



De la squalénisation à la terpénisation de nucléosides : relation entre nucléolipide, structure supramoléculaire et activité biologique

Elise Lepeltier

► To cite this version:

Elise Lepeltier. De la squalénisation à la terpénisation de nucléosides : relation entre nucléolipide, structure supramoléculaire et activité biologique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114827 . tel-01070640

HAL Id: tel-01070640

<https://theses.hal.science/tel-01070640>

Submitted on 2 Oct 2014

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 Biopharmacie

ANNÉE 2012 – 2013

SÉRIE DOCTORAT N° 1240

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 26-09-2013

Par

Elise LEPELTIER

De la squalénisation à la terpénisation de nucléosides :
Relation entre nucléolipide, structure supramoléculaire et
activité biologique.

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Claudie BOURGAUX	Chargé de recherche (Université Paris-Sud)
Rapporteurs :	Nathalie MIGNET Philippe BARTHELEMY	Directeur de recherche (Université Paris-Descartes) Professeur (Université de Bordeaux)
Jury :	Patrick COUVREUR Didier DESMAELE Olivier SPALLA	Professeur (Université Paris-Sud) Directeur de Recherche (Université Paris-Sud) Expert Senior (CEA)

Sommaire

<u>Introduction générale</u>	1
<u>Chapitre I : Bibliographie</u>	7
I- Nanomédicaments	8
1) Vectorisation d'un principe actif	8
2) Agents de contraste en imagerie	12
3) La théranostique	15
4) Prodrogue et squalénisation	18
5) Influence de la structure sur l'internalisation des nanoparticules	25
II- Organisation supramoléculaire de molécules amphiphiles	33
1) Matière molle	33
2) Tensio-actifs et organisations	33
III- Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: application to drug delivery (Revue)	38
1) Introduction	39
2) Brief theoretical background	40
3) Stabilization of nanoparticles	44
4) Solvent elimination	46
5) Experimental processes of mixing	46
6) Nanoprecipitation of polymers: which parameters matter?	48
7) Examples of application of polymeric nanoparticles obtained by nanoprecipitation for the delivery therapeutic molecules	54
8) Terpenoids- based nanoparticles: a new platform for theranostics	58
9) Conclusion	60
<u>Chapitre II : Matériel et Méthodes</u>	74
I- Molécules étudiées	75
1) Variation de la tête polaire	75
2) Variation de la longueur de la chaîne hydrophobe	76
3) Synthèse de la Gemcitabine-1-isoprène et de la Gemcitabine-2-isoprènes	78
II- Préparation des nanoparticules	83
III-Diffraction des Rayons X	83
1) Diffraction par un cristal : loi de Bragg	84
2) Diffusion aux petits angles	86
3) Cas d'une solution idéale de particules identiques (monodisperses)	87
4) Cas d'une solution concentrée: particules en interaction	88

5) Exemples de facteurs de structure de systèmes lipidiques lyotropes	89
6) En pratique	93
IV-Diffusion dynamique de la lumière	96
1) Principe	96
2) En pratique	97
V- Calorimétrie différentielle à balayage	97
1) Principe	97
2) En pratique	98
VI- Cryo-MET	99
1) Principe de la microscopie électronique à transmission	99
2) La cryofixation	99
3) En pratique	100
VII- Balance de Langmuir	101
1) Principe	101
2) En pratique	102
VIII- Biologie cellulaire	104
1) Lignées cellulaires étudiées et culture	104
2) Test MTT	106
3) Cytométrie en flux	109
4) Microscopie confocale à balayage laser	114
<u>Chapitre III : Influence de la tête polaire sur la structure supramoléculaire de nanoparticules squalénées</u>	119
I- Résumé	120
II-Self-assembly of squalene-based nucleolipids: relating the chemical structure of the bioconjugates to the architecture of the nanoparticles (Article 1)	121
1) Introduction	121
2) Experimental Section	124
2) Results and discussion	126
3) Conclusion	137
III- Supporting Information	144
IV- Conclusion	157

<u>Complément d'étude Chapitre III : Influence de la température</u>	158
I- DSC	159
II- SAXS en température	160
1) Thymidine-Sq	160
2) Déoxycytidine-Sq	161
3) Déoxycytidine-5'-Sq	162
4) Adénosine-Sq	163
<u>Chapitre IV : Influence de la longueur de la chaîne hydrophobe sur la structure supramoléculaire des nanoparticules et sur l'internalisation cellulaire</u>	165
I- Résumé	166
II- Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self-assembly: investigating the influence of the chain length (Article 2)	168
1) Introduction	168
2) Langmuir monolayers	170
3) Nanoprecipitation	172
4) Supramolecular organization	173
5) Cell internalization and cytotoxicity	179
6) Discussion	182
7) Materials and methods	185
III- Supporting Information	191
IV- Conclusion	193
<u>Complément d'étude Chapitre IV : Tests MTT et Cytométrie en Flux</u>	194
I- Résultats tests MTT	195
II- Cytométrie en Flux : comparaison de l'internalisation des nanoparticules de Gem-Sq et de Gem-5-isoprènes	199
1) Intensité de fluorescence des suspensions	200
2) Tailles des nanoparticules utilisées	203
3) Cryo-Tem	203
4) Cytométrie en Flux	204
<u>Chapitre V : Influence des conditions de préparation sur la structure supramoléculaire des nanoparticules d'Adénosine-Squalène homologué</u>	209
I- Introduction	210

II- Stabilité des nanoparticules d'Adénosine-Sq homologué	212
III- Balance de Langmuir	213
IV- Structure supramoléculaire en fonction des paramètres de nanoprécipitation	214
1) Variation du ratio entre le volume d'eau et le volume d'éthanol	214
2) Variation de la température	216
3) Structures avant évaporation de l'éthanol	218
4) Nanoprécipitation dans l'acétone	219
V- Etudes RMN	220
VI- Balance de Langmuir avec comme sous phase un mélange eau/éthanol	221
VII-Conclusion	222
 <u>Chapitre VI : Discussion</u>	 226
I- Introduction	227
II- Modification de la molécule amphiphile	228
1) Tête polaire et position du squalène	228
2) Chaîne hydrophobe	229
III- Variations des conditions de préparation	232
IV- Internalisation cellulaire et activité biologique	233
1) Internalisation cellulaire	233
2) Sonde fluorescente	234
 <u>Conclusion générale</u>	 238
 <u>Annexes</u>	 241

Introduction générale

Pour concevoir un médicament, il ne suffit pas de trouver une molécule biologiquement active. Il va falloir être capable, en plus, de répondre à plusieurs problématiques pouvant limiter l'efficacité du médicament. Tout d'abord, les scientifiques doivent souvent faire face à des problèmes de solubilité, ou à une stabilité chimique insuffisante. Il peut être nécessaire d'améliorer l'absorption des molécules actives pour augmenter leur biodisponibilité. Un objectif est aussi de minimiser la toxicité systémique.

C'est dans cette problématique générale que la création de nanomédicaments s'inscrit. De l'ordre de grandeur d'une centaine de nanomètres, ces « magic bullets », concept proposé il y a une centaine d'années par Paul Ehrlich (immunologiste et prix Nobel), commencent réellement à faire leurs preuves, avec quelques mises sur le marché. Par exemple, le Doxil® est un anticancéreux utilisé notamment pour traiter le cancer du sein ou des ovaires. Ce médicament est constitué de doxorubicine chlorhydrate, encapsulée dans des liposomes furtifs (« stealth liposomes »). Ces nanoparticules sont donc utilisées pour transporter de manière contrôlée la drogue du site d'administration à la cible thérapeutique.

Les nanosystèmes envisagés sont nombreux : les particules lipidiques, notamment les liposomes (T. M. Allen, 2013) et les cubosomes (E. Esposito, 2005), les particules polymériques (A. Kumari, 2010), les nanotubes de carbone (S. R. Ji, 2010) et les nanodiamants (M. Chen, 2009) ou encore les colloïdes métalliques (d'or, de fer...) (X. Li, 2011) : **Figure 1**.

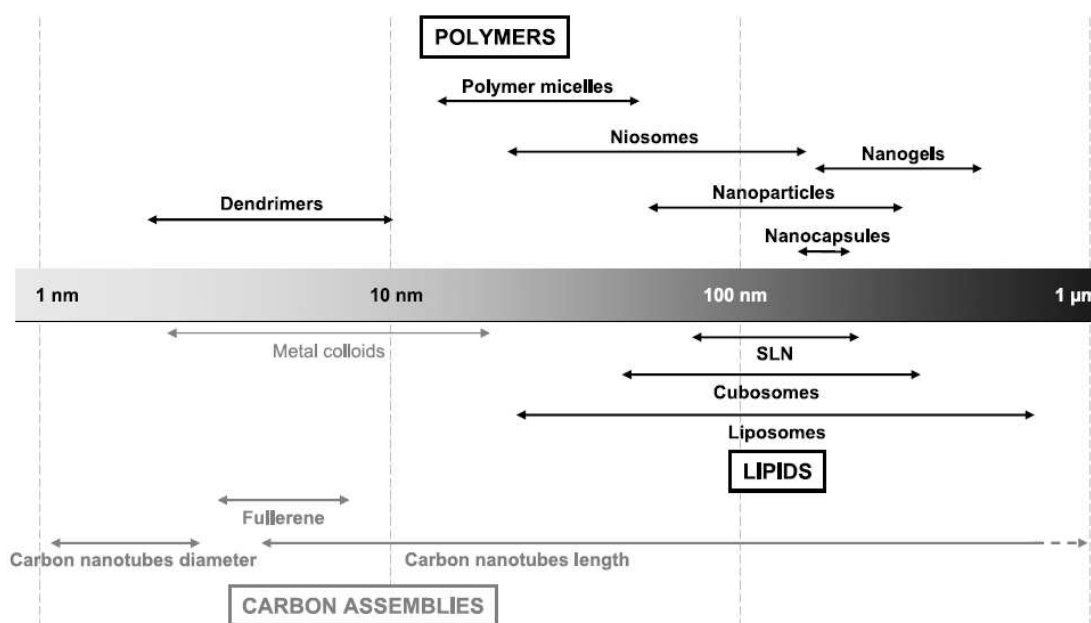


Figure 1 : résumé des principaux systèmes de nanoparticules, les plus étudiées étant les nanoparticules polymériques et lipidiques. L'axe en noir représente la taille des objets (P. Couvreur, C. Vauthier, 2006).

D'une manière générale, les nanovecteurs seront utilisés pour protéger une drogue de la dégradation, augmenter l'absorption de la drogue en facilitant la diffusion à travers l'épithélium (tissu constitué de cellules étroitement juxtaposées), modifier la pharmacocinétique et le profil de distribution de la drogue dans les tissus et/ou améliorer la pénétration et la distribution intracellulaire. Les nanosystèmes peuvent aussi être utilisés pour améliorer les performances des techniques d'imagerie, comme par exemple dans le diagnostic de tumeurs *in vivo*.

Le concept de prodrogue, permet aussi de répondre à certaines problématiques rencontrées lors de la création d'un nouveau médicament (A. M. Qandil, 2012 ; P. Ettmayer, 2004). Ce terme a été introduit en 1958 par Adrien Albert, pour décrire les composés qui subissent une biotransformation avant d'être pharmacologiquement actifs. Les objectifs des prodrogues peuvent être :

- une amélioration de la biodisponibilité d'une part en augmentant la solubilité en milieu aqueux (par des groupements chargés par exemple), l'absorption intestinale passive (par des groupements lipophiles) ou via des transporteurs, d'autre part en protégeant d'une rapide métabolisation (par une modification de la fonction labile éventuelle).
- une délivrance ciblée de la drogue via un enrichissement passif dans le tissu cible, par un ciblage spécifique de certains transporteurs, d'enzymes ou d'antigènes de surface ou encore par une activation contrôlée de la drogue via des enzymes exogènes.

C'est en mariant ces deux approches qu'est née la « squalénisation ». Le squalène (Sq) est un polyterpène biocompatible (précurseur du cholestérol) et lipophile. Il s'est avéré que, lorsqu'il est couplé à un principe actif polaire, il lui confère la capacité de s'auto-assembler en nanoparticules par nanopréciipitation, ce qui en fait une stratégie de vectorisation prometteuse (P. Couvreur, 2006).

Le premier principe actif squalénisé a été la Gemcitabine (Gem) : c'est un analogue de la déoxycytidine, commercialisé depuis 1996 par le laboratoire Lilly, utilisé en chimiothérapie notamment contre le cancer du pancréas mais qui possède une efficacité modérée due à une rapide métabolisation ou encore à des mécanismes de résistance (W. Hagmann, 2010 ; Y. Saiki, 2012 ; E. Moysan, 2013). Après nanopréciipitation, des nanoparticules ayant un

diamètre moyen de 140 nm ont été obtenues, présentant une structure interne bien définie (phase hexagonale inverse).

Il s'est avéré que les nanoparticules de Gem-Sq étaient beaucoup plus actives *in vivo* que la Gemcitabine seule sur des modèles de leucémies murines (P388 et L1210) (P. Couvreur, 2008). Cette efficacité accrue a été expliquée notamment par le fait que la squalénisation améliore la pharmacocinétique de la Gemcitabine.

Au vu des propriétés remarquables de la Gemcitabine-Squalène, le projet est alors né d'appliquer la squalénisation à d'autres principes actifs, et d'étendre cette technique à la terpénisation, c'est-à-dire de coupler des polyterpènes de longueurs différentes à un principe actif, dans une démarche rationnelle et systématique visant à optimiser l'activité thérapeutique de ces différents systèmes (programme ERC TERNANOMED coordonné par le Professeur Patrick Couvreur).

Dans ce cadre, l'objectif général de ma thèse était de tenter de comprendre les relations entre la nature de la paire drogue-terpénoïde, la structure des nanoparticules et leur activité biologique.

Dans la première partie du manuscrit, une étude bibliographique présente les nanomédicaments et, en particulier, l'influence de leur taille et de leur forme sur l'internalisation dans les cellules. Le principe de la squalénisation y est introduit. L'auto-association de molécules amphiphiles est rappelée ensuite. Enfin, la formation de nanoparticules par nanoprécipitation est décrite.

La seconde partie présente les principaux résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse. Dans le chapitre III, l'auto-assemblage de différents nucléosides et analogues nucléosidiques couplés au squalène a été rationalisé. Dans le chapitre suivant, la structure supramoléculaire de différentes nanoparticules composées de Gemcitabine greffée à une chaîne isoprène de longueur variable a été étudiée, et une relation structure-activité a été envisagée. Enfin, dans le chapitre V, les conditions de préparation d'un des bioconjugués ont été modulées afin d'établir les paramètres systématiques à appliquer lors de la nanoprécipitation pour obtenir des nanoparticules stables, avec une structure supramoléculaire définie. Enfin, la dernière partie du manuscrit est une discussion générale de l'ensemble des résultats, identifiant des perspectives et des questions restant à étudier à l'issue de cette thèse.

Références

- T. M. Allen, P. R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 36–48, (2013).
- M. Chen, E. D. Pierstorff, R. Lam, S.-Y. Li, H. Huang, E. Osawa, D. Ho, Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics, *ACS Nano*, **3** (7), 2016-2022, (2009).
- P. Couvreur, B. Stella, L. H. Reddy, Hervé Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaëlle, S. Lepêtre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, Véronique Rosilio, V. Marsaud, J.M. Renoir, L. Cattel, Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics, *Nano Lett.*, **6** (11), 2544-2548, (2006).
- P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharmaceutical Research*, **23** (7), 1417-1450, (2006).
- P. Couvreur, L. H. Reddy, S. Mangenot, J. H. Poupaert, D. Desmaëlle, S. Lepêtre-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, M. Ollivon, Discovery of New Hexagonal Supramolecular Nanostructures Formed by Squalenoylation of an Anticancer Nucleoside Analogue, *Small*, **4** (2), 247 – 253, (2008).
- E. Esposito, R. Cortesi, M. Drechsler, L. Paccamiccio, P. Mariani, C. Contado, E. Stellin, E. Menegatti, F. Bonina, C. Puglia, Cubosome Dispersions as Delivery Systems for Percutaneous Administration of Indomethacin, *Pharmaceutical Research*, **22** (12), (2005).
- P. Ettmayer, G. L. Amidon, B. Clement, B. Testa, Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs, *Journal of Medicinal Chemistry*, **47** (10), 2393-2404, (2004).
- W. Hagmann, R. Jesnowski, J. M. Löhr, Interdependence of Gemcitabine Treatment, Transporter Expression, and Resistance in Human Pancreatic Carcinoma Cells, *Neoplasia*, **12**, 740–747, (2010).
- S-R Ji, C. Liu, B. Zhang, F. Yang, J. Xu, J. Long, C. Jin, D-L Fu, Q-X Ni, X-J Yu, Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1806**, 29–35, (2010).
- A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**, 1–18, (2010).
- X. Li, H. Xu, Z-S Chen, G. Chen, Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications, *Journal of Nanomaterials*, 1-16, (2011).
- A. M. Qandil, Prodrugs of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 17244-17274, (2012).
- E. Moysan, G. Bastiat, J-P Benoit, Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications, *Mol. Pharmaceutics*, **10**, 430–444, (2013).

Y. Saiki, Y. Yoshino, H. Fujimura, T. Manabe, Y. Kudo, M. Shimada, N. Mano, T. Nakano, Y. Lee, S. Shimizu, S. Oba, S. Fujiwara, H. Shimizu, N. Chen, Z. K. Nezhad, G. Jin, S. Fukushima, M. Sunamura, M. Ishida, F. Motoi, S. Egawa, M. Unno, A. Horii, DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **421**, 98–104, (2012).

Chapitre I

Bibliographie



I-Nanomédicaments

Le 29 décembre 1959 à la Société Américaine de Physique, le Professeur Feynman a prononcé la phrase « Pourquoi ne pourrions-nous pas écrire l'intégralité de l'Encyclopædia Britannica sur une tête d'épingle ? ». C'est historiquement une des premières phrases illustrant les possibilités de l'échelle nanoscopique.

Une nanoparticule est un objet ayant des dimensions inférieures au micron, Elle possède un nombre réduit de molécules : d'une dizaine jusqu'à plusieurs milliers. A cette échelle la surface de l'objet devient prépondérante par rapport à son volume, ce qui en fait une propriété très intéressante pour de nombreuses applications.

1) Vectorisation d'un principe actif

Le challenge de ces dernières décennies est de trouver de nouvelles voies thérapeutiques toujours plus spécifiques pour minimiser les effets secondaires indésirables et augmenter l'efficacité d'un traitement. C'est dans ce cadre, que la vectorisation a vu le jour : elle permet d'amener la molécule active directement à la cible biologique (*P. Couvreur, 2001*).

Les nanoparticules semblent être des acteurs de choix pour vectoriser un principe actif. Les dimensions des nanoparticules correspondent à celles de nombreux organismes comme les virus ou les bactéries, elles vont donc pouvoir entrer dans l'organisme tel un cheval de Troie pour amener le composé d'intérêt. Le problème est cependant de concevoir des nanovecteurs biodégradables, non toxiques et non immunogènes. Patrick Couvreur a été un pionnier dans ce domaine en proposant des nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate (*P. Couvreur, 1979*).

Depuis, le nombre de brevets dans ce domaine n'a cessé d'augmenter : entre 1995 et 2003, le nombre de brevets à l'année est passé de 950 à 2600 dans le domaine des nanotechnologies en général (*A. Hullmann, 2006*).

Il existe trois générations de vecteurs pour traiter le cancer (*P. Couvreur, C. Vauthier 2006*).

- Les vecteurs de première génération.

L'inconvénient de ce type de vecteur est la rapide élimination des nanoparticules par les macrophages du foie, ce qui entraîne une faible disponibilité sanguine. Cependant, ces vecteurs sont particulièrement intéressants pour traiter des cancers qui seraient localisés dans cet organe. En 1997, Patrick Couvreur montra que des nanoparticules de

polyalkylcyanoacrylate chargées d'un anticancéreux, la doxorubicine, arrivaient à vaincre les mécanismes de résistance de cellules cancéreuses métastasées hépatiques murines (P. Couvreur, 1997). En effet, les nanoparticules sont fortement adsorbées à la surface des cellules, induisant un microgradient de la concentration en doxorubicine dans la membrane cellulaire ce qui a pour conséquence d'augmenter la diffusion intracellulaire de la drogue tout en évitant la glycoprotéine P (PgP) (pompe d'efflux). Cette découverte est très prometteuse pour le traitement de l'hépatocarcinome, (tumeurs du foie) l'un des cancers les plus répandus dans le monde, car ces tumeurs sont connues pour être très résistantes aux chimiothérapies.

- vecteurs de seconde génération : ciblage passif

Pour pallier la faible biodisponibilité, une seconde génération de vecteur a vu le jour : ce sont des nanoparticules présentant une surface recouverte de polymères hydrophiles comme le Polyéthylène Glycol (PEG) (**Figure 1**). Il y a deux manières de modifier la surface : soit en liant de manière covalente le polymère hydrophile à la molécule constituant la nanoparticule, soit en étant adsorbé physiquement à sa surface. Cela crée un « nuage » hydrophile autour de la particule, ce qui aura pour conséquence la réduction de la réaction d'opsonisation et donc de la prise en charge par les macrophages (voir partie 5) (nanoparticules furtives). Ces particules pourront donc avoir un temps de demi-vie de circulation sanguine allant jusqu'à 45 h, contrairement à quelques heures maximum pour la première génération de vecteur.

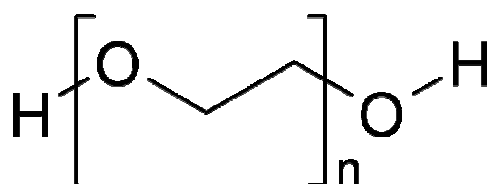


Figure 1 : polyéthylène glycol comportant n monomères.

Les particules « Stealth », marque déposée par Liposomes Technology (USA), sont justement des liposomes furtifs de petites tailles (inférieure à 100 nm) et ayant une surface hydrophile. La taille peut en effet avoir une influence sur l'internalisation par les macrophages : le rayon de courbure étant plus grand, l'opsonisation serait réduite. Il a été montré que ces particules pouvaient libérer leur contenu spécifiquement au sein de la tumeur, grâce à l'effet EPR qui signifie « Enhanced Permeability and Retention ». En effet, d'une part la nature même d'une tumeur cancéreuse qui d'une part développe un réseau de vaisseaux sanguin anormalement

important pour pouvoir grandir et se multiplier (angiogenèse), d'autre part possède un endothélium discontinu, et enfin une absence de drainage lymphatique (très observée dans les tumeurs solides), il y aurait une accumulation plus importante de particules au sein des tumeurs cancéreuses. Ainsi, avec des nanoparticules ayant un temps de demi-vie dans le sang relativement important et une taille inférieure à celle des pores de l'endothélium, une accumulation spécifique est envisageable dans la tumeur (*H. Maeda, 2013*).

- La troisième et dernière génération de vecteurs sont des particules à ciblage actif, pour pouvoir délivrer la drogue à la bonne cellule, via un processus de reconnaissance de cibles caractéristiques de certaines cellules cancéreuses. Par exemple, des liposomes ont été créés pour cibler spécifiquement les cellules endothéliales des poumons. Ils portent à leur surface des anticorps monoclonaux IgG, immunoglobulines de type G, qui vont être spécifiques des récepteurs à glycoprotéines pp120 (*K. Maruyama, 1999*). Des liposomes anti HER-2 encapsulant de la doxorubicine ont aussi été conçus, et les études sur des xénogreffes du cancer du sein ont montré des résultats bien meilleurs comparés à des liposomes simplement PEGylés (*J. W. Park 2001*).

Un autre type de vecteur très intuitif est aussi utilisé : les nanovecteurs magnétiques. En effet, en utilisant un champ magnétique localisé, les nanoparticules seront accumulées physiquement au sein de la tumeur. En associant ce ciblage magnétique à un principe actif, comme c'est le cas par exemple pour les nanoparticules de Gemcitabine-Squalène encapsulant des particules de magnétite (*J. L. Arias, 2008*), une activité thérapeutique très intéressante est observée. Il n'est cependant pas nécessaire d'associer à ce type de vecteur un principe actif pour avoir une activité thérapeutique. En effet, les particules d'oxyde de fer de taille inférieure à ~20 nm possèdent un comportement superparamagnétique : c'est-à-dire qu'en présence d'un champ magnétique elles possèdent une aimantation qui s'annulera à l'arrêt de ce champ. La relaxation de l'aimantation en l'absence de champ magnétique se fera par deux mécanismes, soit par la rotation du vecteur d'aimantation pour revenir à son point d'origine, soit par la rotation de la particule, ce qui aura pour conséquence dans les deux cas un échauffement du milieu : c'est ce qu'on appelle l'hyperthermie.

Dès 1968, il avait été reporté qu'augmenter la température de tissus cancéreux entre 40-43°C apportait une amélioration, voire une destruction des tissus cancéreux (*R. Sharma, 2009*). Mais pouvoir chauffer très localement la tumeur sans toucher le tissu sain a longtemps été un défi. L'idée d'utiliser des nanoparticules a alors émergé (*H. Marie 2013 ; C. Vauthier 2011 ; H. Hejase, 2012*). In vitro, il n'existe pourtant pas de différence entre la thermosensibilité

intrinsèque des cellules tumorales et la thermosensibilité de cellules saines. Mais in vivo, les différences physiologiques entre un milieu tumoral et un milieu sain vont rendre les cellules cancéreuses bien plus sensibles à l'élévation de température : faible apport en oxygène, manque de glucose... De plus le tissu tumoral est moins bien perfusé, il dissipera donc moins bien la chaleur (*J. Van der Zee, 2002*). A l'échelle cellulaire, l'élévation de la température affecterait la fluidité et la stabilité de la membrane cellulaire et aurait un impact sur la fonction des protéines de transport transmembranaires ainsi que sur les récepteurs cellulaires. L'augmentation de la température induirait aussi des changements dans l'organisation du cytosquelette. Tous ces facteurs entraîneraient l'apoptose des cellules (*B. Hildebrandt, 2001*). L'hyperthermie est aussi utilisée pour ses effets améliorant l'action de la radiothérapie ou/et de la chimiothérapie. En effet, il a été montré que l'hyperthermie, associée à un agent thérapeutique augmentait considérablement la nécrose d'une tumeur cancéreuse. Plusieurs études comparatives en phases cliniques III ont aussi montré que la radiothérapie associée avec de l'hyperthermie augmentait significativement les chances de survie du patient, comparée à la radiothérapie seule (*B. Hildebrandt, 2001*).

Malgré tout cet engouement concernant ces « nanobombes », en France, seulement deux nanomédicaments anticancéreux ont vu le jour. Le Caelyx[®], molécule de doxorubicine encapsulée dans des liposomes pégylés, utilisé dès 1996 contre le sarcome de Kaposi, puis par la suite utilisé dans le traitement du cancer du sein et des ovaires et l'Abraxane[®], molécule de paclitaxel lié de façon covalente à une protéine d'albumine, commercialisé en 2008 pour le traitement du cancer du sein (**Figure 2**).

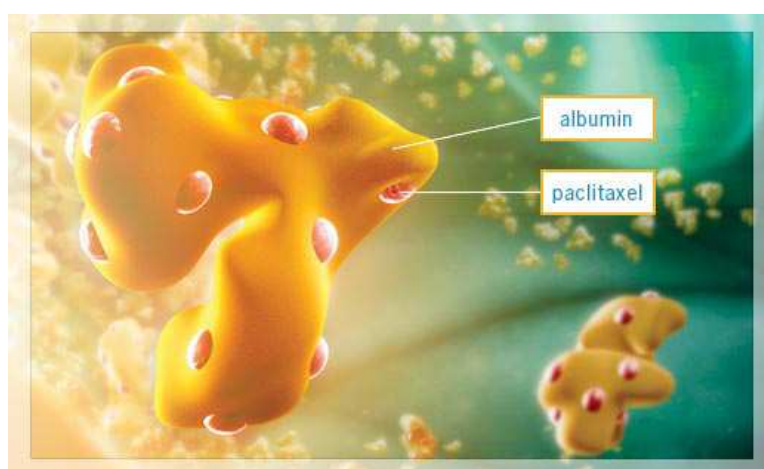


Figure 2 : représentation schématique de l'Abraxane[®].

En effet, il est difficile pour un nanomédicament de voir le jour car tous les domaines de compétences sont mis à contribution pour les développer: chimie organique, biologie, physico-chimie... Et tout cela coûte cher: des dizaines de millions d'euros. Mais les exemples dans les laboratoires publics continuent cependant d'augmenter: plus de 900 publications en 2012.

Un exemple récent est Transdrug[®], développé par Bioalliance. Ce sont des nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate chargées en doxorubicine. Ce médicament est actuellement en phase clinique III pour le traitement de l'hépatocarcinome multi - drug resistant (P. Couvreur 2013).

2) Agents de contraste en imagerie

Une autre application des nanoparticules est leur utilisation comme agent de contraste en imagerie médicale, notamment en IRM.

Un agent de contraste est un élément paramagnétique, qui est capable de modifier les temps de relaxation longitudinal et transversal T_1 et T_2 (**Figure 3**) des spins des protons des molécules l'eau et donc d'améliorer le contraste des images.

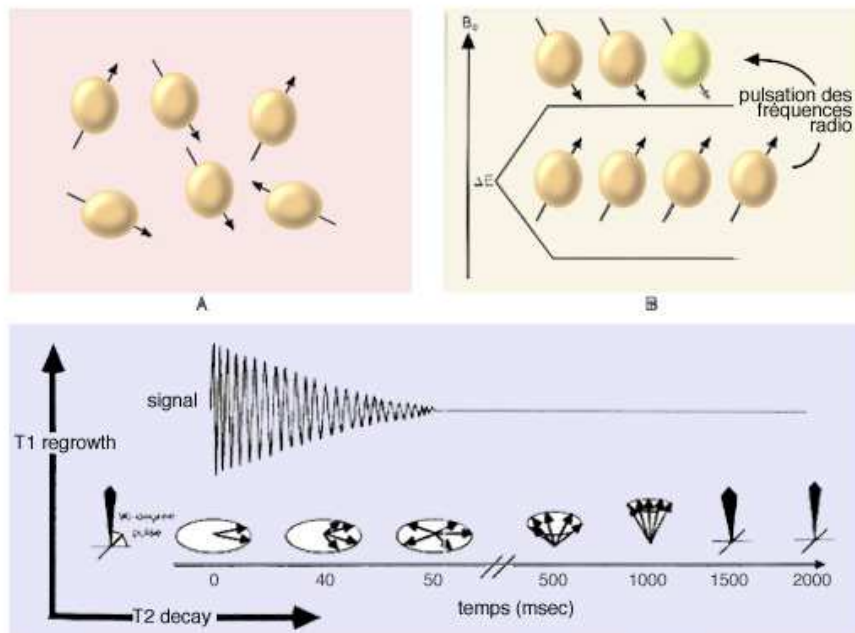


Figure 3 : Principe de l'IRM et explication de T_1 et T_2 : Un groupe de spins placés dans un champ magnétique B_0 possède une aimantation générale de même sens et direction que B_0 . Cette aimantation résulte de la différence de populations de spins « parallèles » (plus nombreux) et « anti-parallèles » au champ B_0 . Une onde radiofréquence entraînera un phénomène de résonance à l'origine d'une bascule de l'aimantation, qui sera alors décrite par

une composante longitudinale (axe B_0) et transversale (perpendiculaire à B_0). Le phénomène de relaxation traduit le retour à l'équilibre de l'aimantation. Il se décompose en deux parties : d'une part une réaugmentation de l'aimantation longitudinale, dans l'axe du champ B_0 , qui suit une courbe exponentielle que l'on caractérise par le temps T_1 d'autre part une chute de l'aimantation transversale qui suit une courbe exponentielle décroissante caractérisée par le temps T_2 .

Les premiers agents de contrastes étaient constitués d'une terre rare paramagnétique, l'ion gadolinium Gd^{3+} , qui isolé est très toxique, mais qui, chélaté, possède une toxicité moindre. Comme tous les composés paramagnétiques, c'est un agent de contraste T_1 , c'est-à-dire qu'il diminue le temps de relaxation T_1 des molécules d'eau située à la proximité. Par pondération, un hypersignal sera donc observé localement. Pour réduire la dose à injecter, les nanotechnologies paraissent être une stratégie prometteuse. Une étude montre par exemple la mise au point de nanoparticules composées d'un biopolymère, qui concentrent en leur sein des complexes de gadolinium commerciaux connus pour leur effet contrastant. (*T. Courant, 2012*).

Les composés superparamagnétiques (magnétite Fe_3O_4 ou maghémite γFe_2O_3) sont des agents de contraste T_2 : ils permettent de diminuer le temps de relaxation T_2 des molécules d'eau à proximité. Plusieurs études ont cherché à vectoriser cet agent, notamment grâce à des nanoparticules. Par exemple, dans l'article *J. A Park, 2008*, des particules d'oxyde de fer (magnétite) ont été encapsulées dans des nanoparticules polymériques (polycaprolactone) recouvertes ou non de biotine-avidine. Les temps de relaxation T_2 ont été mesurés pour ces différents systèmes, afin d'étudier l'impact de l'enrobage sur le comportement superparamagnétique de ces objets.

Actuellement, il existe trois produits sur le marché, composés de nanoparticules de fer et utilisés comme agent de contraste : Endorem[®] (développé par Guerbet), Feridex[®] et Resovist[®] (développé par Bayer).

Les nanoparticules peuvent aussi être utilisées comme agent de contraste dans une autre technique d'imagerie : l'ultrasonographie ou imagerie par ultrasons. Un transducteur est placé contre la peau et une onde à haute fréquence, ultrason, est émise. Cette onde en rencontrant différents types de tissus ou de structure dans le corps sera soit absorbée par un milieu homogène, soit réfléchi par l'interface entre deux milieux ayant une impédance (vitesse du son $\times$ densité du milieu) différente. Il y aura alors formation d'un écho ultra-sonore qui sera enregistré par ce même transducteur. L'intensité du signal réfléchi définira alors

l'échogénicité du milieu : par exemple, les os peuvent être facilement distingués des autres tissus de par leur forte échogénicité (R. Díaz-López, 2010). Mais lorsque l'écart est trop faible, comme c'est le cas entre une tumeur et un tissu sain, il est nécessaire d'utiliser des agents de contraste. Les agents perfluorocarbonés, comme le perfluorooctylbromide, sont connus pour être de bons agents de contraste pour l'ultrasonographie : à 37°C il est sous forme de microbulles ce qui aura pour conséquence une différence notable d'échogénicité (F. Tranquart, 2007). Pour stabiliser ces microbulles et pour les amener dans la région d'intérêt, des nanoparticules polymériques ont été utilisées (E. Pisani, 2008) (**Figure 4**).

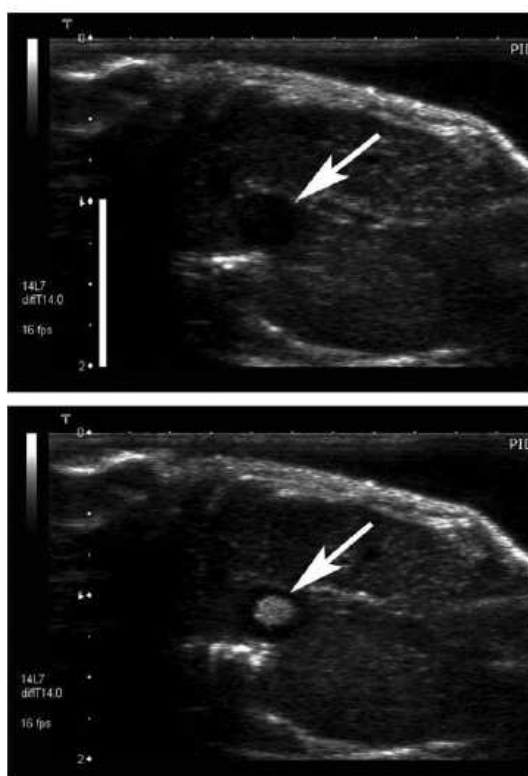


Figure 4 : Image obtenue par ultrasons d'une souris à laquelle on a injecté une suspension de nanocapsules contenant un agent de contraste perfluorocarboné (image inférieure) : la flèche désigne la veine cave inférieure du foie. Image supérieure : en l'absence d'agent de contraste.

3) La théranostique

Pendant ces dernières années, des nanoparticules combinant ces deux approches, le traitement d'une tumeur et l'imagerie, ont vu le jour : c'est ce qu'on appelle la nanothéranostique (*P. Prabhu, 2012, S. Mura 2012*). C'est un domaine de recherche très prometteur, car les nanovecteurs envisagés peuvent être multiples. Le vecteur pourra être capable de traiter une tumeur par chimiothérapie, photothérapie ou encore thérapie génique tout en étant suivi par de la microscopie de fluorescence, l'IRM ou encore par ultrasonographie.

Prenons un exemple concret : une récente étude a montré le développement de nanoparticules de silice mésoporeuse incorporant de façon covalente des agents fluorescents d'heptaméthine cyanine. Les molécules de metallo-naphtalocyanine sont hydrophobes, et ont été adsorbées dans les pores de la particule. L'excitation de cette molécule par un laser ayant une longueur d'onde dans le proche infrarouge entraîne une augmentation locale de la température. Ces nanoparticules injectées en intratumoral permettent d'une part une augmentation significative du volume de la tumeur nécrosé (95 %) et d'autre part une visualisation de la tumeur (*A. K. Singh, 2012*). Dans cet exemple, la nanoparticule sera suivie par de l'imagerie de fluorescence et le traitement envisagé est l'hyperthermie.

Dans le tableau suivant (**Table 1**), quelques études portant sur le développement de nanovecteurs en théranostique ont été résumées :

Référence	Vecteur	Principe actif	Agent de contraste	Technique d'imagerie
<i>J. Conde, 2013</i> (Figure 5a)	Nanoparticule d'or PEGylées	Anti Si-ARN : thérapie génique	Fluorophore en 3': Cy3	Microscopie de fluorescence
<i>S. Alireza, 2012</i>	Nanoparticules polymériques (acide méthacrylique, polysorbate 80 et amidon)	Doxorubicine : chimiothérapie	HiLyte Fluor 750	Microscopie de fluorescence
<i>S. Kaida, 2010</i>	Micelles de block copolymère poly (éthylène glycol)-b-poly(glutamic acide)	DHCAPt, dérivé de l'oxaliplatine : chimiothérapie	Diethylenetriaminepentaacetic acid gadolinium (III)	IRM
<i>N. Rapoport, 2011</i>	Micelles de block copolymère poly(éthylène oxide)-co-poly(D,L-lactide)	Paclitaxel : chimiothérapie	perfluoro-15-crown-5-éter	Ultrasonographie
<i>I. Roy, 2003</i>	Nanoparticules de silice	2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide (HPPH) : photothérapie	HPPH	Microscopie de fluorescence
<i>H. Koo, 2010</i>	Micelles d'un polymère pH sensible MPEG poly(β -amino ester)	Molécule photosensibilisante, la protoporphyrine IX : photothérapie	protoporphyrine IX	Microscopie de fluorescence
<i>N. R. Soman, 2009</i>	Nanoparticules composées d'un mélange de deux lipides (lécithine et DPPE)	Melittine (peptide cytolytique non-spécifique) : chimiothérapie	perfluorooctyle Bromide liquide	Ultrasonographie
<i>M. Nurunnabi, 2010</i> (Figure 5c)	Micelles composées d'un mélange de PEG-PCDA (10,12-pentacosadiynoic acide) et PCDA-Herceptine	Herceptine : chimiothérapie	Quantum dots (CdTe/CdSe)	Microscopie de fluorescence
<i>J. H. Park, 2008</i>	Micelles composées de phospholipides-PEGylées	Doxorubicine : chimiothérapie	Particules d'oxyde de fer et Quantum dots	Microscopie de fluorescence
<i>Z. Peng, 2010</i>	Nanoparticules d'oxyde de fer PEGylées	Doxorubicine : chimiothérapie	dye 5-FAM	IRM et microscopie de fluorescence
<i>H. K. Moon, 2009</i> (Figure 5b)	Nanotubes de carbone fonctionnalisés avec PL-PEG2000-NH ₂	Photothérapie dans le proche IR	Nanotube lui-même	Microscopie de fluorescence

Table 1 : résumé de 11 publications visant à développer des nanoparticules en théranostique.

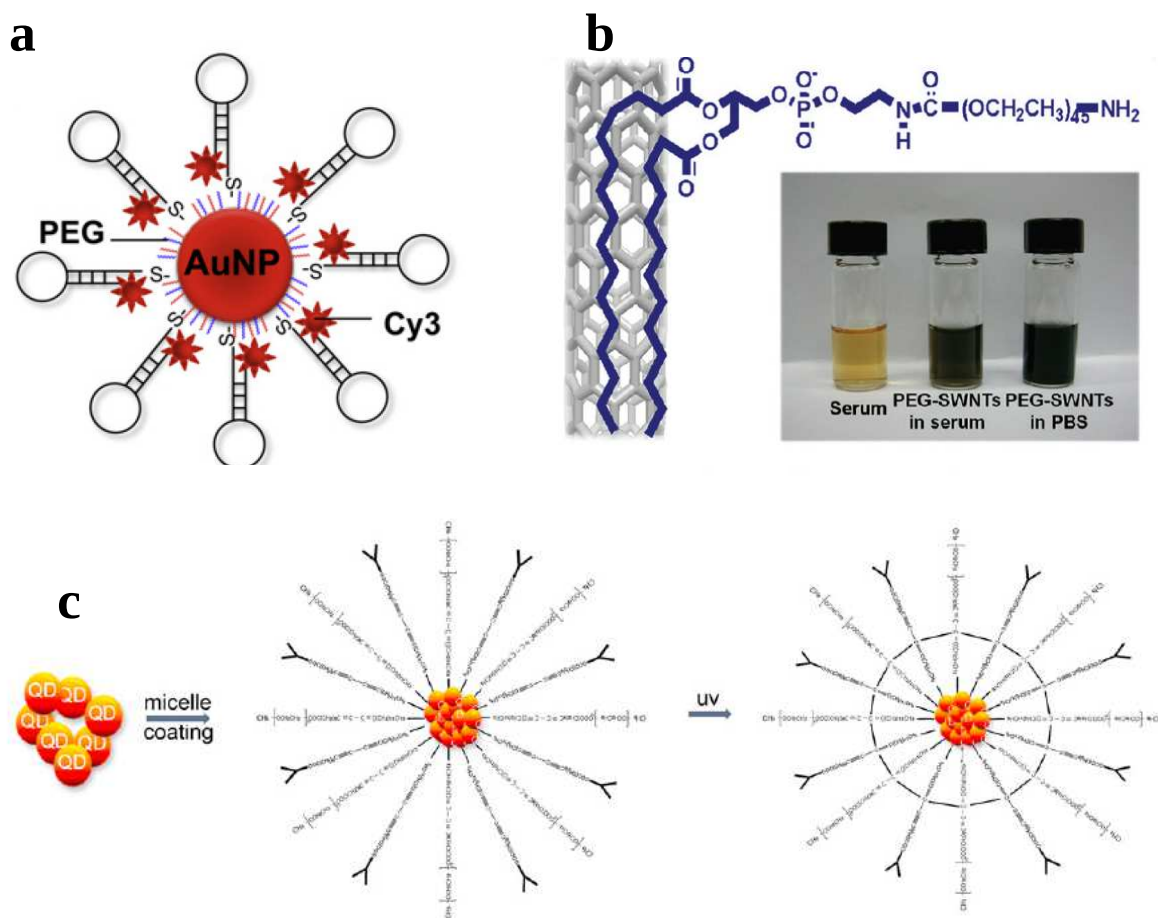


Figure 5 : trois exemples de vecteurs théranostiques cités dans le tableau : (a) nanoparticules d'or PEGylées recouvertes de SiRNA antisens et d'une sonde fluorescente Cy3. (b) Schéma d'un nanotube de carbone fonctionnalisé et comparaison de trois vials comportant du sérum seul et des nanotubes dans le sérum ou dans le PBS. (c) micelle encapsulant en son cœur des quantum dots.

Ce tableau montre à quel point la nanothéranostique est un domaine en devenir. Les vecteurs utilisés sont de natures diverses : métalliques, lipidiques, polymériques. Ils encapsulent un principe actif pour des thérapies variées : thérapie génique, chimiothérapie ou encore photothérapie. Enfin, pour pouvoir suivre ce vecteur et imager la tumeur, il est nécessaire d'ajouter un agent de contraste : une sonde fluorescente pour la microscopie de fluorescence, un composé paramagnétique pour l'IRM (pour les nanoparticules d'oxyde de fer, le vecteur lui-même était l'agent de contraste), et enfin un composé perfluoré pour l'ultrasonographie.

Pour finir avec cette partie, nous nous sommes placés dans le cadre du traitement du cancer, mais la nanothéranostique se développe aussi dans d'autres domaines, comme la médecine personnalisée ou le traitement de maladies cardiovasculaires (S. Mura, 2013).

4) Prodrogue et squalénisation

a) Prodrogue

La prodrogue est un composé qui est administré sous une forme inactive. Une fois exposé et métabolisé à un environnement adéquat, le composé sera libéré sous sa forme active. Les prodrogues sont classées en deux catégories, basées sur leur site de conversion dans leur forme active. Les prodrogues de type I sont celles où la conversion est intracellulaire, et le type II, sont celles où la conversion est extracellulaire, notamment dans les sucs digestifs ou dans le sang.

Historiquement, certaines prodrogues ont été découvertes fortuitement, c'est-à-dire que des molécules avaient été découvertes comme étant actives, mais il n'était pas envisagé que ça ne puisse pas être directement le principe actif. La découverte du vrai agent actif a contribué à la compréhension du mécanisme d'action de la molécule et même à la découverte de nouvelles classes thérapeutiques. C'est le cas notamment du Prontosil[®] (**Figure 6**), premier médicament antibactérien commercialisé, mis au point en 1935. Les scientifiques ont montré que l'agent réellement actif était la para-aminophénylsulfamide, et ce dernier fut vendu en France en 1937 : une nouvelle classe de médicament était née, les sulfamides (M. Wainwright, 2011).

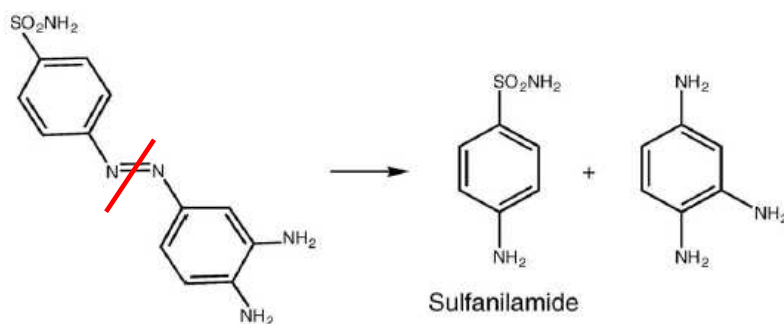


Figure 6 : molécule de Prontosil[®] à gauche, et molécule active à droite. Le trait rouge représente l'hydrolyse de la double liaison N=N.

b) Trois exemples de prodrogue

Une stratégie pour augmenter la solubilité de drogues contenant un groupement hydroxyle est d'ajouter un phosphate. C'est ce qui a été par exemple réalisé pour augmenter la solubilité de la buparvaquone, indiquée pour le traitement de la theilériose, maladie parasitaire (**Figure 7**) (A. Mäntylä, 2004). Une fois dans la cellule, le lien sera ensuite hydrolysé par des phosphatases alcalines pour libérer le principe actif.

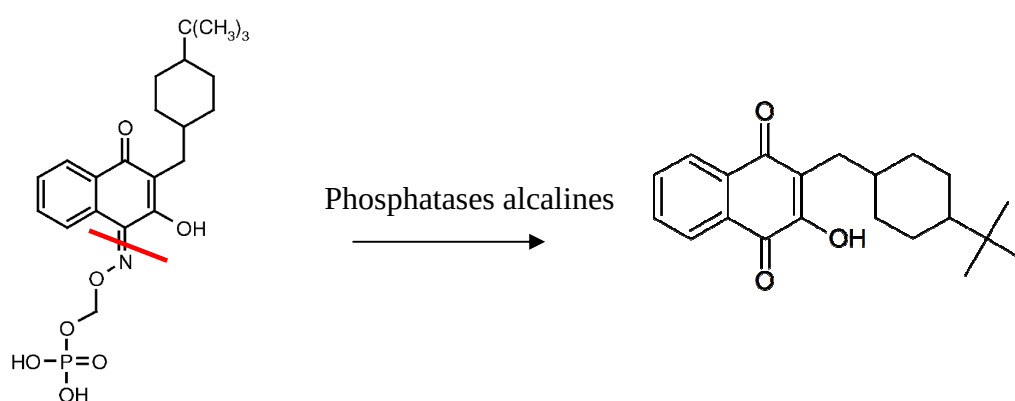


Figure 7 : Prodrogue à gauche libérant en intracellulaire la buparvaquone, à droite.

Pour augmenter l'absorption orale du paclitaxel, un polymère soluble dans l'eau, le monométhoxypolyéthyléneglycol 5000-succinate, a été couplé à la molécule par un lien ester. Une fois dans la cellule, ce lien est rapidement hydrolysé par des estérases pour libérer l'anticancéreux (J-C Choia, 2004) : **Figure 8**.



Figure 8 : Schéma de l'hydrolyse de la prodrogue libérant le paclitaxel.

Pour augmenter la lipophilie d'une drogue polaire, comme par exemple un nucléoside, une stratégie de plus en plus utilisée est de construire une prodrogue amphiphile, en utilisant par exemple des dérivés cholestérols. C'est le cas de la didéoxyinosine, un anti-VIH, qui a été couplée au cholestérol via un lien ester avec pour espaceur l'acide succinique (Y. Jin, 2008) :

Figure 9.

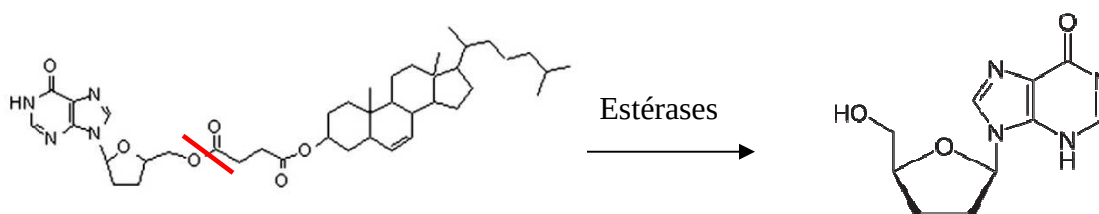


Figure 9 : Schéma de la didéoxyinosine rendue amphiphile par une molécule de cholestérol.

c) Squalène et squalénisation

Le squalène est une biomolécule hydrophobe contenant 6 unités isoprènes (**Figure 10**). C'est un précurseur impliqué dans la voie de synthèse du cholestérol et de stéroïdes. Le squalène est partout dans la nature, plus spécialement dans les olives, dans l'huile de foie de requin, ou encore dans les germes de blé. Chez l'homme le squalène est produit par le foie et la peau.



Figure 10 : molécule de squalène, qui possède un centre de symétrie.

Le squalène est connu pour être une molécule bien tolérée par l'organisme, c'est pourquoi elle est utilisée notamment comme adjuvant pour les vaccins. Le squalène est aussi employé comme agent protecteur et préventif du cancer. En effet il a été montré que l'absence de cancer chez le requin était liée à la grande quantité de squalène chez cet animal (L. H. Reddy, 2009). Aussi, le fait que les populations méditerranéennes soient moins touchées par le

cancer serait en partie lié au fait que l'alimentation est plus riche en squalène que la moyenne : grande consommation d'huile d'olive.

Ces dernières années, le concept de créer des conjugués lipides-drogues s'est particulièrement développé. En effet ce couplage permettrait d'améliorer la pharmacocinétique et de diminuer la cytotoxicité.

C'est en mariant ces différents éléments que la squalénisation, un nouveau concept de prodrogue, a vu le jour dans l'équipe de Patrick Couvreur. Cela consiste à coupler une molécule de squalène, ou plus exactement l'acide squalénique, à un principe actif. Dans le cas d'un principe actif polaire, une molécule amphiphile est alors obtenue, qui remarquablement et quel que soit le principe actif, s'auto-organise en nanoparticules. Le premier couplage réalisé concernait la gemcitabine (**Figure 11**).

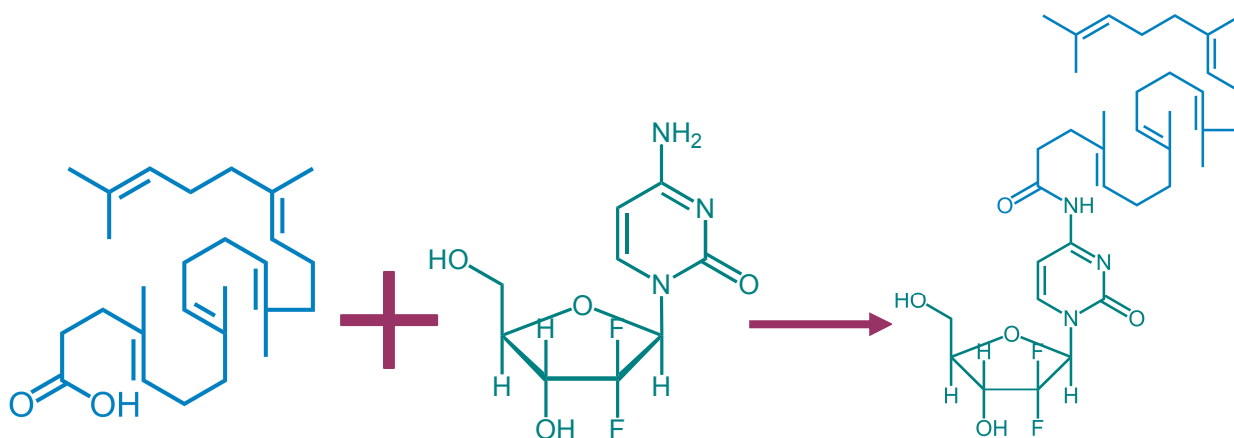


Figure 11 : Schéma du couplage entre la Gemcitabine et le squalène modifié en acide squalénique.

La Gemcitabine est un analogue nucléosidique hydrophile, notamment utilisé pour traiter le cancer du pancréas mais qui a une efficacité modérée. En effet, ce composé étant hydrophile, des transporteurs sont nécessaires pour pénétrer la membrane plasmique, ce qui peut entraîner des mécanismes de résistance. De plus, pour devenir active, la Gemcitabine doit être triphosphorylée par des cytidine-kinases, ce qui peut aussi entraîner des phénomènes de résistance. Une fois entré dans la cellule (ou dans le flux sanguin), le composé est susceptible d'être déaminé par la déoxycytidine déaminase et de devenir inactif. Coupler le squalène, ou plus exactement l'acide squalénique, à la Gemcitabine via une liaison amide permet donc d'une part de protéger la fonction amide, et d'autre part de créer un composé amphiphile qui pourrait entrer sans transporteur (**Figure 12**). Dans l'eau, la Gemcitabine- Squalène forme spontanément des nanoparticules ayant une taille voisine de 120 nm.

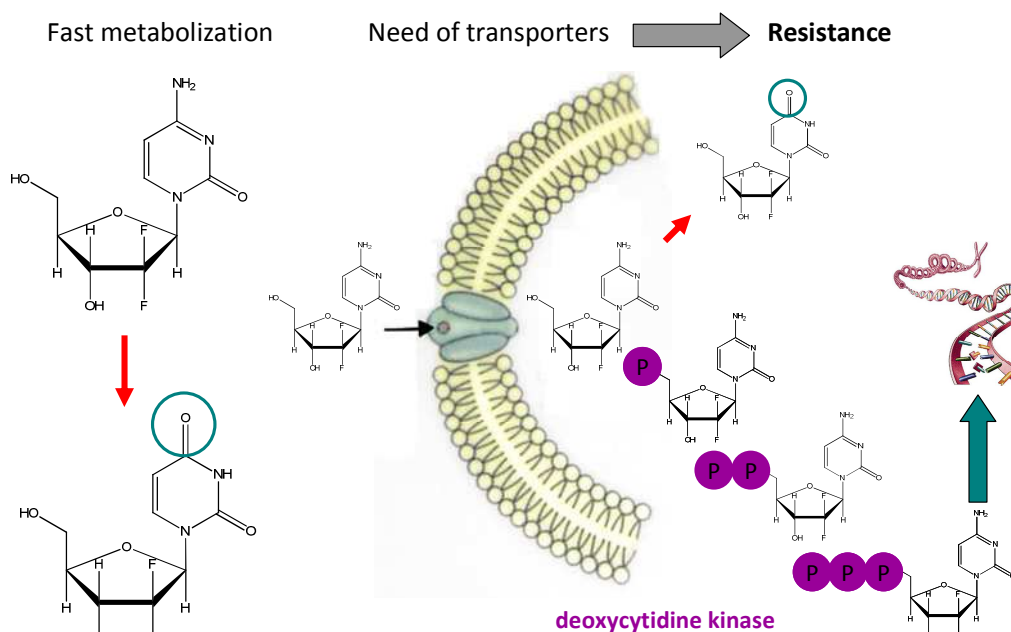


Figure 12 : dessin représentant les mécanismes d'action et d'inactivation de la Gemcitabine : à gauche la rapide métabolisation par la déoxycytidine déaminase et à droite la nécessité d'avoir des transporteurs pour pénétrer dans la cellule. Une fois entrée, la molécule devra être trois fois phosphorylée pour être incorporée lors de la réplication de l'ADN.

Concernant le mécanisme d'internalisation, il a été montré dans les cellules MCF-7 et J774 que la nanoparticule n'entrait pas par endocytose mais par diffusion passive (*L. Bildstein, 2010*): la nanoparticule serait débobinée par des protéines extracellulaires (albumine, lipoprotéines) puis les monomères seraient pris en charge par des protéines qui faciliteraient la diffusion du composé à travers la membrane. Celle-ci jouerait le rôle de réservoir, en délivrant ainsi relativement lentement la Gemcitabine-Squalène (Gem-Sq) dans le milieu intracellulaire (**Figure 13**). Ces résultats ont aussi été confirmés par des études d'insertion de la Gem-Sq dans des membranes modèles : en effet il a été démontré que la Gem-Sq pouvait pénétrer la DPPC en changeant la structure de la membrane (*B. Pili, 2010*).

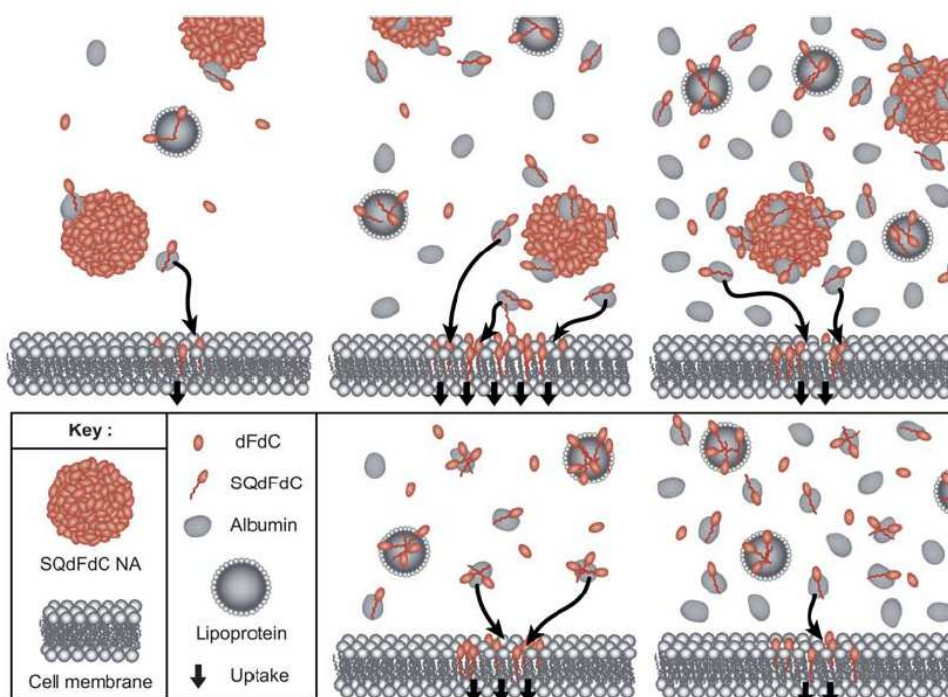


Figure 13 : schéma représentant le « débobinage » de la nanoparticule par les protéines, puis la prise en charge des monomères pour faciliter la diffusion à travers la membrane cellulaire (L. Bildstein, 2010).

Une fois dans la cellule, la liaison amide sera alors coupée par une estérase, libérant ainsi le principe actif qui sera alors phosphorylé 3 fois par des kinases, avant d'être intégré lors de la réplication d'ADN. La synthèse de l'ADN sera alors stoppée, et le mécanisme d'apoptose enclenché (**Figure 12**).

Pour finir, le gain en efficacité thérapeutique a bien été prouvé in-vivo, notamment sur des souris sur lesquelles des tumeurs P388 ou encore L1210 avaient été greffées en sous-cutanées (**Figure 14**) (L. H. Reddy, 2007 ; P. Couvreur, 2008).

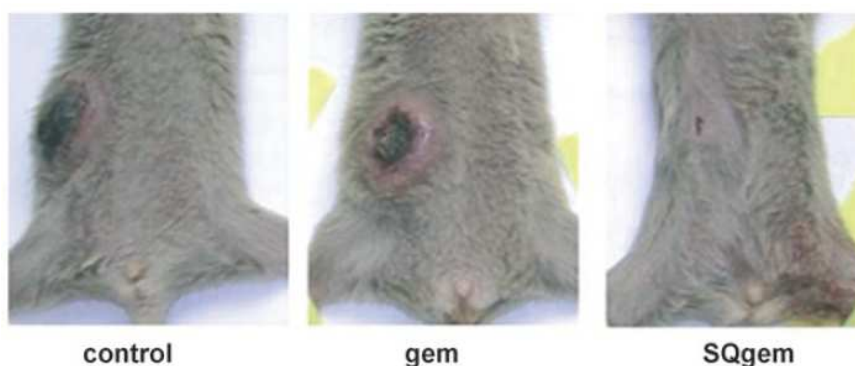


Figure 14 : photo d'une souris ayant une tumeur P388 greffée en sous cutanée, traitée, à gauche, uniquement par une solution saline, au centre par la Gemcitabine et à droite par des nanoparticules de Gemcitabine-Squalène. Le volume tumoral a considérablement diminué (P. Couvreur, 2008).

Suite à ces résultats exceptionnels, la squalénisation a été étendue à un bon nombre de principes actifs, et encore une fois, dans tous les cas des nanoparticules furent obtenues, en milieu aqueux : le paclitaxel (*F. Dosio, 2010*) (anticancéreux utilisé notamment pour traiter le cancer du poumon, du sein et de l’ovaire), la didéoxycytine (*F. Bekkara-Aounallah, 2008*), le monophosphate-Gemcitabine (*J. Caron, 2012*), la pénicilline G (*N. Semiramo, 2012*), et même un siARN (*M. Raouane, 2011*).

d) Structure des nanoparticules de Gemcitabine-Squalene

La structure supramoléculaire des nanoparticules de Gemcitabine-Squalene a été étudiée par diffraction aux rayons X petits angles, par cryomicroscopie électronique à transmission et enfin la structure a été confirmée par modélisation. Il s’est avéré que les nanoparticules s’organisaient en phase hexagonale inverse (**Figure 15**), avec pour paramètre de maille $a = 8.77$ nm. Cette structure provient de l’auto-organisation de micelles cylindriques en phase inverses (*P. Couvreur, 2008*).

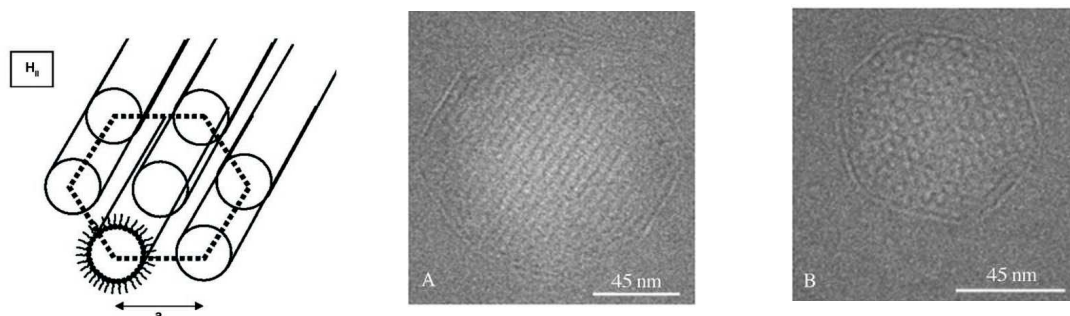


Figure 15 : A gauche, représentation de la phase hexagonale inverse et à droite deux images obtenue par Cryo-Tem (*P. Couvreur, 2008*).

5) Influence de la morphologie sur l'internalisation des nanoparticules

a) Les différentes voies d'internalisation d'une nanoparticule (H. Hillaireau, 2009)

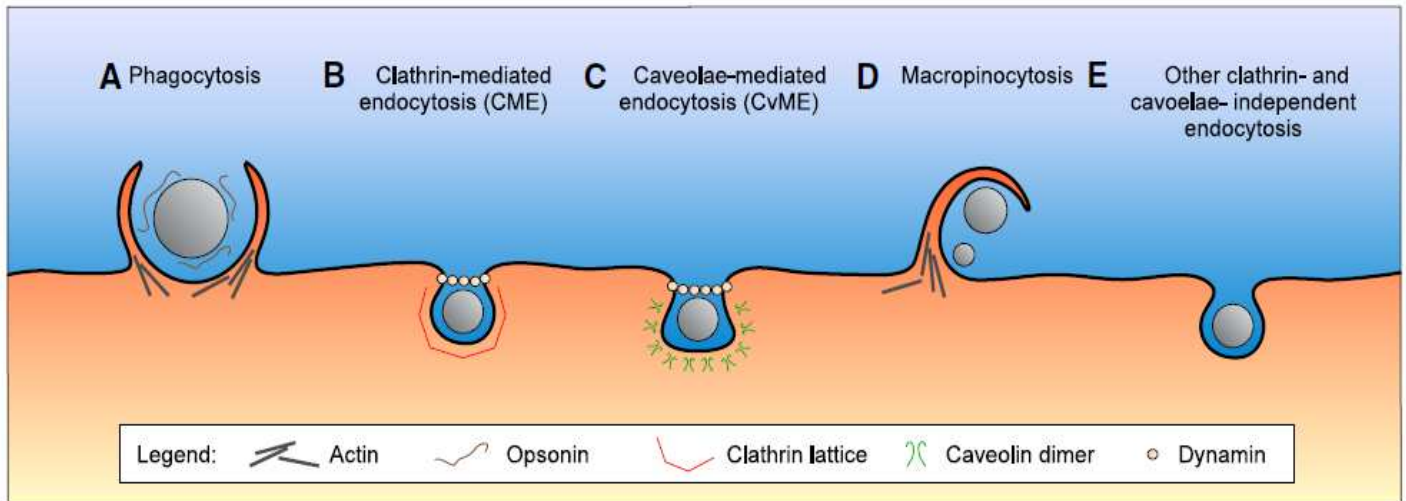


Figure 16 : Schéma des différentes voies d'internalisation d'une nanoparticule (H. Hillaireau, 2009).

La phagocytose (**Figure 16**) fut découverte en 1882 comme un processus majeur de lutte contre les différents pathogènes et autres éléments du non-soi, comme des nanoparticules. L'entrée par phagocytose dans une cellule se décompose en plusieurs étapes : reconnaissance par opsonisation dans le flux sanguin, adhésion de ces particules recouvertes d'opsonine aux macrophages et enfin ingestion de la particule, pour former un phagosome. Cet organe transportera ensuite la nanoparticule dans le cytoplasme de la cellule, puis ensuite fusionnera avec des lysosomes pour enfin être acidifié, ce qui entraînera la dégradation de la nanoparticule.

Contrairement à la phagocytose qui est réservée à une catégorie précise de cellules (macrophages, monocytes etc...), quatre autres voies endocytiques peuvent en théorie exister pour tout type de cellules : l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéoline-dépendante, la macropinocytose et enfin l'endocytose clathrine et cavéoline-indépendantes (**Figure 17**).

L'endocytose clathrine-dépendante (via des liaisons spécifiques à des récepteurs ou non) est le principal mécanisme d'internalisation des macromolécules et des constituants de la membrane plasmique, pour la plupart des types cellulaires. L'endocytose a lieu typiquement dans une région membranaire riche en clathrine. Celle-ci polymérisera autour de la particule

pour former comme une cage, ce qui aidera à déformer la membrane cellulaire, jusqu'à ce que la particule soit totalement invaginée. Par la suite, la particule se libérera de la clathrine, pour former un endosome qui fusionnera avec les vésicules des lysosomes, environnement acide riche en enzymes. Cette étape entrainera la dégradation de la particule et de son contenu. Il faudra donc éviter cette voie ou tout au moins tâcher de s'échapper des endosomes pour avoir une libération du principe actif intact dans le cytosol.

L'autre voie d'internalisation, l'endocytose cavéoline-dépendante fait intervenir les cavéoles. Les premières ont été identifiées par microscopie électronique en 1953 par Georges Palade : ce sont des invaginations en forme d'oméga dans la membrane plasmique. Elles sont recouvertes d'une protéine membranaire, la cavéoline, qui insère une boucle hydrophobe dans la membrane. C'est en oligomérisant que cette protéine crée d'abord une invagination, puis la formation d'une vésicule. La fission de la vésicule est ensuite déclenchée, entre autre, par des protéines TAPs, membre de la famille des transporteurs à « ATP Binding Cassette », et la particule peut donc être prise en charge par des cavéosomes qui, contrairement aux endosomes, possèdent un pH neutre. On évite ainsi le processus de dégradation rencontré précédemment.

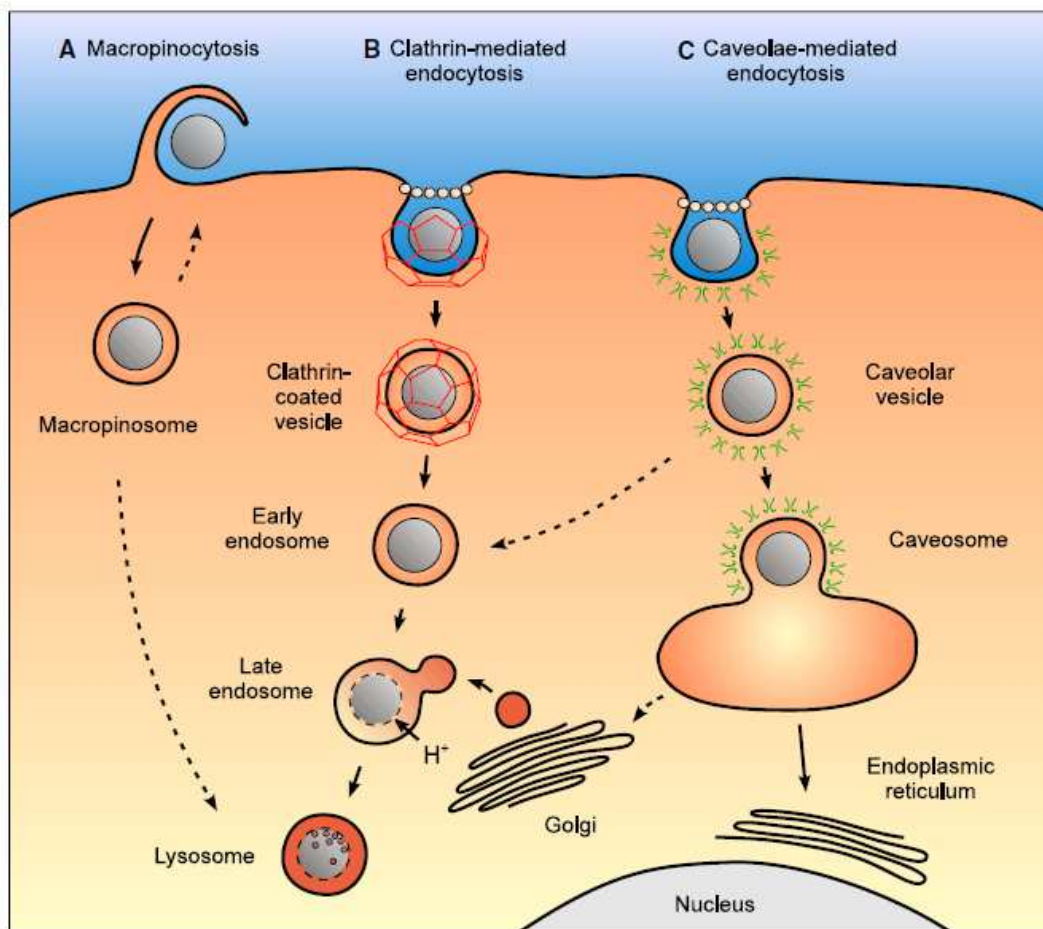


Figure 17 : Schéma représentant les 3 processus majeurs d'endocytose (H. Hillaireau, 2009).

La macropinocytose a lieu dans beaucoup de types cellulaires, dont les macrophages.

Contrairement à la phagocytose, où l'ingestion se fait par évagination, c'est-à-dire que l'extension de la membrane cellulaire se réalise à l'extérieur de la cellule, l'ingestion lors de la macropinocytose se fait par invagination, l'extension de la membrane se fait vers l'intérieur de la cellule. L'entrée génèrera de larges vésicules endocytotiques, appelées macropinosomes, qui éventuellement fusionneront avec des lysosomes, ou recycleront leur contenu vers la surface.

Pour finir, d'autres voies d'internalisation existent, qui dépendent de certains lipides et protéines mais clathrine et calvéoline-indépendantes. Par exemple, certaines voies ont été identifiées comme flotilline1 (protéine membranaire), GRAF1 (« GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase-1 »), kinases, actine ou encore dynamine-dépendantes (G. J. Doherty, 2009). Pour résumer, l'ensemble des voies possibles qu'une cellule peu emprunter pour internaliser une nanoparticule a été représenté sur le diagramme de la **Figure 18**.

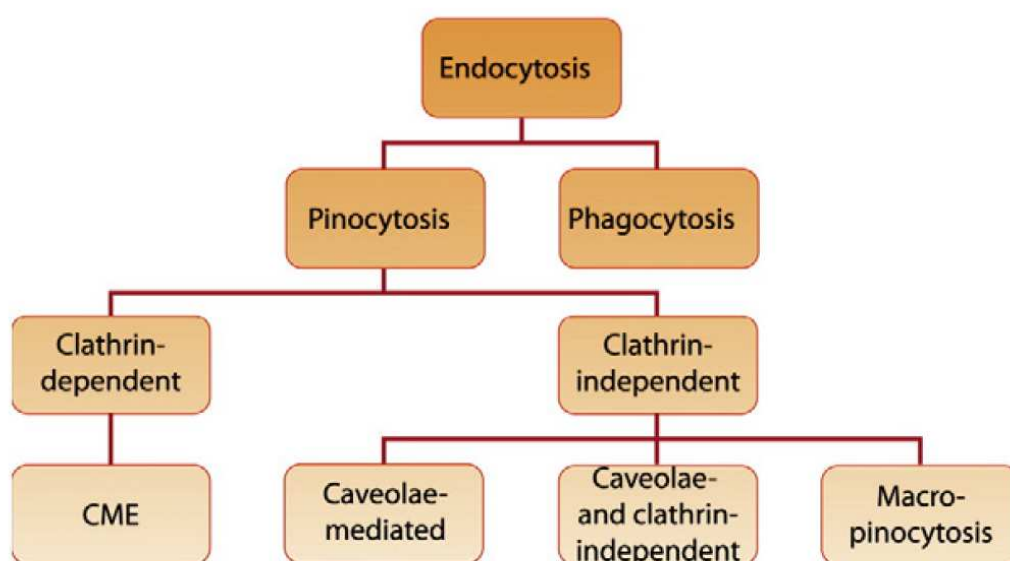


Figure 18 : Schéma résumant les différentes voies d'internalisation d'une nanoparticule par une cellule (G. Sahay, 2010).

La voie d'internalisation de certains nanomédicaments sur le marché a été étudiée. Par exemple, le Doxil®, liposomes PEGylés encapsulant de la doxorubicine chlorhydrate (86 nm) prescrits dans le traitement du cancer métastatique des ovaires, utiliserait une voie d'internalisation cavéoline-dépendante pour entrer dans les cellules épithéliales cancéreuses

(G. Sahay, 2010). Les liposomes s'accumuleraient alors dans les lysosomes où la drogue serait apparemment libérée.

Un autre exemple qui a été étudié est l'Abraxane[®], paclitaxel lié chimiquement à l'albumine formant des nanoparticules de 130 nm. Elles seraient internalisées via une endocytose cavéoline-dépendante : les nanoparticules se lieraient au récepteur de l'albumine (gp60) présent dans les cavéoles des cellules endothéliales avant d'être transportées dans les espaces interstitiels de la tumeur (J. E. Schnitzer, 1992). Les nanoparticules seraient ensuite capturées par des protéines spécifiques sécrétées par la tumeur (SPARC) avant d'être internalisées sélectivement par les cellules tumorales (N. P. Desai, 2008).

b) Les caractéristiques influençant potentiellement une voie d'entrée dans la cellule

En ce qui concerne la phagocytose, la surface de la nanoparticule est un paramètre clé, car elle peut favoriser ou non la fixation de l'opsonine, et dont l'entrée par cette voie (H. Hillaireau, 2009). En général, les interactions qui favorisent l'adsorption de protéines sont ioniques et hydrophobes. Donc des particules chargées, positivement ou négativement, recouvertes d'une surface hydrophobe seraient l'idéal pour l'étape d'opsonisation et donc pour être phagocytées (A. Chonn, 1991). La taille de la particule semble aussi jouer un rôle : des particules ayant une taille inférieure à 0.5 μm seraient moins efficacement internalisées (A. Aderem, 2002).

En ce qui concerne les voies endocytotiques, il est difficile d'établir un profil idéal d'internalisation par cette voie. Cependant, la taille semble avoir un impact : certaines études ont montré que les nanoparticules avec une taille inférieure à 200 nm semblaient entrer via l'endocytose clathrine-dépendante alors que lorsque les dimensions augmentaient (autour de 500 nm), les nanoparticules entraient par endocytose cavéoline-dépendante (J. Rejman, 2004). Etant donné la charge négative de la membrane plasmique des cellules, une meilleure internalisation a été observée avec des nanoparticules chargées positivement.

c) L'influence de la morphologie sur l'internalisation

Quelle que soit la forme de la particule, il semble que la rigidité soit un facteur influant sur la phagocytose, même si des résultats contradictoires ont été obtenus. En effet, dans K. A. Beningo, 2001, des billes de polyacrilamide de rigidité variable ont été synthétisées (en changeant la quantité de cross-linker lors la synthèse) et il a été montré que plus la particule était rigide et mieux elle était phagocytée par des cellules de macrophage, car les filaments

d'actine nécessaires à la formation du phagosome étaient plus sollicités (**Figure 19**). Mais dans *T. M. Allen, 1991*, des nanoparticules lipidiques de différentes compositions avaient été étudiées, et plus la rigidité de la membrane était grande, moins elles étaient phagocytées.

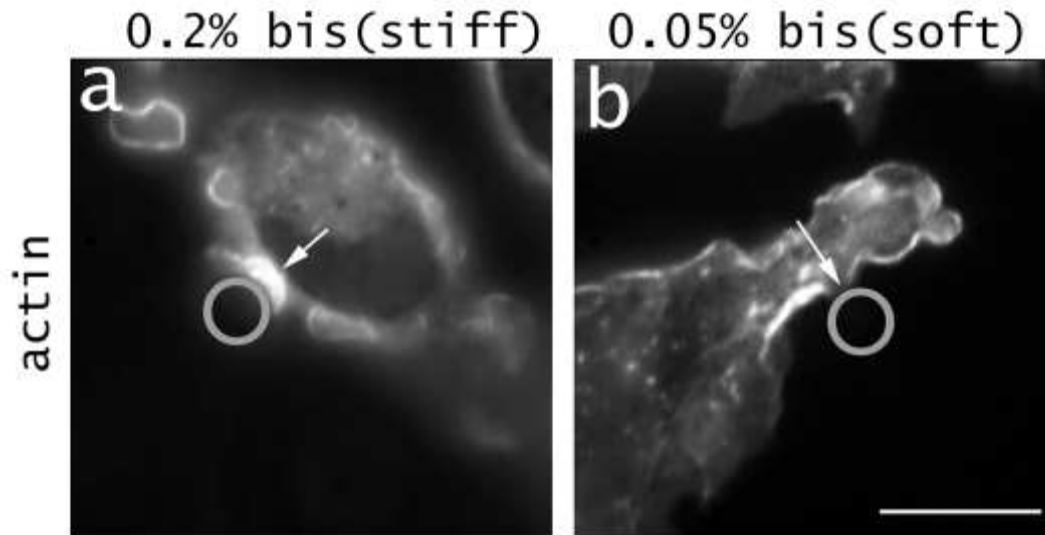


Figure 19 : image par microscopie de fluorescence des filaments d'actine autour d'une particule rigide (stiff) ou non (soft). Le cercle gris représente la bille et il est clair que les filaments d'actine sont plus sollicités dans le cas de billes rigides. (*A. Beningo, 2001*)

Certes, la plupart des nanoparticules développées pour la délivrance de médicament ont une forme sphérique. Cependant certaines études ont porté attention à l'influence de la morphologie sur la phagocytose (*E. A. Simone, 2011*), et il a été montré que la forme locale de particules de polystyrène au point de contact avec un macrophage déterminait la cinétique d'internalisation (*J. A. Champion, 2006*). En effet, prenons le cas d'une particule elliptique, lorsque celle-ci arrive sur le macrophage par « la pointe », il a été montré qu'elle pouvait être internalisée en quelques minutes par des cellules, tandis que lorsque c'est la région la plus large qui arrive d'abord sur le macrophage, l'internalisation peut prendre plus de 12 heures (**Figure 20**). Des modèles théoriques ont aussi permis de retrouver ce résultat (*P. Decuzzi, 2008*).

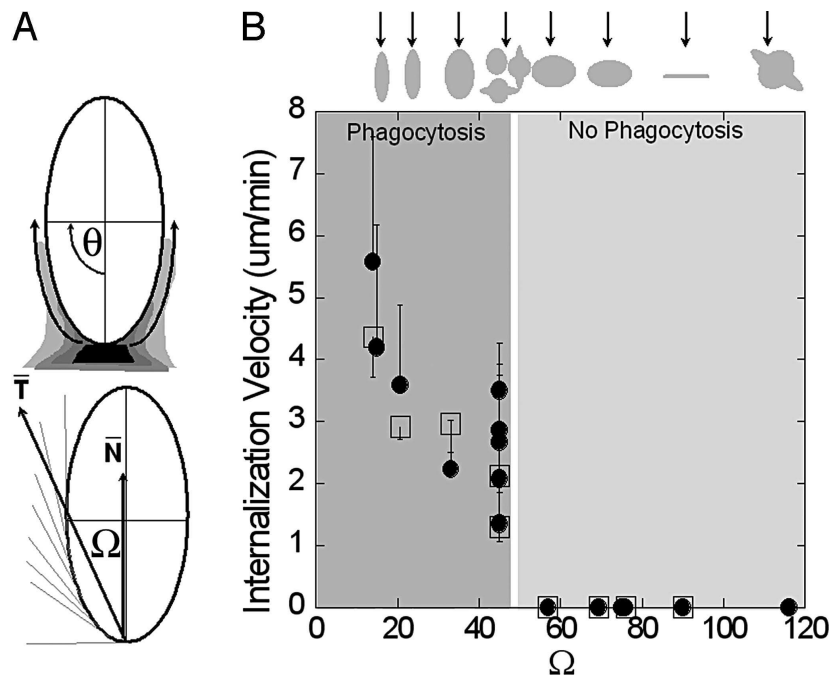


Figure 20 : vitesse d'internalisation de particules de polystyrène en fonction de l'angle de contact Ω de la particule avec la cellule macrophage (*J. A. Champion, 2006*).

