and Langer, R. "Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells." *Cancer Res* 64(21): 7668-7672 (2004)
- Felding-Habermann, B. "Integrin adhesion receptors in tumor metastasis." *Clin Exp Metastasis* 20(3): 203-213 (2003)
- Fisher, J. E., Caulfield, M. P., Sato, M., Quartuccio, H. A., Gould, R. J., Garsky, V. M., Rodan, G. A. and Rosenblatt, M. "Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein." *Endocrinology* 132(3): 1411-1413 (1993)
- Green, N. M. "Avidin and streptavidin." *Methods Enzymol* 184: 51-67 (1990)
- Gupte, A. and Ciftci, K. "Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres." *Int J Pharm* 276(1-2): 93-106 (2004)
- Harris, T. J., Green, J. J., Fung, P. W., Langer, R., Anderson, D. G. and Bhatia, S. N. "Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating." *Biomaterials* 31(5): 998-1006 (2010)
- Henderson, T. J. "Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents." *Anal Chem* 74(1): 191-198 (2002)
- Hong, S., Leroueil, P. R., Majoros, I. J., Orr, B. G., Baker, J. R., Jr. and Banaszak Holl, M. M. "The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform." *Chem Biol* 14(1): 107-115 (2007)
- Kateb, B., Chiu, K., Black, K. L., Yamamoto, V., Khalsa, B., Ljubimova, J. Y., Ding, H., Patil, R., Portilla-Arias, J. A., Modo, M., Moore, D. F., Farahani, K., Okun, M. S., Prakash, N., Neman, J., Ahdoot, D., Grundfest, W., Nikzad, S. and Heiss, J. D. "Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy?" *Neuroimage* 54 Suppl 1: S106-124 (2011)

- Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. and Kristl, J. "Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody." *J Control Release* 120(1-2): 18-26 (2007)
- Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." *Angew Chem Int Ed Engl* 40(11): 2004-2021 (2001)
- Koole, R., van Schooneveld, M. M., Hilhorst, J., Castermans, K., Cormode, D. P., Strijkers, G. J., Donega, C. D., Vanmaekelbergh, D., Griffioen, A. W., Nicolay, K., Fayad, Z. A., Meijerink, A. and Mulder, W. J. M. "Paramagnetic Lipid-Coated Silica Nanoparticles with a Fluorescent Quantum Dot Core: A New Contrast Agent Platform for Multimodality Imaging." *Bioconjugate Chemistry* 19(12): 2471-2479 (2008)
- Kumar, C. C., Nie, H., Rogers, C. P., Malkowski, M., Maxwell, E., Catino, J. J. and Armstrong, L. "Biochemical characterization of the binding of echistatin to integrin alphavbeta3 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 283(2): 843-853 (1997)
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E. and Storm, G. "Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions." *Mol Pharm* 7(6): 1899-1912 (2010)
- Lu, R. M., Chang, Y. L., Chen, M. S. and Wu, H. C. "Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery." *Biomaterials* 32(12): 3265-3274 (2011)
- Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T. and Yoshino, H. "Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide)." *Journal of Controlled Release* 106(1-2): 172-180 (2005)
- Moghimi, S. M., Andersen, A. J., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L. and Hunter, A. C. "Material properties in complement activation." *Adv Drug Deliv Rev* 63(12): 1000-1007 (2011)
- Monnot, E. A., Kindberg, C. G., Johnson, T. S., Riley, C. M., Stobaugh, J. F. and Slavik, M. "Stability of intravenous admixtures of 5-fluorouracil and spirogermanium, a novel combination of cytotoxic agents." *International Journal of Pharmaceutics* 60: 41-52 (1990)
- Montet, X., Funovics, M., Montet-Abou, K., Weissleder, R. and Josephson, L. "Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display." *J Med Chem* 49(20): 6087-6093 (2006)
- Natarajan, A., Gruettner, C., Ivkovic, R., DeNardo, G. L., Mirick, G., Yuan, A., Foreman, A. and DeNardo, S. J. "NanoFerrite particle based radioimmunonanoparticles: binding affinity and in vivo pharmacokinetics." *Bioconjug Chem* 19(6): 1211-1218 (2008)
- Nijenhuis, A. J., Grijpma, D. W. and Pennings, A. J. "Lewis Acid-Catalyzed Polymerization of L-Lactide - Kinetics and Mechanism of the Bulk-Polymerization." *Macromolecules* 25(24): 6419-6424 (1992)
- Pan, D., Lanza, G. M., Wickline, S. A. and Caruthers, S. D. "Nanomedicine: perspective and promises with ligand-directed molecular imaging." *Eur J Radiol* 70(2): 274-285 (2009)
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. and Fattal, E. "Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization." *Langmuir* 22(9): 4397-4402 (2006)
- Saito, N., Kagari, Y. and Okubo, M. "Revisiting the morphology development of solvent-swollen composite polymer particles at thermodynamic equilibrium." *Langmuir* 23(11): 5914-5919 (2007)
- Sam, S., Touahir, L., Salvador Andresa, J., Allongue, P., Chazalviel, J. N., Gouget-Laemmel, A. C., Henry de Villeneuve, C., Moraillon, A., Ozanam, F., Gabouze, N. and Djebbar, S. "Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces." *Langmuir* 26(2): 809-814 (2010)
- Scott, R. L. "The Solubility of Fluorocarbons." *Journal of the American Chemical Society* 70: 4090-4093 (1948)
- Shi, J., Xiao, Z., Kamaly, N. and Farokhzad, O. C. "Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation." *Acc Chem Res* 44(10): 1123-1134 (2011)

Chapitre 3B : Introduction d'une molécule bioactive pour le ciblage actif de la tumeur

- Singh, B. N., Singh, R. B. and Singh, J. "Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum." *Int J Pharm* 298(1): 98-107 (2005)
- Singla, A. K., Garg, A. and Aggarwal, D. "Paclitaxel and its formulations." *Int J Pharm* 235(1-2): 179-192 (2002)
- Temming, K., Meyer, D. L., Zabinski, R., Dijkers, E. C., Poelstra, K., Molema, G. and Kok, R. J. "Evaluation of RGD-targeted albumin carriers for specific delivery of auristatin E to tumor blood vessels." *Bioconjug Chem* 17(6): 1385-1394 (2006)
- Thorek, D. L., Elias, D. R. and Tsourkas, A. "Comparative analysis of nanoparticle-antibody conjugations: carbodiimide versus click chemistry." *Mol Imaging* 8(4): 221-229 (2009)
- Wang, C., Yan, Q., Liu, H. B., Zhou, X. H. and Xiao, S. J. "Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions." *Langmuir* 27(19): 12058-12068 (2011)
- Wang, T. and Guo, Z. "Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design." *Curr Med Chem* 13(5): 525-537 (2006)
- Winter, P. M., Schmieder, A. H., Caruthers, S. D., Keene, J. L., Zhang, H., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. "Minute dosages of alpha(nu)beta3-targeted fumagillin nanoparticles impair Vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits." *FASEB J* 22(8): 2758-2767 (2008)
- Yu, M. K., Park, J. and Jon, S. "Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy." *Theranostics* 2(1): 3-44 (2012)
- Zhang, H., Bei, J. and Wang, S. "Preparation and drug release Behaviors of 5-fluorouracil loaded poly(glycolide-co-lactide-co-caprolactone) nanoparticles." *Journal of Applied Polymer Science* 106(6): 3757-3767 (2007)

Supporting information:

To compare the two coupling strategies, the number of RGD moieties per capsules ($N_{RGD/capsules}$) was calculated for all samples. First the number of polymer chains ($N_{PLGA-PEG}$) within the capsules was determined, when prepared with 100% of PLGA-PEG (Equation 1 and 2). This system was completely studied in previous articles, providing all the data needed, such as ρ_{NC} the density of nanocapsules (1.5 g/cm³), V_{NC} their volume (with $d_H=123\text{nm}$), $m_{NC recovered}$ the mass of capsules recovered after preparation (124mg) and m_{PFOB} the total weight of PFOB in the suspension, deduced from the encapsulation efficiency measurements.

$$N_{PLGA-PEG} = \frac{m_{PLGA-PEG / NC}}{M_{PLGA-PEG}} N_a \quad \text{with} \quad m_{PLGA-PEG / NC} = \frac{m_{NC recovered} - m_{PFOB}}{m_{NC recovered} / \rho_{NC} V_{NC}}$$

$M_{PLGA-PEG}$ is the molecular weight of PLGA-PEG (50 000g/mol)

These calculations resulted in $N_{PLGA-PEG} = 6093$ chains. Second, the $N_{RGD/capsules}$ for the first approach was calculated considering the amount of PLA-PEG-RGD ($N_{PLA-PEG-RGD}$) in the mixture and the 40% coupling efficiency of PLA-PEG as: $N_{RGD/capsule} = \%_{PLA-PEG-RGD} \times 0.4 \times N_{PLGA-PEG}$. For the second approach, $N_{RGD/capsules}$ was directly determined from the coupling efficiency as: $N_{RGD/capsule} = \eta_{RGD} \times N_{PLGA-PEG}$.

Discussion générale

L'enjeu de la thèse était d'élaborer des nanocapsules pour la théranostique du cancer. Trois objectifs devaient alors être atteints. Il s'agissait tout d'abord de concevoir un système de type capsule qui vectorise un agent de contraste et une molécule bioactive vers la tumeur solide, grâce à une approche de ciblage passif et/ou actif. Accumulées dans la tumeur, les capsules permettent alors la visualisation du tissu malade par échographie et IRM du ^{19}F . Le principe actif encapsulé, quant à lui, peut être libéré par diffusion à travers la membrane, qui se dégrade progressivement. Dans cette discussion, nous reviendrons successivement sur ces trois objectifs en confrontant les résultats obtenus à la littérature. De plus, nous mettrons en évidence les forces et les faiblesses du système théranostique conçu.

1. Le vecteur : une coque de polymère fonctionnalisée

Le système vecteur de référence développé par Pisani *et al.* consistait en une nanocapsule polymère biocompatible et biodégradable de PLGA. Certaines limitations affectaient l'efficacité du système *in vivo* : faible rémanence vasculaire, capture rapide par le système réticulo-endothélial (Pisani *et al.* 2008). Des améliorations de la formulation galénique devaient donc être apportées avant de considérer à nouveau l'administration des nanocapsules chez la souris. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la fonctionnalisation de la surface des nanocapsules de PLGA par le PEG, auquel nous avons ensuite lié de manière covalente le peptide RGD.

1.1. Le ciblage passif

Le ciblage passif consiste à augmenter la demi-vie plasmatique et diminuer la capture des nanocapsules par le système réticulo-endothélial, de façon à faciliter leur accumulation dans la tumeur par effet EPR. Dans la partie travaux antérieurs, plusieurs stratégies de ciblage passif ont été évoquées. La stratégie souvent privilégiée est la PEGylation, comme le montre la croissance rapide du nombre de publications annuelles concernant des nanoparticules PEGylées (Figure 1) (Jokerst *et al.* 2011). La fonctionnalisation par les chaînes de PEG contribue à diminuer l'énergie de surface des nanoparticules. Les interactions attractives de Van der Waals sont minimisées et les répulsions stériques favorisées, empêchant ainsi l'agrégation des nanoparticules (Caliceti *et al.* 2003).

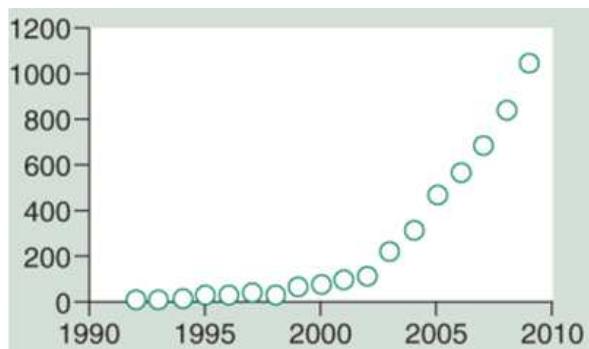


Figure 1 : Evolution du nombre annuel de publications scientifiques concernant des nanoparticules PEGylées.

1.1.1. L'organisation des chaînes de PEG en surface

Pour envisager une bonne couverture des nanocapsules de PFOB par les chaînes de PEG, nous avons choisi de remplacer le PLGA par le copolymère PLGA-*b*-PEG. Lors du procédé d'émulsion/évaporation, les chaînes de PEG s'orientent vers la phase aqueuse alors que les chaînes de PLGA restent confinées au sein de la membrane. Ainsi, en RMN du ^1H , les signaux caractéristiques du PLGA (CH_3 du PLA à $\delta = 1,48$ ppm CH_2 du PGA à $\delta = 4,9$ ppm et CH du PLA à $\delta = 5,21$ ppm dans DMSO-d_6) disparaissent sur le spectre des nanocapsules dispersées dans D_2O . Seul reste le signal des chaînes de PEG ($\delta = 3,74$ ppm). Ces dernières adoptent des configurations à degrés de libertés élevés, comme le démontre l'allure du pic, élargi, en RMN (Hrkach *et al.* 1997) (Figure 2).

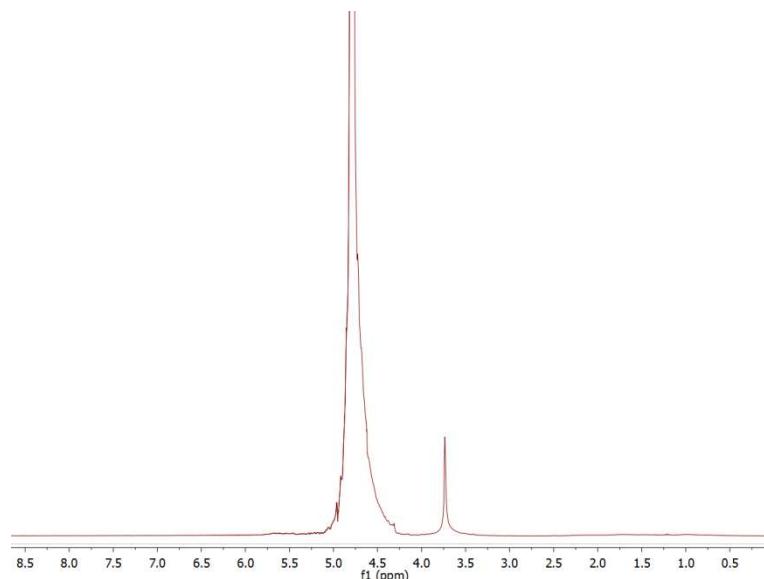


Figure 2 : Spectre ^1H RMN des nanocapsules de PLGA-*b*-PEG/PFOB dispersées dans D_2O (CH_2 du bloc PEG à $\delta=3,74$ ppm et pic de solvant D_2O à $\delta=4,79$ ppm).

Discussion générale

La longueur, la densité de surface ainsi que la conformation des chaînes de PEG doivent ensuite être considérées car elles joueront un rôle crucial sur les performances *in vivo* en termes de ciblage passif, qui seront développées par la suite, dans la partie 1.1.3.

Pour déterminer, de façon précise, la densité des chaînes de PEG en surface des nanoparticules, des méthodes de quantification doivent être mises au point. Elles sont en réalité rares dans la littérature, les auteurs faisant souvent l'approximation que toutes les chaînes de PEG introduites, s'orientent spontanément vers la surface. Quand elles existent, il s'agit de méthodes indirectes mesurant par exemple la fraction de PEG non couplée restante dans le surnageant par HPLC et détection par diffusion de la lumière (Zabaleta *et al.* 2007) ou détection par UV après couplage du PEG avec un chromophore (Jokerst *et al.* 2011). Les méthodes directes quant à elles, nécessitent souvent la dégradation de l'échantillon par dissolution des nanoparticules dans un solvant. L'analyse peut ensuite être menée par RMN (Yoncheva *et al.* 2005), spectrométrie de masse (Auriola *et al.* 1993) ou chromatographie liquide couplée à un réfractomètre (Liu *et al.* 2004). En ce qui nous concerne, nous avons réussi à mettre en évidence de façon qualitative la couverture de PEG par XPS et l'avons quantifiée par diffusion des neutrons (chapitres 1 et 2). Contrairement à l'approximation couramment répandue, nous avons montré que toutes les chaînes de PEG ne s'orientent pas vers l'interface, certaines restent probablement enfouies au sein de la membrane hydrophobe. Selon les résultats obtenus par diffusion des neutrons, les nanocapsules de PFOB comptent 1720 chaînes de PEG en surface, soit 28 % de la quantité totale introduite. Ces nanocapsules ont une taille de l'ordre de 106 nm (d_{SANS}). On peut alors calculer la surface disponible pour une chaîne de PEG, $S_{PEG}=20,5 \text{ nm}^2$, ce qui correspond à une distance inter-PEG $d_{PEG}=4,5 \text{ nm}$. La conformation des chaînes de PEG peut ensuite être décrite grâce au paramètre de Flory, F, tel que $F = \alpha \times n^{3/5}$ où n est le nombre d'unités éthylène glycol (ici n=114) et α sa longueur ($\alpha = 0,358 \text{ nm}$) (De Gennes 1980; De Gennes 1987). Dans notre cas, on trouve $F = 6,1 \text{ nm} > d_{PEG}$, la conformation « en brosse » du PEG est donc privilégiée par rapport à la conformation « champignon », qui satisfait la condition $F < d_{PEG}$.

Pour conclure, les nanocapsules de PLGA-PEG/PFOB sont recouvertes de chaînes de PEG de longueur 5000 g/mol, distantes de 4,5 nm et qui adoptent une conformation « en brosse ». Gref *et al.* ont étudié diverses nanoparticules PEGylées : à partir de PCL-*b*-PEG, PLGA-*b*-PEG, PLA-*b*-PEG ainsi que des mélanges PEG-*b*-PLA : PLA. La longueur du bloc hydrophile variant de 2000 à 20 000 g/mol. Ils ont évalué qu'une couverture de PEG₅₀₀₀ avec une distance inter-PEG de 1,4 nm était optimale pour assurer la furtivité *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules (Gref *et al.* 2000; Mosqueira *et al.* 2001). Szleifer *et al.* préfèrent, quant à eux, utiliser un PEG plus court (PEG₂₀₀₀) (Szleifer 1997). On peut donc se demander ce qu'il en est de nos systèmes et de leur furtivité.

1.1.2. Evaluation *in vitro* de la furtivité

Comme évoqué précédemment, avant de pouvoir bénéficier de l'accumulation dans la tumeur par effet EPR, nous devons assurer la furtivité des nanocapsules de PFOB vis à vis du système réticulo endothéial. Ce dernier est mobilisé après activation du complément. Le système du complément est complexe, il est composé d'une trentaine de protéines pouvant être activées par trois voies différentes : classique, alternative et lectines dépendante. Ces mécanismes résultent de la sécrétion d'une enzyme, la C3 convertase, responsable du clivage de la protéine C3 en fragments C3a et C3b. Suivra ensuite l'adsorption des opsonines (C3b, IgG...) sur la nanocapsule puis leur reconnaissance rapide par les cellules porteuses des récepteurs membranaires correspondants (cellules de Kupffer, macrophages, monocytes...) (Figure 2). Les nanocapsules seront finalement acheminées et séquestrées dans le foie ou la rate.

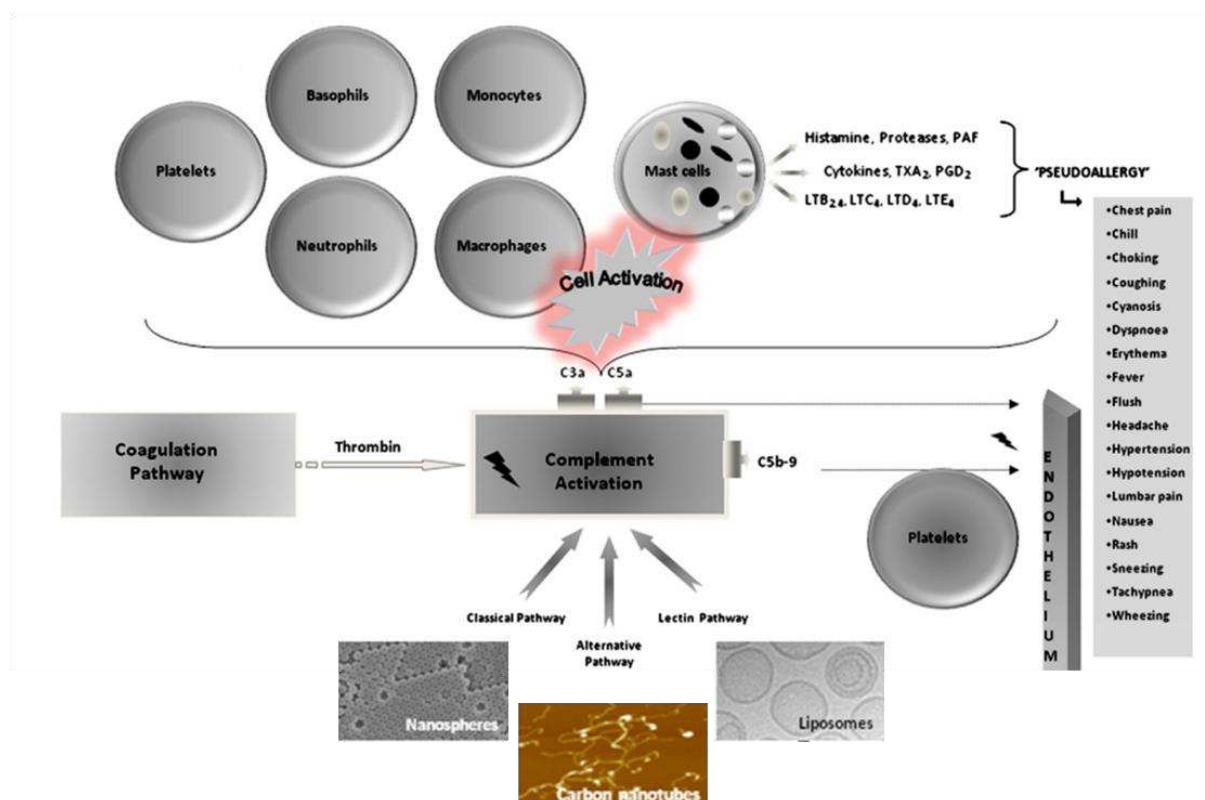


Figure 2 : Réponse cellulaire lors de l'activation du complément et symptômes cliniques associés.