Plusieurs études se sont aussi intéressées à l'impact direct de la morphologie d'une particule sur l'internalisation par voie endocytotique. Par exemple, dans la publication de *S. E. A. Gratton, 2008*, il a été étudié l'internalisation de particules polymériques de différentes morphologies, cubes et cylindres de différentes tailles (**Figure 21**), dans des cellules HeLa (cellules cancéreuses ovariennes). A diamètre égal (150-200 nm) et à volume égal (autour de $0.007 \mu\text{m}^3$), les particules cylindriques ayant une hauteur de 450 nm rentraient 4 fois plus vite que les particules cylindriques ayant une hauteur de 200 nm.

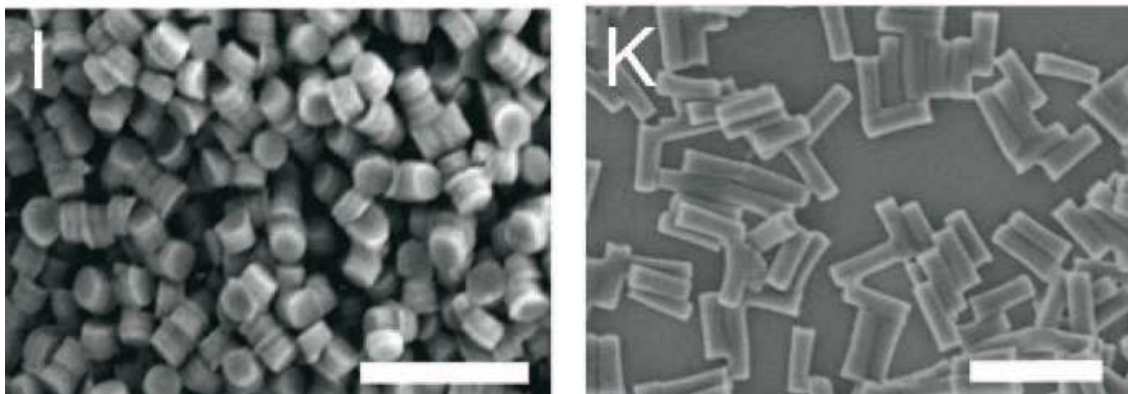


Figure 21: images par microscopie électronique à transmission, à gauche de particules polymériques cylindriques avec un diamètre égal à la hauteur (200 nm) et à droite de particules cylindriques ayant une hauteur 3 fois plus grande que le diamètre (450 nm / 150 nm) (*S. E. A. Gratton, 2008*).

Dans la publication de *B. D. Chithrani 2007*, des particules d'or en forme de tubes et sphériques ont été internalisées dans trois lignées cellulaires différentes (STO, cellules de fibroblastes, HeLa et SNB19, cellules tumorales du cerveau). Les résultats ont montré que les sphères étaient mieux endocytées que les tubes, et à l'inverse ces derniers étaient plus largement exocytés. Dans *Y. Qiu, 2010*, ce résultat a été confirmé sur des cellules MCF-7 (lignée tumorale mammaire) (**Figure 22**).

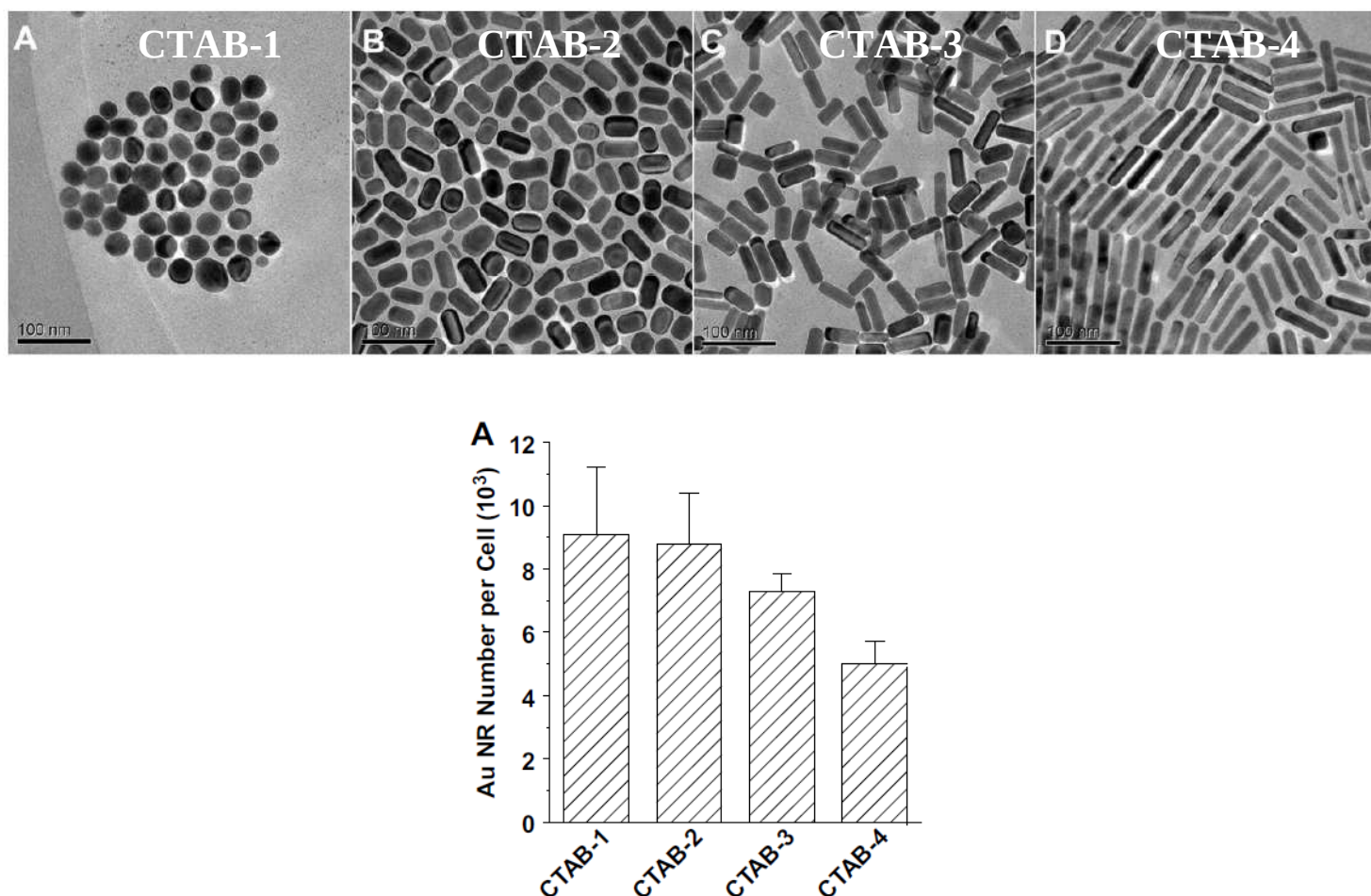


Figure 22 : différentes formes de nanoparticules d'or recouvertes de CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) et influence sur l'internalisation (*Y. Qiu, 2010*).

Par contre, dans la publication de *N. Hao, 2012* trois formes de nanoparticules mésoporeuses de silice ont été fabriquées : une sphère, un long tube et un tube court. Il a été montré que la cinétique d'internalisation de ces trois objets dans des cellules HeLa n'était pas la même. Aux temps courts (30 minutes) l'internalisation des particules sphériques était plus lente que celle des tubes courts, qui étaient à leur tour plus lentement internalisés que les longs tubes. L'explication donnée par les auteurs est la suivante : la surface de contact entre le tube et la

cellule serait plus importante qu'avec une particule sphérique. Après 30 minutes, les différences d'internalisation sont nivelées dues aux phénomènes d'exocytoses. Il a aussi été décrit dans cette publication que suivant la morphologie de la particule, des voies endocytotiques différentes étaient observées : les particules sphériques entreraient par endocytose clathrine-dépendante, les longs tubes par endocytose cavéoline-dépendante, et enfin les tubes courts par un mélange des deux phénomènes (**figure 23**).

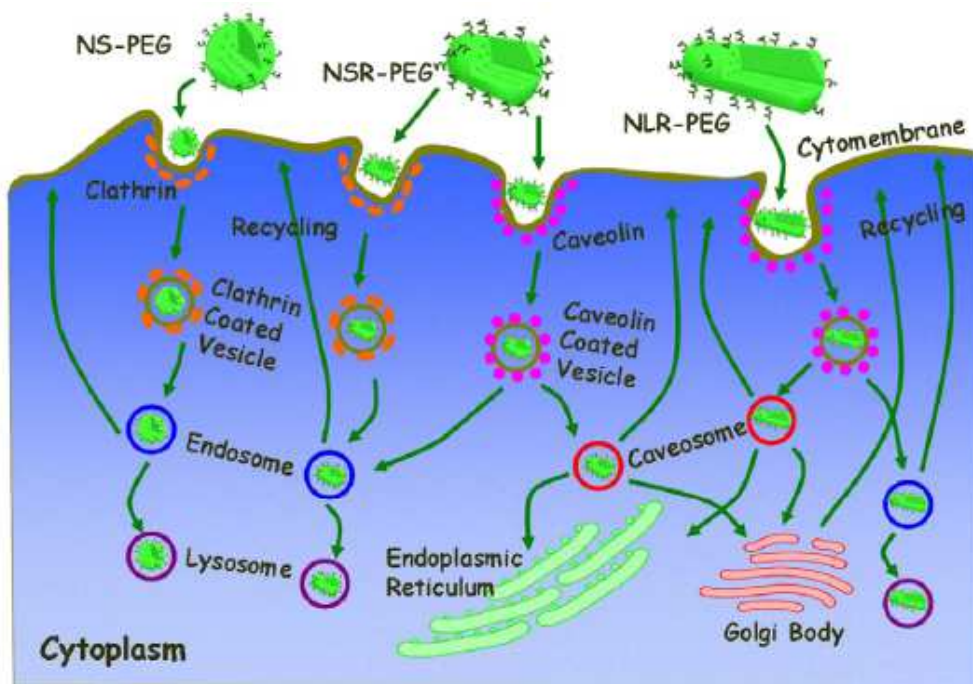


Figure 23 : Schéma représentant les deux mécanismes d'internalisation différents suivant la structure de la nanoparticule (N. Hao, 2012)

Ce paragraphe montre à quel point le problème de relier l'internalisation d'une particule à sa morphologie est complexe, car des résultats en contradiction ont été rencontrés. De plus, dans ce paragraphe, on se plaçait à l'échelle de la cellule, mais il est bien sûr évident qu'à l'échelle du vivant, la forme de la nanoparticule aura aussi un impact sur le transport dans le système vasculaire et sur la biodistribution (P. Decuzzi, 2009, E. A Simone, 2011). Par exemple, il a été montré que les micelles en forme de filaments restaient dix fois plus longtemps dans la circulation sanguine que les formes sphériques (Y. Geng, 2007).

II- Organisation supramoléculaire de molécules amphiphiles

1) Matière molle

Le terme « matière molle » fut employé pour la première fois par la physicienne Madeleine Veyssié, proche collaboratrice de Pierre-Gilles de Gennes. Ce terme n'était pas très apprécié par ce dernier, qui le jugeait trop péjoratif pour un domaine qui était loin d'être trivial. Pourtant en 1991, lors de sa cérémonie de remise de prix Nobel, il popularisa l'expression en utilisant les mots « soft matter » pour commencer son discours de réception (*S. Balibar, 2009*). La matière molle désigne des matériaux intermédiaires entre les solides et les liquides : bulles de savon, gels, élastomères, cristaux liquides... Les objets caractéristiques constitutifs de la matière molle vont des polymères aux protéines en passant par les colloïdes, les amphiphiles, ou encore les cristaux liquides. Dans ce manuscrit, les composés utilisés seront des molécules amphiphiles c'est-à-dire qui présentent deux polarités différentes, une tête polaire et une queue hydrophobe apolaire. Ces molécules possèdent des propriétés physico-chimiques particulières dans l'eau : ce sont des tensio-actifs qui sont capables de s'auto-associer pour former des systèmes moléculaires organisés comme les micelles ou les liposomes.

2) Tensio-actifs et organisations

a) Effet Hydrophobe

Dans l'eau, les parties hydrophobes des molécules tensio-actives vont avoir tendance à s'associer, alors que les parties polaires resteront au contact de l'eau. Ce sont les liaisons faibles qui stabilisent la structure, et parmi elles, les interactions hydrophobes. Lorsqu'une molécule apolaire est placée dans de l'eau, elle modifie le réseau de liaisons hydrogène présent. Cela provoquera la formation d'une cage d'eau (**Figure 24**) (clathrate), où les contraintes sont relativement importantes. Il en résultera une diminution de l'entropie du système. Lorsqu'une seconde molécule apolaire est ajoutée, pour minimiser la diminution entropique, celle-ci aura tendance à s'associer avec la première molécule, et donc à se placer dans la même cage d'eau, plutôt que de produire une seconde cage. Cette tendance à l'association est appelé effet hydrophobe (*D. Chandler, 2005*).

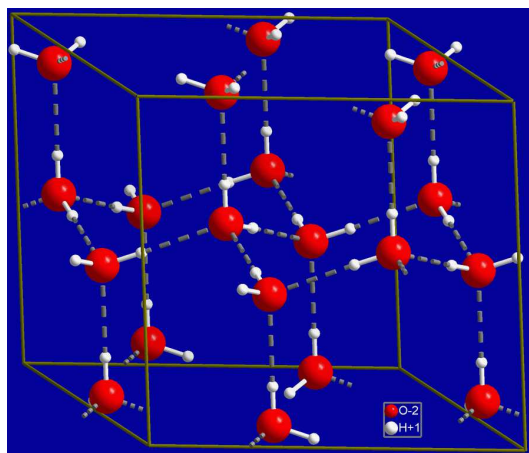


Figure 24 : réseau de liaisons hydrogènes entre plusieurs molécules d'eau.

b) Paramètre d'empilement

L'effet hydrophobe va donc permettre, dans l'eau, l'auto-association de molécules amphiphiles. Ces associations peuvent conduire à des structures diverses : micelles sphériques, micelles cylindriques linéaires, micelles cylindriques avec jonctions, vésicules, bicouches, cubiques, lamellaires et une variété de structures inverses, comme hexagonales inverses, cubiques inverses ou encore micelles inverses (**Figure 25**). Une structure inverse signifie que c'est la partie hydrophobe qui est vers l'extérieur de l'objet et la partie polaire vers l'intérieur.

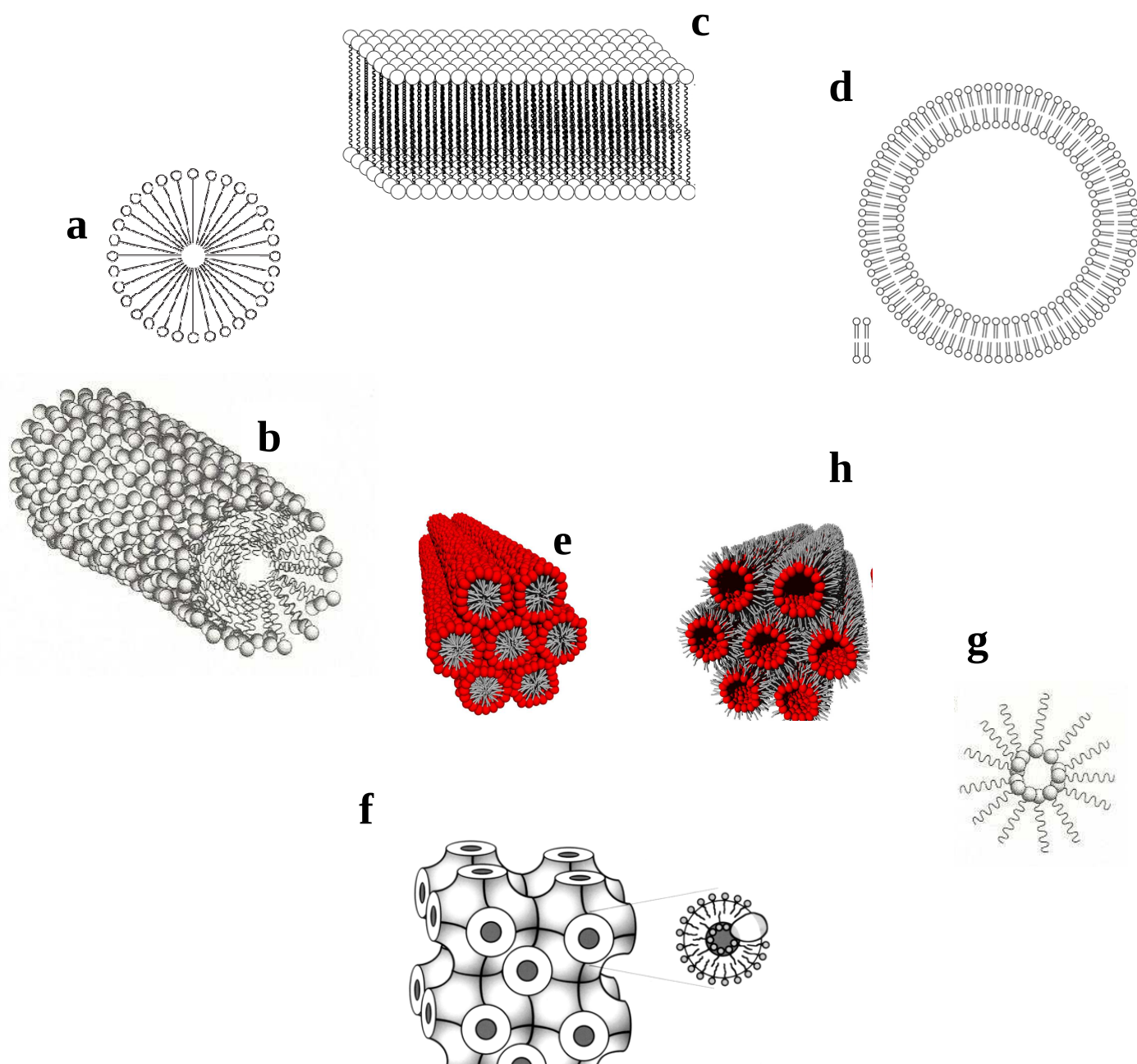


Figure 25 : représentation des différentes auto-associations de molécules amphiphiles. a) micelle, b) micelle cylindrique, c) bicouche, d) vésicule, e) phase hexagonale, f) phase cubique inverse, g) micelle inverse et h) hexagone inverse.

Un paramètre adimensionnel peut aider à comprendre voire à prévoir les structures potentielles de molécules amphiphiles à la surface de l'eau. Ce terme est appelé le paramètre d'empilement, noté p . Il est défini suivant la formule ci-après (**Figure 26**), où v est le volume moléculaire, a est l'aire optimum de la tête polaire à l'interface, et l la longueur maximum possible de la chaîne hydrophobe.

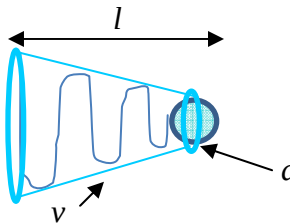
$$p = \frac{v}{al}$$


Figure 26 : expression du paramètre d'empilement p en fonction du volume v et de l'aire a moléculaire

Il a été montré (*J. Israelachvili, 2004*) que suivant les valeurs que prenait ce paramètre, différentes organisations supramoléculaires pouvaient être envisagées. Lorsque $p < 1/3$, les molécules auront tendance à s'organiser en sphère, lorsque $1/3 < p < 1/2$, une structure de type cylindrique sera envisageable, pour $1/2 < p < 1$, une phase lamellaire pourrait potentiellement se former et enfin lorsque $1 < p < 3$, les structures inverses seront plus certainement rencontrées (**Figure 27**).

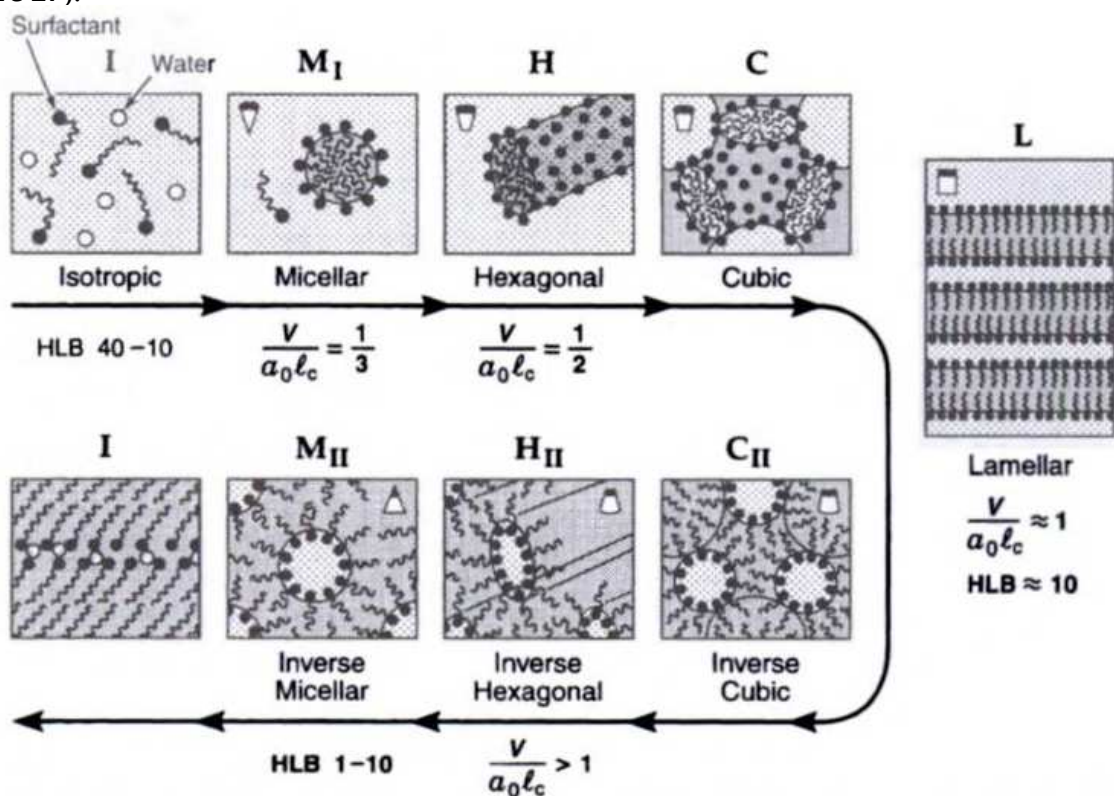


Figure 27 : Evolution des structures de molécules amphiphiles en fonctions des valeurs du paramètre d'empilement.

c) Facteur influencant les valeurs du paramètre d'empilement

L'aire optimum a de la tête polaire n'est pas une valeur intrinsèque à la molécule mais dépend de différents facteurs comme le pH de la solution, l'hydratation, ou encore des contre-ions présents en solution. Par exemple, pour un lipide présentant une petite tête polaire anionique, l'ajout de Ca^{2+} aura tendance à augmenter l'air moléculaire.

Concernant la chaîne hydrophobe, la longueur l peut être réduite en introduisant par exemple des insaturations, ou des branchements.

La température peut aussi affecter ces différents paramètres. Par exemple, l'aire de la tête polaire du polyoxyéthylène diminue lorsque la température augmente à cause de l'augmentation de l'hydrophobicité. Ou encore, l'augmentation de la température peut entraîner des changements conformationnels de la chaîne hydrophobe, et donc changer la longueur l (*J. Israelachvili, 1991*).

III- Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: application to drug delivery devices

Elise Lepeltier ^a, Claudie Bourgaux ^{a,*}, Patrick Couvreur ^a

^a UMR CNRS 8612 Institut Galien Paris-Sud, Université Paris-Sud, France

Abstract

Biocompatible nanocarriers such as lipid- or polymer-based nanoparticles can be designed to improve the efficacy and reduce the toxic side effects of drugs. Under appropriate conditions, nanoprecipitation of a hydrophobic compound solution in a non-solvent can generate a dispersion of nanoparticles with a narrow distribution of sizes without the use of surfactant or mechanical energy (“Ouzo” effect). The aim of this review is to present the main parameters controlling the nucleation and growth of aggregates in a supersaturated solution and the characteristics of the obtained nanoparticles. The importance of the kinetics of mixing of the solution containing the hydrophobic compound and the non-solvent is highlighted. Illustrative examples of polymeric nanoparticles for drug delivery or terpenoid-based nanoprodrugs obtained by nanoprecipitation are reported.

Content

- 1- Introduction
- 2- Brief theoretical background
- 3- Stabilization of nanoparticles
- 4- Solvent elimination
- 5- Experimental processes of mixing
- 6- Nanoprecipitation of polymers: which parameters matter?
- 7- Examples of application of polymeric nanoparticles obtained by nanoprecipitation for the delivery of therapeutic molecules
- 8- Terpenoid-based nanoparticles: a new platform for theranostics
- 9- Conclusion

References

1) Introduction

Nanocarriers can provide a crucial advantage to various drugs and therapeutic biological molecules such as nucleic acids and proteins by improving their efficacy and reducing potential toxic and side effects. Biocompatible nanoparticles (NPs) offer possibilities to protect therapeutic agents against degradation, to control their release, to overcome biological barriers and to target specific sites of action [1-7]. The physicochemical properties of nanoparticles, such as composition, size, morphology and surface properties, can impact the biodistribution and pharmacokinetics of drugs by modifying interactions with the biological environment [8-15].

Among these characteristics, nanoparticle size is a crucial parameter, especially for intravenous administration, since it strongly influences the adsorption of the plasma proteins (opsonins), which results in recognition of the nanoparticles by the macrophages of the reticuloendothelial system (RES) and rapid clearance from the bloodstream. It has been shown that clearance of the smaller particles (~80 nm) was slower than that of the bigger particles (~200 nm), due to a lower quantity of adsorbed plasma proteins. Additionally, filtration of NPs by the spleen and trapping in the hepatic parenchyma also depended on size. Regarding cancer therapy, nanocarriers can take advantage of the so-called enhanced permeation and retention effect (EPR): the leaky vasculature of some solid tumors, in combination with a weak lymphatic drainage, may result in a selective accumulation of colloidal carriers in the target tissue. On the other hand, in healthy tissues, a diameter larger than 10 nm usually hinders the diffusion of the NPs through the vessel endothelium, minimizing side effects.

At the cellular level, the mechanisms of NP internalization, either phagocytosis or endocytosis, are also influenced by size [8-10]. Therefore, the size and the size distribution of NPs need to be accurately controlled for efficient and safe drug delivery.

Among the different methods described for NP preparation [16-18], the solvent displacement method (or solvent shifting, or nanoprecipitation) is a straightforward and fast process differing from emulsion-based methods (emulsification-diffusion, emulsion-evaporation and salting-out techniques) in that no precursor emulsion is required. In the practice, the hydrophobic solute (polymer or lipid molecules) is first dissolved into a polar solvent (usually ethanol, acetone or THF). This solution is then added to a large amount of a non-solvent (generally water) of the solute with which the polar solvent is miscible in all proportions. The

mixed binary solution becomes a non-solvent for the hydrophobic molecules and the system evolves towards phase separation, leading to the formation of particles of the hydrophobic solute. The organic solvent can then be removed by evaporation. This methodology is easy but the main practical limitation lies in possible flocculation of particles and formation of large aggregates.

Under appropriate conditions, this process instantaneously generates a dispersion of small droplets or nanoparticles with a narrow unimodal size distribution in the 50-300 nm range. This spontaneous emulsification process, which does not require surfactant or mechanical energy, has been named “the Ouzo effect” by Vitale and Katz from the generic example of the Greek beverage [19]. The major components of Ouzo (Pastis in France) are water (~55%), alcohol (~45%) and trans-anethol (~0.2%), a water-insoluble oil extracted from anise seeds. Upon dilution with water, anethol is no longer solubilized in the water/ethanol mixture. Ouzo becomes spontaneously milky due to the formation of long-lived metastable oil droplets which scatter visible light. Reexamining publications (until 2005) dealing with the preparation of various nanoparticles or nanocapsules via the solvent displacement method, Ganachaud and Katz suggested that the formation of these dispersions was triggered by the Ouzo effect [20]. Small hydrophobic organic molecules, i.e. lipids or polymers, can act similar to oil molecules and the Ouzo effect can therefore lead to the formation of nanoparticles.

Numerous studies were intended to identify the most pertinent experimental parameters controlling the size and polydispersity of NPs. Some investigations have focused on the phase diagrams of the ternary systems, solute/solvent/non-solvent, in order to determine the region of the composition map where only nanoparticles are obtained (Ouzo region). Attempts have been made to clarify the mechanisms controlling the kinetics of formation and the characteristics of the obtained nanoparticles. This knowledge is of prime importance for preparing monodisperse nanoparticles in an efficient and reproducible manner, using a rational approach instead of a trial-and-error process.

The purpose of this review is to present recent advances in the knowledge of the formation of organic nanoparticles using the solvent displacement method with emphasis on drug delivery applications.

2) Brief theoretical background

When a solution comprised of a hydrophobic solute in a polar, water-miscible, solvent is mixed with a large amount of water, the concentration of the solute in the resulting solution exceeds its thermodynamic solubility limit. The ratio of the actual solute concentration to the equilibrium solubility defines the supersaturation (S) of the solution. On the phase diagram of the ternary system solute/solvent/non-solvent, the binodal curve corresponds to the miscibility limit as a function of composition, whereas the spinodal curve defines the limit of thermodynamic stability. The system evolves by nucleation and growth of solute particles (or droplets) in the metastable region of the phase diagram (between the binodal and spinodal curves) or by spinodal decomposition in the area delimited by the spinodal [21].

Classical nucleation theory (CNT) is the most widely used model to explain homogeneous nucleation in the metastable region. When a critical supersaturation is reached, nuclei form spontaneously from small local fluctuations in the concentration of solute molecules. CNT assumes a globular shape for the nuclei and a constant surface tension independent of the size of the nuclei. The free energy of formation of a nucleus of radius r is thus given by:

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + 4/3 \pi r^3 \Delta g_v$$

where γ is the surface tension and Δg_v the difference in free energy per unit volume between the two phases. The two terms are of opposite sign so that ΔG goes through a maximum when r varies.

The critical nucleus radius r^* , corresponding to the maximum of the free energy, is given by:

$$r^* = -2\gamma / \Delta g_v$$

Particles with a radius smaller than the critical nucleus radius r^* vanish, whereas larger particles are stable and can grow further.

The instantaneous nucleation rate and the critical nucleus radius are linked to the supersaturation (S) of the solution and to the thermodynamic properties of the particles/solution interface through γ . The nucleation rate varies as $\exp(-\gamma^3 / k^3 T^3 (\log S)^2)$ and r^* is proportional to $(\gamma / kT \log S)$. The nucleation rate and critical nucleus radius are therefore extremely sensitive to supersaturation. At low supersaturation few stable nuclei are formed whereas high supersaturation yields a large number of very small nuclei.

It should be emphasized that, in the case of nanoprecipitation, homogeneous supersaturation requires that the mixing of the aqueous and organic phases, and the associated molecular diffusion of components, are extremely rapid as compared to the rate of nanoparticle nucleation. Particles are then assumed to grow from a single batch in which solute molecules are randomly dispersed.

Nuclei which exceed the critical size can grow further, by sticking other solute molecules from the surrounding solution, until the concentration of the still-dissolved solute has decreased to the equilibrium concentration. When the growth of particles is limited by diffusion of the solute molecules to the nuclei surface, their rate of growth depends on the supersaturation and on the diffusion coefficient (D) of the solute molecules. Beside this diffusion limited growth process, diffusion limited cluster-cluster aggregation (DLCA) may occur. When the number of nuclei is very high, growth occurs mainly through random collisions of existing particles. The probability of collision is proportional to the square of the number of particles and it is assumed that each collision causes aggregation of the two particles involved. Upon encounter, soft NPs rearrange to form dense structures, often spherical. The average size is predicted to increase linearly with time. It is expected that very high supersaturation favors the DLCA mechanism whereas at low supersaturation, nucleation and growth is the dominant mechanism [22].

Regarding the size distribution of NPs, the separation of nucleation and growth in time is a key for the formation of NPs with low polydispersity [23-24]. A single nucleation burst is required, which may be achieved by processes with very short mixing times to ensure uniform supersaturation. Nucleation may be followed by the diffusion limited growth of nuclei. It has been shown that a narrow size distribution of NPs may also be induced by coalescence of small nuclei [25-27].

Ostwald ripening (OR) is a potential mechanism involved in further particles (or droplets) growth, on a longer time scale [28]. It consists of the growth of the larger particles at the expense of smaller ones, resulting from the diffusive transport of dissolved solute through the continuous phase. The reduction of the interfacial energy term favors this process. This leads to a reduction in particle number as small particles disappear. Solubility and diffusion coefficient of hydrophobic solute in the continuous phase, and surface tension between aggregates and solution are the main parameters involved in Ostwald ripening; they are temperature dependent. A very low solubility of the hydrophobic solute in water and/or homogeneously sized particles oppose Ostwald ripening.

To summarize, the values of supersaturation (S), interfacial tension (γ) and diffusion coefficients of the solute molecules and clusters during the different stages of nucleation, growth and Ostwald ripening of particles should influence their final concentration, size and polydispersity.

In a small domain of composition of the ternary hydrophobic solute/solvent/water system, the “Ouzo domain”, nanoprecipitation yields a dispersion of nanoparticles (or droplets) exhibiting a narrow size distribution whereas, beyond the Ouzo boundary, the solvent displacement process generates both nanoparticles and large aggregates. The “Ouzo domain” is a narrow domain between the binodal and spinodal curves, corresponding to low hydrophobic solute concentrations and solvent/water ratios [29] (**Fig. 1**).

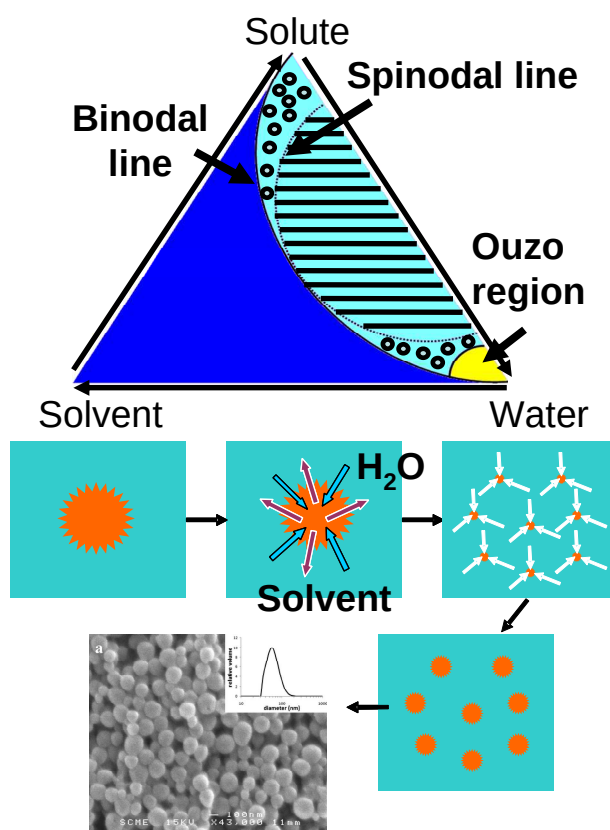


Fig. 1: Phase diagram of the ternary system hydrophobic solute/solvent/water (top, reprinted from [29]) and schematic description of the liquid–liquid nucleation process or Ouzo effect (bottom, adapted from [20]): the rapid dispersion within water of the droplets of the organic solution containing the hydrophobic oil is followed by interdiffusion of solvent and water, leading to supersaturation of oil and droplet nucleation. Droplet growth stops when the aqueous phase is no longer supersaturated with oil. At the end of the process, the oil droplets are dispersed in the aqueous phase. A SEM photograph of nanoparticles of PMMA obtained by nanoprecipitation in the Ouzo domain is presented [reprinted from 22].

The Ouzo effect has been analysed in details in model divinyl benzene (DVB)/ ethanol/ water and in trans-anethol (*t*-A)/ ethanol/water systems [19,30-34]. It was found that the mean DVB droplet diameter was primarily a function of one parameter, the excess oil-to-solvent ratio, “excess oil” referring to the concentration of oil in excess of its saturation concentration in the solvent/ water continuous phase. Increasing the excess oil-to-solvent ratio caused the mean droplet diameter to increase [19]. Regarding trans-anethol (*t*-A)/ ethanol/water system, NMR

spectroscopy has revealed that the spontaneous emulsification of *t*-A in water began with the formation of very small aggregates (~ 2 nm diameter). A very slow exchange between free *t*-A molecules in the aqueous phase and *t*-A molecules within the aggregates was observed. Rapid coalescence of these aggregates gave rise to larger droplets ($\sim \mu\text{m}$), responsible for the cloudy aspect of the emulsion, which have been investigated using dynamic light scattering (DLS) and small-angle neutron scattering (SANS). Further growth of the droplets occurred via Ostwald ripening, on a longer time scale, thus ensuring the long life of the emulsion. OR was delayed by the homogeneous size of the droplets, the very low solubility of oil in water and the low interfacial tension of *t*-A droplets in ethanol/water mixtures. Moreover, the formation of an adsorbed layer of ethanol on *t*-A droplets could stabilize them, as suggested by Monte-Carlo simulations [29].

Taken together, observations were consistent with homogeneous liquid-liquid nucleation of the droplets and emphasized the importance of Ostwald ripening. However, the factors involved in the growth and stability of these spontaneous droplets are not fully understood.

3) Stabilization of nanoparticles

The stabilization of primary NPs resulting from the fast nucleation-and-growth or nucleation-aggregation (DLCA) mechanisms is critical for maintaining small NPs. Slow processes occurring on a longer time scale, such as Ostwald ripening and/or further aggregation of NPs, may lead to large polydisperse particles. The aggregation of the NPs may be prevented by the presence of additives such as a low molecular weight surfactant, an amphiphilic polymer (e.g. PEO-PPO copolymer), or a polysaccharidic polymer like dextran, adsorbed at the NP surface. To stabilize the particles, the nanoprecipitation may therefore be carried out in water containing a small quantity of a stabilizer. The stabilizer is usually not needed if NPs display non zero zeta potential or hydrophilic moieties. Moreover, the aggregation of NPs may be limited by the presence of additives that increase the viscosity of the continuous medium and lower the diffusion rate of clusters.

Interestingly, Roger *et al.* have shown that aggregation of soft polymeric NPs limited by long-range electrostatic repulsion between charged NPs may lead to the decrease of the NPs polydispersity. Indeed, the size-dependent repulsive potential favored encounters involving a large NP and a small one rather than two large NPs [35].

When the NP growth is stopped by adsorption of additives, the concentration of additive and the relative time- scales of the different processes involved in NP formation are expected to be of primary importance in determining their final size. This was underlined by Lannibois *et al.* who studied the precipitation of hydrophobic molecules (cholesteryl acetate) in water in the presence of an added amphiphilic diblock copolymer (PS-PEO) [36]. They were both dissolved in acetone and the solution was mixed with a large excess of water. Cholesteryl acetate being nearly insoluble in water, aggregates formed immediately and grew through a DLCA mechanism. A stable dispersion was obtained when the surface of NPs was fully covered by a monolayer of surfactant. The final average NP size depended on the concentrations of hydrophobic (C_H , g/g) and surfactant molecules (C_S , g/g). For a given C_S/C_H ratio (e.g. $C_S/C_H = 1$), the NPs volume increased linearly with the initial concentration of hydrophobic molecules in acetone (from $C_H = 10^{-4}$ g/g to $C_H = 10^{-2}$ g/g). The evolution of the NP volume with C_S/C_H ratio showed that, at high surfactant concentrations, the NP sizes were larger than those anticipated if all surfactant molecules had been adsorbed. Only a fraction of the copolymer was effective in controlling aggregation. It was found that part of the copolymer formed micelles in water. Experiments involving the hydrophobic hexadecane and the $C_{12}E_5$ surfactant confirmed the existence of two regimes. At moderate surfactant/hydrophobic solute ratios, all surfactant molecules coated the surface of the NPs but aggregation yielded rather large particle sizes. At high C_S/C_H ratios the aggregation was stopped at an earlier stage but part of the surfactant remained in water. Therefore, attempts to obtain smaller and smaller NPs by adding increasing amounts of surfactant should fail at some point.

These experimental results could be explained by comparison with numerical simulations of the competition between aggregation of hydrophobic molecules and adsorption of surfactant. Two different power laws were evidenced in the log-log plot of the NP volume V_{av} as a function of the C_S/C_H ratio, accounting for the two regimes in the use of surfactant molecules. The exponent measured at low C_S/C_H ratios was close to the theoretical value of -3 ($V_{av} \propto [C_S/C_H]^{-3}$), corresponding to all surfactant molecules adsorbed on the surface of growing NPs. Aggregation was also allowed to proceed unimpeded for a time t before adsorption of the surfactant began. For a constant C_S/C_H ratio (e.g. $C_S/C_H = 4$), the NP size was determined by the initial concentration of hydrophobic molecules (C_H) and by the value of this time delay τ . For $\tau = 0$ the NP volume increased slightly with C_H . In the limit of long time delays, the NP volume increased linearly with the initial concentration of hydrophobic molecules, reflecting the experimental results.

Cholesteryl acetate aggregates were amorphous spherical NPs. The formation of amorphous NPs from small organic molecules (cholesteryl acetate, dyes...) for which the crystalline phase is the thermodynamically stable phase seems to be a common feature of the Ouzo effect. According to Lannibois *et al.*, this was due to residual solvent and water plasticizing the NPs [36]. Brick *et al.* suggested that the preferential formation of amorphous NPs was consistent with a spinodal decomposition process at high supersaturation, where phase separation is able to occur faster than crystallization [37].

4) Solvent elimination

Removal of solvent from the NP suspensions is important for biomedical applications. As the solvent is fully miscible with both the hydrophobic molecules and water, NPs prepared by nanoprecipitation should contain a fraction of solvent, determined by the partition coefficient, in equilibrium with solvent in the aqueous phase. As an example, the partition coefficient of ethanol, defined as the ratio of the weight fraction of ethanol in water to that in the organic phase, was reported to be 6.9 for DVB [19]. The usual solvents (ethanol, THF, acetone) were generally removed by evaporation under reduced pressure since their boiling points are lower than that of water. In some cases, the suspensions were dialyzed against water or buffer [38]. A new approach has been proposed recently, using a supercritical CO₂ extraction process for an effective elimination of acetone and acetone/ethanol mixtures from suspensions of polymeric nanoparticles. Lower quantities of residual solvent (few ppm) were measured with respect to the usual evaporation process [39]. Despite its practical importance, the issue of residual solvent in NP suspensions was seldom addressed.

5) Experimental processes of mixing

In the metastable region of the phase diagram, nucleus size and number should depend on the mixing conditions of the organic solution containing the hydrophobic component and water. Specifically, the local instantaneous supersaturation, resulting from interdiffusion of solvent and water in small droplets of the organic solution dispersed within the aqueous phase, is expected to depend on the mixing process. The nucleation and growth of particles may be initiated within the droplets before complete mixing can occur. When nanoprecipitation is performed by dropwise addition of the organic solution into the aqueous phase, a continuous

change in the composition of the solute/solvent/ non solvent mixture is induced. Different experimental devices have therefore been implemented to achieve a better control of the mixing of the two phases (**Fig. 2**). In a stopped-flow setup, defined volumes of the two phases are rapidly mixed and introduced into a cell where NPs grow. In a continuous flow apparatus converging channels carry the organic solution and water which are mixed at the T (or Y)-junction and then flow out through the exit channel where nanoprecipitation takes place. The suspension of nanoparticles is recovered at the outlet of this channel. Several types of mixers have been inserted into these devices, e.g. a millifluidic or microfluidic mixer or a confined impinging jet mixer, to ensure a fast and reproducible mixing of the two solutions [24,40-42]. Depending on the mixing conditions, the mixing may be laminar or turbulent and the mixing time varies. Mixing times of less than 1 ms have been achieved with a microfluidic device using hydrodynamic flow focusing where the organic solution is squeezed into a narrow stream flowing between two water streams. The thin width of the focused stream enables rapid interdiffusion of solvent and water [42]. Numerical simulations of the fluid dynamics have been recently performed to evaluate the mixing efficiency for a high pressure interdigital multilamination micromixer [43]. In this device, thin layers of polymer solution and water are alternatively staggered before entering a flow- focusing section, where their width is decreased. The water-to-solvent ratio R is set by their relative flow rates. The mixing efficiency was defined as the fluid volume fraction in the flow- focusing section where nucleation was possible due to supersaturation. Simulations indicated that increasing the flow rates while keeping R constant increased the mixing efficiency. Smaller polymeric NPs were obtained experimentally. Nanoprecipitation was therefore determined by the hydrodynamics within the micromixer, for given water-to-solvent ratio and initial concentration of polymer in solvent.

In a pioneering work, Horn and co-workers developed a continuous mixing chamber process for the industrial production of nanodispersed carotenoid hydrosols [21]. These tetraterpenes, displaying various moieties at the chain ends, are insoluble in water and poorly soluble in lipids. In this process, a solution of a carotenoid in a water miscible solvent, usually ethanol, was nanoprecipitated by turbulent mixing with an aqueous phase containing dissolved gelatin that provided colloidal stability to the NPs. The resulting monodisperse NPs exhibited a core/shell structure with a carotenoid core surrounded by a gelatin shell. In a recent review, D'Addio and Prud'homme have discussed the formation of drug nanoparticles by rapid solvent shifting [40]. They have pointed out the advantages of the continuous confined jet mixers which can scale up from laboratory experiment to industrial production. All these

findings open new perspectives for the administration of poorly soluble pharmaceutical compounds [45].

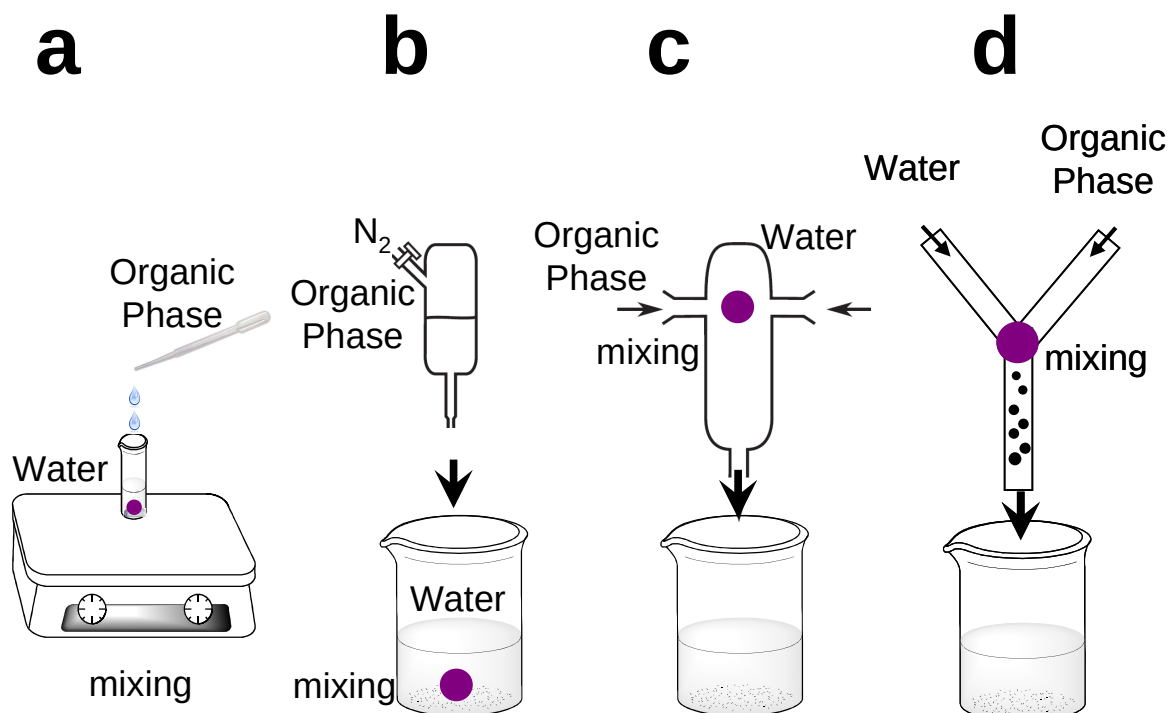


Fig. 2: Different nanoprecipitation devices: (a). Scheme of a dropwise process, (b). Pressure driven injection device (adapted from [44]), (c). Impinging jet mixer (adapted from [41]) and (d). Y-junction in a continuous-flow nanoprecipitation device.

Stopped-flow or continuous flow devices may be coupled with measurement techniques such as synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) to follow the early stages of nanoparticles formation. Kinetics studies of the formation of nanoparticles may enable to assess nucleation and growth models. Hitherto, almost all time-resolved studies of the formation of colloidal particles in liquid media dealt with inorganic NPs, such as gold NPs. In many experiments, the supersaturation of the inorganic precursor was induced by chemical reactions occurring upon rapid mixing of two solutions [24,26-27,46]. For instance, gold NPs could be obtained from the reduction of an aqueous solution of gold salt by ascorbic acid. This chemical reaction was analogous to the rapid decrease of solvent quality in nanoprecipitation process.

6) Nanoprecipitation of polymers: which parameters matter?

Since the pioneering work of Fessi *et al.* numerous nanoparticles, prepared with different polymers and solvents, have been obtained using the solvent displacement method [18,47-48]. The most widely used polymers were poly(lactic acid) (PLA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), poly(alkyl cyanoacrylate) (PACA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL), and the corresponding copolymers with poly(ethylene-glycol) (PEG) moiety, which fulfill drug delivery device requirements of biodegradability, biocompatibility and absence of immunogenicity (**Fig. 3**). Systematic experiments have provided information regarding the location of the “Ouzo region”, where only nanoparticles are obtained, and identified the relevant parameters controlling the yield of production, size and polydispersity of nanoparticles. The respective influences of solvent/water ratio, polymer/solvent ratio, polymer molar mass, nature of the solvent, interfacial tension and solvent/ non-solvent mixing time have been investigated.

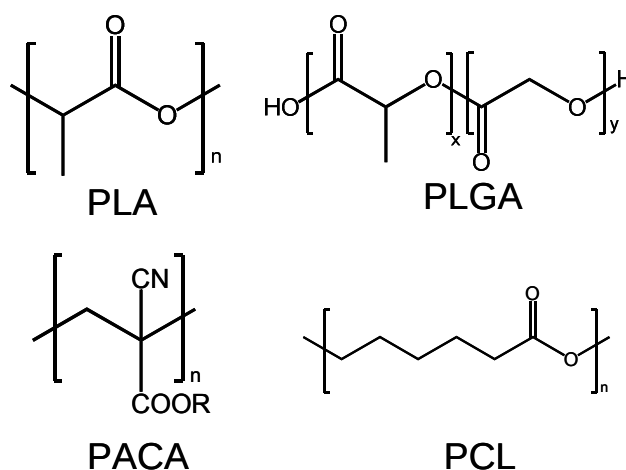


Fig. 3: Chemical formula of several polymers widely used to produce nanoparticles by solvent displacement method: PLA (poly(lactic acid)), PLGA (poly(lactide-co-glycolide)), PACA (poly(alkyl cyanoacrylate)) and PCL (poly(ϵ -caprolactone)). n , x and y correspond to the number of respective monomers.

It has been shown that, at the Ouzo boundary, the initial mass fraction of polymer decreased exponentially with increasing solvent/ water ratio: the $\log[\text{mass fraction of polymer in solvent}]$ was a linear function of $[\text{solvent/water ratio}]$. This trend was evidenced in several systems, e.g. PMMA/ acetone, PCL/ acetone and PLGA/ acetone [22,49-50]. The relevant parameters for the Ouzo boundary are, therefore, the initial concentration of polymer in organic solvent and the solvent/water ratio. As pointed out by Aubry *et al.*, the Ouzo limit is actually different from both the binodal and the spinodal lines [22]. Optimal conditions for nanoprecipitation were achieved when the polymer was dissolved in a theta solvent and when the solution was in the dilute regime, so that the polymer coils did not overlap. Nanoparticles

with a smaller mean size and lower polydispersity in addition to a better production yield were obtained. Conversely, above a critical polymer concentration in solvent, large aggregates were formed in addition to the NPs, even when increasing the water/ solvent ratio [17,51].

The mean particle size was dependent on the initial concentration of polymer in the organic solvent. Increasing the polymer concentration resulted in an increase in mean particle size. In the Ouzo region, the mean particle diameter varied as a power law of polymer weight fraction. The log-log representation of the mean diameter of poly(methymethacrylate) (PMMA), PLGA and PCL NPs as a function of polymer weight fraction (f_p) was a straight line with slope close to $1/3$, indicating that the volume per particle was proportional to the concentration of polymer in the initial solution [22, 50, 52]. Moreover, Kissel and co-workers have shown that the log-log curves obtained for different weight fractions of acetone ($f_a = 0.1$, $f_a = 0.2$, $f_a = 0.3$) superimposed when the mean diameter of PLGA nanoparticles was redrawn as a function of (f_p / f_a) [50]. This suggested that the mean size of the formed nanoparticles depended only on the ratio of polymer to solvent f_p / f_a (Fig. 4).

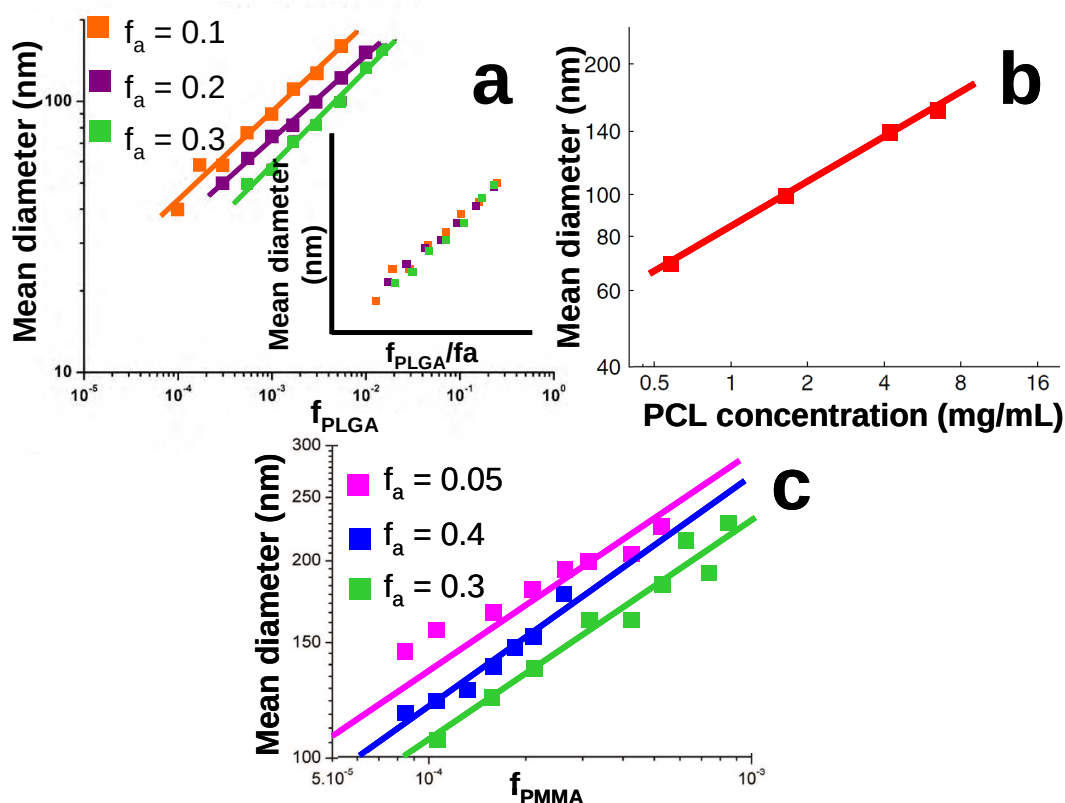


Fig. 4: Mean diameter of polymeric nanoparticles as a function of weight fraction of polymers, f_{PLGA} (a) and f_{PMMA} (c), for several weight fractions of acetone, or as a function of the concentration of PCL in acetone (b). Insert of (a): mean diameter of PLGA nanoparticles as a function of the ratio f_{PLGA}/f_a (adapted from [22,50,52]).

Experimental data dealing with the influence of the polymer molar mass on nanoprecipitation are rather scarce. Legrand *et al.* have studied a homologous series of poly(D,L)-lactides (PLAs) with molar masses from 22 600 g/mol to 124 800 g/mol. At low polymer concentration (5 mg/mL), the molar mass had little influence on the yield of nanoparticles formed when acetone was the solvent. However, for molar masses higher than 32 100 g/mol, the mean hydrodynamic diameter of NPs increased with increasing molar mass (from less than 100 nm at 22 600 g/mol and 32 100 g/mol to about 250 nm at 124 800 g/mol). These results were tentatively correlated to the lower amphiphilic character of long PLA chains since chain ends bear a polar group [51]. On the other hand, Kissel *et al.* did not observe significant difference in particle size upon varying the molar masses of PLGA (12, 34, 48 kDa) dissolved in acetone at different concentrations (5 - 15 mg/mL), although the viscosities of the polymer solutions differed substantially as a function of the molar mass [50]. The same results have been found for nanoparticles of PCL with molar mass varying from 2 to 80 kg/mol [52].

The influence of the interfacial tension between the solvent and the non-solvent on NP formation has been investigated by Kissel *et al.* [50]. They injected PLGA dissolved in acetone into either pure water or a mixture of water and acetone, having a lower interfacial tension than pure water. No significant differences in NP size were seen, as would be expected if nanoprecipitation was mainly governed by the so-called Marangoni effect, described as “surface tension-driven flow”. The Marangoni effect has been assumed to induce turbulences at the interface of the solvent and the non-solvent, resulting in the fingering of the organic phase into the aqueous phase and then formation of smaller and smaller droplets. In that case, the formation of particles should be due to the aggregation of the chains present in the droplets [18]. Other investigators also pointed out that interfacial tension and mechanical turbulence were not the driving forces for spontaneous emulsification [19,33].

The mean size of NPs was found dependant on the nature of the solvent used to solubilize the polymer. For instance, whatever the polymer, the NPs obtained from acetone solutions were always smaller than those prepared from THF under the same conditions. It has been suggested that the lower viscosity and higher diffusion coefficient of acetone in water, compared to THF, should promote faster mixing of solvent and water, resulting in more uniform supersaturation leading to smaller particles [50-51]. Cheng *et al.* have investigated the impact of solvent miscibility with water on PLGA-PEG NP size, using four solvents (acetonitrile, THF, acetone and DMF). They observed a decrease in the mean NP size when solvent/water miscibility increased [53].

The mixing time of the organic solution containing the polymer with the aqueous phase is a crucial parameter. It has been shown that faster mixing led to a reduced mean size of the resulting nanoparticles [41-43]. Outstanding results have been obtained by Johnson and Prud'homme whose experiments encompassed mixing times ranging from ~5 ms to 10 000 ms, thanks to a confined impinging jets mixer [41]. The mixing cell was fed with two opposed jets, one of a solution of an amphiphilic diblock poly(butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) (PBA(59)-b-PAA(104)) copolymer in methanol, the other of water. The mixing time for the two phases was controlled by the velocity of the jets. The sudden drop in solvent quality for the hydrophobic PBA blocks entailed rapid self-assembly of these blocks, inducing nucleation and growth of monodisperse spherical aggregates. The growth process was arrested by a corona brush of hydrophilic blocks covering the NPs. Johnson and Prud'homme have evidenced two regimes for the variation of NP size as a function of the mixing time: as the mixing time decreased, the NP size also decreased until a breakpoint, beyond which the particle size remained constant. At this breakpoint the mixing time τ_{mix} and aggregation time τ_{ag} were equivalent. This characteristic aggregation time decreased from 60 to 26 ms when the copolymer concentration in methanol increased from 0.1 wt% to 0.65 wt%. At very short mixing times, the time corresponding to the formation of NPs decreased with increasing initial concentration of polymer but the NP size was independent of the concentration. At larger mixing times, increasing the polymer concentration in the organic phase increased the mean size of the resulting particles (**Fig. 5**).

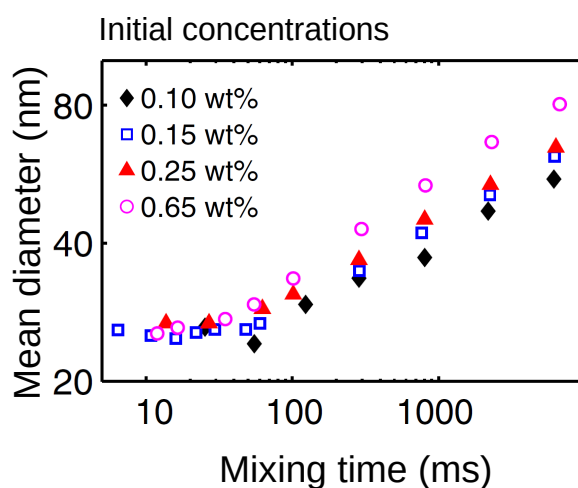


Fig. 5: Mean diameter of PBA(59)-b-PAA(104) nanoparticles as a function of the water-solvent mixing time with different initial concentrations of polymer in methanol (0.10 wt%, 0.15 wt%, 0.25 wt% and 0.65 wt%), adapted from [41,52].

As emphasized by the authors, this mechanism of nanoprecipitation is fundamentally different from the self-assembly of dynamic copolymer micelles at equilibrium, characterized by a fast exchange of polymer chains. Nanoprecipitation generate kinetically frozen NPs, not in a thermodynamic equilibrium but long-lived. During nanoprecipitation, the NPs size increases until the energy barrier for insertion of single chains (unimers) becomes too high which happens for an aggregation number smaller than the equilibrium value. This energy barrier depends on the magnitude of solvent quality change. It has been suggested that it is lower when water-solvent interdiffusion is not complete, explaining why the NPs size increases with increasing mixing time for $\tau_{\text{mix}} > \tau_{\text{ag}}$. Larger NPs can form before being kinetically frozen. When $\tau_{\text{mix}} < \tau_{\text{ag}}$, the NPs size may be expected to become independent of polymer concentration.

Reaching equilibrium would require further exchange of single chains between aggregates, involving a change in the number of aggregates. These two stages of aggregation, a fast nucleation and growth leading to metastable NPs followed by a slow equilibration process, have been observed by synchrotron SAXS with millisecond time resolution for another amphiphilic block copolymer poly(ethylene-propylene)- poly(ethylene oxide) (PEP-PEO) [54]. Aggregation was induced by very fast mixing (4.5 ms) of dilute copolymer solution with water using a stopped-flow apparatus. The fast initial aggregation ($\sim 5\text{-}20$ ms) led to metastable NPs while in the slow last step ($\sim 10^3\text{-}10^5$ ms) the NPs aggregation number increased, as the thermodynamic equilibrium was approached. The growth process was based on insertion and exchange of unimers. The rate of exchange of chains between aggregates formed by block copolymers may vary in a very large range, depending on the system. The main parameters that influence the exchange rate are the length and chemical nature of the hydrophobic blocks and the interfacial tension between the hydrophobic blocks and water [55]. Control of the exchange kinetics is important when aggregates are used as nanocarriers for drug delivery [45].

Stepanyan *et al.* have recently proposed a universal relationship between the NPs size and two parameters, the ratio of the mixing time to the aggregation time and the initial polymer concentration [52]. When the mixing time is greater than the aggregation time of collapsed chains, the NPs size depends mainly on the mixing time and the initial polymer concentration if the surfactant concentration is sufficient. The NPs diameter is predicted to display a $1/3$ power law as a function of these parameters but is independent of the polymer molar mass. The nanoprecipitation of a PCL/acetone solution in a 1 wt% Pluronic P127 aqueous solution

was well described by this model. The predictions of the model of Stepanyan *et al.* were also supported by the experimental data of Johnson and Prud'homme [41].

In summary, stable suspensions of nearly monodisperse polymeric NPs can be obtained using spontaneous emulsification in a narrow domain of composition of the polymer/ solvent/ non-solvent (water) ternary mixture. The Ouzo domain, located between the binodal and spinodal curves, corresponds to dilute polymer solutions. The formation of NPs is accounted for by a nucleation and growth mechanism in a supersaturated polymer solution in the presence of a stabilizing agent. Alternatively, hydrophilic blocks of amphiphilic copolymers may play the role of surfactant. The initial system consists of isolated polymer coils in the solvent. As the solvent quality drops upon rapid mixing with a large amount of water, the polymer coils collapse, then collide and stick together. In parallel, the stabilizing molecules adsorb on the NPs formed and stop their coalescence. The mixing time parameter is of critical importance for the final NPs size. For typical experimental conditions, i.e relatively slow mixing in the presence of a stabilizer, the final NPs size increases with the initial polymer concentration but is independent of the polymer molar mass.

7) Examples of application of polymeric nanoparticles obtained by nanoprecipitation for the delivery of therapeutic molecules

Hydrophobic drugs have been incorporated into nanocarriers by co-precipitation of the polymer/drug solution into water. For example, poorly water soluble paclitaxel and docetaxel have been loaded into PLGA NPs taking advantage of the Ouzo effect. NPs containing these potent antimitotic agents have shown lower toxicity and enhanced efficacy compared to micelle-based formulations using low molecular weight surfactants [56]. Bilati *et al.* proposed to extend the use of nanoprecipitation to the encapsulation of more hydrophilic molecules, e.g proteins, by an accurate selection of the solvent and non-solvent. They have shown that PLGA and PLA NPs could be obtained by precipitation of a DMSO solution into alcohol, enabling the incorporation of proteins [57].

A versatile nanoparticulate platform has been recently designed via nanoprecipitation of poly(alkyl cyanoacrylate) (PACA) based copolymers in an aqueous solution [58]. The nanocarriers combined a PACA core, a PEG outer shell imparting colloidal stability and stealth properties, fluorescent properties provided by covalent linkage of a rhodamine B-based dye to the polymer backbone of some chains, and terminal ligands for specific active targeting

(Fig. 6). Regarding potential cancer therapy applications, stealth characteristics allow the NPs to escape the RES system, thereby prolonging NP blood circulation and enhancing the EPR effect in tumors. This passive targeting can be improved by using ligands that selectively bind to receptors overexpressed on tumor cells. Biotin has been used as a ligand for specific recognition of different cancer cell lines (i.e., human breast carcinoma MCF-7 and murine lung cancer M109). The efficient internalization, via biotin-receptor mediated endocytosis, of fluorescent targeted NPs was evidenced by flow cytometry. The encapsulation of paclitaxel in these functionalized NPs has been achieved, leading to a specific anticancer activity against MCF-7 cells *in vitro*. The relevance of this platform was further demonstrated in the field of Alzheimer's disease (AD). NPs were functionalized with either curcumin derivatives, known for their potential role in the prevention and treatment of AD, or with a novel specific antibody, in order to bind not only the β -amyloid peptide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) monomer, a biomarker of AD, but also the corresponding fibrils, usually located in AD brains. These NPs displayed strong affinity for both monomeric and fibrillar peptides. This versatile platform paves the way to multifunctional NPs, targeting different pathologies when functionalized with appropriate ligands and carrying different hydrophobic drugs in their PACA core. This holds great promise since PACA NPs alone have already shown significant preclinical results in different pathologies. Currently in phase III clinical trials, doxorubicin-loaded PACA NPs (i.e., Transdrug) improved survival, compared to the standard treatment, of patients with multidrug resistant hepatocarcinoma.

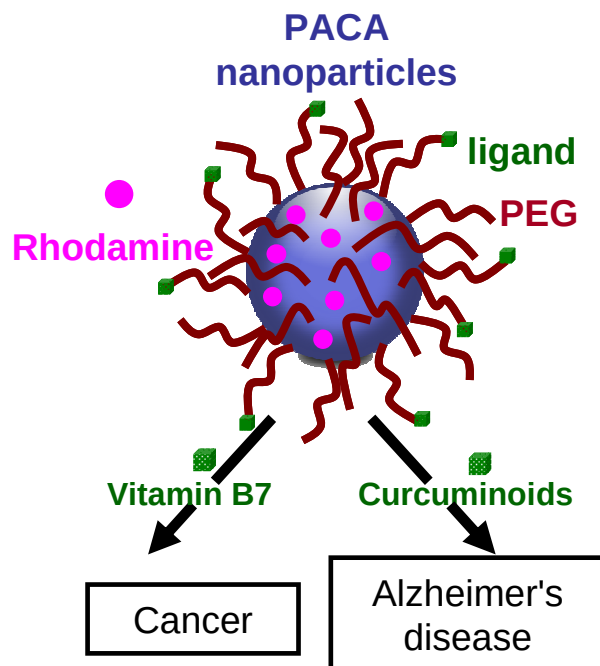


Fig. 6: Example of polymeric nanoparticles with a PACA core, a PEG outer shell, a rhodamine B-based dye and ligands for specific active targeting: vitamin B7 for specific recognition of different cancer cell lines or curcuminoids as ligands for abeta peptide, a marker of Alzheimer's disease (adapted from [58]).

Besides NPs, the nanoprecipitation process also allowed the preparation of nanocapsules. A small amount of oil, in which an active compound could be dissolved, was added to the polymer solution. When this solution was rapidly mixed with water, core-shell NPs (or nanocapsules) were formed by precipitation of the hydrophobic polymer at the surface of oil droplets [47].

Natural phospholipids that self-assemble in liposomes have inspired to Discher and co-workers a new class of vesicles, termed polymersomes, made from amphiphilic diblock copolymers [59-60]. These polymer vesicles have been obtained by different methods, including nanoprecipitation. Aggregation was driven by interaction between hydrophobic blocks, while the morphology was determined by the hydrophilic-to-hydrophobic volume fraction. Polymersomes warranted analogies with viral capsids due to the high stability and low permeability of their shell. These properties were mainly correlated to the membrane thickness that could be modulated to a large extent by varying block lengths. Lecommandoux and coworkers have used a new generation of poly(g-benzyl L-glutamate)-block-hyaluronan (PBLG-b-HA), polypeptide-block-polysaccharide copolymers, to prepare polymersomes targeting over-expressed CD44 glycoprotein receptors in cancer cells, thanks to the

hydrophilic hyaluronan moiety. Doxorubicine was successfully loaded in these polymersomes using coprecipitation and efficiently delivered to breast cancer cells (MCF-7) [38].

It is also worth mentioning a recent study of Bui *et al.*, taking advantage in an original way of solvent shifting to self-assemble a capsid-like shell of block copolymer around a condensed complex of siRNA and polyethyleneimine (PEI) [61]. In the first step, branched PEI and siRNA were complexed in aqueous buffer, yielding positively charged NPs. These polyplexes were then dispersed in a DMSO-rich solution in which the amphiphilic hyaluronan-poly (g-benzyl-L-glutamate) block copolymer was dissolved. Negatively charged hyaluronan moieties interacted with the preformed NPs via electrostatic interactions, giving rise to a surface monolayer of adsorbed copolymer. Excess copolymer chains in solution coexisted with adsorbed ones. In a last step, a large amount of water was added to this suspension, so that the solution became a non-solvent for the highly hydrophobic PBLG moieties, resulting in the self-assembly of isolated copolymer chains with chains adsorbed on the NPs. Hydrophobic interactions between the PBLG blocks allowed the formation of a copolymer bilayer membrane around the core of siRNA-PEI complexes (**Fig. 7**). This nanoconstruct mimicking the morphology of a virus showed a higher gene silencing activity than the PEI-siRNA complex alone.

These few illustrative examples show the important contribution of the nanoprecipitation/Ouzo effect to the design of nanocarriers for drug delivery and targeting.

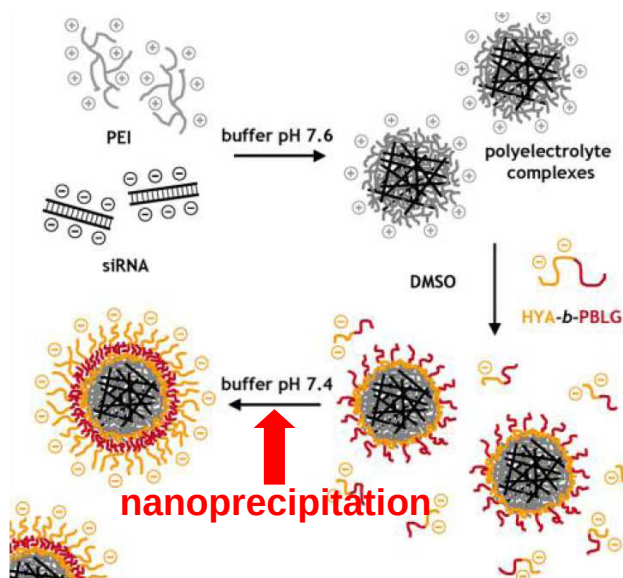


Fig. 7: Design of virus-like polymer nanoparticles by self-assembly of amphiphilic block copolymer molecules around siRNA-based polyelectrolyte complexes (reprinted from [61]).

8) Terpenoids- based nanoparticles: a new platform for theranostics

Drug-loaded NPs represent an attractive strategy for the treatment of severe diseases, especially in the field of cancer. However, increasing drug loading, usually less than 5-10 wt%, remains a challenge and NPs often exhibit the so-called “burst release”, in which a significant fraction of the cargo, generally corresponding to molecules simply adsorbed (or anchored) at the surface of the nanocarrier, is rapidly released upon parenteral administration. Building nanocarriers with molecules covalently bound to the drug by a cleavable linkage (prodrug approach) may help to overcome these limitations [62]. A recent breakthrough has been achieved by Couvreur and co-workers who designed a unique and versatile platform for drug delivery, taking also advantage of the Ouzo effect. It consists in linking an isoprenoid chain to a biologically active drug molecule. Nanoassemblies of the bioconjugate are then obtained by nanoprecipitation without the need of any surfactant. Isoprenoid chains were chosen because isoprene is the basic structural motif of naturally occurring terpenoids which are extraordinary diverse in chemistry, structure and function. Among them, squalene is an acyclic triterpene, widespread in nature. In humans it is a precursor of the cholesterol biosynthesis.

The proof of concept of this nanoprodrug approach has been provided using the squalene as polyterpenoid moiety and gemcitabine as a model anticancer nucleoside analogue [63-64]. Gemcitabine is a fluorinated cytidine analogue used in clinic against various solid tumors and also active against lymphoid and myeloid cancer cell lines. However, its therapeutic potential is restricted by a poor stability in vivo, a limited intracellular diffusion and the induction of resistance. To overcome these drawbacks, squalene was covalently coupled to the amine function of gemcitabine, giving the 4-(N)-tris-nor-squalenoyl-gemcitabine bioconjugate (Sq-Gem) (**Fig. 8a**). This prodrug self-assembled in water as NPs with a diameter of about 120-140 nm. After intravenous administration, these Sq-Gem nanoassemblies, with a drug loading of almost 50% w/w, exhibited impressively higher anticancer activity than gemcitabine against both solid subcutaneously grafted tumours (panc-1, L1210 wt and P388) and aggressive metastatic leukemia (L1210 wt, P388 and RNK-16 LGL). This concept was then applied to other nucleosides or nucleosides analogues such as ddC, ddI, thymidine or adenosine. Remarkably, whatever the nucleosidic headgroup, the squalene-based bioconjugates spontaneously formed Nps upon nanoprecipitation of ethanolic solutions in

water. These NPs exhibited a variety of supramolecular structures (ie. lamellar, inverse bicontinuous cubic or inverse hexagonal phases) [65-67].

The significant improvement in the activity of gemcitabine when coupled to squalene has led to extend the concept of squalenoylation to other drugs such as paclitaxel and penicillin G [68-69]. Unlike the amphiphilic nucleosidic bioconjugates, the hydrophobic squalenoyl-paclitaxel and squalenoyl-penicillin G conjugates self-assembled upon nanoprecipitation as dense spherical NPs devoid of internal structure (**Fig. 8b**). Squalenoyl-paclitaxel NPs showed antitumor efficacy comparable to that of the parent drug but with much lower toxicity. Squalenoyl-penicillin G NPs increased the antibacterial activity of penicillin G against *S. aureus* infection of macrophages thanks to their cell internalization through endocytic pathways. Both these NPs were very stable and fairly monodisperse. Their colloidal stability could be correlated to their negative zeta potential (~ -20 mV) and the insolubility of the conjugates, thus hindering Ostwald ripening. Interestingly, it was found that the initial concentration of the squalenoyl-paclitaxel in ethanol was a crucial parameter to control the final size of the NPs; the higher the concentration in ethanol, the smaller the size of the NPs. This trend is consistent with a nucleation and growth mechanism: as the number of nuclei varies exponentially with the supersaturation, higher solute concentrations are expected to yield higher numbers of nuclei and, therefore, smaller NPs if nuclei grow by capturing surrounding solute molecules.

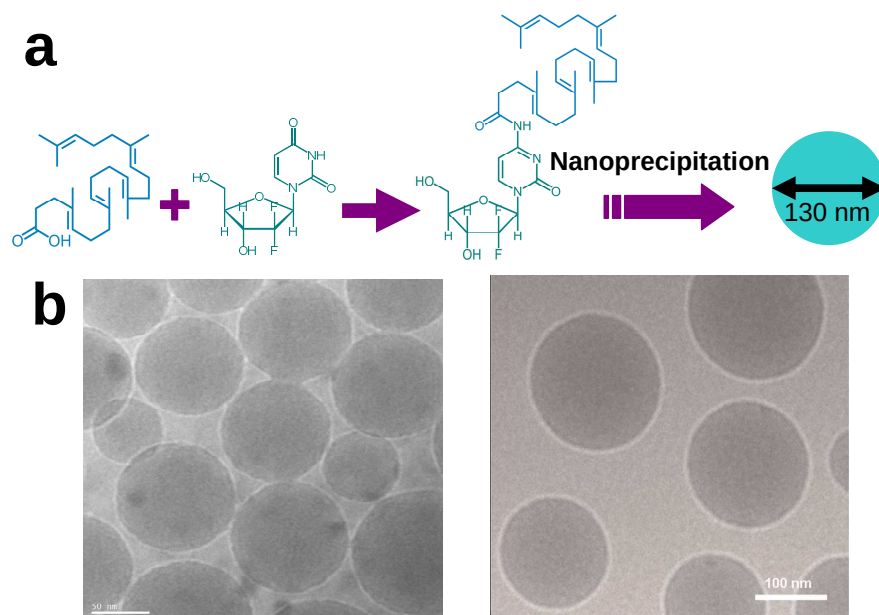


Fig. 8: (a). Squalenic acid coupled with gemcitabine molecules spontaneously self-assemble in water by nanoprecipitation, and form nanoparticles with a mean diameter (d) around 130 nm. (b). Selected Cryo-Tem images of squalenoyl-paclitaxel nanoparticles (left: $d = 142$ nm, $PdI = 0.073$) and squalenoyl-penicillin G (right: $d = 140$ nm, $PdI = 0.1$). Nanoparticles are dense spheres (adapted from [68,69]).

Further studies focused on systematic modulation of the chain length used for the conjugation of gemcitabine. Either natural or synthesized terpenes, with a number of isoprenyl units varying from 1 to 6, were coupled to gemcitabine and the ability of the resulting bioconjugates to form NPs was assessed [70]. All the compounds yielded nanoassemblies active against several cancer cell lines but the prodrugs displaying a short hydrophobic chain precipitated soon after NP formation in the absence of stabilizer, upon ethanol evaporation. Ostwald ripening could be involved in the instability of the NP suspensions prepared with the shorter isoprene moieties.

Beyond short chains, well defined polyisoprene-gemcitabine conjugates were obtained by a living radical polymerization technique [71]. This method allowed the growth of polyisoprene chains of controlled molar mass with a gemcitabine moiety attached to one of the extremities of the polymer chains by a hydrolysable amide linkage. Upon nanoprecipitation in water from a THF solution, these conjugates formed NPs with a high payload ($W_{\text{gem}}/M_{\text{n,PI}}$) of gemcitabine, ranging from 10.5 wt% for $M_{\text{n,PI}} = 2510$ g/mol to 31.2 wt% for $M_{\text{n,PI}} = 840$ g/mol. The NPs size (~137 nm in diameter) did not show significant dependence on PI molar mass for M_n varying between 1190 g/mol and 2510 g/mol. The remarkable colloidal stability of the suspensions could be explained by the negative zeta potential of NPs (~ -68 mV) and by the likely very low water solubility of PI-gem conjugates. The PI-gem NPs exhibited efficient anticancer activity both *in vitro*, on various cancer cell lines, and *in vivo*, on human pancreatic carcinoma-bearing mice while suppressing the inherent toxicity of gemcitabine. Noteworthy, the *in vivo* anticancer activity of the PI-gem conjugate increased with increasing PI molar mass.

The squalene-based platform for drug delivery has further been endowed with both magnetic responsiveness and imaging capabilities to combine diagnostic and therapeutic activities [72]. Multifunctional nanocarriers were prepared by one-step nanoprecipitation of a squalenoyl bioconjugate solution containing magnetite nanocrystals (USPIO). The USPIO/Sq-gem nanocomposites, injected to mice bearing the L1210 wt subcutaneous tumor model, could be guided by an external magnetic field toward the tumor tissue where they could be tracked by magnetic resonance imaging (MRI). To extend this theranostic concept to other contrast agents for MRI, nanocomposites associating Sq-Gem and a gadolinium Gd^{3+} contrast agent coupled to squalene were also designed.

9) Conclusion

Nanoprecipitation is a general strategy for obtaining a diversity of colloidal particles such as nanospheres, nanocapsules, nanovesicles... It has also been used for the design of terpenoid-based nanoprodrugs. It may enable the preparation of fine dispersions of poorly water soluble, or even insoluble, pharmaceutical organic compounds, thus improving their bioavailability. The simplicity of the process and versatility of the materials that can be used have also given a decisive impulse to the design of nanocarriers intended for parenteral drug delivery. For the purpose of nanomedicine, the size distribution of NPs needs to be accurately controlled, which can be achieved taking advantage of the “Ouzo effect”. This spontaneous emulsification process requires neither surfactant nor mechanical energy and generates a dispersion of monodisperse nanoparticles. The key factors controlling the formation of nanoparticles have been discussed but unsolved issues remain. NP characteristics are not determined only by the composition of the ternary system in a metastable state. The “Ouzo effect” and nanoprecipitation are strongly related to the kinetics of mixing of the organic solution containing the hydrophobic compound and the non-solvent, giving rise to supersaturated systems. Residual solvent, as well as additives and drugs, could also interfere with the particle formation and stabilization processes. Little is known about the influence of these factors. There is therefore an urgent need for further experiments and simulations in these domains.

References

- [1] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug delivery systems: entering the main stream, *Science* 303 (2004) 1818-1822.
- [2] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, P. Couvreur, Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery, *Chem.Soc.Rev.* 42 (2013) 1147-1235.
- [3] E. Soussan, S. Cassel, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers, *Angew. Chem.* 48 (2009) 274-288.
- [4] C. Vauthier, P. Couvreur, Nanomedicines: a new approach for the treatment of serious diseases, *J. Biomed. Nanotechnol.* 3 (2007) 1-12.
- [5] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1649-1659.
- [6] J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 329-347.