Il a été montré que l'activation du complément dépend de nombreux paramètres, tels que la morphologie, la taille, la courbure ou la charge de surface des nanovecteurs. De plus, la chimie de surface doit être contrôlée. En effet, les fonctions amines ou hydroxy, nucléophiles, doivent être évitées puisqu'elles favorisent l'interaction covalente avec le carbone thiolé, électrophile, du fragment C3b (Figure 3) (Moghimi *et al.* 2011).

Discussion générale

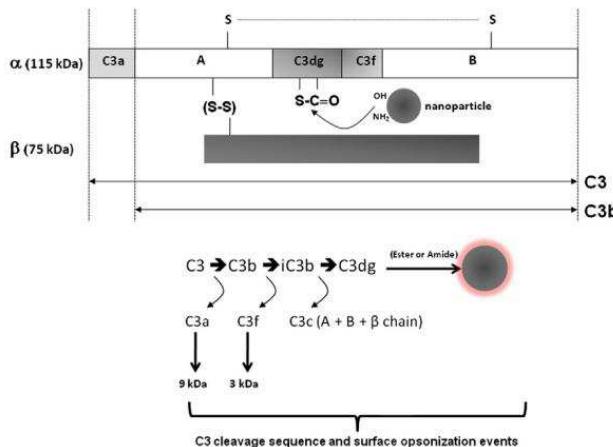


Figure 3 : Structure schématique de la protéine C3. Lors du clivage de la protéine C3 en C3b, le groupement ester thiolé (situé sur la portion C3dg) peut réagir avec la surface de nanoparticules hydroxy ou amine terminé.

Dans notre cas, les nanocapsules PEGylées de PFOB ont un diamètre de 120 nm (en diffusion de la lumière, d_{DDL}) et possèdent une surface hydrophile. Les chaînes de PEG portent un groupement terminal methoxy, peu réactif et souvent considéré comme neutre vis à vis de la réponse immunitaire (Jokerst *et al.* 2011). Conformément aux travaux de Vauthier *et al.*, on peut ensuite prévoir l’adsorption des protéines plasmatiques, qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance et l’élimination des nanocapsules PEGylées par le système immunitaire. On estime alors une probabilité

d’insertion de la protéine, P_{insert} telle que $P_{insert} = \exp\left(-\frac{S_{prot}}{S_{PEG}}\right)$. Pour l’albumine et le fibrinogène, les

valeurs de S_{prot} sont respectivement de 26 nm^2 et 10 nm^2 . Les probabilités d’insertion correspondante sont $p_{BSA} = 0,28$ et $p_{fibrinogène} = 0,61$. Ces valeurs sont non négligeables, et pourraient traduire une mauvaise furtivité des nanocapsules, ce qui remettrait en cause notre stratégie de ciblage passif. En ce qui concerne le fragment C3b du complément ($S_{C3b} = 40 \text{ nm}^2$ (Janssen *et al.* 2006)) son adsorption semble peu favorable, comme le démontre la faible probabilité d’insertion de la protéine entre les chaînes de PEG : $p_{C3b} = 0,14$. Ces prédictions sont à considérer avec précaution. Vauthier *et al.* ont noté des divergences expérimentales par rapport à leurs estimations théoriques (Vauthier *et al.* 2011). C’est pourquoi, il serait préférable d’utiliser l’électrophorèse bi-dimensionnelle PAGE, pour décrire de façon empirique et plus approfondie l’adsorption des protéines plasmatiques. Cette technique permettrait de plus d’élargir le catalogue des protéines plasmatiques aux IgG, ApoA, ApoE (Gref *et al.* 2000).

Dans notre cas, nous nous sommes uniquement intéressés à la protéine C3 et à sa propension à se cliver en fragments C3a et C3b au contact des nanocapsules. Ce phénomène est mis en évidence par immunoélectrophorèse 2D et quantifié par le facteur d’activation, CAF. Pour les nanocapsules PEGylées, le CAF reste faible ($CAF = 11 \pm 2 \%$) et ce, même pour des concentrations élevées, utilisées

lors des injections *in vivo*. Nous pouvons noter que la concentration en PEG₅₀₀₀ correspondante, de 8×10^{-2} mM, reste très inférieure à 5 mM, concentration évaluée comme significativement activante du complément par Hamad *et al.* (Hamad *et al.* 2008).

1.1.3. Evaluation *in vivo* de la furtivité

Grâce à la faible activation du complément et à la configuration en brosse du PEG à la surface des nanocapsules de PFOB, on peut leur prédire un temps de rémanence vasculaire prolongé (Moghimi *et al.* 2003). Le temps de demi-vie idéal pour une application en tant qu'agent de contraste est de l'ordre de 2 à 6 h. Le délai entre l'injection et le moment d'observation est suffisamment long pour permettre l'accumulation dans la tumeur et l'élimination par les organes compétiteurs, tout en étant suffisamment court pour recueillir des données rapidement. En thérapie, le temps de demi-vie est généralement plus élevé pour permettre une exposition répétée de la zone malade. Par le passé, la PEGylation de protéines, nanoparticules et liposomes a permis un allongement considérable de la demi-vie plasmatique (Tableau 1).

Tableau 1 : Influence de la PEGylation de nanoparticules sur leur temps de demi-vie plasmatique

Système (taille)	Modèle <i>in vivo</i>	Longueur du PEG (g/mol)	t _{1/2} plasma avant/après PEGylation	Référence
Particules de latex (75 nm)	Rat sain	PEO- <i>b</i> -PPO- <i>b</i> -PEO ($M_w > 13000$ g/mol)	20 min / 13 h	Tan, Biomat, 1993
Liposomes (200 nm)	Souris saine	5000 g/mol	30 min / 5 h	Klibanov, FEBS Lett, 1990
Liposomes Doxil® (90 nm)	Chien	2000 g/mol	13 h/29 h	Gabizon, Pharm Res, 1993
Particules de PCL (200 nm)	Souris nude	PEO- <i>b</i> -PPO- <i>b</i> -PEO ($M_w = 14600$ g/mol)	-/25 h	Shenoy, Pharm Res, 2005

Un ingénieux modèle a même été développé par Li *et al.* pour prédire les paramètres pharmacocinétiques (coefficients d'absorption ou d'excrétion et de partition tissu/sang) de nanoparticules de PLGA-*b*-PEG en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (taille : x₁, pZ : x₂ et densité de PEG en surface : x₃). Ils ont confirmé la validité de leur modèle en se basant sur des données physiologiques expérimentales obtenues au préalable avec 6 types de nanoparticules. Ils proposent notamment une linéarisation du coefficient d'absorption telle que k_i=Ax₁+Bx₂+Cx₃+Intercept et déterminent les constantes A, B, C et Intercept pour chaque organe ou compartiment i (poumons, rate, reins, sang). On peut ensuite en déduire le temps caractéristique d'accumulation tel que t_{1/2}=ln2/k_i (Li *et al.* 2012).

En ce qui nous concerne, une étude pharmacocinétique complète de la biodistribution des nanocapsules n'a pas pu être menée. Il était difficile d'envisager des prélèvements sanguins réguliers chez une même souris, pour y mesurer *a posteriori* la quantité de PFOB par RMN du ^{19}F . Le volume sanguin de la souris est en effet trop faible et l'accès au spectromètre de résonance magnétique était limité. Nous avons pu tout de même déterminer un temps caractéristique d'accumulation dans le foie de 24 et 14 min pour les nanocapsules PEGylées et non PEGylées, respectivement. Ces valeurs ne peuvent malheureusement pas être comparées à celles prédictes par le modèle de Li *et al.* En effet, pour le foie, la relation propriété/biodistribution des nanoparticules n'est plus linéaire ($R^2=0,67$). En revanche, Mosqueira *et al.* ont établi une corrélation entre le temps caractéristique d'accumulation dans le foie et la rémanence vasculaire, pour des nanocapsules de PLA et PLA-*b*-PEG₅₀₀₀, de diamètre moyen 147 nm. Ils ont montré que l'utilisation du copolymère PEGylé impliquait : un ralentissement de la capture hépatique (avec des temps caractéristiques de 12 à 100 minutes pour le PLA et le PLA-*b*-PEG respectivement) aussi bien qu'une augmentation du temps de résidence moyen dans la circulation sanguine (de 70 à 140 minutes) (Mosqueira *et al.* 2001). Nos systèmes ont des caractéristiques physico-chimiques proches de ceux développés par Mosqueira *et al.* Par analogie, nous pouvons donc supposer la bonne furtivité *in vivo* des nanocapsules PEGylées de PFOB. Néanmoins, il serait intéressant d'approfondir l'étude de biodistribution. On pourrait alors envisager de développer, un modèle *in vivo* chez le rat immunodéprimé, pour lequel la pose d'un cathéter est réalisable, ou encore de sacrifier la souris pour chaque temps de la pharmacocinétique, méthode souvent retrouvée dans la littérature (Peracchia *et al.* 1999).

1.1.4. Les inconvénients des systèmes PEGylés et du ciblage passif en général

La PEGylation est une stratégie vieille de plus d'une trentaine d'année. Elle a été et continue d'être approuvée pour le développement clinique de protéines (Alconcel *et al.* 2011) ou de liposomes furtifs (Immordino *et al.* 2006). Néanmoins certains chercheurs remettent régulièrement en cause l'utilisation du PEG, en démontrant l'immunogénicité et l'antigénicité de la molécule chez l'homme et le lapin (Richter *et al.* 1984; Sherman *et al.* 2012). Précisons qu'il s'agit souvent de chaînes de masses molaires élevée ($M_n > 10\,000 \text{ g/mol}$). De plus, la PEGylation est souvent associée à une diminution de l'efficacité de transfection des nanovecteurs, limitant l'accessibilité du principe actif à sa cible biologique intracellulaire (Bally *et al.* 1999). C'est pourquoi, certains auteurs ont mis au point des systèmes comportant une liaison PEG-nanoparticule, par pont disulfure, qui est clivée en conditions réductrices, dans les endosomes par exemple (Zalipsky *et al.* 1999; Takae *et al.* 2008).

Comme souligné précédemment, la stratégie de ciblage passif repose sur le caractère défectueux de la vascularisation et le drainage lymphatique réduit des tissus tumoraux. Le degré de perfusion et la porosité des néovaisseaux sont donc des paramètres décisifs. Néanmoins ils dépendent fortement du type de tumeur, de son stade de développement et sont très variables d'un individu à l'autre. Avant de nous intéresser au modèle CT26, nous avions choisi de développer le modèle tumoral *in vivo* avec des cellules humaines du cancer du pancréas (Mia-Paca-2). L'absence de signal dans la tumeur par IRM du ^{19}F , à différents temps d'observation (4 h, 7 h, 9 h et 24 h), a suggéré l'hypovascularisation du modèle Mia-Paca-2. Le cancer du pancréas est en effet caractérisé par une faible vascularisation. L'apport réduit d'oxygène à la tumeur est mis en évidence par l'existence fréquente de régions hypoxiques. Chez l'homme, l'absence de réponse à des traitements basés sur le ciblage passif, a été noté dans des cas d'adénocarcinome pancréatique et gastrique (Mura *et al.* 2012). De plus, bien souvent, le ciblage passif ne permet d'obtenir que de faibles concentrations de nanoparticules dans la tumeur. Cheng *et al.* ont étudié des nanoparticules de PLGA-*b*-PEG de 160 nm pour la vectorisation du docétaxel. Comme nous, 6 h après injection par voie intraveineuse, ils ne retrouvent qu'1 % de la dose injectée dans la tumeur (Cheng *et al.* 2007). Cette quantité est souvent trop faible pour justifier un gain significatif de l'efficacité en imagerie ou en thérapie. Comme Cheng et de nombreux autres auteurs, nous nous sommes donc tournés vers une approche de ciblage actif.

1.2. Le ciblage actif

Le ciblage actif repose sur la reconnaissance spécifique d'un ligand, porté à la surface des nanoparticules, par un récepteur biologique, sur-exprimé par les tissus tumoraux. De plus, l'internalisation des nanoparticules est facilitée car elle est récepteur-médiée. Cette stratégie permet d'augmenter la concentration de nanoparticules, accumulée dans la tumeur. De nombreux ligands peuvent alors être envisagés comme les peptides, les protéines ou les aptamers. En décorant d'acide folique leur nanoparticules PEGylées, Oyewumi et Lu atteignent une quantité, équivalente à 7 % de la dose injectée, dans la tumeur 6 h ou 8 h après injection intraveineuse (Oyewumi *et al.* 2004; Lu *et al.* 2011). Le peptide RGD suscite un vif intérêt depuis les années 1990 et les travaux de l'équipe de H. Kessler qui ont rationalisé la relation entre la structure du ligand et son affinité avec les protéines d'adhésion (Gurrath *et al.* 1992). Une version synthétique, linéaire de ce peptide a été couplée aux nanocapsules PEGylées de PFOB dans le chapitre 3. La séquence peptidique avait été choisie dans le cadre d'une collaboration avec l'industriel Guerbet, qui étudiait en parallèle, des systèmes lipidiques fluorés, fonctionnalisés avec le même ligand. Nous reviendrons ici successivement sur l'approche bottom-up et top-down, en essayant de comprendre les raisons de leur échec ou de leur réussite.

1.2.1. Approche bottom-up

L'approche bottom-up consiste d'abord, à synthétiser un polymère fonctionnalisé, PLA-*b*-PEG-RGD, mélangé, dans un second temps, au PLGA-*b*-PEG (polymère commercial largement disponible), pour former des nanocapsules mixtes. L'homogénéité du mélange de polymères au sein de la coque n'était a priori pas certaine. Diaz-Lopez avait envisagé la PEGylation des nanocapsules de PLGA ($M_n=12\ 000$ g/mol) en y ajoutant des quantités croissantes de PLGA-*b*-PEG ($M_n=50\ 000$ g/mol). Elle avait montré que la formation des nanocapsules était inévitablement accompagnée de la présence de microcapsules et qu'au delà de 25 % de PLGA-*b*-PEG introduit, la précipitation complète du polymère avait lieu (Diaz-Lopez 2009). Dans notre cas, l'addition de 5 à 25 % de PLA-*b*-PEG-RGD ($M_n = 42\ 897$ g/mol) dans le PLGA-*b*-PEG ($M_n = 50\ 000$ g/mol) conduit à la formation de nanocapsules à double globules avec un cœur de PFOB décentré (Figure 4A). Ces objets étaient néanmoins déjà observables lors du simple mélange de PLGA-*b*-PEG et de 25 % de PLA-*b*-PEG-COOH (Figure 4B) (Chapitre 3). Le RGD n'est donc pas responsable de la modification morphologique. Lors de la formation des nanocapsules mixtes, par émulsion-évaporation, la solubilité de chacun des polymères dans la phase organique, leur miscibilité ainsi que leurs propriétés interfaciales doivent être considérés. Une brève discussion, à propos de ces trois paramètres, est ici menée en considérant le PLGA-*b*-PEG et le PLA-*b*-PEG-COOH.

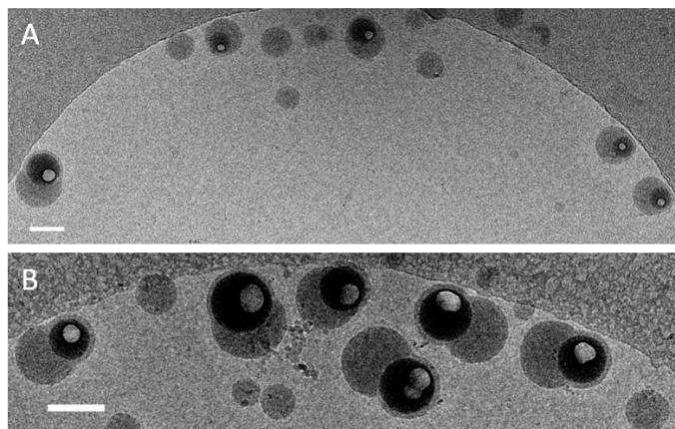


Figure 4 : Clichés CryoMET de nanocapsules de A) PLGA-*b*-PEG/PLA-*b*-PEG-RGD (75/25) et B) PLGA-*b*-PEG/PLA-*b*-PEG-COOH (75/25). La barre d'échelle correspond à 100 nm.

1.2.1.1. Solubilité des polymères dans la phase organique

Thomasin *et al.* ont étudié l'influence de différentes conditions expérimentales (concentration de polymère, nature du solvant) sur les caractéristiques de microcapsules (tailles, taux de solvant résiduel...) obtenues par coacervation (Thomasin *et al.* 1998). Ils ont travaillé avec une large gamme de PLA et de PLGA, de rapports LA/GA et de masses molaires variés, provenant de Boehringer. Conformément aux études de Dobry *et al.*, Thomasin *et al.*, ont noté que les polyesters de masses molaires élevées sont moins solubles dans le dichlorométhane que ceux de masses molaires plus

faible (Dobry *et al.* 1947). En ce qui concerne le rapport LA/GA, même si le PLGA est légèrement plus hydrophile que le PLA, les deux polymères ont des coefficients de solubilité très proches dans le dichlorométhane (Siemann 1992). Les bouts de chaînes des polymères peuvent influencer leurs propriétés de solubilité. Ainsi Blanco-Prieto *et al.* constatent que les groupement carboxyliques terminaux augmentent l'hydrophilicité du PLGA-*b*-PEG-COOH (Blanco-Prieto *et al.* 2004). Dans notre cas, on peut donc considérer que le PLA-*b*-PEG-COOH et le PLGA-*b*-PEG, de même masse molaire, sont aussi solubles dans la phase organique et que la cause de l'apparition des morphologies double globules est ailleurs.

1.2.1.2. Miscibilité des polymères

Plusieurs groupes de recherche formulent des nanoparticules à partir de mélanges de polymères sans se poser la question de la séparation de phase. Il s'agit de mélanges de PLA ($M_n = 6\,000$ g/mol) / PLA-*b*-PEG ($M_n = 15\,000$ g/mol) ou de PLGA / PLA-*b*-PEG (M_n de 3 000 à 20 000) pour Ishira et al (Ishihara *et al.* 2009; Ishihara *et al.* 2010). Danhier *et al.* quant à eux, décorent de RGD, des nanoparticules de PLGA ($M_n = 22\,000$ g/mol) / PLGA-*b*-PEG ($M_n=29000$ g/mol), en introduisant du PCL-*b*-PEG-RGD ($M_n= 22\,000$ g/mol) (Danhier *et al.* 2009). Matsumoto *et al.* induisent volontairement une séparation de phase entre le PLA et le PLGA, de mêmes masses molaires ($M_n = 20\,000$ g/mol), en travaillant avec une phase organique très concentrée en polymère : 796 mg/mL. Cette concentration est plus de 30 fois supérieure à celle que nous utilisons habituellement (25 mg/mL). De façon originale, Matsumoto *et al.* forment des capsules avec un cœur de PLGA, contenant le principe actif Cis-Platine (Cis-Pt), et une coque de PLA ou inversement en variant les ratios de PLA et PLGA. Le Cis-Pt, de densité électronique élevée joue le rôle de contrastant en microscopie électronique à transmission et permet de distinguer, de façon indirecte les deux polymères. Matsumoto *et al.* modulent les cinétiques de libération du principe actif, en incorporant le Cis-Pt dans le cœur ou la membrane de la capsule (Matsumoto *et al.* 2005). Shin *et al.* qui utilisent des polyesters de masses molaires très élevées (PLGA et PLLA avec $M_n > 100\,000$ g/mol) compatibilisent leur mélange en y introduisant un PLGA-*b*-PEG symétrique (PLGA et PEG de même masse). Le copolymère diminue la tension interfaciale entre les blocs, sa symétrie permettant d'avoir une courbure quasi nulle. Les auteurs obtiennent alors des architectures plus homogènes (Shin *et al.* 2005). Dans notre cas, l'étude de calorimétrie différentielle du mélange PLGA-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG-COOH a mis en évidence une température de transition vitreuse unique, faisant penser à la compatibilité des deux polymères. Néanmoins, une étude plus approfondie devrait être menée pour valider complètement l'hypothèse de miscibilité des polymères dans les conditions de formulation utilisées. On pourrait par exemple analyser les nanocapsules de type doubles globules, préparées à partir d'un mélange de PLGA-*b*-PEG

et de PLA(d)-*b*-PEG-COOH par diffusion des neutrons aux petits angles. Le PLA(d)-*b*-PEG-COOH serait synthétisé à partir d'un monomère LA deutéré (Riley *et al.* 2003). La séparation de phase des polymères serait aisément mise en évidence en utilisant la méthode de variation de contraste, évoquée dans le chapitre 2.

1.2.1.3. Propriétés de surface des polymères

Enfin, l'apparition d'objets double globules pourrait résulter d'hétérogénéités de comportement interfacial du PLGA-*b*-PEG et du PLA-*b*-PEG-COOH. L'angle de contact avec l'eau dépend peu de la nature du bloc hydrophobe, PLA ou PLGA, de structures chimiques semblables (Ishaug-Riley *et al.* 1999). En revanche, si une quantité suffisante de PEG y est greffé, on peut diminuer significativement l'angle de contact. Sheng *et al.* rapportent un abaissement de 10° en modifiant un PLA avec 10 % de PEG₅₀₀₀ (Sheng *et al.* 2009). Jalbert *et al.* ont étudié, par la méthode de la goutte pendante, l'influence des bouts de chaînes (hydroxy, carboxy, amino) sur les tensions à l'interface eau/huile de différents Poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Ils ont montré que la tension de surface pouvait varier de 3 unités (mN/m) en modifiant la terminaison d'un PDMS de faible masse molaire (1000 g/mol). Néanmoins lorsque la masse molaire devient supérieure à 4000 g/mol, l'influence des bouts de chaînes devient négligeable (Jalbert *et al.* 1993; Jalbert *et al.* 1997). En ce qui concerne le PEG, selon Sauer *et al.*, la masse molaire ne semble pas avoir d'influence sur les propriétés interfaciales du polymère (Sauer *et al.* 1991). De plus, Hata *et al.* ont observé une variation de la tension de surface en modifiant les terminaisons du PEG : hydroxy ou méthoxy (Hata *et al.* 1980) et Blanco-Prieto *et al.* considèrent le PLGA-*b*-PEG-COOH plus hydrophile que son analogue ester-terminé (Blanco-Prieto *et al.* 2004). Dans notre cas, la terminaison du PLA-*b*-PEG diffère de celle du PLGA-*b*-PEG par la présence d'un court espaceur : -NHC(O)CH₂CH₂-, terminé par une fonction carboxylique ce qui pourrait avoir un impact sur la morphologie des capsules formées. D'autres expériences devraient être conduites, sur une large gamme de concentration, pour décrire le comportement interfacial du PLA-*b*-PEG-COOH et du PLGA-*b*-PEG, séparément et en mélanges, aux interfaces solvant/eau et PFOB/solvant et en régime dynamique, de façon à reproduire les conditions d'évaporation au sein des gouttes d'émulsion (Miller *et al.* 1994).