- [7] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 113-131.
- [8] H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers'entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cell Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2873-2896.
- [9] H. Lee, H. Fong, B. Hoang, R.M. Reilly, C. Allen, The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm.* 7 (2010) 1195-1208.
- [10] F. Lu, S.H. Wu, Y. Hung, C.Y. Mou, Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticle, *Small* 5 (2009) 1408-1413.
- [11] E.A. Simone, T.D. Dziubla, V.R. Muzykantov, Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 1283-1300.
- [12] D. Hühn, K. Kantner, C. Geidel, S. Brandholt, I. De Cock, S.J.H. Soenen, P. Rivera-Gil, J-M. Montenegro, K. Braeckmans, K. Müllen, G.U. Nienhaus, M. Klapper, W.J. Parak, Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge, *ACS Nano* 7 (2013) 3253-3263.
- [13] M.A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil, Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Mol Pharm.* 5 (2008) 487-495.
- [14] Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y. Li, C. Chen, Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods, *Biomaterials.* 31 (2010) 7606-7619.
- [15] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm. Res.* 26 (2009) 235-243.
- [16] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1025-1056.
- [17] S. Galindo-Rodriguez, E. Alleman, H. Fessi, E. Doelker, Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1428-1439.
- [18] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods. Critical comparison, *Adv. Coll. Interf. Sci.* 163 (2011) 90-122.
- [19] S.A. Vitale, J.L. Katz, Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: "the Ouzo effect", *Langmuir* 19 (2003) 4105-4110.
- [20] F. Ganachaud, J.L. Katz, Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices, *ChemPhysChem.* 9 (2005) 209-216.

- [21] D. Horn, J. Rieger, Organic nanoparticles in aqueous phase, *Angew. Chem.* 40 (2001) 4330-4361.
- [22] J. Aubry, F. Ganachaud, J.P.C. Addad, B. Cabane, Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries, *Langmuir* 25 (2009) 1970-1979.
- [23] M.A. Watzky, R.G. Finke, Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 10382-10400.
- [24] J. Han, F. Testard, F. Maloggi, P.E. Coulon, N. Menguy, O. Spalla, Understanding of the Size Control of Biocompatible Gold Nanoparticles in Millifluidic Channels, *Langmuir* 28 (2012) 15966-15974.
- [25] E. Matijevic, Uniform inorganic colloid dispersions. Achievements and challenges, *Langmuir* 10 (1994) 8-16.
- [26] J. Polte, T.T. Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A.F. Thünemann, R. Kraehnert, Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1296-1301.
- [27] J. Polte, R. Erler, A.F. Thünemann, S. Sokolov, T.T. Ahner, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution, *ACS Nano* 4 (2010) 1076-1082.
- [28] Y. Liu, K. Kathan, W. Saad, R.K. Prud'homme, Ostwald ripening of β -carotene nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.* 98 (2007) 036102.
- [29] R. Botet, The "Ouzo effect", recent developments and application to therapeutic drug carrying, *J. of Physics: conference series* 352 (2012) 1-8.
- [30] D. Carteau, I. Pianet, P. Brunerie, B. Guillemat, D.M. Bassani, Probing the initial events in the spontaneous emulsification of trans-anethole using dynamic NMR spectroscopy, *Langmuir* 23 (2007) 3561-3565.
- [31] D. Carteau, D. Bassani, I. Pianet, The « Ouzo effect »: following the spontaneous emulsification of trans-anethole in water by NMR, *C.R. Chimie* 11 (2008) 493-498.
- [32] I. Grillo, Small-angle neutron scattering study of a world-wide known emulsion: Le Pastis, *Coll. Surf. A.* 225 (2003) 153-160.
- [33] N.L. Sitnikova, R. Sprik, G. Wegdam, E. Eiser, Spontaneously formed trans-anethol/water/alcool emulsions: mechanism of formation and stability, *Langmuir* 21 (2005) 7083-7089.
- [34] E. Scholten, E. van der Linden, H. This, The life of an anise flavored alcoholic beverage: does its stability cloud or confirm theory?, *Langmuir* 24 (2008) 1701-1706.

- [35] K. Roger, R. Botet, B. Cabane, Coalescence of repelling colloidal droplets: a route to monodisperse populations, *Langmuir* 29 (2013) 5689-5700.
- [36] H. Lannibois, A. Hasmy, R. Botet, O. Aguerre Charriol, B. Cabane, Surfactant limited aggregation of hydrophobic molecules in water, *J. Phys.II France* 7 (1997) 319-342.
- [37] M.C. Brick, H.J. Palmer, T.H. Whitesides, Formation of colloidal dispersions of organic materials in aqueous media by solvent shifting, *Langmuir* 19 (2003) 6367- 6380.
- [38] K.K. Upadhyay, A.N. Bhatt, A.K. Mishra, B.S. Dwarakanath, S. Jain, C. Schatz, J.F. Le Meins, A. Farooque, G. Chandraiah, A.K. Jain, A. Misra, S. Lecommandoux, The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(γ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes, *Biomaterials* 31 (2010) 2882-2892.
- [39] R. Campardelli, G. Della Porta, E. Reverchon, Solvent elimination from polymer nanoparticle suspensions by continuous supercritical extraction, *J. of Supercritical Fluids* 70 (2012) 100-105.
- [40] S.M. d'Addio, R.K. Prud'homme, Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 417-426.
- [41] B.K. Johnson, R.K. Prud'homme, Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles, *Phys.Rev.Let.* 91 (2003) 118302.
- [42] R. Karnik, F. Gu, P. Basto, C. Cannizaro, L. Dean, W. Kyei-Manu, R. Langer, O. C. Farokhzad, Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles, *NanoLetters* 8 (2008) 2906-2912.
- [43] F. Bally, D.K. Garg, C.A. Serra, Y. Hoarau, N. Anton, C. Brochon, D. Parida, T. Vandamme, G. Hadziioannou, Improved size-tunable preparation of polymeric nanoparticles by microfluidic nanoprecipitation, *Polymer* 53 (2012) 5045-5051.
- [44] J. Molceperes, M. Guzman, M.R. Arberturas, M. Chacon, L. Berges, Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 206–213.
- [45] V. Kumar, L. Wang, M. Riebe, H.H. Tung, R.K. Prud'homme, Formulation and stability of Itraconazole and Odanacatib nanoparticles: governing physical parameters, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1118-1124.
- [46] B. Abecassis, F. Testard, O. Spalla, P. Barboux, Probing in situ the nucleation and growth of gold nanoparticles by small-angle X-ray scattering, *Nanoletters* 7 (2007) 1723-1727.
- [47] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) R1–R4.

- [48] O. Thioune, H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant, *Int. J. Pharm.* 146 (1997) 233-238.
- [49] S. Stainmesse, A.-M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, H. Fessi, Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.* 273 (1995) 505–511.
- [50] M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lebbhardt, X. Wang, T. Kissel, Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the “Ouzo region” upon drug loading, *Eur.J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 244-253.
- [51] P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 33-43.
- [52] R. Stepanyan, J.G.J.L. Lebouille, J.J.M. Slot, R. Tuinier, M.A. Cohen Stuart, Controlled nanoparticle formation by diffusion limited coalescence, *Phys.Rev.Let.* 109 (2012) 138301.
- [53] J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F.X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A.F. Radovic-Moreno, R. langer, O.C. Farokhzad, Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery, *Biomater.* 28 (2007) 869-876.
- [54] R. Lund, L. Willner, M. Monkenbusch, P. Panine, T. Narayanan, J. Colmenero, D. Richter, Structural observation and kinetic pathway in the formation of polymeric micelles. *Phys. Rev. Lett.* 102 (2009) 188301.
- [55] T. Nicolai, O. Colombani, C. Chassenieux, Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers, *Soft Mat.* 6 (2010) 3111-3118.
- [56] G. Gaucher, R.H. Marchessault, J.C. Leroux, Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes, *J. Control. Release* 143 (2010) 2-12.
- [57] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs in nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 67-75.
- [58] B. Le Droumaguet, J. Nicolas, D. Brambilla, S. Mura, A. Maksimenko, L. De Kimpe, E. Salvati, C. Zona, C. Airoidi, M. Canovi, M. Gobbi, M. Noiray, B. La Ferla, F. Nicotra, W. Scheper, O. Flores, M. Masserini, K. Andrieux, P. Couvreur, Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease, *ACS Nano* 6 (2012) 5866-5879.
- [59] B.M. Discher, Y.Y. Won, D.S. Ege, J.C-M. Lee, F.S. Bates, D.E. Discher, D.A. Hammer, Polymersomes: though vesicles made from diblock copolymers, *Science* 284 (1999) 1143-1146.
- [60] D.E. Discher, A. Eisenberg, Polymer vesicles, *Science* 297 (2002) 967-973.

- [61] L. Bui, S. Abbou, E. Ibarboure, N. Guidolin, C. Staedel, J.J. Toulme, S. Lecommandoux, C. Schatz, Encapsulation of RNA- polyelectrolyte complexes with amphiphilic block copolymers: toward a new self-assembly route, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 20189-20196.
- [62] M.J. Joralemon, S. McRae, T. Emrick, PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems, *Chem. Commun.* 46 (2010) 1377-1393.
- [63] P. Couvreur, B. Stella, L.H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepître-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereudre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J.M. Renoir, L. Cattel, Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics, *Nano Letters* 6 (2006) 2544-2548.
- [64] P. Couvreur, L.H. Reddy, S. Mangenot, J. H. Poupaert, D. Desmaële, S. Lepître-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, M. Ollivon, Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue, *Small* 4 (2008) 247-253.
- [65] V. Allain, C. Bourgaux, P. Couvreur, Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices, *Nucleic Acids Research* 40 (2012) 1891-1903.
- [66] E. Lepeltier, C. Bourgaux, V. Rosilio, J. H. Poupaert, F. Meneau, F. Zouhiri, S. Lepître-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, Self-assembly of squalene-based nucleolipids: relating the chemical structure of the bioconjugates to the architecture of the nanoparticles : submitted.
- [67] F. Bekkara-Aounallah, R. Gref, M. Othman, L.H. Reddy, B. Pili, V. Allain, C. Bourgaux, H. Hillaireau, S. Lepître-Mouelhi, D. Desmaële, J. Nicolas, N. Chafi, P. Couvreur, Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues, *Adv. Funct. Mat.* 18 (2008) 3715-3725.
- [68] J. Caron, A. Maksimenko, S. Wack, E. Lepeltier, C. Bourgaux, E. Morvan, K. Leblanc, P. Couvreur, D. Desmaele, Improving the Antitumor Activity of Squalenoyl-Paclitaxel Conjugate Nanoassemblies by Manipulating the Linker between Paclitaxel and Squalene, *Adv. Healthcare Mater.* 2 (2013) 172-185.
- [69] N. Semiramoth, C. Di Meo, F. Zouhiri, F. Saïd-Hassane, S. Valetti, R. Gorges, V. Nicolas, J.H. Poupaert, S. Chollet-Martin, D. Desmaële, R. Gref, P. Couvreur, Self-assembled penicillin bioconjugates: an original approach for the treatment of intracellular infections, *ACS Nano* 6 (2012) 3820-3831.
- [70] A. Maksimenko, J. Mougin, S. Mura, E. Sliwinski, E. Lepeltier, C. Bourgaux, S. Lepître, F. Zouhiri, D. Desmaële, P. Couvreur, Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self-assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy, *Cancer Letters* 334 (2013) 346-353.
- [71] S. Harrisson, J. Nicolas, A. Maksimenko, D.T. Bui, J. Mougin, P. Couvreur, Nanoparticles with in vivo anticancer activity from polymer prodrug amphiphiles prepared by living radical polymerization, *Angew.Chem.* 52 (2013) 1678-1682.

[72] J.L. Arias, L.H. Reddy, M. Othman, B. Gillet, D. Desmaële, F. Zouhiri, F. Dosio, R. Gref, P. Couvreur, Squalene-based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano* 5 (2011) 1513-1521.

Références

- A. Aderem, How to eat something bigger than your head, *Cell*, **110**, 5–8, (2002).
- S. Alireza, C. Ping, R. M. Andrew, H. T. Jeffery, W. Xiao Yu, Evaluation of new bi-functional terpolymeric nanoparticles for simultaneous in vivo optical imaging and chemotherapy of breast cancer, *Drug Delivery and Translational Research*, **2** (6), 437-453, (2012).
- T. M. Allen, G. A. Austin, A. Chonn, L. Lin, K.C. Lee, Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1061**, 56–64, (1991).
- J. L. Arias, L. H. Reddy, P. Couvreur, Magneto-responsive Squalenoyl Gemcitabine Composite Nanoparticles for Cancer Active Targeting, *Langmuir*, **24**, 7512-7519, (2008).
- S. Balibar et E. Brézin « Demain la physique », *Edition Odile Jacob*, Chapitre Matière Molle, (2009).
- F. Bekkara-Aounallah, R. Gref, M. Othman, L. H. Reddy, B. Pili, V. Allain, C. Bourgaux, H. Hillaireau, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, J. Nicolas, N. Chafi, P. Couvreur, Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues, *Adv. Funct. Mater.*, **18**, (2008), 3715–3725.
- K. A. Beningo, Y. L. Wang, Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target, *Journal of Cell Science*, **115** (4), 849-856, (2001).
- L. Bildstein, C. Dubernet, V. Marsaud, H. Chacun, V. Nicolas, C. Gueutin, A. Sarasin, H. Bénech, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: an original drug delivery pathway, *Journal of Controlled Release*, **147**, 163–170, (2010).
- L. Bildstein, V. Marsaud, H. Chacun, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, C. Dubernet, Extracellular-protein-enhanced cellular uptake of squalenoyl gemcitabine from nanoassemblies, *Soft Matter*, **6**, 5570–5580, (2010).
- J. Caron, E. Lepeltier, L. H. Reddy, S. Lepetre-Mouelhi, S. Wack, C. Bourgaux, P. Couvreur, D. Desmaële, Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation, *Europ. J. Organ. Chem.*, **14**, 2615-2628, (2011).
- J. A. Champion, S. Mitragotri, Role of target geometry in phagocytosis, *PNAS*, **103** (13), 4930–4934, (2006).
- D. Chandler, Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly, *Nature*, **437**, 640-647, (2005).
- B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Lett.*, **7** (6), 1542-1550, (2007).

- J.-C. Choia, B.-W. Job, Y.-C. Kimc, Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of paclitaxel or prodrug to rats pretreated with quercetin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 313–318, (2004).
- A. Chonn, P.R. Cullis, D.V. Devine, The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes, *J. Immunol.*, **146**, 4234-4241, (1991).
- J. Conde, J. Rosa, J. M. de la Fuente, P. V. Baptista, Gold-nanobeacons for simultaneous gene specific silencing and intracellular tracking of the silencing events, *Biomaterials*, **34**, 2516-2523, (2013).
- T. Courant, V. G. Roullin, C. Cadiou, M. Callewaert, M. C. Andry, C. Portefaix, C. Hoeffel, M. C. de Goltstein, Marc Port, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, M. Molinari, F. Chuburu Hydrogels Incorporating GdDOTA : Towards Highly Efficient DualT1/T2 MRI Contrast Agents, *Angewandte Chemie International Edition*, **51** (36), 9119–9122, (2012).
- P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, P. Speiser, Polycyanoacrylate Nanocapsules as potential lysosomotropic carriers – Preparation, morphological and sorptive properties, *J. Pharm. Pharmacol.*, **31** (5), 331– 332, (1979).
- P. Couvreur, Drug vectorization or how to modulate tissular and celular distribution of biologically active compounds, *Ann Pharm Fr*, **59** (4), 232-238 (2001).
- P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharmaceutical Research*, **23** (7), 1417-1450, (2006).
- P. Couvreur, L. H. Reddy, S. Mangenot, J. H. Poupaert, D. Desmaële, S. Lepître-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, M. Ollivon, Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue, *Small*, **4** (2), 247-253, (2008).
- P. Couvreur, Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 21–23, (2013).
- P. Decuzzi, M. Ferrari, The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles, *Biophysical Journal*, **94**, 3790–3797, (2008).
- P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?, *Pharmaceutical Research*, **26** (1), 235-243, (2009).
- N. P. Desai, V. Trieu, L. Y. Hwang, R. J. Wu, P. Soon-Shiong, W. J. Gradishar, Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status, *Anti-Cancer Drugs*, **19**, 899–909, (2008).
- A. C. deVerdiere, C. Dubernet, F. Nemati; E. Soma; M. Appel, J. Ferte, S. Bernard, F. Puisieux, P. Couvreur, Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: Towards a mechanism of action, *British Journal of Cancer*, **76** (2), 198-205, (1997).

- R. Díaz-López, N. Tsapis, E. Fattal, Liquid Perfluorocarbons as Contrast Agents for Ultrasonography and ^{19}F -MRI, *Pharmaceutical Research*, **27** (1), 1-16, (2010).
- G. J. Doherty, H. T. McMahon, Mechanisms of Endocytosis, *Annu. Rev. Biochem*, **78**, 857-902, (2009).
- F. Dosio, L. H. Reddy, A. Ferrero, B. Stella, L. Cattell, P. Couvreur, Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl-Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation, *Bioconjugate Chem.*, **21**, 1349–1361, (2010).
- Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D. E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nature Nanotechnology*, **2**, 249-255, (2007).
- S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, *PNAS*, **105** (33), 11613–11618, (2008).
- N. Hao, L. Li, Q. Zhang, X. Huang, X. Meng, Y. Zhang, D. Chen, F. Tang, L. Li, The shape effect of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake pathway in Hela cells, *Microporous and Mesoporous Materials*, **162**, 14–23, (2012).
- H. Hejase, S. S. Hayek, S. Qadri, Y. Haik, MnZnFe nanoparticles for self-controlled magnetic hyperthermia, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **324**, 3620–3628, (2012).
- B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, The cellular and molecular basis of hyperthermia, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **43**, 33–56, (2002).
- H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2873–2896, (2009).
- A. Hullmann, Who is winning the global nanorace?, *Nature Nanotechnology*, **1** (2), 81-83, (2006).
- J. Israelachvili, Intermolecular and surface Forces, Chapter 17: Aggregation of amphiphilic molecules, *Elsevier*, (1991).
- J. Israelachvili, I. Ladyzhinski, The Physico-chemical basis of self assembling structures, In the book Forces, Growth and Form in Soft Condensed Matter: At the interface between Physics and Biology, A.T. Skjeltorp and A.V. Belushkin Edited by Nato Science Series, (2004).
- Y. Jin, P. Ai, R. Xina, D. Chen, Morphological transformation of self-assembled nanostructures prepared from cholesteryl acyl didanosine and the optimal formulation of nanoparticulate systems: Effects of solvents, acyl chain length and poloxamer 188, *Journal of Colloid and Interface Science*, **326**, 275–282, (2008).

S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible Drug delivery by supramolecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumormodel, *Cancer Res.*, **70**, 7031–7041, (2010).

H. Koo, H. Lee, S. Lee, K. H. Min, M. S. Kim, D. S. Lee, Y. Choi, I. C. Kwon, K. Kim, S. Y. Jeong, In vivo tumor diagnosis and photodynamic therapy via tumoral pH-responsive polymeric micelles, *Chem. Commun.*, **46**, 5668–5670, (2010).

H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 71–79, (2013).

A. Mäntylä, J. Rautio, T. Nevalainen, P. Keski-Rahkonen, J. Vepsäläinen, T. Järvinen, Design, synthesis and in vitro evaluation of novel water-soluble prodrugs of buparvaquone, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **23**, 151–158, (2004).

H. Marie, V. Plassa, S. Lesieur, Magnetic-fluid-loaded liposomes for MR imaging and therapy of cancer, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **23** (1), 25-37, (2013).

K. Maruyama, O. Ishida, T. Takizawa, and K. Moribe. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40** (1-2), 89-102, (1999).

H. K. Moon, S. H. Lee, H. C. Choi, In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes, *ACS Nano*, **3**, 3707–3713, (2009).

S. Mura, P. Couvreur, Nanotheranostics for personalized medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 1394–1416, (2012).

M. Nurunnabi, K. J. Cho, J. S. Choi, K. M. Huh, Y-K Lee, Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging, *Biomaterials*, **31**, 5436-5444, (2010).

J. W. Park, D. B. Kirpotin, K. Hong, R. Shalaby, Y. Shao, U. B. Nielsen, J. D. Marks, D. Papahadjopoulos, C. C. Benz, Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes, *J. Control. Release*, **74** (1-3), 95-113, (2001).

J. A. Park, J. J. Lee, I. S. Kim, B. H. Park, G. H. Lee, T. J. Kim, H. C. Ri, H. J. Kim, Y. Chang, Magnetic and MR relaxation properties of avidin–biotin conjugated superparamagnetic nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **313**, 288–291, (2008).

J. H. Park, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **47**, 7284–7288, (2008).

Z. Peng, Y. Yanke; W. Y. Andrew, Z. Yanqiang, W. Amanda, G. Craig, W. Shaomeng, S. Duxin, Superparamagnetic Iron Oxide Nanotheranostics for Targeted Cancer Cell Imaging and pH-Dependent Intracellular Drug Release, *Molecular Pharmaceutics*, **7** (6), 1974-1984, (2010).

- B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, G. Keller, S. Lepître-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, M. Ollivon, Interaction of a new anticancer prodrug, gemcitabine–squalene, with a model membrane Coupled DSC and XRD study, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**, 1522–1532, (2010).
- E. Pisani, N. Tsapis, B. Galaz, M. Santin, R. Berti, N. Taulier, E. Kurtisovski, O. Lucidarme, M. Ourevitch, B.T. Doan, J.C. Beloeil, B. Gillet, W. Urbach, S.L. Bridal, E. Fattal, Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging, *Advanced Functional Materials*, **18** (19), 2963–2971, (2008).
- P. Prabhu, V. Patravale, The Upcoming Field of Theranostic Nanomedicine: An Overview, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **8**, 859–882, (2012).
- Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y. Li, C. Chen, Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods, *Biomaterials*, **31**, 7606–7619, (2010).
- M. Raouane, D. Desmaële, M. Gilbert-Sirieix, C. Gueutin, F. Zouhiri, C. Bourgaux, E. Lepeltier, R. Gref, R. Ben Salah, G. Clayman, L. Massade, P. Couvreur, Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma, *J. Med. Chem.*, **54**, 4067–4076, (2011).
- N. Rapoport, K. H. Nam, R. Gupta, Z. Gao, P. Mohan, A. Payne, N. Todd, X. Liu, T. Kim, J. Shea, C. Scaife, D. L. Parker, E. K. Jeong, A. M. Kennedy, Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions, *J. Control. Release*, **153**, 4–15, (2011).
- L. H. Reddy, C. Dubernet, S. Lepetire Mouelhi, P. E. Marque, D. Desmaele, P. Couvreur, A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types, *Journal of Controlled Release*, **124**, 20–27, (2007).
- L. H. Reddy, H. Khoury, A. Paci, A. Deroussent, H. Ferreira, C. Dubernet, X. Declèves, M. Besnard, H. Chacun, S. Lepître-Mouelhi, D. Desmaële, B. Rousseau, C. Laugier, J.-C. Cintrat, G. Vassal, P. Couvreur, Squalenylation Favorably Modifies the in Vivo Pharmacokinetics and Biodistribution of Gemcitabine in Mice, *Drug Metabolism and Disposition*, **36** (8), 1570–1577, (2008).
- L. H. Reddy, P. Couvreur, Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy, *Advanced drug delivery reviews*, **61**, 1412–1426, (2009).
- J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, **377**, 159–169, (2004).
- I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty, P. N. Prasad, Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7860–7865, (2003).

- G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, Endocytosis of nanomedicines, *Journal of Controlled Release*, **145**, 182–195, (2010).
- G. Sahay, J.O. Kim, A.V. Kabanov, T.K. Bronich, The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents, *Biomaterials*, **31** (5), 923–933, (2010).
- J.E. Schnitzer, gp60 is an albumin-binding glycoprotein expressed by continuous endothelium involved in albumin transcytosis, *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, **262**, 246–254 (1992).
- R. Sharma, C. J. Chen, Newer nanoparticles in hyperthermia treatment and thermometry, *J Nanopart Res*, **11**, 671–689, (2009).
- N. Semiramoth, C. Di Meo, F. Zouhiri, F. Saïd-Hassane, S. Valetti, R. Gorges, V. Nicolas, J. H. Poupaert, S. Chollet-Martin, D. Desmaële, R. Gref, P. Couvreur, Self-Assembled Squalenoylated Penicillin Bioconjugates: An Original Approach for the Treatment of Intracellular Infections, *ACS Nano*, **6**, 3820-3831, (2012).
- E. A Simone, T.D. Dziubla, V. R. Muzykantov, Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **5** (12), 1283-1300, (2008).
- A. K. Singh, M. A. Hahn, L. G. Gutwein, M. C. Rule, J. A. Knapik, B. M. Moudgil, S. R. Grobmyer, S. C. Brown, .Multi-dye theranostic nanoparticle platform for bioimaging and cancer therapy, *International Journal of Nanomedecine*, **7**, 2739-2750, (2012).
- N. R. Soman, S. L. Baldwin, G. Hu, J. N. Marsh, G. M. Lanza, J. E. Heuser, J. M. Arbeit, S. A. Wickline, P. H. Schlesinger, Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth, *J. Clin. Invest.*, **119**, 2830–2842, (2009).
- B. Testa, Prodrug research: futile or fertile?, *Biochemical Pharmacology*, **68**, 2097–2106, (2004).
- F. Tranquart, J. M. Correas, A. Bouakaz, Echographie de contraste, chapitre : caractéristique des agents de contraste, *Springer Edition*, (2007).
- J. Van der Zee, Heatig the patient: a promising approach?, *Annals of Oncology*, **13**, 1173-1184, (2002).
- C. Vauthier, N. Tsapis, P. Couvreur, Nanoparticles: heating tumors to death?, *Nanomedicine*, **6** (1), 99-109, (2011).
- M. Wainwright, J. E. Kristiansen, On the 75th anniversary of Prontosil, *Dyes and Pigments*, **88**, 231-234, (2011).

Chapitre II

Matériel et Méthodes



I- Molécules étudiées

La grande majorité des molécules étudiées ont été synthétisées par l'équipe des chimistes de l'UMR 8612 dirigée par Didier Desmaële.

1) Variation de la tête polaire

Dans une première partie nous avons étudié des nucléosides ou des analogues nucléosidiques couplés à une chaîne squalénée, celle-ci étant greffée soit avec la base nucléosidique, soit avec l'hydroxyle 5' du sucre (**Figure 1**). Toutes ces molécules présentent l'intérêt de posséder des propriétés thérapeutiques et d'être amphiphiles. En effet, une fois libérés dans la cellule, les analogues nucléosidiques sont, comme leurs analogues naturels, phosphorylés par des kinases et intégrés dans les brins d'ADN en réplication (cellules infectées par des virus, cellules cancéreuses). L'absence d'hydroxyle en 2' dans ces molécules entraîne la terminaison de chaîne en inhibant par exemple l'action de l'ADN polymérase, entraînant l'apoptose (B. Ewald, 2008).

La Gemcitabine est un anticancéreux utilisé notamment contre le cancer du pancréas (S. Noble, 1997). Le fait d'ajouter un groupement phosphate à la Gemcitabine a pour but d'améliorer la cytotoxicité de celle-ci, étant donné qu'en intracellulaire la première étape de phosphorylation est cinétiquement déterminante (J. Caron, 2011). La didéoxycytidine (N. A. Van Draanen, 1994) connue sous le nom Zalcitabine® ou encore la didéoxyinosine (E. Mukherji, 1994) commercialisée sous le nom Videx® sont des antiviraux capables d'inhiber la réplication d'un rétrovirus comme le VIH, agent étiologique du SIDA. La déoxycytidine, connue sous le nom de Decitabine® est utilisée pour traiter notamment la leucémie (E. Jabbour, 2008) : c'est un agent hypométhylant (M. J Hoffmann, 2005). Enfin l'adénosine, précurseur de la synthèse de l'ATP, pourrait être utilisée pour ralentir l'ischémie du myocarde ou cérébrale (T. Obata, 2002 ; H. Karmouty-Quintana 2013).

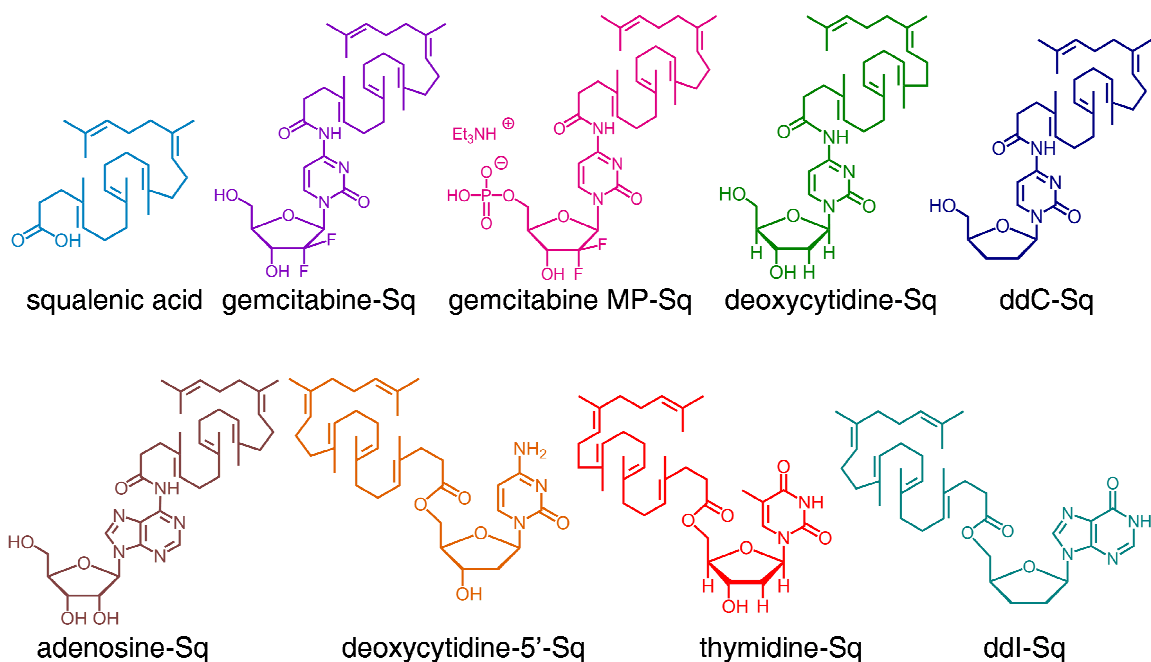


Figure 1: Structure des différentes molécules ayant pour tête polaire un nucléoside ou un analogue nucléosidique couplé au squalène.

2) Variation de la longueur de la chaîne hydrophobe

a) Tête polaire : la Gemcitabine

Dans une deuxième partie d'étude, les molécules présentaient toutes comme tête polaire la Gemcitabine, mais possédaient une longueur de chaîne hydrophobe variable : 1, 2, 3, 4, 5 ou encore 6 unités isoprènes (**Figure 2**).

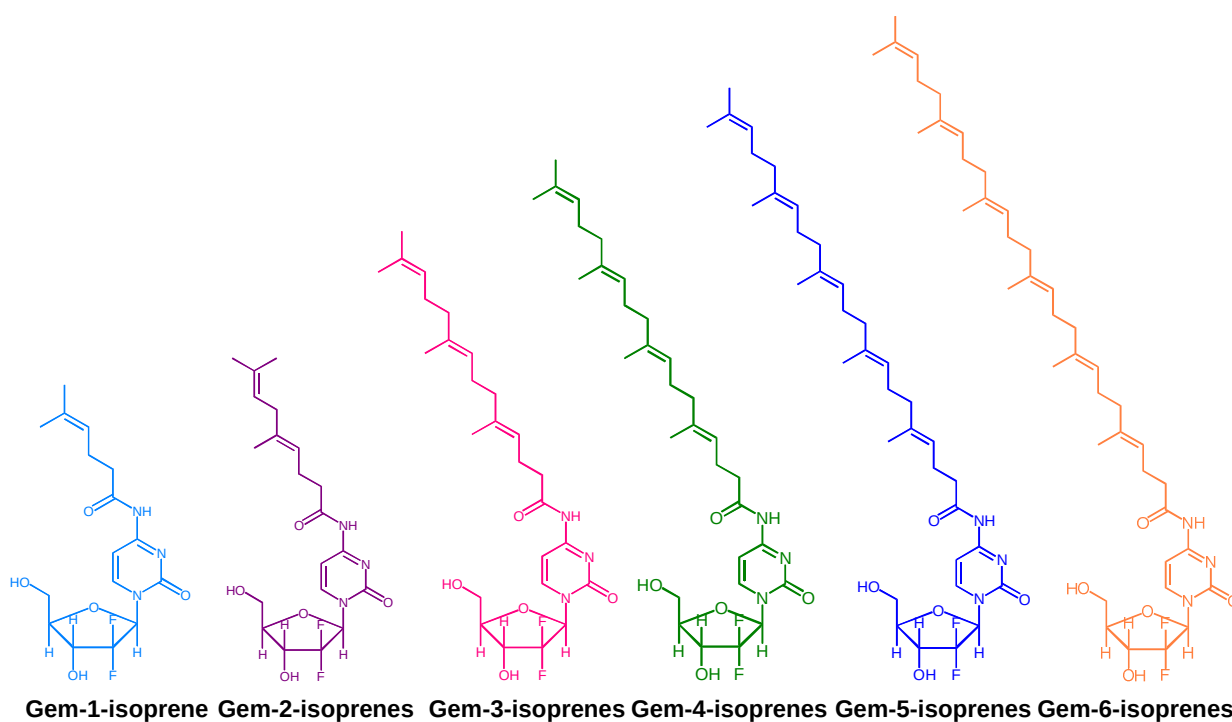


Figure 2 : Représentation des différentes molécules avec comme tête polaire la Gemcitabine couplée à une chaîne polyisoprènes plus ou moins longue (1, 2, 3, 4, 5 ou 6 unités isoprènes).

b) Tête polaire : l'adénosine

Enfin, dans la dernière partie, l'adénosine-Sq homologuée était à l'étude (**Figure 3**): cette molécule présente comme chaîne hydrophobe un squalène avec une unité isoprène en plus.

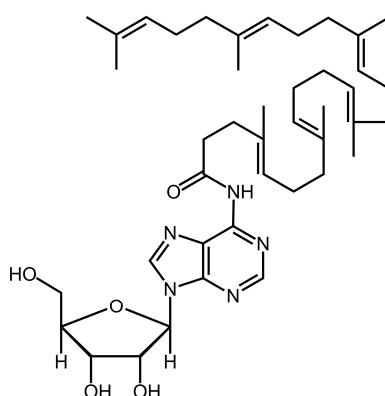


Figure 3 : représentation de la molécule d'adénosine-Sq homologuée.

3) Synthèse de la Gemcitabine-1-isoprène et de la Gemcitabine-2-isoprènes

a) Réactifs

La Gemcitabine a été achetée chez Sequoia Research Product Ltd. (UK). Tous les solvants utilisés dans la synthèse ont été achetés chez Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Enfin l'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HATU), la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), le fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) et la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) ont été achetés chez Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Quentin Fallavier, France).

b) Synthèse (Schéma 1)

4-Amino-1-[4-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-3,3-difluoro-tetrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidin-2-one (GemTBS) :

La Gemcitabine est d'abord protégée en position 3' et 5' du sucre par des groupements *tert*-butyldiméthylsilyle. Dans un ballon de 250 mL, 2.5 équivalents de chlorure *tert*-butyldiméthylsilyle, 1 équivalent de Gemcitabine, 3 équivalents d'imidazole et 1.1 équivalents de triéthylamine sont ajoutés dans 100 mL de DMF sous atmosphère inerte. Le mélange est agité à 25 °C pendant 24 heures. Le DMF est ensuite distillé sous pression réduite (évaporateur rotatif à carboglace). Le résidu est repris dans une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (75 mL) et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (4×100 mL). La phase organique est ensuite lavée avec 20 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl puis séchée sur MgSO₄. Le mélange est filtré et le filtrat est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant l'acétate d'éthyle pour donner la Gemcitabine silylée avec un rendement de 58%. sous forme d'un solide incolore. $[\alpha]_D^{26.6} + 2.19$ (*c* = 1, MeOH), RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (1H, br s, NH), 7.60 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-6), 6.30 (1H, dd, *J* = 10.8, 4.5 Hz, H-1'), 5.80 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 4.29 (1H, td, *J* = 11.9, 8.2 Hz, H-3'), 3.97 (1H, d, *J* = 11.8 Hz, H-5'), 3.86 (1H, br d, *J* = 8.2 Hz, H-4'), 3.78 (1H, dd, *J* = 11.8, 2.0 Hz, H-5'), 0.92 (9H, s, (CH₃)₃CSi), 0.89 (9H, s, (CH₃)₃CSi), 0.12 (3H, s, (CH₃)₂Si), 0.10 (9H, s (CH₃)₂Si); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 166.1 (C, C-4), 155.8 (C, C-2), 140.6 (CH, C-6), 122.2 (CF₂, t, *J*_{C-F} = 260.7 Hz, C-2'), 95.4 (CH, C-5), 84.3 (CH, dd, *J*_{C-F} = 40.0, 23.4 Hz, C-1'), 81.0 (CH, d, *J*_{C-F} = 9.0 Hz, C-4'), 70.0 (CH, dd, *J*_{C-F} = 28.1, 18.1 Hz, C-3'), 60.3 (CH₂, C-5'), 26.0 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi), 25.7 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi), 18.4 (C, (CH₃)₃CSi), 18.1

(C, (CH₃)₃CSi),), -4.6 (CH₃, (CH₃)₂Si), -5.2 (CH₃, (CH₃)₂Si), -5.3 (CH₃, (CH₃)₂Si), -5.4 (CH₃, (CH₃)₂Si); RMN ¹⁹F (188 MHz, CDCl₃) δ -113.83 (d, J_{F-F} = 238 Hz, 1F), -115.79 (d, J_{F-F} = 238 Hz, 1F); IR (neat) : 2956 (m), 2929 (m), 2857 (m), 1636 (s), 1472 (m), 1403 (s), 1362 (s), 1254 (s), 1206 (s), 1148 (s), 1088 (m), 955 (s), 833 (m), 780 (m), 731 (m), 676 (m); MS (-ESI) m/z(%): 490 (100) [M⁺-H]; Anal. Théorique pour C₂₁H₃₉F₂N₃O₄Si₂: C 51.29, H 7.99, N 8.55. Trouvé: C 51.15, H 8.11, N 8.48.

N-(1''-((2'R,4'R,5'R)-4'-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-5'-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3',3'-difluorotetrahydrofuran-2'-yl)-2''-oxo-1'',2''-dihydropyrimidin-4''-yl)-5-methylhex-4-enamide (GemTBS-1-isoprène):

600 mg de 3',5'-di-tert-butyldimethylsilyl-gemcitabine sont mis en solution dans 18 mL de DMF anhydre. 4.9 équivalents de DIPEA, 1.1 équivalents d'acide 5-méthylhex-4-oïque, 1.9 équivalents de HATU (agent de couplage) et 0.1 équivalents de DMAP (catalyseur) sont ajoutés et mis à agiter pendant 48 heures sous atmosphère inerte à température ambiante. Le DMF est évaporé, le résidu est repris dans de l'eau et la phase aqueuse est ensuite extraite avec 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne à dépôt de silice, avec pour éluant un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (1 :4) pour donner 480 mg (rendement : 73 %) de Gem-monoisoprène sous forme d'une huile jaune pâle (162 mg, 70%). [α]_D²⁷ +0.51 (c = 1, CHCl₃); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9.95 (1 H, s, NH), 8.06 (1 H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 7.45 (1 H, d, J = 7.6 Hz, H-5), 6.32 (1 H, dd, J = 10.0, 3.9 Hz, H-1'), 5.18–4.99 (1 H, m, (CH₃)C=CH), 4.32 (1 H, td, J = 11.7, 8.4 Hz, H-3'), 4.01 (1 H, d, J = 11.8 Hz, H-5'), 3.94 (1 H, d, J = 8.1 Hz, H-4'), 3.80 (1 H, dd, J = 11.8, 1.5 Hz, H-5'), 2.60–2.48 (2 H, m, CH₂CH₂CONH), 2.33 (2 H, m, CH₂CH₂CONH), 1.65 (3 H, s, CH₃), 1.59 (3 H, s, CH₃), 0.94 (9 H, s, SiC(CH₃)₃), 0.89 (9 H, s, SiC(CH₃)₃), 0.12 (3 H, s, SiCH₃), 0.12 (3 H, s, SiCH₃), 0.11 (3 H, s, SiCH₃), 0.09 (3 H, s, SiCH₃); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 173.9 (CONH), 163.2 (C, C4), 154.9 (C, C2), 144.0 (CH, C6), 133.6 (C, (CH₃)₂C=CH), 122.1 (CH, (CH₃)₂C=CH), 122.0 (CF₂, t, ¹J_{CF} = 260.7 Hz, C2'), 97.2 (CH, C5), 84.8 (CH, dd, ²J_{CF} = 39.8, 24.9 Hz, C1'), 81.5 (CH, t, ²J_{CF} = 8.4 Hz, C4'), 69.5 (CH, dd, ²J_{C-F} = 26.6, 18.6 Hz, C3'), 60.0 (CH₂, C-5'), 37.6 (CH₂, CH₂CH₂CONH), 25.9 (3 CH₃, SiC(CH₃)₃), 25.6 (CH₃), 25.5 (3 CH₃, SiC(CH₃)₃), 23.3 (CH₂, CH₂CH₂CONH), 18.4 (C, SiC(CH₃)₃), 18.1 (C, SiC(CH₃)₃), 17.8 (CH₃), -4.7 (CH₃, Si(CH₃)₂), -5.2 (CH₃, Si(CH₃)₂), -5.3 (2 CH₃, Si(CH₃)₂); ¹⁹F NMR (188 MHz, acetone d₆) δ -114.09 (ddd, J = 238.8, 11.9, 3.3 Hz, 1F), -115.81 (dt, J = 239.4, 10.5 Hz, 1F); IR (neat): ν = 2930–2857 (m), 1722 (m), 1688 (s), 1681 (s), 1628 (m), 1617 (s), 1559 (m), 1554 (m), 1497 (s), 1491(s), 1473 (m), 1391 (m), 1376 (m), 1362 (m), 1344 (m), 1320 (m), 1272 (m), 1262 (m), 1254 (m), 1212 (m), 1198 (m), 1133 (m),

1091 (s), 1067 (m), 859 (m), 841 (s), 811 (m), 782 (s), 778 (s); MS (ESI+): m/z (%) = 624 (100) $[M+Na]^+$, 602 (50) $[M+H]^+$.

(E)-N-(1'-((2'R,4'R,5'R)-4'-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-5'-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy) methyl)-3',3'-difluorotetrahydrofuran-2'-yl)-2''-oxo-1'',2''-dihydropyrimidin-4''-yl)-5,9-dimethyldeca-4,8-dienamide (GemTBS-2-isoprènes) :

Après un premier couplage infructueux réalisé avec le même protocole que précédemment, un second couplage a été réalisé en utilisant l'EDCI comme agent de couplage. 544 mg de 3',5'-di-tert-butyldimethylsilyl-gemcitabine sont solubilisés dans 8 mL de DMF distillé. Puis 1.9 équiv. d'acide 5,9-diméthyl-deca-4,8-dienoïque, 1.8 équivalents de EDCI et 0.1 équivalents de DMAP sont ajoutés. Le tout est mis à agiter pendant 24 heures sous atmosphère inerte à température ambiante. Le DMF est ensuite évaporé, le résidu est repris dans de l'eau et la phase aqueuse est ensuite extraite avec 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, avec pour éluant un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (1 : 4) pour donner 230 mg (rendement 34 %) de Gem-2-isoprènes sous forme d'une huile jaune pâle. $[\alpha]_D^{26} = +0.42$ ($c = 1$, $CHCl_3$); RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.98 (1 H, s, NH), 8.06 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 7.45 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5), 6.32 (1 H, dd, $J = 9.9$, 3.8 Hz, H-1'), 5.20–4.80 (2 H, m, $(CH_3)C=CH$), 4.32 (1 H, td, $J = 11.7$, 8.4 Hz, H-3'), 4.01 (1 H, d, $J = 11.9$ Hz, H-5'), 3.94 (1 H, d, $J = 8.1$ Hz, H-4'), 3.81 (1 H, d, $J = 11.9$ Hz, H-5'), 2.60–2.50 (2 H, m, CH_2CH_2CONH), 2.40–2.30 (2 H, m, CH_2CH_2CONH), 2.01–1.96 (4 H, m, $=CCH_2CH_2C=$), 1.64 (6 H, s, CH_3), 1.56 (3 H, s, CH_3), 0.95 (9 H, s, $SiC(CH_3)_3$), 0.89 (9 H, s, $SiC(CH_3)_3$), 0.12 (6 H, s, $SiCH_3$), 0.11 (3 H, s, $SiCH_3$), 0.09 (3 H, s, $SiCH_3$); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.9 (CONH), 163.2 (C, C4), 154.8 (C, C2), 143.9 (CH, C6), 137.1 (C, $(CH_3)C=CH$), 131.3 (C, $(CH_3)C=CH$), 124.2 (CH, $(CH_3)C=CH$), 121.9 (CH, $(CH_3)C=CH$), 121.8 (CF_2 , t, $^1J_{C-F} = 260.9$ Hz, C2'), 97.0 (CH, C5), 84.6 (CH, dd, $^2J_{C-F} = 39.8$, 24.6 Hz, C1'), 81.3 (CH, t, $^2J_{C-F} = 8.4$ Hz, C4'), 69.5 (CH, dd, $^2J_{C-F} = 26.5$, 18.7 Hz, C3'), 59.9 (CH_2 , C-5'), 37.7 (CH_2 , CH_2CH_2CONH), 32.2 (CH_2), 25.8 (3 CH_3 , $SiC(CH_3)_3$), 25.6 (CH_3), 25.5 (3 CH_3 , $SiC(CH_3)_3$), 23.3 (CH_3), 23.2 (CH_2), 18.3 (C, $SiC(CH_3)_3$), 18.0 (C, $SiC(CH_3)_3$), 17.8 (CH_3), 16.1 (CH_3), -4.7 (CH_3 , $Si(CH_3)_2$), -5.2 (CH_3 , $Si(CH_3)_2$), -5.4 (2 CH_3 , $Si(CH_3)_2$); RMN ^{19}F (188 MHz, $CDCl_3$) δ : -116.1 (ddd, $J = 238.8$, 8.8, 3.0 Hz, F), -117.9 (dt, $J = 238.8$, 10.4 Hz, F); IR (neat): $\nu = 3010$ –2860 (m), 1682 (s), 1630 (m), 1617 (m), 1563 (m), 1555 (m), 1493 (s), 1473 (m), 1390 (m), 1375 (m), 1345 (m), 1322 (m), 1254 (m), 1198 (m), 1149 (m), 1132 (m), 1095 (s), 1090 (s), 1071 (m), 860 (m), 841 (s), 834 (s), 808 (m), 781 (m), 761 (s); MS (ESI+): m/z (%) = 692 (50) $[M+Na]^+$, 670 (100) $[M+H]^+$.

Protocole général de déprotection :

Les produits de couplage sont mis en solution dans du THF et 3 équivalents de TBAF sont ajoutés. Le mélange est laissé sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 1 heure. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est repris dans un peu d'eau. Le mélange est extrait au dichlorométhane et les phases organiques sont séchées sur MgSO₄. Après filtration, le mélange est concentré sous pression réduite et le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice, avec pour éluant un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane d'abord (1 :2) puis de l'acétate d'éthyle pur. Le spectre RMN du proton est réalisé (Annexe). Le rendement de cette étape a été de 60 % avec la Gemcitabine-1-isoprène et de 73 % avec la Gemcitabine-2-isoprènes.

***N*-(1''-((2'*R*,4'*R*,5'*R*)-3',3'-Difluoro-4'-hydroxy-5'-(hydroxyméthyl)tetrahydrofuran-2'-yl)-2''-oxo-1'',2''-dihydropyrimidin-4''-yl)-5-methylhex-4-enamide (Gem-1-isoprène):** Cristaux incolores (75 mg, 60%). F: 122-125 °C (Acétone). $[\alpha]_D^{24} = +0.74$ ($c = 0.52$, Acétone). RMN ¹H (400 MHz, acétone d₆) δ : 9.43 (1 H, s, NH), 8.21 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, *H*-6), 7.35 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, *H*-5), 6.40–6.20 (1 H, m, *H*-1'), 5.22-5.10 (2 H, m, (CH₃)₂C=CH, CH₂OH), 4.46 (1 H, dd, $J = 19.9, 11.5$ Hz, *H*-3'), 4.24 (1 H, br s, CH₂OH), 4.08-3.98 (2 H, m, *H*-4', *H*-5'), 3.92-3.85 (1 H, m, *H*-5'), 2.60–2.53 (2 H, m, CH₂CH₂CONH), 2.39 (2 H, q, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₂CONH), 1.68 (3 H, s, CH₃), 1.65 (3 H, s, CH₃); RMN ¹³C (100 MHz, acétone d₆) δ : 174.1 (CONH), 164.1 (C, C4), 155.5 (C, C2), 145.7 (CH, C6), 133.6 (C, (CH₃)₂C=CH), 124.1 (CF₂, t, $^1J_{CF} = 258.7$ Hz, C2'), 123.8 (CH, (CH₃)₂C=CH), 96.9 (CH, C5), 86.0 (CH, dd, $^2J_{CF} = 37.8, 25.9$ Hz, C1'), 82.8 (CH, d, $^2J_{CF} = 6.0$ Hz, C4'), 70.6 (CH, dd, $^2J_{C-F} = 26.6, 18.6$ Hz, C3'), 60.6 (CH₂, C5'), 38.3 (CH₂, CH₂CH₂CONH), 25.9 (CH₃), 24.4 (CH₂, CH₂CH₂CONH), 17.8 (CH₃); ¹⁹F NMR (188 MHz, acétone d₆) δ : -116.93; IR (CHCl₃): $\nu = 1733$ (m), 1716 (m), 1704 (m), 1666 (s), 1657 (s), 1618 (m), 1561 (s), 1561 (s), 1494 (s), 1488 (s), 1438 (m), 1395 (m), 1385 (m), 1309 (m), 1125 (m), 1085 (m);. MS (ESI+): m/z (%) = 396 (100) [M+Na]⁺, 374 (50) [M+H]⁺.

***(E)*-N-(1''-((2'*R*,4'*R*,5'*R*)-3',3'-Difluoro-4'-hydroxy-5'-(hydroxyméthyl)tetrahydrofuran-2'-yl)-2''-oxo-1'',2''-dihydropyrimidin-4''-yl)-5,9-dimethyldeca-4,8-dienamide (Gem-2-isoprènes):** Solide pâteux (36 mg, 73%). $[\alpha]_D^{25} = +1.09$ ($c = 0.95$, CHCl₃). RMN ¹H (400 MHz, acétone d₆) δ : 9.83 (1 H, s, NH), 8.29 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, *H*-6), 7.39 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz, *H*-5), 6.27 (1 H, t, $J = 7.5$ Hz, *H*-1'), 5.19 (1 H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, (CH₃)C=CH), 5.11–5.07 (1 H, m, (CH₃)₂C=CH), 4.44 (1 H, td, $J = 12.4, 8.4$ Hz, *H*-3'), 4.05-3.98 (2 H, m, *H*-4', *H*-5'), 3.86 (1 H, dd, $J = 12.4, 2.6$ Hz, *H*-5'), 2.59–2.56 (2 H, m, CH₂CH₂CONH), 2.40–2.34 (2 H, m, CH₂CH₂CONH₂), 2.09–2.07 (2 H, m,

CH_2CH_2), 1.99–1.95 (2H, m, CH_2CH_2), 1.63 (6 H, s, CH_3), 1.57 (3 H, s, CH_3); RMN ^{13}C (100 MHz, acétone d_6) δ : 174.1 (CONH), 163.9 (C, C4), 155.5 (C, C2), 145.6 (CH, C6), 137.1 (C, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$), 131.8 (C, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$), 125.0 (CH, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$), 123.9 (CF_2 , t, $^1J_{\text{CF}} = 258.3$ Hz, C2'), 123.5 (CH, $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}$), 96.8 (CH, C5), 85.6 (CH, t, $^2J_{\text{C-F}} = 32.2$ Hz, C1'), 82.4 (CH, t, $^3J_{\text{C-F}} = 4.3$ Hz, C4'), 69.8 (CH, t, $^2J_{\text{C-F}} = 22.9$ Hz, C3'), 60.0 (CH_2 , C5'), 40.4 (CH_2), 38.8 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 27.3 (CH_2), 25.8 (CH_3), 24.1 (CH_2), 17.7 (CH_3), 16.1 (CH_3); ^{19}F NMR (188 MHz, acétone d_6) δ -116.90; IR (CHCl_3): $\nu = 2961\text{--}860$ (m), 1681 (m), 1672 (m), 1658 (s), 1649 (s), 1581 (m), 1494 (s), 1490 (s), 1432 (m), 1389 (m), 1380 (m), 1323 (m), 1316 (m), 1261 (m), 1195 (m), 1137 (s), 1108 (s), 1087 (s), 1016 (m), 817 (m), 810 (m), 813 (s); MS (ESI $^+$): m/z (%) = 464 (70) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (70), 442 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

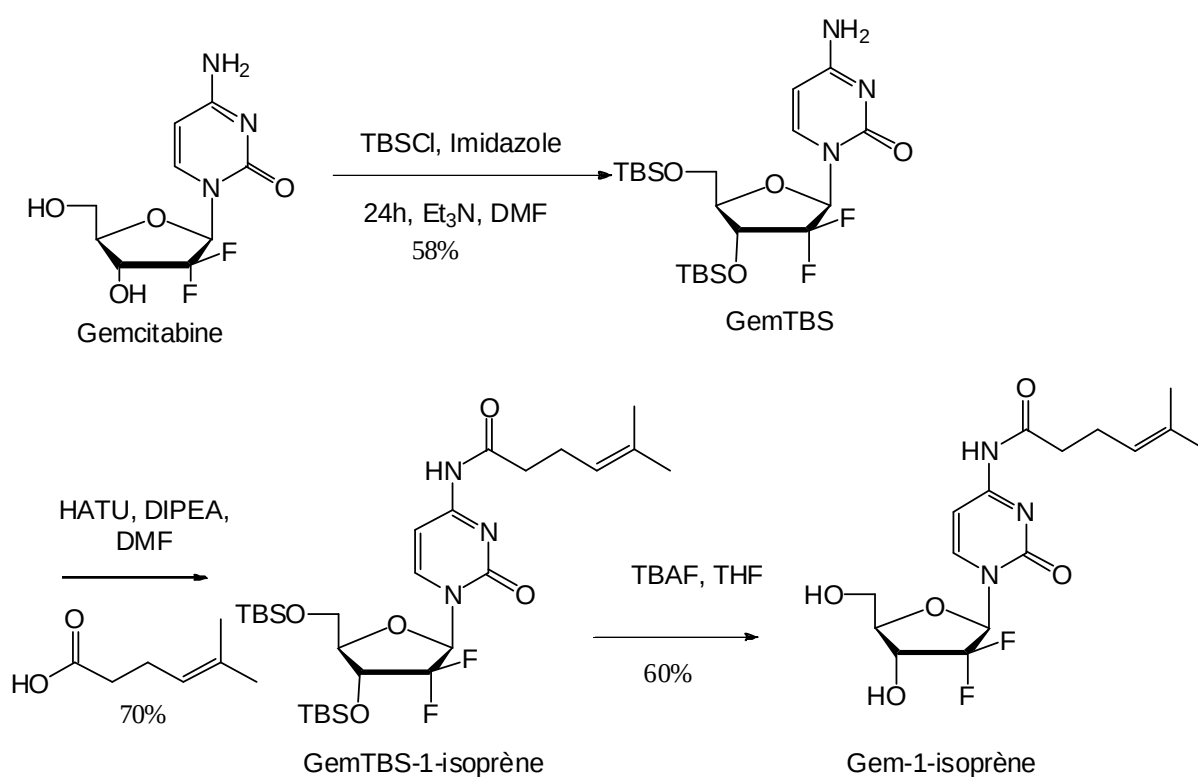


Schéma 1 : synthèse de la Gem-1-isoprène.

II- Préparation des nanoparticules

Toutes les suspensions de nanoparticules ont été préparées par nanoprécipitation (ou encore appelée processus par déplacement de solvant ou émulsification spontanée) (F. Ganachaud, 2005). La molécule d'intérêt est solubilisée dans un volume connu de solvant organique, l'éthanol (EtOH) pour la plupart des suspensions réalisées. La solution est ajoutée goutte à goutte dans un volume d'eau connu sous agitation (1000 rpm), à l'aide de pipettes Pasteur allongées à la flamme pour obtenir un diamètre réduit de goutte. Le solvant organique est ensuite évaporé au Rotavapor[®] à 37 °C. Lorsque les conditions de préparation sont adéquates, relativement faible concentration dans l'éthanol (< 15 mg/mL) et ratio entre le volume d'eau et le volume d'éthanol ≥ 2 , une suspension est alors obtenue avec une opalescence caractéristique de la diffusion de la lumière par les nanoparticules (**Figure 4**).

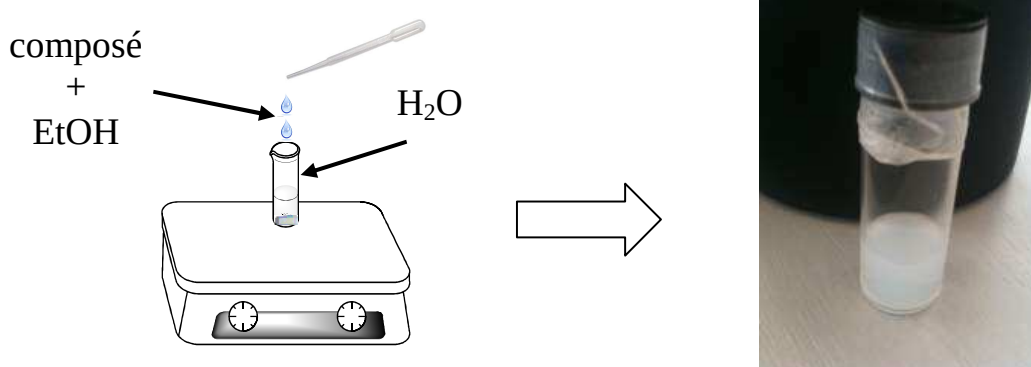


Figure 4 : schéma du principe de la nanoprécipitation et exemple d'une suspension obtenue.

III-Diffraction des Rayons X

Les rayons X ont été découverts en 1895 par le physicien allemand Röntgen, qui les nomma ainsi car leur nature était inconnue, d'où le nom X. Puis, en 1912, le physicien Laüe détermina la longueur d'onde des rayons X grâce à un réseau cristallin, l'ordre de grandeur étant la distance interatomique c'est-à-dire quelques Angströms. L'idée d'utiliser à l'inverse les rayons X pour étudier un réseau cristallin ne s'est pas fait attendre et en 1913 William Lawrence Bragg et son père trouvèrent la structure cristalline de NaCl (J. L. Hodeau, 2007).

Les rayons X sont diffusés par les électrons : on considère uniquement la diffusion cohérente élastique, c'est à dire sans changement d'énergie.

L'onde incidente provoque un déplacement du nuage électronique par rapport au noyau, et il y a alors réémission d'une onde électromagnétique de même fréquence (**Figure 5**).

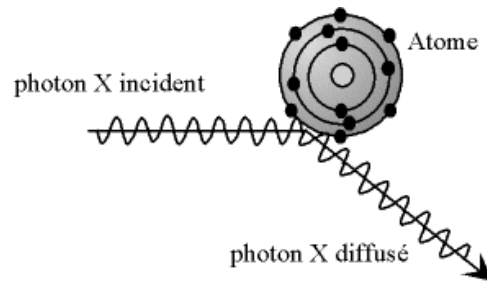


Figure 5 : Schéma de la diffusion de photons sur un atome.

L'onde plane monochromatique incidente est définie par le vecteur d'onde $\vec{k}$, de module $2\pi/\lambda$ où λ est la longueur d'onde du rayonnement. Les rayons X sont diffusés dans toutes les directions de l'espace (l'onde diffusée par un électron est une onde sphérique). Dans la direction 2θ le module du vecteur de diffusion est égal à q (**Figure 6**).

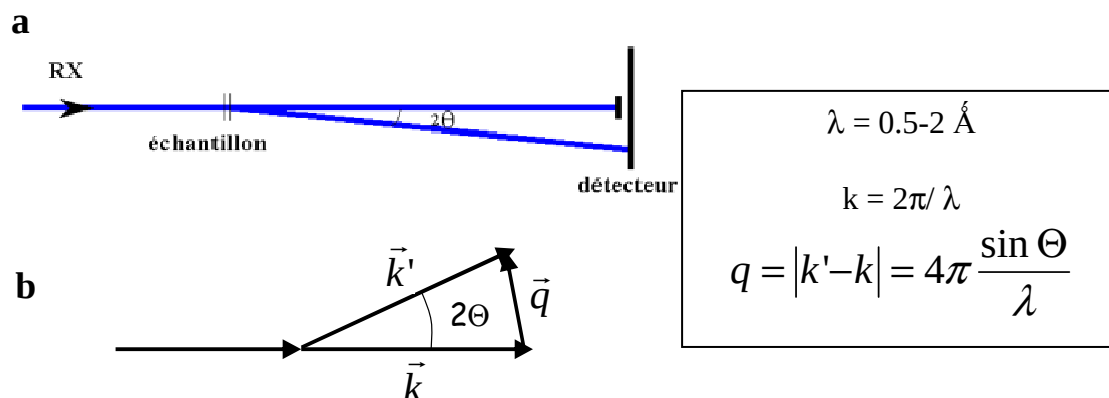


Figure 6: (a) représentation schématique d'une expérience de diffusion, (b) représentation vectorielle du vecteur de diffusion $\vec{q}$ avec $\vec{k}$ le vecteur d'onde incident et $\vec{k}'$ le vecteur d'onde diffusé.

1) Diffraction par un cristal : loi de Bragg

Les rayons X sont diffusés par chacun des atomes du cristal et vont interférer. Les interférences seront constructives dans certaines directions (les ondes « s'additionnent ») et destructives dans d'autres (les ondes « s'annulent ») : **Figure 7**.

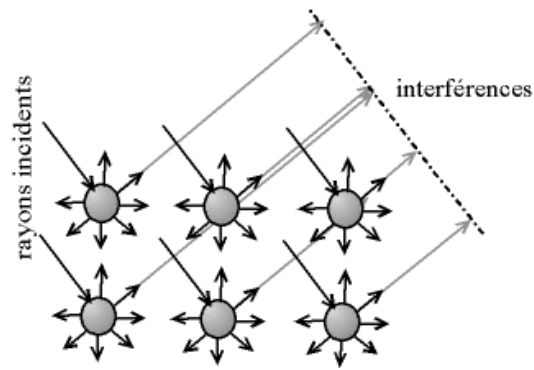


Figure 7 : Schéma de la diffusion des rayons X sur un réseau d'atomes régulier.

La loi de Bragg rend compte des directions pour lesquelles les interférences sont constructives : **Figure 8**.

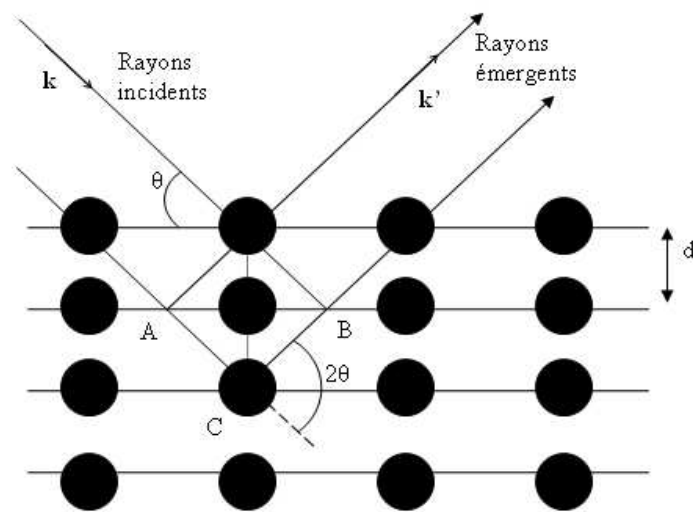


Figure 8 : Schéma permettant de retrouver la démonstration de la loi de Bragg.

On considère une série de plans d'atomes parallèles et équidistants recevant un faisceau de rayons X. Chaque atome est la source d'une onde diffusée : toutes ces sources peuvent interférer. S'il y a une différence de phase entre les ondes diffusées, elles s'annulent par interférence.

La diffusion se fait sous forme d'interférences constructives, si la différence de chemin optique parcouru par deux faisceaux réfléchis sur deux plans successifs est égale à un nombre entier de fois la longueur d'onde.

La réflexion par un cristal est sélective : elle ne se produit que pour certains angles d'incidence. La relation de Bragg relie la distance réticulaire d d'une famille de plans et la longueur d'onde λ des rayons X à l'angle de réflexion θ du faisceau sur ces plans.

n (entier) est l'ordre de la réflexion. L'angle de réflexion θ est la moitié de l'angle de diffraction, angle entre les rayons incident et diffracté.

$$\text{Loi de Bragg : } 2 d \sin \theta = n \lambda ; q=2\pi/d$$

Chaque pic du diffractogramme sera donc associé à un plan atomique désigné par les indices de Miller (hkl). Ainsi chaque pic pourra être indexé par ces indices de Miller (**Figure 9**).

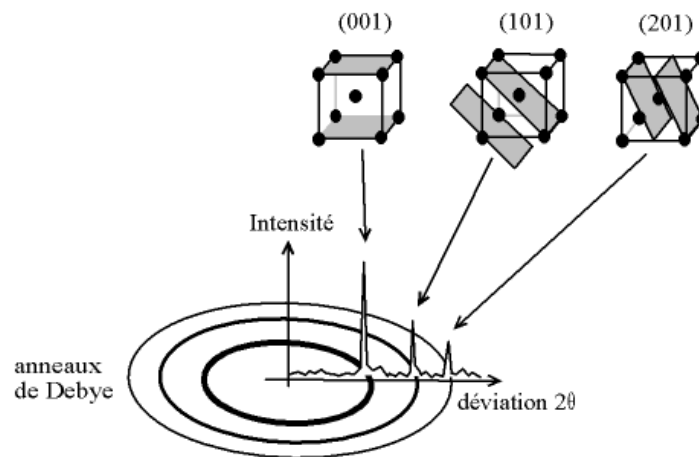


Figure 9 : association d'un pic de diffraction et d'un plan (hkl) dans le cas d'un réseau cubique centré. Les anneaux de Debye résultent de la diffraction des rayons en forme de cônes (dans le cas d'un échantillon isotrope) dont l'axe est le faisceau incident.

2) Diffusion aux petits angles

Le domaine pertinent de q pour mesurer une taille d est tel que $q.d \sim 1$. Le domaine angulaire intéressant est donc voisin de $\theta \sim \lambda/d$. Lorsque les dimensions caractéristiques des objets (une centaine d'Angströms par exemple) sont beaucoup plus grandes que la longueur d'onde des rayons X (entre 1 et 2 Å en général), la diffusion est observée aux petits angles.

Pour la diffusion aux petits angles, qui concerne des distances très supérieures aux distances interatomiques, le matériau est traité comme un continuum où il est défini une densité électronique moyenne. Le signal de diffusion centrale est dû à la présence d'« objets diffusants » ayant une densité électronique différente de celle du milieu environnant (ou à un milieu à deux phases).

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) permet de décrire, dans un matériau, les inhomogénéités de la densité électronique dont les tailles caractéristiques sont comprises entre une dizaine d' Å et 1000 Å environ. C'est donc une méthode précieuse pour déterminer les paramètres structuraux de matériaux très variés.

Les objets diffusants peuvent être de formes diverses : considérés comme isolés (cas dilué) ou présenter des corrélations spatiales (cas concentré).

Les courbes de diffusion centrale peuvent donc contenir des informations sur la taille, la forme, l'organisation spatiale et les interactions des objets diffusants présents dans le système ainsi que sur leur structure interne éventuelle.

A une distance grande par rapport à la dimension de l'échantillon, l'amplitude de l'onde diffusée est :

$$A(\mathbf{q}) = \iiint e^{-i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

où $\rho(r)$ est la densité électronique en un point r de l'espace.

L'amplitude diffusée est la transformée de Fourier de la densité électronique de l'échantillon. Elle dépend des fluctuations de densité autour de la valeur moyenne.

Une expérience de diffusion consiste à mesurer l'intensité diffusée, qui est le carré du module de l'amplitude de diffusion, en fonction de la direction de diffusion:

$$I(\mathbf{q}) = |A(\mathbf{q})|^2$$

3) Cas d'une solution idéale de particules identiques (monodisperses)

On considère une solution idéale de particules identiques : les particules sont sans interactions mutuelles. Leur distribution en solution est aléatoire, sans corrélation ni en position ni en orientation. Expérimentalement, on s'approche d'une solution idéale lorsque la solution est diluée.

L'intensité $I(q)$ diffusée par la solution contenant N particules est la somme des contributions $I_1(q)$ de chacune des particules :

$$I(q) = N I_1(q)$$

$I_1(q) = P(q)$ est appelé le facteur de forme de la particule.

Pour des particules ayant une forme géométrique simple (sphère...) le facteur de forme peut être calculé.

La variation angulaire de l'intensité diffusée dépend de la taille et de la forme de la particule.

Pour l'étude d'un diffractogramme, trois domaines en q sont à considérer (*D. Espinat 1992*), R étant la taille de la particule:

- le domaine de Guinier ($qR < 1$) : des distances supérieures aux dimensions de la particule sont sondées. Le rayon de giration de la particule pourra alors être déterminé.
- le domaine intermédiaire ($R^{-1} < q$) : ce domaine renseigne sur la forme de la particule.
- le domaine de Porod : des distances beaucoup plus petites que la taille de la particule sont sondées. L'évolution aux grandes valeurs de q reflète la structure de l'interface.

4) Cas d'une solution concentrée: particules en interaction

Une solution monodisperse de particules centrosymétriques peut se décrire comme le produit de convolution d'une particule par la distribution spatiale des centres des particules. L'intensité diffusée $I(q)$ s'exprime alors comme le produit du facteur de forme $P(q)$ et du facteur de structure $S(q)$:

$$I(q) = P(q) \cdot S(q)$$

$P(q)$ donne la diffusion d'une particule élémentaire.

Le facteur de structure $S(q)$ est un facteur d'interférence qui rend compte des corrélations spatiales des particules et de l'influence des interactions. Il dépend donc de la concentration. $S(q)$ est défini pas la transformée de Fourier de la moyenne sphérique de la fonction de distribution de paires $g(r)$ (fonction traduisant la probabilité de trouver deux particules séparées de la distance r).

Dans le cas d'une solution suffisamment diluée $S(q) = 1$. En présence d'interactions, $S(q)$ tend asymptotiquement vers 1 aux grands angles. Il peut aussi exister des corrélations intra-particules lorsque celles-ci présentent une structure interne régulière.

5) Exemples de facteurs de structure de systèmes lipidiques lyotropes (J. M. Seddon, 1990)

a) Phase lamellaire

La phase lamellaire est formée de couches parallèles régulièrement espacées dans la direction normale à leur plan moyen, séparées par le milieu aqueux. La densité électronique est supposée varier seulement dans la direction perpendiculaire aux lamelles et les dimensions latérales des lamelles sont considérées comme grandes. La période de cette phase est $d = d_b + d_w$ où d_b est l'épaisseur de la lamelle et d_w celle de la couche d'eau (**Figure 10**).

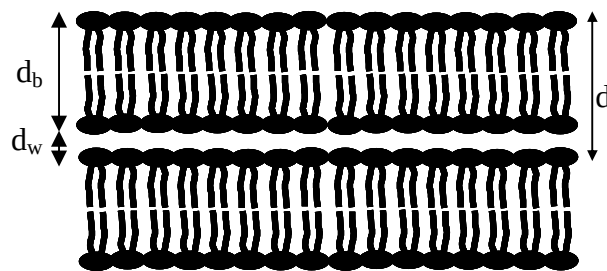


Figure 10 : représentation d'une phase lamellaire avec d la distance interlamellaire, d_b l'épaisseur de la lamelle et d_w celle de la couche d'eau.

Le facteur de structure $S(q)$ est un ensemble de pics de Bragg centrés en $q_n = nq_0$ où n est l'ordre de diffraction et $q_0 = 2\pi / d$ (q_0 est relié à la période d par la relation de Bragg) :

Figure 11.

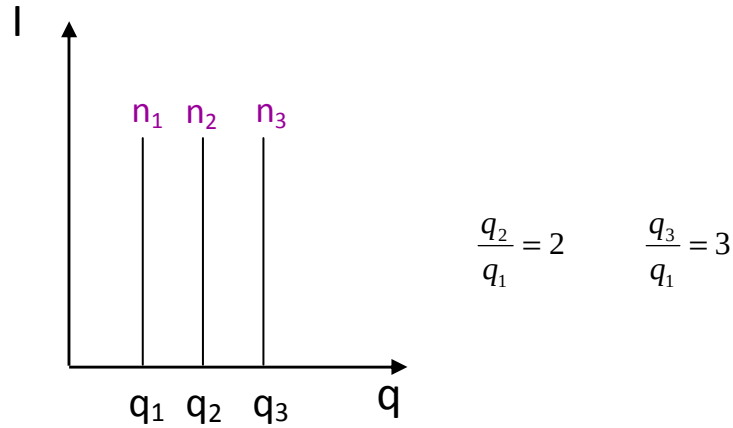


Figure 11 : schéma d'un diffractogramme d'une phase lamellaire avec n_1 , n_2 et n_3 les 3 ordres de diffractions et q_1 , q_2 et q_3 les vecteurs de diffusion respectifs.

Pour une phase lamellaire : $q_i/q_1 = n_i/n_1$.

Il peut être noté que la taille finie du « paquet » de lamelles contribue à élargir les pics de Bragg. Leur largeur est inversement proportionnelle à la taille L du paquet ($L = Nd$). Le réseau est toujours perturbé par des défauts d'empilement ou des fluctuations de position ou d'ondulation des lamelles. Ce désordre entraîne une diminution de l'intensité et un élargissement des pics de diffraction, d'autant plus marqués que l'ordre de diffraction augmente.

b) Phase cubique

La distance inter-réticulaire d_{hkl} d'une famille de plans d'indices (h,k,l) d'un réseau cubique a pour expression, (hkl) étant les indices de Miller des plans réticulaires :

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}$$

Où a est le paramètre de maille.

La relation de Bragg est vérifiée pour les vecteurs de diffusion q tels que :

$$q = \frac{2\pi}{a} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$$

Pour le réseau cubique centré (I) et cubique faces centrées (CFC) certaines raies sont éteintes (**Figure 12**).

Les conditions d'extinction des raies sont :

- pour un réseau cubique centré : $h + k + l = 2n+1$, avec n un entier
- pour un réseau cubique faces centrées : h, k, l de parités mixtes

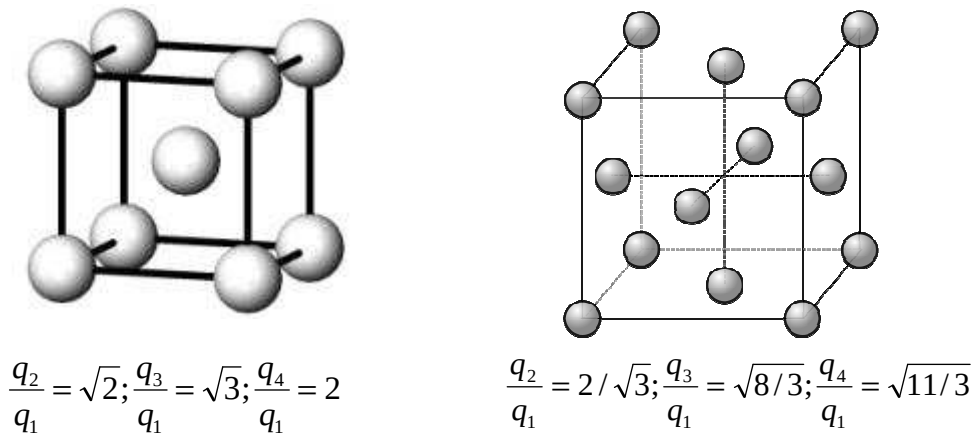
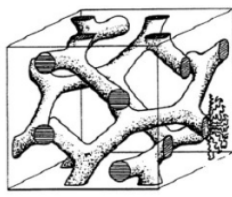


Figure 12 : à gauche, réseau cubique centré et à droite, cubique faces centrées. En dessous de chaque réseau, ratios des positions des pics de diffraction.

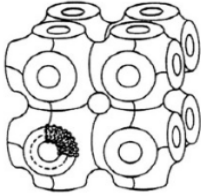
Hormis les phases cubiques micellaires formées par des agrégats discrets disposés sur un réseau cubique, il existe des phases cubiques bicontinues inverses. L'unité de base de ces phases est une bicouche qui sépare l'espace aqueux en deux sous-espaces distincts. La surface passant par le milieu de la bicouche peut être modélisée par une surface minimale périodique (« Infinite Periodic Minimal Surface », IPMS), c'est à dire une surface ayant en tout point une courbure moyenne nulle. Trois IPMS ont été identifiées : la surface primitive (P), la surface « diamant » (D) et la surface gyroïde (G), auxquelles correspondent respectivement les groupes d'espace $Im\bar{3}m$, $Pn\bar{3}m$ et $Ia\bar{3}d$ (**Figure 13**).



Ia3d



Pn3m



Im3m

<i>Pn3m</i>	<i>Im3m</i>	<i>Ia3d</i>	Ratio
			1
(110)	(110)		$\sqrt{2}$
(110)			$\sqrt{3}$
(200)	(200)		2
			$\sqrt{5}$
(211)	(211)	(211)	$\sqrt{6}$
(220)	(220)	(220)	$\sqrt{8}$
(221)			3
(310)	(310)		$\sqrt{10}$
(311)			$\sqrt{11}$
(222)	(222)		$\sqrt{12}$
			$\sqrt{13}$
(321)	(321)	(321)	$\sqrt{14}$
(400)	(400)	(400)	4

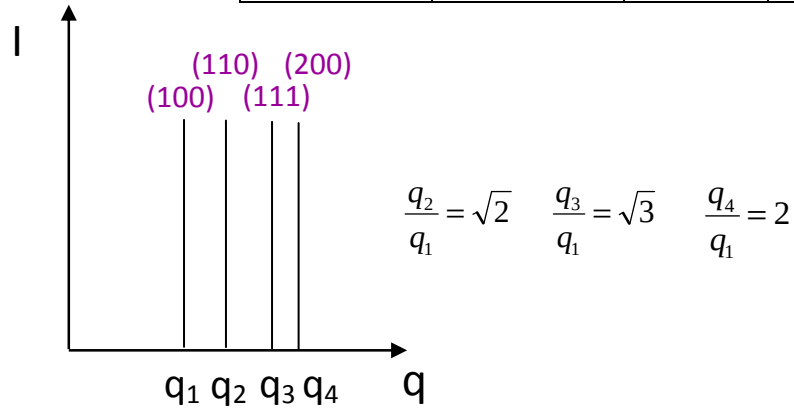


Figure 13: En haut, schéma des groupes d'espace *Ia3d*, *Pn3m* et *Im3m*, et tableau des différentes raies permises avec les ratios respectifs (J. M. Seddon, 2000). En bas, représentation d'un diffractogramme d'une phase *Pn3m*, avec au dessus de chaque pic, les différents plans réticulaires correspondants et ratios des différents q .

c) Phase hexagonale

La distance inter-réticulaire d_{hkl} d'une famille de plans d'indices (hkl) d'un réseau hexagonal (**Figure 14**) a pour expression :

$$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3a^2}(h^2 + k^2 + hk) + \frac{l^2}{c^2}}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3a^2}(h^2 + k^2 + hk)}} \quad \text{en considérant } c \gg l$$

La relation de Bragg est vérifiée pour les vecteurs de diffusion q tels que :

$$q = 2\pi \sqrt{\frac{4}{3a^2}(h^2 + k^2 + hk)}$$

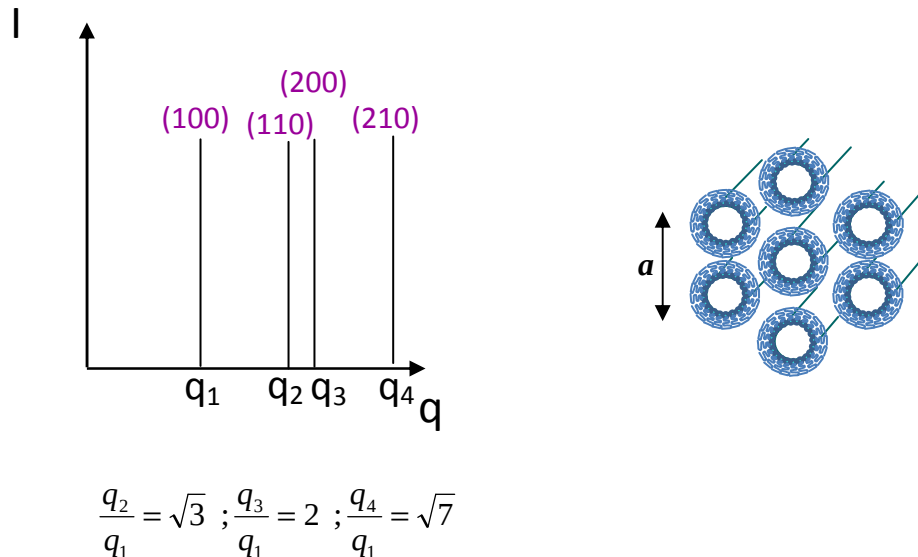


Figure 14: à gauche schéma d'un diffractogramme d'une phase hexagonale, avec les ratios caractéristiques et au dessus de chaque pic les différents plans réticulaires correspondants. A droite, représentation d'une phase hexagonale inverse, assemblage de micelles en tubes remplies de molécules d'eau, avec a le paramètre de la maille.

6) En pratique

Les mesures de diffusion des rayons X aux petits angles ont été faites sur deux lignes synchrotrons : la ligne SWING du synchrotron SOLEIL (Saclay) et la ligne SAXS du synchrotron Elettra (Trieste, Italie) (**Figure 15**).



Figure 15: photo vue du ciel du synchrotron Soleil.

Un synchrotron utilise le rayonnement émis par des particules chargées (des électrons par exemple) lorsqu'elles sont accélérées à une vitesse proche de celle de la lumière (*M. E. Couprie, 2008*).

Lorsqu'un électron est accéléré à une vitesse relativement faible par rapport à celle de la lumière, il émet un rayonnement monochromatique et isotrope. Quand sa vitesse devient

proche de celle de la lumière, le rayonnement émis devient de plus en plus anisotrope et est confiné dans un cône de très petite ouverture dont la direction est tangente à la trajectoire de la particule en mouvement. En outre, ce rayonnement n'est plus monochromatique mais présente une large gamme d'énergie.

Les électrons sont d'abord accélérés dans un accélérateur linéaire (le LINAC), puis ils sont amenés à l'énergie requise dans le booster avant d'être injectés dans l'anneau de stockage. Une fois dans cet anneau, les électrons sont contraints à tourner et sont maintenus à grande vitesse par une série d'éléments électromagnétiques (aimants de courbure...). Les lignes de lumière, disposées tangentielllement à la trajectoire des particules accélérées, récupèrent le rayonnement synchrotron.

Les lignes SAXS disposent d'un système de monochromatisation, de focalisation et de collimation du faisceau (monochromateurs à deux cristaux, miroirs et fentes). L'énergie du rayonnement utilisé était généralement de 8 ou 11 keV. La détection est faite par des détecteurs à localisation à gaz ou par des détecteurs CCD. La distance échantillon-détecteur est ajustée selon le domaine de q désiré. Plusieurs environnements d'échantillons sont disponibles, notamment une cellule DSC.

L'utilisation du rayonnement synchrotron apporte un gain notable par rapport à une source de rayons X « classique » de laboratoire. Le faisceau de petite taille et faiblement divergent permet d'accéder aux très petits angles (et donc à de grandes tailles d'objet). Le faisceau étant pratiquement ponctuel, il ne provoque pas d'élargissement ni de déformation des raies de diffraction. Le flux intense de photons permet d'étudier des échantillons plus dilués, moins diffusants ou de réduire le temps d'acquisition (de l'ordre de quelques ms à quelques s), autorisant l'étude de cinétiques rapides pour des échantillons très diffusants. La possibilité d'ajuster la longueur d'onde permet d'étudier des systèmes fortement absorbants.