A ce point de l'étude, il est donc difficile d'attribuer la formation d'objets doubles globules à l'un ou l'autre des phénomènes décrits ci-dessus. Même si cette morphologie semble caractéristique du démouillage de l'un des deux copolymères, évoqué dans les chapitres 2 et 3, des expériences complémentaires doivent absolument être menées. Après l'échec de l'approche bottom-up, nous

avons tenté de fonctionnaliser les nanocapsules de PFOB tout en conservant la morphologie sphérique simple, par l'approche top-down.

1.2.2. Approche top-down

Elle consiste à préformer des nanocapsules de PLA-*b*-PEG comportant des groupes réactifs en surface (COOH). Un couplage peptidique en milieu aqueux permet ensuite d'y greffer le ligand d'intérêt : RGD. Le taux de couverture de RGD, que nous avons obtenu, est tout à fait correct considérant la méthode choisie ($N_{RGD} \sim 900$ par capsule). Malheureusement ici encore les nanocapsules sont déformées et ont une surface assez négative (-38 mV), qui pourraient conduire à une augmentation de l'activation du complément (van Vlerken *et al.* 2007) (Figure 5).

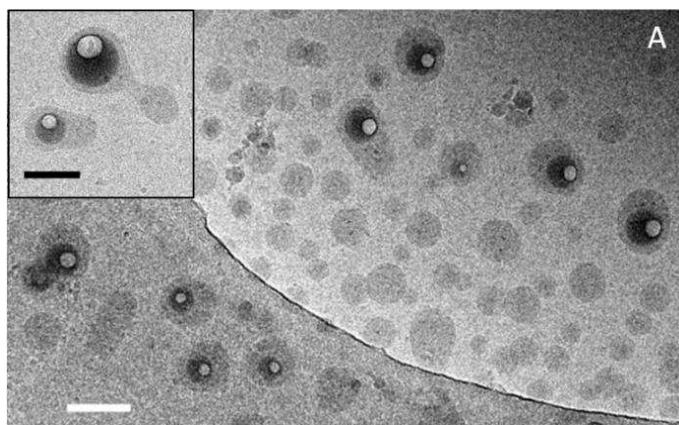


Figure 5 : Cliché CryoTEM de nanocapsules de PLA-*b*-PEG-COOH. La barre d'échelle correspond à 100nm.

Le problème de la charge de surface finale des nanocapsules peut être aisément résolu, par la désactivation des fonctions carboxy résiduelles en introduisant de la benzylamine, en fin de réaction de couplage. Néanmoins, cela ne résout pas le problème morphologique qui survient en amont, lors de la formation des nanocapsules. Lors de l'évaporation du solvant, les chaînes de PEG s'orientent vers la phase aqueuse. On peut alors se demander si les répulsions électrostatiques qui interviennent entre les groupements carboxylés terminaux ne seraient pas la cause de la création d'interfaces supplémentaires, conduisant à la déformation de la capsule. La phase aqueuse étant stabilisée par un électrolyte monovalent, le cholate de sodium, de concentration $3,5 \cdot 10^{-2}$ M, la longueur de Debye

correspondante peut être calculée par la formule : $\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_s kT}{e^2 \sum_i c_i z_i^2}}$ Avec ϵ_s la permittivité électrique du solvant, k la constante de Boltzmann, T la température, e la charge électrique élémentaire, c_i la concentration de l'espèce ionique (en ion/m³) et z_i la valence de l'ion. La longueur de Debye est estimée à $\kappa^{-1}=1,6$ nm. D'autre part, dans le cas où toutes les chaînes de PEG introduites

initialement dans la formulation, s'orienteraient vers la phase aqueuse, la distance inter-PEG, d_{PEG} , serait de 2,2 nm. d_{PEG} est supérieur à κ^{-1} , les charges des groupements carboxy devraient donc être écrantées par celles du sel monovalent. Néanmoins il faut noter que ces deux valeurs sont très proches et que les effets des répulsions électrostatiques ne doivent peut-être pas être négligés. Pour des microcapsules de PLGA-*b*-PEG-OCH₃, Pisani *et al.* ont remarqué que lorsque la distance inter-PEG est inférieure à 1,4 nm, les chaînes de PEG créent des interfaces supplémentaires pour pouvoir s'orienter vers la phase aqueuse. Des protrusions apparaissent en surface et les microcapsules adoptent une structure en forme d'éponge (Figure 6). Dans notre cas, la distance seuil de création d'interfaces pourrait être plus élevée que 1,4 nm à cause de la contribution supplémentaire des répulsions électrostatiques (Pisani *et al.* 2009).

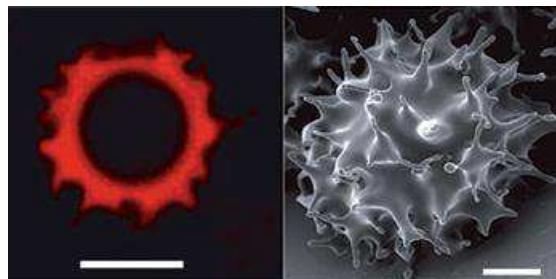


Figure 6 : Microcapsules PEGylées de PLGA pour une distance inter-PEG théorique de 1 nm.
Clichés de microscopie confocale (gauche, barre d'échelle 5 µm) et de microscopie électronique à balayage (droite, barre d'échelle 2 µm).

Les techniques de couplage peptidique avec activation par EDC/NHS sont limitées en termes d'efficacité de couplage. D'autres stratégies pourraient être considérées. La chimie « click », par exemple, est très performante et les problèmes de toxicité, que le catalyseur à base de cuivre faisait intervenir, ont maintenant trouvé des solutions. Des techniques de purification efficaces ont été mises en place : complexation avec l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) ou utilisation de nanoparticules inorganiques en tant que piège du cuivre (Hein *et al.* 2008). Avant d'aller plus loin, il importe néanmoins de résoudre le problème de la modification morphologique, entraînée par l'utilisation du PLA-*b*-PEG-COOH. Ce copolymère synthétique semblait pourtant être très proche du PLGA-*b*-PEG commercial habituel (structure, masses molaire, T_g).

1.2.3. La caractérisation de la NC fonctionnalisée

Une fois le greffage effectué, et ce par n'importe quelle technique, il est difficile de quantifier les bouts de chaînes. L'efficacité du couplage est d'ailleurs souvent mise en évidence de façon indirecte par des tests d'affinité biologiques (Garinot *et al.* 2007; Garg *et al.* 2009) ou en dosant par fluorimétrie la part de RGD non couplée, qui réagit avec la fluorescamine (ou 4-Phénylspiro-[furan-

Discussion générale

2(3H),1-phtalan]-3,3'-dione) (Wang *et al.* 2012). En effet, les techniques classiques telle que la RMN sont mises en défaut à cause de la faible masse molaire de la molécule greffée par rapport au polymère. Dans notre cas, même si nous avons proposé une méthode de quantification utilisant une référence externe, contenue dans un insert, reconsidérer un PLA-*b*-PEG plus court faciliterait l'analyse. Notons que le PLGA utilisé en première instance (RG502) avait une masse autour de 12 000 g/mol et permettait une encapsulation, certes moindre, mais tout de même satisfaisante du PFOB (chapitre 1). De plus, si le polymère est suffisamment monodisperse on pourra éventuellement valider le couplage par spectrométrie MALDI-TOF (Temming *et al.* 2006).

Si on suppose que les nanocapsules de PFOB sont toujours sphériques, la densité de ligands obtenue en surface est de $d_{RGD} = 9,95 \times 10^{-3}/\text{nm}^2$ (pour l'approche top-down). Cette valeur est tout à fait satisfaisante si on la compare aux données existantes dans la littérature. Rerat *et al.* obtiennent une densité de $d_{RGD} = 1,94 \times 10^{-3}/\text{nm}^2$ sur leurs nanoparticules oligoPEGylées d'oxyde de fer (SPIO) (Rerat *et al.* 2010). Montet *et al.* réussissent à augmenter cette valeur à $d_{RGD} = 5,44 \times 10^{-3}/\text{nm}^2$ en utilisant un espaceur plus grand, entre la nanoparticule inorganique et le peptide : des chaînes de dextran (Montet *et al.* 2006). Avec presque 10^{-2} RGD par nm^2 à la surface des nanocapsules de PFOB, on pourrait profiter de l'effet de multivalence évoqué par Montet *et al.*, pour augmenter considérablement l'affinité du peptide lorsqu'il est porté par les nanocapsules (Figure 7). Ainsi, Montet *et al.* estiment que l' IC_{50} (concentration nécessaire pour occuper 50 % des récepteurs) de leur c-RGD est divisé par 38, lorsque le peptide est lié à la surface des SPIO au lieu d'être sous forme libre (Montet *et al.* 2006).

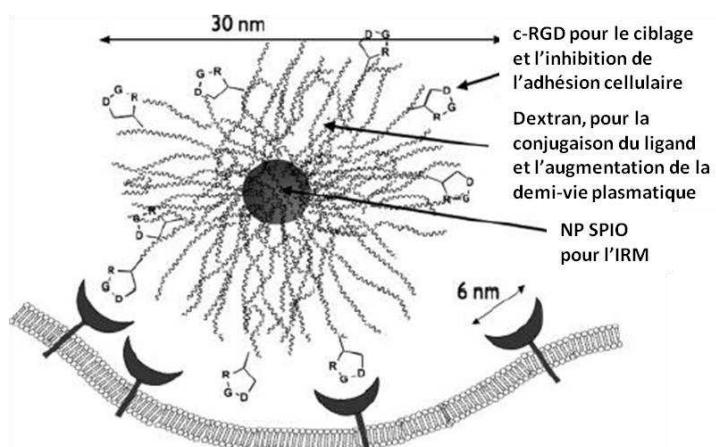


Figure 7 : Représentation schématique des interactions multiples qui interviennent lors de la reconnaissance du peptide RGD par les intégrines $\alpha_v\beta_3$, résultant d'un effet de multivalence.

Enfin, il faut préciser que l'enjeu du couplage peptidique était, pour nous, d'apporter la preuve de concept de la fonctionnalisation de surface des nanocapsules PEGylées de PFOB. En revanche, pour démontrer l'affinité et la spécificité du peptide *in vitro* puis valider la stratégie de ciblage actif *in vivo*, le choix d'un peptide cyclique serait probablement plus judicieux. En effet, on rapporte dans la

bibliographie, l'utilisation massive et privilégiée du c[RGDFK] (Nasongkla *et al.* 2004; Garanger *et al.* 2005; Temming *et al.* 2006; Wang *et al.* 2012). Son successeur N-alkylé (c-RGD(f-N(Me)V)) est d'ailleurs entré en phase clinique II en tant qu'inhibiteur de l'angiogénèse (Dechantsreiter *et al.* 1999). De plus il a été montré que les peptides cycliques ont une affinité 200 fois plus élevée que les peptides linéaires (Haubner *et al.* 1996).

Pour conclure, les nanocapsules de PFOB PEGylées et décorées par le peptide RGD peuvent être vectorisées et accumulées dans la tumeur par ciblages passif et actif. Leur potentiel théranostique est mis en avant dans la suite de ce chapitre.

2. L'imagerie

L'intérêt majeur de l'encapsulation du PFOB réside dans son utilisation en tant qu'agent de contraste pour de nombreuses modalités. Pour des raisons déjà évoquées, nous avons choisi de nous intéresser à l'échographie et l'IRM du ^{19}F (Travaux antérieurs).

Notre étude de l'accumulation tumorale par ciblage passif, a été menée 7 h après administration intraveineuse des nanocapsules. Ce délai est souvent retrouvé dans la littérature pour des nanoparticules de polyesters PEGylées (Cheng *et al.* 2007; Lu *et al.* 2011). D'autres auteurs attendent jusqu'à 24 ou 48 h pour profiter d'une accumulation plus avantageuse (Schadlich *et al.* 2011). Dans notre cas, une brève étude *ex vivo* en spectroscopie de résonance magnétique, sur des tumeurs prélevées à différents temps, a montré que cela n'était pas nécessaire. Enfin, le délai d'imagerie post injection est en général réduit dans le cas d'un ciblage actif (Giraudeau 2012). Une de nos premières préoccupations a donc été d'assurer l'intégrité des nanocapsules dans le délai d'imagerie. Ceci est indispensable pour pouvoir ensuite tirer des conclusions justes et précises en termes de biodistribution. Langereis *et al.* ont, pour ce faire, élaboré un ingénieux système qui permet de détecter la désintégration de leur vecteur (liposome thermosensible) par l'apparition d'un signal en RMN du ^{19}F et la disparition simultanée du signal CEST en RMN du ^1H (Langereis *et al.* 2009) (Figure 8).

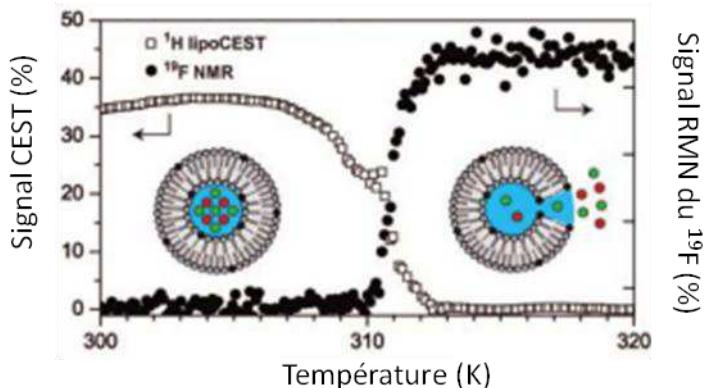


Figure 8 : Croissance et décroissance symétriques des signaux en RMN du ^1H et ^{19}F , en fonction de la température, pour des liposomes thermosensibles encapsulant les sondes $[\text{Tm}(\text{hpdo3a})(\text{H}_2\text{O})]$ et NH_4PF_6 .

En ce qui nous concerne, l'étude de stabilité des nanocapsules de PFOB a été menée de façon beaucoup plus classique. Les polyesters ont des cinétiques de dégradation assez rapides (Zweers *et al.* 2004). L'hydrolyse du bloc hydrophobe est d'autant plus favorisée par un ratio glycolide/lactide élevé et par la présence d'une couronne de PEG en surface, responsables de l'absorption supplémentaire d'eau (Ishihara *et al.* 2009). Néanmoins nous avons montré que dans des conditions d'osmolarité et de pH physiologiques et à 37°C, la totalité des nanocapsules conserve sa charge en PFOB au moins pendant 48 h (chapitre 1), temps suffisant pour l'imagerie. D'autres expériences pourraient être menées dans du sérum ou du sang à 37°C pour mimer de façon plus pertinente les conditions d'administration *in vivo*.

2.1. L'échographie

L'imagerie ultrasonore basses fréquences (échographies cliniques, 7-14 MHz) n'a été réalisée que sur les nanocapsules PEGylées, pour le ciblage passif. L'accumulation dans la tumeur était alors insuffisante pour y détecter le moindre signal aux temps $t=0$, 4 h et 7 h (chapitre 2). L'apport du RGD pourrait permettre d'augmenter la concentration locale en nanocapsules ou au moins d'immobiliser ces dernières, de façon à créer une nouvelle interface réfléchissante. Ces deux effets auraient pour conséquence commune d'augmenter l'intensité du signal. Dans le cas contraire, il faudra inexorablement envisager un changement d'une des composantes du système (coque, cœur). On a en effet montré que l'échogénicité du système PLGA-*b*-PEG/PFOB n'était pas aisément modulable par modifications des conditions de formulation (chapitre 2). On pourrait remplacer le PFOB par un autre perfluorocarbone de température d'ébullition plus basse : Perfluoropentane, Perfluorohexane. A 37°C et soumis à la pression acoustique, le cœur des nanocapsules pourrait subir une transition de phase (vaporisation du Perfluorocarbone, PFC), ce qui résulte d'une augmentation de l'échogénicité, par augmentation de la différence d'impédance (Fang *et al.* 2009; Fabiilli *et al.* 2010). Certains

ateurs induisent même l'oscillation et/ou l'explosion des nanoparticules, enrichissant la réponse acoustique (présence supplémentaire d'harmoniques et sous harmonique) (Gao *et al.* 2008; Couture *et al.* 2012). De par leur pression de vapeur élevée ces PFC peuvent néanmoins être moins facilement manipulables que le PFOB.

L'intérêt des hautes fréquences a été évoqué à la fin du chapitre 2, pour l'imagerie des nanocapsules PEGylées de PFOB. Des expérimentations préliminaires ont été conduites sur le modèle *in vivo* des tumeurs CT26. Un gain acoustique faible mais significatif a pu être mesuré 5 minutes après injection des nanocapsules. Néanmoins ces résultats encourageants restent encore trop inter-animal dépendants. De plus, le dispositif expérimental est peu pratique, la position des plans d'imagerie ne peut pas être conservée sur des temps plus longs (4 h ou 7 h), et il ne permet pas d'acquérir des images en temps réel (Figure 9 gauche) (Jafari 2012). L'apparition récente sur le marché d'un échographe clinique, hautes fréquences (Vevo 770, Visual Sonics) pourrait largement profiter aux capsules fonctionnalisées de PFOB (Figure 9 droite).

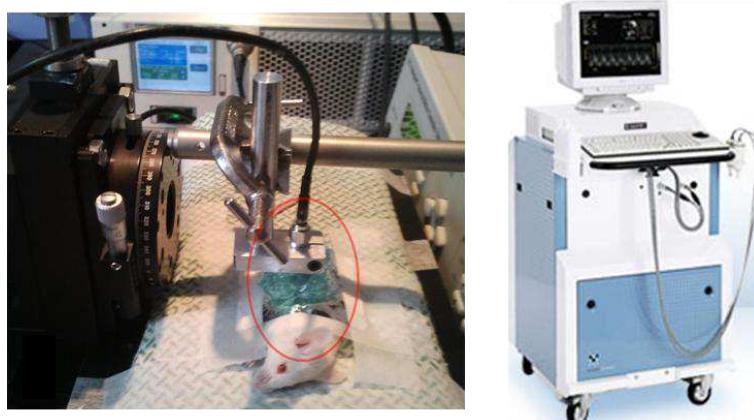


Figure 9 : Dispositifs expérimentaux d'imagerie hautes fréquences, développés à l'échelle laboratoire (gauche) et clinique (droite).

On l'a vu, l'échographie est une technique peu sensible et les concentrations en agents de contraste accumulées sont souvent faibles. Pour minimiser la réponse non linéaire des tissus mous (induisant un bruit de fond d'autant plus élevé aux hautes fréquences), il est indispensable d'utiliser des modèles spécifiques de tumeurs hypoéchogènes (tels que CT26 ou Mia-Paca-2). De surcroit, avec un modèle implanté en sous cutanée, on s'éloigne de la réalité clinique des tissus malades.

2.2. L'IRM du ^{19}F

Contrairement à l'échographie, l'IRM du ^{19}F est une méthode très sensible. Le seuil de détection du PFOB a été évalué à 0,04 mM, ce qui nous a permis de mettre en évidence une accumulation tumorale faible par ciblage passif (0,19 mM). Le bruit de fond étant quasiment nul, la quantification

des nanocapsules est effectuée de manière aisée et directe, grâce à l'introduction d'une référence externe à proximité du corps de l'animal. Malheureusement le dosage est limité aux nanocapsules immobilisées dans les tissus ou circulant dans les capillaires à flux sanguin réduit (tumeur), le signal provenant du compartiment vasculaire général étant supprimé. De plus, l'intégration de la bobine Fluor mobile, dans l'aimant 4,7T, permet d'obtenir simultanément des informations anatomiques en IRM ^1H . Néanmoins le temps d'acquisition reste long (35 minutes) et la résolution spatiale faible ($630 \mu\text{m} \times 940 \mu\text{m}$).

Cette technique reste tout de même encore très étudiée. Le défi principal est de construire des bobines Fluor à plus grande échelle et de les adapter sur des aimants à champs cliniques. Lanza *et al.*, pionniers dans le domaine des émulsions fluorées pour l'imagerie par échographie ou IRM du Fluor, ont adapté leur technologie à l'imagerie et à la thérapie cellulaire (Travaux antérieurs). En 2011, leur agent de contraste Cell Sense[®] a été autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) pour son utilisation lors de tests cliniques de phase I en tant que vaccin (Figure 10).

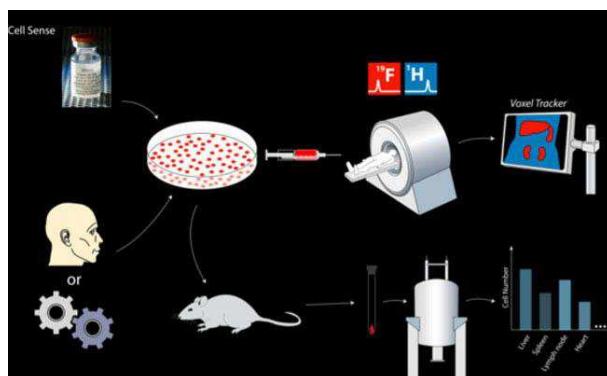


Figure 10 : Représentation schématique de la plateforme Cell Sense[®]. Des cellules souches sont cultivées en présence de l'émulsion fluorée, qui est rapidement internalisée. Les cellules ainsi marquées sont administrées à un sujet humain ou animal. Par IRM du Fluor, on suit la biodistribution des cellules marquées, information complétée par l'image anatomique en IRM du ^1H . Des échantillons prélevés peuvent aussi facilement être analysés *ex vivo* par spectroscopie magnétique.