Les principales étapes du traitement des données sont :

- la normalisation par rapport au flux incident (intensité du flux incident $\times$ temps de comptage)
- la correction de l'épaisseur de l'échantillon et de sa transmission
- la soustraction de toutes les contributions qui ne sont pas dues à l'échantillon lui-même (diffusion parasite, diffusion du solvant...)

Les suspensions de nanoparticules sont insérées à l'aide de seringues dans des capillaires en quartz de diamètre 1.5 mm (Glas Germany), avec une hauteur finale de liquide dans le capillaire d'environ 3 cm (**Figure 16**). Puis les capillaires sont fermés à l'aide de cire de bougie pour éviter toute évaporation, et conservés à 4°C.

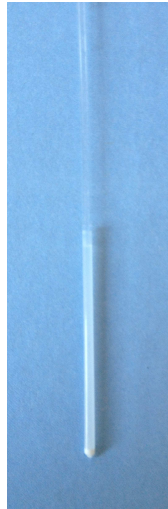


Figure 16 : Exemple de capillaire rempli avec une suspension de nanoparticules

IV-Diffusion dynamique de la lumière

1) Principe (B. J. Berne, 2000)

Des particules en solution sont soumises à l'agitation thermique et possèdent ainsi un mouvement aléatoire appelé mouvement Brownien. Lorsqu'une onde électromagnétique atteint une particule, elle sera diffusée dans toutes les directions (diffusion Rayleigh) et cette intensité diffusée variera en fonction du temps. Une fonction d'autocorrélation est utilisée pour relier la diffusion mesurée au temps t et au temps $t + \Delta$. La fonction aura une équation de la forme:

$$f(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau}}$$

avec A une constante, et τ le temps caractéristique de décroissance.

Ce temps caractéristique est relié au coefficient de diffusion D de la particule par l'expression :

$$\frac{1}{\tau} = Dq^2 \quad \text{avec } q \text{ le vecteur de diffusion.}$$

Une fois le coefficient de diffusion calculé, dans le cas d'une particule sphérique, le diamètre hydrodynamique D_h de la particule sera déduit de la loi de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, qui est contrôlée, et η la viscosité du milieu.

Il peut être noté que si la fonction de corrélation décroît rapidement ($1/\tau$ grand), c'est que le signal varie rapidement, dû au déplacement important des particules de part leur petite taille. Ainsi, le coefficient D prendra des valeurs relativement grandes.

2) En pratique

Le rayon hydrodynamique des nanoparticules a été déterminé à l'aide d'un Nanosizer (nano-ZS90, MALVERN), avec un angle de mesure de 90°. La suspension était diluée au 1/10^e, c'est-à-dire que la concentration de la suspension était environ de 1.10⁻³ mol/L. Pour chaque suspension, 3 mesures ont été effectuées et moyennées.

La valeur du diamètre hydrodynamique est soit pondérée en intensité, en nombre ou en volume. La valeur pondérée en intensité fera ressortir les particules plus grosses car l'intensité diffusée par une sphère est proportionnelle à D_n^6 . Les valeurs pondérées en nombre, dans cette étude, ne pouvaient être prises en compte car l'indice de réfraction des nanoparticules n'est pas connu. Les valeurs pondérées en volume ont donc été considérées comme étant les plus proches de la réalité.

V- Calorimétrie différentielle à balayage

1) Principe (D. Giron, 1995)

Cette technique permet d'analyser les différences d'échange de chaleur entre l'échantillon à analyser et une référence (dans ce cas l'air), lorsque la température varie. Ces différences sont dues à des transitions de phase du système, par exemple la fusion, la cristallisation, ou encore la transition vitreuse dans le cas de polymères.

L'échantillon à analyser et la référence sont placés dans deux fours différents mais dans la même enceinte calorifique, sous atmosphère inerte (diazote). La température varie linéairement, et est maintenue égale entre les deux fours. Lorsqu'une transition se produit, il y a absorption ou dégagement de chaleur (transition endothermique ou exothermique). Un générateur de puissance fournit plus ou moins d'énergie pour maintenir la température constante. La différence d'énergie fournie à l'échantillon et à la référence est alors mesurée. Cette variation d'énergie est enregistrée en fonction du temps (ou de la température) (**Figure 17**).

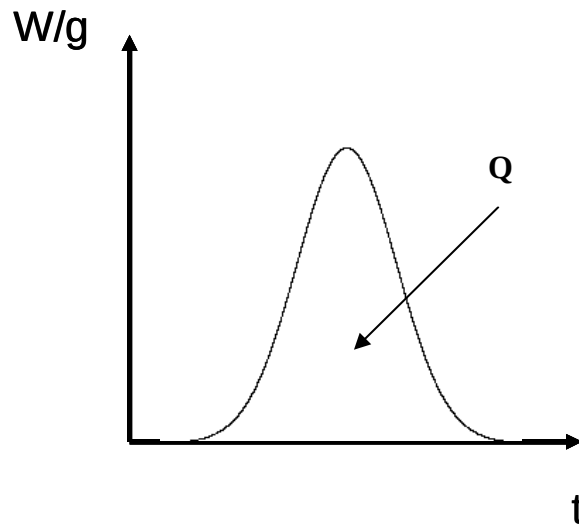


Figure 17 : Thermogramme avec en abscisse le temps de mesure, et en ordonnée la puissance par gramme d'échantillon, représentant une transition de phase endothermique. Q est la quantité de chaleur.

L'aire sous la courbe donnera la quantité de chaleur Q car :

$$E = \int P dt$$

2) En pratique

Quelques gouttes de suspension (entre 10 et 20 mg) sont déposées dans une capsule en aluminium scellée. Pour référence, une capsule vide est placée dans l'enceinte calorifique du DSC-7 Perkin-Elmer. Le programme imposant les variations de température à l'enceinte calorifique est le suivant :

- première rampe de 5°C jusqu'à 60°C avec une vitesse de 5°C/min
- isotherme à 60 °C pendant 2 minutes
- deuxième rampe de 60°C à 5°C avec une vitesse de 5°C/min
- seconde isotherme à 5°C pendant 10 minutes
- une dernière rampe de 5°C à 60°C à une vitesse de 5°C/min

VI- Cryo-MET

1) Principe de la microscopie électronique à transmission (R. F. Egerton, 2005)

Selon la théorie de Abbe, la limite de résolution d d'un microscope est liée à la longueur d'onde par la relation :

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}$$

avec n l'indice de réfraction, λ la longueur d'onde incidente et θ le demi angle du cône de lumière maximum accessible.

En utilisant un microscope optique, la résolution est limitée à la longueur d'onde du visible comprise entre 400 et 800 nm. L'idée d'utiliser un faisceau d'électrons pour pallier ce problème est née au début du XXe siècle. La Microscopie Electronique à Transmission permet ainsi d'obtenir une image d'un échantillon, invisible par un microscope optique, en atteignant un grossissement jusqu'à 5 000 000 fois.

Son principe est le même qu'un microscope optique et l'on considère que les lois de l'optique géométrique sont conservées. Un faisceau d'électrons (produit via un canon à électrons), est envoyé sur la matière, le tout dans le vide pour qu'il n'y ait pas d'interaction avec des molécules autres. Ce rayonnement est diffusé par l'échantillon dans différentes directions. Le rayonnement diffusé est ensuite focalisé à l'aide de lentilles magnétiques. Une lentille magnétique est schématiquement une bobine parcourue par un courant électrique, produisant ainsi un champ magnétique. La focalisation des lentilles peut-être simplement modifiée en changeant l'intensité du courant dans les bobines. Les électrons seront simplement déviés par le champ magnétique sans perdre d'énergie.

Tout ce système de lentilles magnétiques produit alors une image électronique de l'échantillon qui est ensuite transformée en une image optique par un capteur CCD.

2) La cryofixation (K. P. Ryan, 1992)

Pour éviter l'évaporation de l'eau et pour bien conserver les différentes suspensions, l'échantillon est au préalable plongé rapidement dans de l'éthane liquide (-170°C). Il se forme

alors un film de glace vitreuse, contenant les nanoparticules. L'échantillon est ensuite conservé dans l'azote liquide dans ce qu'on appelle le cryotransfert, ou porte-objet, pour ensuite être observé à -170°C .

3) En pratique

Une goutte ($5\text{ }\mu\text{L}$) d'une suspension peu concentrée ($\sim 5\text{ mg/mL}$) est déposée sur une grille à trous en cuivre recouverte de carbone. L'excès de liquide est absorbé à l'aide d'un papier filtre, puis la grille est plongée rapidement dans l'éthane liquide. L'échantillon est ensuite transféré dans le porte-objet avant d'être introduit dans le Cryo-microscope, un JEOL 2100 haut contraste fonctionnant à 200 kV (**Figure 18**). Les images obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Image J.

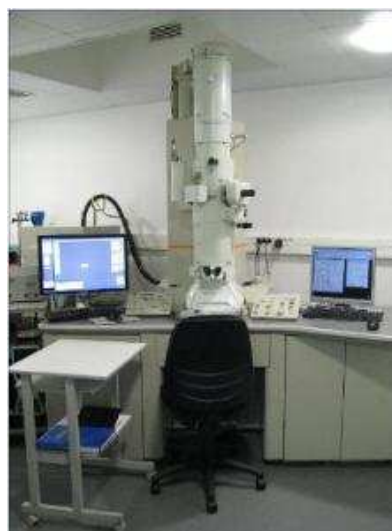


Figure 18 : A gauche, photo du porte objet et à droite photo du microscope utilisé.

VII- Balance de Langmuir

1) Principe

En 1774, à la British Royal Society, Benjamin Franklin raconta qu'il eut l'idée de mettre un peu d'huile, pas plus d'une cuillère à café, sur un grand étang connu pour être relativement exposé au vent. Il remarqua alors que l'huile se propageait rapidement à la surface de l'eau, jusqu'à atteindre l'autre côté de l'étang : un bon quart de l'étang fut alors « lisse comme un miroir » (*M. A. Van Beek, 1842*). Benjamin avait alors créé ce qu'on appelle un film mince, une monocouche à la surface air-eau.

Et justement, le principe de la balance de Langmuir est d'étudier l'organisation de molécules à l'interface notamment de l'air et de l'eau. Une quantité connue de molécules est déposée à la surface de l'eau à une température régulée, formant un film mince. Cette monocouche est alors compressée par deux barrières en Téflon, et la pression de surface sera alors enregistrée au fil de la compression (**Figure 19**) par une lame de Wilhelmy (*N. Wu, 1999*). On obtient donc un enregistrement présentant en abscisse la surface du film par molécule (dimension de la cuve et nombre de molécules déposées connues) (σ) et en ordonnée la pression de surface (Π).

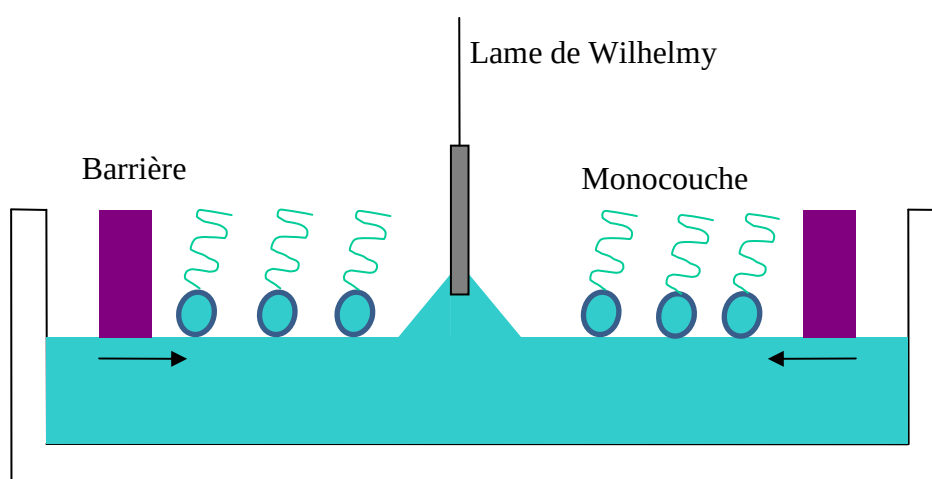


Figure 19 : schéma d'une balance de Langmuir, avec un dépôt de molécules amphiphiles à la surface de l'eau.

A l'échelle moléculaire, au départ, les objets seront relativement espacés, comme dans une phase gazeuse (G). Puis au fil de la compression, les molécules se rapprocheront les unes des autres pour arriver dans un état dit liquide expansé (L_1) puis liquide condensé (L_2). Enfin les molécules seront dans un état totalement organisé dit solide (S) (V. M. Kaganer, 1999). Dans ce dernier état, les molécules sont alors à leur maximum de compression, et l'aire moléculaire minimum peut ainsi être déterminée (**Figure 20**). Si la compression continue, les molécules n'auront d'autres choix que de passer dans la phase liquide : c'est ce qu'on appelle le *collapse*.

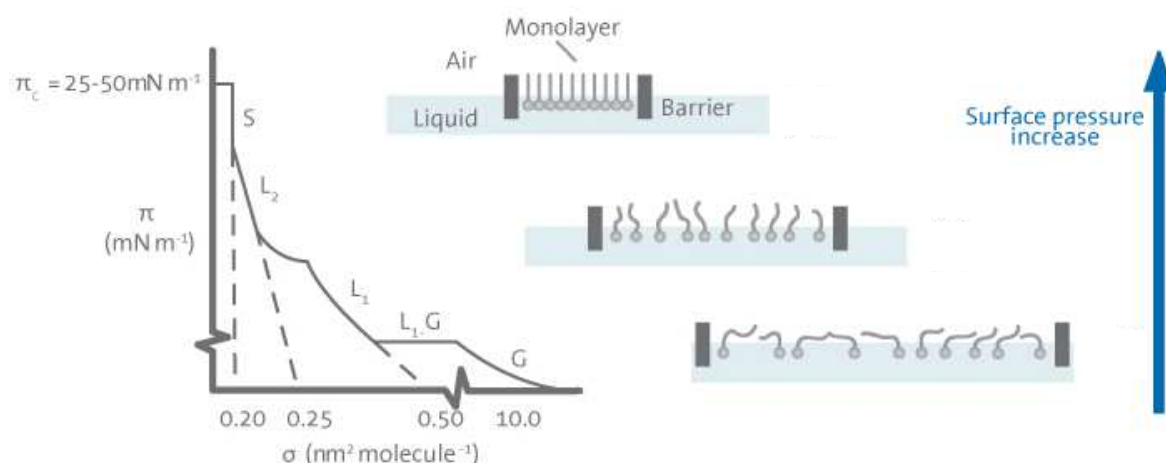


Figure 20 : à gauche schéma d'une isotherme de compression, avec les différentes transitions S (solide), L_2 (liquide condensé), L_1 (liquide expansé) et G (gaz) et à droite schéma des molécules à l'interface pendant la compression.

Le module de compressibilité isotherme K_A pourra ensuite être calculé :

$$K_A = -A \frac{d\Pi}{dA}$$

2) En pratique

Les isothermes de compression sont enregistrées via une balance de Langmuir couplée à un système de Wilhelmy (KSV Nima).

Les différentes molécules amphiphiles étudiées sont mises en solution dans du chloroforme. Une quantité connue de molécules est déposée (**Table 1**) à la surface de l'eau maintenue à 18°C. Après le dépôt, on attend 15 minutes avant le début de la compression pour évaporer les molécules de solvant. Ensuite le film mince est comprimé symétriquement par deux barrières

en Téflon à une vitesse de 10 mm/min. Pour chaque échantillon, trois mesures au minimum sont effectuées.

Molécule	Deoxycytidine-Sq	Deoxycytidine 5'-Sq	DdC-Sq	Gem-Sq	Acide-Sq	Adenosine-Sq
Concentration (molecule/ μ L)	$1,39.10^{15}$	$1,67.10^{15}$	$1,76. 10^{15}$	$1,85. 10^{15}$	$1,63. 10^{15}$	$1,46. 10^{15}$
Volume déposé (μ L)	52	40	50	50	60	60

Molécule	Gem-3-isoprenes	Gem-4-isoprenes	Gem-5-isoprenes	Gem-6-isoprenes	Adenosine-Sq homologué
Concentration (molecule/ μ L)	$1,79.10^{15}$	$1,50.10^{15}$	$1,66.10^{15}$	$1,60.10^{15}$	$1,39.10^{15}$
Volume déposé (μ L)	50	60	60	60	60

Table 1 : valeurs des différentes concentrations et volumes déposés pour les différentes isothermes de compression réalisées au cours de cette thèse.

VIII- Biologie cellulaire

Tous les produits utilisés, sauf si précisé, ont été achetés chez Invitrogen-Life Technologies.

1) Lignées cellulaires étudiées et culture

Au total, 8 lignées cellulaires cancéreuses ont été à l'étude (**Table 2**, **Table 3**). Elles ont été obtenues de l'American Type Culture Collection. Parmi ces lignées, quatre sont des cellules adhérentes, et quatre des cellules suspensives.

Nom de la lignée	MiaPaCa-2	MCF-7	MCF-7 MDR	B16F10
Espèce	Humaine	Humaine	Humaine	Murine
Type de cancer	Tumeur pancréatique	Tumeur mammaire	Tumeur mammaire « Multi Drug Resistance »	Mélanome

Table 2 : Lignées cellulaires adhérentes.

Nom de la lignée	CCRF CEM	CEM/ARAC 8C	L1210	L1210K
Espèce	Humaine	Humaine	Murine	Murine
Type de cancer	Leucémie	Leucémie, déficiency en transporteurs	Leucémie	Leucémie, déficiency en kinase

Table 3 : Lignées cellulaires suspensives.

Le choix de ces lignées a été orienté par les résultats trouvés précédemment avec les nanoparticules de Gemcitabine-Sq : en effet ce composé était actif sur ces différentes cellules (*L. H. Reddy, 2007 ; L. H. Reddy 2009*).

Dans un premier temps, les cellules sont décongelées : elles sont dispersées dans 10 mL de milieu de culture adéquat, puis centrifugées à 1200 tr/min pendant 5 minutes pour enlever le DMSO ajouté lors de la congélation. Le surnageant est ensuite enlevé, puis le culot est redispersé délicatement dans 10 mL de milieu. Ensuite les cellules sont placées dans des

flasques de 250 mL, et mises dans un incubateur à atmosphère humide, à 37°C, avec un taux en CO₂ de 5 %.

En règle générale, les cellules adhérentes sont mises en culture dans du DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium), qui est un milieu tamponné contenant des acides aminés (entre autres du L-Glutamine), des sels minéraux, des vitamines, du glucose et du phénol rouge. Ce milieu est complété par des antibactériens (pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL)) et du sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (chauffé à 56°C pendant 30 minutes), qui apporte des protéines et de nombreux facteurs de croissance nécessaires à la survie et à la multiplication cellulaires. Le sérum est décomplémenté pour lui retirer son activité lytique, due aux différentes protéines plasmatiques, participant chez l'animal à l'immunité innée. Pour la lignée MiaPaCa-2, du sérum de cheval (SH, Gibco) est aussi ajouté pour se placer dans des conditions optimum (**Table 4**).

Nom de la lignée	MiaPaCa-2	MCF-7	MCF-7 MDR	B16F10
Milieu de culture	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Complément	10 % SVF + 2,5 % SH + PN	10 % SVF + PN	10 % SVF + PN	10 % SVF + PN

Table 4 : milieux de culture pour les cellules adhérentes.

De même, les cellules en suspension ont été mises en culture dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), qui est un milieu proche du DMEM mais contenant du glutathion réduit et une diversité plus grande d'acides aminés et de vitamines. De la même manière, du SVF ainsi que des antibiotiques sont ajoutés au milieu (**Table 5**).

Nom de la lignée	CCRF CEM	CEM/ARAC 8C	L1210	L1210K
Milieu de culture	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI
Complément	10 % SVF +PN	10 % SVF + PN	10 % SVF + PN	10 % SVF + PN

Table 5 : milieux de culture pour les cellules en suspension.

En moyenne, tous les deux ou trois jours (à 80 % de confluence), un passage des cellules est effectué. Pour les cellules adhérentes, le milieu est aspiré puis les cellules sont rincées avec du DPBS pour enlever toutes traces de milieu. 1.5 mL de trypsine est ajouté et laissé pendant 5 minutes environ à 37°C, pour décoller les cellules. Ensuite, la trypsine est inactivée en ajoutant 8.5 mL de milieu et 1 mL de cette solution est placé dans une nouvelle flasque contenant à son tour 10 mL de milieu : c'est un passage au $\sim 1/10^e$. Pour les cellules en suspension, il suffit de prélever 1 mL de la solution contenant les cellules, et de l'ajouter à une nouvelle flasque contenant 10 mL de milieu pour avoir une dilution $\sim$ au $1/10^e$.

En moyenne, les expériences ont été réalisées au troisième passage.

2) Test MTT

Le test MTT est un test colorimétrique qui permet de quantifier les cellules vivantes. Le réactif est un sel de tétrazolium, qui est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives (**Figure 21**). Une solution de SDS à 10% avec 10 μ mol de HCl est ensuite utilisée pour détruire les membranes cellulaires et libérer le précipité de couleur violette. Ensuite, une simple mesure de la densité optique à 570 nm permet de quantifier les cellules vivantes.

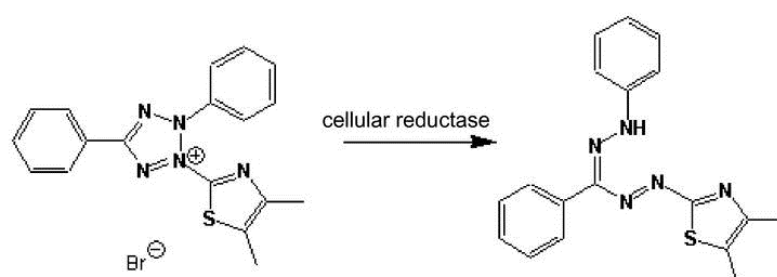


Figure 21 : Schéma réactionnel de la réduction du sel de tétrazolium en formazan.

12 suspensions de nanoparticules : Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes ainsi que les 6 acides isopréniques correspondants ont été testées sur 7 lignées cellulaires : MiaPaCa-2, MCF-7, MCF-7 MDR, CCRF CEM, CEM/ARAC 8C, L1210 et L1210K.

En pratique, le test est réalisé en sextuplicate avec des plaques 96 puits. Un nombre relativement grand de cellules est déposé dans chaque puits (3000 cellules dans 180 μ L de milieu par puits pour les cellules adhérentes et 10 000 cellules dans 90 μ L de milieu par puits pour les cellules suspensives). Pour dénombrer les cellules suspensives vivantes, il est nécessaire d'utiliser du bleu de trypan (colore en bleu exclusivement les cellules mortes qui ne possède plus de mécanisme « d'expulsion » et qui possède une membrane fragilisée). Dans le cas des cellules adhérentes, les cellules mortes sont en suspension, il est donc facile de s'en débarrasser, en aspirant le milieu.

Ensuite, dans le cas des cellules adhérentes, la plaque est placée 24 heures à l'incubateur. Puis, après changement de milieu, 20 μ L de drogue sont incubés pendant 72 heures à des concentrations variables : voir la **Figure 22**. Pour les cellules en suspension, 10 μ L de drogue sont de suite incubés, aux mêmes concentrations que précédemment.

Blanc	0 nM	5 nM	13 nM	33 nM	82 nM	200 nM	512 nM	1280 nM	3200 nM	8000 nM	20000 nM

100% cellules vivantes

Figure 22 : Schéma d'une plaque 96 puits utilisée pour réaliser le test MTT. Les cases en bleues correspondent aux puits contenant les cellules incubées avec la drogue aux concentrations finales indiquées en haut de chaque colonne (une dilution d'un facteur 2.5 de droite à gauche). Les lignes vertes correspondent aux puits où aucune nanoparticule n'a été ajoutée. La colonne correspondant à 0 nM de principe actif sera ainsi le « 100% de cellules vivantes ». Enfin la colonne en violet sera « le blanc » : comporte uniquement du milieu de culture.

Après 72 heures, le milieu est aspiré, les cellules sont incubées à 37°C pendant 2-3 heures en présence de 100 μ L d'une solution de MTT (Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Quentin Fallavier, France) à 0.5 mg/mL (dans le DPBS) et enfin, 100 μ L d'une solution de SDS à 10 % sont ajoutés dans chaque puits. L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Metertech 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France), en soustrayant l'absorbance du blanc.

Après avoir calculé toutes les moyennes des absorbances pour les différentes concentrations en drogue, le pourcentage de cellules vivantes sera simplement obtenu en se rapportant à

l'absorbance des puits où aucune drogue n'a été incubée, c'est-à-dire au « 100 % de cellules vivantes ». En traçant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en nanoparticules, il est alors aisé de trouver la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) : **Figure 23.**

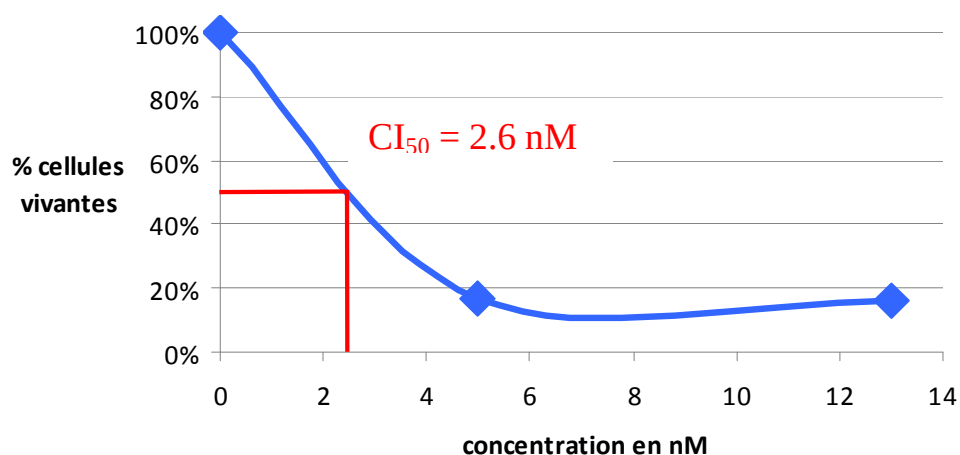


Figure 23 : Pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en drogue. En rouge, le tracé pour déterminer à 50 % de cellules vivantes, la concentration correspondante : la CI_{50} .

3) Cytométrie en flux

a) Principe (*BD Biosciences, 2000*)

La cytométrie en flux permet de mesurer et même d'analyser de multiples caractéristiques physiques de particules uniques, souvent des cellules, circulant dans un flux de fluide, et interceptant la trajectoire d'un faisceau laser (**Figure 24**).

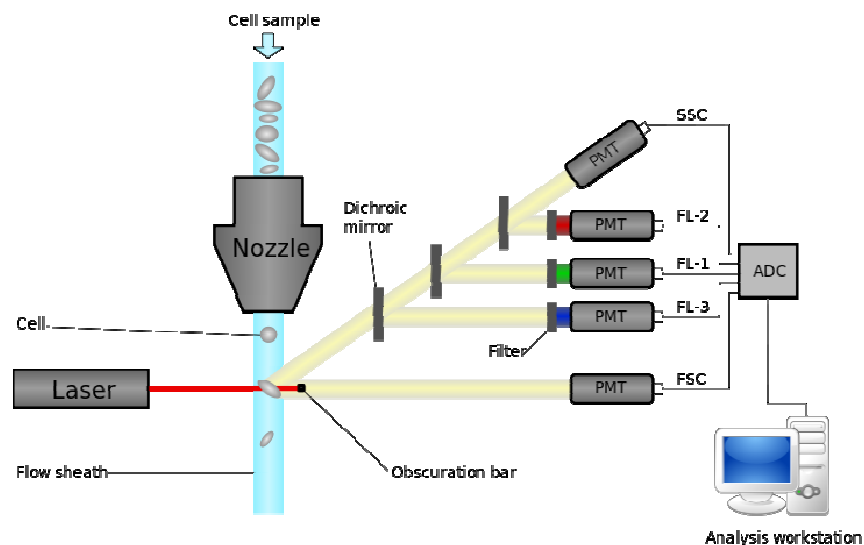


Figure 24 : Schéma d'un cytomètre en flux avec en bleu le flux de cellules, le laser, et les différents détecteurs.

L'appareil est donc constitué de trois parties :

- un système fluide transportant les cellules vers le laser.
- un système optique constitué du laser et de différents détecteurs. Le signal FSC (Forward Scatter) sera détecté dans la direction du faisceau incident tandis que le signal SSC (Side Scatter) sera collecté dans une direction perpendiculaire à celle du faisceau incident. Ces deux signaux ne donneront pas les mêmes renseignements : le signal FSC est proportionnel à la taille de la cellule tandis que le signal SCC provient d'un changement d'indice de réfraction du milieu cellulaire, il donne donc des renseignements sur la granulosité ou encore sur la complexité interne de la cellule (**Figure 25**).

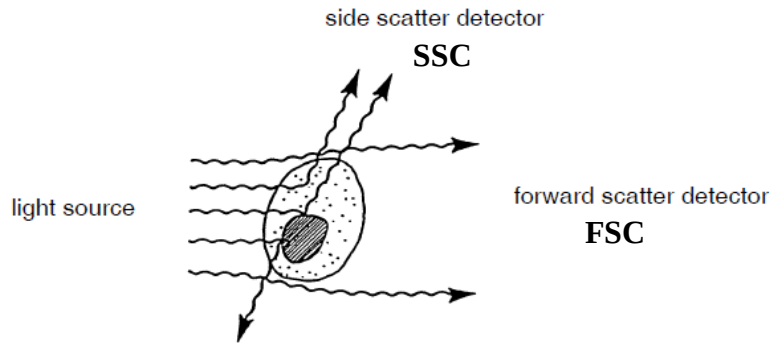


Figure 25 : schéma représentant la diffusion d'une onde électromagnétique à travers une cellule, avec les deux types d'ondes diffusées détectées : « side scatter » (SSC) et « forward scatter » FSC.

Ainsi, le fait de corréler le signal SSC au signal FSC permet de distinguer les différents objets présents, comme par exemple de différencier les cellules vivantes de celles qui sont mortes (**Figure 26**).

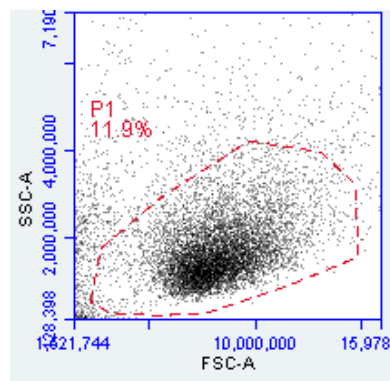


Figure 26 : Schéma représentant le signal SCC en fonction du signal FSC, avec en rouge le tracé du « gate » P1 correspondant aux cellules vivantes.

Le cytomètre en flux possède aussi un système de filtres optiques, FL-1 (533 ± 30 nm), FL-2 (585/40 nm), FL-3 (>670 nm) et FL-4 (675/25 nm) qui permet de collecter le signal issu de l'émission de fluorescence lors de l'excitation par le laser d'un marqueur fluorescent : le filtre sera choisi en fonction du marqueur fluorescent utilisé.

- Enfin, le signal optique est transformé en un signal électronique pour ensuite être analysé.

b) La sonde fluorescente utilisée

Le marqueur fluorescent utilisé est le Cholesterol BODIPY® FL C₁₂ (CholBodiPy) : **Figure 27**.

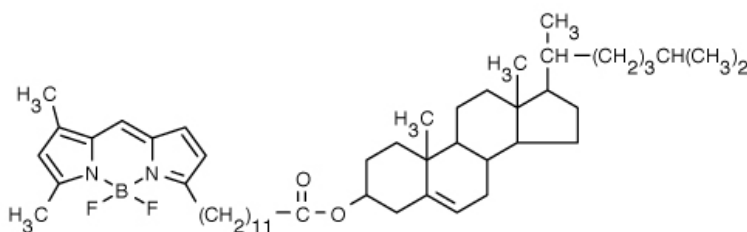


Figure 27 : Formule chimique du marqueur fluorescent utilisé, CholBodiPy.

C'est un analogue du cholestérol qui a donc la propriété de pouvoir s'insérer dans les membranes cellulaires et donc aussi dans les nanoparticules utilisées.

Lorsqu'il est excité à une longueur d'onde comprise entre 480 et 500 nm, il y aura émission de fluorescence autour de 520 nm, dans le vert. Ce fluorophore a un comportement qui dépend de la concentration locale : en effet il a été montré que dans des vésicules lipidiques, lorsque le pourcentage molaire en sonde augmentait, l'émission dans le vert diminuait, mais par contre une émission dans le rouge apparaissait (**Figure 28**) (R. E. Pagano, 1991). Ce phénomène serait dû à la formation d'excimères qui auraient une longueur d'onde d'émission de fluorescence différente de la sonde seule (G. M. Makrigiorgos, 1997 ; Y. Ohsaki, 2010 ; N. Saki, 2005).

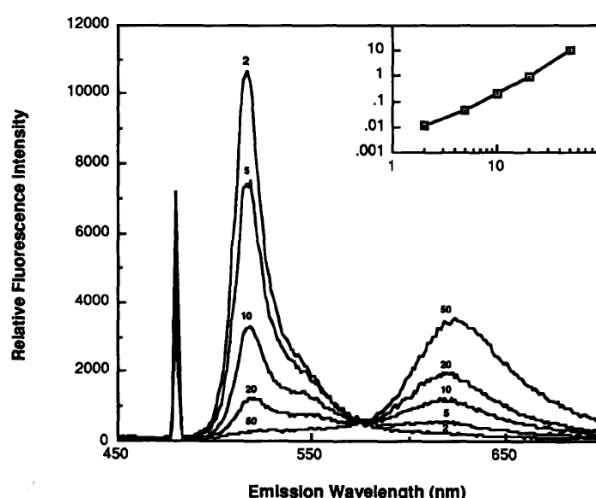


Figure 28 : Spectre d'émission (excitation à 480 nm) de vésicules lipidiques chargées à différents ratio molaires en Cholesterol BODIPY® FL C₁₂ (2%, 5%, 10%, 20 % et 50 %). La concentration en lipide était de 31 µM.

Plus exactement, deux conformations de dimères sembleraient coexister dans un système lipidique, D_I (forme sandwich) et D_{II} , cette dernière conformation étant responsable d'une fluorescence d'émission dans le rouge (**Figure 29**) : le spectre d'émission du monomère et d'absorption de ce dimère D_{II} se chevauchant. La conformation D_I quant à elle ne présente aucune intensité d'émission de fluorescence, seulement un pic d'absorption à 477 nm, avec un rayon de Förster estimé à $57 \pm 2 \text{ \AA}$ (*F. Bergström, 2001*).

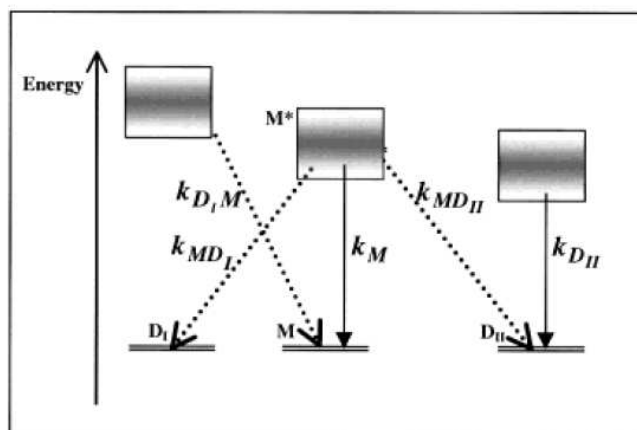


Figure 29 : Schéma représentant les différents chemins de relaxation possibles du monomère (M), et des dimères D_I et D_{II} (*F. Bergström, 2001*).

c) Spectroscopie de fluorescence

Pour vérifier la fluorescence des différentes suspensions étudiées, le spectre d'émission (entre 490 et 600 nm) a été réalisé sur le spectrofluorimètre Perkin Elmer LS 50B, avec une longueur d'onde d'excitation de 480 nm. Les suspensions (0.5 mg/mL) étaient placées dans des cuves en quartz (PerkinElmer, 10×2 mm) après dilution au 7/3 pour ne pas saturer l'appareil.

d) En pratique

0.5% de CholBodiPy (solution à 1 mg/mL dans un mélange éthanol/acétone 1 :1) est ajouté dans la phase organique lors de la nanopréciipitation de la Gem-Sq et de la Gem-5-isoprènes. Les suspensions ont pour concentration finale 0.5 mg/mL.

Les lignées B16F10 et MiaPaCa-2 sont mises en culture dans des plaques 12 puits : 100 000 cellules par puits, dans 1 mL de milieu pendant 24 heures. Après avoir changé le milieu, soit en remettant du milieu initial, soit du milieu sans SVF, les cellules sont incubées avec la suspension (concentration finale de 10 $\mu\text{mol/L}$) pendant 30 minutes, 1 heure, 4 heures, 8

heures, 24 heures et 48 heures. Les cellules sont ensuite lavées dans du DPBS puis décollées au temps voulu avec 300 μ L de trypsine dans chaque puits (pendant 5 minutes). Chaque échantillon est ensuite analysé en triplicate à l'aide d'un cytomètre en flux (BD Accuri C6, Ann Arbor, MI) en utilisant le logiciel BD Accuri CFlow Plus. La zone correspondant aux cellules vivantes, le « gate », a d'abord été estimée, et la mesure s'arrêtait au bout de 10000 cellules dans cette zone (**Figure 30**). La vitesse du flux était de 35 μ L/min, le laser utilisé possédait une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et le filtre de détection était à 533 nm (FL1-A).

Une autre série d'expériences a été réalisée en plaçant les plaques à 4°C après incubation avec la drogue, pour voir une possible influence sur l'internalisation.

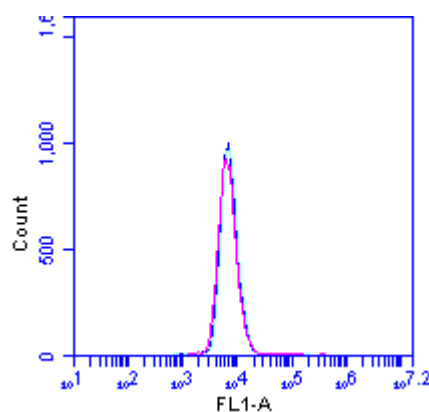


Figure 30 : superposition des trois mesures représentant la fluorescence pour 10 000 événements enregistrés dans le gate P1 par le cytomètre.

4) Microscopie confocale à balayage laser

a) Principe (P. A Bryon, 1995)

En microscopie optique conventionnelle, tous les points de l'objet dans le champ examiné sont éclairés et contribuent à la formation de l'image, même s'ils sont situés hors du plan focal de l'objectif, d'où une perte de résolution d'autant plus importante que l'objet observé est épais. En 1957, Marvin Minsky a proposé de diminuer la lumière parasite en utilisant des diaphragmes (pinhole), limitant alors à un même spot ponctuel dans le plan focal l'illumination et la formation de l'image. Le principe de base de la microscopie confocale est ainsi une coïncidence point par point de l'illumination et de l'obtention de l'image avec élimination des points situés hors du plan focal (**Figure 31**). La correspondance entre le point illuminé et le point utilisé pour l'image nécessite le même système optique pour l'illumination et la formation de l'image, ce qui limite l'emploi du système confocal à la microscopie d'épifluorescence.

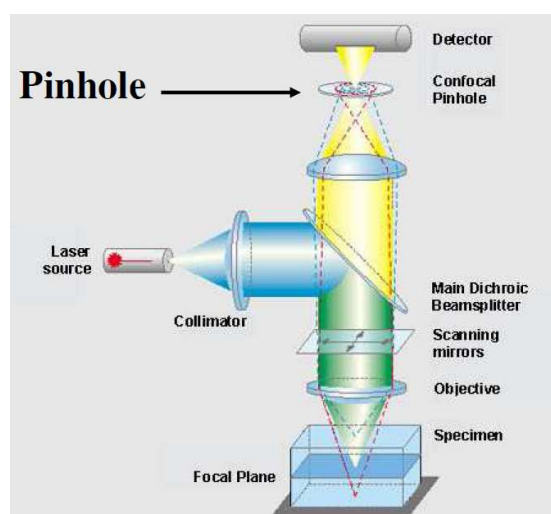


Figure 31 : schéma d'un microscope confocale à balayage laser

b) En pratique

Les cellules MiaPaca-2 et B16F10 sont mises en culture sur des lamelles en verre de 16 mm de diamètre placées dans des plaques à 6 puits (100 000 cellules par puits). De la même manière que pour la cytométrie en flux, les deux suspensions fluorescentes de Gem-Sq et de

Gem-5-isoprènes sont incubées pendant 1h, 4h et 8h, à la concentration de 0.5 mg/mL. Les cellules sont ensuite rincées avec du DPBS, et fixées sur les lamelles en verre avec du PFA (paraformaldéhyde) à 3% pendant 20 minutes : cette étape crée des ponts méthylène entre les protéines (*John A. Kiernan, 2000*). Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du NH_4Cl (50 mM), puis deux fois avec du DPBS. Les lamelles de verres sont récupérées et montées sur des lames avec une goutte d'une solution Fluoro-Prep. Les lames sont ensuite observées sur le microscope LSM510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany) en utilisant un objectif à immersion dans l'huile 63× (Plan-Apochromat). La longueur d'onde d'excitation du laser argon est de 488 nm (30 mW), et la fluorescence a été détectée à l'aide d'un filtre passe bande entre 505-530 nm pour limiter l'autofluorescence naturelle des cellules.

Références:

- F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hägglöf, R. Wortmann, T. Ny, L. B.-Å. Johansson, Dimers of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) with Light Spectroscopic Applications in Chemistry and Biology, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2), 196-204, (2002).
- B. J. Berne, R. Pecora, Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics, Dover Edition, (2000).
- BD Biosciences, Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, *Manual Part Number: 11-11032-01*, (2000).
- P. A Bryon, R. Delorme, C. Souchier, La microscopie à balayage laser et ses applications hématologiques, *Revue française des laboratoires*, **275**, (1995).
- J. Caron, E. Lepeltier, L.H. Reddy, S. Lepêtre-Mouelhi, S. Wack, C. Bourgaux, P. Couvreur, D. Desmaële, Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation, *European Journal of Organic Chemistry*, **14**, 2615-2628, (2011).
- M. E. Couprie, J. M. Filhol, X radiation sources based on accelerators, *C. R. Physique*, **9**, 487-506, (2008).
- R. F. Egerton, Physical Principles of Electron Microscopy an introduction to TEM, SEM and AEM. Springer Edition, (2005).
- B. Ewald, D. Sampath, W. Plunkett, Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death, *Oncogene*, **27** (50), 6522-6537, (2008).
- D. Giron, Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates, *Thermochimica Acta*, **248**, 1-59, (1995).
- J. L. Hodeau, R. Guinebretière, Crystallography: past and present, *Appl. Phys. A*, **89**, 813-823 (2007).
- M. J. Hoffmann, W. A. Schulz, Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer, *Biochemistry and Cell Biology*, **83** (3), 296-321, (2005).
- E. Jabbour, J. P. Issa, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, Evolution of decitabine development - Accomplishments, ongoing investigations, and future strategies, *Cancer*, **112** (11), 2341-2351, (2008).
- V. M. Kaganer, H. Mohwald, P. Dutta, Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Rev. Mod. Phys.*, **71** (3), (1999).
- H. Karmouty-Quintana, Y. Xia, M. R. Blackburn, Adenosine signaling during acute and chronic disease states, *J Mol Med*, **91**, 173-181, (2013).

J. A. Kiernan, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do, *Microscopy Today*, 2000-1:8-12, (2000).

G. M. Makrigiorgos, Detection of lipid peroxidation on erythrocytes using the excimer forming property of a lipophilic BODIPY fluorescent dye, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **35**, 23–35, (1997).

E. Mukherji, J. L. Au, L. E. Mathes, Differential Antiviral Activities and Intracellular Metabolism of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine and 2',3'-Dideoxyinosine in Human Cells *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38** (7), 1573-1579, (1994).

S. Noble, K. L. Goa, Gemcitabine - A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer, *Drugs*, **54** (3), 447-472, (1997).

T. Obata, Adenosine production and its interaction with protection of ischemic and reperfusion injury of the myocardium, *Life Sciences*, **71**, 2083-2103, (2002).

Y. Ohsaki, Y. Shinohara, M. Suzuki, T. Fujimoto, A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for Fluorescence microscopy, *Histochem Cell Biol*, **133**, 477–480, (2010).

R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang, R. P. Haugland, A Novel Fluorescent Ceramide Analogue for Studying Membrane Traffic in Animal Cells: Accumulation at the Golgi Apparatus Results in Altered Spectral Properties of the Sphingolipid Precursor, *The Journal of Cell Biology*, **113** (6), 1267-1279, (1991).

L. H. Reddy, C. Dubernet, S. Lepetre Mouelhi, P. E. Marque, D. Desmaële, P. Couvreur, A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types, *Journal of Controlled Release*, **124** (1-2), 20-27, (2007).

L. H. Reddy, J. M. Renoir, V. Marsaud, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel on Experimental Tumor, *ACS*, (2009).

K. P Ryan, Cryofixation of tissues for Electron-Microscopy- A review of plunge cooling methods, *Scanning Microscopy*, **6** (3), 715-743, (1992).

N. Saki, T. Dincb, E. U. Akkaya, Excimer emission and energy transfer in cofacial boradiazaindacene (BODIPY) dimers built on a xanthene scaffold, *Tetrahedron*, **62**, 2721–2725, (2006).

J. M. Seddon, Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1031** (1), 1-69, (1990).

J. M. Seddon, J. Robins, T. Gulik-Krzywicki, H. Delacroix, Inverse micellar phases of phospholipids and glycolipids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**, 4485-4492, (2000).

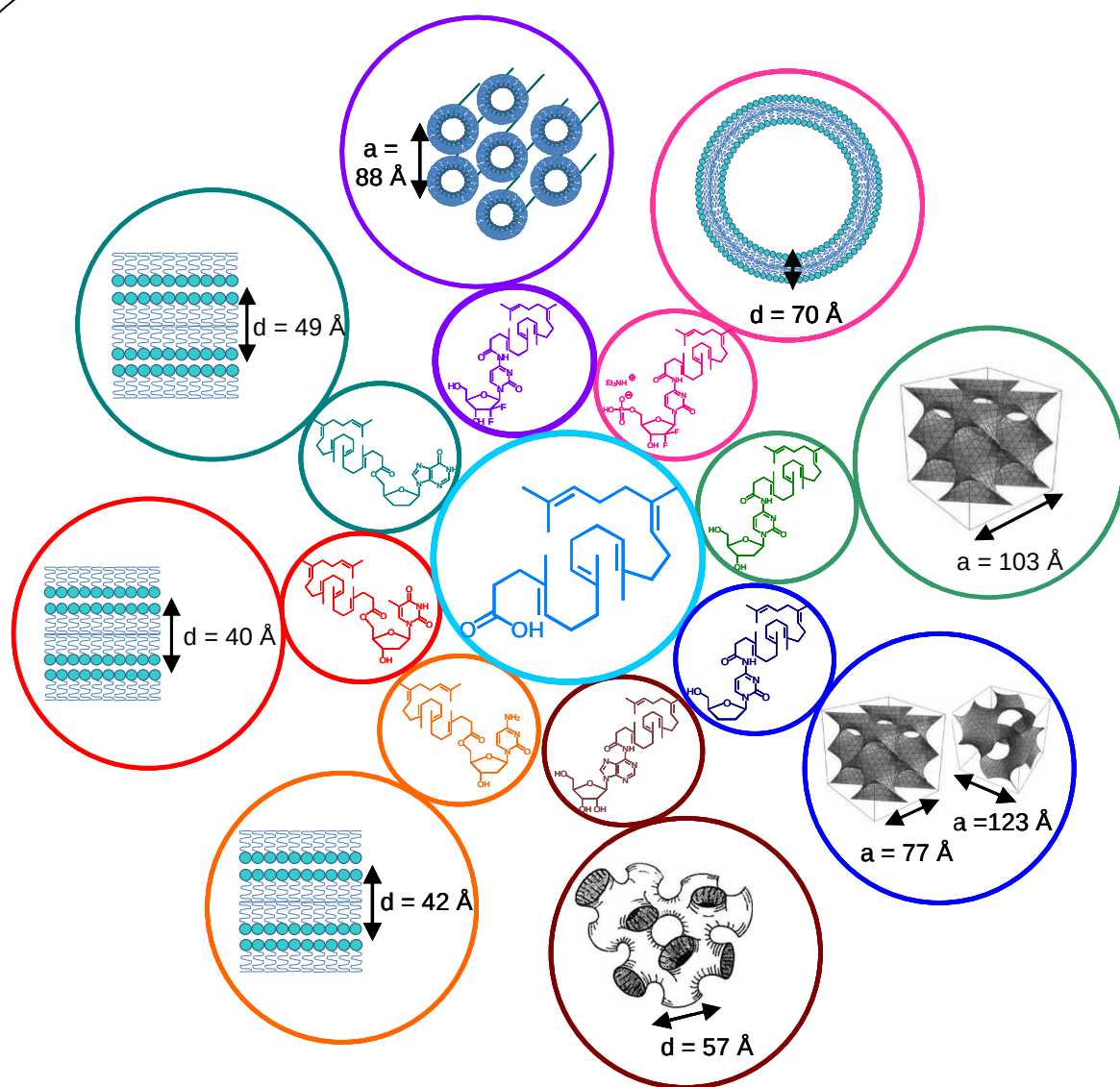
M. A Van Beek, Mémoire sur la propriété des huiles de calmer les flots, et de rendre la surface de l'eau parfaitement transparente, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, **2**, 46-52, (1842).

N. A. Van Draanen, M. Tisdale, N. R. Parry, R. Jansen, R. E. Dornsife, J. V. Tuttle, D. R. Averett, G. W. Koszalka, Influence of Stereochemistry on Antiviral Activities and Resistance Profiles of Dideoxycytidine Nucleosides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**(4) 868-871, (1994).

N. Wu, J. Dai, F. J. Micale, Dynamic Surface Tension Measurement with a Dynamic Wilhelmy Plate Technique, *Journal of Colloid and Interface Science*, **215**, 258–269, (1999).

Chapitre III

Influence de la tête polaire sur la structure supramoléculaire de nanoparticules squalénées



I- Résumé

Dans les études précédentes, les structures supramoléculaires respectives des nanoparticules de Gem-Sq ainsi que de didéoxycytididine-Sq (ddC-Sq) avaient été déterminées et il se trouve que ces molécules (prodrogues) ne s'organisaient pas de la même manière : une phase hexagonale inverse et un mélange de deux phases cubiques (*Pn3m* et *Ia3d*) respectivement. Pourtant ces molécules ont relativement peu de différences : **Figure 1**.

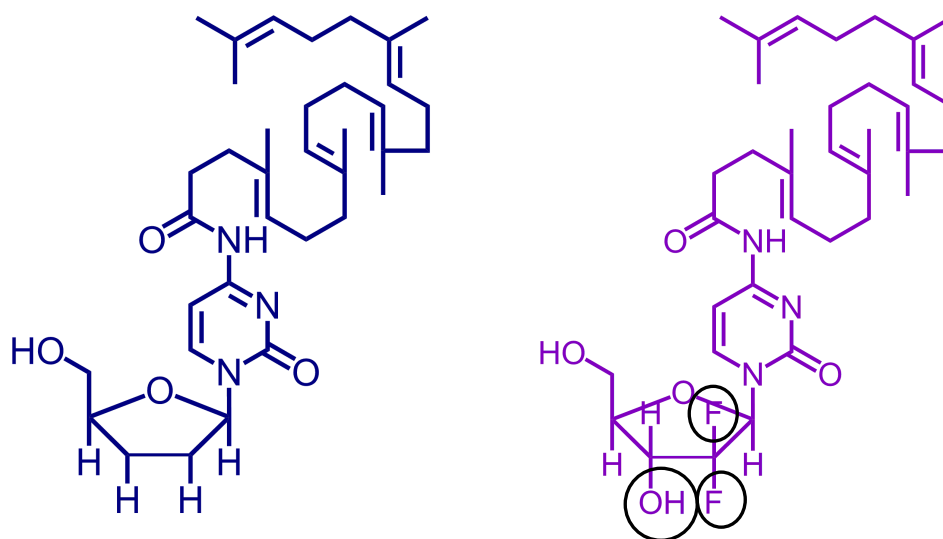


Figure 1 : molécules de ddC-Sq à gauche et de Gem-Sq à droite : les différences entre ces deux molécules amphiphiles sont entourées en noir.

Pour tenter de rationaliser ces auto-assemblages, l'étude de la structure supramoléculaire de plusieurs nucléosides ou analogues nucléosidiques couplés au squalène a été effectuée : adénosine, déoxycytidine, thymidine, didéoxyinosine, gemcitabine monophosphate. Le comportement en deux dimensions de chacun de ces amphiphiles à l'interface air-eau a aussi été étudié, pour évaluer l'aire moléculaire.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de la position du squalène sur la structure supramoléculaire des nanoparticules. De la modélisation moléculaire a été effectuée sur l'un des composés pour affiner l'analyse.

Enfin, dans le complément d'étude de ce chapitre, nous avons regardé l'influence de la température sur la structure de certaines de ces nanoparticules.

II-Self-assembly of squalene-based nucleolipids: relating the chemical structure of the bioconjugates to the architecture of the nanoparticles.

Elise Lepeltier[†], Claudie Bourgaux^{*,†}, Véronique Rosilio[†], Jacques H. Poupaert[‡], Florian Meneau[§], Fatima Zouhiri[†], Sinda Lepêtre-Mouelhi[†], Didier Desmaële[†], Patrick Couvreur[†].

[†]Univ. Paris-Sud XI, Faculté de Pharmacie, UMR CNRS 8612-Institut Galien Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[‡]Unité de Chimie Pharmaceutique et Radiopharmacie, Univ. Catholique de Louvain, 1200 Bruxelles, Belgium

[§] Synchrotron SOLEIL, l'Orme des Merisiers, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Keywords: nucleolipids, squalenoylation, nanoprecipitation, 2D- and 3D- self-assembly, supramolecular structure.

Abstract

Squalene-based nucleolipids, including anticancer or antiviral prodrugs, gave rise to nanoparticles displaying a diversity of structures upon nanoprecipitation in water. Synchrotron small-angle X-ray scattering and cryo-TEM imaging revealed that both the nature of the nucleoside and the position of the squalene moiety relative to the nucleobase determined the self-assembly of the corresponding bioconjugates. It was found that tiny chemical differences resulted in major differences in the self-organization of nucleolipids when squalene was grafted onto the nucleobase whereas only lamellar phases were observed when squalene was linked to the sugar moiety. The key role of hydrogen bonds between nucleobases in the formation of the lamellar phases was suggested, in agreement with molecular simulations. These findings open a way towards a fine tuning of the supramolecular organization of squalene-based prodrugs, with the aim of improving their pharmacological activity.

1) Introduction

The therapeutic activity of drug molecules is often impaired by their physico-chemical properties and toxic side effects. Two main approaches have therefore been developed to enhance the efficacy of existing therapeutic compounds and to improve their delivery to the

target cells or tissues. One of them, the prodrug strategy, consists of the chemical linkage of the active drug to a moiety that will be cleaved at the target site to trigger the release of the active compound.^{1,2} The second strategy is the design of colloidal systems loaded with the drug molecules.^{3,4,5} These approaches may overcome poor drug solubility and/or stability, improve drug bioavailability by enhancing absorption, control the drug release and achieve the specific delivery or activation of the drug molecules at the target site, thus increasing the drug therapeutic index.

We have conceived a new strategy which combines these two approaches.⁶ The so-called “squalenoylation” technology consists of the bioconjugation of squalene, a natural lipid precursor in the biosynthesis of sterols, to anticancer (such as gemcitabine) or antiviral (such as dideoxycytidine, ddC) nucleoside analogues. The resulting amphiphilic nucleolipids spontaneously self-assembled as nanoparticles in water, without the need for any other carrier material. Remarkably, these bioconjugates exhibited better pharmacological activity than the parent drugs.^{7,8,9}

It should be noted that the driving forces for self-assembly of such amphiphiles in an aqueous medium are the hydrophobic forces but that various structures can be formed as a result of the balance between hydrophobic forces and polar head interactions. Nucleosides or nucleoside analogues can interact through π - π stacking and hydrogen bonding.¹⁰ Therefore, nucleolipid supramolecular assemblies result from complex cooperative effects of multiple weak interactions between a large number of components. Subtle differences between nucleolipids may be amplified in supramolecular assemblies. Consequently, small changes of the nucleolipid molecular structure may lead to different aggregate organizations.^{11,12} The supramolecular organization of these prodrug nanoassemblies is expected to be a key parameter which can dramatically influence their pharmacological activity. Indeed, their size, shape, surface properties and structure as well as the stability in aqueous medium of both the nanoparticles and their individual prodrugs may dramatically affect their ability to diffuse into tissues and to be internalized within cells.^{13,14,15} For example, nanoassemblies with inner aqueous channels may ensure a better accessibility of water and activation enzymes to amphiphilic prodrugs and the drug release profile may also depend on the channel size and tortuosity.¹⁶ Additionally, nanoassemblies displaying inverse cubic or hexagonal structures are considered cell membrane fusogenic nanocarriers^{17,18} since they have been suggested to promote the spontaneous formation of transient pores in membranes upon interaction with cells. This disruption of the bilayer structure is thought to be an intermediate in the

mechanism of membrane fusion. It is obvious that all of these factors will dramatically affect the biological activity of the nanoparticles.

There is, therefore, an urgent need to clarify and better understand the parameters which determine the supramolecular structure of these squalene-based nucleolipid nanoassemblies. With this aim, we have covalently coupled squalene to either the nucleobase or the sugar moiety of a library of nucleosides or nucleoside analogues. Briefly, the nucleoside analogues were condensed with 1,1',2-trisnorsqualenic acid (squalenic acid) either on the 5'-OH group or onto the heterocyclic base (see Supporting Information). The chemical structures of the different squalene conjugates are drawn in **Figure 1**. Remarkably, all the synthesized bioconjugates self-assembled into nanoparticles upon nanoprecipitation in water. It has been found that both the nature of the nucleoside and the position of squalene relative to the nucleobase influenced the structure of the nanoassemblies in a complex manner which is discussed in the present article.

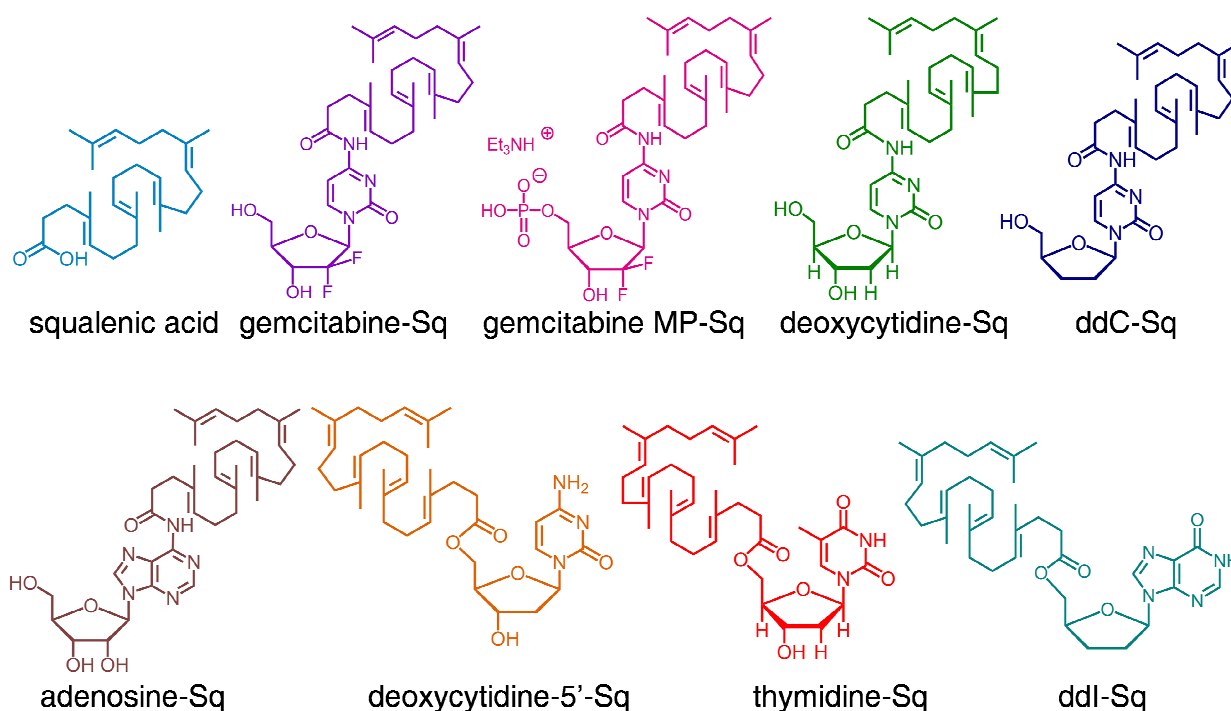


Figure 1. Chemical structures of squalenic acid and squalene-based nucleolipids. Squalene was grafted either on the nucleobase or on the 5' position of the sugar moiety.

2) Experimental Section

Preparation of nanoparticles: The nanoassemblies were prepared by nanoprecipitation. Briefly, compounds were dissolved in ethanol ($<10 \text{ mg mL}^{-1}$). This solution was added dropwise under stirring (500 rpm) into water. The volume ratio between the aqueous and organic phases was of 2 (3 for adenosine-Sq nanoparticles). Formation of the nanoassemblies occurred spontaneously. Ethanol was evaporated using a Rotavapor instrument to obtain an aqueous suspension of nanoparticles.

Langmuir film balance. A computer-controlled Langmuir trough coupled to a Wilhelmy plate device (KSV Nima, Finland) was used to record compression isotherms of squalene-based nucleolipid monolayers. Nucleolipids were spread from chloroform solutions onto pure water (775.75 cm^2) maintained at 18°C . After deposition of a solution the solvent was allowed to evaporate for 15 min before the beginning of the compression. Two Teflon barriers compressed the monolayer symmetrically at the same rate (10 mm min^{-1}) from opposite sides of the trough. The reported π -A values are mean values of three measurements. The value of monolayer isothermal compressibility modulus K_A at a given surface pressure π was deduced from the π -A relationship: $K_A = -A d\pi/dA$.

Quasi-elastic light scattering (QELS). The hydrodynamic diameter of the nanoparticles was determined at 20°C by QELS at a scattering angle of 90° , using a Nanosizer apparatus (nano-ZS90, MALVERN). The hydrodynamic diameter, d , was deduced from the mean translational diffusion coefficient, D , of the particles according to the Stokes-Einstein law for spherical particles in the absence of interactions: $d = k_B T / 3\pi\eta D$, where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature and η the viscosity of water. The measurements were performed on suspensions at a concentration lower than $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. The MALVERN nanosizer software yielded intensity-weighted size distribution. Three measurements on the same sample were averaged.

Small-angle X-ray scattering. Suspensions of nanoparticles were loaded into quartz capillaries (diameter 1.5 mm, Glas Müller, Berlin, Germany). The top of the capillaries was sealed by a drop of paraffin to prevent water evaporation. X-ray scattering experiments were performed on the Austrian synchrotron beamline at ELETTRA and on the SWING beamline

at SOLEIL. The scattered intensity was reported as a function of the scattering vector $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ the wavelength of the incident beam. For both instruments the calibration of the q range was carried out with silver behenate. The Austrian SAXS beamline was operated at 8 keV. SAXS patterns were recorded using a position sensitive linear gas detector, argon-ethane filled, with sample-detector distance of 1 m. Exposure times were typically 300 s. On SWING beamline operated at 11 keV the data were collected by a two-dimensional CCD detector. Exposure times were typically 10 s. Intensity values were normalized to account for beam intensity, acquisition time and sample transmission. Each powder-like diffraction pattern, displaying a series of concentric rings, was then integrated circularly to yield the intensity as a function of q . The scattered intensity from a capillary filled with water was subtracted from the sample scattering curves.

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM). The Cryo-TEM investigations were performed with a Cryo-TEM (JEOL 2100) electron microscope, at the “Service de Microscopie Electronique de l’Institut de Biologie Intégrative” (IFR 83 CNRS, Paris). A drop (4 μ L) of the (2 mg mL⁻¹) sample was deposited on a carbon-coated copper grid. Excess liquid was removed with a blotting filter paper and the sample was quickly vitrified by plunging it into liquid ethane, using a guillotine-like frame. The sample was then transferred to a cryo-sample holder. Observations were made at an accelerating voltage of 200 kV under low electron dose. Analysis was performed with the ImageJ software.

Molecular modeling. An initial 3D structure of the title compound was generated from a 2D chemical drawing created from Chem3D sketch using Chem3D (both softwares were from CambridgeSoft Corporation). From this 3D model, a thoroughly energy-minimized model was obtained after a short molecular dynamics trajectory of 10 psec under AM1¹⁹ (semi-empirical quantum mechanics Austin 1 algorithm) by steps of 1 fsec at 300K, as implemented in the HyperChem package (HyperCube, Inc.) and subsequent energy-minimization (using a Polak-Ribiere gradient algorithm). This process was repeated 100 times and the conformer with the lowest ΔH content was selected for further elaboration of more complex models. A dimeric assembly was built up. Since it was known experimentally that the distance between the most distal atoms was in the order of 42 Å, different dimeric assemblies respecting this distance constraint were constructed and energy-minimized as above. Finally, the most energy-favored model was selected for further elaboration of more complex frames, simulating the lamellae-shaped phase and a construction using 8 dimeric units was attempted:

this model could be handled using the OPLS molecular mechanics approach²⁰ (which takes into account hydrogen bonds). All the systems so-far assembled, the only one that showed coherence upon energy-minimization was that obtained by parallel staking of the heterocyclic moieties. All other attempts resulted in a quick destructive disaggregation of the model.

3) Results and discussion

Insight into the 2 D self-assembly of molecules at the air-water interface has first been gained by the Langmuir film balance technique. Compression isotherms of squalene-based nucleolipids have been recorded. Triethylammonium 4-(*N*)-trisor-squalenoyl-2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine monophosphate (gemcitabine MP-Sq), 5'-trisor-squalenoyl-2'-deoxythymidine (thymidine-Sq) and 5'-trisor-squalenoyl-2',3'-dideoxyinosine (ddI-Sq) did not form stable monolayers upon compression whereas cytidine-derived conjugates like 4-(*N*)-trisor-squalenoyl-2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine-Sq), 4-(*N*)-trisor-squalenoyl-2'-dideoxycytidine (ddC-Sq), 4-(*N*)-trisor-squalenoyl-2'-deoxycytidine (deoxycytidine-Sq) and 5'-trisor-squalenoyl-2'-deoxycytidine (deoxycytidine-5'-Sq) as well as 6-(*N*)-trisor-squalenoyl-adenosine (adenosine-Sq) exhibited typical surface pressure-molecular area (π -A) isotherms, as shown in **Figure 2a and 2b**. The surface pressure-molecular area isotherm of squalenic acid was also recorded (**Figure 2a and 2b**).

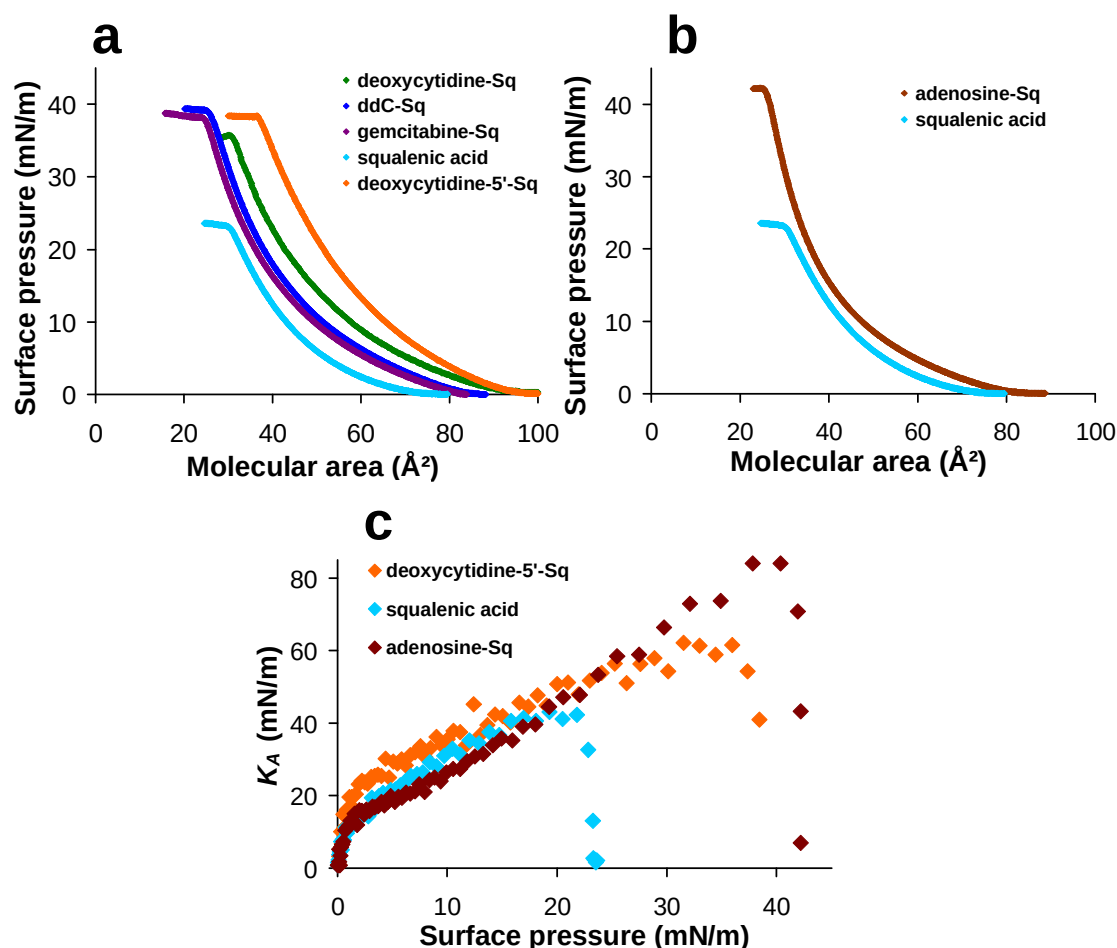


Figure 2. Surface pressure-molecular area compression (π - A) isotherms recorded at $T = 18^\circ\text{C}$ of nucleolipids monolayers at the air–water interface. (a) deoxycytidine-Sq, ddC-Sq, gemcitabine-Sq, squalenic acid and deoxycytidine-5'-Sq. (b) adenosine-Sq and squalenic acid. (c): Compressibility moduli K_A as a function of surface pressure recorded at $T = 18^\circ\text{C}$ for nucleolipids spread at the air–water interface: deoxycytidine-5'-Sq, squalenic acid and adenosine-Sq (see also **Figure S6**).

Large molecular areas at zero pressure corresponded to the gas-like state of the amphiphilic molecules. The onset of surface pressure, for a molecular area close to $90 \text{ \AA}^2$, revealed the beginning of the interaction and organization of molecules at the interface. The collapse was reached at a surface pressure between 36.0 and 42.0 mN m^{-1} , depending on the molecular structure of the nucleolipid. The surface area at collapse corresponded to the minimum area occupied by the molecules. The slope of the π - A isotherm provided information on the monolayer compressibility $K_A = -A d\pi/dA$ indicative of the physical state of the monolayer (**Figure 2c** and **Figure S6**) (liquid-expanded for $13 < K_A \leq 100 \text{ mN m}^{-1}$, liquid-condensed for $100 < K_A < 250 \text{ mN m}^{-1}$).²¹ **Table 1** gathers characteristic values of surface pressure and molecular area at collapse, and K_{Amax} for all studied nucleolipids. Molecular areas at 30 mN m^{-1} , which is a surface pressure where the compressibility of squalene chains is reduced, are also reported for comparison between nucleolipids.

Table 1. Characteristic values deduced from compression isotherms of squalene-based nucleolipids monolayers: molecular area at collapse, surface pressure at collapse, molecular area at 30 mN m⁻¹ and maximum compressibility modulus.

Compounds	Molecular area at collapse (Å ²)	Surface pressure at collapse (mN m ⁻¹)	Molecular area at 30 mN m ⁻¹ (Å ²)	$K_{A_{Max}}$ (mN m ⁻¹)
squalenic acid	30.5	23.2	** **	43
gemcitabine-Sq	25.0	38.0	29.0	58
deoxycytidine-Sq	30.8	36.0	34.6	56
ddC-Sq	26.0	39.2	30.7	59
adenosine-Sq	26.0	42.0	30.4	84
deoxycytidine - 5'-Sq	36.6	38.3	42.6	62

The different molecular areas A of the bioconjugates derived from cytidine, with squalene linked to the nucleobase, could be understood in terms of the different hydrophilicities of the nucleoside analogues. The more hydrophobic gemcitabine-Sq exhibited the smallest molecular area. Exchanging the geminal fluorines of gemcitabine at the 2' position of the nucleoside by two H atoms increased the hydrophilicity of the deoxycytidine-Sq headgroup and, thus, its molecular area. The slightly less hydrophilic ddC-Sq displayed a molecular area that was intermediate between those of gemcitabine-Sq and deoxycytidine-Sq. Surprisingly, the molecular area of the bulkier adenosine-Sq was very close to that of ddC-Sq. This could be explained by the higher hydrophobicity and π -stacking ability of adenosine compared to cytidine, resulting in a tight arrangement of adenosine-Sq molecules at the interface. On another hand, the large molecular area A found for the deoxycytidine-Sq derivative when Sq was linked to the 5' position of the nucleoside may be tentatively explained by the different conformation and stacking of deoxycytidine moieties at the interface.

The monolayer isothermal compressibility moduli maxima ($K_{A_{max}}$) of cytidine derivatives were within the range 56-62 mN m⁻¹. From these values of K_A , all monolayers appeared to be in a liquid-expanded state up to the collapse, as expected for amphiphiles containing a highly unsaturated aliphatic chain. However, for the adenosine-Sq bioconjugate, $K_{A_{max}}$ was 84 mN m⁻¹, suggesting a more organized state of this monolayer.

Comparison of π - A isotherms of squalenic acid and squalene-based nucleolipids revealed the influence of the nucleoside moieties on the interfacial behavior of these nucleolipids. The squalenic acid monolayer collapsed at a much higher surface pressure than squalene (7.7 mN m⁻¹)²² but at a significantly lower surface pressure than the monolayers of

nucleolipids. When the headgroup was a nucleosidic moiety, the collapse pressure and compressibility modulus increase was due to interactions between nucleosides. Specifically, the higher base-stacking tendency and hydrophobicity of purine bases, compared to pyrimidine bases, resulted in a higher collapse pressure and compressibility modulus maximum of the adenosine-Sq monolayer. Monolayer behavior thus arose from the coexistence of disordered hydrophobic chains and polar nucleosidic headgroups prone to self-organizing.

It was observed that all the synthesized bioconjugates spontaneously self-assembled as nanoparticles upon addition of an ethanolic solution into water, the solvent being further removed by evaporation. The hydrodynamic diameter of the particles, measured by quasi-elastic light scattering (QELS) immediately after preparation, was comprised between 100 and 500 nm. Nanoparticles in diluted suspensions were found to be stable over a period of 50 days, except for gemcitabine-Sq which was stable for only 4 days (**Figure S4 and S5**).

The supramolecular organization of gemcitabine-Sq, gemcitabine MP-Sq and ddC-Sq nanoassemblies has been identified in preliminary studies.^{7,23,24} Gemcitabine-Sq formed an inverse hexagonal structure, with a lattice parameter of 87.7 Å. The aqueous cores of close-packed cylinders were surrounded by hydrophilic gemcitabine molecules linked to the squalene chains. When gemcitabine was phosphorylated and further conjugated with squalene, unilamellar liposomes were observed. Finally, ddC-Sq nanoassemblies displayed an inverse bicontinuous cubic organization, formed by a bilayer lying on a periodic minimal surface. Two lattices of space group *Pn3m* (lattice parameter $a = 77.2$ Å) and *Ia3d* ($a = 122.5$ Å) were evidenced. The *Pn3m* and *Ia3d* cubic phases correspond to D (diamond) and G (gyroid) minimal surfaces, respectively. However, it was unclear why these supramolecular organizations occurred.

Thus, to better understand the contribution of the nucleosidic headgroup to the supramolecular organization of the nanoparticles, the internal structure of nanoassemblies involving either deoxycytidine-Sq or adenosine-Sq has been investigated using synchrotron radiation small-angle X-ray scattering (SAXS) and the nanoassemblies have been imaged using cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM). As shown in **Figure 3a**, the nanoassemblies of deoxycytidine-Sq exhibited an inverse bicontinuous cubic structure. The series of Bragg reflections had an onset at $q = 0.09$ Å⁻¹ and q values were spaced in the ratios $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, 3. These peaks indexed as the (110), (111), (200), (211), (220) and (221) reflections of a

cubic structure of space group $Pn3m$. The lattice parameter, a , was obtained from the reciprocal slope of the linear plot of q versus $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$, (**Figure 3b**) where q was the peak position and $(h\ k\ l)$ the corresponding Miller plane indices (for a cubic phase $q = 2\pi/a (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$). This yielded $a = 102.7\ \text{\AA}$. The angular shapes of nanoparticles, as evidenced by cryo-TEM, reflected their cubic structure (**Figure 3a Insert**).

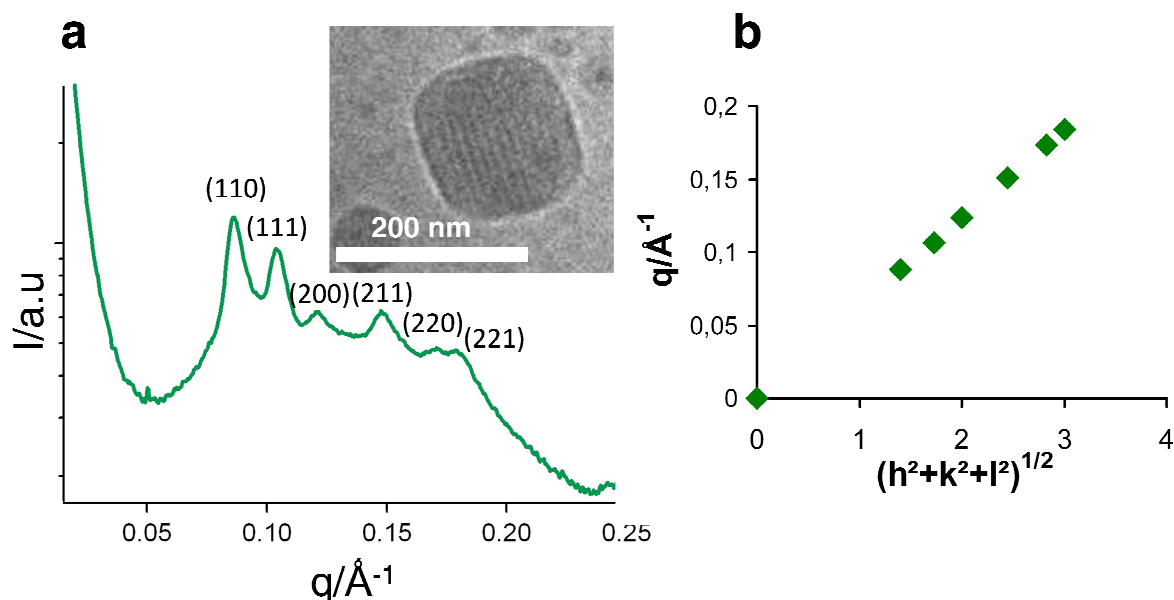


Figure 3. (a) Small-angle X-ray diffraction pattern recorded at room temperature of deoxycytidine-Sq nanoparticles in excess water. Peaks are indexed according to a cubic structure of space group $Pn3m$. (b) Plot of the q -values of the scattering maxima versus $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$ where (hkl) are the corresponding Miller indices. The lattice parameter a is obtained from the reciprocal slope of the line fitted to the data points ($a = 102.7\ \text{\AA}$). Insert: Selected cryo-TEM image of deoxycytidine-Sq nanoparticles, showing an angular shape consistent with a cubic phase.

The SAXS pattern of adenosine-Sq nanoassemblies displayed only a broad peak, revealing no long-range positional order. Cryo-TEM showed nanoparticles with a disordered inner structure, seemingly made of randomly connected membranes. These nanoparticles were occasionally square-shaped and a few vesicles were also observed (**Figure 4**). Taken together, these SAXS and cryo-TEM patterns were reminiscent of sponge-like phase nanoparticles. The sponge (L_3) phase consists of a multi-connected membrane which may exhibit short range ordering, similar to patches of an inverse bicontinuous cubic structure, and is usually considered as a melted cubic phase.²⁵ From the position q_s of the SAXS correlation peak, the characteristic cell size of the bilayer random network could be estimated as being $d = 2\pi/q_s = 57.3\ \text{\AA}$. A minor population of cubosomes, whose SAXS pattern might be obscured by the broad peak of the L_3 phase, could also be present.

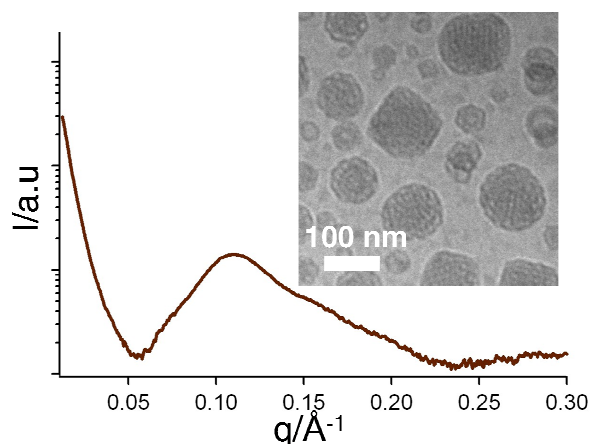


Figure 4. Small-angle X-ray diffraction pattern recorded at room temperature of adenosine-Sq nanoparticles in excess water. The broad scattering peak results from bilayer correlations in the sponge phase. Insert: Cryo-TEM image of adenosine-Sq nanoparticles.

In a second set of experiments, the impact of the position of squalene relative to the nucleobase was assessed. With this aim, the supramolecular organization of deoxycytidine-5'-Sq (i.e. with Sq linked to the sugar 5' position) was compared to that of deoxycytidine-Sq (i.e. with Sq coupled to the nucleobase). The diffraction pattern of deoxycytidine-5'-Sq nanoassemblies exhibited a sharp peak at $q = 0.15 \text{ Å}^{-1}$ and a weak second order peak, indicative of a lamellar phase (L_α) (**Figure 5**). The lamellar spacing d , deduced from the position of the peaks using the Bragg law $d = 2\pi/q$, was 41.9 Å . The d -spacing is the sum of the bilayer thickness and the water layer thickness between the bilayers. Interestingly, these nanoparticles, imaged by cryo-TEM, appeared as short cylinder-like objects most likely arising from compact stacking of disc-like bilayers (**Figure 5 Insert**).

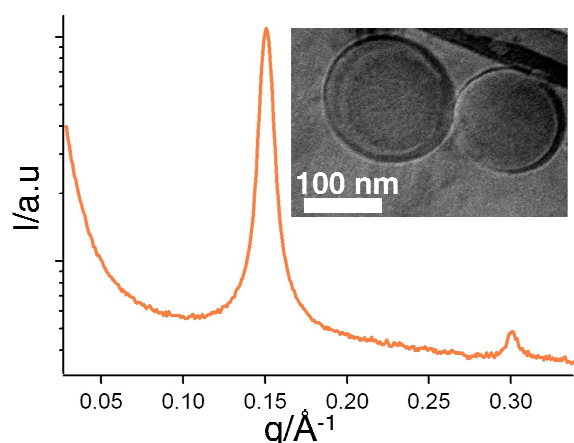


Figure 5. Small-angle X-ray diffraction pattern recorded at room temperature of deoxycytidine-5'-Sq nanoparticles in excess water. The positions of the peaks are indicative of a lamellar phase ($d = 41.9 \text{ Å}$). Insert: Cryo-TEM image of deoxycytidine-5'-Sq nanoparticles.