3. La Thérapie

3.1. Le RGD comme peptide thérapeutique

Le processus d'angiogénèse requiert la migration et l'adhésion des cellules endothéliales invasives sur la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des intégrines, qui sont des protéines transmembranaires. Le ligand endogène privilégié de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la vitronectine. L'inhibition de cette interaction, c'est-à-dire l'occupation des récepteurs spécifiques par un peptide RGD exogène, conduit les cellules malines à l'apoptose (Montgomery *et al.* 1994). Des agents

antiangiogéniques et antimitotiques ont été développés dans cette optique, parmi lesquels on peut citer la Vitaxin® (anticorps monoclonal humanisé) (Brooks *et al.* 1994; Tucker 2003) et la Cilengitide® (RGD cyclique) (Smith 2003). La fixation du peptide RGD sur une nanocapsule furtive permettrait d'augmenter sa demi-vie plasmatique, de diminuer son élimination rénale et par effet de multivalence d'augmenter son efficacité et ainsi de réduire les doses administrées. Les études cliniques de phase I du Cilengitide®, ont évalué la demi-vie plasmatique du composé à 3-5 h et la dose optimale pour inhiber la croissance tumorale à 200 mg/m² (Eskens *et al.* 2003).

3.2. L'encapsulation d'un principe actif

L'encapsulation du 5-FU aurait relevé un défi à la fois biologique et analytique. La molécule est préconisée dans le traitement du cancer du côlon. Son encapsulation aurait contribué à l'augmentation de sa rémanence vasculaire, à la diminution de la dose administrée et à l'atténuation des effets indésirables. De plus, une séquence IRM innovante focalisée sur le pic de résonnance du 5-FU, à -169,2 ppm (au lieu du PFOB) aurait permis d'imager l'accumulation des nanocapsules et la libération du principe actif dans les organes. Malheureusement, l'encapsulation du 5-FU par émulsion-évaporation, à différents pH, a échoué, probablement à cause de l'hydrophilicité et de la diffusion rapide de la molécule dans la phase aqueuse. Peut-être faudrait-il considérer l'approche prodrogue (Tegafur® ou Carmofur®). Ces analogues sont plus hydrophobes, ont fait l'objet de tests cliniques de phase III mais restent aussi très coûteux (Lembersky *et al.* 2006). Thomas *et al.* ont mis en place une autre stratégie pour augmenter le taux de charge dans des liposomes. Il s'agit de la complexation du 5-FU avec du cuivre et du poly(éthylène imine) (PEI) (Thomas *et al.* 2011). Cependant le PEI étant aussi hydrophile, cette approche aurait probablement pas été inefficace dans notre cas.

Par la suite, il faudra certainement envisager de changer de principe actif. Danhier *et al.*, ont encapsulé du paclitaxel et/ou de la doxorubicine dans des nanoparticules de PLGA-*b*-PEG-RGD pour induire un ralentissement de la croissance tumorale (Danhier *et al.* 2009). En ce qui concerne la doxorubicine, on profiterait de la fluorescence naturelle de la molécule ($\lambda_{\text{excitation}} = 470 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 585 \text{ nm}$), pour l'observation en microscopie confocale des modèles cellulaires et la mise en évidence de l'affinité spécifique et de l'internalisation des nanocapsules fonctionnalisées RGD. Enfin, tout reste à faire sur la libération du principe actif sous ultrasons, approche intéressante qui a été étudiée, pour la doxorubicine, par Eisenbrey *et al.* avec des microbulles d'air enrobées de PLA et contenant de la doxorubicine (Eisenbrey *et al.* 2009) et par Gao *et al.* avec des nanocapsules de PLA/PFP (Gao *et al.* 2008).

References

- Alconcel, S. N. S., Baas, A. S. and Maynard, H. D. "FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs." *Polymer Chemistry* 2(7): 1442-1448 (2011)
- Auriola, S. O., Ronkko, K. M. and Urtti, A. "Determination of polyethylene glycols by high-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry." *J Pharm Biomed Anal* 11(10): 1027-1032 (1993)
- Bally, M. B., Harvie, P., Wong, F. M., Kong, S., Wasan, E. K. and Reimer, D. L. "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." *Adv Drug Deliv Rev* 38(3): 291-315 (1999)
- Blanco-Prieto, M. J., Campanero, M. A., Besseghir, K., Heimgatner, F. and Gander, B. "Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres." *Journal of Controlled Release* 96(3): 437-448 (2004)
- Brooks, P. C., Clark, R. A. and Cheresh, D. A. "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." *Science* 264(5158): 569-571 (1994)
- Caliceti, P. and Veronese, F. M. "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates." *Adv Drug Deliv Rev* 55(10): 1261-1277 (2003)
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R. and Farokhzad, O. C. "Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery." *Biomaterials* 28(5): 869-876 (2007)
- Couture, O., Urban, A., Bretagne, A., Martinez, L., Tanter, M. and Tabeling, P. "In vivo targeted delivery of large payloads with an ultrasound clinical scanner." *Med Phys* 39(8): 5229-5237 (2012)
- Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N., Crokart, N., Pourcelle, V., Freichels, H., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. and Preat, V. "Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel." *J Control Release* 140(2): 166-173 (2009)
- De Gennes, P. G. "Conformations of Polymers Attached to an Interface." *Macromolecules* 13(5): 1069-1075 (1980)
- De Gennes, P. G. "Polymers at an Interface - a Simplified View." *Advances in Colloid and Interface Science* 27(3-4): 189-209 (1987)
- Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L. and Kessler, H. "N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists." *J Med Chem* 42(16): 3033-3040 (1999)
- Diaz-Lopez, R. "Micro et nanocapsules de perfluoroctyl bromure pour l'ultrasonographie : modifications des propriétés de surface et devenir *in vivo*." *Pharmacotechnie et physico-chimie* (2009)
- Dobry, A. and Boyer-Kawenoki, F. "Phase separation in polymer solution." *Journal of Polymer Science* 2(1): 90-100 (1947)
- Eisenbrey, J. R., Huang, P., Hsu, J. and Wheatley, M. A. "Ultrasound triggered cell death in vitro with doxorubicin loaded poly lactic-acid contrast agents." *Ultrasonics* 49(8): 628-633 (2009)
- Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wynendaele, W., Dreys, J., Verweij, J. and van Oosterom, A. T. "Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours." *Eur J Cancer* 39(7): 917-926 (2003)
- Fabiilli, M. L., Lee, J. A., Kripfgans, O. D., Carson, P. L. and Fowlkes, J. B. "Delivery of Water-Soluble Drugs Using Acoustically Triggered Perfluorocarbon Double Emulsions." *Pharmaceutical Research* 27(12): 2753-2765 (2010)
- Fang, J. Y., Hung, C. F., Hua, S. C. and Hwang, T. L. "Acoustically active per fluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: Drug release and cytotoxicity against cancer cells." *Ultrasonics* 49(1): 39-46 (2009)

Discussion générale

- Gao, Z., Kennedy, A. M., Christensen, D. A. and Rapoport, N. Y. "Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy." *Ultrasonics* 48(4): 260-270 (2008)
- Garanger, E., Boturyn, D., Jin, Z., Dumen, P., Favrot, M. C. and Coll, J. L. "New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors." *Mol Ther* 12(6): 1168-1175 (2005)
- Garg, A., Tisdale, A. W., Haidari, E. and Kokkoli, E. "Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide." *Int J Pharm* 366(1-2): 201-210 (2009)
- Garinot, M., Fievez, V., Pourcelle, V., Stoffelbach, F., des Rieux, A., Plapied, L., Theate, I., Freichels, H., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y. J. and Preat, V. "PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination." *Journal of Controlled Release* 120(3): 195-204 (2007)
- Giraudieu, C. "RMN d'émulsions fluorées : développements méthodologiques et application à l'évaluation de l'oxymétrie et de la biodistribution dans le foie et la rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale dans le cerveau du rongeur." *Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes* (2012)
- Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T. and Muller, R. H. "'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption." *Colloids Surf B Biointerfaces* 18(3-4): 301-313 (2000)
- Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Aumailley, M. and Timpl, R. "Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides." *Eur J Biochem* 210(3): 911-921 (1992)
- Hamad, I., Hunter, A. C., Szebeni, J. and Moghimi, S. M. "Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process." *Mol Immunol* 46(2): 225-232 (2008)
- Hata, T. and Kasemura, T. "Surface and interfacial tensions of polymer melts and solutions." *Polymer Science and Technology* 12A: 15-41 (1980)
- Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S. L., Jonczyk, A. and Kessler, H. "Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin alpha(v)beta(3) antagonists." *Journal of the American Chemical Society* 118(32): 7461-7472 (1996)
- Hein, C. D., Liu, X. M. and Wang, D. "Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences." *Pharm Res* 25(10): 2216-2230 (2008)
- Hrkach, J. S., Peracchia, M. T., Domb, A., Lotan, N. and Langer, R. "Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by ¹H NMR spectroscopy." *Biomaterials* 18(1): 27-30 (1997)
- Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattel, L. "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential." *Int J Nanomedicine* 1(3): 297-315 (2006)
- Ishaug-Riley, S. L., Okun, L. E., Prado, G., Applegate, M. A. and Ratcliffe, A. "Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films." *Biomaterials* 20(23-24): 2245-2256 (1999)
- Ishihara, T., Kubota, T., Choi, T., Takahashi, M., Ayano, E., Kanazawa, H. and Higaki, M. "Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness." *International Journal of Pharmaceutics* 375(1-2): 148-154 (2009)
- Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Mizushima, Y. and Mizushima, T. "Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents." *Int J Pharm* 385(1-2): 170-175 (2010)
- Jafari, S. "Détection ultrasonore haute fréquence des microbulles et des nanoparticules expérimentales à cœur liquide." *Informatique Biomédical – Imagerie Biomédicale* (2012)