Further experiments have been performed on other nucleolipids bearing the squalene chain on the sugar 5' position. Both thymidine and ddI derivatives were also found to self-organize as lamellar phases, as revealed by SAXS (**Figure 6**). Their characteristic repeat distances were $d = 39.8 \text{ \AA}$ and $d = 49.4 \text{ \AA}$, respectively. Cryo-TEM images showed spherical nanoparticles (**Figure 6 Inserts**). All of the lamellar phases displayed small characteristic repeat distances, between $40 \text{ \AA}$ and $49 \text{ \AA}$. Only the two first orders of diffraction were observed; the suppression of higher orders should be due to stacking disorder and/or to bending (Helfrich) fluctuations of the bilayers.²⁶

Taken together, X-ray data and cryo-TEM imaging highlighted that tiny chemical differences resulted in major differences in the self-organization of nucleolipids when squalene was grafted onto the nucleobase whereas only lamellar phases were formed when squalene was linked to the sugar moiety.

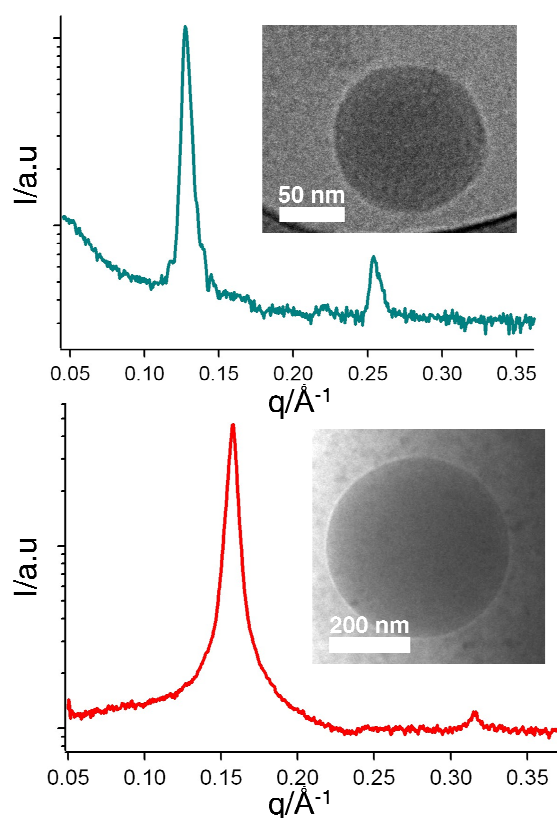


Figure 6. Small-angle X-ray diffraction patterns recorded at room temperature of a) ddI-Sq and b) thymidine-Sq nanoparticles in excess water. The positions of the peaks are indicative of lamellar phases ($d = 49.4 \text{ \AA}$ and $d = 39.8 \text{ \AA}$, respectively). Inserts: Cryo-TEM images of a) ddI-Sq and b) thymidine-Sq nanoparticles.

The simplest approach to understand the self-assembly structure of amphiphilic molecules in water takes into account their molecular shape, as described by the packing parameter. The

packing parameter has been defined as: $p = V/(A_0 \times l)$ where V is the volume of the hydrocarbon chain(s), l is the maximum effective hydrocarbon chain length and A_0 is the optimal surface area per molecule at the polar/ apolar interface. The molecular shape is assumed to determine the interface curvature. When $p \leq 0.5$, cone- or truncated cone-shaped molecules are anticipated to form spherical or cylindrical micelles. The flat bilayer organization is favored for amphiphiles with a cylindrical molecular shape characterized by a p value close to 1. As the value of p increases above 1, the molecules become wedge-shaped and tend to aggregate into structures with negative curvature, such as the inverse bicontinuous cubic phases or the inverse hexagonal phase.²⁷

This simple geometrical model can account for the phase sequence observed when the interfacial area of cytidine derivatives, with squalene coupled to the nucleoside amine function, progressively increases. Gemcitabine-Sq, which exhibits the smallest molecular area $A = 29.0 \text{ \AA}^2$ at 30 mN m^{-1} , forms an inverse hexagonal structure. This packing allows the bulky squalene chains to splay in spite of the small gemcitabine headgroup area. In order to evaluate the gemcitabine-Sq packing parameter, the extended squalene chain length was determined from a molecular model and the hydrophobic volume of the chain was obtained by adding the volumes of the submolecular components.^{28,29} We found $l \sim 25 \text{ \AA}$ and $V = 822 \text{ \AA}^3$. Taking $A_0 = 29.0 \text{ \AA}^2$, this yielded $p = 1.134$, which is consistent with the formation of an inverse hexagonal phase. The small increase in interfacial area of ddC-Sq and deoxycytidine-Sq, compared to gemcitabine-Sq, promotes the formation of the less curved inverse cubic phases. The wedge shape of deoxycytidine-Sq ($p \sim 0.95$) is anticipated to be less pronounced than that of ddC-Sq ($p \sim 1.07$) since its molecular area is slightly larger. This should result in a decreased spontaneous monolayer curvature, inducing an enlargement of the unit cell size of the $Pn3m$ phase that is consistent with the increase of the measured lattice parameter from $77.2 \text{ \AA}$ in ddC-Sq²⁴ to $102.7 \text{ \AA}$ in deoxycytidine-Sq. The difference in spontaneous monolayer curvature of ddC-Sq and deoxycytidine-Sq could also explain the coexistence of the $Pn3m$ (D) and $Ia3d$ (G) phases in ddC-Sq samples whereas only the $Pn3m$ phase was observed in deoxycytidine-Sq. Indeed, according to the model that assumes a constant mean interfacial curvature for inverse bicontinuous cubic phases, the energetic degeneracy between the $Im3m$ (P, primitive), $Pn3m$ (D) and $Ia3d$ (G) phases is broken and an increasingly negative curvature of the monolayer favors the phase sequence $P \rightarrow D \rightarrow G$.^{30, 31,32} Finally, an even larger molecular area is likely when a phosphate group is coupled at the 5' position of gemcitabine-Sq, due to the increased steric hindrance and hydrophilicity of the headgroups and to electrostatic repulsion between them. This leads to the flattening of the

monolayers and to the formation of liposomes.²³ Adenosine-squalene, whose molecular area is similar to that of ddC-squalene, also displays an inverse bicontinuous phase, the sponge phase. These nanoparticles devoid of long-range order might be kinetically trapped structures. Noteworthy, the L_3 phase was very rarely observed in simple two component lipid-water systems.^{33,34}

The phase sequence flat bilayer – inverse bicontinuous cubic phase Q_{II} – inverse hexagonal phase H_{II} , which was evidenced at room temperature among the cytidine derivatives- based nucleolipids, with squalene coupled to the nucleobase, can be qualitatively explained by the decrease of the nucleosidic headgroup hydrophilicity. This phase sequence is usually considered as the natural sequence of the lyotropic mesophases when the spontaneous monolayer interfacial curvature of a given amphiphile becomes increasingly negative upon external stimuli such as a variation of hydration, temperature, pressure etc...

The packing parameter captures the general trends of the dependence of the supramolecular structure on polar headgroups. However, as evidenced above, phase transitions may be related to minor variations of the packing parameter and the model is unable to predict with certainty the phase formed, either lamellar or inverse bicontinuous, when the packing parameter value is close to unity. A more accurate approach would need to consider the total free energy of the system. It is assumed that the supramolecular organization is such that it minimizes the sum of the curvature elastic free energy, the chain packing free energy and a free energy term including contributions from other interactions.²⁷ Usually, the formation of either the L_α or Q_{II} phase is explained by the elastic properties of the bilayer which is the basic unit of these two phases. Two constants describe the elastic properties of the membrane, the elastic mean curvature modulus (bending modulus) and the elastic Gaussian curvature modulus. Depending on the value of the elastic Gaussian curvature modulus κ , either the L_α or Q_{II} phase is favored. Positive values of κ favor saddle deformations of the membrane (and thus cubic or sponge phases) whereas the lamellar phase is energetically more favorable if κ is negative.³⁵ However, when the squalene chain is coupled to the ribose moiety, nucleobases belonging to opposing monolayers are able to form twin hydrogen bonds. For instance, two thymine or adenine nucleobases can form twin hydrogen bonds (either $NH...O$ or $NH...N$).¹⁰ In this case, the last term in the total free energy, resulting from specific interactions, is expected to no longer be negligible. Indeed, surface force measurements performed between monolayers of lipids with nucleosides as headgroups (thymidine or adenosine) have evidenced strong adhesion energy between such layers, which has been explained by the formation of hydrogen

bonds.^{36,37} The absence of interfacial curvature of the lamellar phase should favor the stacking interactions between bases within the same monolayer, as suggested by grazing incidence X-ray diffraction,³⁸ and the cooperativity of hydrogen bonding between bilayers. These interactions could result in a total free energy lower for the L_α phase than for the Q_{II} phase. Consequently, when squalene is linked to the sugar moiety, the lamellar phase could be stabilized by specific interactions between nucleobases as well as by the value of the packing parameter.

These attractive interactions might limit the swelling of the lamellar phases, accounting, at least partly, for the small d-spacing values reported above. This assumption is consistent with the previous finding that replacing the choline headgroup of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) by a nucleoside, either uridine or adenosine, caused a significant decrease of the lamellar d-spacing, pointing to a lower hydration of the nucleolipid lamellar phases compared to POPC.^{39,40,41}

Molecular simulation methods including molecular dynamics and energy-minimization using mainly the classical AM1 semi-empirical quantum mechanics method were employed to support the formation of a lamellar phase in deoxycytidine-5'-Sq. After creating an initial monomeric model using standard methods, a hydrogen-bonded dimer was obtained which was stable under molecular dynamics trajectories (up to 100 psec using increments of 1 psec at 300 °K) and which respected the distance of 42 Å between the most distal hydrogen atoms in the resulting assembly. Using a trial-error method, an assembly of 8 dimeric units was finally selected for building up a lamellae-shaped structure with a twin hydrogen bond network at the heart of the supramolecular architecture (**Figure 7 and Figure S7**). The energy contribution to the stabilization of the lamellar structure offered by these twin hydrogen bonds was calculated to be 6.7 – 7.3 kcal mol⁻¹ (AM1), which is in agreement with values for this type of N-H...N bond. A similar figure was obtained using the PM3 method. The energy of hydrogen bond formation in water is expected to be lower. Indeed, the energy deduced from surface force measurements was ~0.9 kcal mol⁻¹ for thymine/thymine H-bonds and ~1.2 kcal mol⁻¹ for adenine/adenine H-bonds while the energy obtained *in vacuo* from quantum mechanical calculations was 5.2 kcal mol⁻¹ for thymine/thymine H-bonds and 5.6 kcal mol⁻¹ for adenine/adenine H-bonds.³⁶ Contributions originating from hydrophobic forces between squalene chains should also be involved in the formation of the lamellar phase. However, as these forces are for a great part entropy-driven, they cannot be safely estimated using available validated molecular simulation methods.

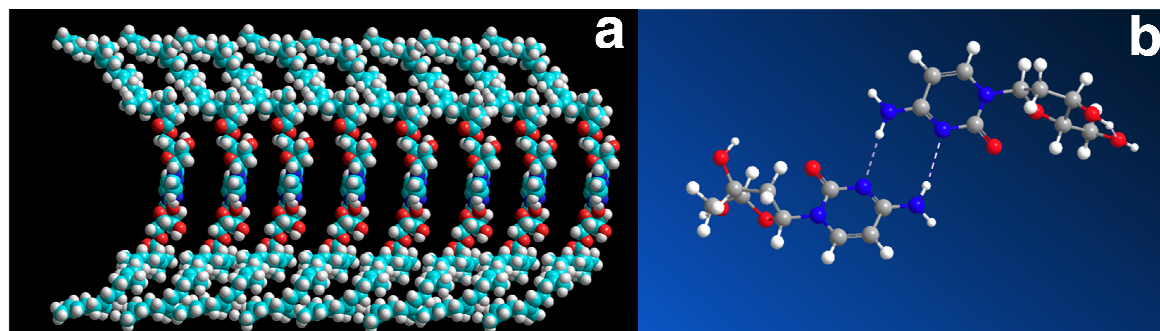


Figure 7. (a) View of a construction of a section of lamellar phase made of 8 deoxycytidine-5'-Sq dimeric units. (b) Each dimer results from twin hydrogen bonds NH...N between nucleobases.

As summarized in **Figure 8**, coupling squalene to nucleosides or nucleosidic analogues gave rise to amphiphilic molecules which spontaneously formed nanoassemblies revealing a diversity of structures. It may be speculated that the length and flexibility of squalene along with the possibility, assessed by NMR and molecular dynamic studies, of assuming different stable conformations, either extended or folded,^{42,43} help this hydrophobic chain to accommodate in various structures, especially inverse structures. Indeed, in the H_{II} phase, the interstices between close packed cylinders must be filled with hydrophobic chains, implying that some chains have either to stretch from their preferred conformation or be compressed if the interface curvature is constant. Around the aqueous core, chains oriented towards the corners of the hexagonal unit cell display the most extended conformations while chains perpendicular to the faces may be compressed. In Q_{II} phases, it has been stressed that bilayer thickness must vary across the unit cell to maintain uniform interfacial curvature.^{30,31,32} Again, the hydrophobic chains cannot adopt the same mean length. As previously emphasized, variation in chain length in inverted phases results in an unfavorable chain-packing energy, which tends to hamper the formation of these phases.^{27,44} The conformational properties of squalene are thought to reduce chain packing energies in non-lamellar phases. Furthermore, the flexibility of squalene chains may allow the arrangement of nucleoside headgroups at the interface so as to favor interactions between them.

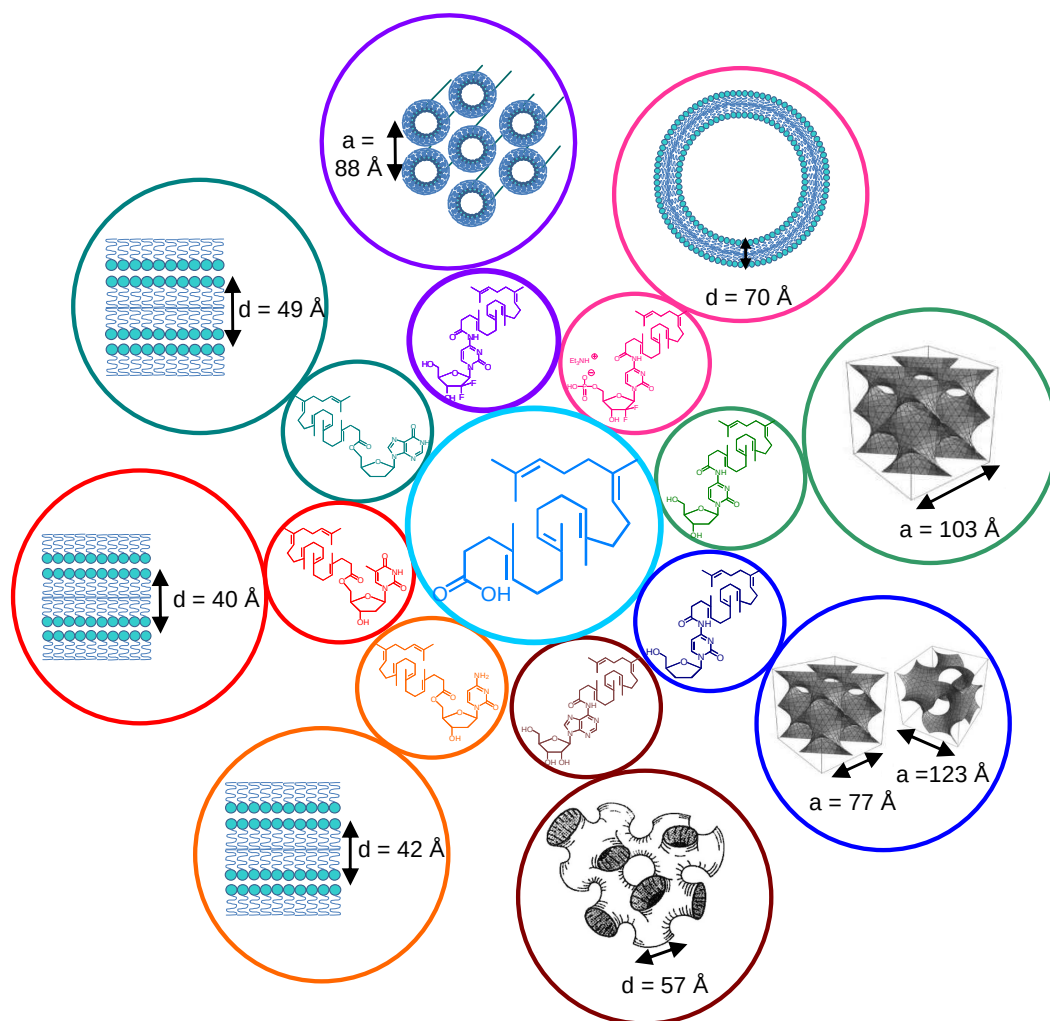


Figure 8. Supramolecular structures of squalene-based nucleolipids as a function of the nature of the nucleoside and the position of squalene relative to the nucleobase.

4) Conclusion

In summary, the present study concerning nanoassemblies formed by squalene-based nucleolipids has revealed that subtle chemical differences induced a diversity of structures when squalene was grafted on the nucleobase whereas only lamellar phases were observed when squalene was linked to the sugar moiety. The complexity of these self-assembled structures results from the interplay between the unique conformational properties of squalene, the packing parameters of the bioconjugates and possible specific H-bond interactions involving nucleobases. These findings open an effective way towards a fine tuning of the supramolecular organization of squalene-based prodrugs, in order to improve their pharmacological activity.

Acknowledgements

The authors wish to thank Heinz Amenitsch for his support during the X-ray measurements on the Austrian synchrotron beamline at ELETTRA and Ghislaine Frebourg for cryo-TEM observations. The research leading to these results has received funding from the European research Council under the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 (Grant Agreement No 249835).

Supporting Information

Materials, synthesis, supplementary figures and supplementary references. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Testa, B. Prodrug research: futile or fertile?. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2097-2106.
- (2) Jana, S.; Mandlekar, S.; Marathe, P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery Scientists. *Cur. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3874–3908.
- (3) Soussan, E.; Cassel, S.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I. Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers. *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 274–288.
- (4) Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1649–1659.
- (5) Vauthier, C.; Couvreur, P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 223–234.
- (6) Couvreur, P.; Stella, B.; Reddy, L. H.; Hillaireau, H.; Dubernet, C.; Desmaële, D.; Lepître-Mouelhi, S.; Rocco, F.; Dereudre-Bosquet, N.; Clayette, P.; Rosilio, V.; Marsaud, V.; Renoir, J. M.; Cattel, L. Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nanoletters* **2006**, *6*, 2544–2548.
- (7) Couvreur, P.; Reddy, L. H.; Mangenot, S.; Poupaert, J. H.; Desmaële, D.; Lepître-Mouelhi, S.; Pili, B.; Bourgaux, C.; Amenitsch, H.; Ollivon, M. Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small* **2008**, *4*, 247–253.

- (8) Reddy, L. H.; Marque, P-E.; Dubernet, C.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Preclinical toxicology (subacute and acute) and efficacy of a new squalenoyl gemcitabine anticancer nanomedicine. *J. Pharm. Exp. Therapeut.* **2008**, 325, 484–490.
- (9) Reddy, L. H.; Renoir, J. M.; Marsaud, V.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6, 1526–1535.
- (10) Sivakova, S.; Rowan, S. J. Nucleobases as supramolecular motifs. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 9–21.
- (11) Allain, V.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *N.A.R.* **2012**, 40, 1891–1903.
- (12) Gissot, A.; Camplo, M.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1324–1333.
- (13) Simone, E. A.; Dziubla, T. D.; Muzykantov, V. R. Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, 5, 1283–1300.
- (14) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 2873–2896.
- (15) Hühn, D.; Kantner, K.; Geidel, C.; Brandholt, S.; De Cock, I.; Soenen, S. J. H.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, J-M.; Braeckmans, K.; Müllen, K.; Nienhaus, G. U.; Klapper, M.; Parak, W. J. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano* **2013**, 7, 3253–3263.
- (16) Clogston, J.; Caffrey, M. Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids. *J. of Control. Release* **2005**, 107, 97–111.
- (17) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. Highly Efficient Gene Silencing Activity of siRNA Embedded in a Nanostructured Gyroid Cubic Lipid Matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16841–16847.
- (18) Khiati, S.; Pierre, N.; Andriamanarivo, S.; Grinstaff, M. W.; Arazam, N.; Nallet, F.; Navailles, L.; Barthelemy, P. Anionic Nucleotide-Lipids for In Vitro DNA Transfection. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1765–1772.
- (19) Dewar, M. J. S.; Ziebesch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. The Development and use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. AM1 – A New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902–3909.

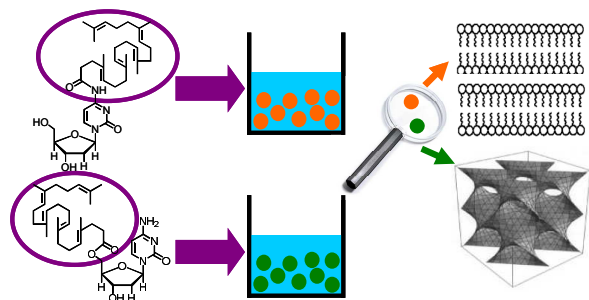
- (20) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
- (21) Davies, J. T.; Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*, 2nd ed.; Academic Press: New York **1963**, 265.
- (22) Ambike, A.; Rosilio, V.; Stella, B.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Couvreur, P. Interaction of Self-Assembled Squalenoyl Gemcitabine Nanoparticles with Phospholipid-Cholesterol Monolayers Mimicking a Biomembrane. *Langmuir* **2011**, *27*, 4891–4899.
- (23) Caron, J.; Lepeltier, E.; Reddy, L. H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Wack, S.; Bourgaux, C.; Couvreur, P.; Desmaële, D. Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *14*, 2615–2628.
- (24) Bekkara-Aounallah, F.; Gref, R.; Othman, M.; Reddy, L. H.; Pili, B.; Allain, V.; Bourgaux, C.; Hillaireau, H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Nicolas, J.; Chafi, N.; Couvreur, P. Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues. *Adv. Funct. Mat.* **2008**, *18*, 3715–3725.
- (25) Porte, G. Lamellar Phases and Disordered Phases of Fluid Bilayer-Membranes. *J. of Physics- Condens. Mat.* **1992**, *4*, 8649–8670.
- (26) Pabst, G.; Koschuch, R.; Pozo-Navas, B.; Rappolt, M.; Lohner, K.; Laggner, P. Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 1378–1388.
- (27) Shearman, G.; Ces, O.; Templer, R.; Seddon, J. Inverse lyotropic phases of lipids and membrane curvature. *J. Phys.: Condens. Matter.* **2006**, *18*, 1105–1124.
- (28) Armen, R. S.; Uitto, O. D.; Feller, S. E. Phospholipid Component Volumes: Determination and Application to Bilayer Structure Calculations. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 734–744.
- (29) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1469*, 159–195.
- (30) Shearman, G. C.; Ces, O.; Templer, R. H. Towards an understanding of phase transitions between inverse bicontinuous cubic lyotropic liquid crystalline phases. *Soft Matter* **2010**, *6*, 256–262.
- (31) Kulkarni, C. V.; Tang, T-Y.; Seddon, A. M.; Seddon, J. M.; Ces, O.; Templer, R. H. Engineering bicontinuous cubic structures at the nanoscale-the role of chain splay. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3191–3194.

- (32) Shearman, G. C.; Khoo, B. J.; Motherwell, M. L.; Brakke, K. A.; Ces, O.; Conn, C. E., Seddon, J. M.; Templer, R. H. Calculations of and evidence for chain packing stress in inverse lyotropic bicontinuous cubic phases. *Langmuir* **2007**, *23*, 7276–7285.
- (33) Imura, T.; Yanagishita, H.; Kitamoto, D. Coacervate formation from natural glycolipid: One acetyl group on the headgroup triggers coacervate-to-vesicle transition. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10804–10805.
- (34) Imura, T.; Hikosaka, Y.; Worakitkanchanakul, W.; Sakai, H.; Abe, M.; Konishi, M.; Minamikawa, H.; Kitamoto, D. Aqueous-phase behavior of natural glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid A: Sponge, cubic, and lamellar phases. *Langmuir* **2007**, *23*, 1659–1663.
- (35) Siegel, D. P.; Kozlov, M. M. The Gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 366–374.
- (36) Pincet, F.; Perez, E.; Bryant, G.; Lebeau, L.; Mioskowski, C. Long-Range Attraction Between Nucleosides With Short-Range Specificity - Direct Measurements. *Phys. Rev. Let.* **1994**, *73*, 2780–2783.
- (37) Taresté, D.; Pincet, F.; Perez, E.; Rickling, S.; Mioskowski, C.; Lebeau, L. Energy of hydrogen bonds probed by the adhesion of functionalized lipid layers. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3675–3681.
- (38) Perez, E.; Pincet, F.; Goldmann, M.; Mioskowski, C.; Lebeau, L. Translational order in liquid-expanded lipid monolayers functionalized with nucleosides. *Eur. Phys. J. B.* **1998**, *6*, 1–4.
- (39) Milani, S.; Bombelli, F. B.; Berti, D.; Hauß, T.; Dante, S.; Baglioni, P. Structural investigation of bilayers formed by 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl nucleosides. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1260–1269.
- (40) Milani, S.; Bombelli, F. B.; Berti, D.; Baglioni, P. Nucleolipoplexes: A new paradigm for phospholipid bilayer-nucleic acid interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11664–11665.
- (41) Kucerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membrane Biol.* **2005**, *208*, 193–202.
- (42) Pogliani, L.; Rossi, P.; Paoli, P.; Ceruti, M.; Milanesio, M. Conformational and dynamical study of squalene derivatives. II - Vinyl oxidosqualenes. *CPL* **1999**, *103*, 67–79.
- (43) Pogliani, L.; Milanesio, M.; Ceruti, M.; Viterbo, D. Conformational and dynamical study of squalene derivatives. III: azasqualenes and solvated squalene. *CPL* **1999**, *103*, 81–93.

(44) Seddon, J.; Robins, J.; Gulik-Krzywicki, T.; Delacroix, H. Inverse micellar phases of phospholipids and glycolipids. *Phys.Chem.Chem.Phys.* **2000**, 2, 4485–4493.

Table of content only

Squalene-based nucleolipids, including anticancer or antiviral prodrugs, give rise to nanoparticles displaying a diversity of structures. The fine tuning of the supramolecular organization of squalene-based prodrugs could improve their activity.



III- Supporting Information

Self-assembly of squalene-based nucleolipids: relating the chemical structure of the bioconjugates to the architecture of the nanoparticles.

Elise Lepeltier[†], Claudie Bourgaux^{*,†}, Véronique Rosilio[†], Jacques H. Poupaert[‡], Florian Meneau[§], Fatima Zouhiri[†], Sinda Lepêtre-Mouelhi[†], Didier Desmaële[†], Patrick Couvreur[†].

[†]Univ. Paris-Sud XI, Faculté de Pharmacie, UMR CNRS 8612-Institut Galien
Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[‡]Unité de Chimie Pharmaceutique et Radiopharmacie, Univ. Catholique de
Louvain, 1200 Bruxelles, Belgium

[§] Synchrotron SOLEIL, l'Orme des Merisiers, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Corresponding Author:

* claudie.bourgaux@u-psud.fr

Materials and Methods

Synthesis

The chemical structures of the studied squalene conjugates are drawn in **Figure S1**. The syntheses of gemcitabine-Sq, gemcitabine MP-Sq, ddC-Sq, thymidine-Sq and ddI-Sq have been previously reported.^{1,2,3} Briefly, the nucleoside analogues were condensed with 1,1',2-trisnorsqualenic acid (squalenic acid) either on the 5'-OH group or on the heterocyclic base. Likewise, deoxycytidine-squalene (dC-Sq) was obtained by reaction with the mixed anhydride derived from 1,1',2-trisnorsqualenic acid and ethyl chloroformate, whereas the synthesis of adenosine-Sq was achieved by acylation using HATU as coupling agent. Finally, deoxycytidine-5'-Sq was obtained by condensation of deoxycytidine hydrochloride with 1,1',2-trisnorsqualenoyl chloride.

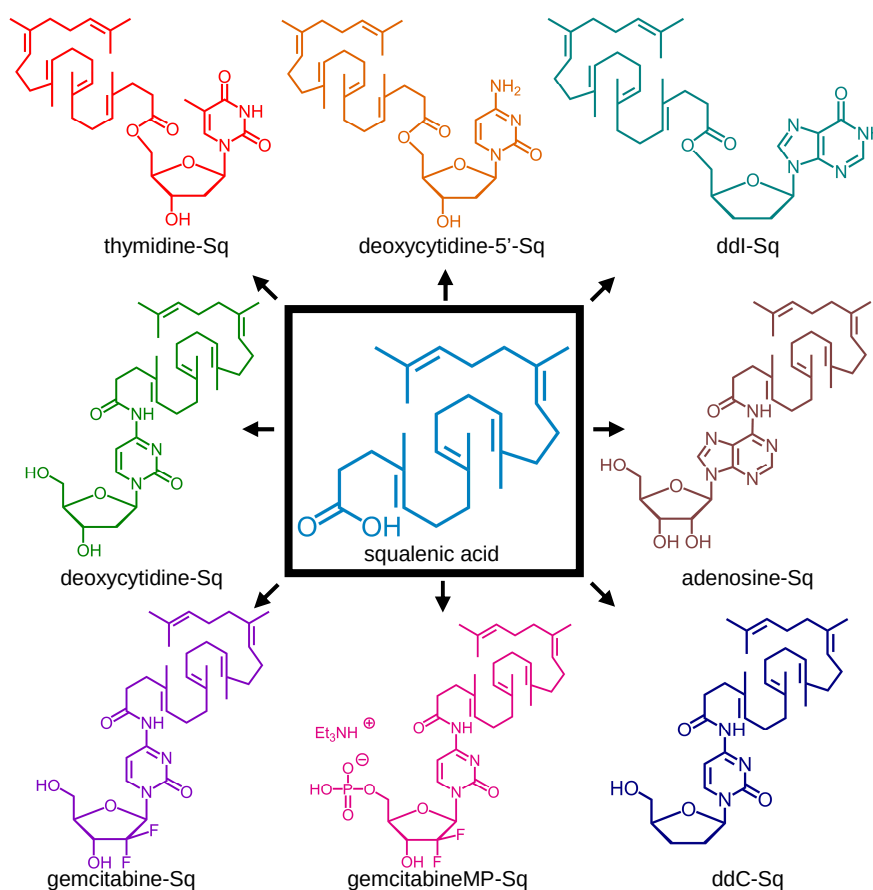


Figure S1. Chemical structures of the different molecules studied, synthesized from squalenic acid.

General:

IR spectra were obtained as solid or neat liquid on a Fourier Transform Bruker Vector 22 spectrometer. Only significant absorptions are listed. — Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 Polarimeter at 589 nm. — The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance-300 (300 MHz and 75 MHz, for ^1H and ^{13}C , respectively) spectrometers. Recognition of methyl, methylene, methine, and quaternary carbon nuclei in ^{13}C NMR spectra rests on the *J*-modulated spin-echo sequence. — Mass spectra were recorded on a Bruker Esquire-LC. — Analytical thin-layer chromatography was performed on Merck silica gel 60F₂₅₄ glass precoated plates (0.25 mm layer). — Column chromatography was performed on Merck silica gel 60 (230-400 mesh ASTM). — Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl. DMF, CH_2Cl_2 and toluene were distilled from calcium hydride, under a nitrogen atmosphere. — All reactions involving air- or water-sensitive compounds were routinely conducted in glassware which was flame-dried under a positive pressure of nitrogen. — Elemental analyses were performed by the Service de microanalyse, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Gif-sur-Yvette, France, with a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer and an Elementar Vario Micro Cube analyser. — Chemicals obtained from commercial suppliers were used without further purification. Squalene, adenosine, deoxycytidine, 1-hydroxybenzotriazole hydrate, 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, tetrabutylammonium fluoride, ethyl chloroformate and oxalyl chloride were obtained from Sigma-Aldrich Fine Chemicals.

Experimental protocols

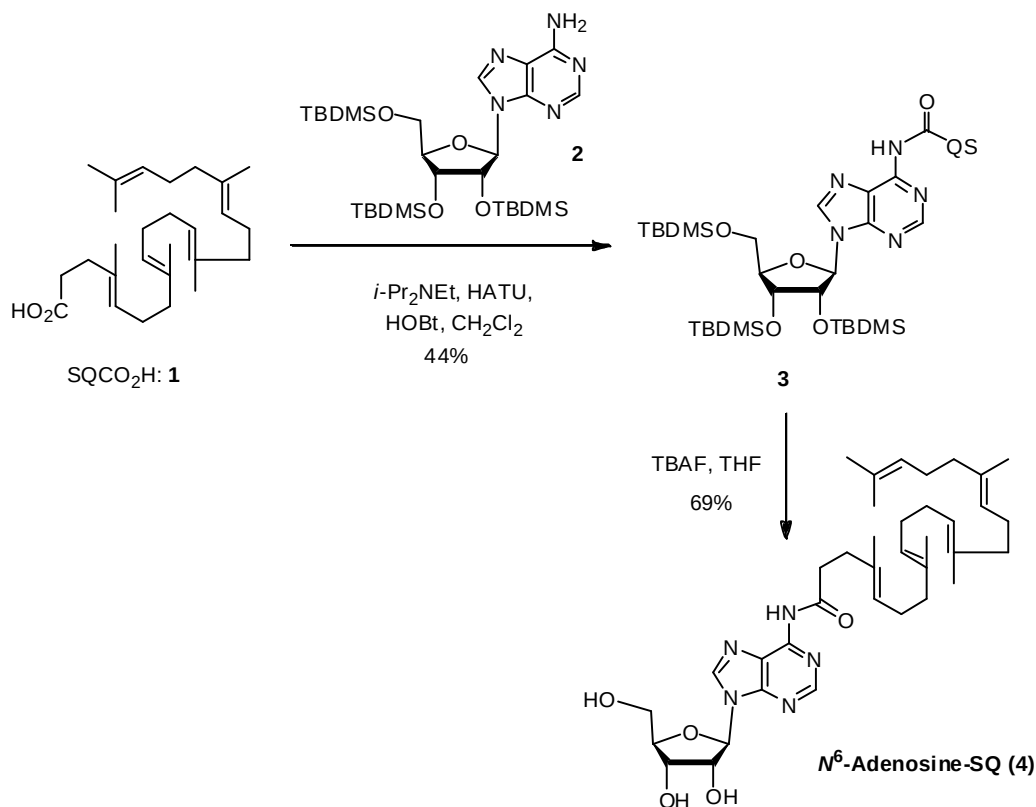
Synthesis of *N*⁶-Squalenoyl Adenosine

Figure S2. Synthesis of *N*⁶-Adenosine Squalene (4).

(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-{9-[(2*R*,5*R*)-3,4-bis[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]methyl]oxolan-2-yl]-9*H*-purin-6-yl}-4,8,13,17,21-pentamethyldocosa-4,8,12,16,20-pentaenamide (3). To a stirred solution of 1,1',2-trisnorsqualenic acid (**1**) (0.197 g, 0.65 mmol) in anhydrous dichloromethane (3 mL) and DMF (0.2 mL) was added 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.09 g, 0.58 mmol), 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (0.224 g, 0.58 mmol), *tris-O*-silylated adenosine **2** (0.226 g, 2.5 mmol) and diisopropylethylamine (0.243 g, 1.88 mmol). The reaction mixture was stirred 72 hours at room temperature and was then concentrated *in vacuo*. Aqueous sodium hydrogen carbonate was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The combined extracts were washed with brine, dried on MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel eluting with 10 % ethyl acetate in cyclohexane to give pure *tris*-

O-silylated *N*⁶-squalenoyl-adenosine (**3**) as a colorless oil (215 mg, 44 %); $[\alpha]_D = -16.6$ (*c* = 1.8, CHCl₃); IR (film, cm⁻¹) ν : 3500-3000, 3000-2860, 1694, 1607, 1584, 1471, 1251, 1190, 1071, 997, 969, 938, 836, 775; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.67 (s, 1 H, NHCO), 8.48 (s, 1 H, H8), 8.32 (s, 1 H, H2), 6.07 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H1'), 5.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, HC=C(CH₃)), 5.19-5.03 (m, 4 H, HC=C(CH₃)), 4.66 (t, *J* = 4.6 Hz, 1 H, H2'), 4.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H3'), 4.14 (m, 1 H, H4'), 4.02 (dd, *J* = 11.3 Hz, *J* = 3.8 Hz, 1H, H5'), 3.79 (dd, *J* = 11.3 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5'), 2.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, O₂CCH₂CH₂), 2.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, O₂CCH₂CH₂), 2.14-1.90 (m, 16H, 8 CH₂), 1.67 (s, 6 H, C=C(CH₃)), 1.59 (s, 12 H, C=C(CH₃)), 0.95 (s, 9 H, *t*-BuSi), 0.93 (s, 9 H, *t*-BuSi), 0.79 (s, 9 H, *t*-BuSi), 0.14 (s, 3 H, CH₃Si), 0.13 (s, 3 H, CH₃Si), 0.10 (s, 6H, CH₃Si), -0.03 (s, 3 H, CH₃Si), -0.24 (s, 3 H, CH₃Si); NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.4 (C, CONH), 152.4 (CH, C2), 151.1 (C, C6), 149.1 (C, C4), 135.1 (C, HC=C(CH₃)), 134.9 (C, HC=C(CH₃)), 134.8 (C, HC=C(CH₃)), 133.4 (C, HC=C(CH₃)), 131.2 (C, HC=C(CH₃)), 125.5 (CH, HC=C(CH₃)), 124.4 (CH, HC=C(CH₃)), 124.3 (CH, HC=C(CH₃)), 124.2 (2 CH, HC=C(CH₃)), 122.0 (C, C5), 88.4 (CH, C1'), 85.5 (CH, C4'), 76.0 (CH, C2'), 71.9 (CH, C3'), 62.4 (CH₂, C5'), 39.7 (2 CH₂), 39.5 (CH₂), 36.8 (CH₂), 34.5 (CH₂), 28.2 (2 CH₂), 26.7 (2 CH₂), 26.6 (CH₂), 26.0 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi), 25.8 (3 CH₃, (CH₃)₃CSi), 25.6 (4 CH₃, HC=C(CH₃)₂ and ((CH₃)₃CSi)), 18.5 (C, (CH₃)₃CSi), 18.0 (C, (CH₃)₃CSi), 17.8 (C, (CH₃)₃CSi), 17.6 (CH₃, HC=C(CH₃)CH₃), 16.0 (3 CH₃, HC=C(CH₃)), 15.9 (CH₃, HC=C(CH₃)), -4.39 (CH₃, SiCH₃), -4.67 (CH₃, SiCH₃), -4.71 (CH₃, SiCH₃), -5.06 (CH₃, SiCH₃), -5.37 (CH₃, SiCH₃), -5.39 (CH₃, SiCH₃) (the C8 line was not detected); MS (+APCI) *m/z* (%) 993.1 (100) [M+H]⁺, 518.6 (24) [M-C₂₃H₅₁O₄Si₃+H]⁺; Anal. Calcd for C₅₅H₉₇N₅O₅Si₃·½ H₂O: C, 65.95, H, 9.86, N, 6.99. Found: C, 66.25, H, 9.86, N, 6.54.

***N*⁶-squalenoyl-adenosine or (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-*N*-{9-[(2*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-9*H*-purin-6-yl}-4,8,13,17,21-pentamethyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaenamide (**4**).** To a solution of *tris-O*-silylated *N*⁶-squalenoyl-adenosine (**3**) (0.173 g, 0.174 mmol) in dry THF (3 mL) was added *n*-Bu₄NF (1M solution in THF, 0.63 mL, 0.63 mmol) and the mixture was stirred for 3h at room temperature. The reaction was then quenched with brine and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The combined extracts were dried on MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by chromatography on silica gel eluting with 5 % methanol in dichloromethane to give pure *N*⁶-squalenoyl-adenosine (**4**) as a colorless oil (82 mg, 73 %); $[\alpha]_D = -44.1$ (*c* = 1.7, CHCl₃); IR (film, cm⁻¹) ν : 3500-2850, 1681, 1614, 1584, 1462, 1375, 1352, 1318, 1223,

1103, 1076, 1039, 982; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.34 (broad s, 1 H, NHCO), 8.39 (s, 1 H, H8), 8.19 (s, 1 H, H2), 5.94 (d, 1 H, $J = 6.5$ Hz, H1'), 5.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 5.13-5.07 (m, 4 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 4.92 (m, 1 H, H2'), 4.46 (d, 1 H, $J = 3.9$ Hz, H3'), 4.30 (m, 1 H, H4'), 3.92 (d, 1 H, $J = 11.9$ Hz, H5'), 3.75 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H, H5'), 2.95-2.85 (m, 2 H, COCH_2CH_2), 2.40 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, COCH_2CH_2), 2.12-1.92 (m, 16 H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 1.67 (s, 3 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 1.65 (s, 3 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 1.59 (s, 12 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.4 (C, CONH), 151.6 (CH, C2), 150.2 (C, C6), 149.5 (C, C4), 143.4 (CH, C8), 135.2 (C, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 135.0 (2 C, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 133.2 (C, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 131.3 (C, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 125.8 (CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 124.5 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 124.4 (2 CH, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 122.9 (C, C5), 91.0 (CH, C1'), 87.5 (CH, C4'), 74.2 (CH, C2'), 72.3 (CH, C3'), 63.0 (CH_2 , C5'), 39.8 (2 CH_2), 39.7 (CH_2), 36.8 (CH_2), 34.6 (CH_2), 28.4 (CH_2), 27.0 (CH_2), 26.9 (2 CH_2), 26.8 (CH_2), 25.8 (2 CH_3), 17.8 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 16.2 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 16.1 (2 CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); MS (+APCI) m/z (%) 650.7 (90) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 518.6 (100) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4 + \text{H}]^+$; Anal. Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot 5/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 63.95, H, 8.70, N, 10.08. Found: C, 64.24, H, 8.31, N, 9.96.

Synthesis of N^4 -Squalenoyl deoxycytidine (6) and 5'-Squalenoyl deoxycytidine (8)

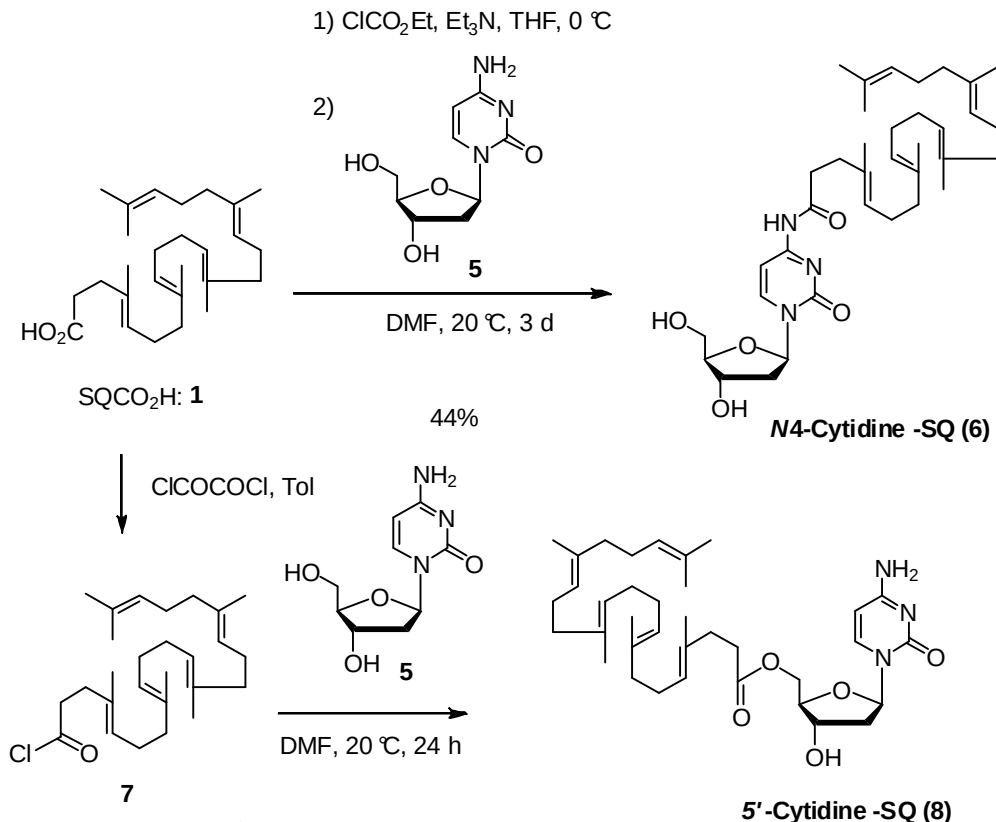


Figure S3. Synthesis of N^4 -deoxycytidine Squalene (6) and 5'-deoxycytidine Squalene (8).

***N*⁴-Squalenoyl deoxycytidine (6):** To a stirred solution of 1,1',2-trisnorsqualenic acid (1) (500 mg, 1.2 mmol) in anhydrous DMF (7 mL) were sequentially added 1-hydroxybenzotriazole hydrate (230 mg, 0.58 mmol), 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (560 g, 1.4 mmol), deoxycytidine hydrochloride (5) (368 mg, 1.4 mmol) and diisopropylethylamine (350 mg, 1.88 mmol). The reaction mixture was stirred 72 hours at room temperature and was then concentrated *in vacuo*. Aqueous sodium hydrogen carbonate was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The combined extracts were washed with brine, dried on MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel eluting with ethyl acetate : MeOH to give pure *N*⁴-squalenoyl-deoxycytidine (6) as a colorless oil (325 mg, 44 %); [α]_D = + 33.0 (c = 2.9, EtOH); IR (film, cm⁻¹) ν : 3500-2900, 3000-2800, 1653, 1645, 1609, 1529, 1492, 1459, 1383, 1309, 1122, 1103, 974; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OH) δ (ppm): 8.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H6), 7.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H5), 6.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H1'), 5.21 (t, *J* = 6.7 Hz, 1 H, HC=C(CH₃)), 5.20-5.07 (m, 4 H, HC=C(CH₃)), 4.42-4.36 (m, 1 H, H4'), 4.03 (dd, *J* = 6.9 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H3'), 3.86 (dd, *J* = 12.1 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1 H, H5'), 3.77 (dd, *J* = 12.1 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1 H, H5'), 2.60-2.44 (m, 3H, O₂CCH₂CH₂, H2'), 2.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, O₂CCH₂CH₂), 2.23-2.10 (m, 1 H, H2'), 2.15-1.90 (m, 16 H, =C(CH₃)CH₂CH₂CH=), 1.69 (s, 3H, C=C(CH₃)), 1.68 (s, 3H, C=C(CH₃)), 1.62 (s, 12H, C=C(CH₃)); ¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 175.4 (C, CONH), 164.2 (C, C4), 157.8 (C, C2), 146.2 (CH, C6), 136.0 (C, C=CH), 135.8 (C, C=CH), 134.4 (C, C=CH), 132.0 (C, C=CH), 126.5 (CH), 125.6 (CH, C=CH), 125.5 (CH, C=CH), 125.5 (CH, C=CH), 97.9 (CH, C5), 89.4 (CH, C1'), 88.6 (CH, C4'), 71.6 (CH, C3'), 62.4 (CH₂, C5'), 40.8 (2 CH₂), 40.7 (CH₂), 37.1 (CH₂), 35.7 (CH₂), 29.2 (2 CH₂), 27.8 (CH₂), 27.6 (CH₂), 27.6 (CH₂), 25.9 (CH₃, C=C(CH₃)₂), 17.8 (CH₃, =C(CH₃)CH₂), 16.2 (2 CH₃, =C(CH₃)CH₂), 16.1 (CH₃, =C(CH₃)CH₂); MS (+APCI) *m/z* (%) 610.7 (95) [M+H]⁺, 494.6 (100) [M-C₅H₈O₃ + H]⁺; Anal. Calcd for C₃₆H₅₅N₃O₅·3/2 H₂O: C, 67.89, H, 9.18, N, 6.60. Found: C, 67.57, H, 8.81, N, 6.71.

(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*)-4,8,13,17,21-Pentamethyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaenoyl chloride (7): To a solution of 1,1',2-trisnorsqualenic acid (1.0 g, 2.5 mmol) in anhydrous toluene (10 mL) was added dropwise oxalyl chloride (970 mg, 7.6 mmol). After being stirred at 20 °C for 3 h, the mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude acid chloride (1.05 g quant.) as a pale yellow oil which was used immediately in the next step; IR (film) ν : 2920,

1799, 1443, 1382, 955, 893; ^1H (NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.23-5.10 (m, 5 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 2.45 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, CH_2COCl), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCl}$), 2.15-1.95 (m, 16 H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 1.70 (s, 3 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.62 (s, 15H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.2 (C, COCl), 135.1 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 134.8 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 134.6 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 131.4 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 131.1 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 126.6 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 124.7 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 124.4 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 124.3 (2 CH, $\text{C}=\text{CH}$), 45.8 (CH_2), 39.7 (2 CH_2), 34.4 (CH_2), 34.6 (CH_2), 28.2 (2 CH_2), 26.8 (CH_2), 26.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.7 (CH_3 , $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 17.6 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 16.0 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 15.9 (2 CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 15.8 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$).

5'-Squalenoyl deoxycytidine (8): To a solution of deoxycytidine hydrochloride (5) (1.25 g, 4.75 mmol) in DMF (8 mL) was added dropwise a solution of 1,1',2-trisnorsqualenoyl chloride (1.0 g, 2.39 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred at 20 ° C for 24 h and concentrated under reduced pressure. Residue was taken into saturated aqueous sodium bicarbonate (10 mL) and was extracted with ethyl acetate (3 $\times$ 40 mL). The combined extracts were washed with brine, dried on MgSO_4 , and concentrated under vacuum. The crude product was purified by chromatography on silica gel eluting with AcOEt then with AcOEt/MeOH, 95:5 to give pure 5'-squalenoyl deoxycytidine (7) as a colorless oil (400 mg, 27 %); $[\alpha]_D = +34.0$ ($c = 1.1$, EtOH); IR (film, cm^{-1}) ν : 3500-3000, 2960-2800, 1740, 1665, 1645, 1618, 1528, 1494, 1451, 1412, 1381, 1286, 1193, 1158, 1084, 789; ^1H (NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.64 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H6), 6.29 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-1'), 5.77 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H5), 5.20-5.04 (m, 5 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 4.40-4.16 (m, 4 H, H3', H4', H5'), 2.76-2.64 (m, 1 H, H-2'), 2.48-2.38 (m, 2 H, CH_2CO_2), (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 2.16-1.92 (m, 17 H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$, H-2'), 1.68 (s, 3 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.60 (s, 15 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 174.3 (C, CO_2), 167.4 (C, C4), 158.0 (C, C2), 142.6 (CH, C6), 135.8 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 135.6 (2 C, $\text{C}=\text{CH}$), 134.0 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 131.8 (C, $\text{C}=\text{CH}$), 126.3 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 125.5 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 125.4 (2 CH, $\text{C}=\text{CH}$), 125.3 (CH, $\text{C}=\text{CH}$), 96.0 (CH, C5), 87.5 (CH, C1'), 85.6 (CH, C4'), 71.9 (CH, C3'), 64.9 (CH_2 , C5'), 40.7 (CH_2), 40.7 (2 CH_2), 40.5 (CH_2), 35.5 (CH_2), 33.9 (CH_2), 29.1 (2 CH_2), 27.7 (CH_2), 27.5 (CH_2), 27.4(CH_2), 26.0 (CH_3 , $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 17.9 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 16.3 (2 CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 16.2 (CH_3 , $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); MS (+ESI) m/z (%) 632.5 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 610.6 (3) $[\text{M} + \text{H}]^+$; Anal. Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 67.89, H, 9.18, N, 6.60. Found: C, 67.86, H, 8.83, N, 6.77.

Results

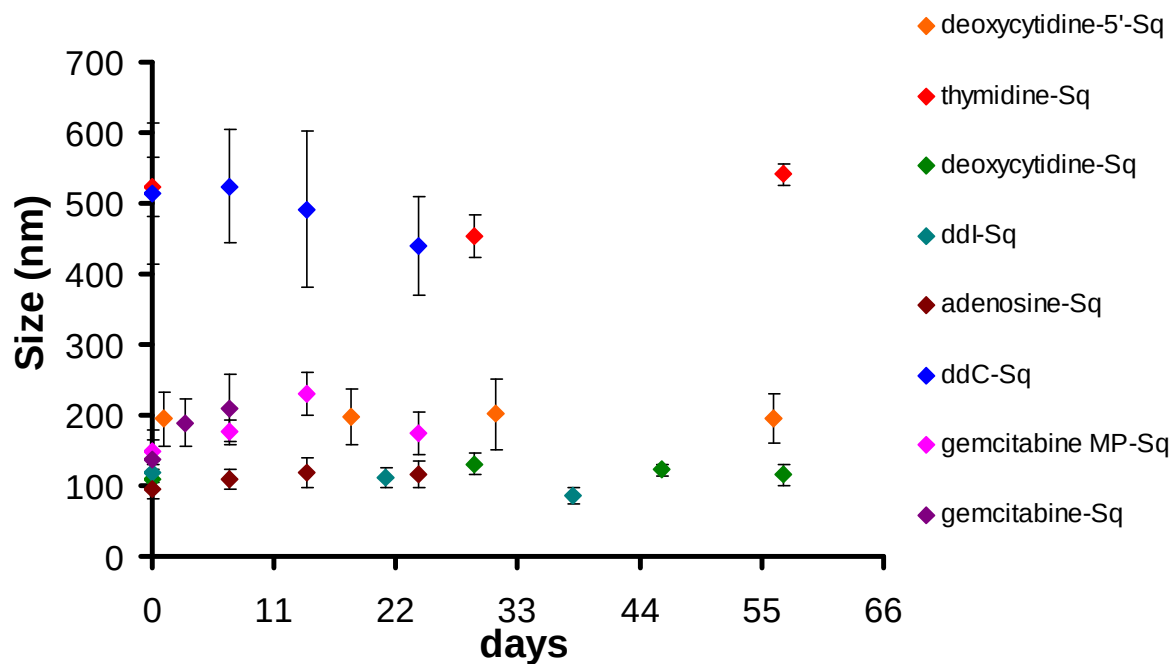


Figure S4. Stability of nanoparticles ($\sim 1.10^{-3}$ mol L $^{-1}$) in water at room temperature. The mean diameter of nanoparticles, determined by DLS, is the average of three measurements.



Figure S5. Suspension of nanoparticles of thymidine-Sq displaying characteristic opalescence.

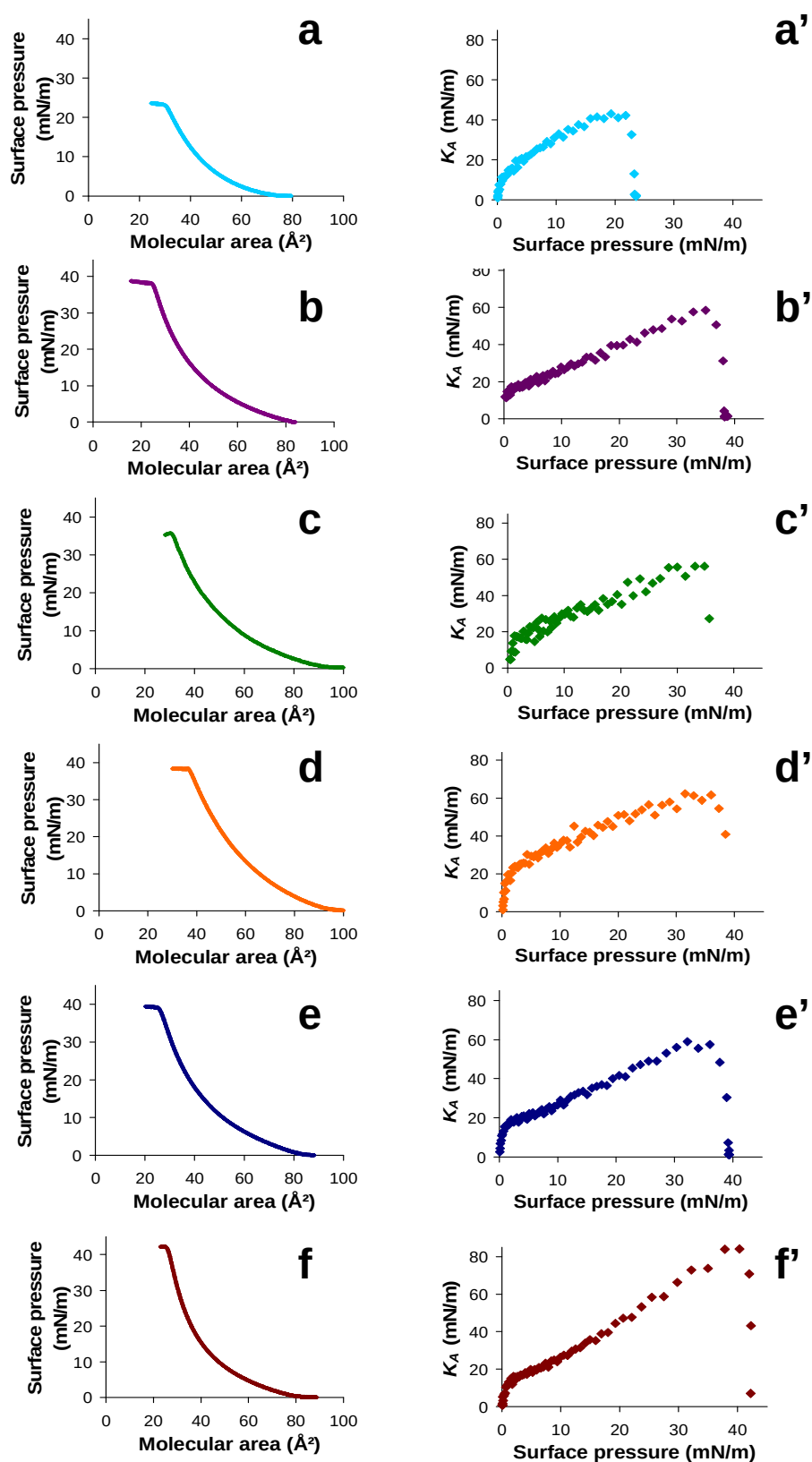


Figure S6. Surface pressure-molecular area compression isotherms and compressibility modulus K_A as a function of surface pressure (recorded at $T = 18^\circ\text{C}$) of nucleolipids monolayers at the air-water interface for the different compounds studied: a) a') squalenic acid, b) b') gemcitabine-Sq, c) c') deoxycytidine-Sq, d) d') deoxycytidine-5'-Sq, e) e') ddC-Sq and f) f') adenosine-Sq.

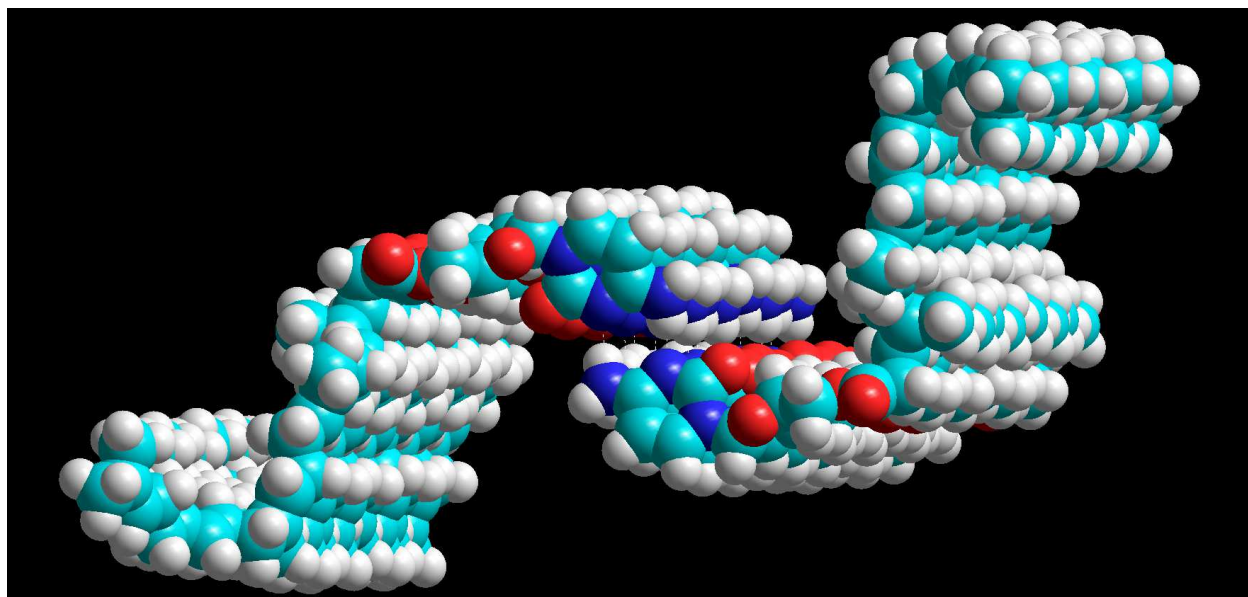


Figure S7: Other view of an assembly of 8 dimeric units of deoxycytidine-5'-Sq.

References

- [1] P. Couvreur, B. Stella, L. H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepître-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J-M. Renoir; L. Cattel, *Nano Letters*, 2006, **6**, 2544-2548.
- [2] J. Caron, E. Lepeltier, L. H. Reddy, S. Lepître-Mouelhi, S. Wack, C. Bourgaux, P. Couvreur, D. Desmaële, *Eur. J. Org. Chem*, 2011, **14**, 2615-2628.
- [3] H. Hillaireau, N. Dereuddre-Bosquet, R. Skanji, F. Bekkara-Aounallah, J. Caron, S. Lepître, S. Argote, L. Bauduin, R. Yousfi, C. Rogez-Kreuz, D. Desmaële, R. Rousseau, R. Gref, K. Andrieux, P. Clayette, P. Couvreur, *Biomaterials*, 2013, **34**, 4831-4838.

IV-Conclusion

Pour conclure sur ce chapitre, lorsque le squalène est greffé sur la nucléobase, de faibles différences de la partie polaire entraînent une variété de structures supramoléculaires : cubiques, hexagonale, éponge, vésicule... En effet, les aires moléculaires de chacune de ces molécules sont sensibles à ces différences, entraînant cette diversité d'auto-assemblages.

Par contre, lorsque le squalène est greffé sur la fonction hydroxyle du sucre en position 5', de relativement grandes différences n'ont eu aucune influence sur l'assemblage de ces molécules amphiphiles : une même phase lamellaire est observée. En vue de la modélisation moléculaire, lorsque le squalène est en 5', les têtes polaires sont « libres » de former des liaisons hydrogènes, telles des bases de l'ADN : dans notre cas, cet appariement favoriserait l'assemblage en lamelles.

Complément d'étude

Chapitre III

Influence de la température

I- DSC

Pour chaque composé, quelques gouttes de suspension ont été déposées dans une capsule en aluminium et soumises à des cycles de chauffage et de refroidissement entre 5°C et 60°C.

Aucune transition de phase n'a été observée, quel que soit le composé (**Figure 1**).

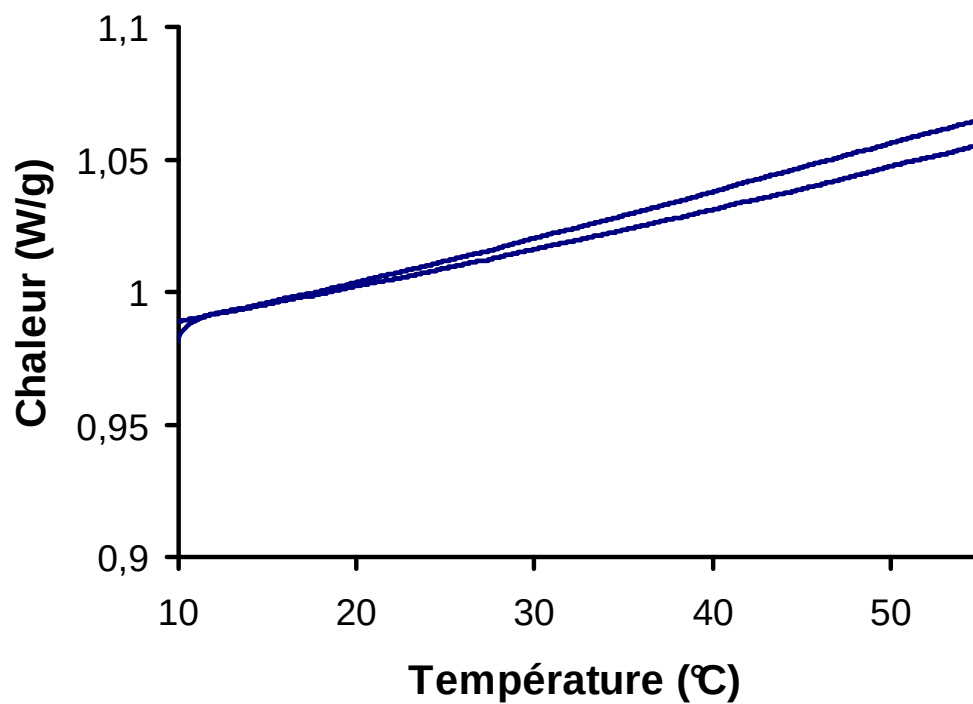


Figure 1 : thermogramme de la déoxycytidine-Sq montrant les deux montées en température.

II- SAXS en température

1) Thymidine-Sq

A 4°C et à 25°C, les nanoparticules présentent la même phase lamellaire, avec pour premier ordre $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ ($d = 39 \text{ \AA}$). Lorsqu'on augmente la température à 60°C, une bosse large apparaît à la même position : la structure initiale est probablement désorganisée par les fluctuations d'ondulation des bicouches sous l'effet de la température (**Figure 2**).

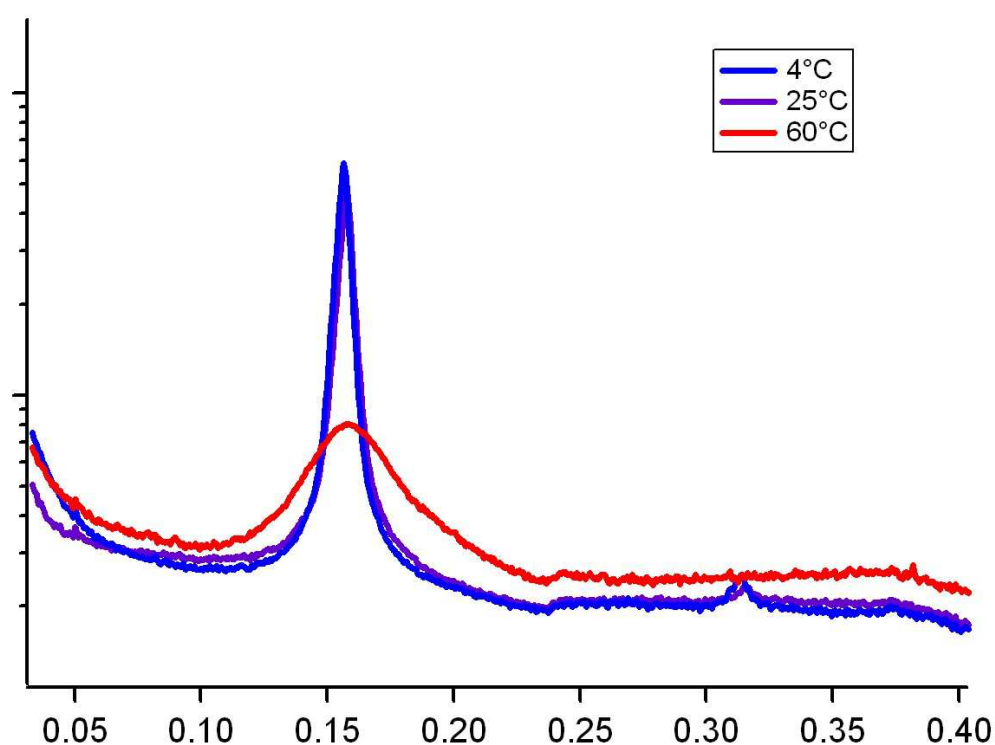


Figure 2 : diffractogrammes de nanoparticules de thymidine-Sq à trois températures : 4°C, 25°C et 60°C.

2) Déoxycytidine-Sq

En ce qui concerne la structure des nanoparticules de déoxycytidine-Sq, la structure $Pn3m$ est conservée quelle que soit la température de l'échantillon. Un léger décalage vers des valeurs plus petites de q à 60°C peut être observé, ce qui révèle une augmentation du paramètre de maille a de la structure avec la température ($a = 103.2 \text{ \AA}$), due à une dilatation de la structure (A. Gerschel, 1995) (**Figure 3**).

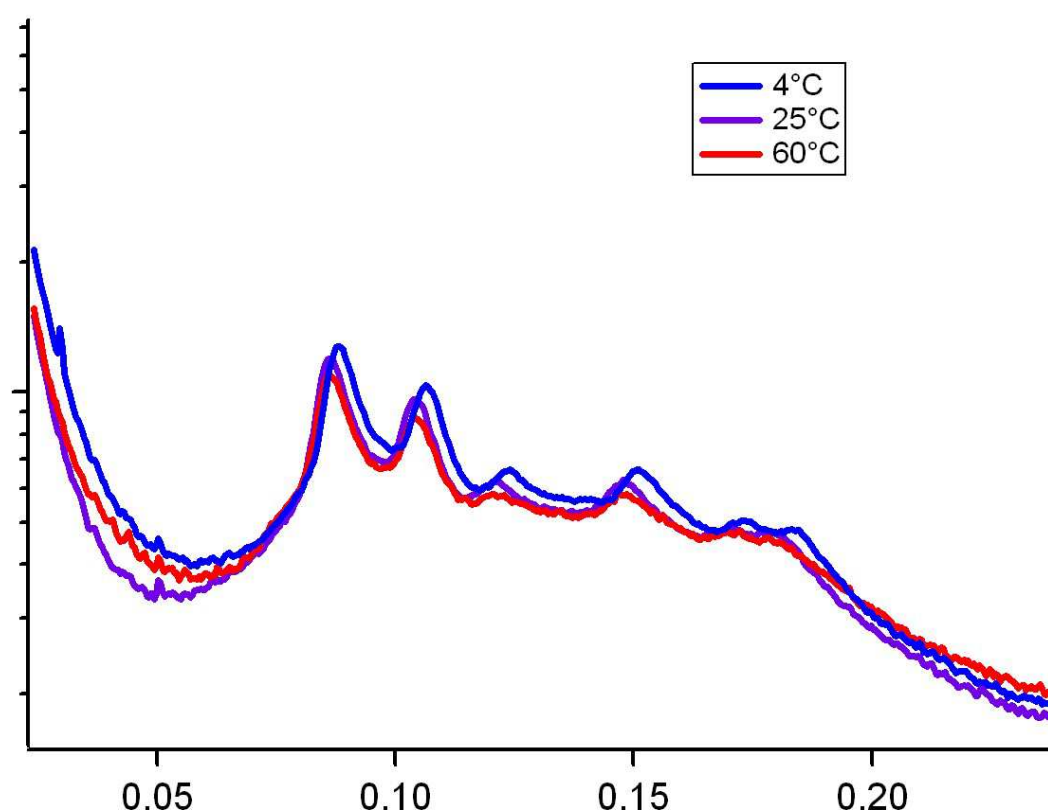


Figure 3 : diffractogrammes de nanoparticules de déoxycytidine-Sq à trois températures : 4°C, 25°C et 60°C.

3) Déoxycytidine-5'-Sq

En augmentant la température, la structure lamellaire des nanoparticules de déoxycytidine-5'-Sq ne semble pas bouger (**Figure 4**).

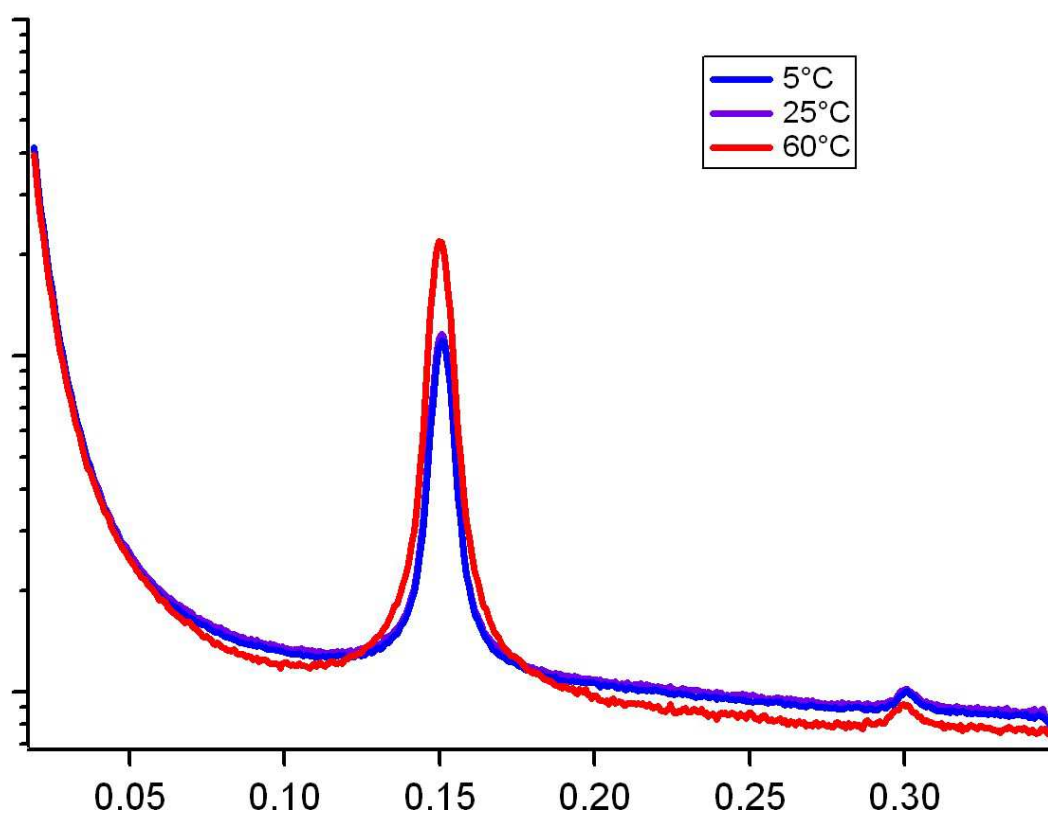


Figure 4 : diffractogrammes de nanoparticules de déoxycytidine-5'-Sq à trois températures : 5°C, 25°C et 60°C.

4) Adénosine-Sq

Les nanoparticules d'adénosine-Sq présentait une autre structure, une structure lamellaire, dans certaines conditions : lorsque le ratio volume d'eau / volume d'éthanol était de 1, lorsque les concentrations dans la phase éthanolique étaient élevées ($> 20 \text{ mg/mL}$) (**Figure 5**).

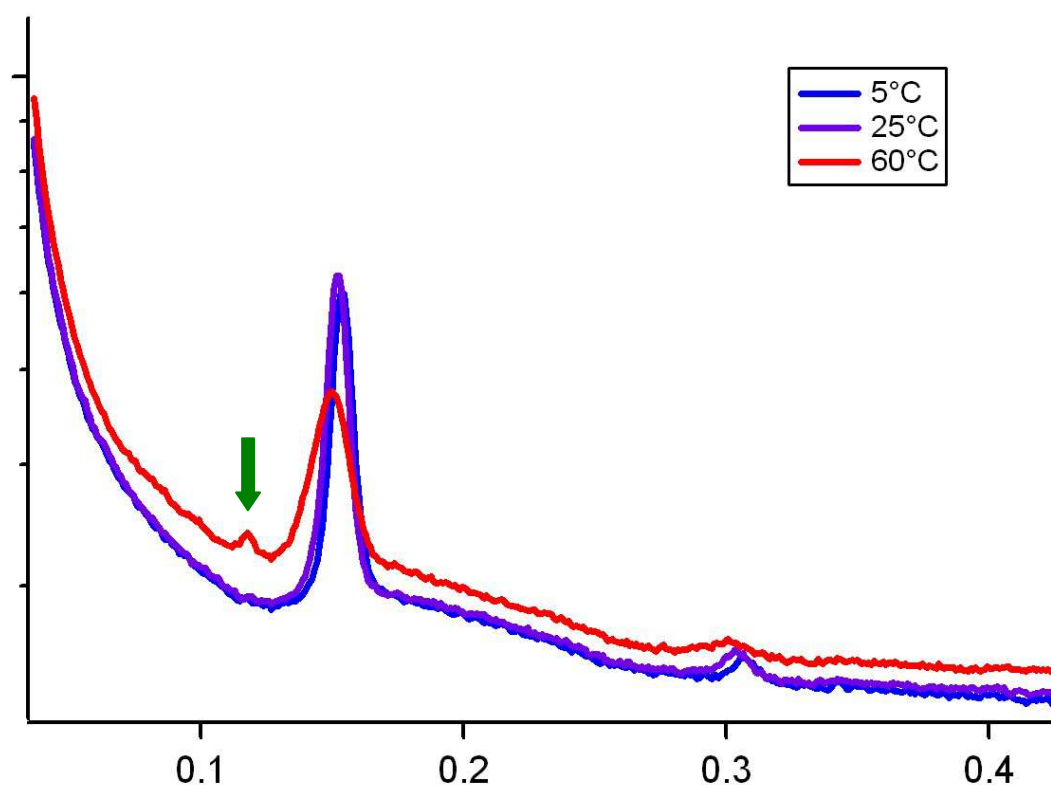


Figure 5 : diffractogrammes de nanoparticules d'adenosine-Sq à trois températures : 5°C, 25°C et 60°C. La flèche verte montre l'apparition d'un pic à 60 °C encore inexpliqué.

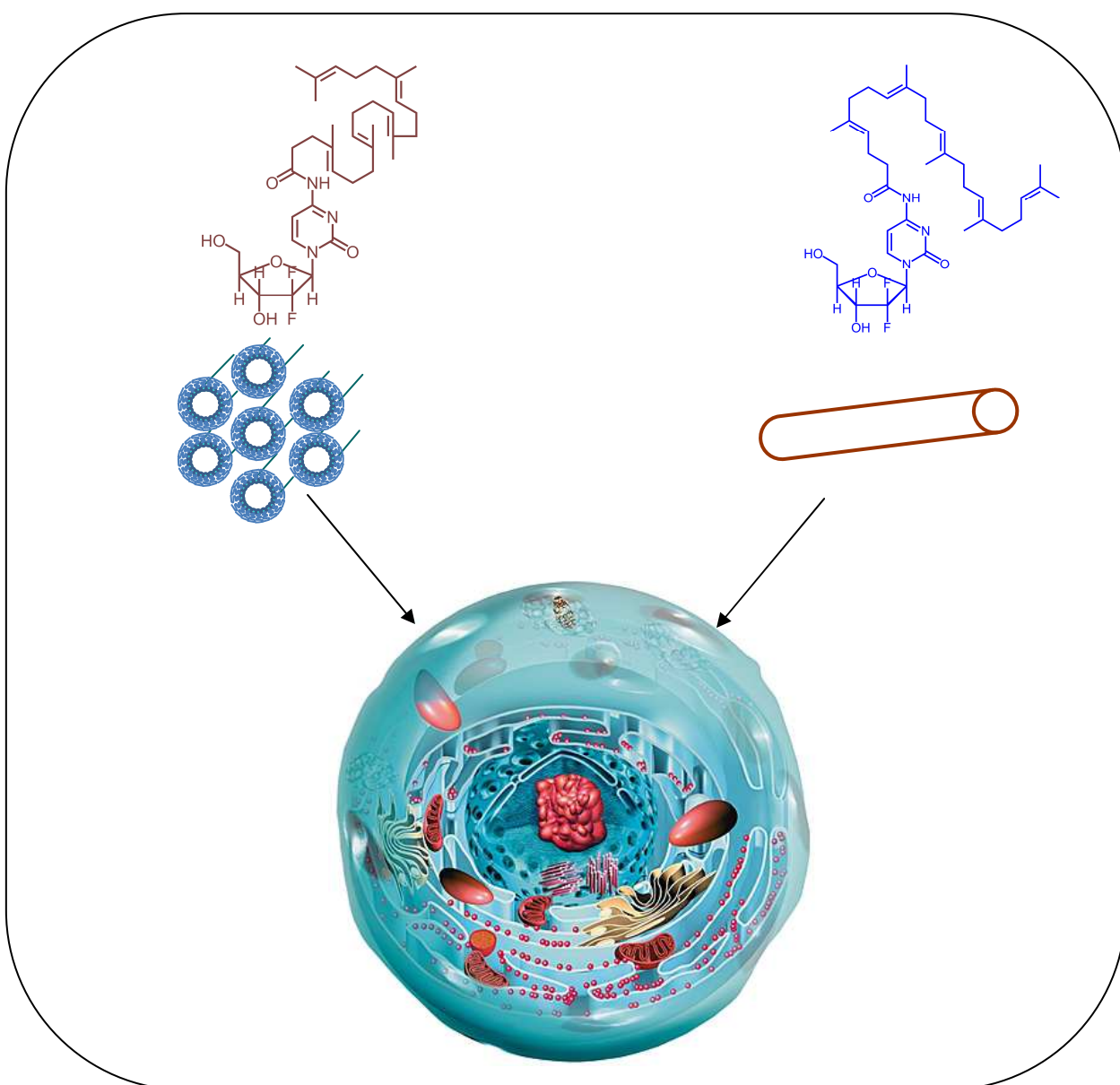
A 5°C, à 25°C et à 60°C, les deux premiers ordres d'une phase lamellaire sont conservés (**Figure 5**), avec comme premier ordre $q = 0.15 \text{ \AA}^{-1}$. Il peut être noté qu'à 60°C, les valeurs de q se décalent vers la gauche ($d = 42.0 \text{ \AA}$). Cependant un nouveau pic encore inexpliqué (flèche verte) apparaît à 60°C.

Références

A. Gerschel, Liaisons intermoléculaires : les forces en jeu dans la matière condensée, *Editions Savoirs Actuels/ CNRS*, (1995).

Chapitre IV

Influence de la longueur de la chaîne
hydrophobe sur la structure
supramoléculaire des nanoparticules et
sur l'internalisation cellulaire



I- Résumé

Après avoir étudié l'influence de la tête polaire sur la structure supramoléculaire des nanoparticules de squalène, la longueur de la chaîne hydrophobe a été modulée : la tête polaire reste la Gemcitabine, et le nombre d'isoprènes varie de 1 à 6 unités (**Figure 1**).

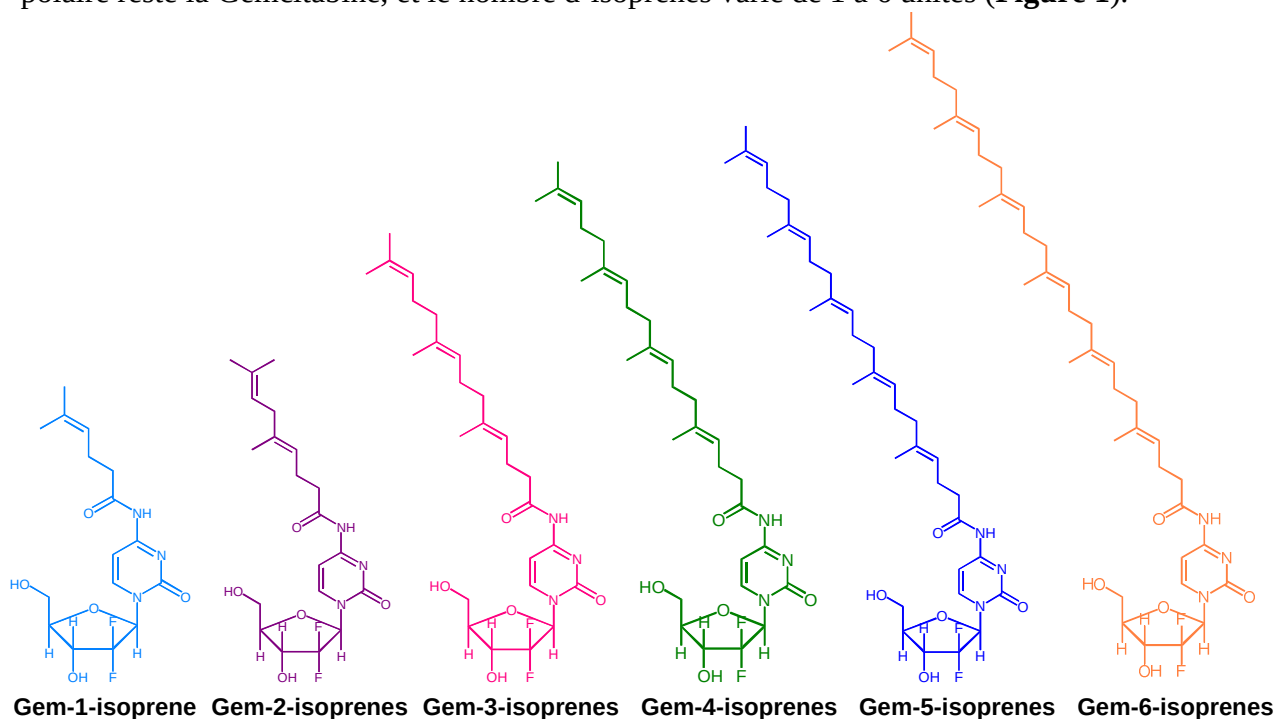


Figure 1 : formules des 6 molécules à l'étude dans ce chapitre.

Dans un premier temps, la Gem-1-isoprène et la Gem-2-isoprènes ont été synthétisées, les autres molécules ont quant à elles été fournies par l'équipe de Didier Desmaële.

La structure supramoléculaire des six suspensions a ensuite été étudiée pour tenter de rationaliser l'auto-assemblage de ces différentes molécules amphiphiles.

Il est intéressant de remarquer que le squalène possède 5 unités isoprènes organisées autour d'un centre de symétrie contrairement à la chaîne 5-isoprènes exposée en **Figure 1** : deux méthyles ne sont pas sur le même carbone (**Figure 2**). Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de ces légères modifications de la chaîne hydrophobe sur la structure supramoléculaire des nanoparticules.

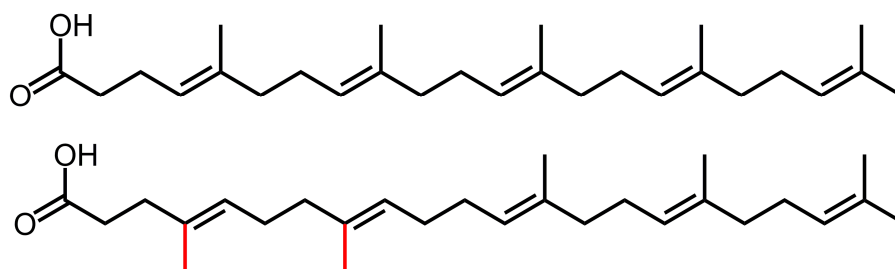


Figure 2 : acide-5-isoprénique en haut et acide squalénique en bas. En rouge : les deux différences de position des méthyles.

Dans l'étude de *A. Maksimenko, 2013*, la cytotoxicité de ces différentes nanoparticules avait été décrite. Sur MiaPaCa-2 (cancer du pancréas humain) et sur B16F10 (mélanome murin) les nanoparticules de Gem-Sq étaient deux fois plus efficaces que les nanoparticules de Gem-5-isoprènes. Nous avons donc ainsi choisi d'approfondir l'étude de ces deux types de nanoparticules pour tenter d'expliquer cette différence de cytotoxicité en nous intéressant à l'internalisation cellulaire.

Enfin, dans le complément d'étude, la cytotoxicité des six suspensions a aussi été évaluée sur des lignées leucémiques murines et humaines, lignées sur lesquelles les nanoparticules de Gem-Sq était relativement actives : CCRF CEM, CEM/ARAC 8C, L1210 et L1210K. Une approche de quantification de l'internalisation cellulaire a été amorcée, dans le but de d'établir une possible relation structure-activité.

II- Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self-assembly: influence of supramolecular organization on their biological activity

Elise Lepeltier[†], Claudie Bourgaux^{*,†}, Andrey Maksimenko[†], Florian Meneau[§], Véronique Rosilio[†], Fatima Zouhiri[†], Didier Desmaële[†], Patrick Couvreur[†].

[†]Univ. Paris-Sud XI, Faculté de Pharmacie, UMR CNRS 8612-Institut Galien Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[§] Synchrotron SOLEIL, l'Orme des Merisiers, 91190 Gif-sur-Yvette, France

1) Introduction

Gemcitabine is a fluorinated cytidine analogue used in clinic against various solid tumours. It is also active against lymphoid and myeloid cancer cell lines. However, its therapeutic potential is restricted by a short plasma half-life due to deamination, a limited intracellular diffusion resulting from its hydrophilicity and the induction of resistance. Indeed, gemcitabine enters cells through specific membrane transporters, whose inactivation induces resistance. In order to protect gemcitabine from metabolic inactivation and to improve cellular uptake by increasing its lipophilicity, gemcitabine has been conjugated to squalene, a natural and biocompatible lipid (*Couvreur 2006*). This triterpene which is an acyclic isoprenoid chain precursor in the biosynthesis of sterols, was covalently linked to the sensitive amine function of gemcitabine, giving the 4-(N)-tris-nor-squalenoyl-gemcitabine bioconjugate (Gem-Sq). This prodrug self-assembled in water as nanoparticles (NPs) with a diameter of about 120-140 nm. After intravenous administration, these Sq-Gem nanoparticles (NPs), with a drug loading of almost 50% w/w, exhibited impressively higher anticancer activity than gemcitabine against both solid subcutaneously grafted tumours (panc-1, L1210 and P388) and aggressive metastatic leukemia (L1210 wt, P388 and RNK-16 LGL) (*Couvreur 2008, Reddy 2008 a,b*).

Thorough studies have shown that the enhanced efficacy of Gem-Sq NPs could be explained by: (i) the better stability of the prodrug in plasma, (ii) an improved intracellular diffusion resulting from the modification of gemcitabine uptake pathway, (iii) the progressive but increased phosphorylation by deoxycytidine kinase after selective activation of the prodrug by cathepsin B, a major enzyme in cancer cells and (iv) the high deposition of Sq-Gem nanoparticles in spleen, liver and lungs, the major metastatic organs in leukemia (*Bildstein 2010 a,b, Reddy 2008a,b, Pili 2010*). Thus, both the amphiphilic nature of the Sq-Gem prodrug and its formulation as nanoparticles contributed to the better anticancer activity of

gemcitabine. This significant improvement of activity has led to extend the concept of squalenoylation to other drugs (*Semiramoth 2012, Raouane 2011, Dosio 2010*).

A series of polyisoprenoyl prodrugs of gemcitabine, considered as an anticancer nucleoside analogue model, has been recently synthesized to clarify the influence of the length of the isoprene moiety on the pharmacological activity of gemcitabine prodrugs (*Maksimenko 2013*). Polyisoprenic acids with 1 to 6 isoprene units have been coupled to gemcitabine (**Figure 1a**). These prodrugs could be formulated as stable nanoassemblies, in pure water for the compounds with longer chains, in 10% trehalose aqueous solution for those with the shorter ones (i.e. with 1 or 2 isoprene units) and in the presence of the surface active squalene conjugated to polyethylene-glycol (Sq-PEG) for the bioconjugate with 3 isoprene units. These nanodrugs displayed cytotoxicity on several cancer cell lines, thus allowing extension of the “squalenoylation” concept to the “terpenoylation” concept. Interestingly, it was observed that the anticancer activity dramatically depended on the length of the polyisoprenoyl chain.

The aim of the present study was to determine the structure of the nanoassemblies constructed with increasing isoprene units with special attention to the supramolecular organization of the bioconjugate with 5 isoprene units which differed from Sq-Gem only in the position of 2 methyl groups (of the hydrophobic chain) (**Figure 1b**). Attempt has been made to establish a relationship between the chemical structure of the prodrug, its supramolecular organization and its pharmacological activity.

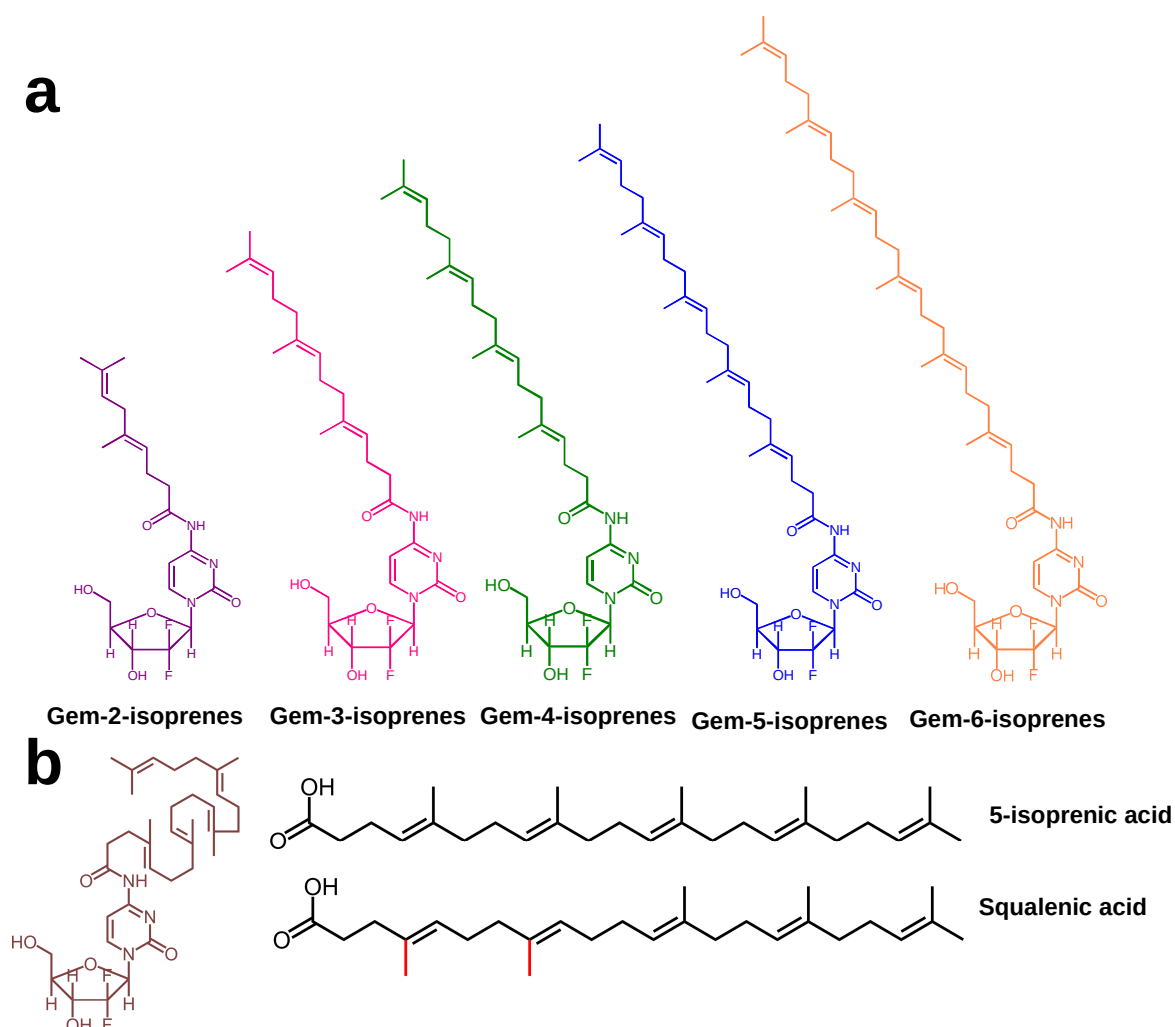


Figure 1: (a) Chemical structures of 5 amphiphilic compounds with the same polar head, Gemcitabine, but with different length of hydrophobic isoprenic chains: 2, 3, 4, 5, 6 isoprene units. (b) Chemical structure of Gem-Sq and comparison between Squalenic acid and 5-isoprenic acid. In red, two methyl groups whose positions differ between molecules.

2) Langmuir monolayers

Polyisoprenoyl prodrugs were spread as monolayers at the air-water interface and compression isotherms were recorded, except for bioconjugates with 1 or 2 isoprene units which did not form stable monolayers at the interface and were solubilized in the subphase upon compression. Large molecular areas at zero pressure corresponded to gas-like state of the amphiphilic molecules. With increasing surface pressure, molecules began to organize and interact at the interface. As shown in **Figure 2a**, Gem-6-isoprenes monolayer reached collapse at a surface pressure of 31.8 mN/m. In contrast, compression of the Gem-3,4,5-isoprenes monolayers gave rise to a transition revealed by a small plateau in the surface

pressure – molecular area (π -A) isotherm and a clearly visible discontinuity in the plot of the monolayer compressibility moduli $K_A = -A d\pi/dA$ versus surface pressure (**Figure 2b**). These monolayers experienced the same transition, from liquid expanded to a more condensed phase, but at different pressures.

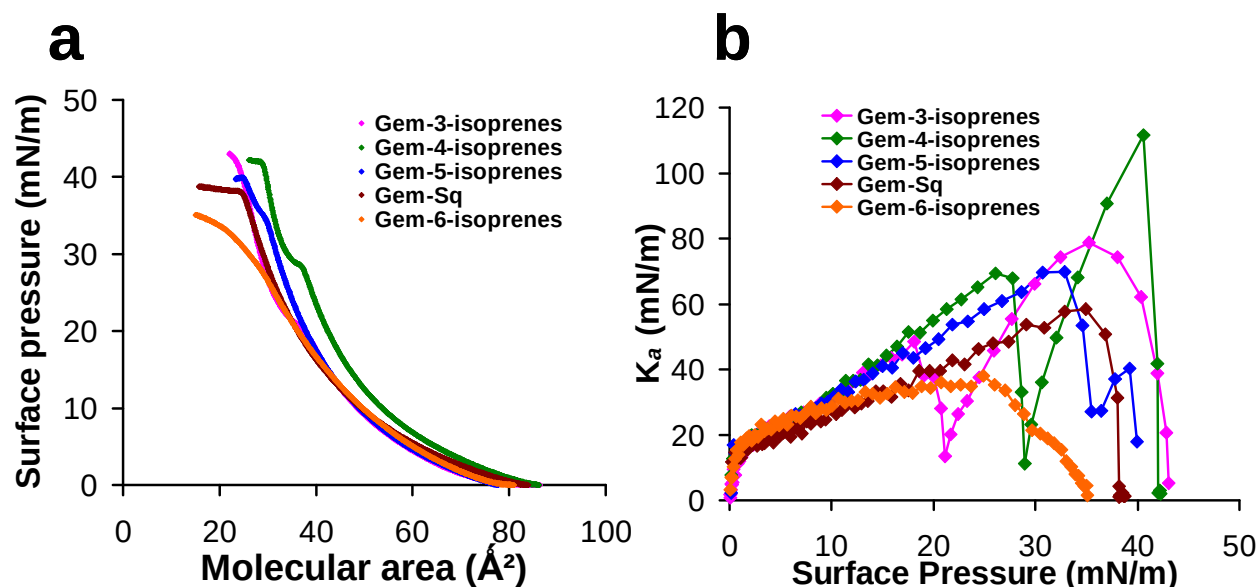


Figure 2: (a) Surface pressure-molecular area compression (π -A) isotherms recorded at $T = 18^\circ\text{C}$ of Gem-3,4,5,6-isoprenes at the air–water interface. (b) Compressibility moduli K_A as a function of surface pressure recorded at $T = 18^\circ\text{C}$ for nucleolipids spread at the air–water interface.

The surface pressure at the onset of this transition increased with increasing isoprene chain length (by about 7 mN/m per isoprene unit) from 21.0 mN/m for Gem-3-isoprenes to 28.8 mN/m for Gem-4-isoprenes and 35.3 mN/m for Gem-5-isoprenes. The collapse was reached at a surface pressure between 39.8 mN/m and 43.0 mN/m, depending on the length of the isoprenoyl chain (**Table 1**). The chain length also influenced in a complex manner the minimum area occupied by the molecules, just before collapse. Gem-4-isoprenes displayed the largest molecular area at collapse, $28.1 \text{ \AA}^2$, while those of Gem-3-isoprenes, Gem-5-isoprenes and Gem-6-isoprenes, respectively 22.0 , 24.1 and $23.7 \text{ \AA}^2$, were close to that of Gem-Sq, $25.0 \text{ \AA}^2$. The compressibility moduli maxima (K_{Amax}) of Gem-3,4,5-isoprenes, comprised in the range 70–112 mN/m, were significantly higher than that of Gem-Sq (58.0 mN/m) and Gem-6-isoprenes (38.0 mN/m) indicating for these isoprene derivatives a higher degree of monolayer organization at the interface. Whereas the other monolayers remained in the liquid-expanded state over the whole surface pressure range, the Gem-4-isoprenes

monolayer reached the liquid-condensed state ($K_A > 100$ mN/m) at about 40 mN/m. It should be noted that Gem-Sq and Gem-5-isoprenes, which differ only in the position of two methyl groups, behaved in a different manner: Gem-Sq monolayer did not undergo any transition up to collapse, and its compressibility modulus remained lower than that of Gem-5-isoprenes. The outcomes from 2-D self-assembly of Gem-terpenoids at the air-water interface highlight the differences in packing properties of squalene and isoprenoid chains.

Compounds	Molecular area at collapse ($\text{\AA}^2$)	Surface pressure at transition (mN/m)	Surface pressure at collapse (mN/m)	K_{aMax}^1 (mN/m)	K_{aMax}^2 (mN/m)
Gem-3-isoprenes	22.0	21.0	43.0	48.4	78.7
Gem-4-isoprenes	28.1	28.8	42.0	69.2	111.6
Gem-5-isoprenes	24.1	35.3	39.8	69.8	40.2
Gem-Sq	25.0	**	38.0	58.0	**
Gem-6-isoprenes	23.7	**	31.8	38.0	**

Table 1: Characteristic values deduced from compression isotherms of polyisoprenes-based nucleolipids monolayers: molecular area at collapse, surface pressure at the transition and at collapse, and maximum compressibility moduli.

3) Nanoprecipitation

When an ethanolic solution of Gem-n-isoprenes was added dropwise to a large volume of water, NPs spontaneously formed whatever the nature of the bioconjugate. However, NPs of prodrugs displaying a short hydrophobic chain precipitated rapidly upon solvent evaporation (Gem-2-isoprenes, Gem-3-isoprenes), or soon after, within one hour (Gem-4-isoprenes). Noteworthy, the amphiphilic nature of prodrugs was not able to stabilize the NPs formed by short chain bioconjugates. The size of Gem-5-isoprenes NPs seemed to increase with time but it could not be accurately measured by quasi-elastic light scattering because of the high aspect ratio of the NPs (see below). The hydrodynamic diameter of Gem-6-isoprenes NPs, measured

immediately after their preparation, was around 110 nm. Gem-6-isoprenes NPs were found stable for 50 days (Supporting Information).

4) Supramolecular organization

The nanoassemblies have been imaged by cryo-TEM and their structure has been further investigated using synchrotron radiation small-angle X-ray scattering.

Cryo-TEM revealed that Gem-2-isoprenes self-assembled as long ribbons. Their length was of the order of micron and their average width was about 20-30 nm. Many of these ribbons tended to wind into helical shapes. A few twisted ribbons were also observed (**Figure 3**).

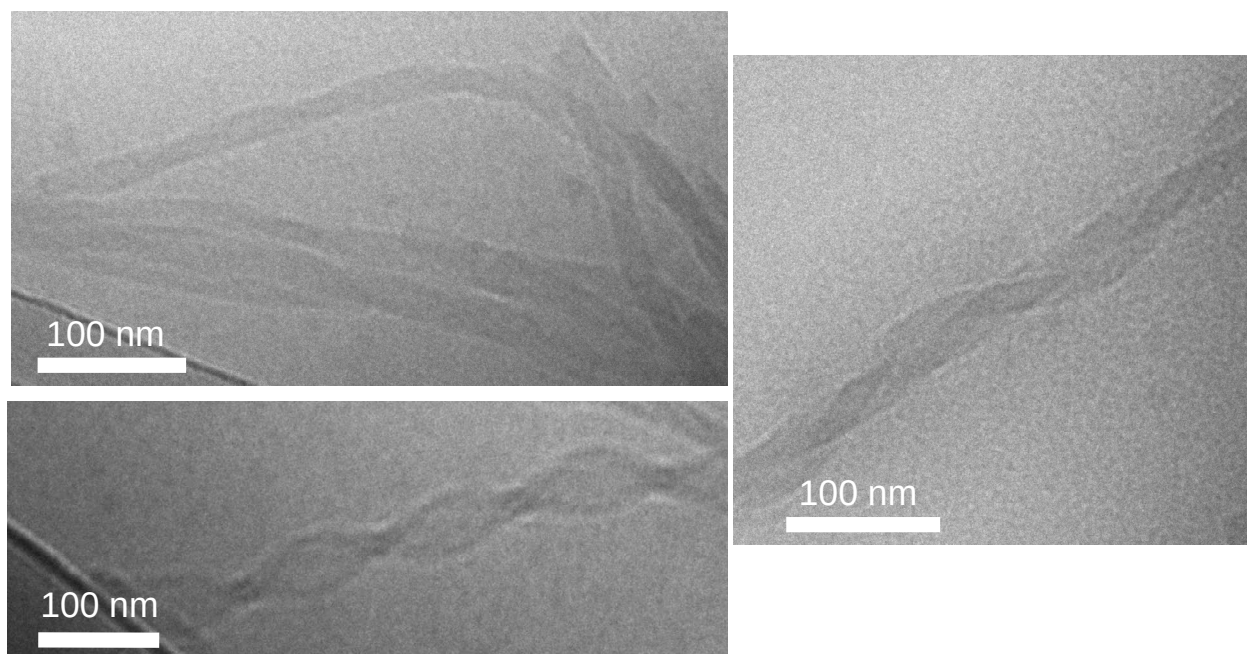


Figure 3: Cryo-TEM images of Gem-2-isoprenes nanoparticles. Several ribbons with an helical shape can be observed and some are twisted.

The SAXS pattern (**Figure 4a**) exhibited a peak at $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ and very weak second and third order reflections at $q = 0.32 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.48 \text{ \AA}^{-1}$, corresponding to a characteristic repeat distance of $d = 39.3 \text{ \AA}$ between stacked ribbons.

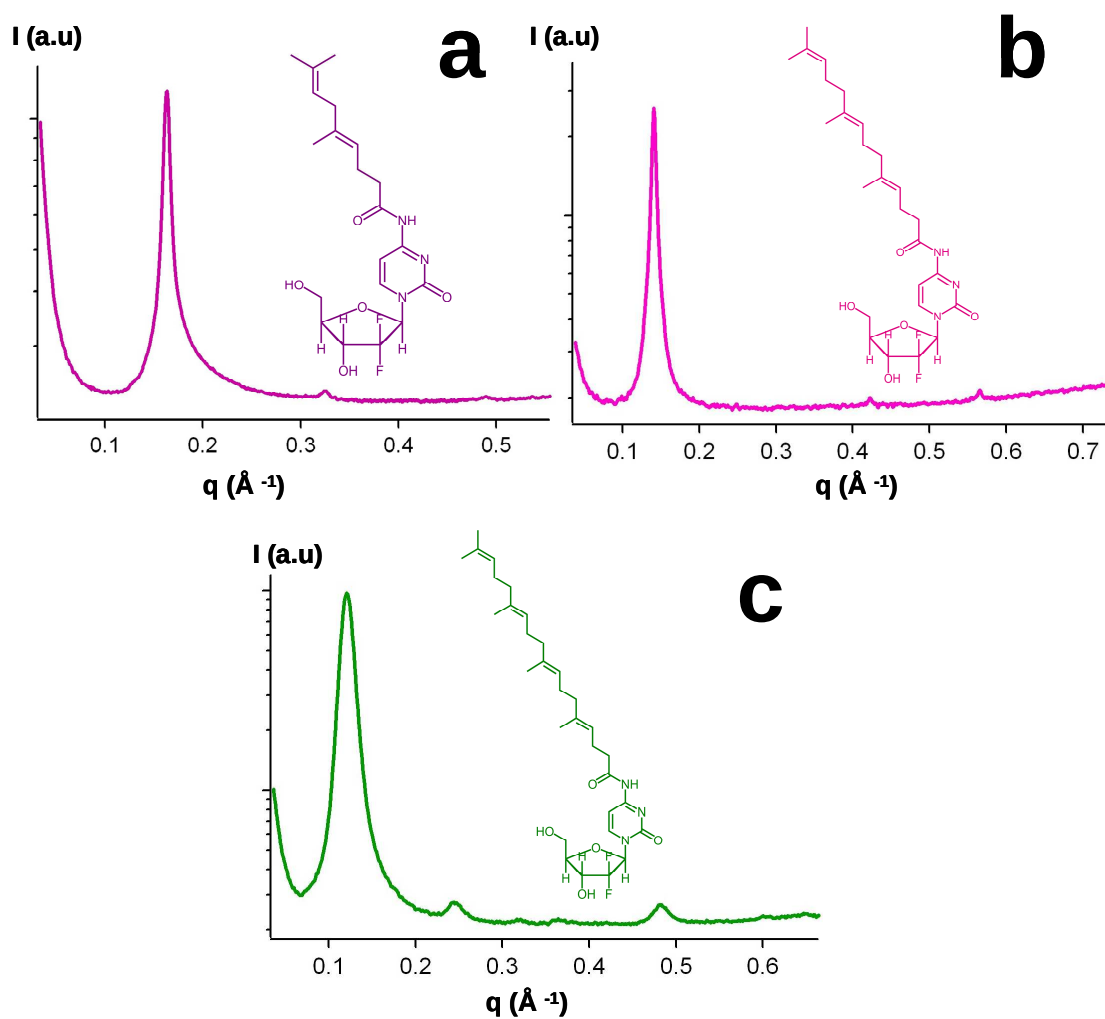


Figure 4: Small-angle X-ray diffraction patterns recorded at room temperature in excess water of: (a) Gem-2-isoprenes nanoparticles, (b) Gem-3-isoprenes nanoparticles and (c) Gem-4-isoprenes nanoparticles.

Gem-3-isoprenes and Gem-4-isoprenes seemed to form very long, rather flexible hollow tubes. Most of these tubes, with mean diameters of $14 \pm 2 \text{ nm}$ for Gem-3-isoprenes and $13 \pm 2 \text{ nm}$ for Gem-4-isoprenes, were stacked in bundles, as shown in **Figure 5**.

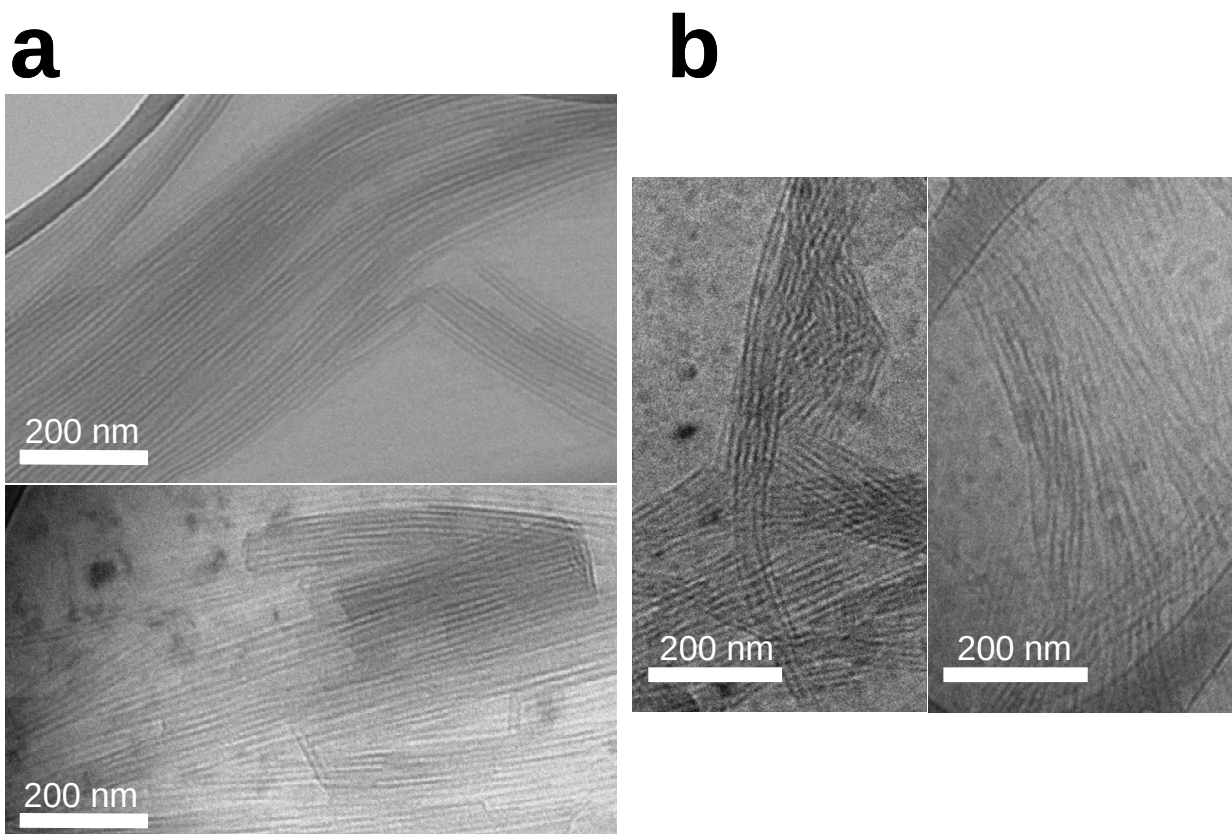


Figure 5: Typical Cryo-TEM images of Gem-3-isoprenes (a) and Gem-4-isoprenes (b) nanoparticles. Flexible tubes are observed and most of these tubes are stacked in bundles.

The SAXS pattern of Gem-3-isoprenes displayed a peak at $q = 0.14 \text{ \AA}^{-1}$ and very weak peaks at $q = 0.42 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.56 \text{ \AA}^{-1}$, corresponding to the 4th and 5th orders of the first reflection (**Figure 4b**). It may be suggested that the correlation length $d = 44.9 \text{ \AA}$ arose from the parallel stacking of tube walls in close contact.

The SAXS curve of Gem-4-isoprenes displayed a peak at $q = 0.12 \text{ \AA}^{-1}$ and small peaks at $q = 0.24 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.48 \text{ \AA}^{-1}$, indicative of a correlation length of $52.3 \text{ \AA}$ (**Figure 4c**).

The correlation length in Gem-3-isoprenes and Gem-4-isoprenes samples increased with the chain length.

Cryo-TEM images of Gem-5-isoprenes nanoparticles revealed the formation of rigid nanotubes with lengths between about 50 nm and several hundreds of nm. It seems that isolated single-walled nanotubes coexisted with multilayered nanotubes and/or single-walled nanotubes sticking together (**Figure 6**). The mean diameter could be estimated as being $\sim 35 \pm 20 \text{ nm}$, depending on the nanoprecipitation conditions. The mean diameter of single-walled nanotubes was about $12 \pm 3 \text{ nm}$.

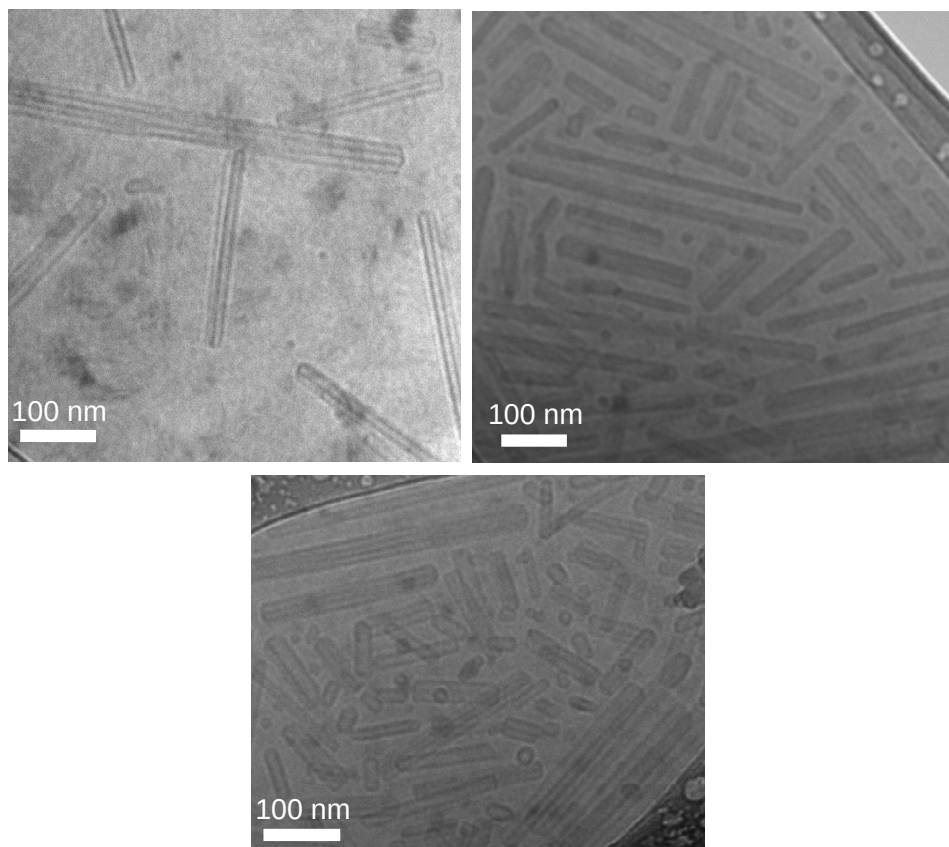


Figure 6: Cryo-TEM images of Gem-5-isoprenes nanoparticles. Rigid nanotubes can be observed, with an inner lamellar organization and/or several nanotubes sticking together.

Whatever the conditions of nanoprecipitation (initial concentration of Gem-5-isoprenes in ethanol and water/ethanol ratio) the SAXS patterns exhibited a peak at $q = 0.12 \text{ \AA}^{-1}$ corresponding to a periodicity of $52.3 \text{ \AA}$. This peak was attributed to the stacking of bilayers forming the nanotubes. Only this peak, along with weak higher orders, could be observed in the more concentrated suspensions (**Figure 7**).

In more dilute suspensions, the scattered intensity also displayed oscillations around $q = 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$, likely arising from the form factor of rigid hollow cylinders (**Figure 7**). Adjusting the radius of the core to $40 \text{ \AA}$ and the thickness of the cylinder wall to $25 \text{ \AA}$ in the expression of the form factor of a core-shell cylinder enabled to approximately reproduce the minima of the SAXS curve at about $0.05 \text{ \AA}^{-1}$, $0.09 \text{ \AA}^{-1}$ and $0.15 \text{ \AA}^{-1}$ (**Figure 7**).

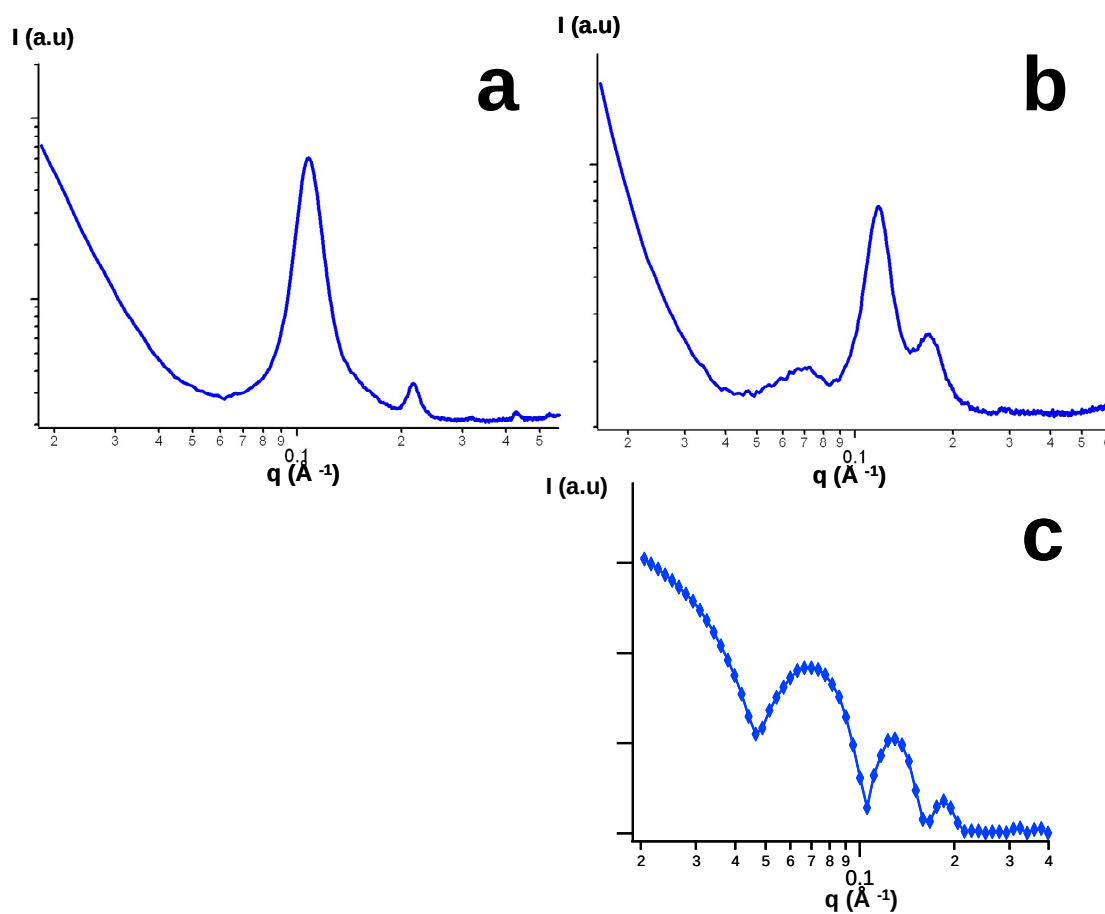


Figure 7: Small-angle X-ray diffraction patterns of Gem-5-isoprenes nanoparticles prepared in different conditions. (a) concentrated suspension (ratio between the volume of water and ethanol equal to 1): the five orders of a lamellar stacking appear. (b) dilute suspensions (ratio equal to 4): the curve displays a strong correlation peak and oscillations assigned to the form factor of tubes. (c) form factor of a hollow cylinder with core radius = 40 $\text{\AA}$ and thickness of the wall = 25 $\text{\AA}$.

The SAXS pattern of Gem-Sq, which has also 5 isoprene units, confirmed the existence of an inverse hexagonal phase with a lattice parameter $a = 87.7 \text{ \AA}$ (**Figure 8**), as previously evidenced (Couvreur 2008).

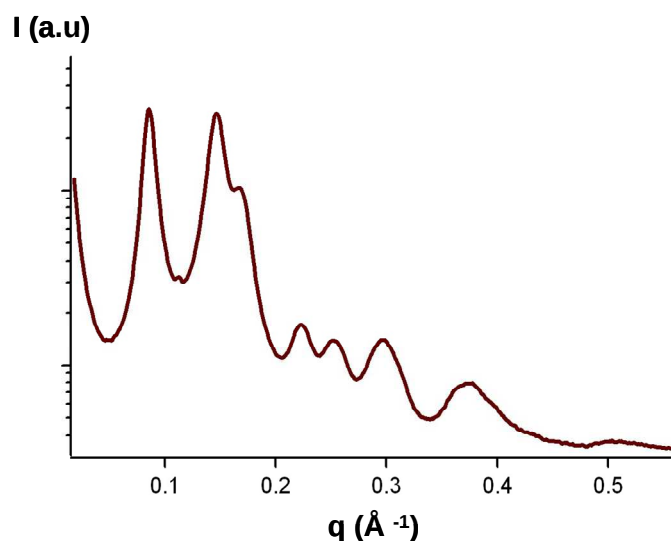


Figure 8: Small-angle X-ray diffraction pattern of Gem-Sq nanoparticles recorded at room temperature in excess water showing an hexagonal structure.

The SAXS pattern of Gem-6-isoprenes exhibited a series of Bragg reflections with an onset at $q = 0.11 \text{ Å}^{-1}$ and q values spaced in the ratios 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$. These peaks indexed as the reflections of an inverse hexagonal phase with lattice parameter $a = 57.1 \text{ Å}$. Cryo-TEM showed nanoparticles with angular shapes, consistent with an hexagonal structure. This phase was formed by cylinders, whose aqueous core was surrounded by gemcitabine molecules coupled to the polyisoprenoid chains, packed on a two-dimensional hexagonal lattice (**Figure 9**).

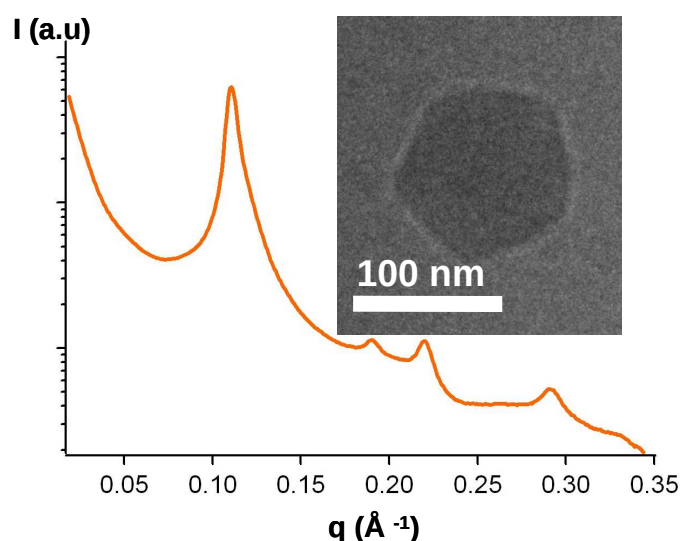


Figure 9: Small-angle X-ray diffraction pattern recorded at room temperature in excess water of Gem-6-isoprenes nanoparticles. Insert: Selected cryo-TEM image of nanoparticle. These data clearly match with a hexagonal structure.

5) Cell internalization and cytotoxicity

The difference in shape of Gem-Sq and Gem-5-isoprenes NPs, with the same drug loading and chemical composition, offered a possibility to study the influence of morphology on the internalization of drug carriers within cells. The cytotoxic activity of these NPs against three human cancer lines (lung cell line A549, breast cell line MCF-7 and pancreatic carcinoma cell line MiaPaCa-2) and one murine cell line (melanoma cell line B16F10) was evaluated, in vitro, in a previous study and confirmed in the current study. In addition, these NPs were also tested against CCRF CEM and L1210 wt cell lines (**Table 2**).

IC ₅₀ (nM)	Mia PaCa-2	B16F10	CCRF CEM	L1210 wt	A549	MCF-7
Gem	25	250	5	3	15	15
Gem-Sq	700	470	23	21	450	550
Gem-5-isoprenes	1400	980	50	17	350	500

Table 2: In vitro cytotoxicity (IC₅₀) of Gem-Sq and Gem-5-isoprenes nanoparticles against various human and murine cancer cell lines. Gemcitabine is used as control.

Interestingly, Gem-Sq NPs displayed a better anticancer activity than Gem-5-isoprenes NPs on two cell lines, MiaPaca-2 and B16F10. The IC₅₀ values (i.e the concentrations required to inhibit cell growth by 50%) were two-fold lower for Gem-Sq than for Gem-5-isoprenes. It was checked that the release of free gemcitabine from NPs in solution containing 90% fetal bovine serum was similar for the two prodrugs. These results suggested that an endocytic pathway, depending on the nature of the cells and NPs, could be considered, in addition to the prodrug uptake mediated by extracellular proteins, as evidenced in previous studies (*Bildstein 2010a*, *Bildstein 2010b*).

The ability of Gem-Sq and Gem-5-isoprenes NPs to be internalized by MiaPaca-2 and B16F10 cells was further investigated by confocal fluorescence microscopy. Cells were incubated with NPs labelled with fluorescent Bodipy-Cholesterol for 1, 4 and 8 hours and then imaged. Noteworthy, the use of this fluorescent tag at a concentration of 0.5 % in the NPs of squalene-derivatives has been previously validated (*Semiramoth 2012*): the hydrophobic cholesteryl ester group of the probe inserted into the NPs core while the Bodipy group provided the fluorescent properties. We have checked that this probe did not induce any significant physico-chemical modification of the particles. When taken up by cells, NPs

appeared as green spots in the median plane of the cells and accumulated along time within the intracellular compartments. Interestingly, **Figure 10 and Figure 11** evidence that Gem-Sq and Gem-5-isoprenes were differently cell internalized. Indeed, whatever the incubation time, the green spots corresponding to Gem-Sq NPs were more numerous in the cytosol of both MiaPaca-2 and B16F10 cells. On the contrary, the fluorescence was more diffuse in cells incubated with Gem-5-isoprenes NPs. These results were consistent with the IC₅₀ values determined by MTT assays and supported the hypothesis that the shape of the NPs could impact on their interaction with cells in culture, since nanotubes with high length- to- radius ratio were found to be less internalized in MiaPaca-2 and B16F10 cells than NPs with more isotropic shapes. It should be noted that Gem-6-isoprenes, which formed hexosomes, also displayed higher toxicity than Gem-5-isoprenes.

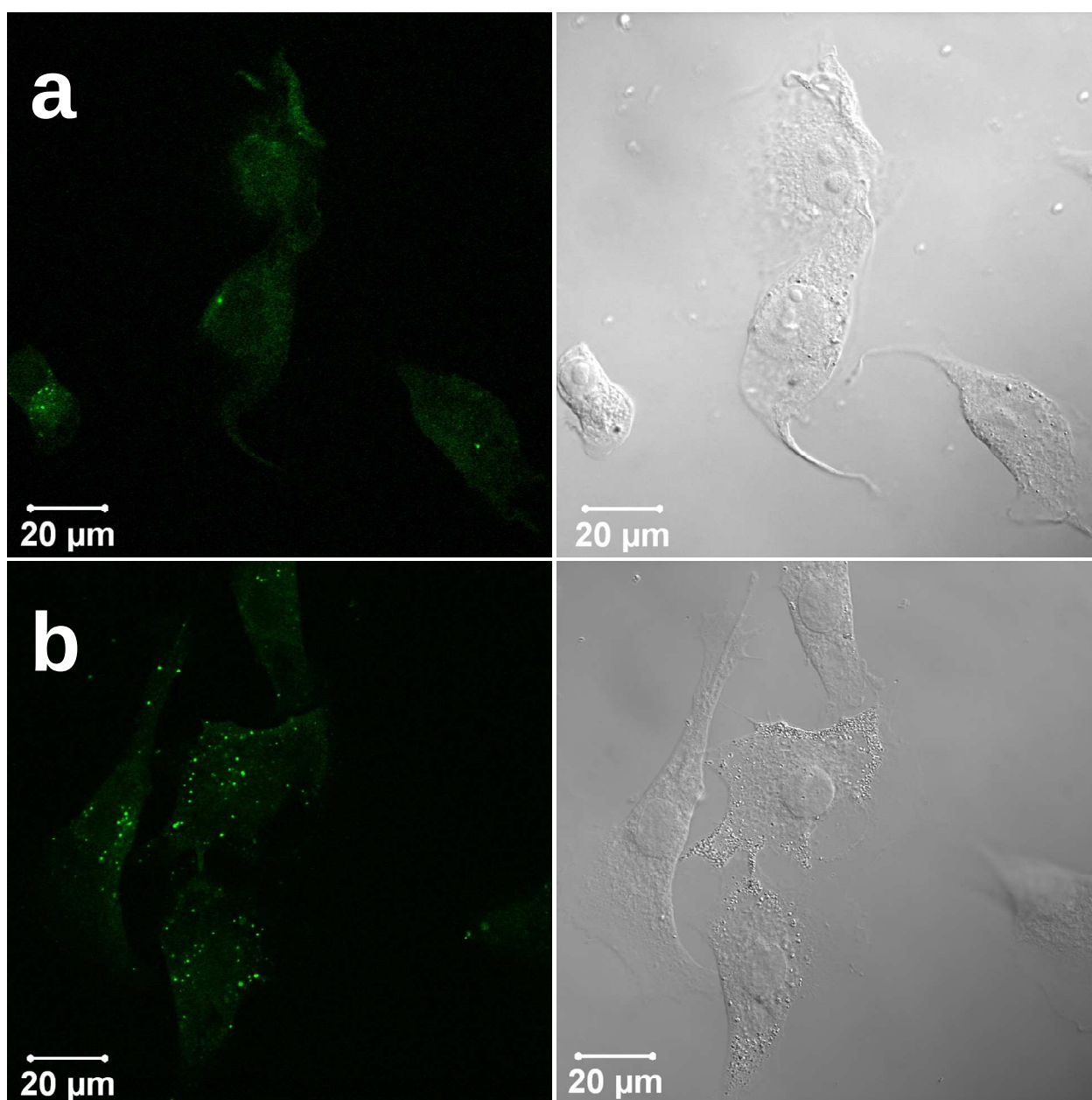


Figure 10: Confocal microscopy images after 4h of incubation of B16F10 cells with: (a) Gem-5-isoprenes nanoparticles and (b) Gem-Sq nanoparticles. The suspensions were prepared with 0.5 % of CholBodiPy and incubated at a concentration of 10 μ M (37°C).

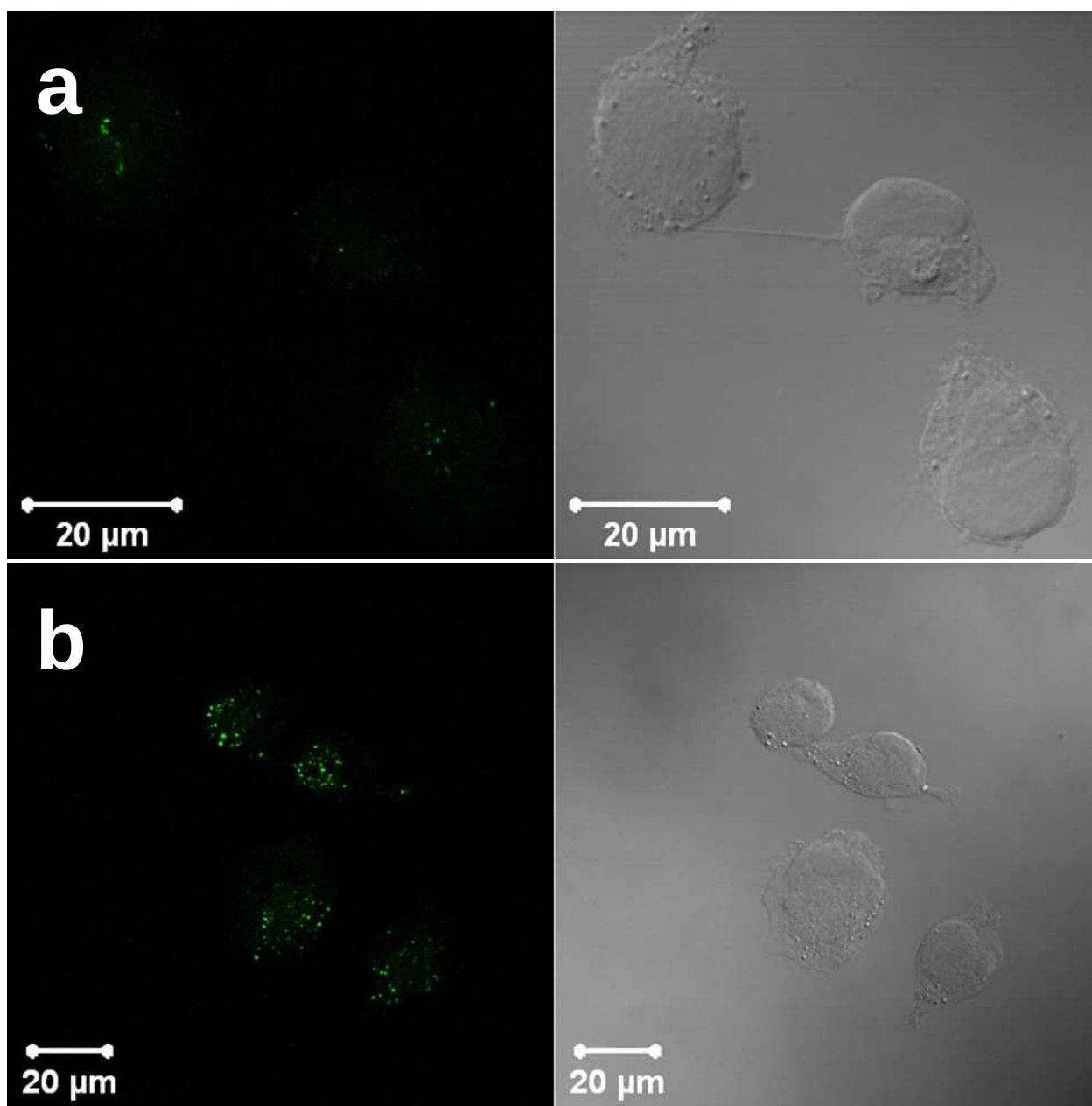


Figure 11: Confocal microscopy images after 4h of incubation of MiaPaCa-2 cells with: (a) Gem-5-isoprenes nanoparticles and (b) Gem-Sq nanoparticles. The suspensions were prepared with 0.5 % of CholBodiPy and incubated at a concentration of 10 μ M (37°C).

6) Discussion

Comparison of prodrugs, based on terpenoid chains with an increasing number of isoprene units, of the same active molecule, gemcitabine, provides unique insight into the influence of

chain length on anticancer activity. It has been found that the activity of prodrugs dramatically depended on the length of the polyisoprenoyl chain.

The pharmacological activity of nanocarriers can be affected by their size, shape and structure and by their stability in aqueous medium. The aim of the current study was therefore to identify factors, related to the chain length, which could impact the prodrug activity.

The stability of NPs increased with the chain length. Only bioconjugates with 5 or 6 isoprene units were able to form stable, long lived, NPs in pure water. Before evaporation of the solvent, the coarsening rate and aggregation of NPs could be limited by a lower interfacial tension and the formation of an adsorbed layer of ethanol. Ostwald ripening, which consists in the growth of the larger particles at the expense of the smaller ones and results from the transport of dissolved solute through the aqueous phase, could be implied in the instability of the NPs suspensions prepared with the shorter isoprene moieties. Indeed, Ostwald ripening could be favoured by the increase of the interfacial tension upon ethanol evaporation and the partial solubility of the short-chain compounds, as suggested by their logP values comprised between 5.37 and 2.04. Conversely, nanoassemblies of long-chain bioconjugates with a lower solubility, as reflected by their logP values (8.43 for Gem-6-isoprens and 7.02 for Gem-5-isoprenes), could be less prone to Ostwald ripening.

Regarding the structure of NPs, bioconjugates containing less than 6 isoprene units displayed nanotubes or ribbons.

Remarkably, Gem-Sq and Gem-5-isoprenes, which differ only in the position of two methyl groups on the hydrophobic chain, exhibited a striking difference in their supramolecular organization. Whereas Gem-Sq formed an inverse hexagonal structure, Gem-5-isoprenes molecules self-assembled as nanotubes.

The inner structure of Gem-Sq NPs has been explained by the wedge shape of the molecules, as described by the packing parameter, $p = V / (A_0 \times l)$ where V is the volume of the hydrocarbon chain (s), l is the maximum effective hydrocarbon chain length and A_0 is the optimal surface area per molecule at the polar – apolar interface. The $p > 1$ value favors aggregates with inverse curvature, such as the inverse hexagonal phase.

The compression isotherm of the Gem-5-isoprenes monolayer, which highlighted a condensed state at high surface pressure, suggests that the replacement of the squalene by the 5-isoprenes chain resulted in a higher rigidity of the prodrug chain. This higher rigidity could hinder the formation of an inverse hexagonal structure, even if it is allowed by the packing parameter. Indeed, the volume fraction filled by close packed cylinders is $\pi/\sqrt{12} \sim 0.91$ and, consequently, the chains have to deform to fill the interstices between cylinders in H_{II} phase.

Chains oriented towards the corners of the hexagonal unit cell display the largest length, l_{max} , while those perpendicular to the faces have the shortest, l_{min} . Assuming that chains act as harmonic springs, the cost in energy to stretch or compress a chain, whose equilibrium length is l_e , to the length l can be expressed as $k(l - l_e)^2$, where k is the stretching rigidity of the chain. If the chain packing energy in the inverse hexagonal phase, estimated from this crude model, is too high, the system may therefore be forced to adopt a different structure (*Shearman 2006*) and the formation of nanotubes could be favored. Noteworthy, as reported by Shimizu, some wedge-shaped amphiphilic lipids have been found prone to self-assemble into hollow cylinders (*Shimizu 2005*).

The self-assembly of an inverse hexagonal phase is observed when the isoprenoid chain coupled to gemcitabine comprises six units. Noteworthy, the lattice parameter of the Gem-6-isoprenes H_{II} phase, 57.1 Å, is significantly smaller than that of the Gem-Sq H_{II} phase (87.7 Å). A smaller lattice parameter reduces chain packing frustration since the volume of voids between close packed cylinders and the variation in chain length around the aqueous core decrease. The maximum variation in chain length, $l_{max} - l_{min}$, is determined by the lattice parameter a : $l_{max} - l_{min} = a(1/\sqrt{3} - 1/2) \sim 0.07735a$ (*Yaghmur 2007*). Furthermore, long chains are able to extend more easily than shorter ones to fill the voids. Taken together, these factors may explain why the formation of an inverse hexagonal phase is allowed for Gem-6-isoprenes.

Results from 2D and 3D self-assembly of gemcitabine prodrugs revealed that the symmetrical distribution of the double bonds in squalene chain gives it remarkable properties, different from those of a regular polyisoprenyl chain.

The internalization of nanoparticles and, ultimately, their pharmacological activity when they are loaded with drug, depends on their size and shape, among other features such as surface properties and charge (*Hillaireau 2009, Decuzzi 2009, Simone 2008, Gratton 2008*). Regarding the influence of the particle shape, no general tendency emerges from previous reports on model polymeric or gold nanoparticles. This might be explained by the existence of multiple endocytic pathways, the importance of the NPs size for cellular uptake and the difficulty to compare the size of nanoparticles with very different shapes. However, some experiments agree with our observations: it has been shown that gold nano-rods with high length- to- radius ratio are internalized in HeLa cells in a smaller proportion compared to shorter ones (*Qiu 2010*) or spherical NPs (*Chitrani 2006*) and that a macrophage only spreads on an ellipsoid-shaped polymeric NP when it is attached to the elongated region of the particle (*Champion 2006*).

It should be emphasized that, beside the geometry and structure of the NPs, the interactions of the individual prodrug molecules with cell membranes could also play a key role in the activity of the prodrugs, thus contributing to explain their differences of cytotoxicity.

In conclusion, this study has shown the influence of the length of the terpene chain on both the stability and the structure of the resulting nanoassemblies, spontaneously formed by polyisoprenoyl gemcitabine conjugates upon nanoprecipitation. The important role of the specific properties of squalene has been highlighted by the comparison of the supramolecular structures of Gem-Sq and Gem-5-isoprenes, which differ only in the position of two methyl groups on the hydrophobic chain. Further, the impact of the structure on the cell capture and cytotoxicity has been demonstrated.

7) Materials and methods

Synthesis of molecules

The synthesis of Gemcitabine-2,3,4,5,6-isoprenes (**Figure 1**) was described previously (*Maksimenko, 2013*). Briefly, the gemcitabine was protected in 3' and 5' hydroxyl positions by tert-Butyldimethylsilyl chloride, then the corresponding polyisoprenic acid was coupled and finally, deprotection was done with tetrabutylammonium fluoride (TBAF).

Preparation of nanoparticles

The nanoparticles were prepared by nanoprecipitation. Briefly, compounds were dissolved in ethanol (5-15 mg in 0.5 mL of ethanol). This solution was added dropwise under stirring (500 rpm) into water. The volume ratio between the aqueous and organic phases was 3 or 4. Ethanol was then evaporated using a Rotavapor[®] instrument. Formation of the nanoassemblies occurred spontaneously for 2 compounds, for the others, aggregation was observed. Fluorescent NAs were prepared using the same procedure, except that Cholesteryl BodiPy[®] FL C12 was dissolved at a concentration of 0.01 mg/ml in ethanol (Gemcitabine-5-isoprenes and Gem-Sq at a concentration of 2 mg/ml). Then, the nanoprecipitation was performed as described before for the non fluorescent NAs.

Langmuir film balance

A computer-controlled Langmuir trough coupled to a Wilhelmy plate device (KSV Nima, Finland) was used to record compression isotherms of Gemcitabine-polyisoprenes monolayers. Nucleolipids were spread from chloroform solutions onto pure water (775.75 cm²) maintained at 18°C. After deposition of a solution, the solvent was allowed to evaporate for 15 min before the beginning of the compression. Two Teflon barriers compressed the monolayer symmetrically at the same rate (10 mm min⁻¹) from opposite sides of the trough. The reported π -A values are mean values of three measurements. The value of monolayer isothermal compressibility modulus K_A at a given surface pressure π was deduced from the π – A relationship: $K_A = -A d\pi/dA$.

Small-angle X-ray scattering.

Suspensions of nanoparticles were loaded into quartz capillaries (diameter 1.5 mm, Glas Müller, Berlin, Germany). The top of the capillaries was sealed by a drop of paraffin to prevent water evaporation. X-ray scattering experiments were performed on the Austrian synchrotron beamline at ELETTRA and on the SWING beamline at SOLEIL. The scattered intensity was reported as a function of the scattering vector $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ the wavelength of the incident beam. For both instruments the calibration of the q range was carried out with silver behenate. The Austrian SAXS beamline was operated at 8 keV. SAXS patterns were recorded using a position sensitive linear gas detector, argon-ethane filled, with sample-detector distance of 1 m. Exposure times were typically 300 s. On SWING beamline operated at 11 keV, the data were collected by a two-dimensional CCD detector. Exposure times were typically 10 s. Intensity values were normalized to account for beam intensity, acquisition time and sample transmission. Each powder-like diffraction pattern, displaying a series of concentric rings, was then integrated circularly to yield the intensity as a function of q . The scattered intensity from a capillary filled with water was subtracted from the sample scattering curves.

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM).

The Cryo-TEM investigations were performed with a Cryo-TEM (JEOL 2100) electron microscope, at the “Service de Microscopie Electronique de l’Institut de Biologie Intégrative” (IFR 83 CNRS, Paris). Practically, a drop (4 μ L) of the (2 mg mL⁻¹) sample was deposited on

a carbon-coated copper grid. Excess liquid was removed with a blotting filter paper and the sample was quickly vitrified by plunging it into liquid ethane, using a guillotine-like frame. The sample was then transferred to a cryo-sample holder. Observations were made at an accelerating voltage of 200 kV under low electron dose. Analysis was performed with the ImageJ software.

Cell Culture

Murine melanoma cell line B16F10, human pancreatic carcinoma cell line MiaPaCa-2, human leukemia cell line (CCRF CEM) and murine lymphocytic leukemia cell line (L1210 wt) were obtained from the American Type Culture Collection and maintained as recommended. B16F10 cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) – Glutamine medium and supplemented 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (56 °C, 30 min), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Medium for MiaPaCa-2 cell line was supplemented additionally with 2.5% heat-inactivated horse serum (Gibco) (56 °C, 30 min). L1210 wt and CCRF CEM cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were maintained in a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO₂.

Cell proliferation assay

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was used to test cytotoxicity of Gem-Sq and Gem-5-isoprene prodrug nanoassemblies. Briefly, 3.10^3 of MiaPaCa-2, 2.10^3 of B16F10 cells per well were incubated in 200 µL medium containing 10% FBS in 96-well plates for 24 h. 1.10^4 of CCRF CEM and L1210 wt cells per well were incubated in 90 µL medium in 96-well plates. The cells were then exposed to series concentrations of Gem-Sq, Gem-5-isoprenes, squalenic acid, 5-isoprenic acid nanoparticles or free gemcitabine for 72 h. After drug exposition, the medium was removed and 100 µL of MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM or RPMI containing 10% FBS) was added to each well. The plates were incubated for 2 h at 37 °C and 100 µL of 20% SDS solution was then added to each well for 24 h at 37 °C. Absorbance was measured at 570 nm using a plate reader (Metertech R 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France). The percentage of surviving cells was calculated as the absorbance ratio of treated to untreated cells. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of the treatments was determined from the dose–response curve. All experiments

were set up in quadruplicate to determine means and SDs. No toxic effects were observed for squalenic acid and 5-isoprenic acid.

Confocal microscopy

B16F10 and MiaPaCa-2 cells were grown for 24 h on 16-mm round cover glasses and placed in the wells of a 6-well plate (seeding density of 100 000 cells per well). After changing the medium, suspensions were incubated during the adequate time (1h, 4h and 8h), with a final concentration of 10 μ mol/L. Cells were rinsed with PBS, and fixed with PFA 3% for 20 min. Then, cells were rinsed twice with NH₄Cl (50 mM) and twice with PBS. Cover glasses were removed, mounted on slide with Fluoroprep. Confocal microscopy was performed on the LSM510 Meta microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 63 $\times$ oil immersion objective of Plan-Apochromat. The 488 nm 30 mW argon laser was used.

References

Bekkara-Aounallah, F.; Gref, R.; Othman, M.; Reddy, L. H.; Pili, B.; Allain, V.; Bourgaux, C.; Hillaireau, H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Nicolas, J.; Chafi, N.; Couvreur, P. Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3715–3725.

Bildstein, L.; Dubernet, C.; Marsaud, V.; Chacun, H.; Nicolas, V.; Gueutin, C.; Sarasin, A.; Bénech, H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, C.; Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: An original drug delivery pathway. *Journal of Controlled Release* **2010**, *147*, 163–170.

Bildstein, L.; Marsaud, V.; Chacun, H.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaele, D.; Couvreur, P.; Dubernet, C. Extracellular-protein-enhanced cellular uptake of squalenoyl gemcitabine from nanoassemblies. *Soft Matter* **2010**, *6*, 5570–5580.

Caron, J.; Lepeltier, E.; Reddy, L. H.; Lepetre-Mouelhi, S.; Wack, S.; Bourgaux, C.; Couvreur, P.; Desmaële, D. Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation, *Europ. J. Organ. Chem.* **2011**, *14*, 2615-2628.

Champion J. A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *PNAS* **2006**, *103*, 4930-4934.

Chitrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.*, **2006**, *6*, 662-668.

Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W.; Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1542-1550.

Couvreur, P.; Stella, B.; Reddy, L. H.; Hillaireau, H.; Dubernet, C.; Desmaële, D.; Lepître-Mouelhi, S.; Rocco, F.; Dereuddre-Bosquet, N.; Clayette, P.; Rosilio, V.; Marsaud, V.; Renoir, J-M.; Cattel L. Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics., *Nano Lett.* **2006**, 6, 2544-2548.

Couvreur, P.; Reddy, L. H.; Mangenot, S.; Poupert, J. H.; Desmaële, D.; Lepître-Mouelhi, S.; Pili, B.; Bourgaux, C.; Amenitsch, H.; Ollivon, M. Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small* **2008**, 4, 247-253.

Decuzzi, P.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Ferrari, M. Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?. *Pharm. Res.*, **2009**, 26, 1, 235-243.

Dosio, F.; Reddy, L. H.; Ferrero, A.; Stella, B.; Cattel, L.; Couvreur, P.; Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl-Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1349–1361.

Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 2873-2896.

Maksimenko, A.; Mougin, J.; Mura, S.; Sliwinski, E.; Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Lepître, S.; Zouhiri, F.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy. *Cancer Letters* **2013**, 334, 346-353.

Pili, B.; Bourgaux, C.; Amenitsch, H.; Keller, G.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P.; Ollivon, M.; Interaction of a new anticancer prodrug, gemcitabine–squalene, with amodel membrane Coupled DSC and XRD study, *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1798, 1522–1532.

Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **2010**, 31, 7606-7619.

Raouane, M.; Desmaële, D.; Gilbert-Sirieix, M.; Gueutin, C.; Zouhiri, F.; Bourgaux, C.; Lepeltier, E.; Gref, R.; Ben Salah, R.; Clayman, G.; Massade, L.; Couvreur, P.; Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4067–4076.

Reddy, L. H.; Ferreira, H.; Dubernet, C.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Rousseau B.; Couvreur. Squalenoyl nanomedicine of gemcitabine is more potent after oral administration in leukemia-bearing rats: study of mechanisms. *Anti-Cancer Drugs* **2008**, 19, 999-1006.

Reddy, L. H.; Marque, P-E.; Dubernet, C.; Lepître-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types. *J. Pharm. Exp. Therapeut.* **2008**, 325, 484–490.

Semiramo, N.; Di Meo, C.; Zouhiri, F.; Saïd-Hassane, F.; Valetti, S.; Gorges, R.; Nicolas, V.; Poupaert, J. H.; Chollet-Martin, S.; Desmaële, D.; Gref, R.; Couvreur, P. Self-assembled penicillin bioconjugates: an original approach for the treatment of intracellular infections. *ACS Nano*, **2012**, 6, 3820-3831.

Shearman, G.; Ces, O.; Templer, R.; Seddon, J. Inverse lyotropic phases of lipids and membrane curvature. *J. Phys.: Condens. Matter*. **2006**, 18, 1105-1124.

Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, Supramolecular nanotube architectures based on amphiphilic molecules. *H. Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1401-14443.

Simone, E. A.; Dziubla, T. D.; Muzykantov, V. R. Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, 5, 1283-1300.

Yagmur, A.; Laggner, P.; Zhang, S.; Rappolt, M. Tuning Curvature and Stability of Monoolein Bilayers by Designer Lipid-Like Peptide Surfactants. *PloS ONE*, **2007**, 5, e479.

III- Supporting Information

Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self-assembly: influence of the supramolecular organization on the biological activity

Elise Lepeltier[†], Claudie Bourgaux^{*,†}, Andrey Maksimenko[†], Florian Meneau[§], Véronique Rosilio[†], Fatima Zouhiri[†], Didier Desmaële[†], Patrick Couvreur[†].

[†]Univ. Paris-Sud XI, Faculté de Pharmacie, UMR CNRS 8612-Institut Galien
Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[§] Synchrotron SOLEIL, l'Orme des Merisiers, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Corresponding Author:

*claudie.bourgaux@u-psud.fr

Results

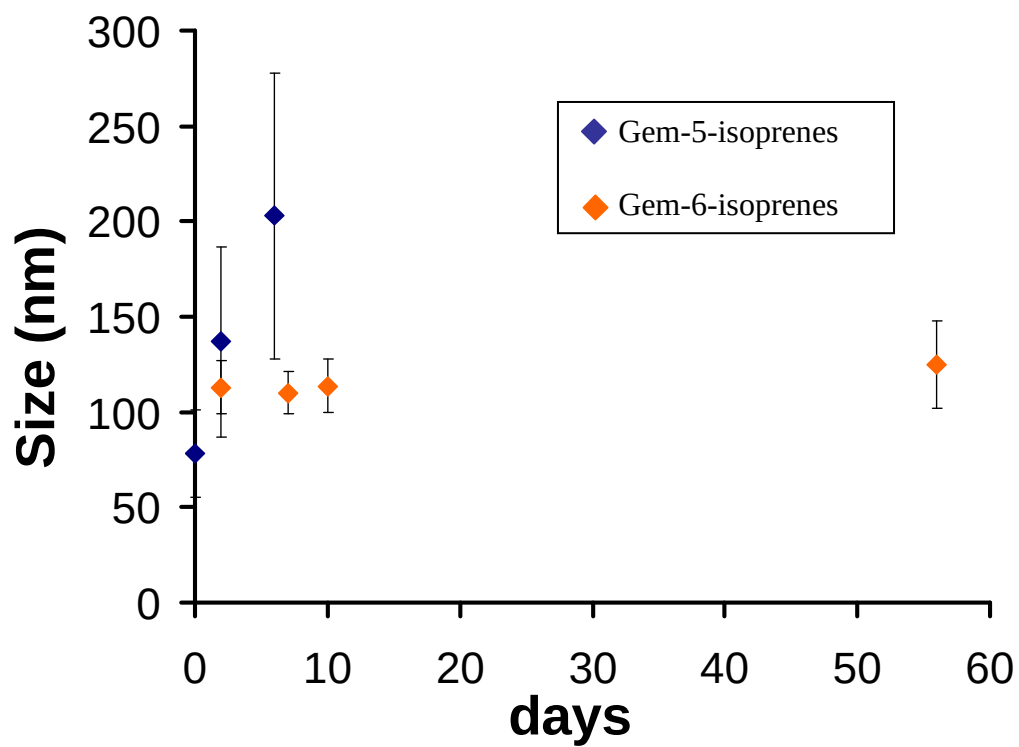


Figure S1. Stability of nanoparticles ($\sim 1.10^{-3}$ mol L $^{-1}$) in water at room temperature. The mean diameter of nanoparticles, determined by DLS, is the average of three measurements.

IV-Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse de deux molécules a été réalisée. Il a été montré que la longueur de la chaîne hydrophobe greffée à une même tête polaire avait une influence sur la stabilité des nanoparticules dans l'eau, sur l'assemblage de ces molécules en film mince à l'interface air-eau, mais aussi sur la structure supramoléculaire des nanoparticules.

En comparant les nanoparticules de Gem-Sq et de Gem-5-isoprènes qui possèdent une organisation supramoléculaire distincte, des différences d'internalisations ont été observées, ce qui montre que la morphologie d'une nanoparticule peut influencer la quantité de nanoparticules endocytée.

Complément d'étude

Chapitre IV

Tests MTT et Cytométrie en Flux

I- Résultats des tests MTT

Dans le but de voir une possible influence de la longueur de la chaîne hydrophobe sur l'activité biologique, 6 composés d'une longueur variable en unités isoprènes, Gemcitabine-1,2,3,4,5,6-isoprènes, ont été incubés avec 7 lignées cellulaires cancéreuses : MiaPaCa-2, MCF-7, MCF-7 MDR, B16F10, CCRF CEM, CEM/ARAC 8C, L1210 et L1210K. La Gemcitabine ainsi que les nanoparticules de Gemcitabine-Sq et des 6 acides-1,2,3,4,5,6-isoprènes ont été incubés en tant que témoins.

Après 72 heures d'incubation en présence de différentes concentrations en nanoparticules, une solution de MTT est ajoutée. Dans les cellules vivantes, ce sel de tétrazolium est alors réduit en formazan, précipité de couleur violette : le pourcentage de cellules vivantes est alors déterminé à partir des mesures d'absorbance, et est tracé en fonction des différentes concentrations pour obtenir les valeurs de CI_{50} .

Pour les lignées MiaPaCa-2, MCF-7 et MCF-7 MDR, les CI_{50} de la Gemcitabine et de la Gemcitabine-Sq étaient bien supérieures à celles trouvées dans les études précédentes (*L. H. Reddy, 2009*). Les résultats n'ont donc pas été validés : les lignées cellulaires avaient sans doute dérivé.

Pour les lignées leucémiques murines et humaines, les résultats obtenus sont présentés dans les **Figures 1, 2, 3 et 4** et les CI_{50} sont résumées dans la **Table 1**. Pour l'ensemble des lignées cellulaires traitées avec les suspensions des différents acides isopréniques, aucune cytotoxicité n'a été observée, ce qui montre que l'activité potentiellement observée pour les différents produits de couplage résulte bien de la libération de la Gemcitabine dans la cellule.

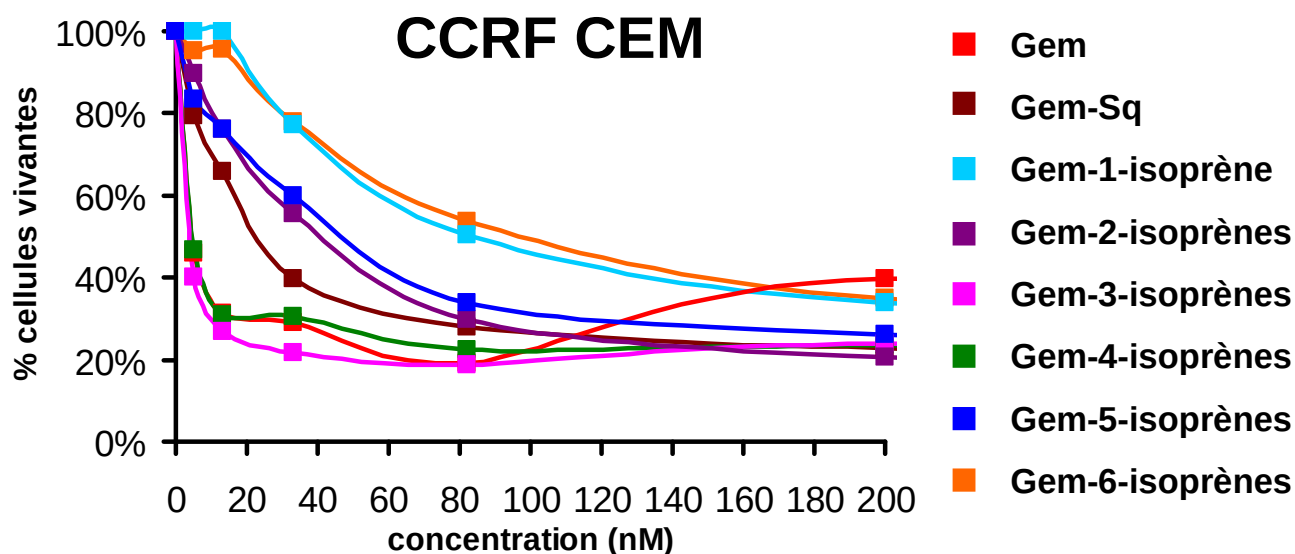


Figure 1 : Pourcentage de cellules CCRF CEM vivantes en fonction de la concentration molaire en nanoparticules pour les différents composés étudiés (Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes) et pour les témoins (Gemcitabine et Gemcitabine-Sq).

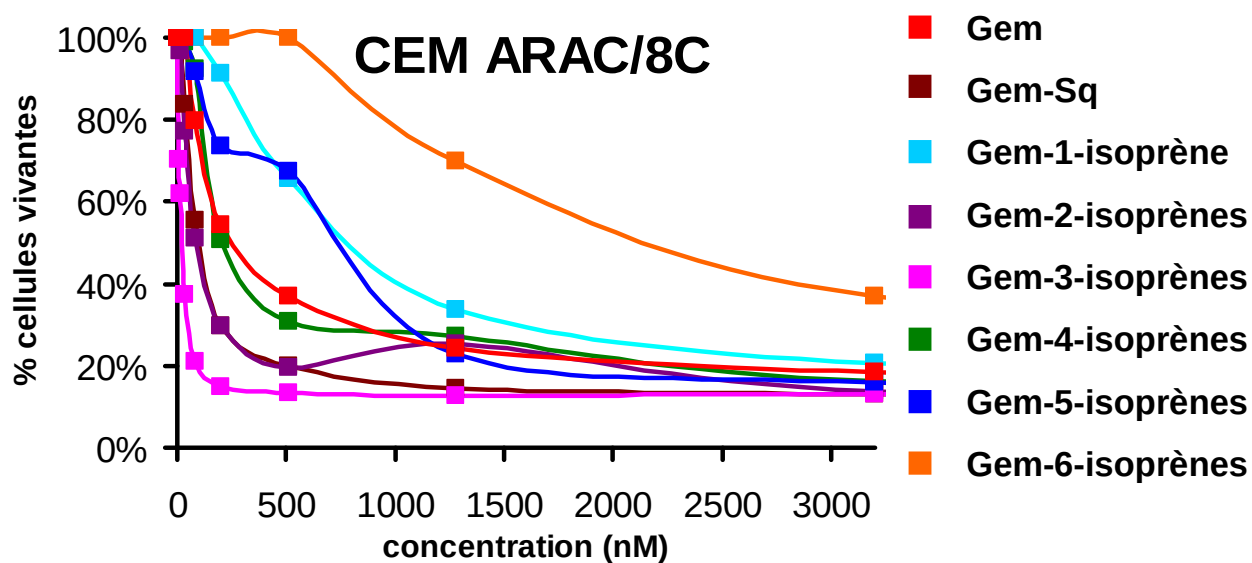


Figure 2: Pourcentage de cellules CEM ARAC/8C vivantes en fonction de la concentration molaire en nanoparticules pour les différents composés étudiés (Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes) et pour les témoins (Gemcitabine et Gemcitabine-Sq).

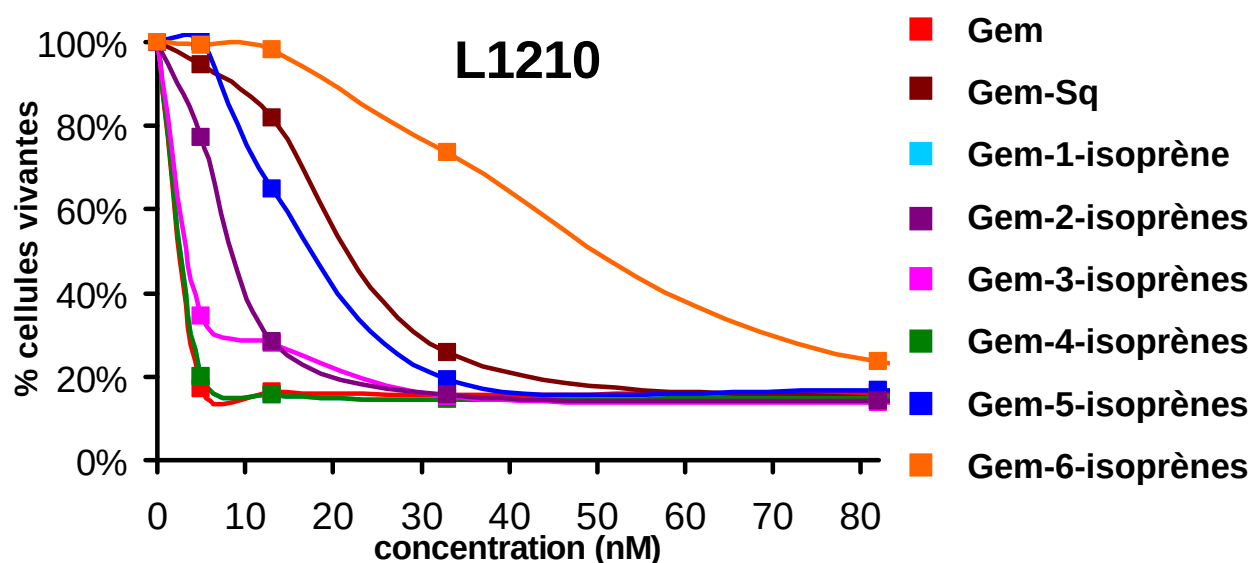


Figure 3: Pourcentage de cellule L1210 vivantes en fonction de la concentration molaire en nanoparticules pour les différents composés étudiés (Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes) et pour les témoins (Gemcitabine et Gemcitabine-Sq).

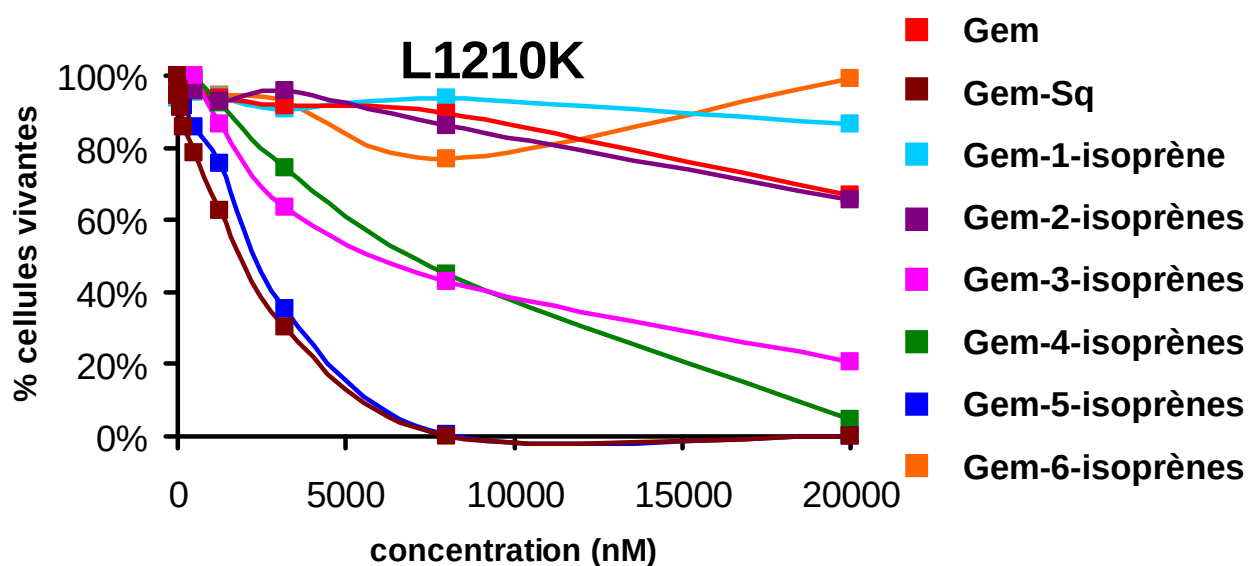


Figure 4: Pourcentage de cellule L1210K vivantes en fonction de la concentration molaire en nanoparticules pour les différents composés étudiés (Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes) et pour les témoins (Gemcitabine et Gemcitabine-Sq).

CI ₅₀	CCRF CEM	CEM/ARAC 8C	L1210	L1210K
Gem	5 nM	316 nM	3 nM	no
Gem-Sq	23 nM	105 nM	21 nM	1842 nM
Gem-1-isoprène	78 nM	842 nM	3 nM	no
Gem-2-isoprènes	41 nM	105 nM	8 nM	no
Gem-3-isoprènes	4 nM	23 nM	3 nM	7842 nM
Gem-4-isoprènes	4 nM	211 nM	3 nM	7000 nM
Gem-5-isoprènes	50 nM	758 nM	17 nM	2368 nM
Gem-6-isoprènes	97 nM	2631 nM	56 nM	no

Table 1 : Résumé des concentration inhibitrices médianes calculées pour les Gem-1,2,3,4,5,6-isoprènes ainsi que pour les témoins (Gemcitabine et Gem-Sq). Le « no » signifie qu'il y a, quelle que soit la concentration, toujours plus de 50 % de cellules vivantes.

D'après la **Table 1**, il semble que la Gem-3-isoprènes soit plus active que toutes les autres suspensions (dont celle de Gem-Sq) sur les deux lignées leucémiques sauvages et sur une des deux lignées résistantes (CEM/ARAC 8C). Ce résultat est en accord avec ce qui avait été précédemment montré sur 4 autres lignées cellulaires : B16F10, MiaPaCa-2, MCF-7 et A549 (adénocarcinome humain) (A. Maksimenko, 2013).

En particulier, les nanoparticules de Gem-3-isoprènes permettent de surmonter la résistance à la Gemcitabine de la lignée CEM/ARAC 8C due à un déficit de transporteurs nucléosidiques. En ce qui concerne la lignée L1210K, qui présente un déficit en kinase, les nanoparticules de Gem-1,2,3,4,6-isoprènes ne parviennent pas à surmonter cette résistance. Seule la Gem-5-isoprènes présente une activité significative.

Enfin, comme observé dans le chapitre IV, les nanoparticules de Gem-5-isoprènes semblent être moins actives que la Gem-Sq, à part pour la lignée L1210 où les CI₅₀ sont comparables (17 nM et 21 nM respectivement).

Il faut cependant souligner que les molécules utilisées pour réaliser les tests MTT étaient issues d'un premier lot de synthèse, et que pour la Gem-1-isoprène, Gem-2-isoprènes et Gem-3-isoprènes des impuretés étaient présentes (quelques pour cents de produits de départ résiduels). L'avantage, si l'on peut dire, est que grâce à ces quelques pour cents d'impuretés, les particules étaient relativement stables. Mais lorsque les molécules ont été synthétisées à nouveau et purifiées, la stabilité n'était plus du tout la même (voir chapitre IV).

Pour conclure, malgré le même principe actif dans toutes ces nanoparticules, la longueur de la chaîne hydrophobe a une influence sur l'activité biologique. Mais pour pouvoir réellement conclure sur l'origine de ces différences il aurait fallu réaliser des études plus approfondies sur ces nanoparticules précisément : mécanisme d'internalisation cellulaire différent dû à une taille ou/et à une structure supramoléculaire différentes?

II- Cytométrie en Flux : comparaison de l'internalisation des nanoparticules de Gem-Sq et de Gem-5-isoprènes

Il a été montré que les nanoparticules de Gem-Sq et de Gem-5-isoprènes, n'avaient pas la même structure supramoléculaire, malgré de faibles différences de formules développées: **Figure 5**. En effet, les nanoparticules de Gem-Sq s'autoassemblaient en phase hexagonale inverse tandis que les nanoparticules de Gem-5-isoprènes possédaient une structure en forme de tube multilamellaire.

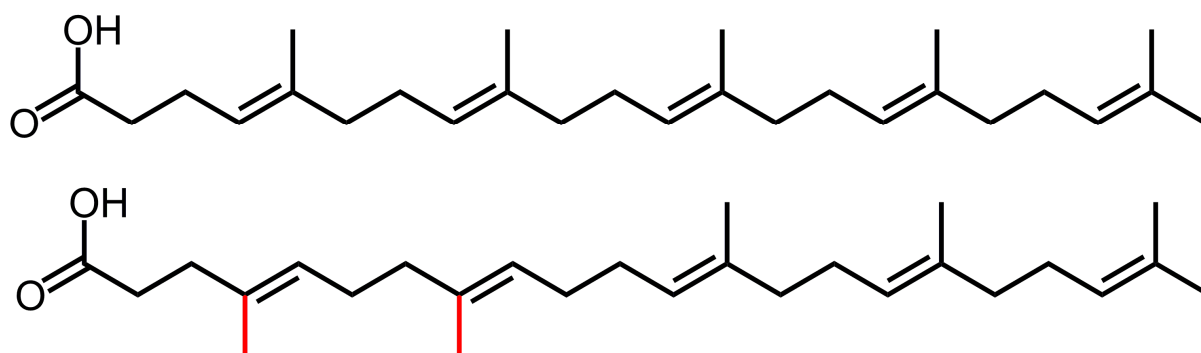


Figure 5: formule de l'acide-5-isoprénique en haut et de l'acide-Sq en bas. En rouge : seules différences, la position de deux méthyles.

Il avait aussi été observé (A. Maksimenko, 2013) que les nanoparticules de Gem-Sq étaient deux fois plus actives que les nanoparticules de Gem-5-isoprènes, notamment sur la lignée cellulaire B16F10. Dans le but d'avoir une approche quantitative de l'internalisation de ces deux types de nanoparticules, des études de cytométrie en flux ont été réalisées. Dans un premier temps, un fluorophore, le Cholesterol BODIPY® FL C₁₂ (CholBodiPy) a été coprécipité avec les molécules amphiphiles et la fluorescence des différentes particules a été vérifiée. Puis cette intensité de fluorescence a été mesurée dans les cellules vivantes pour voir une potentielle différence d'internalisation.

1) Intensité de fluorescence des suspensions

a) 1 % de CholBodiPy

Après nanopréciipitation avec 1% de CholBodiPy, les suspensions (à 0.5 mg/mL) ne présentaient pas le même aspect visuel : la suspension de Gem-Sq avait une faible teinte verte alors que la suspension de Gem-5-isoprènes et la suspension témoin de CholBodiPy présentaient une légère teinte rosée. Le spectre d'émission de fluorescence de ces différentes suspensions a donc été réalisé : **Figure 6**.

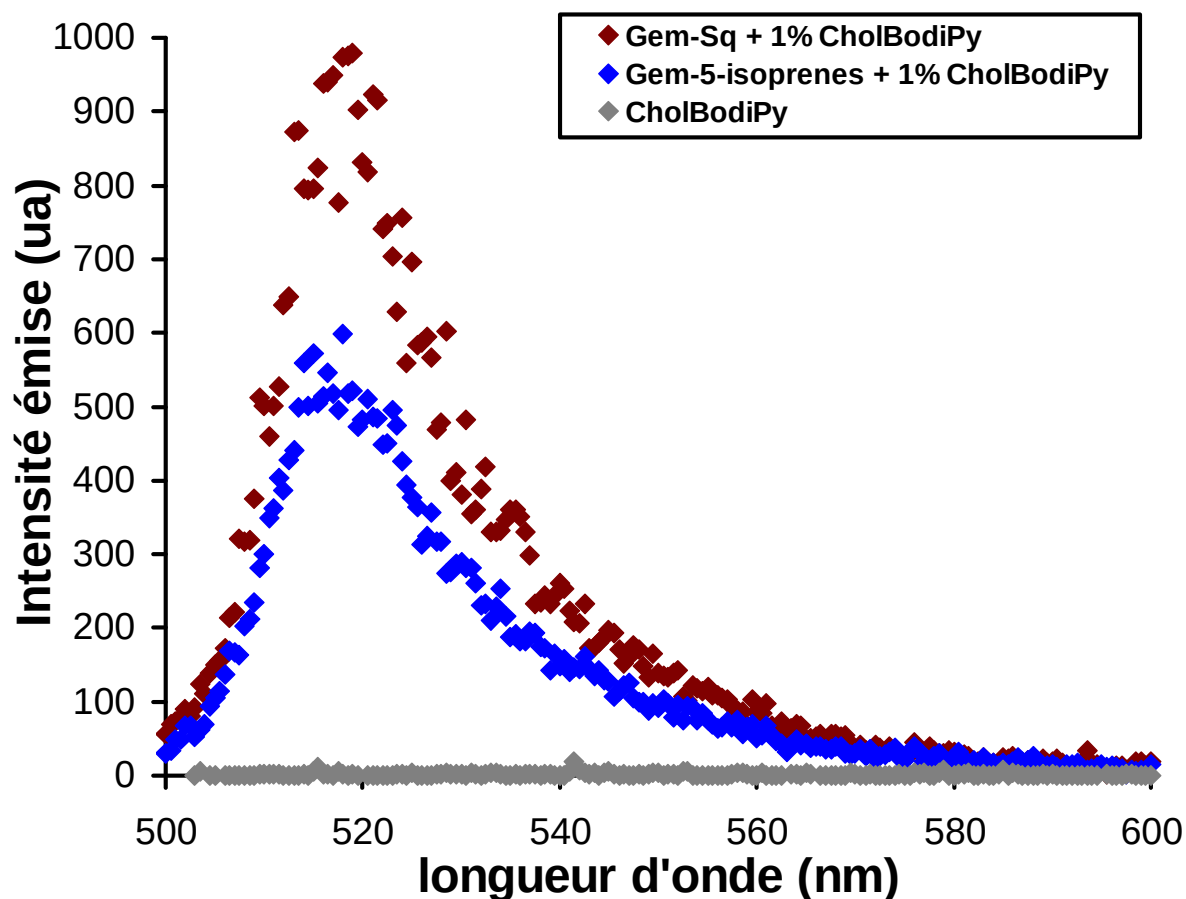


Figure 6 : spectre d'émission de 3 suspensions préparées avec 1 % de CholBodiPy.

D'après la **Figure 6**, malgré la même quantité de fluorophore à la préparation, la fluorescence finale des nanoparticules de Gem-5-isoprène est pratiquement deux fois plus faible que la fluorescence des nanoparticules de Gem-Sq. La fluorescence de la suspension de CholBodiPy est nulle. Ces observations s'expliquent par la propriété même de ce fluorophore de former

des excimères lorsque la concentration est suffisante (voir Chapitre II). Pour la suspension de CholBodiPy, il y a vraisemblablement formation de ces excimères, ce qui expliquerait la teinte rosée observée, et la non-fluorescence dans le vert de cette suspension. En ce qui concerne la suspension de Gem-5-isoprènes, un pic de fluorescence dans le vert est observé, mais il semblerait aussi que des excimères se soient formés (teinte rosée): pour ce type de nanoparticule en forme de tube, il se pourrait que le fluorophore soit en excès et que la quantité restant en solution forme des excimères. Quant aux nanoparticules de Gem-Sq, il semblerait que les 1% de CholBodiPy soient internalisés dans la particule : intensité maximale.

Cette formulation avec 1% de CholBodiPy ne pourra donc pas être conservée pour une approche quantitative de la fluorescence en intracellulaire.

b) 0.5 % de CholBodiPy

Pour résoudre ce problème, il a donc été décidé de diminuer la quantité de CholBodiPy à 0.5 %. Pour vérifier la reproductibilité des mesures, 2 suspensions de Gem-Sq ainsi que deux suspensions de Gem-5-isoprènes ont été réalisées. Le spectre d'émission a été enregistré dans les mêmes conditions que précédemment : **Figure 7**.

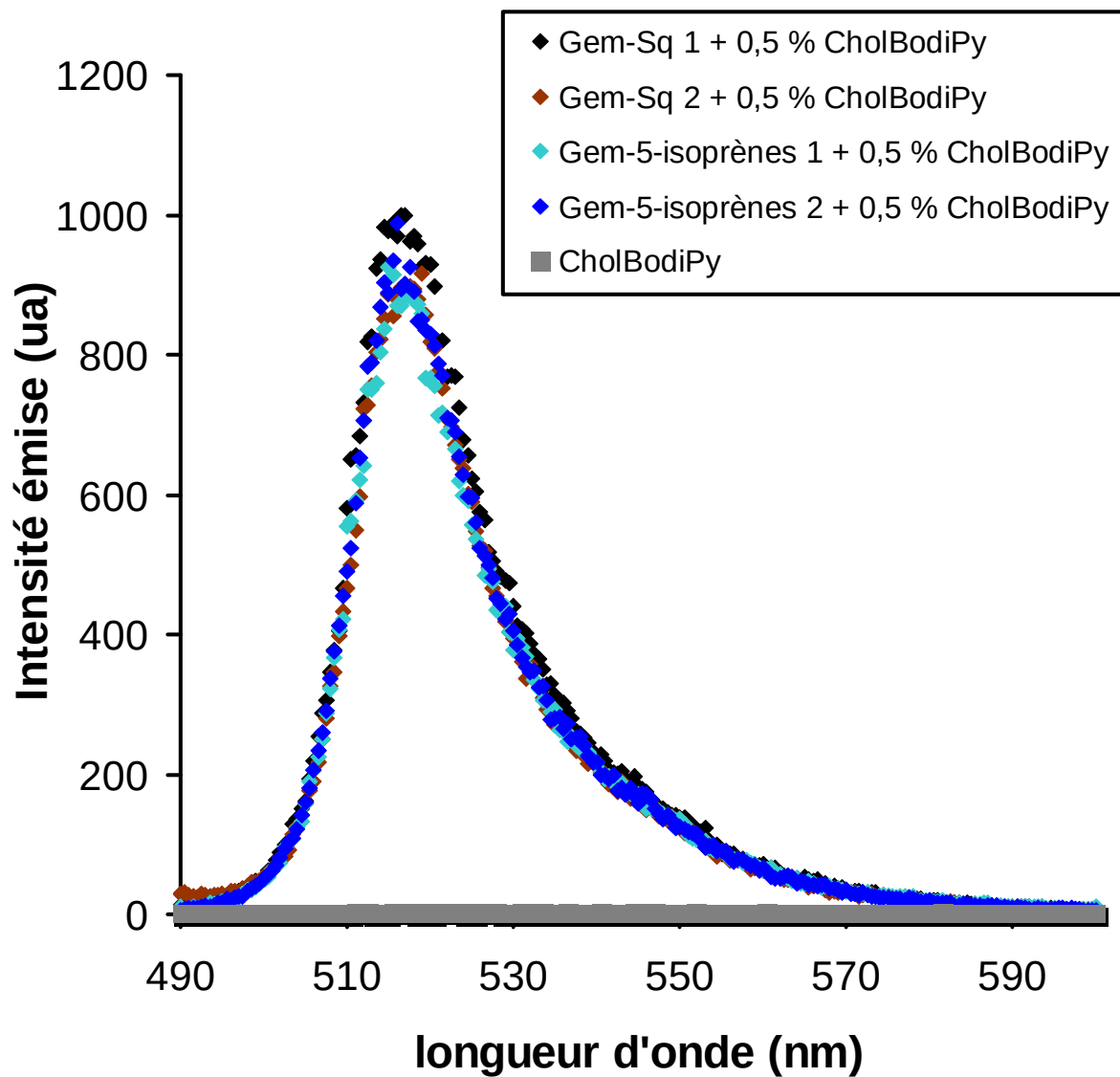


Figure 7 : Spectre d'émission de 7 suspensions réalisées avec 0.5 % de CholBodiPy.

Pour cette formulation avec 0.5 % de CholBodiPy, les deux suspensions de Gem-Sq et les deux suspensions de Gem-5-isoprènes ont la même intensité de fluorescence. Ces objets pourront donc être comparés et quantifiés.

2) Tailles des nanoparticules utilisées

La **table 3** résume les différentes tailles des suspensions réalisées précédemment.

Composé	Gem-Sq 1	Gem-Sq 2	CholBodiPy
Taille	69.3 nm	111.7 nm	94.8 nm
Distribution	± 8 nm	± 12 nm	± 3 nm

Table 3 : moyennes des trois mesures de taille et moyennes des trois largeurs du pic d'intensité à mi-hauteur pour les différentes suspensions étudiées.

Il peut être noté que les deux suspensions de Gem-Sq possèdent des tailles moyennes relativement différentes, alors que la nanoprécipitation a été réalisée le même jour, avec les mêmes produits de départ, dans les mêmes conditions. Le seul paramètre qui peut être variable d'une préparation à l'autre est la vitesse d'addition de la phase organique dans la phase aqueuse, et ce paramètre peut jouer sur la taille des objets.

3) Cryo-Tem

Des images des deux suspensions de Gem-Sq ont été réalisées en Cryo-Tem : **Figure 8**.

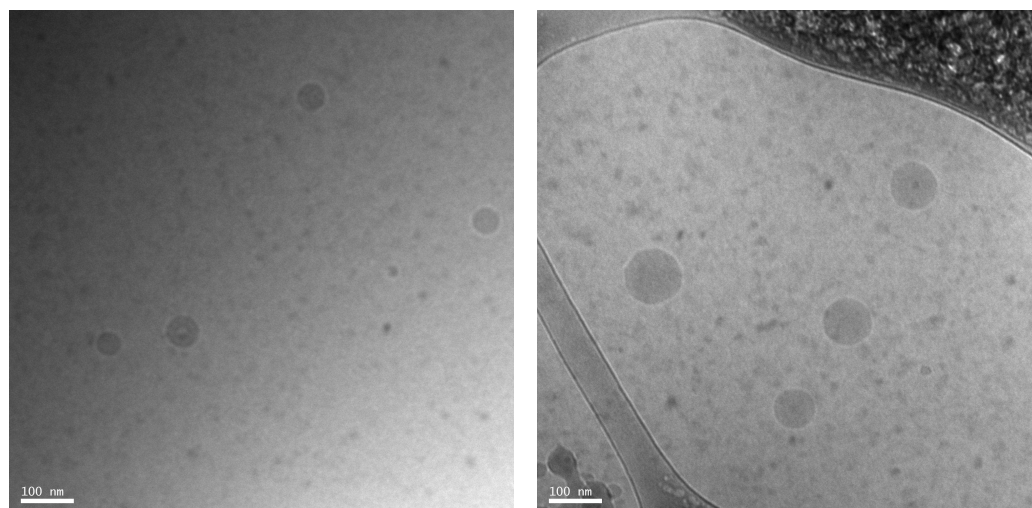


Figure 8 : Images de Cryo-Tem avec à gauche, les nanoparticules de Gem-Sq 1 et à droite les nanoparticules de Gem-Sq 2.

La même constatation que précédemment peut-être faite : il y a une différence notable de taille entre ces deux préparations.

4) Cytométrie en Flux

L'intensité de fluorescence internalisée dans les cellules B16F10 vivantes a été mesurée par le cytomètre en flux, pour chaque temps d'incubation (1h, 4h et 8h) en triplicate (**Figure 9**).

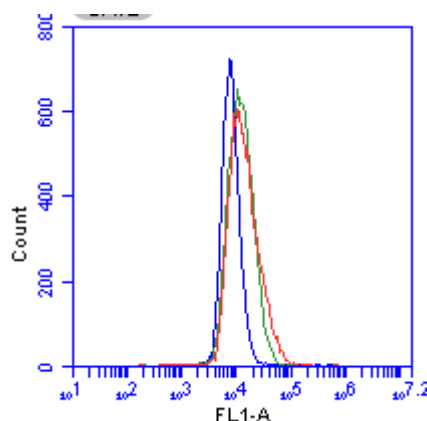


Figure 9 : Intensité de fluorescence internalisée dans les cellules B16F10 vivantes aux temps 1h (en bleu), 4h (en vert) et 8h (rouge) pour la suspension Gem-Sq 1.

Pour chaque temps d'incubation, l'intensité est ensuite moyennée et l'évolution de la fluorescence peut alors être étudiée.

Dans un premier temps, l'étude a été réalisée à 4°C : **Figure 10**.

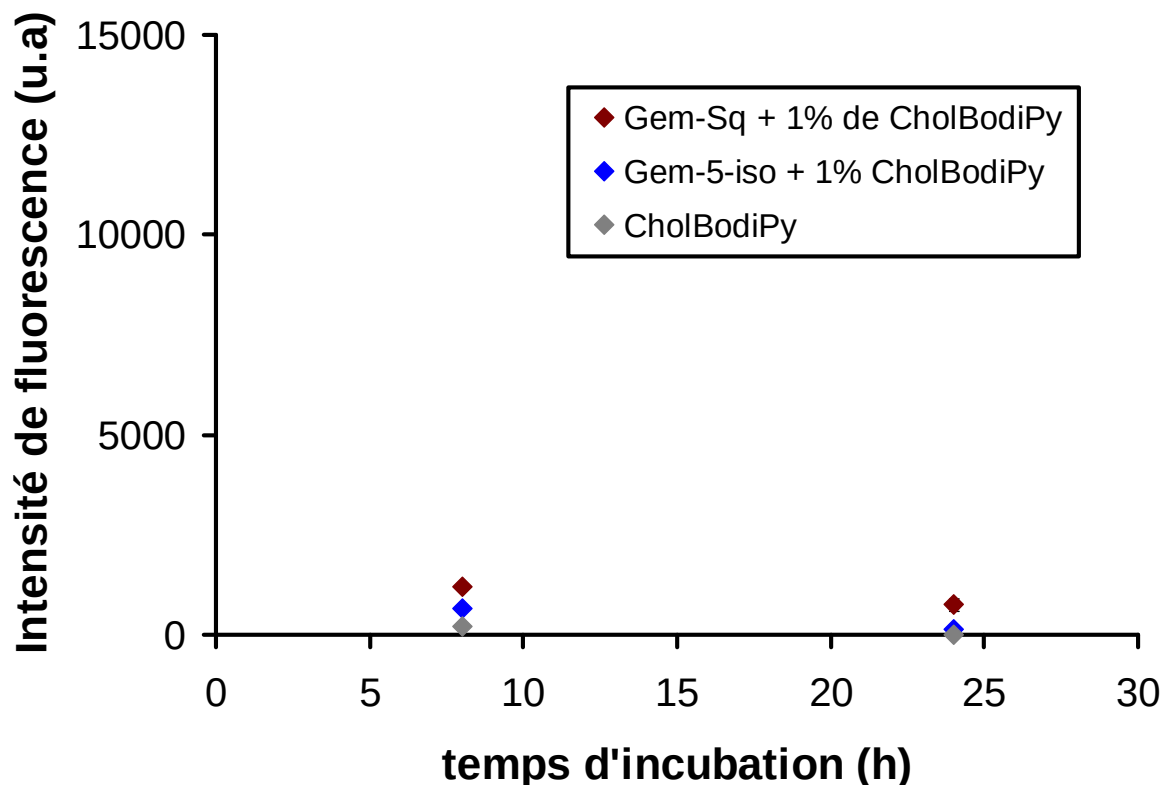


Figure 10 : intensité de fluorescence internalisée au sein de 10000 cellules vivantes en fonction du temps d'incubation pour les différentes suspensions, à 4°C.

Les nanoparticules utilisées pour cette étude étaient issues de la première formulation, contenant 1 % de CholBodiPy. Lorsque les cellules sont placées à 4°C après incubation de la drogue, aucune fluorescence internalisée n'est observée pour l'ensemble des suspensions. Il semblerait donc que le mécanisme d'internalisation de ces nanoparticules par les cellules B16F10 soit de l'endocytose. En effet, ce mécanisme est énergétiquement dépendant et à 4°C, il est fortement réduit, voire impossible (*S. C. Silverstein, 1977, W. Negendank, 1982*).

Les études d'internalisation ont ensuite été réalisées à 37°C, avec les suspensions contenant 0.5 % de CholBodiPy, pour pouvoir comparer et quantifier l'intensité de fluorescence dans les cellules (**Figure 11**).

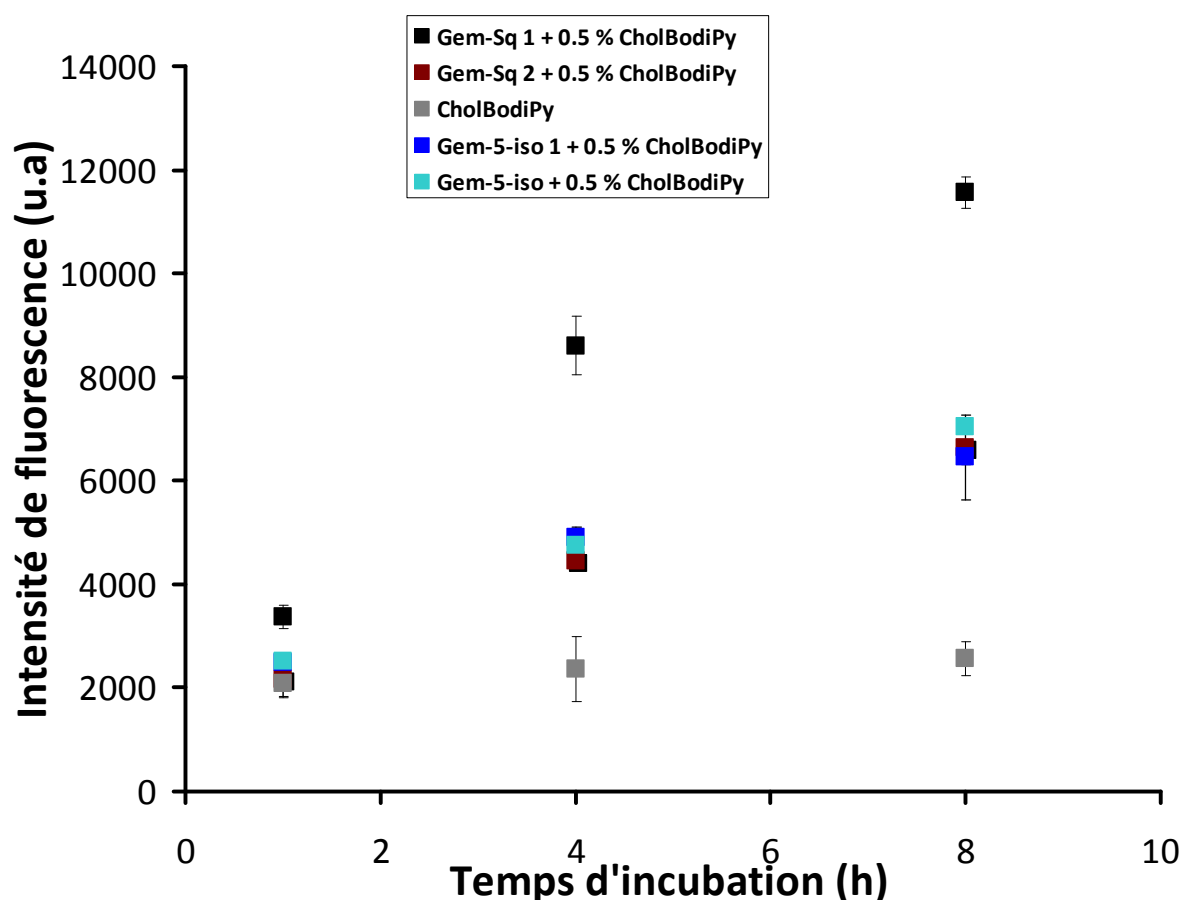


Figure 11 : Intensité internalisée dans 10 000 cellules vivantes en fonction du temps d’incubation de la suspension de Gem-Sq 1, de Gem-Sq 2, de Gem-5-isoprènes 1, de Gem-5-isoprènes 2 et de CholBodiPy.

L’internalisation de la suspension de CholBodiPy est constante et relativement faible quel que soit le temps d’incubation (**Figure 11**) : peu de nanoparticules sont internalisées. En ce qui concerne les deux suspensions de Gem-5-isoprènes, les résultats sont très proches. Par contre, l’internalisation des deux suspensions de Gem-Sq est différente.

Pour conclure sur cette étude, deux phénomènes semblent être mis en évidence. D’une part la morphologie joue un rôle sur l’internalisation : en effet, à taille égale, la structure hexagonale, morphologie plus compacte, semble être mieux internalisée que la structure en forme de tube, morphologie plus allongée. Ce phénomène avait déjà été observé avec des particules d’or dans *B. D. Chithrani, 2007* et *Y. Qiu, 2010* où les nanoparticules sphériques étaient mieux internalisées que les particules cylindriques. D’autre part à morphologie constante, il semblerait que les plus petites particules soient mieux internalisées. Cette observation avait déjà été faite par exemple sur des nanoparticules de silice mésoporeuse (*M. Ekkapongpisit,*

2012), ou encore sur des nanoparticules métalliques ($\text{Mg}_{0.68}\text{Al}_{0.32}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_{0.16} \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$) (Figure 12) (J.-M. Oh, 2009).

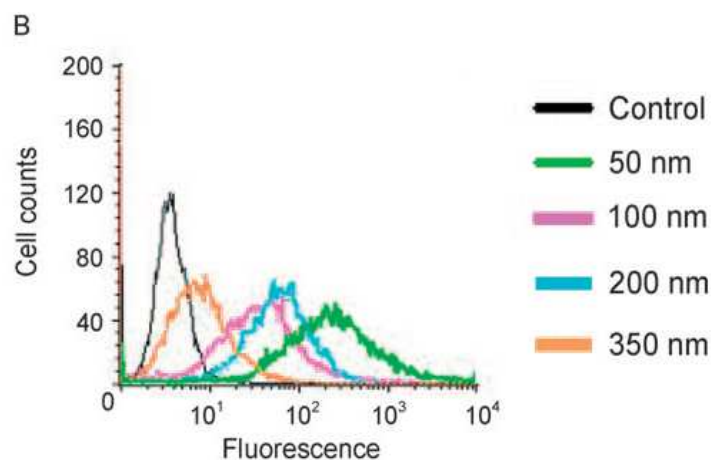


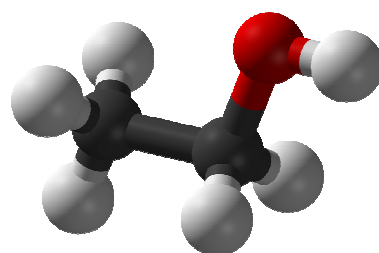
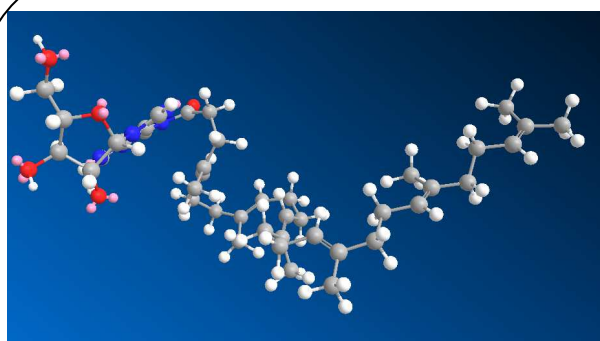
Figure 12 : Intensité de fluorescence internalisée dans des cellules humaine d'ostéosarcome (MNNG/HOS) en fonction de la taille des nanoparticules inorganique (J.-M. Oh, 2009).

Références

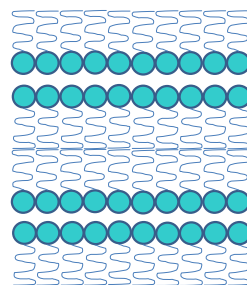
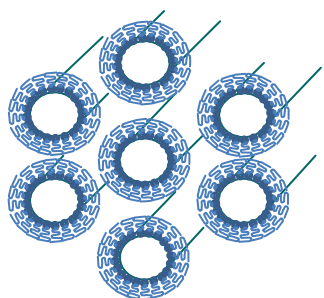
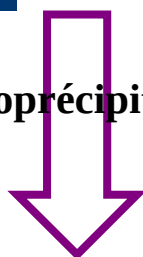
- B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Lett.*, **7** (6), 1542-1550, (2007).
- M. Ekkapongpisit, A. Giovina, C. Follo, G. Caputo, C. Isidoro, Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: effects of size and surface charge groups, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 4147-4158, (2012).
- A. Maksimenko, J. Mougin, S. Mura, E. Sliwinski, E. Lepeltier, C. Bourgaux, S. Lepêtre, F. Zouhiri, D. Desmaële, P. Couvreur, Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy, *Cancer Letter*, **34** (2), 346–353, (2013).
- W. Negendank, C. Shaller, Temperature-dependence of ATP level, organic phosphate production and Na,K-ATPase in human lymphocytes, *Physiol Chem Phys.*, **14** (6), 513-518, (1982).
- J.-M. Oh, S.-J. Choi, G.-E. Lee, J.-E. Kim and J.-H. Choy, Inorganic Metal Hydroxide Nanoparticles for Targeted Cellular Uptake Through Clathrin-Mediated Endocytosis, *Chem. Asian. J.*, **4**, 67-73, (2009).
- Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y Li, C. Chen, Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods, *Biomaterials*, **31**, 7606-7619, (2010).
- L. H. Reddy, J.-M. Renoir, V. Marsaud, S. Lepetre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor, *Molecular Pharmaceutics*, **6** (5), 1526-1535, (2009).
- S. C. Silverstein, R. M. Steinman, Z. A. Cohn, Endocytosis, *Annual Review of Biochemistry*, **46**, 669-722, (1977).

Chapitre V

Influence des conditions de préparation sur la structure supramoléculaire des nanoparticules d'Adénosine-Squalène homologué



Nanoprécipitation



I- Introduction

Comme il a été montré dans la partie bibliographique de ce manuscrit, « l'effet Ouzo », encore appelé « nanoprécipitation » est une méthode simple pour obtenir des nanoparticules (F. Ganachaud, 2005). La molécule d'intérêt, insoluble dans l'eau, est solubilisée dans un volume connu de solvant (éthanol, acétone, THF...), miscible en toutes proportions avec l'eau, puis la solution est ajoutée goutte à goutte à une grande quantité d'eau, le tout sous agitation (S. Schubert, 2011). Le soluté étant insoluble dans le mélange eau/solvant, des nanoparticules se forment spontanément. Le solvant est ensuite évaporé. Par comparaison avec d'autres méthodes de préparation de nanoobjets, comme le relargage ou encore l'émulsification-diffusion, aucun ajout de surfactant n'est nécessaire pour obtenir une émulsion (S. Galindo-Rodriguez, 2004), ce qui est un point positif pour le développement notamment de médicaments (possible effet toxique). De plus pour certains composés, la nanoprécipitation donne des particules plus stables (C. E. Mora-Huertas, 2004).

Cette formation spontanée de nanoparticules s'explique par la nucléation de petits agrégats de molécules, à partir des fluctuations locales en concentration de soluté dans une solution sursaturée (nucléation homogène). Les noyaux atteignant une taille critique vont être stables et pourront croître par diffusion de molécules de soluté vers leur surface et/ou par agrégation avec d'autres particules. (S. A. Vitale, 2003). Il est habituel d'utiliser un diagramme de phase pour représenter la région où les nanoparticules sont stables et homogènes en taille : « région Ouzo » (R. Botet, 2012). Cette région se situe à de faibles concentrations en soluté, et pour de grandes quantités d'eau (**Figure 1**).

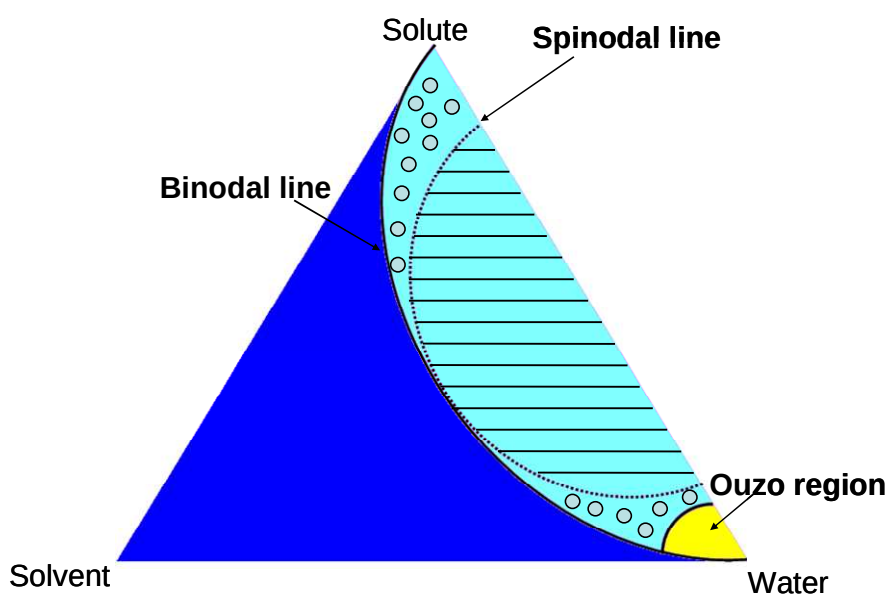


Figure 1 : diagramme de phase pour un soluté amphiphile dans un mélange eau, solvant.

Certaines variables de formulation peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, notamment la taille. Par exemple, la taille des nanoassemblages ainsi que la vitesse de libération de la drogue est liée à la concentration en soluté : plus la concentration est faible, plus la taille est petite, plus le rapport surface/volume augmente et donc plus la quantité de drogue exposée au milieu est grande (*M. Chorny, 2002 ; P. Legrand, 2007*). La nature du solvant, notamment la viscosité est aussi un paramètre important (*U. Bilati, 2005*). En effet, plus la vitesse de diffusion est élevée, plus la particule sera petite. Le ratio entre le volume de la phase aqueuse et le volume de solvant organique semble aussi avoir un impact même si des résultats contradictoires sont observés : dans certaines études, plus le ratio est grand, plus la taille des objets est grande, dans d'autres aucune influence n'est observée (*I. L. Blouza, 2006 ; M. Beck-Broichsitter, 2010*). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'influence de ce ratio sur la structure supramoléculaire.

Dans ce chapitre, nous nous sommes ainsi intéressés à l'influence de ce ratio eau/solvant sur l'organisation des nanoparticules d'adénosine-Sq homologué (**Figure 2**). Pourquoi le choix de ce composé ? Dès le début de la thèse, la structure supramoléculaire de ces nanoparticules avait été étudiée, dans une démarche systématique, et deux structures supramoléculaires semblaient exister pour ce composé, suivant les conditions de préparation.

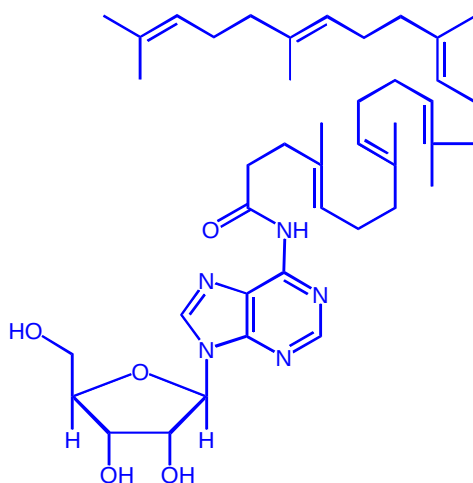


Figure 2 : représentation de l'adénosine-Sq homologué (1 unité isoprène en plus sur la chaîne de squalène).

II- Stabilité des nanoparticules d'Adénosine-Sq homologué

Différentes suspensions ont été préparées pour étudier les paramètres qui pourraient influencer la stabilité et même la structure des auto-assemblages. La même quantité de produit ($8 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$) a été dissoute dans 0.5 mL d'EtOH, puis ajoutée dans un volume variable d'eau : 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL et 2.5 mL. A l'œil nu, trois types d'échantillon ont été obtenus. Avec un ratio de 1 entre le volume d'eau et le volume d'éthanol, des agrégats sont observés. Pour le ratio 2, on remarque deux phases: une solution opalescente (caractéristique de particules en suspension) et des agrégats. Enfin, pour les ratios de 3 et plus, une suspension unique est obtenue. Pour ce dernier échantillon, la taille des nanoparticules a été suivie au cours du temps, et il semblerait que ces nanoobjets dont la taille moyenne est de $82 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$ soient stables jusqu'à 100 jours (**Figure 3**).

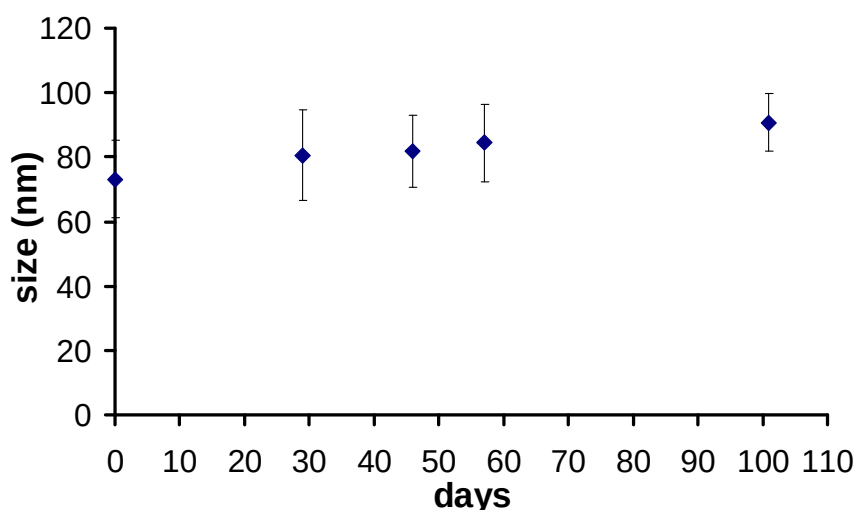


Figure 3: Etude de la stabilité d'une suspension d'adénosine-Sq homologué (ratio 3 entre le volume d'eau et le volume d'éthanol, concentration $\sim 1.10^{-4} \text{ mol/L}$).

L'observation de ces différentes phases montre à quel point il est nécessaire de se placer dans la région Ouzo pour obtenir des particules stables. En effet, quand la quantité de solvant organique se rapproche de celle de la phase aqueuse, les nanoparticules ne sont pas stables, et forment des agrégats macroscopiques.

III- Balance de Langmuir

L'organisation des molécules d'adénosine-Sq homologué à l'interface air/eau a été étudiée à l'aide de la balance de Langmuir, après un dépôt de 60 μL d'une solution à $1.39 \cdot 10^{15}$ molécules/ μL . L'aire moléculaire au collapse est de $26.2 \text{ \AA}^2$, ce qui correspond au minimum de l'aire moléculaire et elle est observée à une pression de surface de 39.04 mN/m. A une pression intermédiaire, 30 mN/m (comparable à la pression de surface dans une membrane cellulaire), l'aire moléculaire est de $A_0 = 32.8 \text{ \AA}^2$ (**Figure 4**). Le volume de la chaîne hydrophobe, V , est calculé à partir du volume individuel de chacun des groupements (*R. R. Armen, 1998*) : $\sim 1000 \text{ \AA}^3$. La longueur de la chaîne hydrophobe est évaluée à $\sim 28 \text{ \AA}$. A partir de la formule $p = \frac{V}{A_0 \times l}$, la valeur du paramètre d'empilement (packing parameter) p est donc de 1.1, ce qui serait compatible avec une organisation en phase hexagonale.

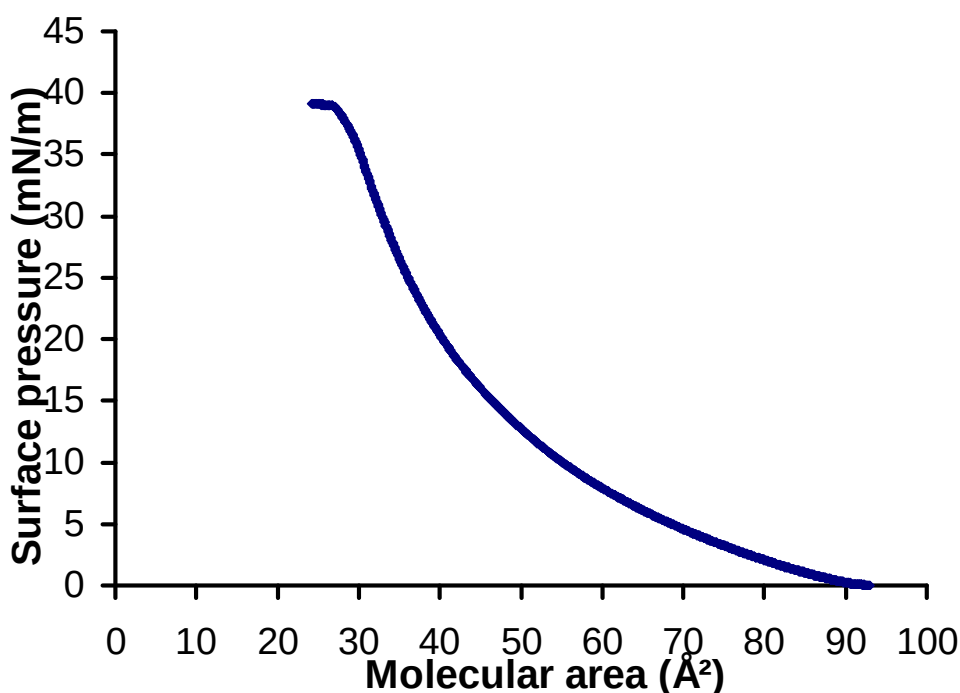


Figure 4: Isotherme de compression de l'adénosine-Sq homologué, enregistrée à 18°C .

Le module de compressibilité a aussi été évalué à une pression de 34.4 mN/m : $K_{Amax} = 62.0 \text{ mN/m}$ (**Figure 5**). A partir de cette valeur, il peut être conclu que cette monocouche est dans un état liquide expansé au collapse ($13 \leq K_a \leq 100 \text{ mN/m}$ (*J. T. Davies, 1963*)).

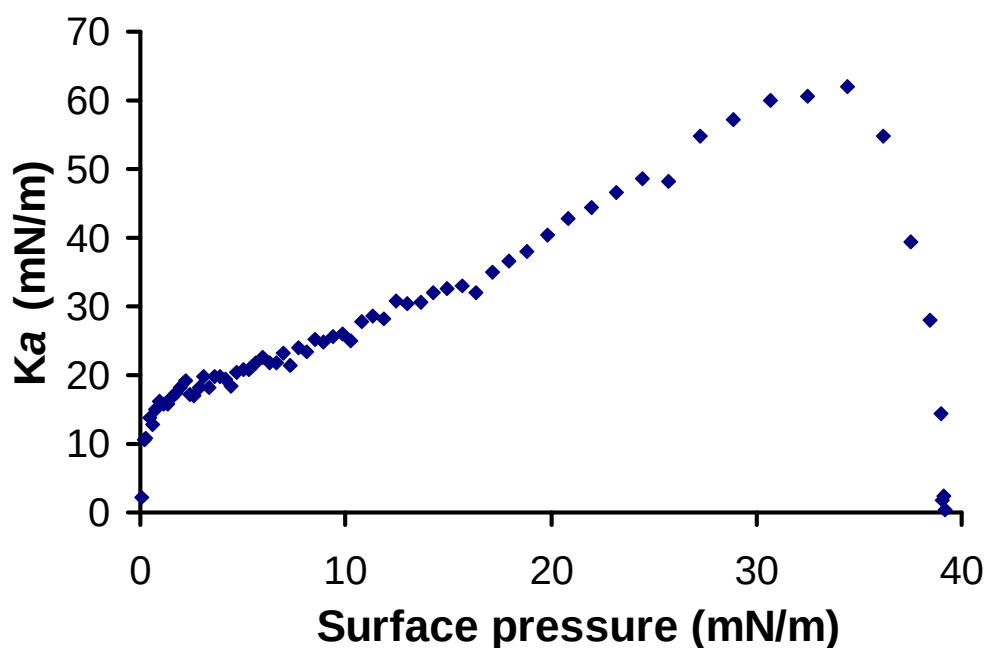


Figure 5 : Module de compressibilité en fonction de la pression de surface pour l'adénosine-Sq homologué.

IV- Structure supramoléculaire en fonction des paramètres de nanopréciipitation

1) Variation du ratio entre le volume d'eau et le volume d'éthanol

Pour étudier l'influence possible du ratio entre le volume d'eau et le volume d'éthanol lors de la nanopréciipitation, chaque suspension a été analysée par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

Pour la suspension préparée dans 0.5 mL d'éthanol et 1.5 mL d'eau ($R = 3$) le diffractogramme révèle 3 pics de Bragg, dont les positions sont q_0 , $q_0\sqrt{3}$ et $2q_0$, ce qui est caractéristique d'une phase hexagonale. Le paramètre de maille est $a = 70 \text{ \AA}$ ($q_0 = 0,08 \text{ \AA}^{-1}$). Les images en Cryo-TEM ont montré des nanoparticules avec des formes angulaires, ce qui est en accord avec une phase hexagonale (**Figure 6**).

Pour la suspension préparée dans 0.5 mL d'éthanol et 0.5 mL d'eau, le diffractogramme montre 3 pics, dont les positions sont q_0 , $2q_0$ et $3q_0$, ce qui est caractéristique des premiers ordres de diffraction d'une phase lamellaire. La distance caractéristique de répétition est de d

= 48 Å ($q_0 = 0,13 \text{ Å}^{-1}$). Les images de Cryo-TEM semblent montrer des vésicules multilamellaires, et la distance de répétition paraît être vérifiée ($d \approx 50 \text{ Å}$) (**Figure 6**).

Pour finir, le diffractogramme de la suspension préparée dans 0.5 mL d'éthanol et 1 mL d'eau montre un mélange des deux structures présentées précédemment : le premier pic de diffraction ($q = 0.08 \text{ Å}^{-1}$) appartient à la phase hexagonale, le deuxième ($q = 0.13 \text{ Å}^{-1}$) est le premier ordre de la phase lamellaire. Les deux réflexions de faible intensité observées ensuite correspondent aux deux autres pics de diffraction de la phase hexagonale et les deux derniers pics appartiennent à la phase lamellaire (deuxième et troisième ordre, $q = 0.26 \text{ Å}^{-1}$ et $q = 0.39 \text{ Å}^{-1}$) (**Figure 6**).

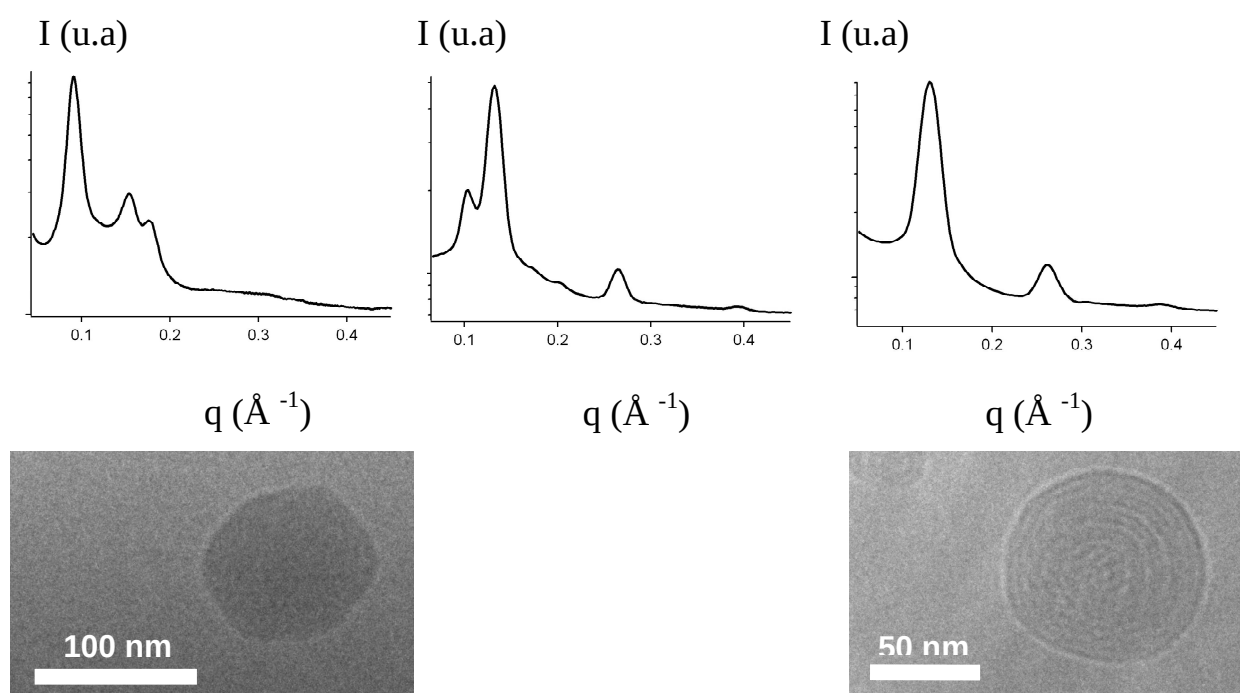


Figure 6 : diffractogrammes enregistrés à température ambiante de nanoparticules d'adénosine-Sq homologué préparées avec différents ratios de solvant. De gauche à droite, ratio 3, ratio 2 et ratio 1, ce qui correspond respectivement à une phase hexagonale, un mélange de deux phases (hexagonale et lamellaire) et à une unique phase lamellaire. En dessous de chaque diffractogramme, image obtenue en Cryo-TEM.

Il est vraiment surprenant d'observer un changement de structure supramoléculaire suivant le ratio entre les volumes d'eau et d'EtOH. En considérant les résultats obtenus avec la balance de Langmuir, une structure unique hexagonale aurait été attendue. Une structure lamellaire, observée lorsque la quantité d'éthanol est la même que celle de l'eau, suggérerait une aire de la tête polaire plus importante. Pour tenter d'expliquer cette observation, des études en température ont été réalisées.

2) Variation de la température

Les nanoparticules préparées avec un ratio de 3 ont été chauffées jusqu'à une température de 60°C et la structure hexagonale inverse est conservée (**Figure 7**). Le décalage des positions des pics vers les grandes valeurs de q au chauffage peut être expliqué par une diminution du paramètre de maille, due à une déshydratation partielle de la structure ($a = 60 \text{ \AA}$).

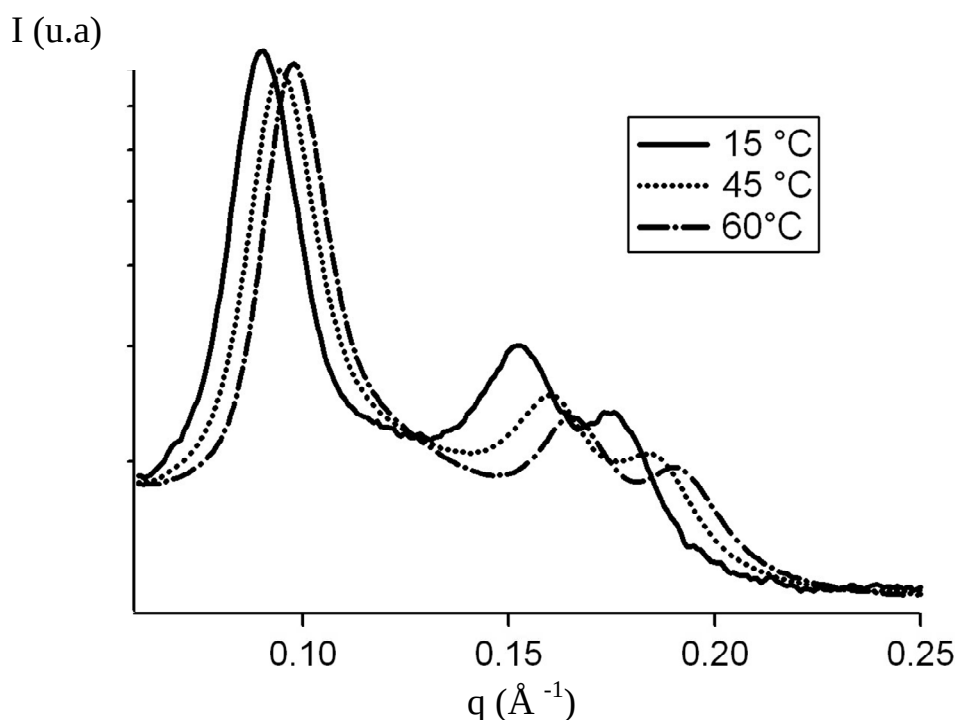


Figure 7 : diffractogrammes d'une suspension d'adénosine-Sq homologué préparée avec un ratio 3 entre les volumes de la phase aqueuse et organique, à 3 températures : 15°C, 45°C et 60°C.

La même expérience a été réalisée avec la suspension ratio 1, et les différents diffractogrammes ont montré une transition de phase : passage d'une phase lamellaire à une phase hexagonale. Le paramètre de maille de cette dernière était le même que celui observé précédemment ($a = 60 \text{ \AA}$). (**Figure 8**).

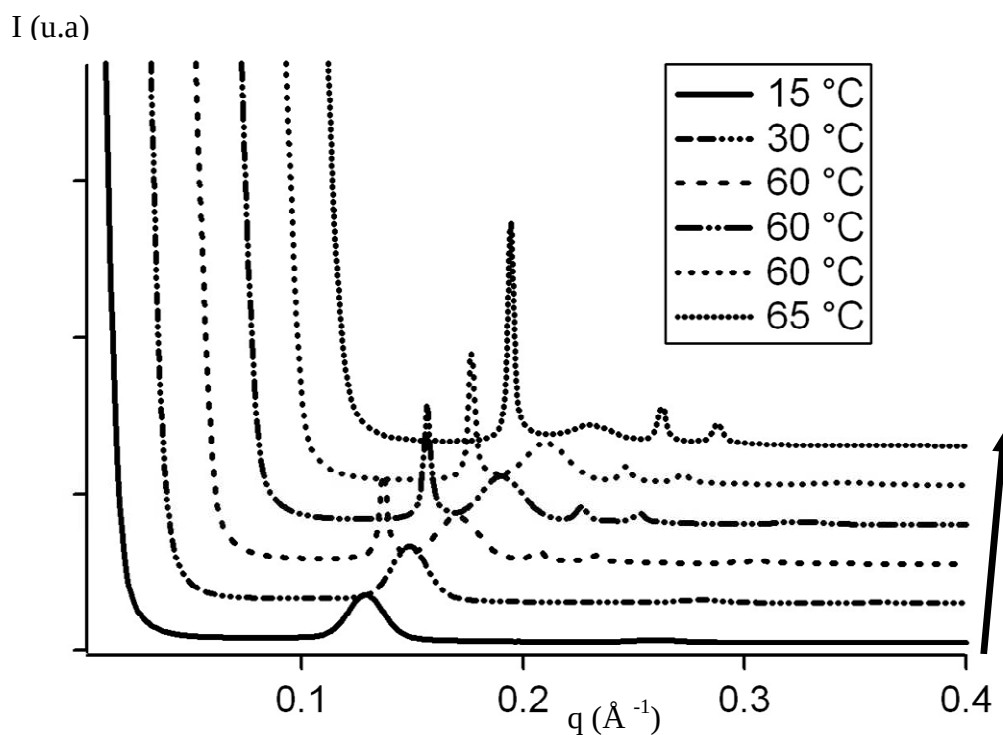


Figure 8 : diffractogrammes d'une suspension d'adénosine-Sq homologué préparée avec un ratio 1 entre les volumes de la phase aqueuse et organique, à 4 températures : 15°C, 30°C, 60°C et 65°C.

Le refroidissement de ce même capillaire montre que la transition n'est pas complètement réversible : les pics caractéristiques de la phase hexagonale demeurent (**Figure 9**).

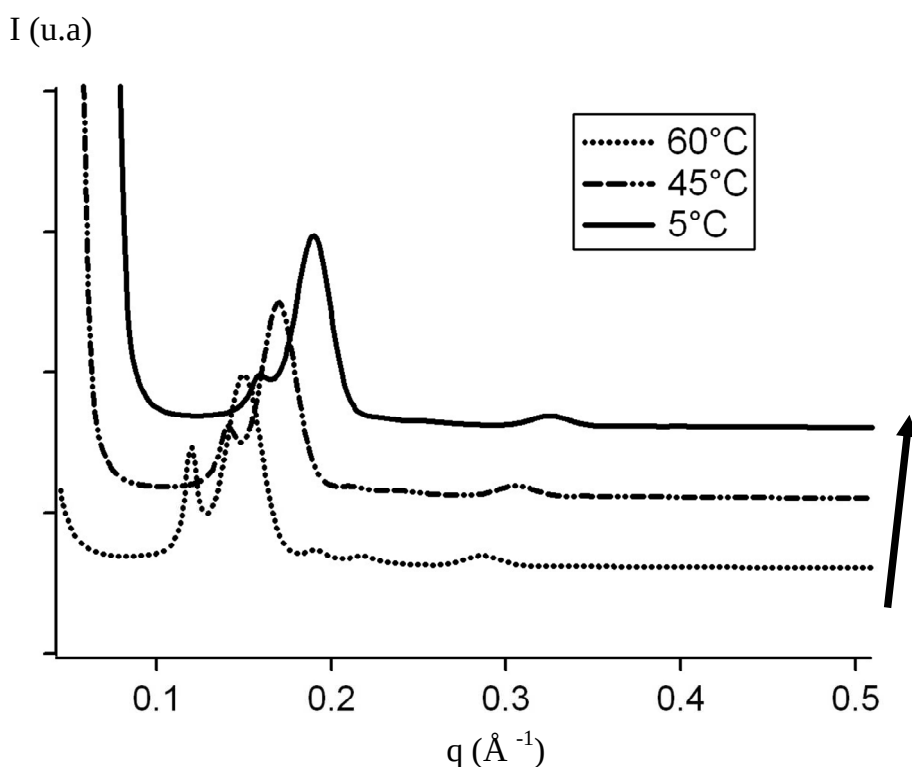


Figure 9 : diffractogrammes de la suspension de la **Figure 8** mais refroidie à 5°C.

Après 3 cycles de chauffages et refroidissement, la proportion de phase hexagonale semble augmenter (**Figure 10**).

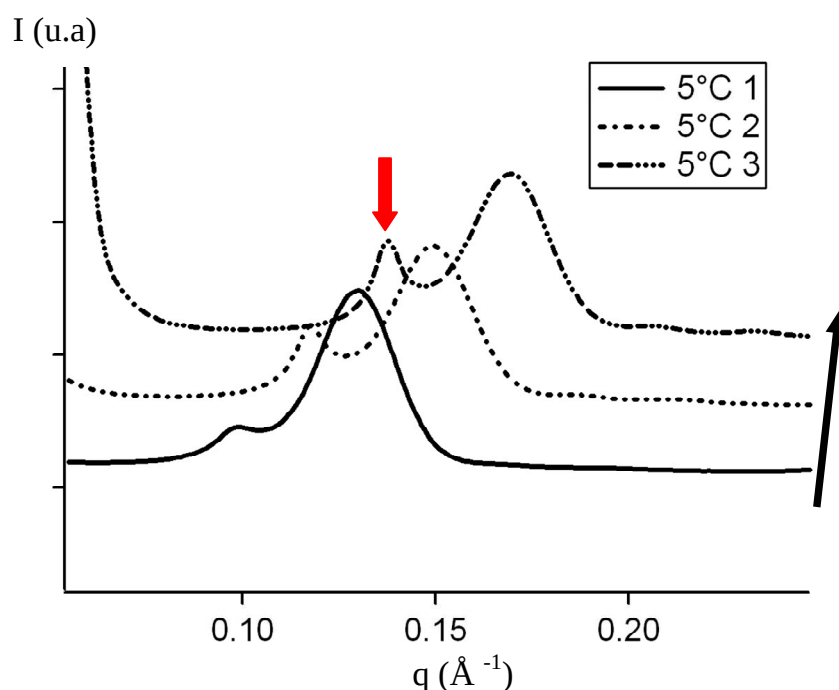


Figure 10 : 3 diffractogrammes obtenus après 3 cycles de chauffage-refroidissement, la flèche rouge montre à quel point la phase hexagonale semble augmenter au fil des cycles.

3) Structures avant évaporation de l'éthanol

La structure supramoléculaire pour les ratios de préparation 1 et 3 a aussi été étudiée avant évaporation du solvant organique (éthanol) : une seule et même structure est observée, une phase lamellaire, avec $d = 48 \text{ Å}$ (**Figure 11**).

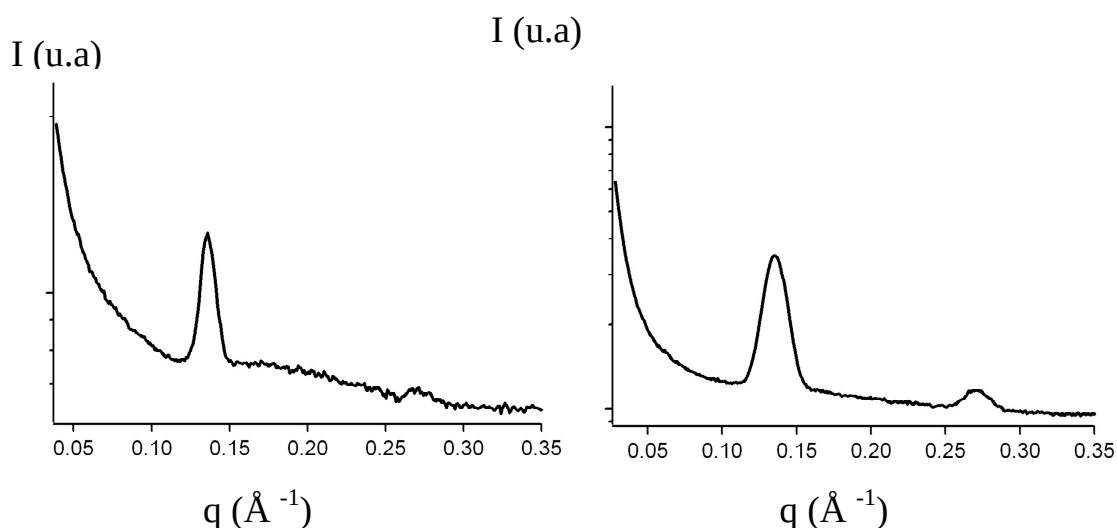


Figure 11: diffractogrammes des suspensions d'adénosine-Sq homologué avant évaporation de l'éthanol, à gauche à ratio 3 et à droite à ratio 1.

Ces observations montrent que l'éthanol a vraisemblablement un rôle dans la formation de la phase lamellaire. Ainsi, il resterait des molécules d'éthanol même après évaporation, dans une quantité d'autant plus importante que la quantité d'éthanol est proche en volume de celle de l'eau, lors de la préparation. En effet, en chauffant la suspension préparée à ratio 1, la phase hexagonale se forme, et semble augmenter de plus en plus au fil des cycles thermiques : la quantité d'éthanol résiduelle diminuerait.

4) Nanoprécipitation d'une solution d'adénosine-squalène homologué dans l'acétone

Pour étudier une possible influence de la nature du solvant, la nanoprécipitation a été réalisée avec une solution faite dans de l'acétone (solvant peu visqueux). Deux préparations ont été réalisées, avec un ratio 1 et 3 entre le volume d'eau et d'acétone et la même concentration d'adénosine-squalène homologué (~ 7 mg/mL dans l'acétone), et les mêmes phases que précédemment ont été observées: une structure hexagonale inverse pour le ratio 3 et une structure lamellaire pour le ratio 1, avec les mêmes paramètres caractéristiques (**Figure 12**).

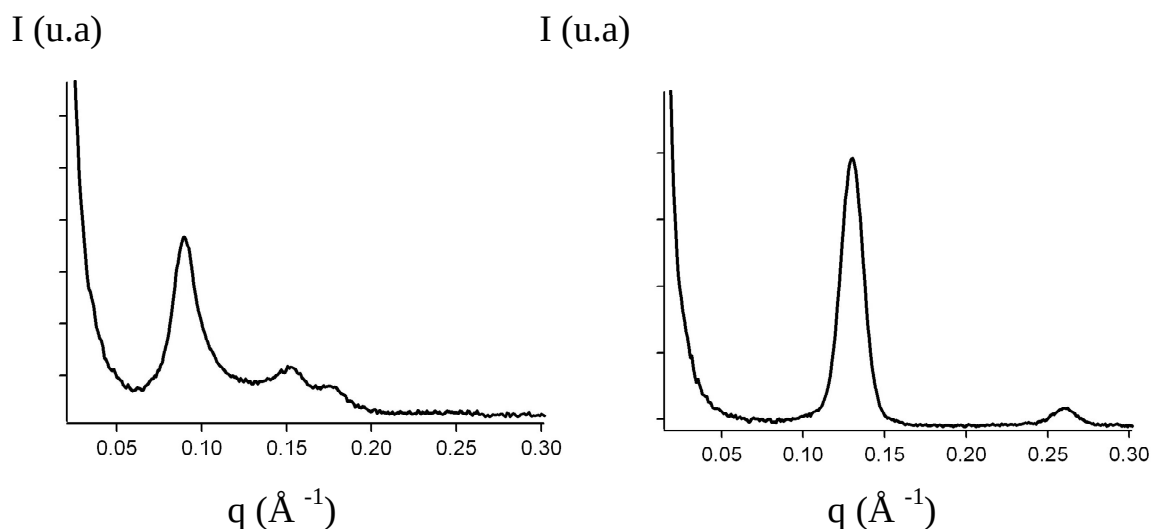
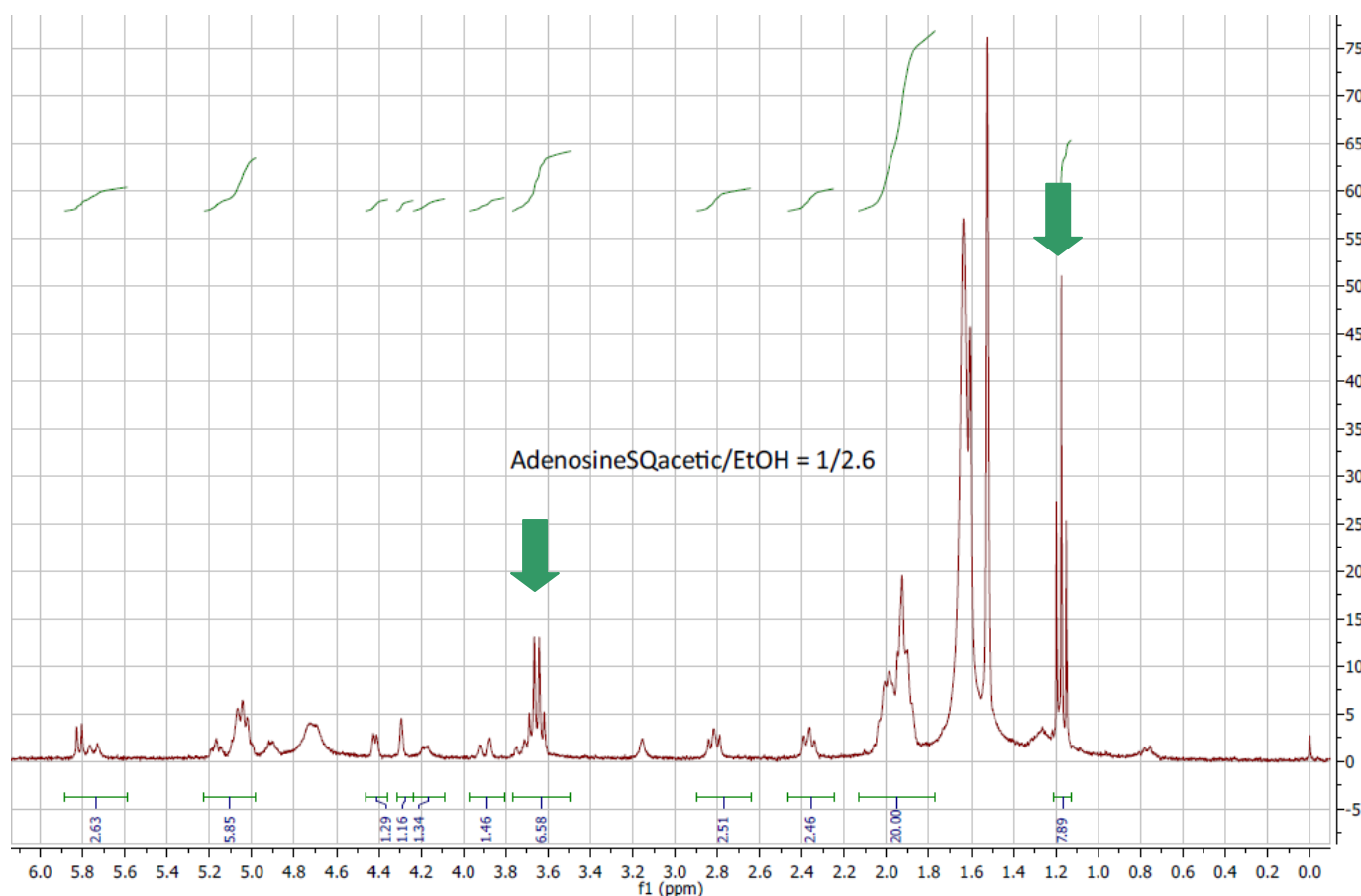


Figure 12 : diffractogrammes des suspensions obtenues par précipitation de solutions d'adénosine-squalène homologué dans l'acétone, pour le ratio eau/solvant = 3 à gauche et le ratio 1 à droite.

V- Etudes RMN

Pour vérifier l'hypothèse, des études de quantification par RMN du proton ont été réalisées pour évaluer la quantité d'éthanol résiduelle après évaporation suivant le ratio eau/ solvant de la nanoprécipitation (1 ou 3). Les particules ont été centrifugées, le surnageant éliminé, et l'échantillon a été dissout dans du CDCl_3 . Pour les deux ratios, les spectres montrent qu'il reste de l'éthanol après évaporation (triplet et quadruplet caractéristique de l'éthanol) (**Figure 13**). Cependant, après quantification, 2.6 équivalents d'éthanol (par molécule d'adénosine-Sq homologué) sont trouvés pour le ratio 3 et 30 équivalents pour le ratio 1. Ces nombres d'équivalents sont à reconsidérer, car il est peu vraisemblable qu'il reste autant de molécules d'éthanol autour d'une seule molécule d'adénosine-Sq homologué. En effet, d'après les spectres RMN, il reste aussi de l'eau, à peu près 20 équivalents. En considérant que le coefficient de partage entre l'adénosine-Sq homologué et l'eau et celui entre l'octanol et l'eau sont comparables ($\log(P_{\text{oct/Wat}}) = -0,3$), il y aura donc deux fois plus de molécules d'éthanol dans l'eau que dans le composé amphiphile (*J. Sangster, 1989*). Ainsi le nombre d'équivalents peut être ramené à 0.8 pour le ratio 1 et de 0.1 pour le ratio 3.



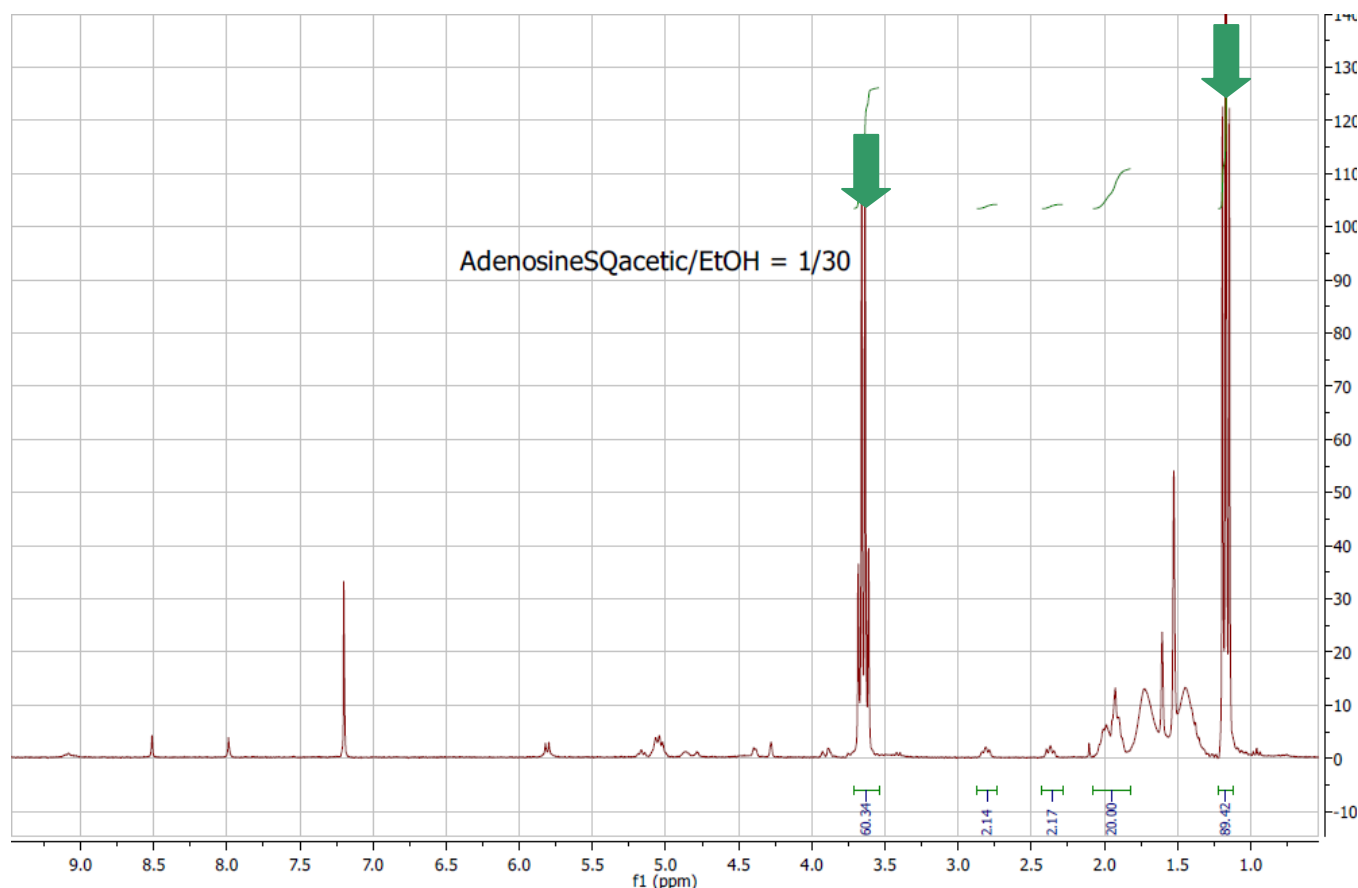


Figure 13 : spectres RMN ^1H des culots obtenus après centrifugation des suspensions réalisées avec un ratio eau/solvant de 3 en haut et de 1 en bas. Les flèches vertes indiquent le triplet et le quadruplet caractéristiques d'une molécule d'éthanol.

VI- Balance de Langmuir avec comme sous phase un mélange eau/éthanol

Pour vérifier l'influence de l'éthanol sur l'aire de la molécule, plusieurs isothermes de compression ont été réalisées avec une sous-phase comportant différents pourcentages en éthanol : 10%, 5%, 1% et 0.5%. Lorsque le pourcentage était compris entre 10 et 1 %, des molécules d'adénosine-Sq homologué devaient être solubilisées dans la sous-phase car les pressions au collapse étaient faibles comparées à la sous-phase contenant 100 % d'eau (15 mN/m, 19 mN/m et 27 mN/m respectivement contre 39 mN/m pour 100 % d'eau). Par contre, pour un pourcentage de 0,5 % en éthanol, la pression au collapse est assez élevée (33 mN/m), et on peut émettre l'hypothèse que peu de molécules se sont solubilisées (**Figure 14**). L'aire

moléculaire à 30 mN/m est de $A_0 = 37 \text{ \AA}^2$. A partir de la formule $p = \frac{V}{A_0 \times l}$, la valeur du

paramètre d'empilement (packing parameter) p est donc de 0.97, donc très proche de 1, ce qui serait compatible avec une organisation en phase lamellaire. Ce résultat confirme que la présence de molécule d'éthanol modifie l'aire moléculaire de l'adénosine-Sq homologué et donc la structure supramoléculaire des nanoparticules.

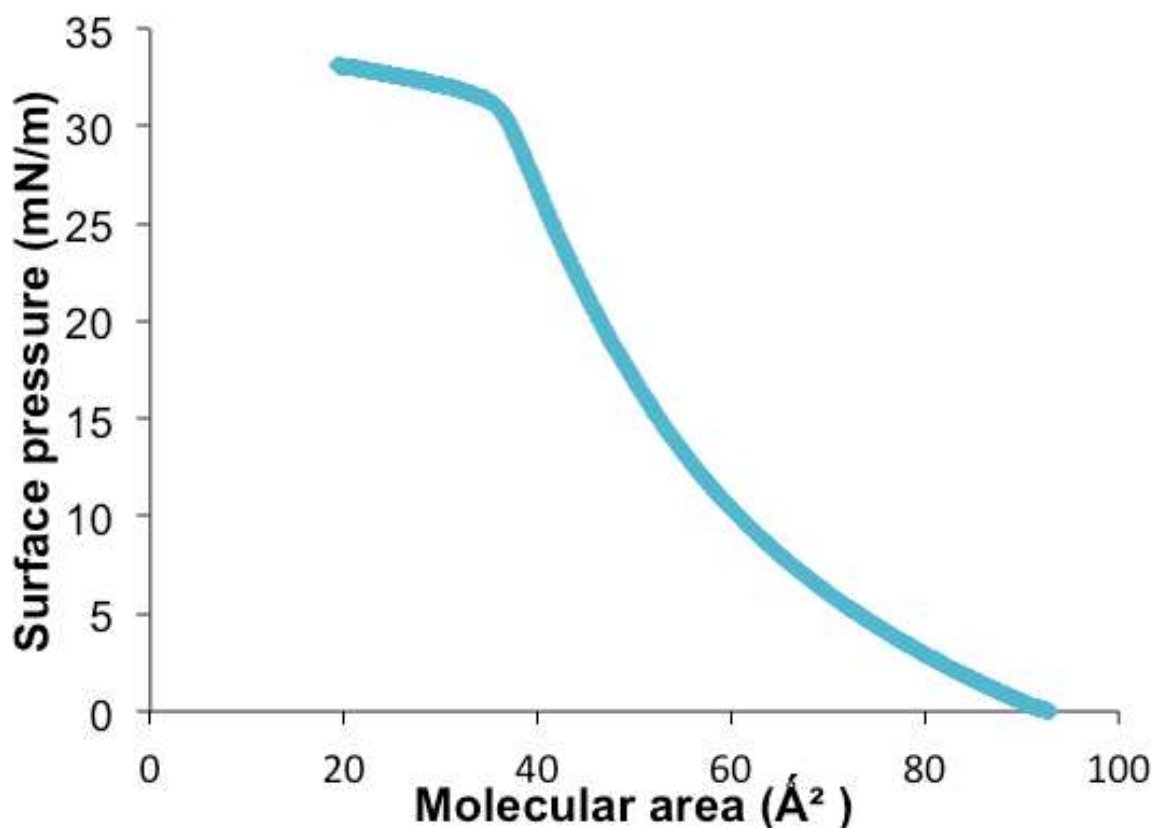


Figure 14 : Isothermes de compression de l'adénosine-Sq homologué réalisées avec 0.5 % d'EtOH dans la sous-phase.

VII-Conclusion

Pour conclure sur cette partie, tous nos résultats montrent qu'il reste des molécules de solvant après la phase d'évaporation, à la fin de la nanopréciipitation. Plus le rapport eau/solvant est faible, plus il semble rester des molécules d'éthanol liées aux molécules d'adénosine-Sq homologué, comme le coefficient de partage eau/huile de l'éthanol le laissait prévoir.

La présence de solvant résiduel après évaporation lors de la nanopréciipitation n'est que très peu traitée dans les publications. Dans l'étude de Bilati et al, de l'éthanol résiduel expliquerait la variation de la taille des nanoparticules avant et après séchage (*U. Bilati, 2005*).

Campardelli et al évoquent ce problème et proposent une élimination plus efficace du solvant par extraction au CO₂ supercritique (*R. Campardelli, 2012*).

Ce changement de structure suivant les paramètres de la nanoprécipitation n'a pas été observé avec les autres molécules étudiées, excepté pour l'adénosine-Sq, où une phase lamellaire avait aussi été caractérisée dans certaines conditions : pour de fortes concentrations, à ratio 1. L'adénosine est un nucléoside particulièrement polaire, ce qui pourrait expliquer une relativement bonne affinité du solvant, notamment l'éthanol, pour cette partie de la molécule.

Références

R. S. Armen, O. D. Uitto, S. E. Feller, Phospholipid Component Volumes: Determination and Application to Bilayer Structure Calculations, *Biophysical Journal*, **75**, 734-744, (1998).

M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lehardt, X. Wang, T. Kissel, Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the "ouzo region" upon drug loading, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41**, 244-253, (2010).

U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **24**, 67-75, (2005).

I. L. Blouza, C. Charcosset, S. Sfarb, H. Fessi, Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use, *International Journal of Pharmaceutics*, **325**, 124-131, (2006).

R. Botet, The "ouzo effect", recent developments and application to therapeutic drug carrying, *Journal of Physics: Conference Series*, **352**, 012047, (2012).

R. Campardelli, G. Della Porta, E. Reverchon, Solvent elimination from polymer nanoparticle suspensions by continuous supercritical extraction, *J. of Supercritical Fluids*, **70**, 100-105, (2012).

M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, G. Golomb, Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics, *Journal of Controlled Release*, **83**, 389-400, (2002).

J. T. Davies, E. K. Rideal, Interfacial Phenomena, 2nd ed.; *Academic Press: New York*, **265**, (1963).

S. Galindo-Rodriguez, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods, *Pharmaceutical Research*, **21** (8), 1428-1439, (2004).

F. Ganachaud, J. L. Katz, Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices, *ChemPhysChem*, **6**, 209-216, (2005).

P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *International Journal of Pharmaceutics*, **344**, 33-43, (2007).

C. E. Mora-Huertas, O. Garrigues, H. Fessi, A. Elaissari, Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80**, 235-239, (2012).

J. Sangster, Octanol-Water partition coefficients of simple organic compounds, *J. Phys.Chem.Ref. Data*, **18** (3), 1111-1227, (1989).

S. Schubert, J. T. Delaney, U. S. Schubert, Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid), *Soft Matter*, **7**, 1581-1588, (2011).

S. A. Vitale, J. L. Katz, Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”, *Langmuir*, **19**, 4105-4110, (2003).

Chapitre VI

Discussion

I- Introduction

Le concept original de « squalénisation » consiste à coupler de façon covalente des analogues nucléosidiques ayant une activité thérapeutique au squalène, lipide naturel précurseur du cholestérol. Le caractère amphiphile des composés obtenus conduit à leur auto-assemblage spontané en milieu aqueux sous forme de nanoparticules d'une centaine de nanomètres, permettant ainsi une administration intraveineuse. Cette stratégie combine les approches « prodrogue » et « nanovecteur » pour augmenter l'efficacité thérapeutique de molécules actives. L'étude de la Gemcitabine-squalène a démontré les potentialités de cette stratégie. Les nanoparticules de Gemcitabine-squalène ont en effet montré, *in vitro* et *in vivo*, une activité anticancéreuse très supérieure à celle de la Gemcitabine libre sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, en particulier des lignées leucémiques. Elles sont particulièrement actives sur les lignées leucémiques résistantes à la Gemcitabine ainsi que sur les lignées les plus agressives.

Mon travail de thèse, inscrit dans le programme ERC « TERNANOMED », vise à étendre ce concept à d'autres molécules actives et d'autres polyterpènes. L'organisation supramoléculaire des prodrogues formant des nanoassemblages est un paramètre important pour leur stabilité en milieu aqueux, leur capacité à diffuser dans les tissus et leur internalisation dans les cellules. Notre objectif est de tenter de comprendre les relations entre la nature de la paire drogue-terpénoïde, la structure des nanoparticules, et leur activité biologique. Dans ce cadre, nous avons, dans un premier temps, étudié l'influence de la nature du nucléoside et de la position du squalène sur la structure de dérivés nucléosidiques du squalène. Dans un deuxième temps, des dérivés terpénoïdes de différentes longueurs ont été couplés à la Gemcitabine, permettant de mettre en évidence la sensibilité de l'organisation supramoléculaire aux caractéristiques de la chaîne hydrophobe. Des différences d'activité anticancéreuse ont également été observées. Enfin, l'influence des conditions de nanopréciipitation sur la stabilité et la structure des nanoparticules a été montrée.

II- Modification de la molécule amphiphile

1) Tête polaire et position du squalène

Les dérivés nucléosidiques du squalène conduisent par nanoprécipitation à une grande diversité de structures lorsque le squalène est greffé sur la nucléobase : hexosome pour les nanoparticules de Gem-Sq, cubosomes pour les nanoparticules de déoxycytidine-Sq et de didéoxycytidine, éponge pour les nanoparticules d'adénosine-Sq et enfin vésicule pour les nanoparticules de Gem-Sq monophosphate.

Au contraire, lorsque le squalène est greffé en position 5' du sucre, l'organisation supramoléculaire des nanoparticules ne dépend pas du nucléoside : une phase lamellaire est toujours observée. L'exemple le plus probant est celui de la déoxycytidine-Sq qui forme une phase cubique inverse bicontinue *Pn3m* ou une phase lamellaire suivant que le squalène est fixé sur la nucléobase ou sur le sucre.

Dans le premier cas, les différentes structures ont été expliquées par des variations du paramètre d'empilement (« packing parameter »), dépendant de l'aire moléculaire à l'interface eau/air du nucléolipide considéré. L'organisation tridimensionnelle des différents nucléolipides paraît être gouvernée par l'arrangement des nucléosides à l'interface et leur hydratation.

Lorsque le squalène est couplé au sucre, l'aire moléculaire à l'interface peut changer, comme le montre l'exemple de la déoxycytidine-Sq : pour une pression de surface de 30 mN/m, l'aire moléculaire est de 35 Å² ou 43 Å² suivant la position du squalène (sur la nucléobase ou sur le sucre respectivement).

Cette augmentation d'aire moléculaire, en modifiant le paramètre d'empilement, peut favoriser la formation d'une phase lamellaire de déoxycytidine-Sq. Cependant, un second facteur peut jouer un rôle déterminant quel que soit le nucléoside : les liaisons hydrogène entre nucléobases appartenant à deux bicouches peuvent stabiliser une phase lamellaire (**Figure 1**). Des études de modélisation moléculaire ont confirmé cette hypothèse : une phase lamellaire de déoxycytidine-Sq, dont la distance de répétition est la même que celle obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles, a été obtenue par simulation.

Il faut noter que ces liaisons hydrogène ne peuvent exister lorsque le squalène est fixé sur la nucléobase, le groupement chimique étant engagé dans la liaison avec le squalène.

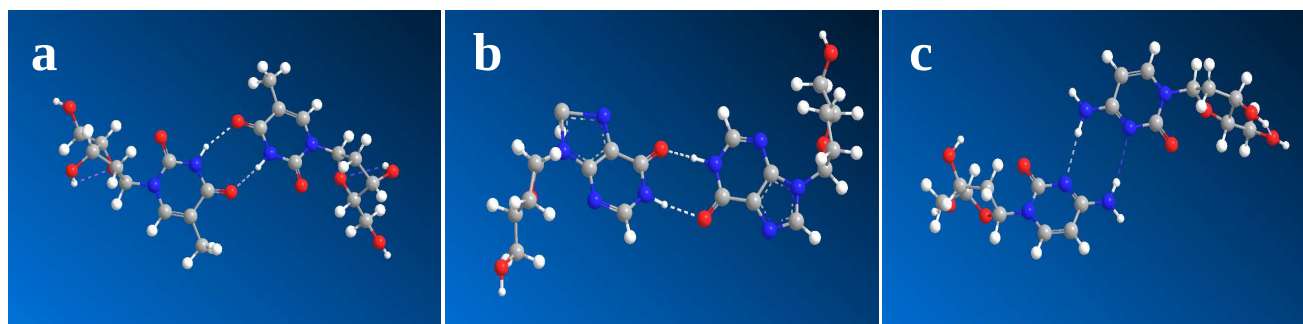


Figure 1 : Appariement de nucléosides, (a) thymidine-thymidine, (b) didéoxynosine-didéoxynosine, (c) déoxycytidine-déoxycytidine

2) Chaîne hydrophobe

La longueur de la chaîne hydrophobe a aussi une influence sur l'organisation supramoléculaire des nanoobjets. Lorsque la Gemcitabine est couplée à des chaînes comptant entre 2 et 6 unités isoprènes, on peut observer des tubes flexibles (Gem-2,3,4-isoprènes), des tubes plus rigides (Gem-5-isoprènes) et une phase hexagonale inverse (Gem-6-isoprènes). Le résultat le plus surprenant est que les nanoparticules de Gem-5-isoprènes et de Gem-Sq n'ont pas la même structure, alors que les deux chaînes hydrophobes ont le même nombre d'unités isoprène, et ne diffèrent que par la position de deux méthyles (**Figure 2**).

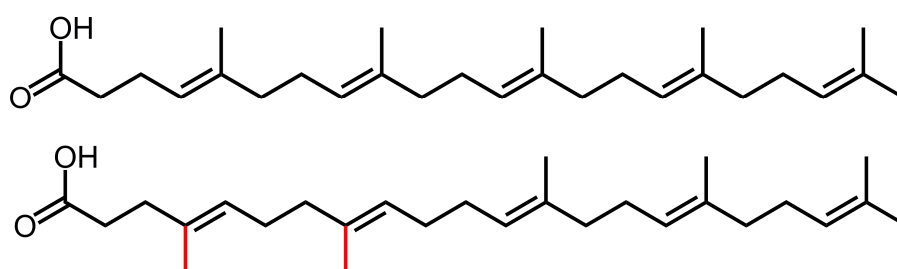


Figure 2 : Acide-5-isoprénique en haut et acide-squalénique en bas. En rouge, différences entre ces deux molécules.

Les aires moléculaires à l'interface eau/air sont proches pour les deux composés ($24 \text{ \AA}^2$ pour la Gem-5-isoprènes et $23 \text{ \AA}^2$ pour la Gem-Sq au collapse) et ne peuvent expliquer les différences de structure observées.

En revanche, l'isotherme de compression de la Gem-5-isoprènes montre une transition de la phase liquide expansée à un état plus condensé qui n'existe pas pour la Gem-Sq. De plus, le

module de compressibilité de la Gem-5-isoprène est supérieur à celui de la Gem-Sq. Cela suggère que la rigidité de la chaîne comportant 5 unités isoprènes est plus grande que celle du squalène. Cette rigidité pourrait empêcher la formation de la phase hexagonale, les chaînes hydrophobes devant s'étirer ou se comprimer pour remplir les interstices entre les cylindres formant la phase hexagonale inverse (**Figure 3**).

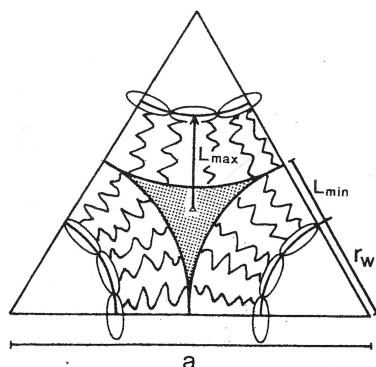


Figure 3 : dessin schématique d'une phase hexagonale H_{II} , illustrant les interstices présents entre les cylindres.

Pour aller plus loin dans l'étude de la relation structure moléculaire-structure supramoléculaire, il serait intéressant d'étudier des systèmes où (i) la chaîne hydrophobe serait saturée, (ii) la configuration des doubles liaisons varierait (isomères Z ou E), (iii) le nombre de méthyles et leur position seraient modifiés, et de déterminer l'influence de ces différents facteurs sur la formation des nanoparticules, leur stabilité et leur structure supramoléculaire.

Des chaînes polyisoprène de différentes longueurs ont également été couplées à la cytidine par polymérisation radicalaire contrôlée (NMRP : « nitroxide-mediated radical polymerization »). Plusieurs longueurs de chaînes ont été obtenues: 6, 17 et 19 unités (**Figure 4**).

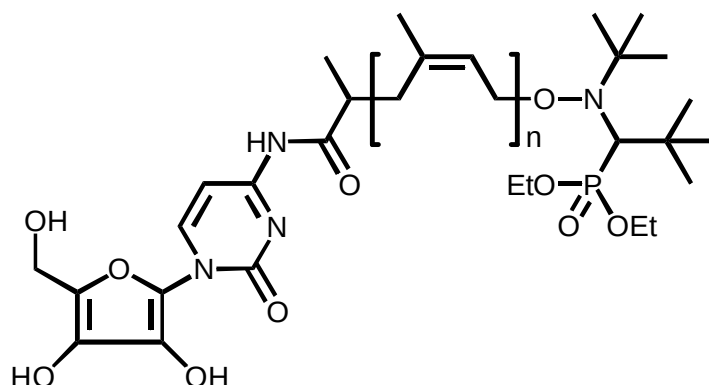


Figure 4 : formule de la cytidine couplée à une chaîne polyisoprène avec n le nombre d'unités.

Les différentes suspensions étaient stables pendant plusieurs jours, avec une taille de nanoparticule qui augmentait légèrement avec le nombre d'unités isoprènes ($n = 6$, $d = 161.0 \pm 27$ nm ; pour $n = 17$, $d = 182.2 \pm 27$ nm ; pour $n = 19$ unités, $d = 189.2 \pm 34$ nm).

Il semblerait que ces nanoparticules ne présentent pas d'organisation interne: une bosse relativement large était observée en SAXS, avec une distance de répétition augmentant avec la longueur de la chaîne isoprène (48 Å, 57 Å et 58 Å respectivement). Les images de Cryo-Tem montraient dans les 3 cas des formes sphériques (**Figure 5**). Pour les longues chaînes ($n = 17$ et $n = 19$), il se peut que la partie hydrophobe soit trop importante par rapport à la tête pour qu'un auto-assemblage ordonné puisse exister.

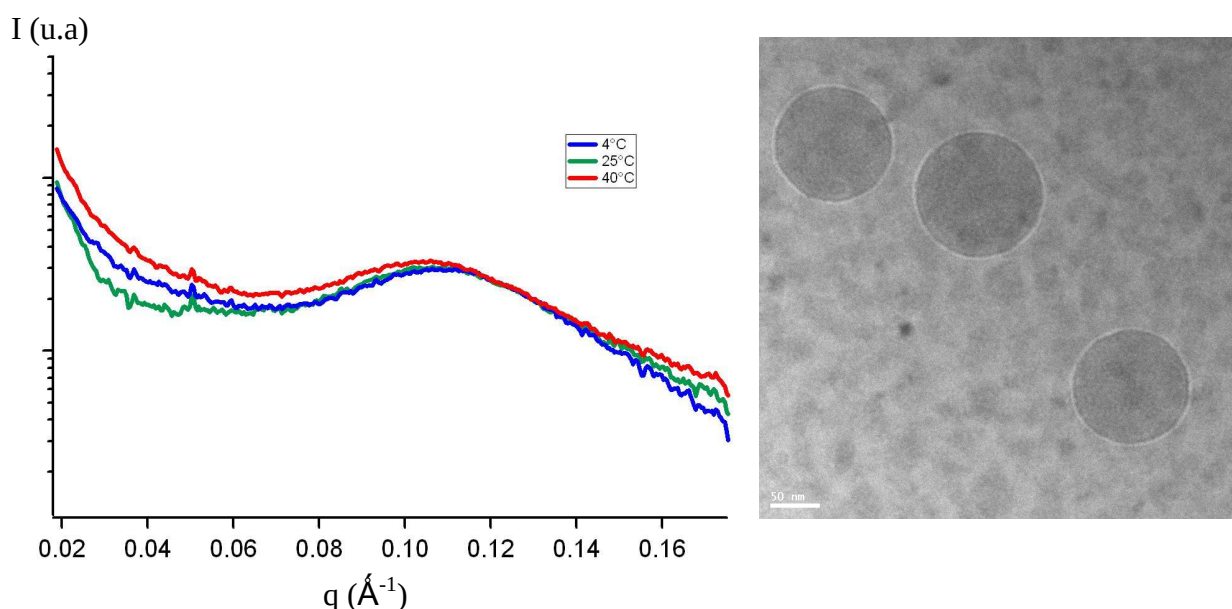


Figure 5 : à gauche, exemple de diffractogramme de la cytidine-19-isoprènes à différentes température et à droite, image en Cryo-Tem des nanoparticules correspondantes.

La chaîne isoprène comportant 6 unités étudiée précédemment formait une phase hexagonale inverse. La différence de structure provient de la nature des parties hydrophobes : la chaîne isoprène obtenue par polymérisation se termine par un groupe encombrant et présente une polydispersité. Même si les PDI de ces chaînes isoprènes sont relativement faibles (en moyenne de 2.0), il n'en reste pas moins que le produit n'est pas pur à 100 %, ce qui peut aussi expliquer les différences observées concernant les structures supramoléculaires.

III- Variations des conditions de préparation

Notre étude a fait apparaître que la structure supramoléculaire des nanoparticules pouvait dépendre de certains paramètres de nanopréciipitation. En effet, il a été observé que le ratio entre le volume d'eau et le volume de la phase éthanolique avait une influence sur la structure supramoléculaire des nanoparticules d'adénosine-Sq homologué. Lorsque le rapport eau/éthanol était égal à 1, les nanoparticules s'organisaient en phase lamellaire alors que lorsque le rapport était égal à 3 une phase hexagonale était observée. Ces différences ont été expliquées par la présence d'éthanol résiduel dans les nanoparticules, malgré une étape d'évaporation poussée. La quantité d'éthanol résiduel est d'autant plus grande que le rapport volume d'eau/volume d'éthanol est proche de 1 au cours de la nanopréciipitation, en raison du coefficient de partage de l'éthanol.

Cependant, le fait que cet alcool résiduel change la structure supramoléculaire des nanoparticules n'a été observé qu'avec l'adénosine, nucléoside particulièrement polaire. Pour les autres molécules étudiées, malgré la variation des conditions de préparation, une même structure a été trouvée. Il se peut que quelques équivalents d'éthanol résiduels « gonflent » l'aire de la tête polaire, et augmentent les distances de répétition de l'ensemble, mais pas assez pour changer la structure supramoléculaire. L'adénosine-Sq et l'adénosine-Sq homologué seraient donc des cas particuliers.

A notre connaissance, ce problème a été rarement évoqué malgré son importance pratique. R. Campardelli et al (*R. Campardelli, 2012*), ont montré qu'en utilisant un processus d'extraction par du CO₂ supercritique, la quantité de solvant résiduelle diminuait fortement (quelques ppm dans la suspension finale).

De façon générale, se placer à une faible concentration en soluté et précipiter la solution dans un large excès d'eau favorisera l'obtention de particules stables, monodisperses en taille et de structure bien définie.

La nanopréciipitation a toujours été effectuée « manuellement », en ajoutant goutte à goutte la solution éthanolique dans un volume d'eau. Un certain nombre de paramètres ont été bien contrôlés : masse des composés, volume des différentes phases, agitation avec toujours le même barreau aimanté, taille de la pipette pasteur allongée à la flamme, évaporation (en pesant le ballon), le ballon lui-même (toujours le même, en forme de « poire »). Cependant, un paramètre est difficilement contrôlable de manière précise : la vitesse d'addition de la

phase organique dans la phase aqueuse. Pourtant, différentes études montrent que ce paramètre a une influence sur la taille des nanoparticules et sur leur stabilité (*L. Capretto, 2011*). Même si en moyenne, l'addition était effectuée à la vitesse d'une goutte toutes les demi-secondes, il était cependant difficile de le faire de façon parfaitement régulière pour un volume relativement grand. Il serait sans doute intéressant de travailler avec un système automatique pour contrôler cette vitesse d'addition (pousse-seringue par exemple).

IV- Internalisation cellulaire et activité biologique

1) Internalisation cellulaire

Le mécanisme d'internalisation des nanoparticules de Gem-Sq dans les lignées MCF-7 (adénocarcinome du sein humain), J774 (macrophage immortalisé humain), CCRF CEM (leucémie humaine) et sur CEM ARAC/8C (leucémie avec déficience en transporteurs) a été étudié précédemment : les nanoparticules de Gem-Sq ne sont pas endocytées mais ce sont les molécules individuelles qui sont prises en charge par des protéines du milieu extracellulaire (albumine, lipoprotéines) et qui entrent par diffusion passive dans la cellule (*L. Bidstein, 2010 ; L. Bildstein, 2010*). Les membranes de la cellule, plasmique et internes, deviennent alors un véritable réservoir de Gem-Sq. La Gemcitabine est ensuite libérée via les estérases au sein du cytoplasme pour ensuite être transformée par les kinases en métabolite actif (Gemcitabine triphosphorylée) se combinant à l'ADN. Le passage passif des membranes et la libération progressive de la Gemcitabine permettent de surmonter deux causes de résistance à la gemcitabine : l'absence de transporteurs nucléosidiques et le déficit en kinases.

Cependant, il semblerait que le mécanisme d'internalisation dépende de la lignée cellulaire (*X.-M. Zhu, 2012*). A. Maksimenko et al ont mis en évidence une cytotoxicité deux fois plus importante des nanoparticules de Gem-Sq comparées aux nanoparticules de Gem-5-isoprènes sur les lignées B16F10 (mélanome murin) et MiaPaCa-2 (cancer du pancréas humain) (*A. Maksimenko, 2013*)

Les deux chaînes hydrophobes ont le même nombre d'unités isoprènes, mais les nanoparticules ne présentent pas la même structure supramoléculaire (forme hexagonale et forme en tube respectivement). En revanche, la libération de la Gemcitabine dans une solution à 90 % en FBS était comparable. Quant aux autres lignées cellulaires étudiées (A549 et MCF-7), les cytotoxicités étaient similaires. La question que nous nous sommes posée est la

suivante : un mécanisme d'internalisation additionnel, qui serait influencé par des différences de structure supramoléculaire, existerait-il pour les lignées B16F10 et MiaPaCa-2?

Nous avons donc étudié l'internalisation de ces deux types de nanoparticules par les lignées B16F10 et MiaPaCa-2. Et effectivement, nous avons montré par imagerie confocale que les nanoparticules de Gem-Sq, à morphologie plutôt isotrope, étaient internalisées en plus grande quantité que les tubes de Gem-5-isoprènes, ce qui est en accord avec les résultats de Chitrani et al et Qiu et al (*B. D. Chitrani, 2007* et *Y. Qiu, 2010*). Ainsi, sur ces deux lignées cellulaires, au vu de la microscopie confocale, il semblerait que les nanoparticules soient en grande majorité endocytées, même si de la diffusion passive peut aussi coexister.

Pour aller plus loin dans la connaissance du mécanisme d'internalisation cellulaire, il serait aussi intéressant d'étudier la ou les voies précises d'entrer en utilisant des inhibiteurs spécifiques et en mesurant l'intensité de fluorescence dans les cellules vivantes, pour chaque nanoparticule : par exemple, la chlorpromazine et la génistéine sont connues pour inhiber les voies d'endocytose clathrine-dépendante et d'endocytose caveoline-dépendante respectivement (*T. dos Santos, 2011* ; *D. Vercauteren, 2010*).

2) Sonde fluorescente

Un point qu'il est intéressant de souligner est le choix de la sonde fluorescente. Le choix du CholBodiPy vert, molécule lipophile, s'est fait rapidement, cette sonde étant très utilisée pour étudier les membranes (*G. M. Makrigiorgos, 1997*) et déjà très employée dans l'équipe. En revanche, lorsque les nanoparticules étaient formulées avec 1% de sonde, une intensité de fluorescence différente (facteur 2 pratiquement) avait été observée suivant le composé, ce qui n'était absolument pas attendu. Une hypothèse d'explication serait que la totalité de la sonde ne s'insère pas dans la structure en forme de tube (nanoparticules de Gem-5-isoprènes) : il resterait ainsi des molécules de CholBodiPy en solution, formant peut-être le et/ou les deux dimères D_I et D_{II}, dont le dernier qui fluoresce dans le rouge (*G. M. Makrigiorgos, 1997* ; *Y. Ohsaki, 2010*). Une autre hypothèse pourrait aussi être envisagée : dans la nanoparticule de Gem-5-isoprènes elle-même, les molécules seraient plus proches et formeraient ainsi des dimères. Il a été montré que la distance entre monomères devait être d'environ 4.5 Å pour former un dimère (*N. Saki, 2005*). Quant au rayon de Förster, il a été évalué à 57 Å pour le dimère D_I (*F. Bergström, 2002*), c'est-à-dire que si le donneur et l'accepteur se trouvent espacés de cette distance, 50% de l'énergie d'excitation absorbée par le monomère est

transférée à l'accepteur, le dimère. Dans notre cas, ce transfert d'énergie est tout à fait envisageable.

La solution employée pour remédier à ce problème a été de diminuer la quantité de sonde dans les deux nanoparticules (Gem-Sq et Gem-5-isoprènes) ce qui a eu pour conséquence d'augmenter l'intensité de fluorescence des nanoparticules de Gem-5-isoprènes et de diminuer celle des particules de Gem-Sq : les intensités étaient ainsi égales, ce qui confirme que la sonde avait été entièrement internalisée.

Pour étudier l'ouverture de la nanoparticule dans le milieu intracellulaire, nous pourrions coprécipiter une sonde CholBodiPy vert avec une sonde CholBodiPy rouge. Après une première acquisition en excitant le fluorophore qui émet dans le vert et une seconde en excitant le fluorophore qui émet dans le rouge, les images pourront être superposées et la colocalisation suivie. Il faudrait cependant se placer dans des conditions limitant le FRET qui a lieu entre ces deux sondes : les spectres d'émission et d'absorption se recouvrant partiellement lorsque la première sonde émettra dans le vert, une partie de la fluorescence excitera la seconde sonde et sera donc perdue.

Pour compléter ces travaux, une étude par FACS pourrait être envisagée pour comparer l'internalisation dans les cellules cancéreuses MiaPaCa-2 des différentes nanoparticules formées par des prodrogues de la gemcitabine ayant des longueurs de chaîne polyisoprénique différentes. En effet, des différences d'activité *in vivo* ont été mises en évidence en fonction de la longueur de chaîne. Les nanoparticules de Gem-3-isoprènes d'une part, et de Gem-polyisoprène ($M_n = 2510 \text{ g.mol}^{-1}$) d'autre part, se sont montrées très efficaces (A. Maksimenko 2013 ; S. Harrisson, 2013).

L'interaction des prodrogues avec une membrane modèle, la perturbation induite et une possible insertion dans la membrane et la perturbation induite pourraient aussi être étudiées (B. Pili, 2010 ; L. Bildstein, 2011).

Références

- F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hägglöf, R. Wortmann, T. Ny, L. B.-Å. Johansson, Dimers of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) with Light Spectroscopic Applications in Chemistry and Biology, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2), 196-204, (2002).
- L. Bildstein, V. Marsaud, H. Chacun, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, C. Dubernet, Extracellular-protein-enhanced cellular uptake of squalenoyl gemcitabine from nanoassemblies, *Soft Matter*, **6**, 5570–5580, (2010).
- L. Bildstein, C. Dubernet, V. Marsaud, H. Chacun, V. Nicolas, C. Gueutin, A. Sarasin, H. Bénech, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: An original drug delivery pathway, *Journal of Controlled Release*, **147**, 163–170, (2010).
- L. Bildstein, B. Pili, V. Marsaud, S. Wack, F. Meneau, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, C. Bourgaux, P. Couvreur, C. Dubernet, Interaction of an amphiphilic squalenoyl prodrug of gemcitabine with cellular membranes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **79**, 612–620 (2011).
- R. Campardelli, G. Della Porta, E. Reverchon, Solvent elimination from polymer nanoparticle suspensions by continuous supercritical extraction, *J. of Supercritical Fluids*, **70**, 100–105, (2012).
- L. Capretto, D. Carugu, W. Cheng, M. Hill, X. Zhang, Continuous-flow production of polymeric micelles in microreactors: Experimental and computational analysis, *Journal of Colloid and Interface Science*, **357**, 243–251, (2011).
- S. Harrisson, J. Nicolas, A. Maksimenko, D. T. Bui, J. Mougin, P. Couvreur, Nanoparticles with In Vivo Anticancer Activity from Polymer Prodrug Amphiphiles Prepared by Living Radical Polymerization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 1678 –1682, (2013).
- G. M. Makrigiorgos, Detection of lipid peroxidation on erythrocytes using the excimer forming property of a lipophilic BODIPY fluorescent dye, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **35**, 23–35, (1997).
- A. Maksimenko, J. Mougin, S. Mura, E. Sliwinski, E. Lepeltier, C. Bourgaux, S. Lepêtre, F. Zouhiri, D. Desmaële, P. Couvreur, Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy, *Cancer Letter*, **34** (2), 346–353, (2013).
- Y. Ohsaki, Y. Shinohara, M. Suzuki, T. Fujimoto, A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for Fluorescence microscopy, *Histochem Cell Biol*, **133**, 477–480, (2010).
- B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, G. Keller, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, M. Ollivon, Interaction of a new anticancer prodrug, gemcitabine–squalene, with a model membrane: Coupled DSC and XRD study, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**, 1522–1532, (2010).

T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines, *PLoS ONE*, **6** (9), (2011).

N. Saki, T. Dincb, E. U. Akkaya, Excimer emission and energy transfer in cofacial boradiazaindacene (BODIPY) dimers built on a xanthene scaffold, *Tetrahedron*, **62**, 2721–2725, (2006).

D. Vercauteren, R. E Vandenbroucke, A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders, K. Braeckmans, The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls, *The American Society of Gene & Cell Therapy*, **18** (3), 561-569, (2010).

X.-M. Zhu, Y.-X. J. Wang, K. C.-F. Leung, S.-F. Lee, F. Zhao, D.-W. Wang, J. M. Y. Lai, C. Wan, C. H. K. Cheng. A. T. Ahuja, Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 953–964, (2012).

Conclusion générale

La squalénisation est un concept de prodrogue innovant qui permet de marier deux stratégies de formulation : quelque soit le principe actif couplé au squalène, des nanoparticules se forment spontanément dans l'eau, après nanoprécipitation. Au vu de l'amélioration importante de l'activité biologique de la molécule active via cette stratégie, et des structures supramoléculaires diverses trouvées, le but de ce travail a été de rationaliser cette approche en déterminant d'une part une relation molécule/structure supramoléculaire, et d'autre part de relier la structure à l'activité biologique.

Dans un premier temps, nous avons montré que la position du squalène orientait les différentes structures supramoléculaires obtenues :

- En position 5' de l'hydroxyle du sucre, une phase lamellaire est observée quel que soit le nucléoside couplé, l'auto-association étant dirigée par la formation de liaisons hydrogène entre les têtes polaires.
- Sur la nucléobase, des structures diverses étaient obtenues, l'auto-association étant dirigée par l'aire moléculaire, liée au caractère hydrophile du nucléoside.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la longueur de la chaîne hydrophobe avait une influence sur la structure supramoléculaire des prodrogues, la tête polaire étant la Gemcitabine.

Enfin, de faibles différences de la chaîne hydrophobe peuvent aussi entraîner des différences de structure supramoléculaire : deux organisations ont été confirmées pour la Gemcitabine-Squalène et la Gemcitabine-5-isoprènes, hexagonale inverse et en tube respectivement, le squalène et la chaîne 5-isoprènes ayant comme seule différence la position de deux méthyles.

Lors de la préparation de certaines nanoparticules, de manière inattendue, le rapport entre le volume de la phase aqueuse et le volume de la phase organique avait une influence sur la structure supramoléculaire des nanoparticules. Ces variations de structure ont été reliées à la présence de solvant résiduel après évaporation. Il est aussi apparu important de se placer dans la région dite « Ouzo » pour avoir un système bien contrôlé, monodisperse en taille et homogène en structure.

Enfin, l'internalisation des nanoparticules de Gem-Sq et de Gem-5-isoprènes a été étudiée sur les cellules B16F10 (mélanome murin) et MiaPaCa-2 (cancer du pancréas humain), et il a été montré que les nanoparticules de structure hexagonale étaient endocytées en bien plus grande

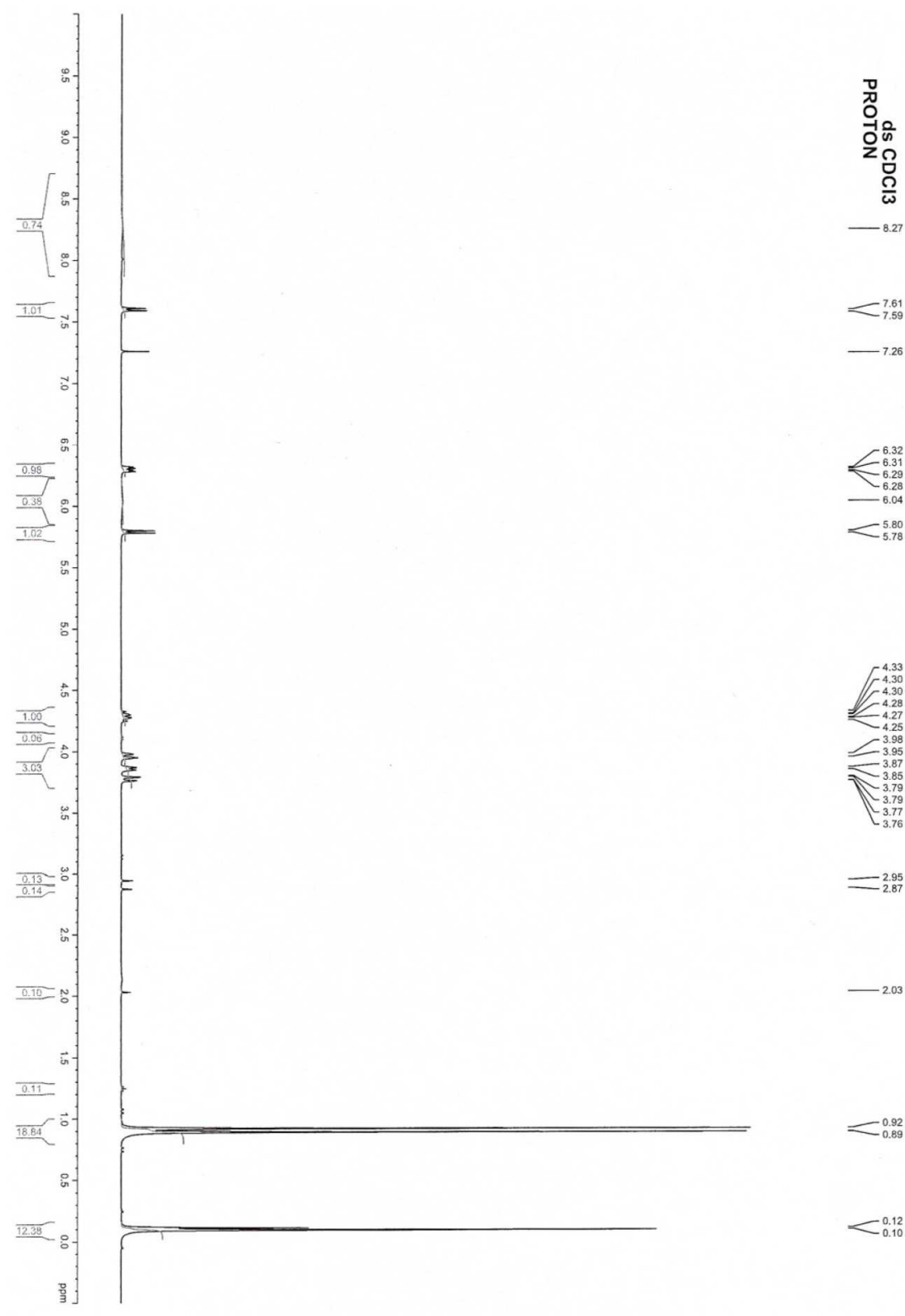
quantité que les nanoparticules en forme de tubes, démontrant ainsi une relation structure/activité.

Annexes

I- Synthèse de la Gemcitabine-1-isoprène et de la Gemcitabine-2-isoprènes

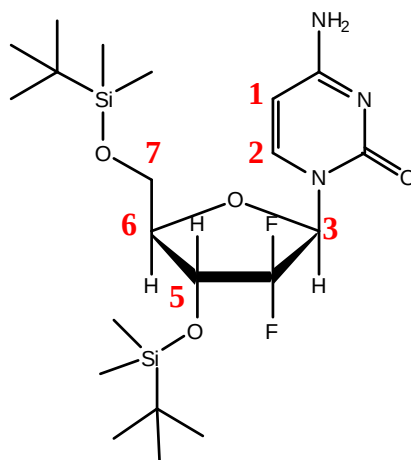
1) Gemcitabine protégée

a) Figure 1 : Spectre RMN ^1H de la Gemcitabine protégée, à 300 MHz dans CDCl_3

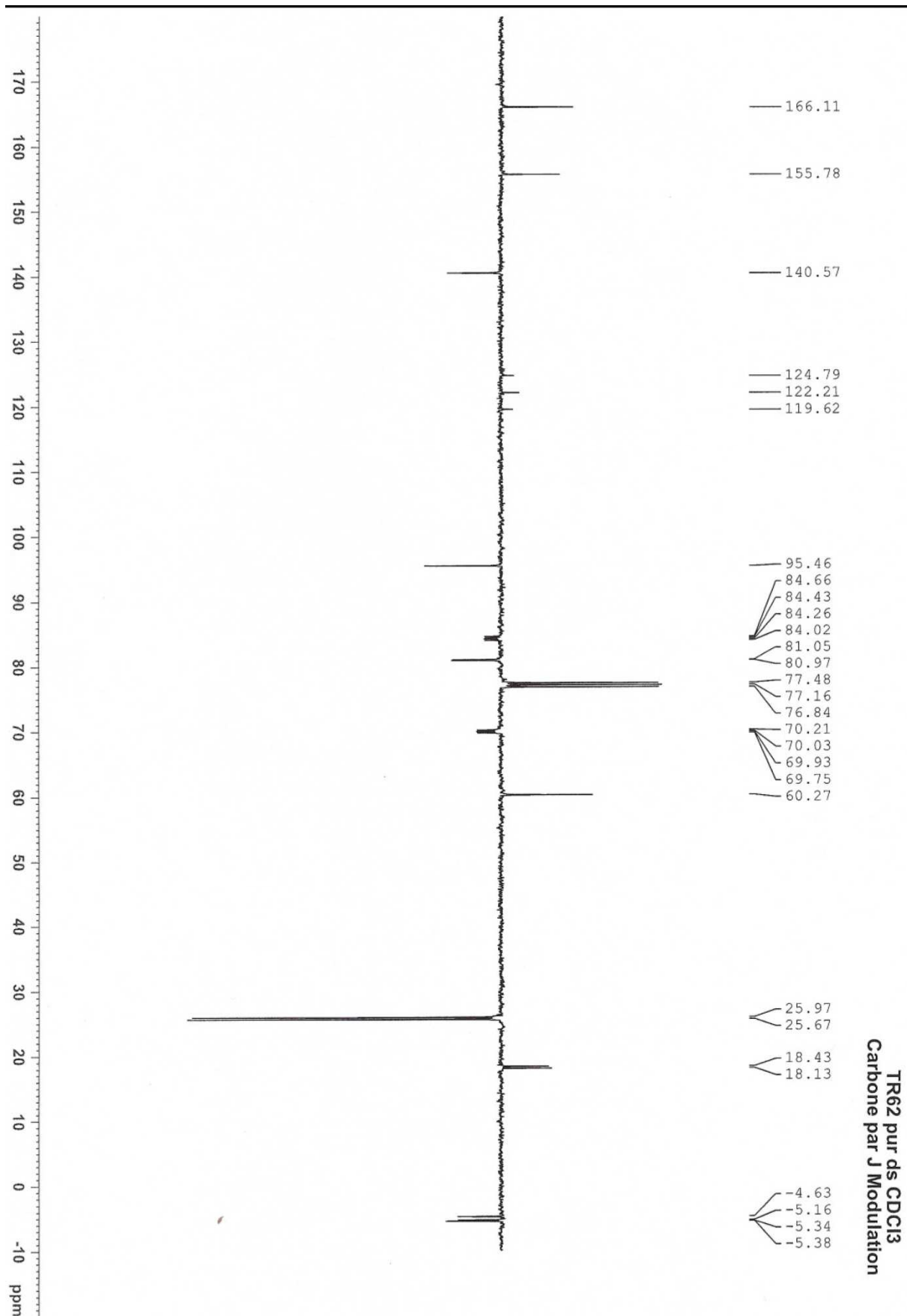


Les déplacements chimiques ont été attribués :

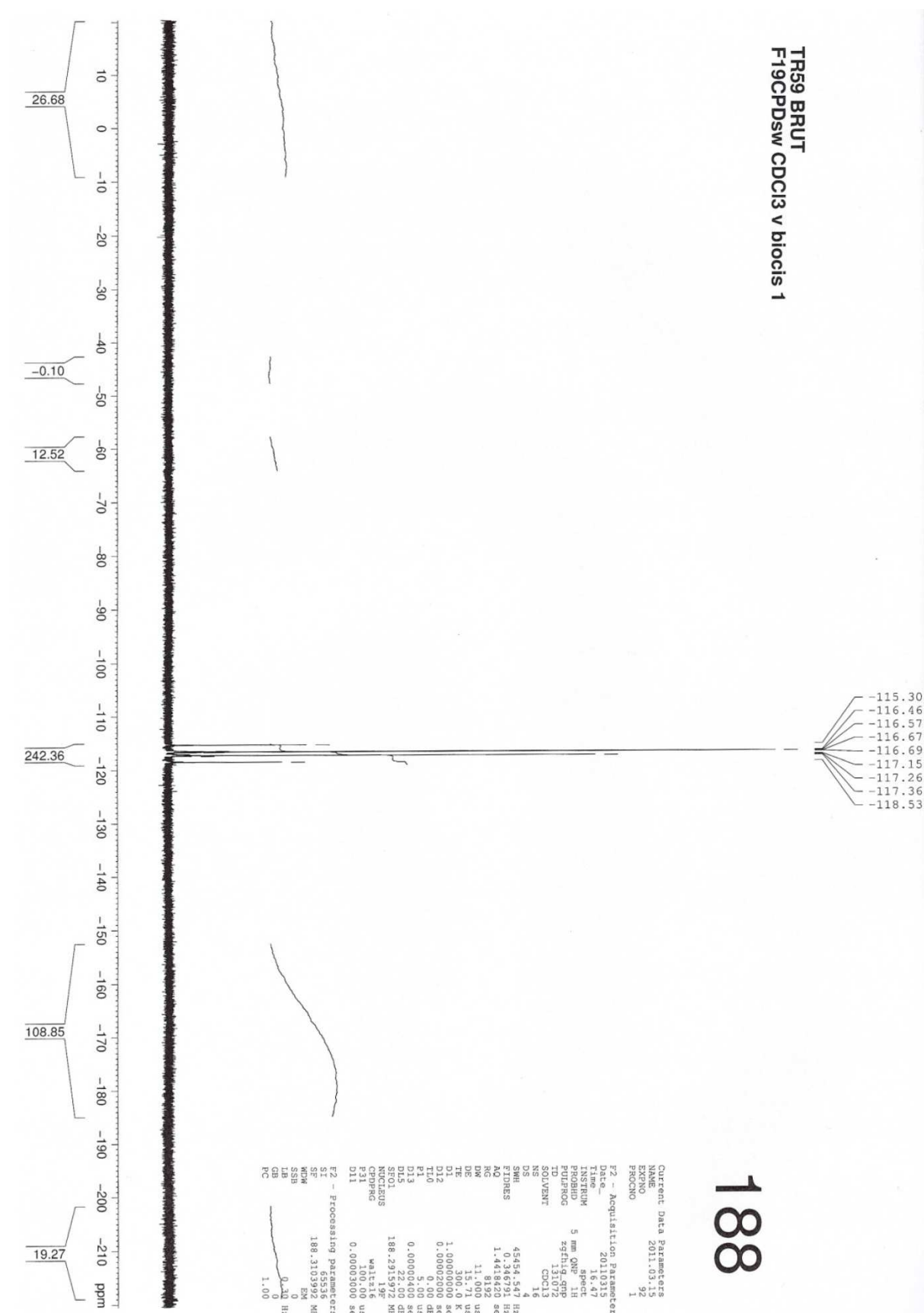
7.59 (1H, doublet, C_2H)
6.23 (1H, doublet de doublet, C_3H)
5.53 (1H, doublet, C_1H)
4.20 (1H, multiplet, C_5H)
3.9 (1H, doublet, C_7Ha)
3.8 (1H, doublet, C_7Hb)
3.7 (1H, doublet de doublet, C_6H)
0.82 (9H, singulet, $Si(CH_3)_3$)
0.79 (9H, singulet, $Si(CH_3)_3$)
0.015 (6H, singulet, $Si(CH_3)_3$)
0.01 (6H, singulet, $Si(CH_3)_3$)



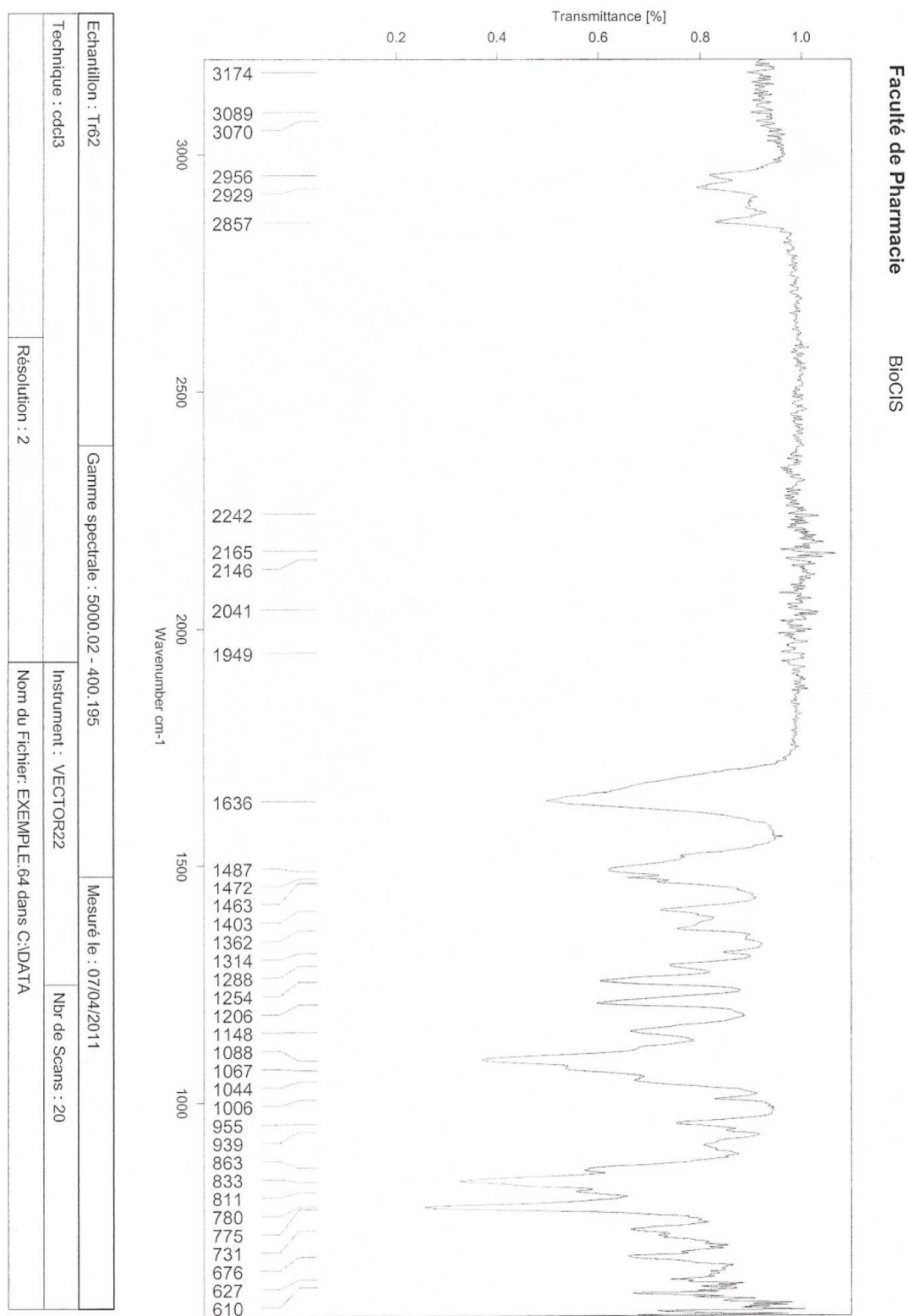
b) Figure 2 : Spectre RMN ^{13}C de la Gemcitabine protégée, à 100 MHz dans CDCl_3



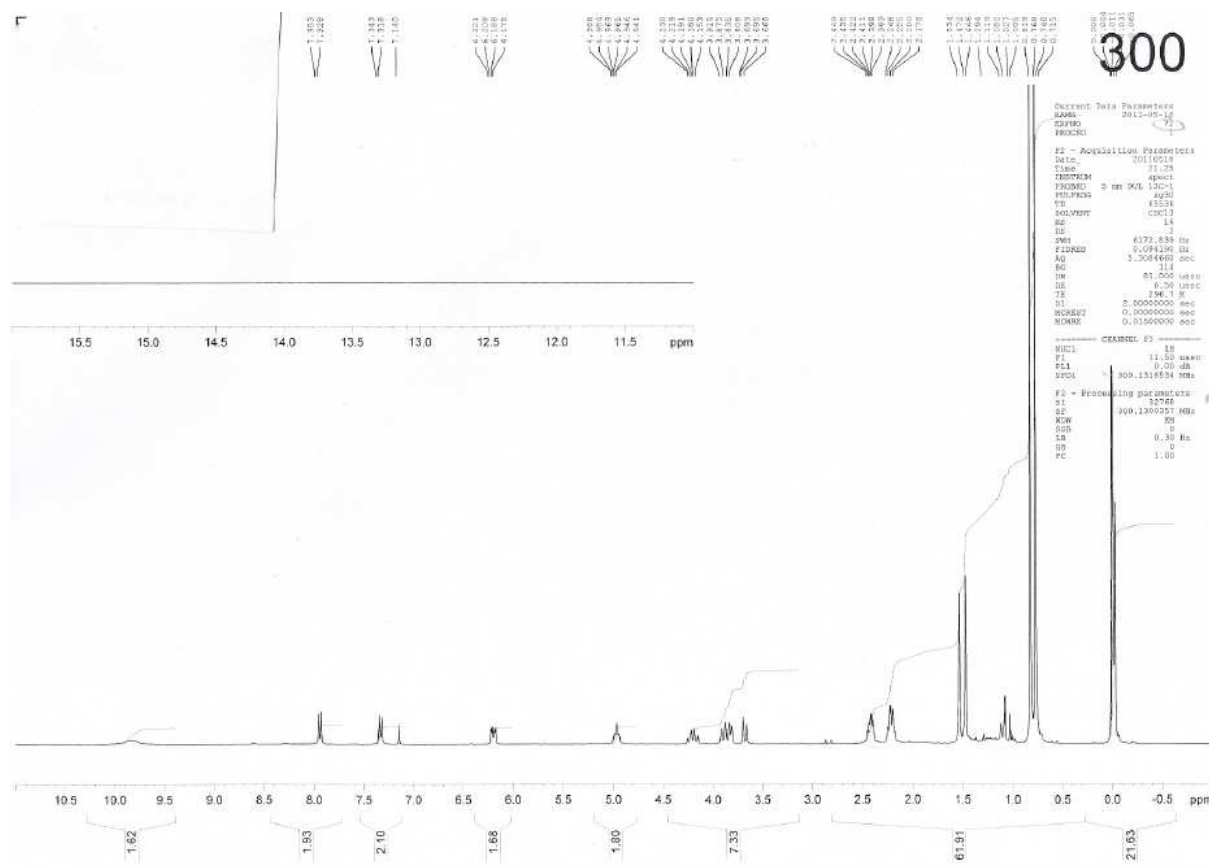
c) Figure 3 : Spectre RMN ^{19}F de la Gemcitabine protégée, à 188 MHz dans CDCl_3



d) Figure 4 : Spectre infrarouge de la gemcitabine silylée

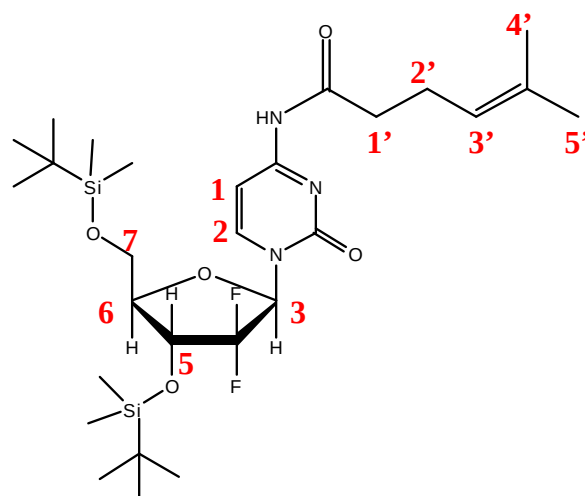


2) Figure 5: Spectre RMN ^1H dans CDCl_3 après couplage avec l'acide monoisoprénique, à 300 MHz



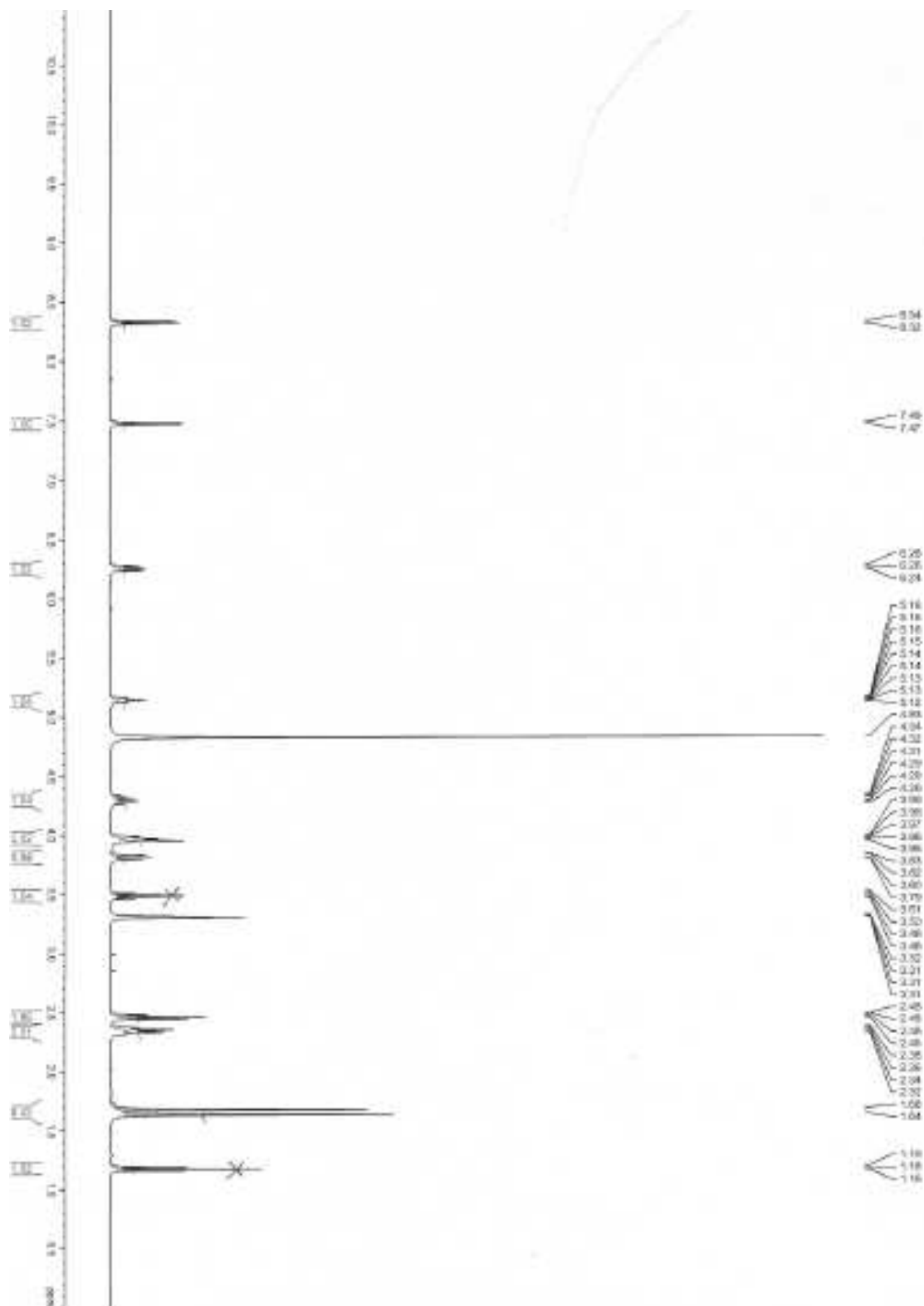
Les déplacements chimiques ont été attribués :

- 8.4 (1H, singulet, NH)
- 7.9 (1H, doublet, C_2H)
- 7.2 (1H, doublet, C_1H)
- 6.2 (1H, doublet de doublet, C_3H)
- 5.0 (1 H, multiplet, $\text{C}_3'\text{H}$)
- 4.2 (1H, multiplet, C_5H)
- 3.9 (1H, doublet, C_7Ha)
- 3.8 (1H, doublet, C_7Hb)
- 3.7 (1H, doublet de doublet, C_6H)
- 2.3 (4H, multiplet, $\text{C}_1'\text{H}$ et $\text{C}_2'\text{H}$)
- 1.6 (3H, singulet, $\text{C}_4'\text{H}$)
- 1.5 (3H, singulet, $\text{C}_5'\text{H}$)
- 0.85 (9H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) ; 0.75 (9H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)
- 0.015 (6H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ; 0.01 (6H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)



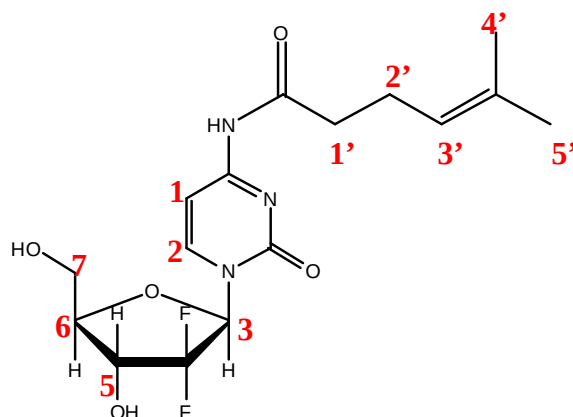
3) Gemcitabine-1-isoprène après l'étape de déprotection

a) Figure 6 : Spectre RMN ^1H dans le $\text{MeOH } d_4$, à 400 MHz



Les déplacements chimiques ont été attribués :

- 7.9 (1H, doublet, C₂H)
- 7.4 (1H, doublet, C₁H)
- 6.3 (1H, multiplet, C₃H)
- 5.1 (1 H, multiplet, C_{3'}H)
- 4.1 (1H, multiplet, C₅H)
- 3.9 (1H, doublet, C₇Ha)
- 3.8 (1H, doublet, C₇Hb)
- 3.7 (1H, doublet de doublet, C₆H)
- 2.4 (4H, multiplet, C_{1'}H et C_{2'}H)
- 1.7 (3H, singulet, C_{4'}H)
- 1.6 (3H, singulet, C_{5'}H)



b) Figure 7 : Spectre de masse ESI

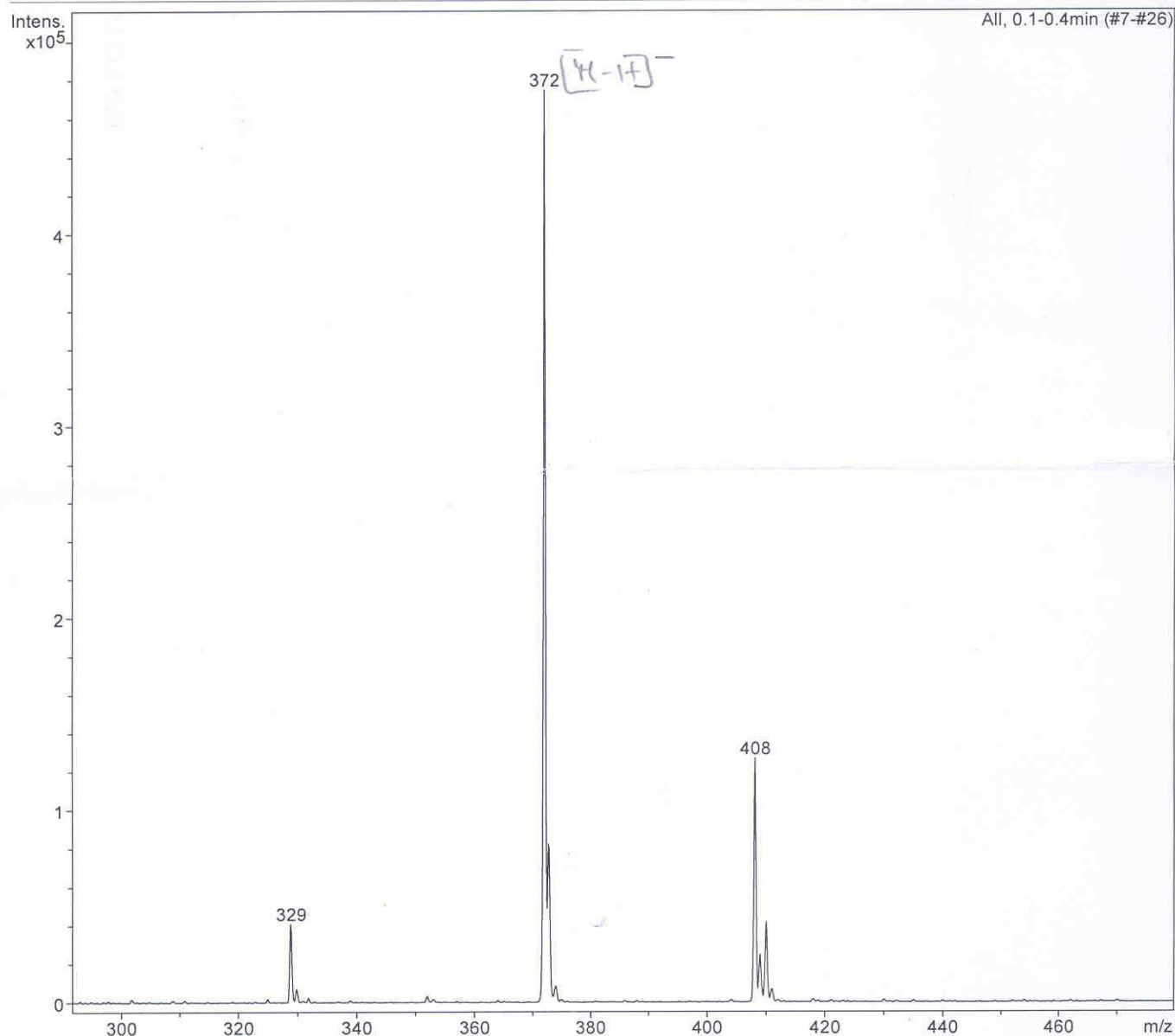
Display Report

Analysis Info

Analysis Name	COU_EL00.d	Acquisition Date	07/05/12 09:50:16
Method	Copy of Routine.MS	Operator	Administrator
Sample Name	Default	Instrument	Esquire-LC_00040
Comment	LEPELTIER CEM MONO ISO dans MeOH		

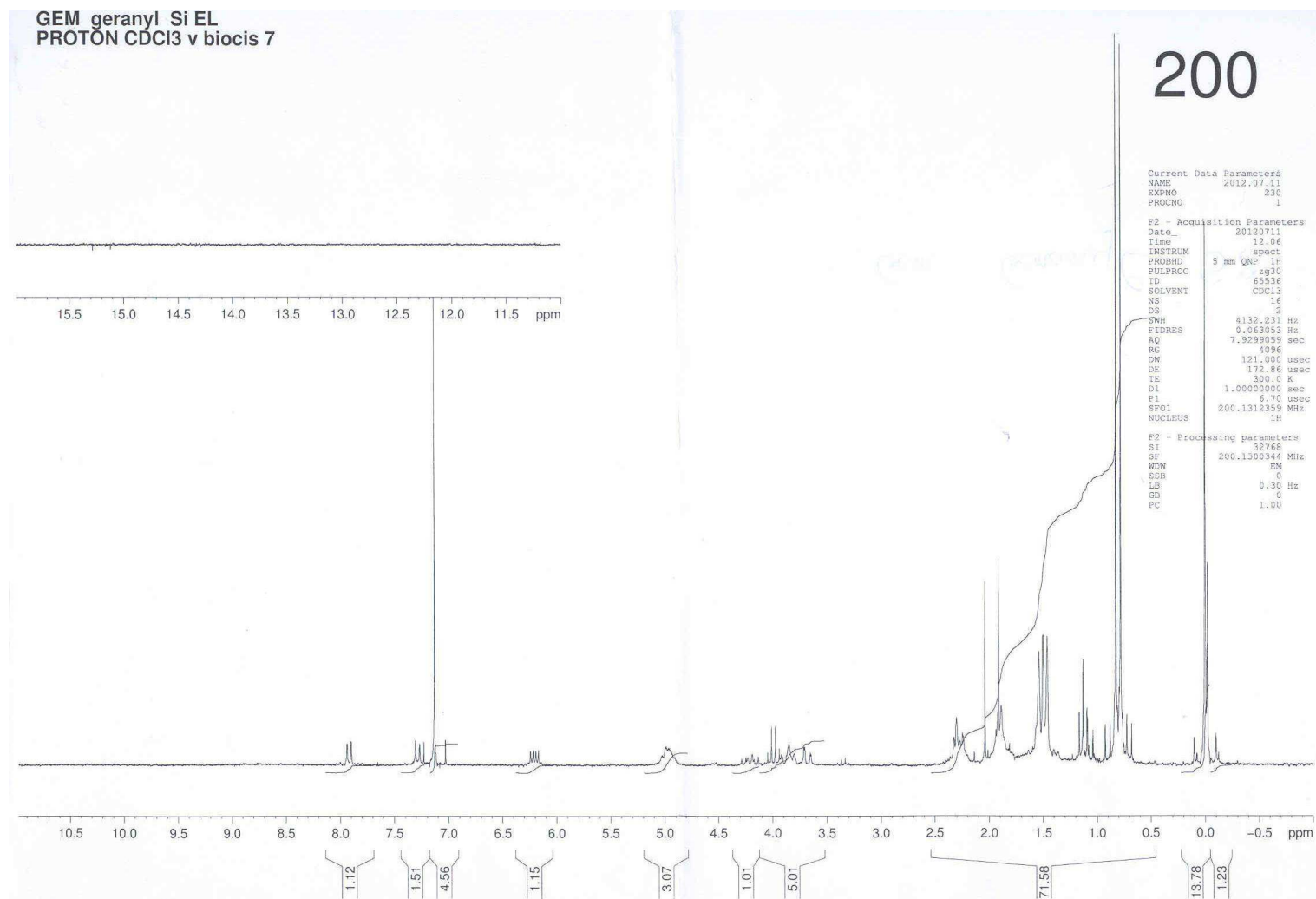
Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	n/a
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50.00 m/z	Scan End	1000.00 m/z
Capillary Exit	-104.8 Volt	Skim 1	-32.6 Volt	Trap Drive	43.8
Accumulation Time	7233 μ s	Averages	8 Spectra	Auto MS/MS	Off



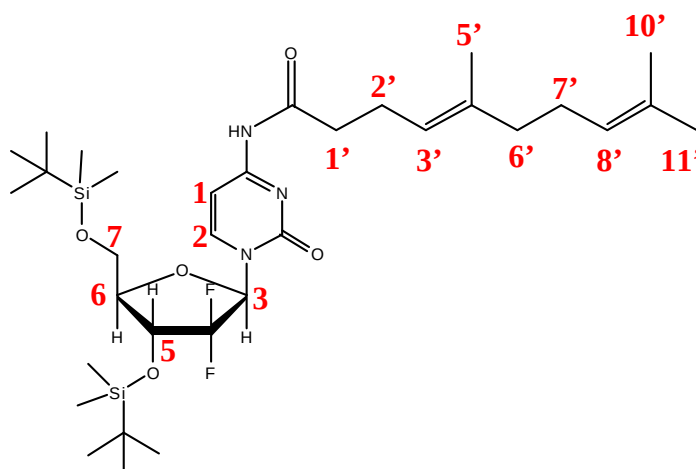
La masse molaire du produit fini étant de $M = 373 \text{ g.mol}^{-1}$, le pic majoritaire correspond à $[M-H]^+$.

4) Figure 8 : Spectre RMN ^1H dans CDCl_3 après couplage avec l'acide gérannique, à 200 MHz

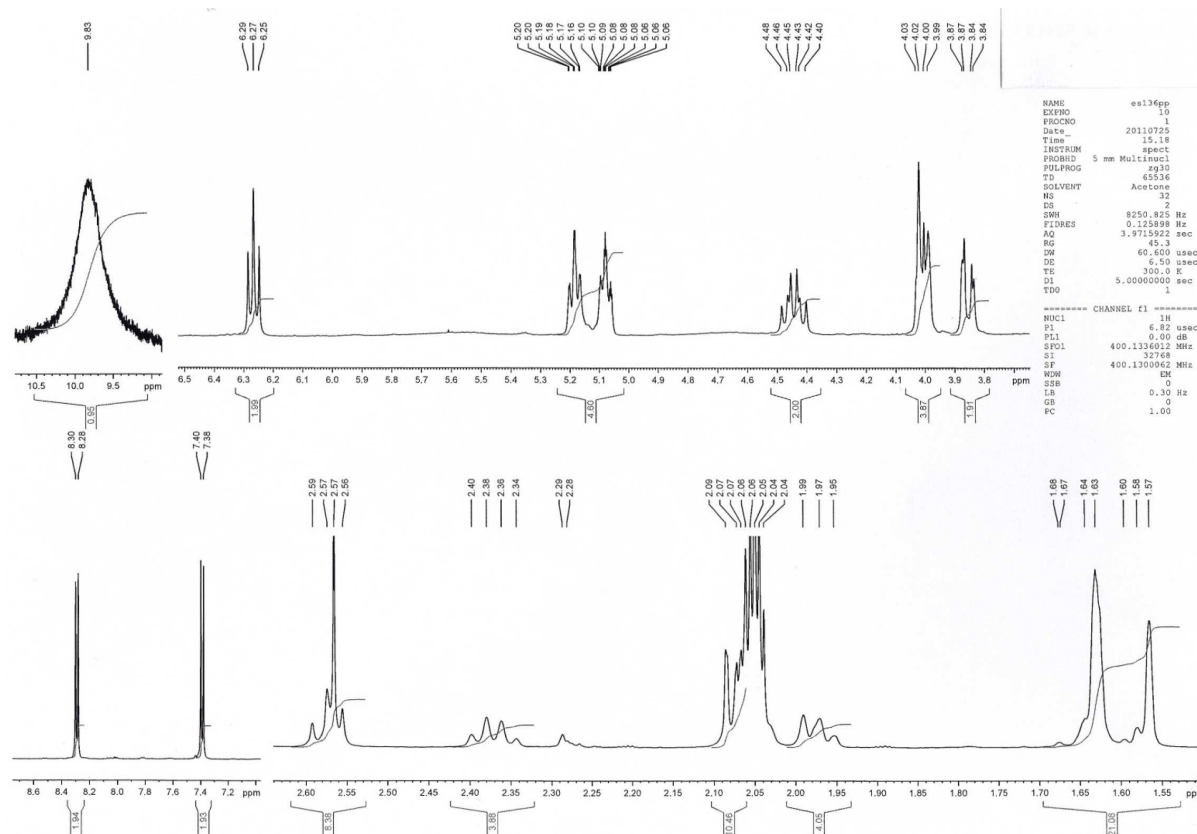


Les déplacements chimiques ont été attribués :

- 7.9 (1H, doublet, C_2H)
- 7.3 (1H, doublet, C_1H)
- 6.2 (1H, doublet de doublet, C_3H)
- 5.0 (2 H, multiplet, $\text{C}_3'\text{H}$ et $\text{C}_8'\text{H}$)
- 4.2 (1H, multiplet, C_5H)
- 3.9 (1H, doublet, C_7Ha)
- 3.8 (1H, doublet, C_7Hb)
- 3.7 (1H, doublet de doublet, C_6H)
- 2.3 (4H, multiplet, $\text{C}_1'\text{H}$ et $\text{C}_2'\text{H}$)
- 1.9 (4H, multiplet, $\text{C}_6'\text{H}$ et $\text{C}_7'\text{H}$)
- 1.6 (3H, singulet, $\text{C}_{11'}\text{H}$) ; 1.55 (3H, singulet, $\text{C}_5'\text{H}$)
- 1.5 (3H, singulet, $\text{C}_{10'}\text{H}$)
- 0.85 (9H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) ; 0.75 (9H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)
- 0.015 (6H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ; 0.01 (6H, singulet, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

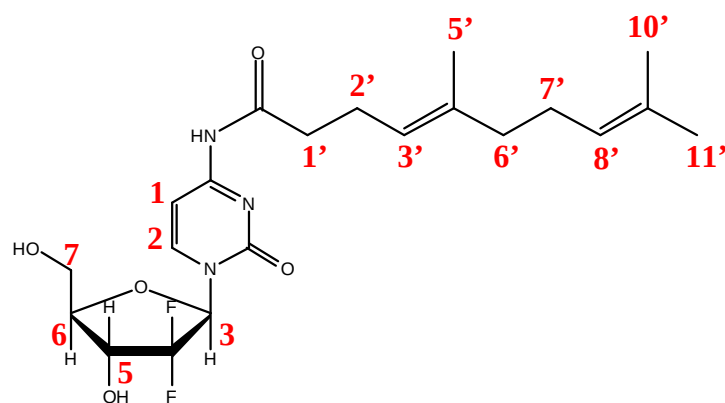


5) Figure 9 : Spectre RMN ^1H de la Gemcitabine-2-isoprènes après l'étape de déprotection, à 400 MHz dans l'acétone d_6 .



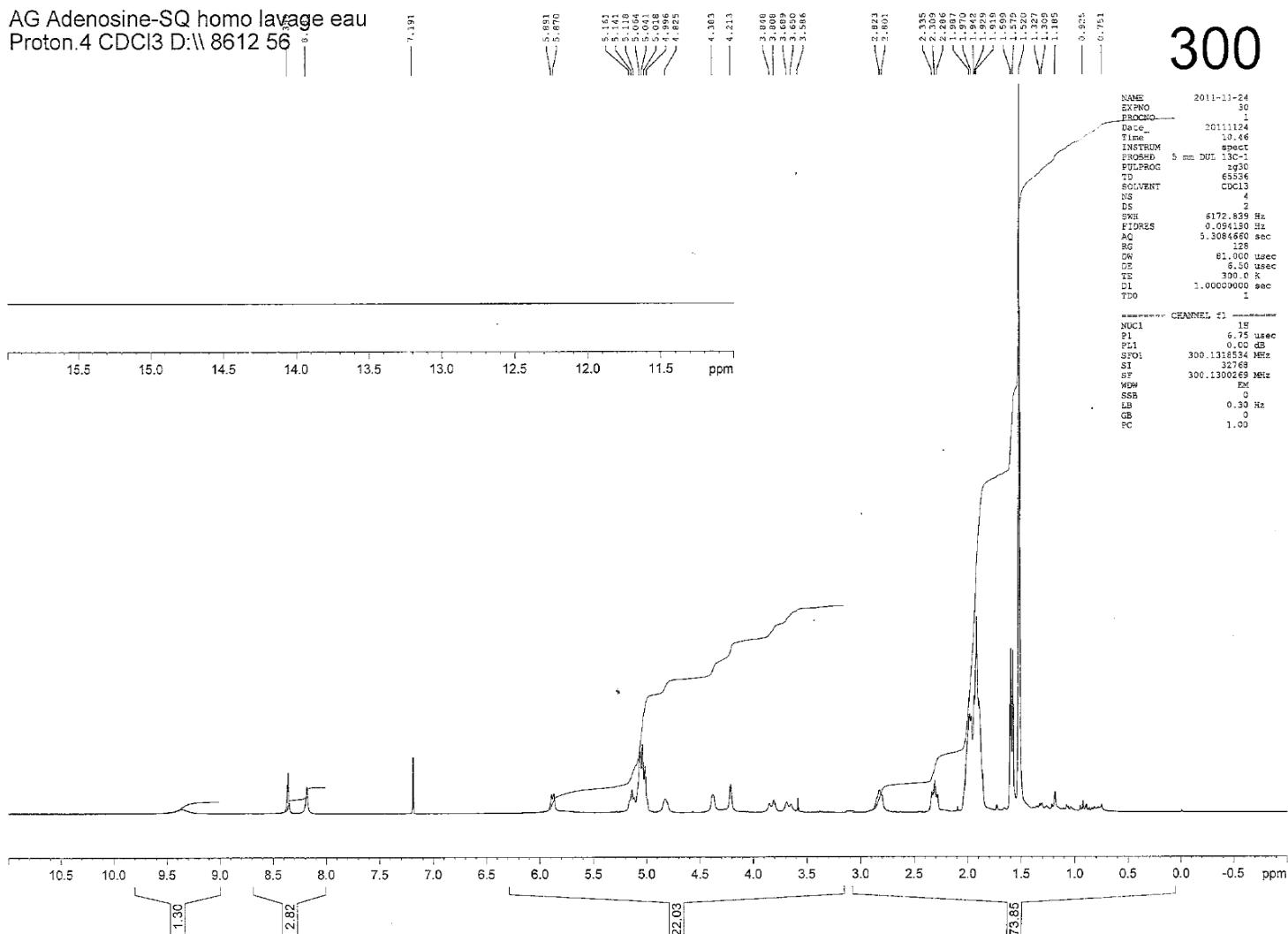
Les déplacements chimiques ont été attribués :

- 10.5-9.5 (1H, proton échangeable)
- 8.29 (1H, doublet, C_2H)
- 7.39 (1H, doublet, C_1H)
- 6.26 (1H, doublet de doublet, C_3H)
- 5.1 (2 H, multiplet, $\text{C}_3'\text{H}$ et $\text{C}_8'\text{H}$)
- 4.5 (1H, multiplet, C_5H)
- 4.1 (1H, doublet, C_7Ha)
- 3.9 (1H, doublet, C_7Hb)
- 3.5 (1H, doublet de doublet, C_6H)
- 2.5 (2H, multiplet, $\text{C}_1'\text{H}$)
- 2.3 (2H, multiplet, $\text{C}_2'\text{H}$)
- 2.0 (4H, multiplet, $\text{C}_6'\text{H}$ et $\text{C}_7'\text{H}$)
- 1.7 (3H, singulet, $\text{C}_{11}'\text{H}$) ; 1.6 (3H, singulet, $\text{C}_5'\text{H}$)
- 1.5 (3H, singulet, $\text{C}_{10}'\text{H}$)

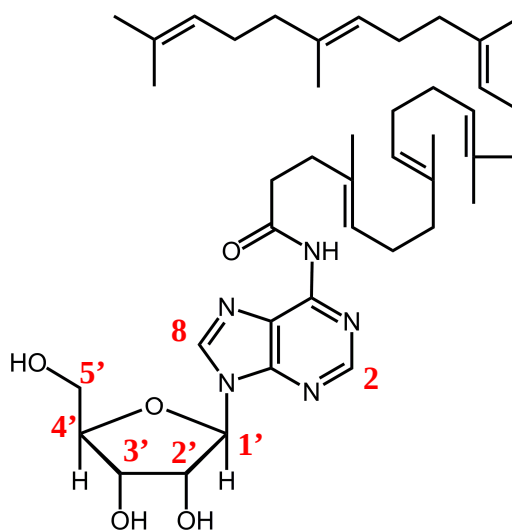


II- Spectre RMN ^1H de l'adénosine-Squalène homologué dans CDCl_3 , à 300 MHz

AG Adenosine-SQ homo lavage eau
Proton.4 CDCl_3 D:\ 8612 56



- 9.34 (broad s, 1 H, NHCO)
- 8.39 (s, 1 H, C_8H)
- 8.19 (s, 1 H, C_2H)
- 5.8 (d, 1 H, $J = 6.5$ Hz, $\text{C}_1'\text{H}$)
- 5.15 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$)
- 5.10-5.0 (m, 5 H, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)$)
- 4.90 (m, 1 H, $\text{C}_2'\text{H}$)
- 4.42 (d, 1 H, $J = 3.9$ Hz, $\text{C}_3'\text{H}$)
- 4.30 (m, 1 H, $\text{C}_4'\text{H}$)
- 3.92 (d, 1 H, $J = 11.9$ Hz, $\text{C}_5'\text{H}$)
- 3.75 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H, $\text{C}_5'\text{H}$)
- 2.80 (m, 2 H, COCH_2CH_2)
- 2.35 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, COCH_2CH_2)
- 2.12-1.92 (m, 20 H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$)
- 1.67 (s, 3 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$)
- 1.65 (s, 3 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$)
- 1.59 (s, 15 H, $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)$)



Résumé de la thèse :

La squalénisation est la base d'une nouvelle et très prometteuse nanotechnologie. Le concept repose sur l'observation que la conjugaison d'un analogue nucléosidique ayant une activité thérapeutique à une molécule de squalène conduit à la formation spontanée dans l'eau de nanoparticules, de diamètre compris entre 100 et 300 nm, montrant une activité très supérieure à celle de l'analogue nucléosidique seul.

Au cours de cette thèse nous avons cherché à comprendre les relations entre la nature de la paire drogue-terpénoïde, la structure des nanoparticules et leur activité biologique. Pour cela, d'une part différents nucléosides et analogues nucléosidiques ont été couplés de façon covalente au squalène et d'autre part la gemcitabine a été couplée à des dérivés terpénoides de longueurs croissantes. L'organisation supramoléculaire de ces composés a été déterminée par diffusion des rayons X aux petits angles et cryo-microscopie électronique. L'influence des conditions de nanopréciipitation sur la structure des nanoparticules a été étudiée. L'impact de l'organisation supramoléculaire des nanoparticules sur leur internalisation cellulaire et leur cytotoxicité a été mis en évidence pour certaines lignées.

Mots clés :

nanoparticules, squalène, terpènes, nucléosides, analogues nucléosidiques, nanopréciipitation, structure supramoléculaire, SAXS, internalisation cellulaire.

Laboratoire de rattachement :

UMR CNRS 8612 – Institut Galien Paris-Sud

5, Rue Jean Baptiste Clément

92290 Châtenay-Malabry, France