Discussion générale

- Jalbert, C., Koberstein, J. T., Hariharan, A. and Kumar, S. K. "End Group Effects on Surface Properties of Polymers: Semiempirical Calculations and Comparison to Experimental Surface Tensions for R, ω -Functional Poly(dimethylsiloxanes)." *Macromolecules* 30(15): 4481-4490 (1997)
- Jalbert, C., Koberstein, J. T., Yilgor, I., Gallagher, P. and Krukonis, V. "Molecular-Weight Dependence and End-Group Effects on the Surface-Tension of Poly(Dimethylsiloxane)." *Macromolecules* 26(12): 3069-3074 (1993)
- Janssen, B. J. C., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J. D. and Gros, P. "Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity." *Nature* 444(7116): 213-216 (2006)
- Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. and Gambhir, S. S. "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy." *Nanomedicine (Lond)* 6(4): 715-728 (2011)
- Langereis, S., Keupp, J., van Velthoven, J. L., de Roos, I. H., Burdinski, D., Pikkemaat, J. A. and Grull, H. "A temperature-sensitive liposomal 1H CEST and 19F contrast agent for MR image-guided drug delivery." *J Am Chem Soc* 131(4): 1380-1381 (2009)
- Lembersky, B. C., Wieand, H. S., Petrelli, N. J., O'Connell, M. J., Colangelo, L. H., Smith, R. E., Seay, T. E., Giguere, J. K., Marshall, M. E., Jacobs, A. D., Colman, L. K., Soran, A., Yothers, G. and Wolmark, N. "Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06." *J Clin Oncol* 24(13): 2059-2064 (2006)
- Li, M., Panagi, Z., Avgoustakis, K. and Reineke, J. "Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content." *Int J Nanomedicine* 7: 1345-1356 (2012)
- Liu, M., Xie, C., Xu, W. and Lu, W. "Separation of polyethylene glycols and their amino-substituted derivatives by high-performance gel filtration chromatography at low ionic strength with refractive index detection." *J Chromatogr A* 1046(1-2): 121-126 (2004)
- Lu, P. L., Chen, Y. C., Ou, T. W., Chen, H. H., Tsai, H. C., Wen, C. J., Lo, C. L., Wey, S. P., Lin, K. J., Yen, T. C. and Hsie, G. H. "Multifunctional hollow nanoparticles based on graft-diblock copolymers for doxorubicin delivery." *Biomaterials* 32(8): 2213-2221 (2011)
- Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T. and Yoshino, H. "Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide)." *Journal of Controlled Release* 106(1-2): 172-180 (2005)
- Miller, R., Joos, P. and Fainerman, V. B. "Dynamic Surface and Interfacial-Tensions of Surfactant and Polymer-Solutions." *Advances in Colloid and Interface Science* 49: 249-302 (1994)
- Moghimi, S. M., Andersen, A. J., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L. and Hunter, A. C. "Material properties in complement activation." *Adv Drug Deliv Rev* 63(12): 1000-1007 (2011)
- Moghimi, S. M. and Szebeni, J. "Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties." *Prog Lipid Res* 42(6): 463-478 (2003)
- Montet, X., Funovics, M., Montet-Abou, K., Weissleder, R. and Josephson, L. "Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display." *Journal of Medicinal Chemistry* 49(20): 6087-6093 (2006)
- Montgomery, A. M., Reisfeld, R. A. and Cheresh, D. A. "Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8856-8860 (1994)
- Mosqueira, V. C., Legrand, P., Morgat, J. L., Vert, M., Mysiakine, E., Gref, R., Devissaguet, J. P. and Barratt, G. "Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density." *Pharm Res* 18(10): 1411-1419 (2001)
- Mura, S. and Couvreur, P. "Nanotheranostics for personalized medicine." *Adv Drug Deliv Rev* (2012)
- Nasongkla, N., Shuai, X., Ai, H., Weinberg, B. D., Pink, J., Boothman, D. A. and Gao, J. "cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery." *Angew Chem Int Ed Engl* 43(46): 6323-6327 (2004)

Discussion générale

- Oyewumi, M. O., Yokel, R. A., Jay, M., Coakley, T. and Mumper, R. J. "Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice." *J Control Release* 95(3): 613-626 (2004)
- Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J. P., Gomis, J. M., Appel, M., d'Angelo, J. and Couvreur, P. "Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting." *J Control Release* 60(1): 121-128 (1999)
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E. and Tsapis, N. "Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG." *Soft Matter* 5(16): 3054-3060 (2009)
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B. T., Beloeil, J. C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S. L. and Fattal, E. "Perfluoroctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging." *Advanced Functional Materials* 18(19): 2963-2971 (2008)
- Rerat, V., Laurent, S., Burtea, C., Driesschaert, B., Pourcelle, V., Elst, L. V., Muller, R. N. and Marchand-Brynaert, J. "Ultrasound particle of iron oxide-RGD peptidomimetic conjugate: synthesis and characterisation." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20(6): 1861-1865 (2010)
- Richter, A. W. and Akerblom, E. "Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 74(1): 36-39 (1984)
- Riley, T., Heald, C. R., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L. and Davis, S. S. "Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery." *Langmuir* 19(20): 8428-8435 (2003)
- Sauer, B. B. and Dee, G. T. "Molecular-Weight and Temperature-Dependence of Polymer Surface-Tension - Comparison of Experiment with Theory." *Macromolecules* 24(8): 2124-2126 (1991)
- Schadlich, A., Caysa, H., Mueller, T., Tenambergen, F., Rose, C., Gopferich, A., Kuntsche, J. and Mader, K. "Tumor Accumulation of NIR Fluorescent PEG PLA Nanoparticles: Impact of Particle Size and Human Xenograft Tumor Model." *ACS Nano* 5(11): 8710-8720 (2011)
- Sheng, Y., Yuan, Y., Liu, C., Tao, X., Shan, X. and Xu, F. "In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content." *J Mater Sci Mater Med* 20(9): 1881-1891 (2009)
- Sherman, M. R., Williams, L. D., Sobczyk, M. A., Michaels, S. J. and Saifer, M. G. "Role of the methoxy group in immune responses to mPEG-protein conjugates." *Bioconjug Chem* 23(3): 485-499 (2012)
- Shin, K. C., Kim, B. S., Kim, J. H., Park, T. G., Do Nam, J. and Lee, D. S. "A facile preparation of highly interconnected macroporous PLGA scaffolds by liquid-liquid phase separation II." *Polymer* 46(11): 3801-3808 (2005)
- Siemann, U. "The Solubility Parameter of Poly(DL-Lactic Acid)." *European Polymer Journal* 28(3): 293-297 (1992)
- Smith, J. W. "Cilengitide Merck." *Current Opinion in Investigational Drugs* 4: 741-745 (2003)
- Szleifer, I. "Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach." *Biophys J* 72(2 Pt 1): 595-612 (1997)
- Takae, S., Miyata, K., Oba, M., Ishii, T., Nishiyama, N., Itaka, K., Yamasaki, Y., Koyama, H. and Kataoka, K. "PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors." *J Am Chem Soc* 130(18): 6001-6009 (2008)
- Temming, K., Meyer, D. L., Zabinski, R., Dijkers, E. C., Poelstra, K., Molema, G. and Kok, R. J. "Evaluation of RGD-targeted albumin carriers for specific delivery of auristatin E to tumor blood vessels." *Bioconjug Chem* 17(6): 1385-1394 (2006)
- Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-fluorouracil for parenteral administration: formulation design, pharmacokinetics and efficacy." *J Control Release* 150(2): 212-219 (2011)

Discussion générale

- Thomasin, C., Merkle, H. P. and Gander, B. "Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 2. Parameters determining microsphere formation." *J Pharm Sci* 87(3): 269-275 (1998)
- Tucker, G. C. "Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy." *Current opinion in investigational drugs* 4: 722-731 (2003)
- van Vlerken, L., TK., V. and MM., A. "Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery." *Pharmaceutical Research* 24(8): 1405-1414 (2007)
- Vauthier, C., Persson, B., Lindner, P. and Cabane, B. "Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles." *Biomaterials* 32(6): 1646-1656 (2011)
- Wang, Z., Lee, T. Y. and Ho, P. C. "A novel dextran-oleate-cRGDFK conjugate for self-assembly of nanodrug." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8(2): 194-203 (2012)
- Yoncheva, K., Lizarraga, E. and Irache, J. M. "Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties." *Eur J Pharm Sci* 24(5): 411-419 (2005)
- Zabaleta, V., Campanero, M. A. and Irache, J. M. "An HPLC with evaporative light scattering detection method for the quantification of PEGs and Gantrez in PEGylated nanoparticles." *J Pharm Biomed Anal* 44(5): 1072-1078 (2007)
- Zalipsky, S., Qazen, M., Walker, J. A., 2nd, Mullah, N., Quinn, Y. P. and Huang, S. K. "New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine." *Bioconjug Chem* 10(5): 703-707 (1999)
- Zweers, M. L. T., Engbers, G. H. M., Grijpma, D. W. and Feijen, J. "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)." *Journal of Controlled Release* 100(3): 347-356 (2004)

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de montrer que de nouvelles fonctionnalités pouvaient être apportées aux nanocapsules de PFOB afin de pouvoir les considérer, un jour, comme un outil théranostique pour la détection et le traitement ciblés des tumeurs solides. Dans une première partie, les propriétés de furtivité *in vitro* et *in vivo* des nanocapsules devaient être améliorées pour assurer le ciblage passif des tumeurs. Nous avons démontré que la stratégie de PEGylation adoptée, par l'utilisation du PLGA-*b*-PEG, était efficace. De plus, la combinaison d'un agent de contraste optimisé avec une séquence d'IRM du ¹⁹F sur mesure, pour le PFOB, se révèle être très prometteuse pour l'imagerie des tumeurs solides. La stratégie de ciblage passif est tout de même limitée puisqu'elle ne permet qu'une accumulation faible de l'agent de contraste dans la tumeur. Dans une deuxième partie, l'amélioration des propriétés acoustiques a finalement été l'occasion de mener une étude plus approfondie du mécanisme de formation des nanocapsules par émulsion-évaporation. La modulation des caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules n'est pas aisée et une augmentation réelle de l'échogénicité des capsules ne se fera que par un changement plus radical de la formulation, tel que l'utilisation d'un autre perfluorocarbone. Le potentiel de l'imagerie acoustique hautes fréquences a aussi été évoqué. A la suite de ces deux premières parties, on comprend que les capacités de l'agent de contraste dépendent fortement du dispositif médical utilisé et que les développements doivent être menés de façon coopérative pour profiter d'un effet de synergie en imagerie médicale. Dans une troisième partie, nous avons envisagé une stratégie de ciblage actif de l'angiogénèse tumorale. Les nanocapsules ont été fonctionnalisées en surface par un peptide RGD, grâce à une méthode simple en phase aqueuse mais qui est limitée en termes d'efficacité de couplage. Une fois de plus, nous avons pu constater que la présence des deux interfaces liquide fluoré/polymère et polymère/eau complexifie les phénomènes mis en jeu lors du procédé d'émulsion-évaporation. La moindre modification d'un des composants de la formulation (polymère, perfluorocarbone), nécessite une étude approfondie des mécanismes interfaciaux pour prédire la morphologie des capsules obtenues. Enfin, le potentiel thérapeutique des capsules devra être accru dans le futur. Le principe actif sera judicieusement choisi afin que sa teneur dans les nanocapsules soit acceptable d'un point de vue clinique. De plus, s'il possède des propriétés de fluorescence (doxorubicine par exemple) les mécanismes d'internalisation des capsules et de libération du principe actif pourront aisément être mis en évidence, *in vitro*, sur des modèles cellulaires par microscopie confocale. Cela facilitera également les études de biodistribution *in vivo*. L'efficacité thérapeutique des nanocapsules devra être démontrée sur des modèles murins en comparant les courbes de croissance tumorale. Enfin, sous application d'ultrasons, les mécanismes de sonoporation et de vaporisation acoustique pourront être induits pour faciliter l'accumulation des capsules dans la tumeur et la libération contrôlée du principe actif.

◆ Résumé de la thèse :

Un agent de contraste, de taille nanométrique a été élaboré pour imager la tumeur par échographie et IRM du Fluor. Ces nanocapsules polymères de perfluoroctyl bromure sont administrées par voie intraveineuse et accumulées dans la tumeur par ciblage passif et/ou actif. L'encapsulation d'un principe actif permet de plus, d'envisager son utilisation en tant qu'outil théranostique.

◆ Mots clés :

Imagerie du cancer, IRM du Fluor, échographie, perfluorocarbure, nanocapsule, ciblage passif et actif, théranostique

◆ Institut Galien, Paris Sud

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex