

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Chimie Physique et Chimie Analytique

Présentée par

Mathieu Goutayer

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo***

Soutenue le 11 décembre 2008

devant le jury composé de :

M Jérôme Bibette	Directeur de thèse
M Jean-Pierre Benoît	Rapporteur
M Bertrand Tavitian	Rapporteur
Mme Valérie Cabuil	Examineur
M Rémi Meyrueix	Examineur
Mme Isabelle Texier	Examineur

# **Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo***

## **Résumé :**

La nanomédecine représente le champ d'application des nanotechnologies, et plus particulièrement des nanoparticules, à la médecine. Ce nouveau domaine est très prometteur notamment en ce qui concerne la détection et le traitement de pathologies d'origine infectieuse, génétique ou cancéreuse. Nous avons développé de nouvelles nanoparticules biocompatibles et évalué leur potentiel en tant que nanocargos d'agents thérapeutiques ou diagnostiques grâce à l'imagerie de fluorescence *in vivo*. Ces particules sont des nano-émulsions de type huile dans eau, de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, stabilisées par une couche de surfactants composée de phospholipides et d'agents de furtivité. L'encapsulation dans le cœur des nanoparticules de fluorophores organiques absorbant et émettant dans les longueurs d'onde compatibles avec les dispositifs d'imagerie de fluorescence permet de suivre leur biodistribution après injection dans des souris Nude. Ces nano-émulsions furtives et fluorescentes peuvent également être fonctionnalisées sur leur surface par des ligands de ciblage actifs tels que le peptide cRGD. De telles nano-émulsions fonctionnalisées montrent *in vitro* une adhésion spécifique avec les cellules exprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , un biomarqueur de l'angiogénèse. L'accumulation, passive et/ou active médiée par les cRGD, des particules au sein de différents modèles de tumeurs sous-cutanées implantés chez la souris Nude, est observée par imagerie de fluorescence non invasive.

## **Mots clés :**

Nanoparticules ; Nano-émulsion ; Fluorescence ; Biodistribution ; Ciblage actif

Cette thèse a été préparée au sein des laboratoires suivant :

Laboratoire des colloïdes et des matériaux divisés LCMD-ESPCI 10 rue Vauquelin 75005 Paris	Laboratoire de Fonctionnalisation et Chimie des Microsystèmes DTBS-LFCM 17, rue des Martyrs 38054 Grenoble cedex
---	---

# **Nanoemulsions for therapeutic or diagnostic agents vectorisation; biodistribution study by *in vivo* fluorescence imaging.**

## **Abstract:**

Nanomedicine represents the application field of nanotechnology, and more especially nanoparticles, to medicine. This new domain is promising in particular for the detection and treatment of infectious, genetic and cancer pathologies. We have developed new biocompatible nanoparticles, and evaluated their potential as nanocarriers for therapeutic or diagnostic agents thanks to *in vivo* fluorescence imaging. These particles are oil in water nanoemulsions, which diameter is less than an hundred nanometers, stabilized by a mixture of phospholipids and stealth agents. The encapsulation of organic dyes with absorbing and emitting wavelengths suitable for *in vivo* fluorescence imaging, allows the follow up of the nanoemulsions after their injection in mice models. Fluorescent stealth nanoemulsions can also be functionalized in order to covalently link onto their surface targeting ligands, such as the cRGD peptide. Indeed, cRGD functionalized nanoemulsions exhibit *in vitro* specific adhesion with cells expressing  $\alpha_v\beta_3$  integrine, an angiogenic biomarker. The particle uptake, either passive and/or cRGD-mediated, in different tumor models bear by Nude mice, is observed using non invasive fluorescence imaging.

## **Key Words:**

Nanoparticles; Nanoemulsion; Fluorescence; Biodistribution; Active targeting

## **Table des matières :**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE I : NANOPARTICULES POUR LE IN VIVO .....</b>	<b>13</b>
I.1. INTERET DES NANOPARTICULES POUR LA MEDECINE .....	14
I.1.1. Définition des nanoparticules .....	14
I.1.2. Avantages des nanoparticules .....	15
I.1.3. Applications des nanoparticules.....	16
I.2. LES DIFFERENTES NANOPARTICULES .....	18
I.2.1. Différents types de nanoparticules .....	18
I.2.2. Les trois générations de nanoparticules .....	22
I.2.3. Nanoparticules, principe général.....	26
I.3. EXEMPLES DE NANOPARTICULES POUR LE VIVANT UTILISEES EN CLINIQUE.....	27
I.3.1. Nanoparticules à vocation thérapeutique .....	27
I.3.2. Nanoparticules à vocation diagnostique.....	28
I.4. CONCLUSION .....	29
<b>CHAPITRE II : IMAGERIE MEDICALE .....</b>	<b>31</b>
II.1. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D’IMAGERIE .....	33
II.1.1. Imagerie moléculaire .....	34
II.1.2. Rayons X .....	35
II.1.3. Ultrasons .....	36
II.1.4. Imagerie par Résonance Magnétique.....	37
II.1.5. Imagerie nucléaire .....	38
II.1.6. Fluorescence .....	39
II.2. IMAGERIE DE FLUORESCENCE.....	39
II.2.1. Principe et grandeurs physiques .....	39
II.2.2. Application de la fluorescence pour l’imagerie in vivo .....	42
II.2.3. Dispositifs expérimentaux .....	45
II.2.4. Traceurs .....	47
II.3. CONCLUSIONS .....	50
<b>CHAPITRE III : NOUVELLES FORMULATIONS DE NANO-EMULSIONS.....</b>	<b>53</b>
III.1. DEFINITION ET PROPRIETES DES NANO-EMULSIONS .....	55
III.1.1. Les émulsions .....	55

III.1.2. Les nano-émulsions .....	57
III.2. CHOIX DE LA FORMULATION .....	61
III.2.1. Détails des constituants .....	62
III.2.2. Choix de la technique d'émulsification .....	66
III.2.3. Protocole général de fabrication .....	69
III.3. CARACTERISTIQUES DE LA FORMULATION DE REFERENCE .....	70
III.3.1. Composition .....	70
III.3.2. Propriétés physiques .....	71
III.3.3. Stabilité et évolution dans le temps .....	79
III.4. VARIATIONS AUTOUR DE LA FORMULATION DITE DE REFERENCE.....	82
III.4.1. Nature du cœur lipophile .....	82
III.4.2. Quantité totale de surfactants .....	85
III.4.3. Ratio phospholipides / surfactants pegylés.....	87
III.4.4. Longueur et structure des chaînes pegylées.....	90
III.5. CONCLUSIONS.....	93

## **CHAPITRE IV : NANO EMULSIONS FLUORESCENTES.....97**

IV.1. LOCALISATION DU FLUOROPHORE AU SEIN DES NANOPARTICULES .....	99
IV.2. CHOIX DES FLUOROPHORES .....	101
IV.2.1. Structure générale de fluorophores compatibles avec l'imagerie de fluorescence in vivo.....	101
IV.2.2. Cyanines.....	103
IV.3. INCORPORATION DES FLUOROPHORES DANS LES NANO-EMULSIONS .....	106
IV.3.1. Production de nano-émulsions fluorescentes .....	106
IV.3.2. Calcul du nombre de fluorophores par globule .....	107
IV.3.3. Impact de l'encapsulation sur les propriétés des nano-émulsions .....	109
IV.4. PROPRIETES OPTIQUES DES NANO-EMULSIONS FLUORESCENTES .....	111
IV.4.1. Spectres d'absorption et d'émission.....	111
IV.4.2. Rendement quantique de fluorescence .....	117
IV.4.3. Durée de vie de fluorescence .....	121
IV.4.4. Vitesse de photoblanchiment .....	123
IV.5. ENCAPSULATION ET STABILITE .....	125
IV.5.1. Stabilité de l'encapsulation .....	125
IV.5.2. Stabilité chimique du fluorophore .....	127
IV.6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	131
IV.6.1. Discussion .....	131
IV.6.2. Conclusion .....	136

## **CHAPITRE V : COMPORTEMENT DES NANO-EMULSIONS EN MILIEU BIOLOGIQUE ..... 139**

V.1. LE SANG, UN VEHICULE DE DISTRIBUTION ET D'ELIMINATION DES NANOPARTICULES.....	140
V.1.1. Composition du sang .....	141
V.1.2. La circulation sanguine des nanoparticules .....	142
V.1.3. L'élimination des nanoparticules du sang .....	143
V.2. COMPATIBILITE EX VIVO ENTRE LE SANG ET LES NANO-EMULSIONS .....	148
V.2.1. Stabilité de la fluorescence des nano-émulsions en milieu sanguin .....	148
V.2.2. Stabilité des globules rouges en présence de nano-émulsions.....	151
V.2.3. Conclusions .....	153
V.3. ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES SUR SOURIS SAINES ...	153
V.3.1. Evolution de la biodistribution des nanoparticules en fonction du temps .....	154
V.3.2. Evolution de la biodistribution en fonction de la formulation.....	164
V.4. CONCLUSION .....	170

## **CHAPITRE VI : NANO-EMULSIONS FONCTIONNALISEES POUR LA DETECTION DES TUMEURS ..... 173**

VI.1. LES TUMEURS, CONSIDERATIONS GENERALES .....	174
VI.1.1. Description .....	174
VI.1.2. L'angiogénèse, un phénomène clé dans le développement et la détection des tumeurs.....	175
VI.2. LE CIBLAGE DES TUMEURS .....	178
VI.2.1. Le couple ligand / récepteur.....	178
VI.2.2. Le couplage chimique des ligands sur les nanoparticules .....	181
VI.2.3. Préparation de nano-émulsions fonctionnalisées.....	183
VI.3. LES MODELES TUMORAUX ET VALIDATION IN VITRO .....	189
VI.3.1. Modèles de cellules tumorales .....	189
VI.3.2. Test in vitro de reconnaissance cellulaire des nanoparticules - cRGD.....	190
VI.4. CIBLAGE ACTIF DES TUMEURS IN VIVO .....	193
VI.4.1. Mise en évidence de l'effet EPR (« Enhanced Permeation and Retention »).....	193
VI.4.2. Expérimentation <i>in vivo</i> : première série.....	195
VI.4.3. Expérimentation <i>in vivo</i> : deuxième série .....	198
VI.4.4. Conclusions .....	203
VI.5. MODELE DE CELLULES TUMORALES HEK B3 .....	203
VI.5.1. Protocole expérimental.....	204
VI.5.2. Résultats .....	204

VI.5.3. Discussion .....	207
VI.6. CONCLUSIONS .....	208
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>211</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>219</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>229</b>
ANNEXE I : MATERIELS .....	230
ANNEXE II : DISPOSITIFS DE MESURE.....	231
Spectres d'absorption .....	231
Spectres d'émission.....	231
Diffusion quasi-élastique de la lumière .....	231
Potentiel zêta .....	231
Durée de vie de fluorescence (Fluorophore : DiD) .....	232
Durée de vie de fluorescence (Fluorophore : DiR).....	232
ANNEXE III : PARAMETRES DE SONICATION .....	233
ANNEXE IV : PREPARATION D'UNE NANO-EMULSION NON DOPEE ISSUE DE LA FORMULATION DE REFERENCE .....	234
ANNEXE V : PREPARATION D'UNE NANO-EMULSION FLUORESCENTE ISSUE DE LA FORMULATION DE REFERENCE .....	235
ANNEXE VI : SYNTHESE DU SURFACTANT REACTIF : PE-PEG-MAL .....	236
ANNEXE VII : PREPARATION D'UNE NANO-EMULSION FLUORESCENTE ISSUE DE LA FORMULATION A 2,5 % M/M DE SURFACTANT FONCTIONNALISABLE .....	237
ANNEXE VIII : PROTOCOLES CELLULAIRES .....	239
Cultures cellulaires .....	239
Analyse par cytométrie en flux.....	239
Analyse par microscopie de fluorescence .....	240



# ***Introduction générale***

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. A l'échelle mondiale, les nanotechnologies suscitent de plus en plus d'intérêt et sont en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle.

Ainsi, l'utilisation des nanotechnologies, et notamment de nanoparticules, dans le cadre plus spécifique de la médecine (ce que l'on appelle désormais nanomédecine) connaît actuellement de grands progrès et devrait permettre d'améliorer la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses par exemple). Le développement de ce type de technologie constitue donc un enjeu majeur de santé publique.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont consisté à développer et étudier de nouvelles nanoparticules biocompatibles de taille nanométrique destinées à être administrées par injection intraveineuse, et ayant pour vocation de véhiculer des agents thérapeutiques et/ou diagnostiques.

Pour cela, les nanoparticules développées doivent être biocompatibles, biodégradables et autant que possible bioassimilables. Elles doivent également avoir la propriété d'être stables à température ambiante, et avoir un comportement *in vivo* leur permettant d'échapper aux défenses immunitaires de l'organisme et rendant possible le ciblage d'une population cellulaire donnée. En vue de son application à l'échelle industrielle, le procédé de fabrication de ces nanoparticules doit en outre être simple et avoir un faible coût de revient.

L'étude du comportement biologique des nanoparticules constitue donc un point clé de leur développement. Afin d'évaluer rapidement et à moindre coût leur potentiel biologique en tant que nanotransporteurs, nous avons eu recours à l'imagerie de fluorescence *in vivo*.

Dans une première partie, nous présenterons brièvement les différentes nanoparticules existantes ainsi que leur intérêt pour la nanomédecine (Chapitre I). Nous nous intéresserons ensuite aux différentes modalités d'imagerie biomédicale, et plus particulièrement à l'imagerie de fluorescence *in vivo* qui sera utilisée par la suite pour suivre la biodistribution après injection des nanoparticules développées (Chapitre II).

La seconde partie sera ensuite consacrée à la description, la préparation et l'étude des nouvelles nanoparticules biocompatibles développées. Ces particules sont des globules de nano-émulsions de type huile dans eau, de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, stabilisés par une couche de surfactants composée de phospholipides et d'agents de furtivité

(Chapitre III). De plus, l'incorporation d'un fluorophore organique au sein de ces particules permet de leur conférer les propriétés indispensables à leur détection et à leur suivi par imagerie de fluorescence *in vivo*. Ces nanoparticules fluorescentes, dont les propriétés optiques seront étudiées, constituent ainsi une nouvelle catégorie de traceurs nanoparticulaires biocompatibles pour l'imagerie de fluorescence, en particulier pour les études précliniques (Chapitre IV).

La troisième et dernière partie présentera les premiers résultats biologiques obtenus. Dans un premier temps, le comportement des nanoparticules fluorescentes non fonctionnalisées sera étudié, en se focalisant notamment sur leur compatibilité physique et biologique avec le sang. Une étude de leur biodistribution dans la souris saine après injection intraveineuse sera également présentée (Chapitre V). Ensuite, la fonctionnalisation de ces nanoparticules par des ligands spécifiques de biomarqueurs tumoraux sera détaillée, puis une étude *in vitro* de reconnaissance spécifique de ces particules avec des cellules exprimant ces marqueurs sera exposée. Enfin, la biodistribution et l'accumulation tumorale des nanoparticules fonctionnalisées après leur injection dans l'organisme de souris porteuses de tumeurs seront étudiées par imagerie de fluorescence *in vivo*.



**Chapitre I :**  
***Nanoparticules***  
***pour le in vivo***

Les nanotechnologies pour le vivant et plus particulièrement l'utilisation de nanoparticules se situent à l'interface de trois grandes disciplines : la biologie, la physique, et la chimie. Ce nouveau domaine est en pleine effervescence. Les nanoparticules véhiculant un agent de contraste ou délivrant sélectivement un principe actif dans les cellules cibles incarnent la version moderne des « magic bullets » imaginées au début du XX<sup>ème</sup> siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich.

Après avoir donné une définition des nanoparticules, nous présenterons leurs avantages ainsi que les applications envisagées pour la médecine. Ce chapitre s'intéressera ensuite aux principaux types et aux différentes générations de nanoparticules. Enfin, il présentera des exemples de nanoparticules approuvées pour un usage clinique thérapeutique ou diagnostique.

## ***1.1. Intérêt des nanoparticules pour la médecine***

### **1.1.1. Définition des nanoparticules**

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm. Ces particules, bien que de taille nanométrique, étant désignées comme submicrométriques.

A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure I-1).

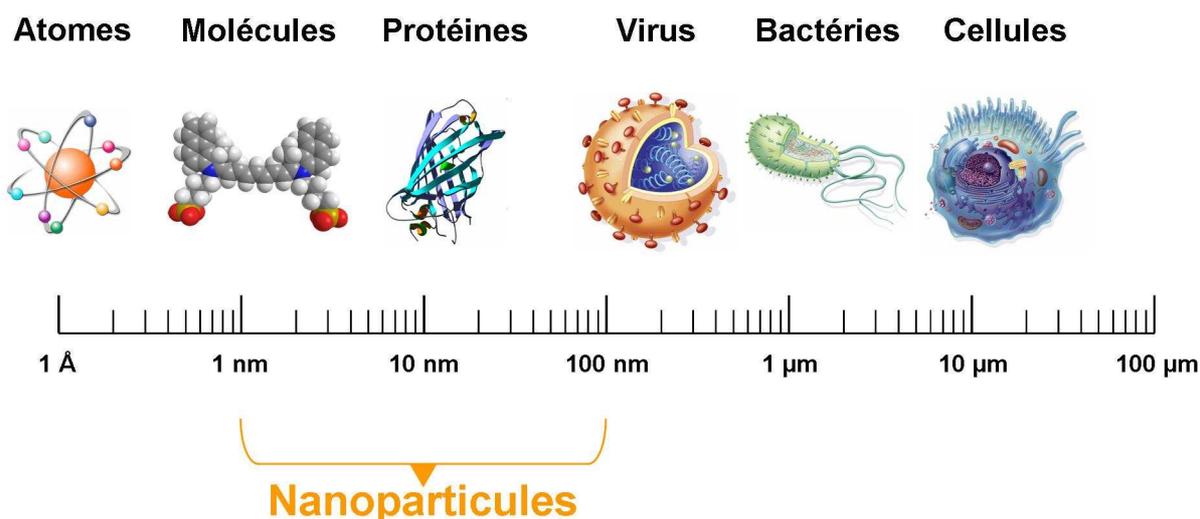


Figure I-1: Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques.

### I.1.2. Avantages des nanoparticules

La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes : elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. Ces particules ont effectivement l'avantage de former des solutions homogènes qui ne sédimentent ou ne crèment pas (voir Chapitre III). Mais ce sont surtout leurs capacités à esquiver les défenses immunitaires et leur capacité à cibler une population de cellules particulières qui en font des vecteurs prometteurs (I.2.2).

L'utilisation des nanoparticules pour la détection et le traitement de pathologies ouvre un nouveau domaine de recherche. L'un des terrains d'application le plus prometteurs, et aussi le plus avancé actuellement, est la délivrance de médicaments (« drug delivery » en anglais), et en particulier le développement de thérapies ciblées pour l'oncologie. En effet, véhiculer les molécules anticancéreuses par des nanoparticules permet d'augmenter leur sélectivité pour les tumeurs, et ainsi de réduire les sévères effets secondaires accompagnant les chimiothérapies.

La délivrance spécifique d'agents d'intérêt vers un organe, un tissu ou une cellule constitue aujourd'hui un défi majeur pour la prévention, la localisation et le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

Actuellement, l'obtention de concentrations efficaces en principes actifs au niveau des zones ciblées ne peut se faire qu'au détriment de cellules saines, puisqu'une partie importante

des substances administrées est captée par d'autres tissus. Cette accumulation au sein de tissus non visés occasionne des effets toxiques conséquents et parfois rédhibitoires qui peuvent entraîner l'abandon du traitement en dépit de son efficacité.

De nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaires, etc.) peu favorables au passage des nombreuses barrières cellulaires, physico-chimiques et biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ces principes actifs sont donc toujours mal absorbés, souvent très rapidement dégradés, métabolisés, ou éliminés et donc incapables d'atteindre leur cible au niveau tissulaire ou cellulaire. Il faut savoir que 95 % des nouveaux principes actifs développés ont des propriétés pharmacocinétiques médiocres [1]. Pour toutes ces raisons, le développement de vecteurs de médicaments permettant la délivrance spécifique de la molécule active au niveau du site d'action a pris un essor considérable au cours des dernières années.

### **I.1.3. Applications des nanoparticules**

La délivrance de médicaments concerne principalement des molécules chimiques (principes actifs) mais elle englobe également les agents thérapeutiques biologiques comme les protéines, les peptides et également l'ADN ou l'ARN pour les thérapies géniques. Outre la délivrance de principes actifs chimiques ou biologiques au sein des tissus ciblés, les nanoparticules peuvent également être utilisées pour d'autres types de thérapies, telles que la radiothérapie, la thermothérapie ou encore la thérapie photodynamique.

- La radiothérapie consiste à détruire des cellules placées à proximité d'une source émettant des rayonnements radioactifs. L'intérêt des nanoparticules est alors de véhiculer la source radioactive directement au niveau de la zone à traiter [2].
- La thermothérapie ou hyperthermie a la même finalité, mais utilise une élévation de la température pour y parvenir. Il s'agit alors de provoquer par un champ extérieur (magnétique ou laser par exemple) un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C) induisant la destruction des cellules [3, 4].
- La thérapie photodynamique [5] se base sur des molécules (photosensibilisateurs) qui, suite à l'absorption d'un rayonnement lumineux,

produisent de l'oxygène singulet ou des radicaux libres. Ces substances ont d'importantes propriétés oxydantes qui conduisent à la mort des cellules environnantes. Une fois de plus, les nanoparticules jouent le rôle de transporteur permettant de véhiculer le photosensibilisateur dans la zone d'intérêt [6, 7].

Dans les trois cas, les nanoparticules sont utilisées pour véhiculer les agents thérapeutiques (source radioactive, matériaux provoquant l'hyperthermie, photosensibilisateur) dans la zone ciblée. En effet, il est toujours préférable que ces agents thérapeutiques s'accumulent de façon préférentielle au sein des tissus à traiter afin de minimiser leur impact sur les cellules saines.

Le diagnostic, et plus particulièrement l'imagerie médicale, constitue également un champ d'application auquel la nanomédecine peut apporter de réelles améliorations, les nanoparticules jouant le rôle de traceurs ou d'agents de contraste. Le chapitre suivant décrira les différentes techniques d'imagerie médicale et, pour chacune d'entre elles, les avantages que peut apporter l'utilisation de nanoparticules.

Une grande partie des nanoparticules inorganiques possèdent intrinsèquement des propriétés thérapeutiques ou diagnostiques (I.2.1.5). C'est notamment le cas des boîtes quantiques fluorescentes (« Quantum dots » en anglais), des nanoparticules magnétiques utilisées comme agent de contraste en IRM (Imagerie de Résonance Magnétique), ou encore des particules pour la thérapie. En revanche, les particules organiques sont dépourvues de telles propriétés. Leur rôle consiste à protéger les agents thérapeutiques ou diagnostiques qui leur sont adjoints, à les véhiculer vers une zone de l'organisme ciblée, et éventuellement à les relarguer.

Ainsi, outre la protection des agents d'intérêt (thérapeutiques ou diagnostiques) et leur libération éventuelle, la principale mission des nanoparticules est de véhiculer les agents d'intérêt vers une zone ciblée. Cela sous-entend donc qu'elles disposent de propriétés de vectorisation particulière.

## **I.2. Les différentes nanoparticules**

Comme présenté au début de ce chapitre, la définition des nanoparticules est uniquement basée sur la taille de ces objets : au moins une des dimensions de l'objet doit être inférieure à 100 nm. Cette définition n'est donc pas limitative vis-à-vis de la composition de ces particules. Il existe ainsi une grande variété de nanoparticules allant des particules d'or aux liposomes, en passant par les nanoparticules polymériques. Si le choix du cœur des particules est primordial en ce qui concerne la protection et l'éventuel relargage des agents d'intérêt, le contrôle de la surface l'est tout autant. Ce sont en effet ses propriétés de surface qui permettront à la particule de véhiculer les agents thérapeutiques ou diagnostiques vers la zone ciblée.

### **I.2.1. Différents types de nanoparticules**

La composition du cœur des nanoparticules est très variée : il peut s'agir d'assemblages organiques ou inorganiques [8]. Nous allons décrire ici les nanoparticules les plus courantes.

#### **I.2.1.1. Liposomes**

Les liposomes [9] sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs doubles couches concentriques de phospholipides et de molécules de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux. La taille des liposomes varie entre 30 nm et plusieurs micromètres.

Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie et la médecine en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie [10]. Leur caractère non toxique et biocompatible font de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications *in vivo*. Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche de phospholipides), une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang [11].

Les niosomes sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques) [12]. C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux [13-16].

### I.2.1.2. Micelles

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles qui forment des structures de type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. Les micelles se forment lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommé concentration micellaire critique. Dans ce cas, les molécules amphiphiles s'auto-assemblent pour regrouper leurs parties hydrophobes et exposer en surface uniquement leurs domaines hydrophiles. Les micelles sont donc des systèmes supramoléculaires qui sont en équilibre avec les molécules amphiphiles en solution [1].

Différents types de micelles ont ainsi été obtenues en fonction des surfactants utilisés. On peut ainsi citer les micelles à base de phospholipides ou de surfactants pegylés, mais ce sont celles utilisant des copolymères qui concentrent la plus grande partie de la recherche actuelle [17-20].

### I.2.1.3. Nanoparticules polymériques

Les premières nanoparticules polymériques développées par Couvreur *et al.* dans les années 1980 sont à base de polyalkylcyanoacrylates [21]. Différents polymères ont ensuite été utilisés avec succès pour former des nanoparticules, les plus couramment utilisés actuellement étant le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique) et leur copolymère le poly(lactide-co-glycolide), respectivement abrégés en anglais PLA, PGA et PLGA. Ces polymères ont l'avantage d'avoir une grande biocompatibilité et d'être biodégradables par l'organisme. Ils sont ainsi utilisés depuis de nombreuses années pour fabriquer des dispositifs médicaux et des implants sous-cutanés. Les nanoparticules polymériques offrent de plus une meilleure stabilité que les liposomes, que se soit *in vivo* ou durant le stockage.

Cependant, même si la biocompatibilité des polymères est bonne, ils ne sont pas dénués de toute cytotoxicité une fois structurés sous forme de nanoparticules. De plus, la

présence de solvants organiques toxiques résiduels au sein des nanoparticules est également problématique. Enfin, la production de telles nanoparticules est difficilement industrialisable et aboutit généralement à des milieux peu concentrés en particules (~2 %).

Des polymères à base de polypeptides, polynucléotides, ou de polysaccharides sont également employés pour l'obtention de nanoparticules [8].

Parmi les nanoparticules polymériques, on peut également citer l'existence des dendrimères et des nanogels.

Les dendrimères sont des complexes polymériques de taille comprise entre 1 et 10 nm qui, à partir d'un monomère possédant au moins trois sites réactifs et formant le cœur de la particule, se construisent par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères [22]. Ces constructions polymériques fortement branchées ont une structure bien contrôlée. Malheureusement la synthèse des dendrimères est délicate.

Quant aux nanogels, ce sont des structures moins courantes constituées de polymères hydrophiles. Contrairement aux nanoparticules polymériques précédemment décrites, leurs chaînes ne sont pas fortement imbriquées les unes dans les autres, ce qui leur confère une flexibilité plus importante. La particule finale, gonflée d'eau, offre ainsi une grande surface spécifique et une importante capacité d'encapsulation [23, 24].

#### **I.2.1.4. Nanoparticules lipidiques**

Pour pallier les inconvénients des nanoparticules de polymères (importants résidus de solvants organiques restant après la synthèse, possible cytotoxicité, production à grande échelle de façon reproductible difficile, mauvaise conservation dans le temps) et des liposomes (faible stabilité, processus de fabrication complexe, faible taux d'encapsulation de principes actifs lipophiles cristallisés), de nouvelles nanoparticules structurées autour d'un cœur lipidique ont été décrites.

Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur lipidique, généralement à base de triglycérides biodégradables, bioassimilables et non toxiques. Parmi les particules entrant dans cette catégorie, les nanoparticules lipidiques solides ou SLN (pour « Solid Lipid Nanoparticles ») sont les plus étudiées [25-28]. Le cœur de ces particules développées au cours des années 1990 est constitué d'une matrice de lipides qui est solide à température

ambiante mais également à la température du corps humain. Cette matrice plus ou moins cristallisée est stabilisée par une couche de surfactants. Les lipides utilisés sont soit des triglycérides hautement purifiés, soit des mélanges de glycérides ou des cires. Ces particules ont une stabilité et une capacité à encapsuler les molécules lipophiles supérieure à celle des liposomes. Elles peuvent de plus être synthétisées en l'absence de solvant organique.

De telles structures présentent cependant les inconvénients suivants : l'augmentation de la taille des particules au cours du temps ; une tendance à gélifier de manière imprévisible ; des transitions polymorphiques inattendues ; et une faible capacité d'encapsulation due à la structure cristalline de la matrice lipidique.

Parmi les nanoparticules lipidiques on trouve également les nanocapsules lipidiques ou LNC (pour « Lipid NanoCapsules »), qui sont constituées d'un cœur lipidique liquide entouré par une coque solide [29, 30]. Les lipoprotéines d'origine naturelle [31] ou synthétique [32] font aussi partie des nanoparticules lipidiques. Enfin, l'ensemble des nanoparticules lipidiques est quelque fois regroupé sous l'appellation de nano-émulsions [33], bien que ce terme soit plus généralement utilisé pour décrire des dispersions d'huile dans l'eau, pour lesquelles les globules de phase dispersée non cristallisée sont stabilisés par une couche de surfactants [34] (voir Chapitre III). Ces systèmes basés sur des cœurs lipidiques non cristallisés ne sont pas concernés par les problèmes de polymorphisme.

### I.2.1.5. Nanoparticules inorganiques

Outre les nanoparticules organiques, des nanoparticules inorganiques ont également été développées. Les plus courantes sont les nanoparticules métalliques d'or [35, 36] ou d'argent, les nanoparticules magnétiques [37], les nanoparticules en silice [38] et les nanocristaux semi-conducteurs [39-42].

La majorité des particules magnétiques se base sur l'utilisation d'oxydes de fer superparamagnétiques. Ces particules sont constituées de petites particules de maghémite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ou de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), de quelques nanomètres de diamètre, qui peuvent être encapsulées dans une matrice de silice, de polymère ou de polysaccharide (dextran). Ces particules magnétiques sont désignées par le terme SPIO (« SuperParamagnetic Iron Oxide ») pour celles dont la taille est comprise entre 50 et 500 nm, et USPIO (« Ultra small SuperParamagnetic Iron Oxide ») si leur diamètre est inférieur à 50 nm. Il existe également

des nanoparticules d'oxydes de fer monocristallins de moins de 3 nm de diamètre (MION ou « Monocristalline Iron Oxyde Nanoparticles ») encapsulés dans une coque de dextran pour aboutir à une taille d'environ 10 nm.

Parmi les nanoparticules inorganiques largement étudiées, on peut également citer le cas des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents, plus connus sous leur dénomination anglaise « Quantum dots » (boîtes quantiques en français). Ces objets mesurant entre 2 et 10 nm de diamètre sont composés d'un cœur cristallin semi-conducteur. Les couples d'éléments les plus couramment utilisés sont les suivants : cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore. Ce cœur est généralement recouvert d'une coque de sulfure de zinc afin de passiver la surface tout en stabilisant les propriétés optiques de ces nanoparticules.

## **I.2.2. Les trois générations de nanoparticules**

En vue d'améliorer le comportement biologique des nanoparticules, des modifications de leurs propriétés de surface ont été réalisées, conduisant ainsi à trois générations de nanoparticules.

### **I.2.2.1. Première génération**

La première génération de nanoparticules était constituée de colloïdes stables en milieu aqueux. Outre leurs propriétés thérapeutiques ou diagnostiques intrinsèques, leur intérêt résidait principalement dans leur capacité à éviter l'élimination et l'excrétion par le système rénal.

En effet, le principal organe d'élimination de l'organisme est le rein, dont le fonctionnement repose sur un principe de filtration à travers des pores de quelques nanomètres seulement. Ainsi, l'encapsulation d'agents d'intérêt de faible poids moléculaire au sein de vecteurs colloïdaux d'une dizaine de nanomètres permet d'éviter leur élimination rénale et de prolonger leur effet. La taille des nanoparticules doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins. Cependant, si la taille des nanoparticules leur permet d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, ce seul paramètre ne permet pas une longue circulation dans

le compartiment sanguin. Les nanoparticules sont en effet considérées comme des corps étrangers par les défenses immunitaires de l'organisme, et plus précisément par le système réticuloendothélial. A ce titre, elles sont souvent rapidement prises en charge par les macrophages. Afin de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, il convient donc d'éviter la phagocytose en leurrant les défenses immunitaires ; on parle alors de furtivité.

### I.2.2.2. Seconde génération : les nanoparticules furtives

Comme le souligne Torchilin [9], l'objectif principal des nanoparticules ou nano-transporteurs une fois administrés dans le compartiment sanguin est d'augmenter la durée de vie de l'agent à véhiculer dans la circulation sanguine.

En effet, les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent grandement l'activité thérapeutique ou diagnostique des médicaments ou des agents de contraste injectés tels quels (voir Chapitre V). Non seulement l'élimination de la substance d'intérêt de la circulation sanguine diminue la dose qui va finalement atteindre les tissus ciblés, mais l'accumulation de cette même substance dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate ...) peut également entraîner des effets secondaires toxiques au niveau de ces tissus. Dans le cas de l'utilisation d'agent de contraste, ces accumulations peuvent de plus masquer la zone d'intérêt, et donc perturber et fausser la détection.

C'est pourquoi de nouvelles stratégies ont été développées afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans le compartiment sanguin. Ces techniques se basent sur la modification chimique de la surface des nano-transporteurs (liposomes, nanoparticules de polymère, émulsions ...).

Le principal mécanisme d'élimination de l'organisme est le système réticuloendothélial (voir Chapitre V). Les particules « étrangères » sont rapidement marquées au cours de leur circulation dans le sang par des protéines désignées par le terme d'opsonines. Les objets opsonisés sont ensuite phagocytés par les cellules de Kupffer (macrophages du foie), les macrophages de la rate ou des poumons, ou encore par les macrophages circulants.

Afin de limiter ce processus, les particules sont recouvertes d'agent de furtivité, ce qui leur permet d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en esquivant la fixation des opsonines [43-45]. La grande majorité des agents de furtivité utilisés pour créer une couche protectrice autour des transporteurs, sont des polymères. Le PEG (polyéthylène

glycol), ou POE (polyoxyéthylène), est le plus couramment utilisé car il a l'avantage d'être biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique, et a en outre une faible immunogénicité et antigénicité. Il est de plus autorisé à l'injection chez l'homme par la FDA (« Food and Drug Administration » : organisme autorisant la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique).



Figure I-2 : Structure du polyoxyéthylène (POE ou PEG) utilisé pour augmenter la furtivité des particules.

De nombreux travaux ont été menés pour optimiser le pourcentage de PEG à la surface des particules, ainsi que la taille et la structure des chaînes de polymère [43]. Il ressort globalement de ces études qu'à taille égale, une chaîne ramifiée est plus efficace qu'une chaîne linéaire, mais également qu'en dessous d'une masse molaire de 2000 g/mol, l'amélioration de la durée de vie en circulation n'est que peu marquée. Ces tendances générales sont cependant à nuancer car les résultats obtenus dépendent fortement de la nanoparticule sur laquelle sont fixées les chaînes polyoxyéthylène [43].

L'utilisation de polymères saccharidiques de type dextran pour augmenter la furtivité des particules est également possible, notamment dans le cas des nanoparticules magnétiques utilisées comme agent de contraste pour l'IRM.

L'utilisation d'agents de furtivité a permis l'apparition de ce que l'on nomme la seconde génération de nanoparticules. Ces objets peuvent avoir un temps de séjour dans la circulation sanguine suffisamment important pour relarguer lentement un agent thérapeutique dans le sang, ou pour qu'il se produise une accumulation passive au sein de tissus pour lesquels l'endothélium vasculaire est discontinu (voir Chapitre VI).

### I.2.2.3. Troisième génération : les nanoparticules ciblant

Les colloïdes furtifs restent dans la circulation sanguine plus longtemps que les autres nanoparticules. Ils finissent cependant par être extravasés hors du compartiment sanguin, notamment dans les zones où la vascularisation présente d'importantes fenestrations comme le foie ou les zones d'angiogénèse (voir Chapitre VI). Ainsi, afin de favoriser

l'accumulation des nanoparticules dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. Les ligands peuvent être des anticorps [41, 46], des peptides [42], des saccharides, des oligonucléotides [47] ou d'autres molécules comme le folate [31, 40, 48].

L'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages [49]. C'est pourquoi il est important d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet. La formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et donc de rendre caduque le ciblage actif. Par conséquent, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la nanoparticule par un bras espaceur (le plus souvent une chaîne polyoxyéthylène) de manière à ce qu'ils évoluent à la surface de la couche de furtivité. L'utilisation des bras espaceurs est également avantageuse dans la mesure où elle offre à l'agent de ciblage une plus grande liberté de mouvement favorisant ainsi sa complexation avec la cible. En effet, il a été montré que le greffage de ligands directement à la surface d'une particule entraîne une diminution importante de la vitesse de complexation, la liberté de mouvement du ligand étant fortement réduite par la particule. La flexibilité du bras espaceur permet alors de redonner suffisamment de liberté de mouvement à l'agent de ciblage afin de maximiser les probabilités de rencontre entre le ligand et le récepteur dans la bonne conformation.

Ainsi, la troisième génération de nanoparticules pour le vivant se caractérise par la présence d'une barrière stérique associée à l'ajout d'agents de ciblage liés à la surface par un bras espaceur (Figure I-3) [50].

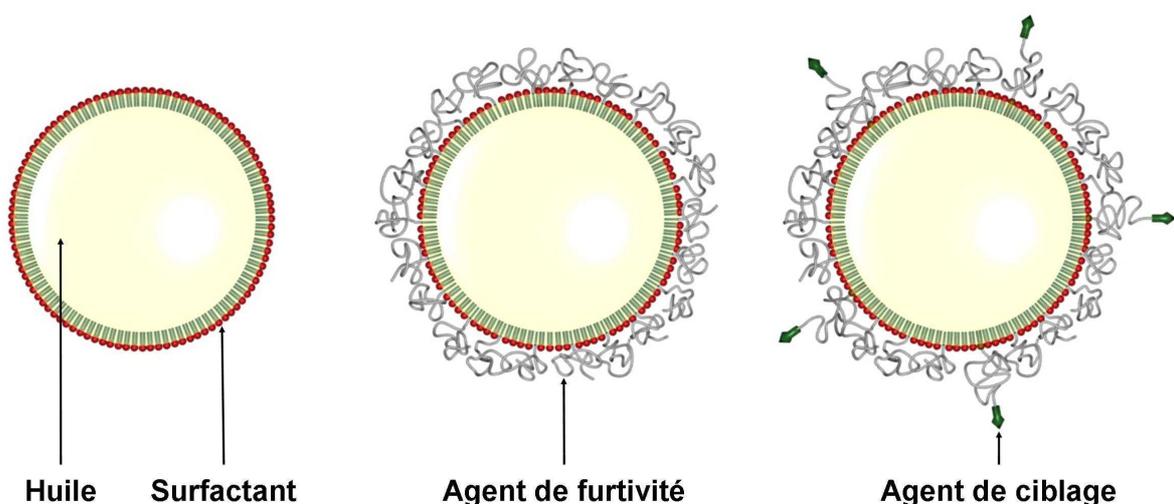


Figure I-3 : Evolution des nanoparticules (ici des nano-émulsions). Première génération : nanoparticule « nue » (à gauche). Deuxième génération : nanoparticules furtives (au centre). Troisième génération : nanoparticules ciblantes (à droite).

### I.2.3. Nanoparticules, principe général

Le concept des nanoparticules multifonctionnelles décrit par Mauro Ferrari [51] regroupe toutes les considérations évoquées précédemment. Ce principe est illustré à la Figure I-4.

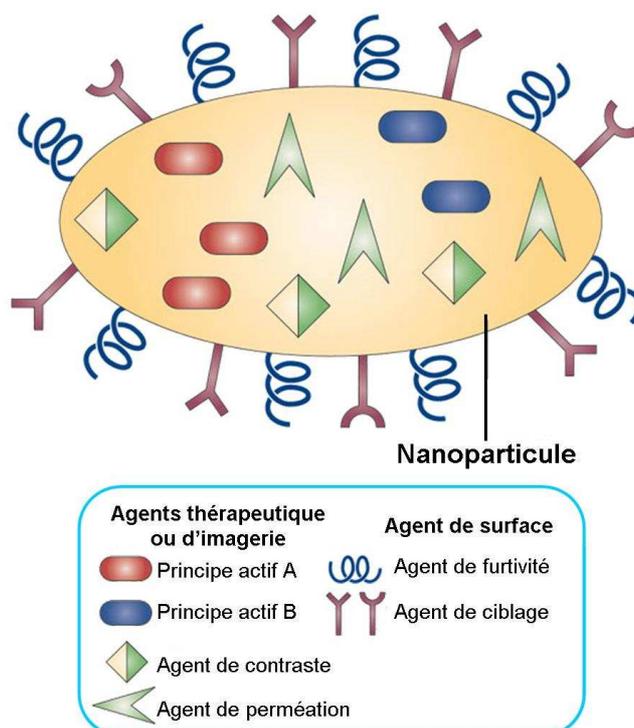


Figure I-4 : Nanoparticule multifonctionnelle. Une telle nanoparticule a la capacité de transporter un ou plusieurs principes actifs, ainsi qu'un agent de contraste permettant son suivi dans l'organisme du patient. La présence d'agents de furtivité à la surface des particules permet d'éviter leur capture par les macrophages et augmente leur temps de circulation dans l'organisme. Les agents de perméation permettent de traverser les barrières biologiques (telles que la paroi des vaisseaux sanguins) qui se dressent entre les nanoparticules et la zone ciblée. Enfin, les agents de ciblage (anticorps par exemple) greffés sur la nanoparticule autorisent un ciblage actif et favorisent donc l'accumulation dans le tissu cible et/ou l'internalisation par les cellules visées (d'après [51]).

Comme nous venons de le voir, les nanoparticules constituent une sorte de plateforme ou de noyau d'assemblage sur lequel différents agents viennent prendre place :

- Agent de furtivité
- Agent de ciblage
- Agent de perméation
- Agent de contraste
- Agent thérapeutique

On peut également ajouter à cette liste les agents d'activation. De tels agents permettent la libération de l'agent thérapeutique à la suite d'un stimulus extérieur (pH ou ondes ultrasonores par exemple), autorisant ainsi la délivrance de principes actifs de manière localisée et contrôlée au sein de l'espace extra ou intracellulaire de la zone ciblée.

Il est ainsi possible, à partir d'une même plateforme de base, d'obtenir un grand nombre de nanoparticules aux propriétés différentes en fonction des agents choisis.

### ***1.3. Exemples de nanoparticules pour le vivant utilisées en clinique***

#### **1.3.1. Nanoparticules à vocation thérapeutique**

Les premiers transporteurs pharmacologiques nano-particulaires ont été commercialisés dans la dernière décennie du XX<sup>ème</sup> siècle. L'injection à l'homme de liposomes de quelques dizaines de nanomètres de diamètre encapsulant des molécules anticancéreuses est approuvée depuis plus de 10 ans pour le traitement de certains cancers du sein ou de l'ovaire. Ainsi en 1997, le DaunoXome<sup>®</sup> (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) est arrivé dans l'arsenal de chimiothérapie. Il s'agit de liposomes encapsulant de la daunorubicine. Cette formulation a été suivie en 1999 par l'AmBisome<sup>®</sup> (Gilead Sciences / Fujisawa Healthcare) qui est également basée sur des liposomes dont la bicouche lipidique comporte des molécules d'Amphotéricine B, un antibiotique antifongique. La doxorubicine, une molécule anticancéreuse, est également commercialisée sous forme liposomale sous les noms de Myocet<sup>®</sup> (Elan Europe) et Doxil<sup>®</sup>(USA) / Caelix<sup>®</sup>(Europe) (Johnson & Johnson Alza). Dans ce dernier cas, la formulation du liposome comporte des agents de furtivité afin d'améliorer sa biodistribution ; de telles particules sont appelées liposomes furtifs.

En 2005, la première nanoparticule autre que les liposomes a été autorisée par la FDA pour injection intraveineuse. Il s'agit de l'Abraxane<sup>®</sup> (Baxter Healthcare) préconisé pour le traitement du cancer du sein. Cette particule est basée sur l'encapsulation de paclitaxel, une molécule anticancéreuse, au sein d'une matrice protéique (albumine) ayant une taille de 130 nm.

De nombreuses autres nanoparticules pour la délivrance de médicaments sont actuellement en cours d'études précliniques et cliniques. Ce sont principalement des liposomes incorporant des molécules hydrophiles, ou des nanoparticules solides à base de lipides, de protéines ou de polymères biodégradables encapsulant des molécules lipophiles.

### **I.3.2. Nanoparticules à vocation diagnostique**

En parallèle des particules utilisées pour la délivrance de médicaments, certaines nanoparticules inorganiques sont également approuvées par la FDA. Ces particules sont des SPIO et des USPIO utilisées en temps qu'agents de contraste pour l'IRM (voir Chapitre II).

Ainsi l'AMI-25, SPIO commercialisé depuis 1995 sous le nom d'Endorem<sup>®</sup> (Laboratoire Guerbet), est constitué de particules d'oxydes de fer de 5 à 6 nm de diamètre enrobées par une couche de dextran (polysaccharide augmentant la furtivité) pour aboutir à des particules d'environ 100 nm de diamètre. Cet agent de contraste, injecté par voie intraveineuse, est utilisé pour visualiser les lésions du foie associées à une altération du système réticuloendothélial (tumeurs et métastases hépatiques notamment). Le Resovist<sup>®</sup> commercialisé par Schering fait également partie des SPIO. Cet agent de contraste d'environ 60 nm de diamètre est constitué de carbodextran encapsulant des particules d'oxydes de fer d'environ 4 nm de diamètre. Ce produit est utilisé pour les mêmes indications que l'Endorem<sup>®</sup>.

Parmi les USPIO, le produit le plus avancé est l'AMI-227 (Sinerem<sup>®</sup>, Laboratoire Guerbet). Il est également constitué de particules d'oxydes de fer de 4 à 6 nm de diamètre enrobées par une couche de dextran. Cependant la taille finale de la nanoparticule est d'environ 30 nm contre 100 nm pour l'AMI-25 précédemment cité. Il est indiqué pour la détection et la caractérisation des ganglions métastatiques chez les patients atteints d'un cancer du pelvis. La demande d'autorisation de mise sur le marché est en cours aux Etats-Unis mais elle a été retirée en Europe au cours de la phase III car l'amélioration de contraste n'a pas été jugée satisfaisante.

Ces particules étant inorganiques, leur métabolisme et leur élimination ont été étudiés. Après injection intraveineuse, ces particules sont rapidement captées par les cellules du système réticuloendothélial (principalement les cellules de Kupffer, mais également les cellules de la rate, des ganglions lymphatiques, et de la moelle osseuse). Une fois

phagocytées, les nanoparticules sont ensuite lentement dégradées dans les lysosomes des cellules du système réticuloendothélial puis intégrées dans le pool de fer de l'organisme. Elles ont donc la particularité de ne pas être détectables dans les voies excrétrices biliaires ou rénales.

### ***1.4. Conclusion***

Les nanoparticules représentent un réel espoir pour la médecine. Elles peuvent en effet favoriser la délivrance d'agents thérapeutiques au sein même de la zone à traiter en limitant leur capture par d'autres tissus. Cela permet ainsi de réduire les effets secondaires de ces traitements, et redonne de l'intérêt à des principes actifs qui avaient des propriétés physiques et une biodistribution insatisfaisantes. D'un point de vue diagnostique, elles permettent d'améliorer le contraste des modalités d'imagerie actuelles et donc de faciliter la détection précoce de pathologies (voir Chapitre II).

Ainsi depuis quelques années, un grand nombre de nanoparticules à vocation diagnostique ou thérapeutique ont été développées et étudiées. Cependant, bien qu'elles aient souvent des propriétés intéressantes, bien peu d'entre elles sont parvenues à une utilisation clinique.

En effet, la production, la stabilité, la biodistribution, et l'efficacité restent des conditions critiques à réunir pour l'utilisation clinique de nouvelles nanoparticules. La toxicité des nanoparticules reste également un point crucial qu'il convient de connaître afin d'éviter que le remède soit pire que le mal.

Parmi les différents types de nanoparticules, les nano-émulsions n'ont été que peu utilisées à ce jour, essentiellement pour des questions de stabilité. Ces matériaux présentent pourtant une grande biocompatibilité et une importante versatilité qui leur permettent d'encapsuler de manière durable de nombreuses molécules ou particules aux fonctions différentes.

Avant de s'intéresser au développement de nouvelles nanoparticules biocompatibles de type nano-émulsions, le chapitre suivant sera consacré aux différentes modalités d'imagerie clinique et préclinique. L'imagerie de fluorescence sera plus particulièrement abordée car elle constitue un outil très efficace pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules.



**Chapitre II :**  
***Imagerie médicale***

Nous venons de voir, dans le chapitre précédent, que la nanomédecine nous permet d'espérer d'importantes avancées dans la détection et le traitement de certaines pathologies. Outre cette révolution attendue, les progrès récents de l'imagerie médicale ont déjà permis de grandes améliorations dans le domaine du diagnostique au cours des dernières décennies. La médecine moderne a en effet régulièrement recours à des techniques d'imagerie médicale, que ce soit pour des raisons cliniques ou scientifiques.

L'imagerie médicale désigne un ensemble de techniques non invasives permettant d'obtenir des informations sur des aspects internes de l'organisme. Ces différentes techniques d'imagerie médicale sont régulièrement utilisées afin d'établir un diagnostic précis, de préparer une opération chirurgicale ou de contrôler les effets d'un traitement ou d'un acte chirurgical. Elles sont également de plus en plus sollicitées au niveau de la recherche médicale dans le but d'approfondir nos connaissances de l'anatomie et de la physiologie des organismes vivants, et plus particulièrement de l'être humain.

On peut, en fonction des informations recherchées, classer les techniques d'imagerie en deux catégories :

- L'imagerie structurelle, qui renseigne sur l'anatomie des organes (volume, position, présence éventuelle de lésions...)
- L'imagerie fonctionnelle, qui permet d'obtenir des indications sur le fonctionnement de l'organisme (physiologie, métabolisme...)

Ce chapitre présentera le fonctionnement, les avantages et les inconvénients des différentes techniques d'imagerie médicale et biomédicale existantes. Il s'intéressera plus particulièrement à leur potentiel pour l'imagerie moléculaire. Cette dernière est rattachée à l'imagerie fonctionnelle : elle permet la visualisation de processus biologiques d'un point de vue spatial et temporel, à l'échelle moléculaire ou génétique, de manière non invasive [52]. L'imagerie moléculaire nécessite cependant l'injection de traceurs ou agents de contraste afin de mettre en évidence le processus étudié. Les agents de contraste couramment utilisés dans les différentes modalités d'imagerie seront donc détaillés. Ce chapitre se focalisera enfin plus précisément sur l'imagerie de fluorescence *in vivo*.

## II.1. Les différentes techniques d'imagerie

Les techniques d'imagerie médicale et biomédicale sont dites non invasives et non traumatisantes. En effet, en dehors de l'injection de traceurs pour certaines modalités, aucun prélèvement (biopsie) ni aucune atteinte des barrières de l'organisme n'est nécessaire à leur mise en oeuvre.

Les différentes modalités d'imagerie biomédicale sont ainsi toutes basées sur l'utilisation de rayons électromagnétiques pour obtenir les informations désirées, sans effectuer de prélèvements sur l'organisme. Ces techniques utilisent des rayonnements répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique : des rayons gamma dans le cas de l'imagerie nucléaire pour les rayonnements les plus énergétiques, aux ultrasons lors des échographies, en passant par les rayons X, les ondes radio dans le cas des IRM (en complément d'un champ magnétique constant), et enfin les rayonnements infrarouges dans le cas de l'imagerie de fluorescence *in vivo* (Figure II-1).

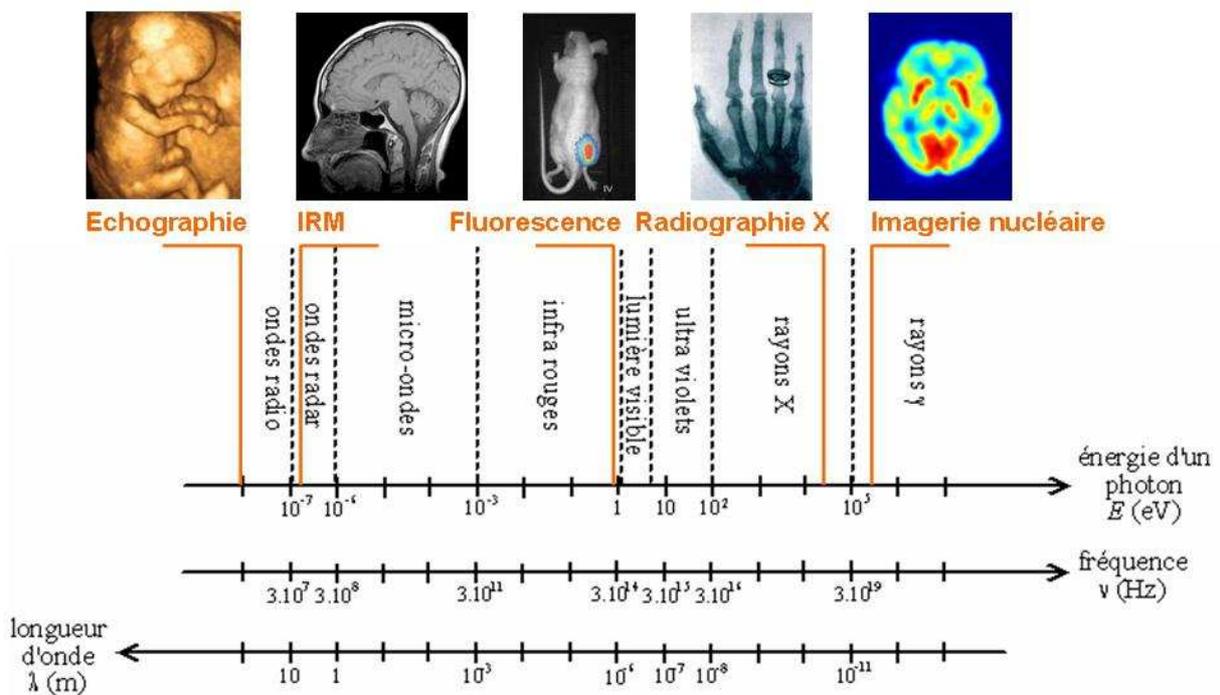


Figure II-1 : Représentation des différentes modalités d'imagerie en fonction des ondes électromagnétiques qu'elles utilisent.

Cependant, s'il existe plusieurs techniques permettant d'obtenir des images *in vivo*, elles sont souvent lourdes et onéreuses, et ne sont pas toutes adéquates pour effectuer de l'imagerie moléculaire.

Avant de présenter chacune des méthodes d'imagerie indiquées ci-dessus, nous allons rappeler l'intérêt de l'imagerie moléculaire.

### II.1.1. Imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire est un nouveau domaine de recherche biomédical qui peut être défini comme la représentation visuelle, la caractérisation et la quantification de processus biologiques à l'échelle cellulaire ou subcellulaire, et également le suivi de processus moléculaires au sein d'organismes vivants de manière non invasive [52, 53].

Les avantages liés à l'imagerie moléculaire sont d'une part une meilleure compréhension des processus biologiques, mais également le diagnostic précoce de tumeurs ou de maladies neurologiques, cardiovasculaires ou auto-immunes. Elle permet en outre d'accélérer le développement de nouvelles thérapies pour ces pathologies grâce à des tests précliniques et cliniques permettant l'optimisation des traitements.

Pour parvenir à ces fins, l'imagerie moléculaire se base sur l'utilisation d'agents de contraste ou traceurs. Chaque traceur est destiné à mettre en évidence un processus biologique donné. Ils peuvent être classés en deux catégories : les traceurs ciblant et les traceurs activables. Les premiers vont se fixer préférentiellement au niveau de cibles, alors que les seconds ne sont détectables qu'après avoir « réagi » avec la cible, ce qui permet de réduire le bruit de fond et améliorer le contraste final (Figure II-2).

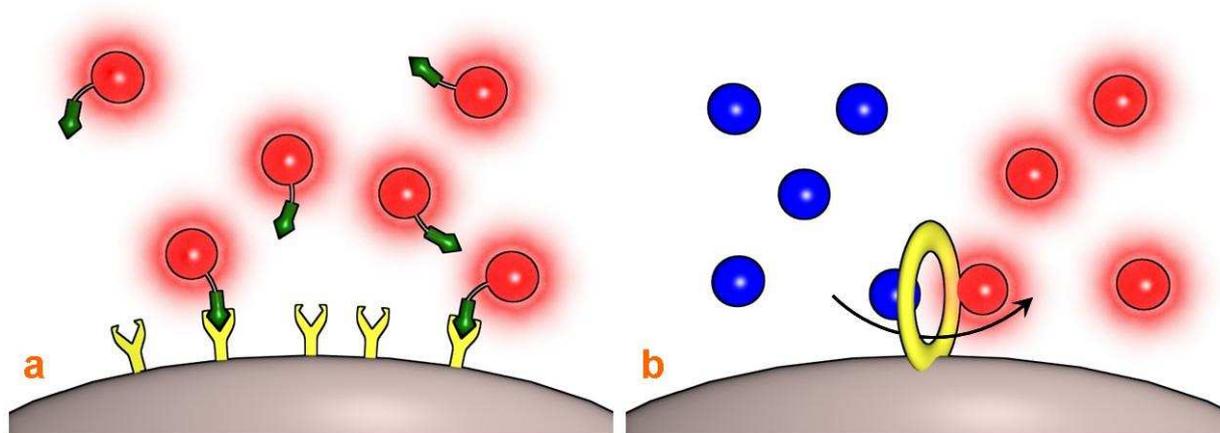


Figure II-2 : Illustration des différents principes de traceurs. a) Traceur ciblant : l'agent de contraste est lié à une molécule (biomarqueur) qui est reconnue ou qui reconnaît spécifiquement une cible

biologique donnée (par exemple un traceur lié à un anticorps qui reconnaît une protéine exprimée en surface de certaines cellules). b) Traceur activable: l'agent de contraste est inhibé et c'est l'action d'un processus biologique qui va restituer les propriétés qui permettent de le détecter (par exemple un traceur dont les propriétés physiques vont être modifiées par l'action d'une enzyme).

L'imagerie moléculaire permet par exemple de détecter de manière précoce la présence de certains marqueurs tumoraux dans un organisme vivant, alors que la tumeur est indétectable avec les modalités d'imagerie structurelles classiques sans réaliser de prélèvement.

### II.1.2. Rayons X

La radiographie par rayons X est la plus ancienne technique d'imagerie médicale. En effet, dès 1895 W.C. Röntgen, physicien allemand découvreur des rayons X, réalise la première radiographie de la main de sa femme. Cette technique s'est depuis largement développée et est couramment utilisée. En plus de la radiographie « classique », le développement de capteurs à rayons X à base de semi-conducteurs et l'avènement de l'informatique dans les années 1970 ont permis l'apparition de la tomodensitométrie, plus couramment appelée scanner. Les scanners permettent, après reconstruction, de réaliser des vues en coupe ou des vues en trois dimensions.

#### II.1.2.1. Agents de contraste

L'iode, qui a la propriété de fortement absorber les rayons X, est couramment utilisée en tant qu'agent de contraste dans le cas de l'angiographie (visualisation du système sanguin). Son injection dans le système sanguin permet aussi de mieux repérer les organes fortement vascularisés et en particulier certaines tumeurs. Les nanoparticules métalliques (en or par exemple) ont également été proposées récemment comme agents de contraste pour l'imagerie par rayons X du fait de la présence d'atomes lourds. Cependant, le pouvoir contrastant de ces traceurs (iodé ou nano-particulaire) est faible. Les quantités injectées sont par conséquent importantes, ce qui limite le développement de nouveaux agents de contraste ciblant permettant de réaliser de l'imagerie moléculaire.

### **II.1.2.2. Avantages et inconvénients**

Les rayons X sont une modalité d'imagerie structurelle rapide et efficace offrant une résolution de quelques dizaines de micromètres sans limite de profondeur. Cependant, si cette technique offre un excellent contraste entre les os et les tissus mous, le contraste entre les différents tissus mous est faible et rend par exemple difficile la localisation de tumeurs au sein de ces tissus. De plus, les rayons X sont des rayonnements ionisants et à ce titre, leur utilisation doit s'effectuer avec toutes les mesures de protection adéquates.

### **II.1.3. Ultrasons**

Depuis son utilisation en obstétrique dans les années 1970, l'échographie s'est largement développée et est devenue une technique d'imagerie très répandue. Les ultrasons sont principalement utilisés pour réaliser de l'imagerie structurelle dédiée à l'analyse des tissus « mous », mais ils peuvent également servir dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle, notamment pour la mesure des flux sanguins grâce à l'échographie Doppler.

#### **II.1.3.1. Agents de contraste**

L'utilisation de microbulles permet d'améliorer le contraste de l'imagerie ultrasonore. Ces agents de contraste sont notamment utilisés lors des échocardiographies. Ces particules sont généralement des émulsions d'huiles perfluorocarbonées stabilisées par une couche de phospholipides [54, 55]. Ces huiles possèdent la propriété de dissoudre d'importantes quantités de gaz (elles sont notamment utilisées pour produire le sang artificiel). Ces microbulles sont fortement échogènes en milieu aqueux puisque la différence de densité entre le gaz contenu dans les microbulles et les tissus environnants est grande.

La nature de ces agents de contraste, leur efficacité et les possibilités de fonctionnalisation permettent d'envisager l'utilisation des microbulles pour la délivrance de médicaments ou pour l'imagerie moléculaire.

### II.1.3.2. Avantages et inconvénients

L'utilisation des ultrasons est sans danger, c'est pourquoi cette modalité d'imagerie est particulièrement employée pour imager les fœtus. Cette technique est de plus rapide, peu coûteuse et peu encombrante. La résolution peut être très précise, mais elle diminue rapidement lors de l'observation de zones profondes, et les os ne laissent pas passer les ondes ultrasonores. Enfin, cette méthode est opérateur-dépendante et nécessite un contact entre le patient et le dispositif.

### II.1.4. Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technologie récente, particulièrement adaptée à la visualisation des tissus mous. Son développement a eu lieu dans le début des années 1980. L'apparition de l'IRM fonctionnelle dans les années 1990 a entre autres permis d'importantes avancées dans la compréhension du fonctionnement du cerveau.

#### II.1.4.1. Agents de contraste

L'imagerie par résonance magnétique, bien que traditionnellement utilisée pour visualiser les tissus (localisation et taille des tumeurs), permet de réaliser de l'imagerie moléculaire grâce à l'injection d'agents de contraste : nanoparticules superparamagnétiques ou chélates de gadolinium [56].

#### II.1.4.2. Avantages et inconvénients

L'IRM est une technique sans danger puisque, contrairement aux rayons X, elle ne se base pas sur l'utilisation de rayonnements ionisants. Elle offre un excellent contraste au niveau des tissus mous, bien meilleur que celui obtenu par tomodensitométrie, mais ne permet pas de visualiser les tissus durs (os). Cette technique est sans doute la modalité d'imagerie structurelle la plus puissante mais elle n'est toutefois pas dénuée de défauts. En effet, la durée d'acquisition est relativement longue mais c'est surtout son coût très important qui limite son utilisation.

## II.1.5. Imagerie nucléaire

La médecine nucléaire repose sur la détection de la désintégration d'atomes radioactifs entrant dans la structure de molécules dites radiopharmaceutiques préalablement injectées au patient. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle et même moléculaire car elle permet de visualiser et de localiser l'accumulation des radiopharmaceutiques.

Deux technologies basées sur des radioéléments différents sont actuellement utilisées : la tomographie à émission de positrons (TEP, ou PET en anglais pour « Positron Emission Tomography ») et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais pour « Single Photon Emission Tomography »).

### II.1.5.1. Agents de contraste

Ces techniques sont basées sur la désintégration de radiopharmaceutiques qui sont des agents de contraste. En TEMP, les radioéléments couramment employés sont le technétium 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), l'indium 111m ( $^{111}\text{In}$ ) et l'iodure 123 ( $^{123}\text{I}$ ). Pour la TEP, les éléments utilisés ont une durée de demi-vie courte (inférieure à 2 heures) : il s'agit de l'oxygène 15 ( $^{15}\text{O}$ ), l'azote 13 ( $^{13}\text{N}$ ), le carbone 11 ( $^{11}\text{C}$ ) et le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ).

Il est important de noter que la production de radiopharmaceutiques et leur conservation limitent le nombre de processus différents qui peuvent être étudiés, un traceur spécifique étant nécessaire pour chaque cible.

Le principal traceur utilisé en TEP est le 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, une molécule de glucose dans laquelle le groupement hydroxyle en position 2 est remplacé par un atome de fluor radioactif ( $^{18}\text{F}$ -FDG). L'administration de ce radiopharmaceutique permet de suivre le métabolisme du glucose, et ainsi de localiser les cellules fortement consommatrices de glucose telles que les cellules tumorales.

### II.1.5.2. Avantages et inconvénients

La médecine nucléaire, grâce aux techniques TEMP et surtout TEP, est une méthode très sensible [52, 53]. Elle nécessite cependant l'injection de radiopharmaceutiques qui

doivent être synthétisés juste avant l'analyse du fait de leur courte durée de vie. Cette dépendance en atomes radioactifs difficiles à produire (production en cyclotron pour la TEP, ou en générateur pour la TEMP), rend malheureusement cette technique très onéreuse. De plus, l'utilisation de sources radioactives en fait une technique lourde à utiliser en termes de mesures de sécurité.

### II.1.6. Fluorescence

La dernière modalité présentée ici est l'imagerie de fluorescence. Si la fluorescence est une technique fortement répandue dans le domaine biomédical, notamment à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire (cytométrie en flux ou coloration histologique), elle est, malgré ses atouts, encore peu employée pour réaliser de l'imagerie *in vivo*.

La section suivante rappellera le principe de la fluorescence, les avantages et les inconvénients liés à son utilisation en imagerie *in vivo*, et présentera également les dispositifs d'imagerie et les principaux traceurs existants.

## II.2. Imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une méthode très sensible mais qui a l'inconvénient d'avoir une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée. Il s'agit malgré tout de la méthode la plus rapide et la moins coûteuse pour imager des molécules ou des cellules dans le petit animal. Elle constitue ainsi une méthode complémentaire de l'IRM ou de la médecine nucléaire [57]. De plus, son faible temps d'acquisition en fait la technique d'imagerie moléculaire la mieux adaptée aux méthodes de « screening ».

### II.2.1. Principe et grandeurs physiques

La fluorescence correspond à l'émission de lumière par une substance (molécule ou matériau par exemple) depuis un état électronique excité.

### II.2.1.1. Diagramme de Jabłoński

Les différents processus électroniques engendrés par l'absorption de lumière par une substance fluorescente (appelée également fluorophore ou fluorochrome) peuvent être représentés par le diagramme de Jabłoński (Figure II-3).

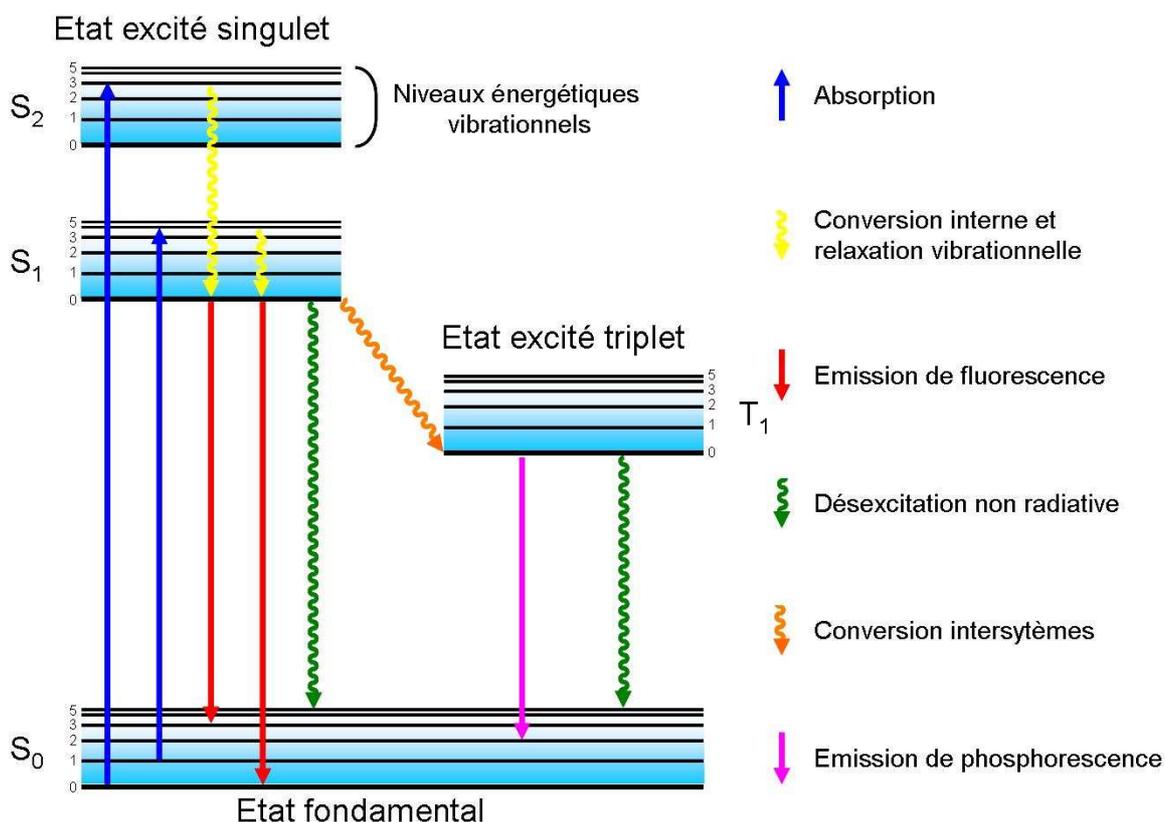


Figure II-3 : Diagramme de Jabłoński.

L'état électronique singulet fondamental ainsi que les deux premiers états électroniques singulets excités sont respectivement représentés par S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>. Chacun de ces niveaux d'énergie électronique, ainsi que l'état excité triplet (T<sub>1</sub>), comprend plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle notés 0, 1, 2, etc. (les niveaux d'énergie rotationnelle ne sont pas représentés).

A température ambiante, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour peupler les états énergétiques S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>. C'est l'absorption de l'énergie lumineuse apportée par un photon qui permet de peupler ces états excités. L'absorption a généralement lieu depuis les niveaux vibrationnels les plus bas de l'état fondamental car ce sont les plus peuplés. Un fluorophore est généralement excité jusqu'aux niveaux vibrationnels élevés, que ce soit ceux de S<sub>1</sub> ou de

$S_2$ . Les molécules excitées se relaxent ensuite rapidement par conversion interne jusqu'au niveau vibrationnel le plus faible (0) de l'état excité  $S_1$ . Le retour à l'état fondamental  $S_0$  depuis le niveau vibrationnel 0 de l'état  $S_1$  peut alors avoir lieu par émission d'un photon, ce qui correspond à la fluorescence, ou par désexcitation non radiative (principalement par dégagement de chaleur lors des collisions avec les molécules environnantes). D'autre part, des phénomènes concurrents comme le transfert d'énergie entre fluorophores ou vers un inhibiteur de fluorescence peuvent également avoir lieu à l'état excité. Ces processus concurrents de l'émission de fluorescence font que le nombre de photons émis est inférieur aux nombre de photons absorbés.

L'énergie libérée lors de l'émission de fluorescence est généralement inférieure à celle ayant permis l'excitation, de l'énergie étant dissipée lors des phénomènes de conversion interne qui suivent l'absorption. Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission est donc décalée vers le rouge (vers les plus grandes longueurs d'ondes) par rapport à la longueur d'onde d'excitation. La différence entre la longueur d'onde où l'absorption est maximale et celle où l'émission de fluorescence est la plus intense se nomme déplacement de Stokes.

Pour certaines molécules, un processus de conversion intersystème autorise le peuplement de l'état excité triplet  $T_1$  depuis l'état excité singulet  $S_1$ . Le retour à l'état  $S_0$  peut dans ce cas s'effectuer soit par émission de lumière, on parle alors de phosphorescence, soit par désexcitation non radiative. L'état excité triplet  $T_1$  étant moins énergétique que  $S_1$ , l'énergie libérée par la phosphorescence est plus faible que celle liée au processus de fluorescence. L'émission de phosphorescence est ainsi décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à l'émission de fluorescence.

### II.2.1.2. Grandeurs physiques caractéristiques de la fluorescence

Les principales caractéristiques physiques des fluorophores sont définies ci-dessous :

- Longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence : elles correspondent aux longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption et l'émission de fluorescence sont maximales.
- Coefficient d'extinction  $\epsilon$  (ou absorption molaire) : ce coefficient relie la quantité de lumière absorbée sur une longueur de cuve  $\ell$  (en cm), pour une longueur

d'onde donnée, à la concentration  $C$  (en  $M$ ) du fluorophore en solution, selon la loi de Beer-Lambert :  $Absorbance = \epsilon \ell C$  ( $\epsilon$  s'exprime donc en  $M^{-1}.cm^{-1}$ ).

- Rendement quantique de fluorescence : il correspond au nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés et représente donc l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation.
- Durée de vie de fluorescence ou durée de vie de l'état excité  $S_1$  : il s'agit de la durée moyenne pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental. A titre d'exemple, cette durée est de l'ordre de la nanoseconde pour un fluorophore organique.
- Photoblanchiment : lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène. Le fluorophore perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand une solution de molécules fluorescentes est excitée, une certaine proportion d'entre elles peut être détruite à chaque instant par photoblanchiment, ce qui engendre une diminution de l'intensité de fluorescence au cours du temps lors d'une irradiation continue.

## II.2.2. Application de la fluorescence pour l'imagerie *in vivo*

La fluorescence permet de faire de l'imagerie moléculaire car il est possible de suivre des traceurs en observant leur émission de fluorescence après les avoir excités par une source lumineuse. Cependant, si l'imagerie de fluorescence *in vivo* est encore en développement, c'est qu'il a fallu dans un premier temps s'affranchir des limitations optiques existant dans les tissus organiques.

### II.2.2.1. Limitations optiques *in vivo*

L'utilisation de fluorophores pour des expérimentations *in vivo* engendre des contraintes supplémentaires par rapport à une utilisation *in vitro* du fait de la présence de tissus organiques sur le trajet des rayonnements lumineux d'excitation et de fluorescence.

Les principaux problèmes rencontrés en imagerie de fluorescence *in vivo* sont les suivants :

- La diffusion du rayonnement lumineux (d'excitation et d'émission) lors de la traversée des tissus entraîne une importante perte d'intensité ainsi qu'une perte d'information, ce qui rend plus difficile la localisation exacte du fluorophore dans l'organisme.
- L'absorption par les tissus de la lumière d'excitation et de celle émise par le fluorophore conduit, comme le phénomène de diffusion, à une perte d'intensité du signal de fluorescence.
- L'auto-fluorescence des tissus, qui est à l'origine d'une diminution importante du contraste de l'image, correspond à la fluorescence naturelle émise par de nombreux constituants des tissus (hémoglobines, porphyrines ...) ainsi que par la nourriture contenue dans le système digestif.

D'un point de vue instrumental, il est nécessaire, pour limiter ces inconvénients, d'augmenter la sensibilité de détection et de filtrer le rayonnement d'excitation diffusé. Quant au traceur utilisé, il doit posséder un rendement quantique de fluorescence et un déplacement de Stokes les plus élevés possibles.

De plus, le choix de longueurs d'onde d'absorption et d'émission adéquates (dans le proche infrarouge) permet également de réduire ces phénomènes gênants. En effet, la diffusion du rayonnement lumineux par les tissus organiques diminue quand les longueurs d'onde d'excitation et d'émission augmentent. En outre, le phénomène d'absorption du rayonnement par les tissus peut être fortement diminué si l'on utilise des longueurs d'onde d'excitation et d'émission comprises entre 650 et 900 nm. La Figure II-4 représente la variation des coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde. Il apparaît nettement sur ce schéma que la fenêtre optimale se situe dans le proche infrarouge, entre l'absorption de l'hémoglobine et celle de l'eau [58].

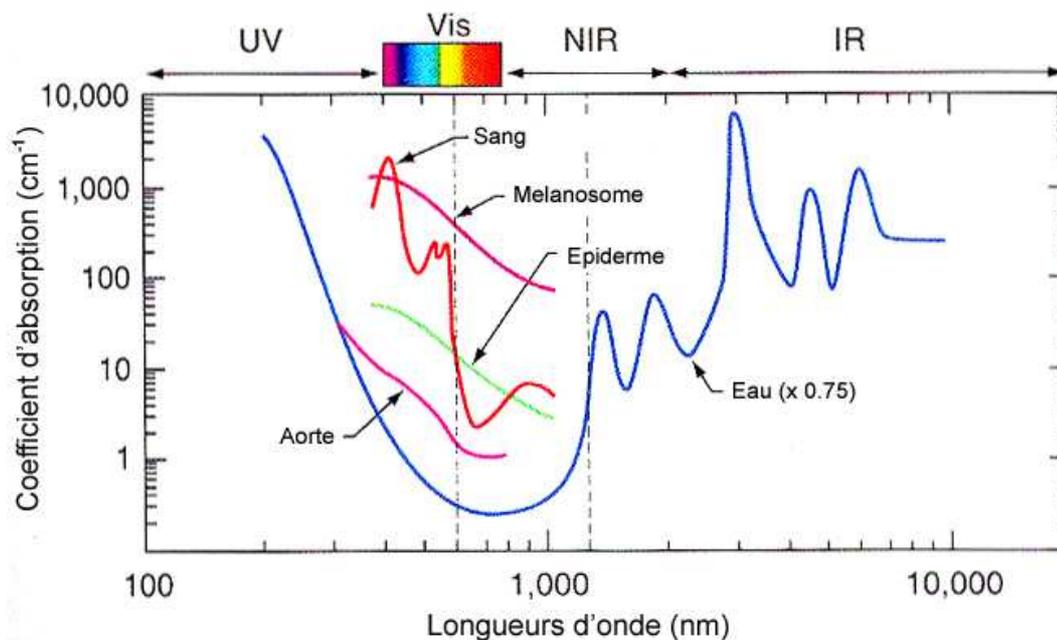


Figure II-4 : Coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde (d'après Mobley, J. et T. Vo-Dinh [58]).

De plus, l'observation dans le proche infrarouge permet de réduire considérablement l'auto-fluorescence des tissus. Comme on le voit sur la Figure II-5, de nombreux organes (peau, intestin, vessie) sont fluorescents dans les longueurs d'onde du visible. Cependant, si l'on travaille dans le proche infrarouge, alors ces mêmes organes n'émettent que très peu de fluorescence, ce qui permet de visualiser les fluorophores injectés dans la souris avec un contraste bien plus important [57].

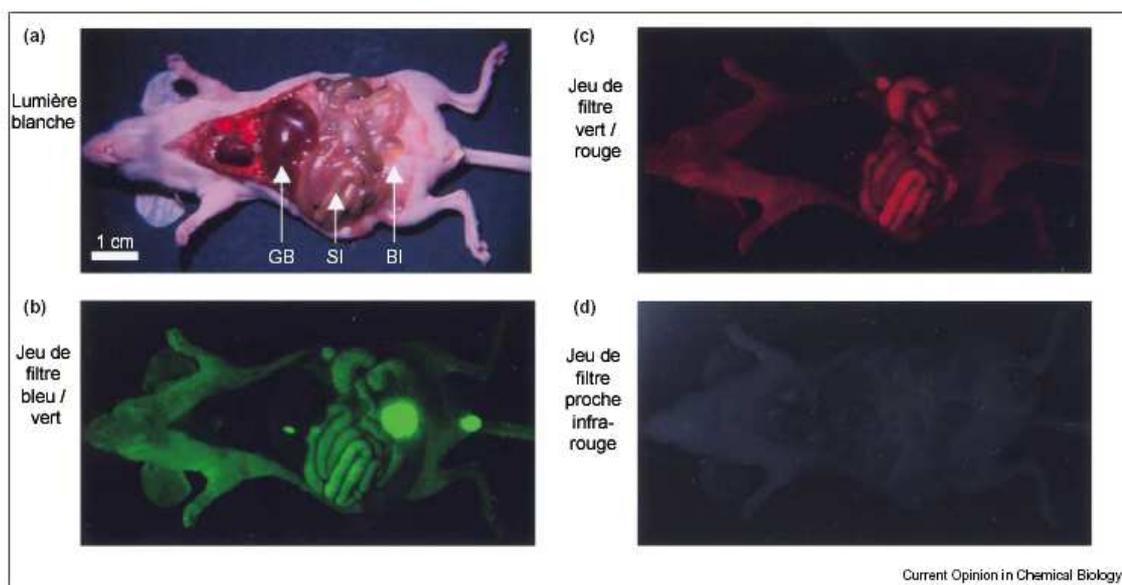


Figure II-5 : Auto-fluorescence des organes de la souris dans différentes conditions optiques [57].

### II.2.2.2. Avantages de la fluorescence

En dépit des limitations liées aux propriétés optiques des tissus il existe donc un domaine de longueurs d'onde (650 – 900 nm) pour lequel l'imagerie de fluorescence est avantageuse.

Cette technique présente en effet de nombreux intérêts : elle allie une bonne sensibilité, un faible encombrement, des agents de contraste stables et elle ne se base pas sur l'utilisation de radiations ionisantes. Cette technique est également peu onéreuse à l'achat et au fonctionnement, ce qui en fait une modalité d'imagerie moléculaire de choix pour le petit animal.

Les applications envisagées à court terme pour le petit animal sont d'une part l'aide à la découverte de biomarqueurs permettant de cibler des tumeurs ou la plaque d'athérome, et d'autre part la découverte et l'évaluation de nouvelles thérapeutiques. A moyen terme, des applications de l'imagerie de fluorescence sont actuellement envisagées pour l'homme, en dermatologie, comme outil de diagnostic du cancer du sein, de détection de métastases ou de ganglions sentinelles en intra-opératoire, ou de polypes précancéreux par endoscopie du colon.

### II.2.3. Dispositifs expérimentaux

Cette section présente différents dispositifs instrumentaux développés par le CEA-LETI pour l'imagerie de fluorescence *in vivo* du petit animal.

#### II.2.3.1. Imagerie de fluorescence par réflectance

L'imagerie de fluorescence par réflectance (FRI en anglais pour « Fluorescence Reflectance Imaging ») permet d'obtenir des clichés de fluorescence en deux dimensions. Ce dispositif est constitué d'une couronne de diodes laser émettant à 633 ou 660 nm placée autour d'une caméra CCD refroidie. Cette caméra est équipée de filtres capables de séparer le rayonnement d'excitation diffusé des signaux de fluorescence émis par les traceurs préalablement injectés ; en effet, ces filtres laissent uniquement passer les longueurs d'onde supérieures à 665 ou 690 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation (633 ou 660 nm).

Le temps d'acquisition d'une image varie entre dix et quelques centaines de millisecondes. Le système de filtration permet également de travailler en lumière inactinique.

Cet équipement est désormais couramment utilisé au laboratoire pour imager des tumeurs à l'aide de traceurs spécifiques marqués par des fluorophores émettant dans le proche infrarouge.

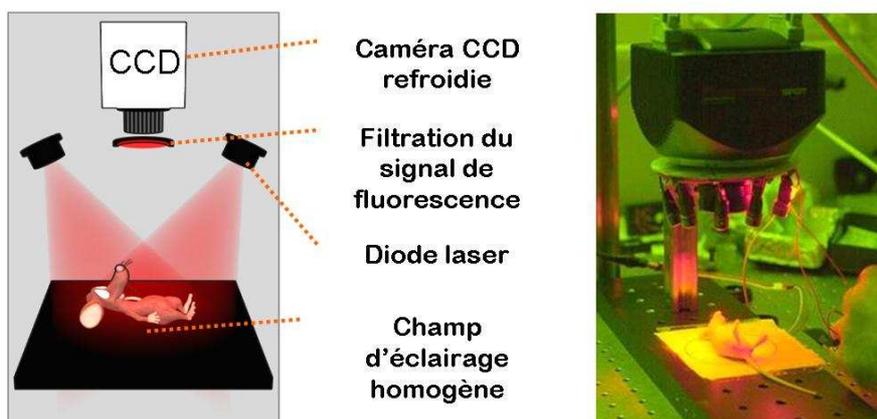


Figure II-6 : Imagerie de fluorescence par réflectance.

### II.2.3.2. Tomographie de fluorescence

Contrairement au premier dispositif qui permet d'obtenir uniquement des images en deux dimensions, la tomographie de fluorescence donne accès à des reconstructions en trois dimensions.

Avec ce dispositif, l'acquisition se fait par transmission : la caméra qui recueille la fluorescence se situe de l'autre côté de l'animal par rapport au faisceau d'excitation laser. Ce faisceau laser balaie la zone à étudier en se déplaçant selon les axes du plan, de manière à illuminer successivement une série de points de l'animal. Pour chaque position du laser, un cliché de fluorescence et de transmission des tissus sont enregistrés. L'analyse de l'ensemble des clichés obtenus permet, après traitement par des algorithmes, d'obtenir des reconstructions en trois dimensions incluant la localisation dans l'espace des sources de fluorescence.

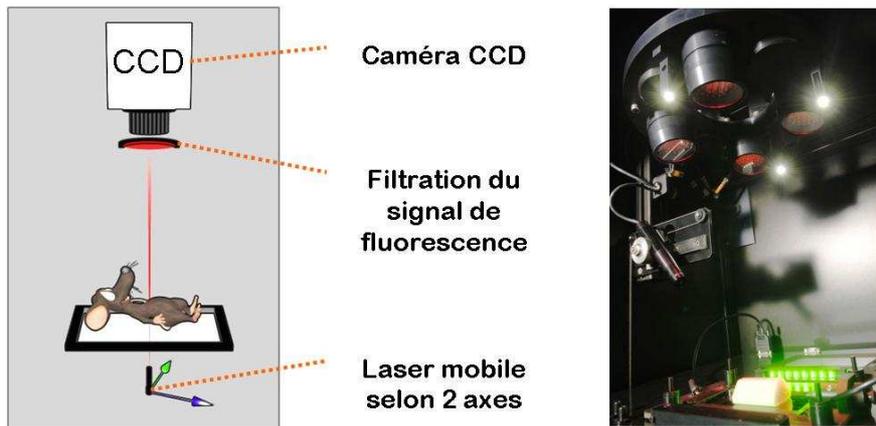


Figure II-7 : Tomographie de fluorescence.

Les deux dispositifs décrits sont implantés au sein de la plateforme « imagerie de fluorescence *in vivo* pour le petit animal » dirigée par Jean-Luc Coll située à l’Institut Albert Bonniot (IAB) [<http://www-iab.ujf-grenoble.fr>]. Toutes les expérimentations réalisées sur le petit animal dans le cadre de ce travail ont été réalisées au sein de cette plateforme d’imagerie.

## II.2.4. Traceurs

L’imagerie de fluorescence nécessite, comme toutes les techniques d’imagerie moléculaire, l’injection d’agents de contraste ou traceurs, qui sont dans ce cas des fluorophores.

Parmi les molécules et matériaux fluorescents utilisés couramment en imagerie de fluorescence, on distingue les fluorophores organiques, les protéines fluorescentes et les nanocristaux semi-conducteurs (Figure II-8).

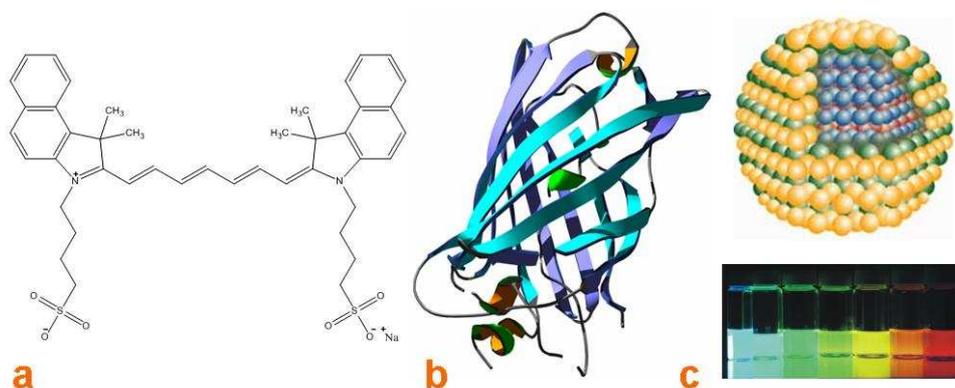


Figure II-8 : a) Fluorophore organique (vert d’indocyanine) ; b) Protéine fluorescente (« Green Fluorescent Protein » ou GFP) ; c) Nanocristaux semi-conducteurs.

### II.2.4.1. Fluorophores organiques

Les fluorophores organiques sont des molécules qui possèdent le plus souvent de nombreuses insaturations conjuguées. Le Chapitre IV présente quelques structures de fluorophores organiques compatibles avec l'imagerie de fluorescence *in vivo*.

A titre d'exemple, on peut citer le cas du vert d'indocyanine (ou ICG en anglais pour « IndoCyanine Green »). Ce fluorophore est largement utilisé depuis de nombreuses années pour des expérimentations sur la souris, mais aussi sur l'homme puisqu'il fait partie des rares molécules fluorescentes autorisées par la FDA. L'ICG est utilisé dans le cadre d'études vasculaires, que ce soit dans l'œil, le cerveau, ou le cœur [57].

Les marqueurs organiques fluorescents peuvent aussi être employés pour visualiser et localiser des cellules cancéreuses *in vivo* dans le petit animal. Pour cela, des dérivés du glucose comme le Cypate-mono-2-deoxy-glucose peuvent être utilisés, le cypate étant une molécule fluorescente dérivée de l'ICG. Ces traceurs sont en effet rapidement absorbés par les cellules cancéreuses du fait de leur forte consommation en glucose. Enfin, la détection de tumeurs peut également être réalisée grâce à l'utilisation de fluorophores organiques, généralement issus de la famille des cyanines, couplés à des peptides ou des anticorps permettant de cibler spécifiquement certaines tumeurs [59].

### II.2.4.2. Protéines fluorescentes

Les fluorophores synthétiques ne sont pas les seuls utilisés en imagerie de fluorescence. En effet, il existe certaines protéines naturelles qui ont des propriétés de fluorescence, comme la « Green Fluorescent Protein » (GFP) [60-62]. La GFP est une protéine issue d'une méduse (*Aequorea victoria*) qui a pour propriété d'émettre dans le vert lorsqu'elle est excitée par une lumière bleue. Le gène codant pour la GFP peut être utilisé comme gène rapporteur : la séquence génétique codant pour la protéine fluorescente est insérée entre un gène d'intérêt et son promoteur afin que l'expression du gène en question entraîne également la production de la protéine fluorescente. La GFP peut donc être considérée comme un traceur activable. Cette technique a permis d'étudier le développement de diverses tumeurs chez la souris, mais aussi son développement embryonnaire [59]. La GFP a cependant l'inconvénient d'absorber dans le bleu et d'émettre dans le vert, longueurs d'onde

pour lesquels les tissus biologiques absorbent et diffusent fortement, rendant ainsi difficile sa détection au sein d'un animal vivant.

D'autres protéines fluorescentes ont donc été développées à la fois pour être compatibles avec l'imagerie de fluorescence *in vivo* et pour élargir la palette de couleurs : la production de différentes protéines de fluorescence par différents gènes d'intérêt permet de visualiser plusieurs processus biologiques simultanément (multiplexage).

Cette technologie nécessite néanmoins l'utilisation de cellules et d'animaux transgéniques et est donc difficilement envisageable pour l'homme.

### II.2.4.3. Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents

Les nanocristaux semi-conducteurs ou boîtes quantiques [39] (« Quantum Dots » en anglais), évoqués dans le Chapitre I sont des fluorophores très performants. Leurs principaux avantages résident dans le contrôle de la longueur d'onde d'émission, l'important déplacement de Stokes et leur faible photoblanchiment.

Ces nanoparticules, comprises entre 2 et 10 nanomètres de diamètre, sont constituées de quelques milliers d'atomes de matériaux semi-conducteurs tels que les couples cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore.

Du fait du confinement du semi-conducteur dans les trois dimensions au sein de la nanoparticule, les électrons des nanocristaux ont des niveaux d'énergie discrets et quantifiés. Ces niveaux d'énergie peuvent être contrôlés par le changement de la taille et par la nature des atomes qui composent le nanocristal. Les propriétés de fluorescence découlant directement de ces niveaux d'énergie, le maximum d'émission de fluorescence peut ainsi être contrôlé.

### II.2.4.4. Vers de nouvelles sondes nano-particulaires biocompatibles

Les boîtes quantiques que nous venons de décrire ont d'excellentes propriétés optiques. Cependant, leur composition et leur métabolisation une fois injectées dans un organisme vivant soulèvent des interrogations quant à leur biocompatibilité. Parmi les autres types de traceurs optiques nano-particulaires, on trouve également des nanoparticules de silice [38] ou de polymères [63] encapsulant plusieurs molécules de fluorophores. Néanmoins, ces

particules soulèvent les mêmes questions que les boîtes quantiques en termes de biocompatibilité et d'élimination.

Les avantages découlant de l'utilisation des nanoparticules, détaillés dans le chapitre I, incitent malgré tout au développement de nouvelles nano-structures pour l'imagerie de fluorescence. En effet, l'utilisation de telles sondes peut permettre d'augmenter fortement la sensibilité de l'imagerie optique puisque chaque particule véhicule de nombreuses molécules fluorescentes : la reconnaissance d'un récepteur par un ligand présent sur la nanoparticule est ainsi associée à un nombre important de fluorophores, facilitant la détection de cette reconnaissance. De plus, les fluorophores encapsulés au sein de ces particules présentent généralement une meilleure photostabilité. Enfin, leur structure nanoparticulaire leur permet une plus grande versatilité et une approche multifonctionnelle associant diverses modalités d'imagerie et/ou d'agents thérapeutiques.

Nous avons donc cherché, au cours de ces travaux, à développer de nouvelles nanoparticules organiques fluorescentes biocompatibles et autant que possible bioassimilables par l'organisme.

## **II.3. Conclusions**

Nous venons de voir l'intérêt de l'imagerie moléculaire pour l'étude et la compréhension de pathologies, mais également pour leur détection et leur traitement. Parmi l'éventail des différentes modalités d'imagerie, la fluorescence présente de nombreux avantages tels que la rapidité d'acquisition, un faible coût, un encombrement réduit, et une grande sensibilité. Toutefois, l'imagerie moléculaire est fortement liée aux traceurs. Il existe ainsi un réel besoin de traceurs facilement modifiables pour pouvoir imager différents processus biologiques. Un des objectifs de ce travail a donc été de développer de nouvelles nanoparticules pouvant agir comme traceurs optiques.

D'autre part, l'utilisation de l'imagerie de fluorescence constitue également un outil précieux pour la compréhension de la biodistribution des nanoparticules et de leur comportement *in vivo*. En effet, même si l'accent sera par la suite mis sur les propriétés de fluorescence des nouvelles nanoparticules synthétisées, il ne faut pas oublier qu'un des objectifs est d'obtenir à terme un vecteur versatile capable de véhiculer un agent de contraste et/ou un agent thérapeutique.





**Chapitre III :**  
**Nouvelles**  
**formulations de**  
**nano-émulsions**

Les chapitres précédents ont rappelé l'intérêt des nanoparticules pour le vivant, que ce soit pour la délivrance de médicaments ou en tant qu'agents d'imagerie, mais également l'attention particulière qui doit être portée à la biocompatibilité de ces colloïdes. Ce chapitre est quant à lui consacré à l'élaboration de nouvelles nanoparticules organiques biocompatibles basées sur des nano-émulsions de type huile dans eau.

Les nano-émulsions sont développées pour être utilisées en tant que transporteurs (ou cargo) de molécules d'intérêt ; dans le cas présent il s'agit d'un marqueur fluorescent. De tels transporteurs ont comme fonction d'assurer la protection de la molécule d'intérêt avant et après injection (ici nous nous focaliserons sur la voie veineuse), de favoriser son accumulation dans les tissus biologiques ciblés, et le cas échéant de contrôler le relargage de la molécule d'intérêt (dans notre cas le fluorophore ne doit pas diffuser hors des globules pendant tout le temps nécessaire à l'imagerie). Les nano-émulsions formulées ici doivent donc être :

- biocompatibles : les nano-émulsions étant destinées à circuler dans le système sanguin, elles doivent être composées d'éléments non toxiques tolérés par l'organisme.
- furtives : afin d'augmenter la proportion de nano-émulsions atteignant le tissu biologique ciblé, il est souvent nécessaire d'avoir des temps de circulation dans le sang importants (voir Chapitre 1).
- stérilisables : toutes les solutions injectables dans le système sanguin doivent être stériles afin d'éviter toute contamination par des microorganismes. C'est pourquoi le diamètre des nano-émulsions doit être inférieur à 100 nm afin de faciliter la stérilisation par filtration. De plus, de telles petites tailles sont nécessaires à l'extravasation hors du système sanguin et à l'internalisation cellulaire, ce qui constitue un avantage pour certaines applications biologiques.
- stables : les solutions de nano-émulsions doivent pouvoir être stockées pendant plusieurs mois sans déstabilisation colloïdale significative.

Après avoir donné une description des nano-émulsions et détaillé les avantages attendus de leur utilisation, ce chapitre se focalisera sur le choix des constituants et de la technique d'émulsification afin de répondre aux critères précédemment énoncés. Ainsi une formulation dite de « référence » et ses propriétés physiques seront présentées. Enfin quelques

formulations issues de variations autour de celle de référence seront décrites, afin d'illustrer l'impact de certains facteurs sur la taille des nano-émulsions.

### **III.1. Définition et propriétés des nano-émulsions**

#### **III.1.1. Les émulsions**

Les émulsions sont des matériaux dont l'usage est très répandu et les applications larges. En effet, elles sont fortement présentes dans les domaines agroalimentaire et cosmétique mais elles sont également à la base de nombreuses peintures et servent même à déposer le bitume qui recouvre nos routes. Mais ici ce sont leurs utilisations pour la délivrance de molécules actives *in vivo* qui nous intéressent.

##### **III.1.1.1. Définitions**

Une émulsion est le mélange de deux liquides immiscibles ou faiblement miscibles. Un liquide (la phase dispersée) est dispersé sous forme de gouttelettes dans un autre (la phase continue). Les émulsions sont généralement thermodynamiquement instables, mais l'ajout de surfactants permet de stabiliser l'interface entre les deux liquides et confère ainsi aux émulsions une stabilité cinétique plus ou moins grande. Il est à noter qu'il existe des émulsions thermodynamiquement stables, celles-ci sont désignées sous l'appellation de micro-émulsions.

La nature de la phase dispersée (nommée également discontinue ou interne) et celle de la phase continue (appelée aussi externe ou dispersante) permettent de définir deux types d'émulsion : les émulsions de type huile dans eau (H/E ou O/W pour oil in water en anglais) où la phase dispersée est lipophile et la phase continue hydrophile ; et les émulsions de type eau dans huile (E/H ou W/O pour water in oil en anglais) où cette fois la phase dispersée est hydrophile et la phase continue est lipophile.

### III.1.1.2. Emulsions naturellement présentes dans l'organisme

Des émulsions de type huile dans eau à base de triglycérides, de cholestérol, de phospholipides et de protéines amphiphiles sont naturellement présentes dans l'organisme et plus particulièrement dans la lymphe et le sang.

Les graisses ingérées sont absorbées au cours de la digestion par des cellules de l'intestin grêle, puis transférées et transportées sous forme de chylomicrons dans le système lymphatique. Les chylomicrons sont des lipoprotéines, c'est-à-dire des émulsions stabilisées à la fois par des phospholipides et par des protéines amphiphiles nommées apolipoprotéines. Ils sont composés à 98 % de lipides (88 % de triglycérides / 8 % de phospholipides / 1 % de cholestérol estérifié) et à 2 % de protéines ; leur diamètre est compris entre 20 et 1000 nm. Les chylomicrons rejoignent la circulation sanguine lorsque le réseau lymphatique se déverse dans le sang au niveau de la veine sous-clavière. Une partie des chylomicrons (ceux dont la taille est inférieure à 200 nm) vont ensuite être captés par le foie, et transformés en d'autres lipoprotéines telles que les HDL (« High Density Lipoprotein ») ou les LDL (« Low Density Lipoprotein ») dont la composition, la taille, et la nature des apolipoprotéines sont différentes. Ce sont ces lipoprotéines synthétisées par le foie qui seront assimilées et utilisées par les cellules de l'organisme. Les chylomicrons en circulation, notamment ceux dont le diamètre est supérieur à 200 nm, vont eux évoluer vers des tailles plus petites par échanges de « matière » avec les autres chylomicrons et les lipoprotéines au cours de leur séjour dans le compartiment sanguin, permettant ainsi leur capture et leur métabolisation par les cellules du foie. Enfin une partie des chylomicrons en circulation dans le sang est également assimilée et stockée par les cellules adipeuses.

Les chylomicrons et les différentes lipoprotéines jouent également un rôle important dans le temps de circulation sanguine des nanoparticules injectées [43]. Les lipoprotéines échangent couramment entre elles des apolipoprotéines et du cholestérol au cours de leur circulation dans le système sanguin. Il semblerait que de la même manière elles aient aussi la capacité de réduire la furtivité des colloïdes et particulièrement celle des liposomes, en capturant les polymères de furtivité par échange de surfactants. L'altération de la couche de répulsion stérique rend alors possible la fixation des opsonines à la surface des nanoparticules, conduisant ainsi à leur phagocytose par les macrophages du système réticuloendothélial (voir Chapitre I et Chapitre V).

### III.1.1.3. Emulsions pour la délivrance de médicaments

De nombreuses formulations d'émulsions ont été développées, et même commercialisées pour certaines, afin de transporter des molécules thérapeutiques après injection intraveineuse. Ces formulations sont pour la plupart composées d'une phase dispersée constituée de triglycérides. Les globules, stabilisés par une couche de phospholipides et de surfactants pegylés, ont généralement un diamètre aux alentours de 250 nm [64].

La production des ces émulsions submicrométriques s'effectue principalement par homogénéisation à haute pression d'une émulsion grossière préparée par agitation mécanique d'une solution aqueuse contenant les surfactants, et de la phase huileuse contenant le principe actif [65] (voir III.2.2).

Les SLN (« Solid Lipid Nanoparticles ») présentés dans le chapitre I que l'on pourrait assimiler à des nano-émulsions pour lesquelles la phase dispersée est cristallisée sont également utilisés pour encapsuler et véhiculer des agents thérapeutiques, et principalement des anticancéreux [28].

## III.1.2. Les nano-émulsions

### III.1.2.1. Définitions

Les nano-émulsions sont une sous-classe d'émulsions dont le diamètre est compris dans une gamme « nanométrique ». Cependant, il n'y a pas encore de consensus dans la littérature pour définir précisément cette gamme, qui peut varier fortement : 10 à 100 nm [66-68], 20 à 200 nm [34, 68-70] ou encore 100 à 1000 nm [71]. Nous retiendrons ici la définition de Solans *et al.* [34], soit un diamètre compris entre 20 et 200 nm. Les nano-émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables.

### III.1.2.2. Propriétés particulières

Si d'un premier abord, seul le diamètre semble différencier les nano-émulsions des émulsions de taille micrométrique, de nombreuses propriétés découlent de ce seul paramètre.

Parmi les propriétés qui seront intéressantes dans notre cas, on peut citer leur grande stabilité, leur relative transparence, et la possibilité de les stériliser par filtration.

### III.1.2.2.1. Stabilité

La dispersion d'une phase dans une autre sous forme d'émulsion n'est pas thermodynamiquement stable. Il existe en effet plusieurs processus de déstabilisation (réversible ou irréversible) qui vont favoriser l'évolution du système dispersé vers son état final stable thermodynamiquement, c'est-à-dire une solution biphasique.

Le crémage (migration de la phase dispersée vers le haut de la solution) ou la sédimentation (migration vers le bas de la solution) sont des phénomènes réversibles de déstabilisation des émulsions, puisque l'agitation de la solution permet de redisperser les gouttelettes. Ces phénomènes favorisent cependant la coalescence, un phénomène irréversible, entraînant une augmentation de la concentration locale en particules et donc des probabilités de contact entre les globules plus importantes. La vitesse de migration des gouttelettes (par crémage ou par sédimentation) est régie par la loi de Stokes (Équation III.1) :

$$v = \frac{2}{9} \times \frac{\Delta\rho g r^2}{\eta_c} \quad (\text{Équation III.1})$$

Avec

$v$  vitesse de migration de la goutte ( $\text{m.s}^{-1}$ )

$g$  accélération due à la pesanteur ( $\text{m.s}^{-2}$ )

$\Delta\rho$  différence entre les masses volumiques des phases ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

$r$  rayon de la goutte (m)

$\eta_c$  viscosité dynamique de la phase continue (Pa.s)

La vitesse de crémage (ou de sédimentation) étant proportionnelle au carré du rayon des globules, la diminution du diamètre de ces gouttelettes permet de ralentir fortement la vitesse de migration verticale. En outre, pour des diamètres de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, le mouvement brownien (qui décrit le mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide) devient prédominant devant le mouvement lié à la pesanteur, permettant ainsi de maintenir indéfiniment une homogénéité parfaite de la solution (il n'y a plus de phénomène de crémage ou de sédimentation) [68].

Cependant, si grâce à leur faible taille les nano-émulsions ne sont pas concernées par les phénomènes de déstabilisation réversibles que sont le crémage et la sédimentation, elles restent néanmoins soumises aux phénomènes de déstabilisation irréversibles que sont la coalescence et le mûrissement d'Ostwald (Figure III-1).

La coalescence correspond à la rupture du film de surfactants séparant deux globules en contact, entraînant ainsi la fusion entre deux gouttelettes. Le mûrissement d'Ostwald intervient quand la phase dispersée est faiblement soluble dans la phase continue. Dans ce cas, la pression de Laplace plus importante dans les globules de faible diamètre va forcer la solubilisation de molécules de la phase dispersée dans la phase continue, qui vont ensuite être préférentiellement assimilées par les plus grosses gouttelettes (car la pression de Laplace y est plus faible). Ce phénomène engendre donc un transfert de la phase dispersée des petits globules vers les plus grands via la phase continue, entraînant une augmentation de la taille globale des gouttelettes.

Etant donné leurs faibles diamètres, les nano-émulsions sont très sensibles au mûrissement d'Ostwald, qui est de ce fait la cause majeure de vieillissement de ces systèmes colloïdaux.

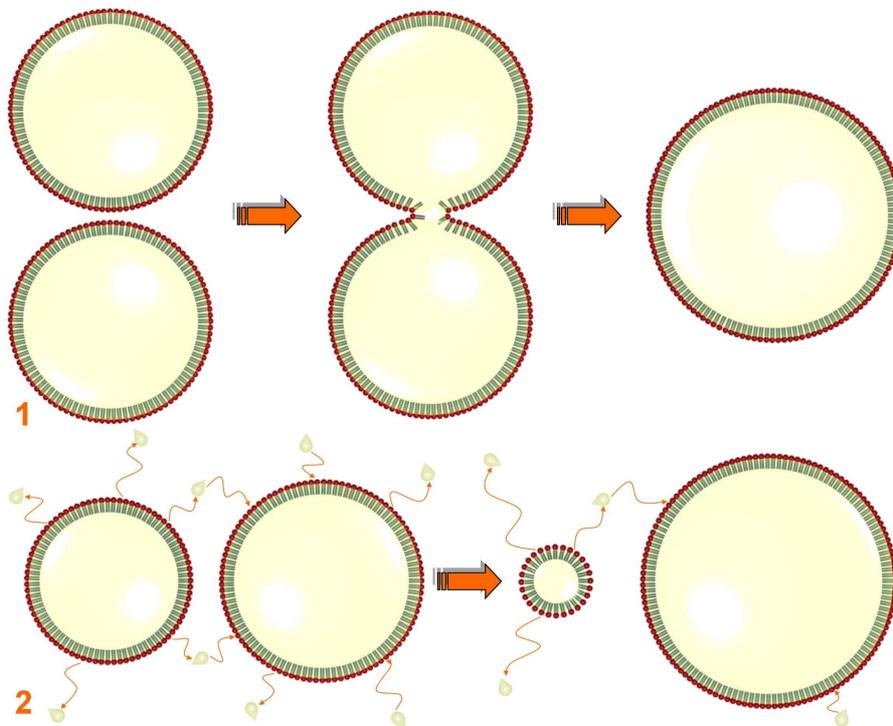


Figure III-1 : Schéma des phénomènes de déstabilisation irréversibles des émulsions. (1) Coalescence : la coalescence correspond à la fusion de deux globules par rupture du film de surfactants les stabilisant. (2) Mûrissement d'Ostwald : le mûrissement d'Ostwald intervient quand la phase dispersée est soluble (même faiblement) dans la phase continue. La différence de pression de Laplace qui existe entre les globules de faible diamètre et ceux de taille plus importante va entraîner une migration des molécules de la phase dispersée des petits vers les gros globules.

### **III.1.2.2.2. *Transparence***

Les émulsions de taille micrométrique diffusent fortement la lumière visible, et à moins que les indices de réfraction de la phase dispersée et de la phase continue ne soient ajustés, elles apparaissent blanches et opaques. En revanche, comme la taille des gouttelettes des nano-émulsions est largement inférieure aux longueurs d'onde du spectre visible (400-700 nm), la lumière n'est pas ou peu diffusée et ainsi, même avec une différence d'indices de réfraction importante, les nano-émulsions sont quasiment transparentes [68]. Ainsi, les solutions de nano-émulsions dont le diamètre de gouttelettes est proche de 100 nm sont troubles, et plus le diamètre augmente plus les solutions deviennent opaques. Cette caractéristique optique permet donc d'évaluer la stabilité des nano-émulsions par un simple contrôle visuel, puisque l'augmentation de la taille d'une faible minorité de globules suffit à rendre la solution trouble.

### **III.1.2.2.3. *Stérilisation***

Le faible diamètre des nano-émulsions rend possible une stérilisation des solutions par filtration sur des membranes dont les pores font 0,22  $\mu\text{m}$ . Une telle taille de pores permet d'éliminer toute contamination de la solution par des microorganismes [72]. Cette technique est plus simple à mettre en œuvre que l'irradiation et moins déstabilisante que la stérilisation par la chaleur.

### **III.1.2.3. *Applications particulières***

Les nano-émulsions sont des colloïdes dont l'étude et le développement sont récents. Néanmoins, ces nano-objets apparaissent déjà très prometteurs pour de nombreuses applications.

Leur transparence par rapport aux émulsions de taille micrométrique est un atout indéniable pour l'industrie cosmétique car elle est liée aux notions de pureté, de simplicité et de fraîcheur. De plus, les nano-émulsions peuvent être facilement absorbées par la peau et leur faible taille permet une stérilisation par filtration [66, 73].

Les nano-émulsions sont également des particules de choix pour la délivrance de médicaments. Cependant, si de nombreuses équipes de recherche travaillent sur l'encapsulation de principes actifs dans des émulsions de taille submicrométrique

(généralement autour de 250 nm de diamètre [64]) peu d'entre elles se focalisent sur l'utilisation de nano-émulsions pour vectoriser des médicaments [70, 74, 75]. Pourtant leur très faible diamètre permet de favoriser leur circulation dans l'organisme en limitant leur élimination, notamment par le foie et la rate [75].

On peut également noter l'existence de travaux sur l'encapsulation de pesticides [69] ou encore l'étude des propriétés antimicrobiennes propres à certaines formulations de nano-émulsions [76].

### ***III.2. Choix de la formulation***

Les nano-émulsions décrites ici sont de type huile dans eau : la phase dispersée est de l'huile et la phase continue est une solution aqueuse. L'émulsification consiste à disperser finement la phase huileuse sous forme de gouttelettes de quelques dizaines de nanomètres de diamètre dans la phase aqueuse, les gouttelettes étant stabilisées par la formation d'une couche de surfactants entre la phase dispersée et la phase continue.

Nous avons choisi, pour des raisons de biocompatibilité, des constituants reconnus comme inoffensifs (GRAS : Generally Recognized As Safe) par la FDA. Les nano-émulsions se composent ainsi d'un mélange de phospholipides et de surfactants pegylés afin de stabiliser les gouttelettes de glycérides, tous ces constituants étant d'ores et déjà utilisés dans des formulations d'émulsions submicrométriques pour la délivrance de médicaments.

Pour obtenir des nano-émulsions stabilisées au moins en partie par des phospholipides, il est nécessaire d'employer des quantités beaucoup plus importantes de ces molécules que dans le cas des émulsions submicrométriques, pour lesquelles les surfactants sont généralement apportés par la phase continue (III.1.1.3). Or la dissolution d'une quantité importante de phospholipides dans l'eau est un procédé long et fastidieux. En effet, les phospholipides doivent dans un premier temps être dissous dans un solvant organique ; puis ce solvant est évaporé de manière à former un film lipidique, qui est ensuite réhydraté par une solution aqueuse, et enfin soniqué afin de disperser la totalité des phospholipides sous forme de liposomes. Afin d'éviter ce long processus de dissolution, nous avons choisi de dissoudre les phospholipides dans la phase huileuse plutôt que dans la phase continue. Bien que les

phospholipides soient connus pour être peu solubles dans les huiles organiques, l'utilisation de certaines cires permet néanmoins de grandement améliorer cette solubilité. La phase dispersée des nouvelles formulations développées est donc composée d'une huile végétale et d'une cire, afin de pouvoir solubiliser les phospholipides dans la phase huileuse.

### **III.2.1. Détails des constituants**

#### **III.2.1.1. Surfactants**

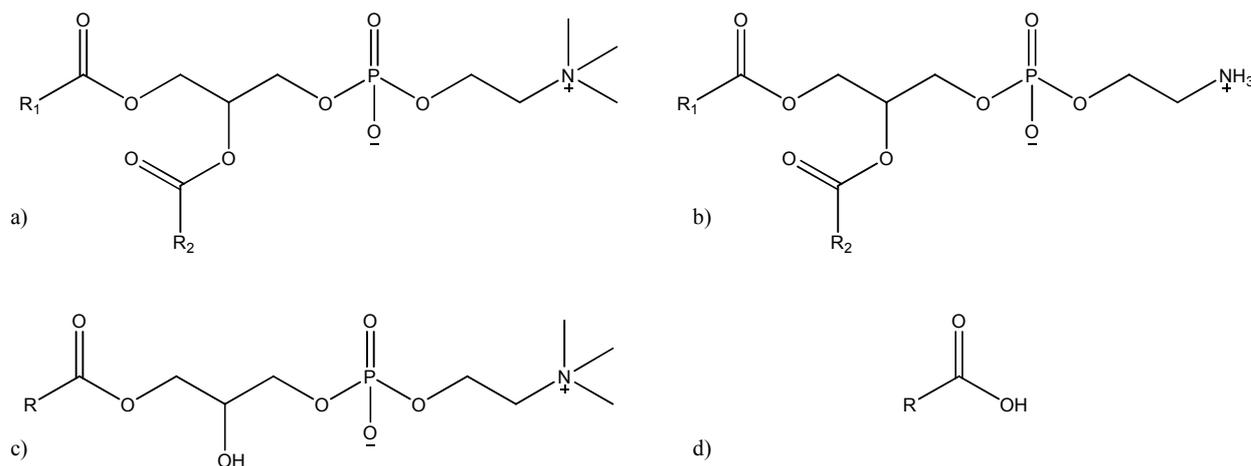
La couche de surfactants utilisée pour stabiliser l'interface entre la phase dispersée et la phase continue est composée de lécithine associée à des surfactants pegylés.

##### **III.2.1.1.1. Lécithine**

La lécithine est un mélange de molécules amphiphiles zwitterioniques d'origine naturelle, majoritairement composées de phospholipides. Les structures des principales molécules composant la lécithine sont illustrées sur la Figure III-2.

Les phospholipides sont les principaux constituants des bicouches lipidiques formant les membranes des cellules ; c'est pourquoi, outre leurs propriétés émulsifiantes, ils sont aussi biocompatibles et bioassimilables. Ils confèrent ainsi aux nano-émulsions un certain biomimétisme avec les lipoprotéines et les cellules, permettant ainsi d'augmenter la furtivité des particules une fois en suspension dans le système sanguin.

La lécithine utilisée dans les formulations de nano-émulsions est issue de graines de soja ; la composition des acides gras qu'elle contient est donc similaire à celle des triglycérides de l'huile de soja (principalement des acides gras insaturés comportant 18 atomes de carbone). La masse molaire de la lécithine a été arbitrairement fixée à 750 g/mol, ce qui correspond à la masse molaire moyenne des phospholipides la composant.



**Figure III-2 : Structure des principaux composants de la lécithine. a) Phosphatidylcholine ; b) Phosphatidyléthanolamine ; c) Lysophosphatidylcholine ; d) Acide gras (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> : résidus d'acides gras). Les acides gras naturels sont constitués d'une chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone saturée ou non. Ceux entrant dans la composition de la lécithine de soja possèdent plus particulièrement 18 atomes de carbone et sont polyinsaturés.**

### III.2.1.1.2. Surfactants pegylés

Les surfactants pegylés sont des molécules amphiphiles non ioniques de synthèse dont la partie hydrophile comporte des motifs polyoxyéthylène (POE ou par abus PEG). Ces chaînes peuvent être linéaires comme dans le cas des stéarates de polyoxyéthylène (commercialisés sous la dénomination Myrj par la société Croda) ou bien ramifiées dans le cas des Tween (voir la Figure III-3). Les surfactants pegylés sont biocompatibles et possèdent de bonnes propriétés émulsifiantes et stabilisantes grâce à la répulsion stérique engendrée par leurs chaînes polyoxyéthylène hydrophiles. Ces chaînes permettent également d'augmenter la furtivité des nano-émulsions vis-à-vis des systèmes de défense biologique (voir Chapitre I).

Le principal surfactant pegylé utilisé est le stéarate de polyoxyéthylène 50 (Myrj 53) commercialisé par Croda. Mais les stéarates de polyoxyéthylène 20 ou 100 (respectivement Myrj 49 et Myrj 59) et le Tween 80 vendu par Sigma-Aldrich entrent aussi dans la composition de certaines formulations. Le Tableau III-1 indique les masses moléculaires moyennes de ces surfactants, ainsi que le nombre de motifs polyoxyéthylène qu'ils comportent.

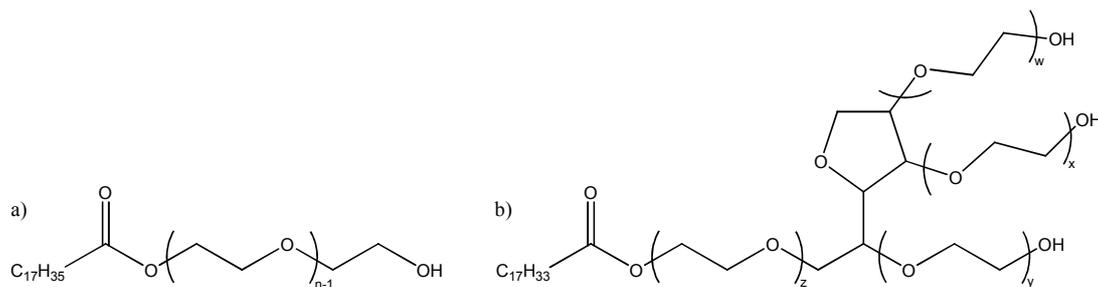


Figure III-3 : Structures des surfactants pegylés. a) Stéarate de polyoxyéthylène ou Myrj (avec n = 20 ; 50 ; 100) ; b) Tween 80 (avec w+x+y+z=20).

Surfactant	Nombre de motifs POE	Poids moléculaire (g/mol)
TWEEN 80	20	1310
Myrj 49	20	1164
Myrj 53	50	2484
Myrj 59	100	4684

Tableau III-1 : Masses molaires et nombre de motifs des surfactants pegylés utilisés.

### III.2.1.2. Phase dispersée

Comme décrit précédemment, la phase dispersée est un mélange de glycérides constitué d'une huile et/ou d'une cire permettant d'augmenter la solubilité des phospholipides.

#### III.2.1.2.1. Huile de soja

Un des constituants de la phase dispersée est une huile végétale : l'huile de soja. Cette huile biocompatible et bioassimable est principalement composée de triglycérides à chaînes grasses longues et insaturées. Elle est autorisée à l'injection principalement dans le cas de la nutrition parentérale, du fait de sa richesse en acides gras essentiels (voir Tableau III-2 et Chapitre I). Le Tableau III-2 indique le pourcentage moyen des principaux acides gras qui composent l'huile de soja [77].

Nature des acides gras	Pourcentage
C16	8,0 à 13,3 %
C16 :1	< 0,2 %
C18	2,4 à 5,4 %
C18 :1	17,7 à 26,1 %
C18 :2	49,8 à 57,1 %
C18 :3	5,5 à 9,5 %

**Tableau III-2 : Composition de l'huile de soja. La notation des acides gras s'effectue selon la nomenclature de type  $C\alpha:\beta$ , où  $\alpha$  correspond au nombre d'atomes de carbone et  $\beta$  au nombre d'insaturations de la chaîne carbonée.**

Nous avons sélectionné cette huile car les triglycérides qui la composent sont considérés comme insolubles dans l'eau, ce qui est une propriété indispensable pour minimiser le processus de mûrissement d'Ostwald, responsable en grande partie de la destabilisation colloïdale des nano-émulsions.

### **III.2.1.2.2. Suppocire® NC**

La cire utilisée pour la formulation des nano-émulsions est la Suppocire® NC commercialisée par Gattefossé. Cette cire est une huile de synthèse composée de glycérides (mono-, di-, triglycérides) d'acides gras saturés d'origine naturelle, comportant principalement entre 12 et 18 atomes de carbone (Tableau III-3). La Suppocire® NC est solide à température ambiante et fond sur une plage de température relativement large centrée autour de 38°C. Compte tenu de la présence d'acides gras à chaîne moyenne et de fonctions alcool libre sur les mono- et diglycérides, cette cire est très faiblement soluble dans l'eau, mais elle possède en contrepartie un important pouvoir de solubilisation.

Longueur de la chaîne carbonée des glycérides	Pourcentage
C8	0,1 à 0,9 %
C10	0,1 à 0,9 %
C12	25 à 50 %
C14	10 à 24,9 %
C16	10 à 24,9 %
C18	10 à 24,9 %

**Tableau III-3 : Composition de la Suppocire® NC.**

### III.2.2. Choix de la technique d'émulsification

Les techniques permettant d'obtenir des nano-émulsions sont peu nombreuses. Elles peuvent être classées en deux catégories : les techniques à basse énergie et les techniques à haute énergie.

Les techniques à basse énergie utilisent certaines propriétés physico-chimiques des constituants pour obtenir des nano-émulsions avec un apport énergétique relativement faible. Par exemple, les techniques dites de température d'inversion de phase ou PIT (acronyme anglais pour Phase Inversion Temperature) se basent sur le changement de solubilité des chaînes polyoxyéthylène en fonction de la température. Les surfactants contenant des motifs polyoxyéthylène sont en général solubles en milieu aqueux à température ambiante, mais ils deviennent liposolubles quand la température augmente du fait de la déshydratation des chaînes polyoxyéthylène. Cette inversion de solubilité est mise à profit pour obtenir des nano-émulsions. Une micro-émulsion est préparée à une température supérieure à celle de l'inversion de solubilité du surfactant : celui-ci se trouve alors encapsulé dans la phase dispersée. En refroidissant la solution, les chaînes polyoxyéthylènes vont se réhydrater et les surfactants vont migrer vers l'interface, déformer la membrane et provoquer la création de globules de faible diamètre, aboutissant ainsi à la formation d'une nano-émulsion. Les caractéristiques finales des globules dépendent fortement de la structure de la micro-émulsion initiale [34, 78, 79]. D'autres techniques d'obtention de nano-émulsions se basant sur l'inversion de phase catastrophique ont également été utilisées [69, 79]. L'inversion de phase catastrophique ou CPI (sigle anglais pour Catastrophic Phase Inversion) consiste à déstabiliser une micro-émulsion en ajoutant à la solution un volume important de phase dispersée. Cela induit une forte augmentation du taux de coalescence et conduit au final à l'inversion de l'émulsion et à la formation de gouttelettes de faible taille.

Ces techniques à basse énergie sont couramment employées pour obtenir des nano-émulsions. Cependant, comme les propriétés finales des colloïdes dépendent en grande partie de la nature des micro-émulsions de départ, ces méthodes imposent une grande rigueur sur la formulation. Elles laissent peu de marge de manœuvre pour optimiser la formulation des nano-émulsions, notamment en fonction de leur comportement en milieu biologique. De plus, l'incorporation de surfactants fonctionnalisables risque de perturber fortement le processus d'émulsification. Or de tels surfactants sont nécessaires pour le greffage de ligands

biologiques permettant une vectorisation active des nano-émulsions dans la zone d'intérêt (voir Chapitre VI).

Les techniques à haute énergie se basent quant à elles sur l'application d'une force mécanique de cisaillement capable de fractionner les globules en particules de plus petite taille. Deux technologies différentes permettent de fournir un cisaillement suffisamment puissant pour former des nano-émulsions : les homogénéiseurs à haute pression et les sondes à ultrasons.

Le principe de fonctionnement des homogénéiseurs haute pression est le suivant : la phase dispersée et la phase continue sont prémélangées de manière à former une émulsion grossière. Cette solution est ensuite projetée à haute pression (jusqu'à 150 MPa) dans une chambre d'interaction, dont la géométrie est étudiée pour générer un intense cisaillement capable de réduire fortement la taille des globules [66, 73, 74, 80, 81].

Bien que l'obtention d'émulsions submicroniques par sonication soit connue [71, 82, 83], et que les ultrasons soient capables de fournir de très importantes quantités d'énergie, cette technique est relativement peu utilisée pour la production de nano-émulsions [70, 75]. L'homogénéisation à haute pression ou les techniques à basse énergie sont en effet plus couramment employées. La sonication possède pourtant des avantages non négligeables : en tant que technique à haute énergie, elle permet d'avoir une grande liberté sur la formulation, et à l'inverse de l'homogénéisation à haute pression, elle permet de travailler sur des plus petits volumes et avec des viscosités plus importantes. La sonication est par conséquent la technique qui a été utilisée pour obtenir l'ensemble des nano-émulsions décrites dans ce travail.

Le processus d'émulsification par sonication est rappelé ci-après. Un générateur convertit le courant électrique discontinu (50/60 Hz) en une énergie électrique à haute fréquence (20kHz). Ce courant est transmis vers un transducteur où il est changé en vibrations mécaniques longitudinales grâce à un cristal piézo-électrique. Ces vibrations sont ensuite amplifiées par la sonde (sonotrode) et transmises au liquide sous la forme d'ondes ultrasoniques consistant en une succession de compressions et de dépressions. Ces variations de pression engendrent la formation de bulles microscopiques (d'air ou de vapeur) appelées cavités. Ces cavités se dilatent durant les phases de dépression et implosent violemment durant les phases de compression. L'effondrement des bulles provoque alors localement un puissant cisaillement s'accompagnant d'une élévation de la température.

Bien que ce phénomène, appelé cavitation, dure seulement quelques millisecondes et que l'énergie libérée par chaque bulle soit faible, sa fréquence fait que l'énergie cumulée générée par toutes les bulles de cavitation est très élevée. Il en résulte une intense agitation à l'échelle de l'échantillon, et donc la dispersion de la phase huile dans la phase aqueuse sous forme de gouttelettes de faibles diamètres.

L'intensité du phénomène de cavitation varie fortement avec les propriétés du milieu, notamment la tension de vapeur, la viscosité, la densité, et toutes les propriétés liées à la quantité de molécules ou d'ions en solution.

L'énergie requise pour former une bulle de cavitation est proportionnelle à la tension de surface et à la pression de vapeur. Ainsi, plus la tension de surface est importante, plus l'énergie nécessaire pour produire les cavités est importante. Cependant l'énergie de l'onde de choc libérée est alors plus importante lorsque les bulles s'effondrent. De la même manière, plus la viscosité de la solution est importante, plus la puissance nécessaire pour former les bulles de cavitation est grande, mais en contrepartie l'énergie libérée par l'effondrement de ces bulles est également plus intense.

L'appareil de sonication utilisé pour obtenir les nano-émulsions est un sonificateur AV505<sup>®</sup> (Sonics, Newtown USA) qui peut être équipé de deux sondes différentes : une sonde de 13 mm de diamètre et une sonde conique de 3 mm de diamètre. Trois paramètres permettent de moduler la sonication : la puissance, les impulsions (pulses) et le temps de sonication.

La puissance s'exprime en pourcentage de la puissance totale de l'appareil (500 W). L'utilisation de la sonde conique impose de ne pas dépasser 40 % de la puissance maximale. Néanmoins, comme la surface de la sonde conique est largement inférieure à celle de la sonde classique, la puissance délivrée localement est plus grande *in fine*.

Il est possible de soniquer la solution en continu ou par impulsions (pulses). Dans le cas de la sonication discontinue, la durée de chaque impulsion (pulse on) ainsi que le temps de repos (pulse off) entre deux impulsions d'ultrasons doivent être définis (en secondes). Soniquer la solution par impulsions et non en continu permet d'une part d'équilibrer la solution grâce aux temps de repos entre les impulsions, mais cela permet également de limiter l'élévation de la température de la solution.

Il est à noter que le temps de sonication correspond à la somme de toutes les impulsions de sonication (pulse on) et diffère donc du temps total de sonication qui comprend aussi les phases de repos (pulse off).

### III.2.3. Protocole général de fabrication

Les nano-émulsions, de type huile dans eau, sont obtenues par sonication de la phase huileuse dans la phase aqueuse. La phase dispersée est composée d'un mélange d'huile de soja et de Suppocire<sup>®</sup> NC. Les globules sont stabilisés par l'association de lécithine et de surfactant pegylé. Cependant, pour des raisons de solubilité, la lécithine est dissoute dans la phase dispersée : l'association de la lécithine et du mélange huile/cire est nommée phase huileuse. Un solvant organique (dichlorométhane) est ajouté pour faciliter la dissolution de la lécithine. Une fois tous les composés dissous, le solvant est évaporé sous vide à une température supérieure à celle de fusion de la cire. Le surfactant pegylé est quant à lui apporté par la phase continue qui, en plus de la solution aqueuse, peut éventuellement comporter du glycérol afin d'augmenter la viscosité. En effet, une phase continue visqueuse favorise le processus d'émulsification et permet aussi d'éviter les projections lors de la sonication. La phase aqueuse est préparée par mélange à chaud du glycérol, du surfactant pegylé et de la solution aqueuse. Les deux phases préalablement maintenues à environ 50°C sont mélangées et la solution diphasique est soniquée directement jusqu'à obtention d'une solution transparente de nano-émulsions (Figure III-4).

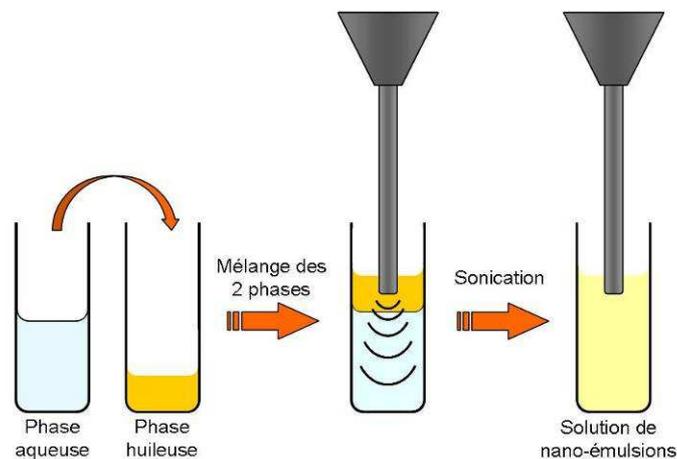


Figure III-4 : Schéma du protocole de préparation d'une solution de nano-émulsions.

Une représentation graphique des nano-émulsions est présentée ci-dessous (Figure III-5).

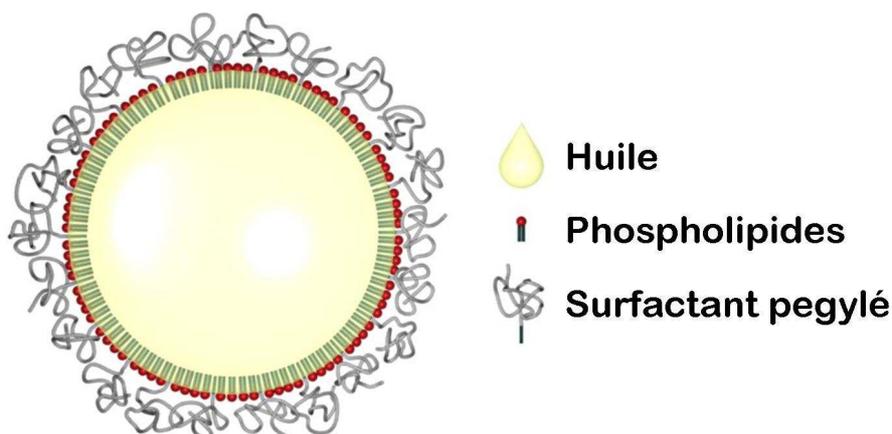


Figure III-5 : Schéma de la structure des nano-émulsions.

Les nano-émulsions sont produites par lot ; les volumes de lot couramment utilisés sont de 2 mL ou 5 mL, mais des lots de 100 mL ont aussi été réalisés. L'annexe III décrit les paramètres de sonication utilisés en fonction du volume du lot.

### ***III.3. Caractéristiques de la formulation de référence***

La formulation décrite dans ce paragraphe est dite de référence, car c'est à partir d'elle que la grande majorité des études physiques, optiques et biologiques a été réalisée. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail les nano-émulsions décrites ont été obtenues avec la formulation de référence, sauf mention contraire.

#### **III.3.1. Composition**

Le Tableau III-4 indique la composition de la formulation de référence. La phase dispersée représente 10 % de la masse totale et est composée à 75 % de Suppocire<sup>®</sup> NC et à 25 % d'huile de soja. La formulation comprend deux types de surfactants : la lécithine et un surfactant pegylé, représentant respectivement 6,90 % et 11,40 % de la masse totale de la solution finale. Le surfactant pegylé est un stéarate de polyoxyéthylène dont la chaîne hydrophile se compose de 50 motifs polyoxyéthylène (Myrj 53). Son poids moléculaire est d'environ 2500 g/mol, la chaîne hydrophile ayant à elle seule une masse molaire de 2250

g/mol. Le surfactant pegylé représente 33 % en moles de la quantité totale de surfactants, tandis que la lécithine en représente 67 %, sa masse molaire ayant été fixée à 750 g/mol. La fraction globale de surfactants est ainsi de 18,3 % en masse, ce qui est nettement supérieur à la quantité de phase dispersée. La quantité de matière réellement dispersée est donc largement supérieure aux 10 % mentionnés plus haut, la solution saline ne représentant finalement que 69,20 % de la masse totale de l'émulsion. Enfin, la formulation comprend également 2,5 % de glycérol afin d'augmenter la viscosité pour faciliter le processus d'émulsification.

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,50
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,50
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	q.s.p 2000	69,20
Surfactants	Lécithine	138	6,90
	Myrj 53	228	11,40

Tableau III-4 : Composition de la formulation de référence pour un lot de 2 mL.

### III.3.2. Propriétés physiques

La formulation décrite dans le paragraphe précédent est émulsionnée selon le protocole présenté dans la section III.2.3 (un protocole détaillé est disponible en annexe IV) et conduit à une solution jaune translucide de nano-émulsions. Les paragraphes suivants sont dédiés à l'étude des propriétés physiques des nano-émulsions issues de la formulation de référence : taille des globules, potentiel zêta, morphologie et état du cœur des globules.

#### III.3.2.1. Distribution en taille et taille moyenne

La diffusion quasi-élastique de la lumière, également nommée spectroscopie par corrélation de photons ou DLS (sigle anglais pour Dynamic Light Scattering), permet d'accéder à la distribution en taille de petites particules en solution. Lors de la mise en œuvre de cette technique, une solution colloïdale est éclairée par un faisceau lumineux monochromatique. Une partie de la lumière diffusée par les particules est alors détectée par un photomultiplicateur.

Le mouvement brownien des particules modifie constamment les distances entre les particules diffusantes dans le temps. Le déplacement des particules engendre alors des fluctuations au niveau des interactions constructives et destructives de la lumière diffusée. Le traitement de ces fluctuations par un corrélateur numérique permet d'obtenir une fonction d'auto-corrélation du signal qui représente la probabilité pour une particule de se trouver à un instant  $t+dt$  au même point de l'espace qu'à l'instant  $t$ . Plus une particule est petite, plus cette probabilité est faible. Inversement, la probabilité augmente avec la taille des particules. Le traitement mathématique de la fonction d'auto-corrélation permet donc d'obtenir la distribution en taille des particules. De plus, l'utilisation de la théorie de Mie rend accessible la pondération de la distribution en volume et en nombre et permet ainsi de définir un diamètre moyen en volume ou en nombre.

Le diamètre moyen des nano-émulsions est mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière grâce à un Zeta-sizer Nano ZS (Malvern, Royaume-Uni). La Figure III-6 représente la distribution en taille de nano-émulsions issues de la formulation de référence. Le diamètre moyen pondéré en volume est de  $35 \pm 2$  nm, avec un indice de polydispersité (défini comme le rapport de l'écart type sur le diamètre moyen) proche de 0,170 ; la solution est donc légèrement polydisperse. Cependant, la méthode de production conduit à une excellente reproductibilité de la distribution en taille des globules obtenus puisque le diamètre moyen ne varie que très peu entre les différents lots de nano-émulsions réalisés avec cette formulation.

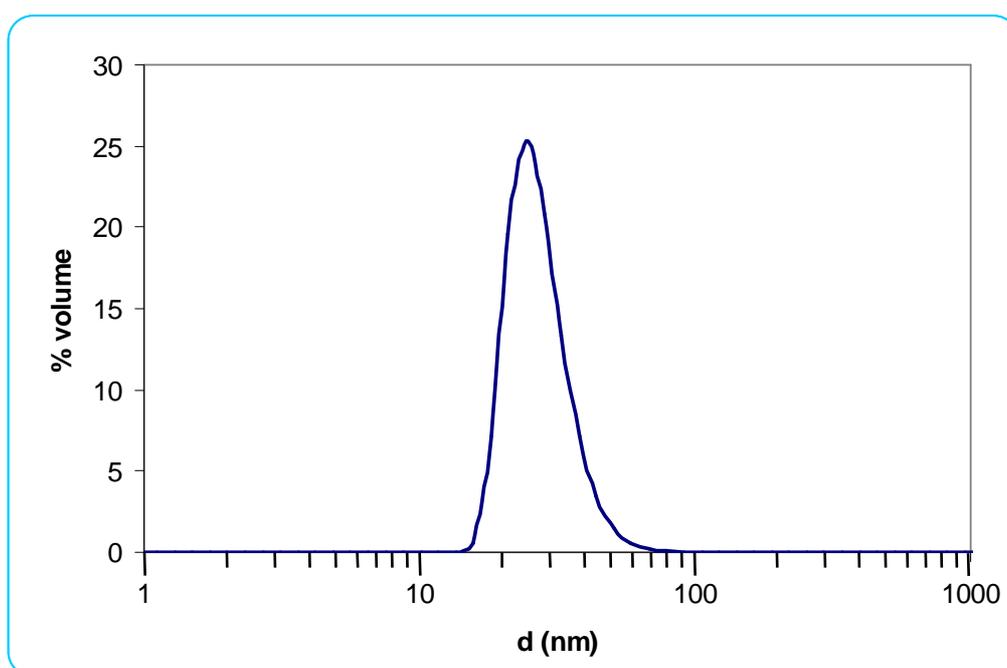


Figure III-6 : Distribution en taille (pondération en volume) d'une solution de nano-émulsions issues de la formulation dite de « référence » à température ambiante après fabrication.

### III.3.2.2. Potentiel Zêta

Le potentiel zêta caractérise la charge de surface des colloïdes en solution. Il ne correspond cependant pas à la charge réelle de la surface du colloïde, mais à celle qu'il acquiert en solution.

La solvataion d'une particule chargée entraîne la formation d'une double couche ionique. La couche la plus proche de la particule est composée d'ions de charge opposée à celle de la surface de la particule. Ces ions sont solidement liés à la particule, c'est pourquoi cette couche dite de Stern est aussi nommée couche liée. La couche de Stern attire à son tour des ions de charge opposée (donc de même charge que la particule). Cette seconde couche appelée couche diffuse ou couche de Gouy contient également des ions de charge identique à celle des ions de la couche liée (voir Figure III-7), mais en concentration volumique moindre.

Lorsque la particule est mise en mouvement, que ce soit par mouvement brownien ou induit (par un champ électrique par exemple), il se forme un plan de glissement (ou plan glissant) au niveau de la double couche de solvataion : la couche de Stern et une partie de la couche de Gouy restent liées à la particule et vont la suivre dans son mouvement, alors que le reste de la couche diffuse reste immobile ou bouge avec du retard par rapport à la particule. C'est au niveau de ce plan de glissement que les particules interagissent entre elles et c'est donc à ce niveau que le potentiel zêta est mesuré.

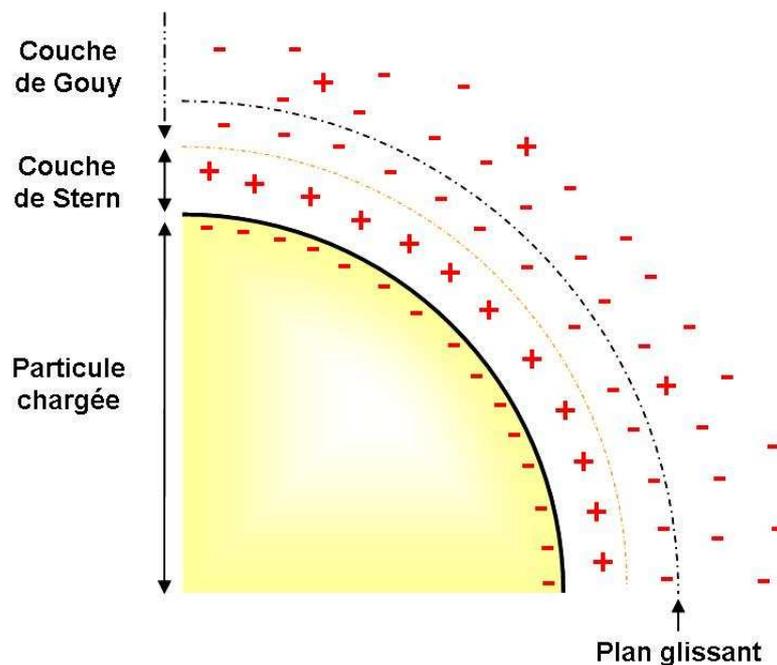


Figure III-7 : Schéma de la double couche ionique de solvataion d'une particule.

Le potentiel zêta est souvent mesuré pour prédire la stabilité des particules en suspension. L'intensité de la force de répulsion électrostatique est en effet liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles vont avoir tendance à s'agréger.

Le potentiel zêta des nano-émulsions a été mesuré avec un Zeta-sizer Nano ZS (Malvern, Royaume-Uni). La solution de colloïdes est soumise à un champ électrique qui va déplacer les particules vers les électrodes de charge opposée avec une vitesse proportionnelle à l'intensité du potentiel zêta. Cette vitesse de déplacement est mesurée par un anémomètre doppler laser. Le décalage de fréquence et de phase d'un faisceau laser incident engendré par les particules en mouvement permet de déterminer la mobilité des particules. A partir de la viscosité de la phase continue, et grâce à l'application de la théorie de Smoluchowski, la mobilité est convertie en potentiel zêta.

Le potentiel zêta des nano-émulsions de la formulation de référence est de  $-5 \pm 2$  mV.

Le potentiel zêta des nano-émulsions est très proche de zéro. Cette faible valeur peut s'expliquer par le fait que la lécithine est principalement composée de phospholipides zwitterioniques (donc globalement neutres), et que les surfactants pegylés sont quant à eux non ioniques. Les charges négatives observées sont sans doute liées aux acides gras libres apportés par la phase dispersée ou la lécithine. La présence de la couche de surfactants pegylés contribue également à diminuer le potentiel zêta puisque la barrière stérique des chaînes polyoxyéthylène entraîne l'éloignement du plan de glissement par rapport à la particule.

Etant donné le faible potentiel zêta des nano-émulsions, ce sont principalement les forces de répulsion stérique dues aux surfactants pegylés, et non les forces de répulsion électrostatique, qui permettent de contrebalancer les forces d'attraction inter-particulaires de Van der Waals, évitant ainsi l'agrégation des particules.

### III.3.2.3. Morphologie

La morphologie des nano-émulsions peut être observée grâce à la cryo-microscopie électronique en transmission (CryoTEM : Cryo Transmission Electronique Microscopy).

Cette technique permet d'étudier des échantillons en solution dans l'eau et évite ainsi que les propriétés morphologiques des particules étudiées ne soient modifiées par l'évaporation du solvant qui est nécessaire pour l'utilisation de la microscopie électronique en transmission classique.

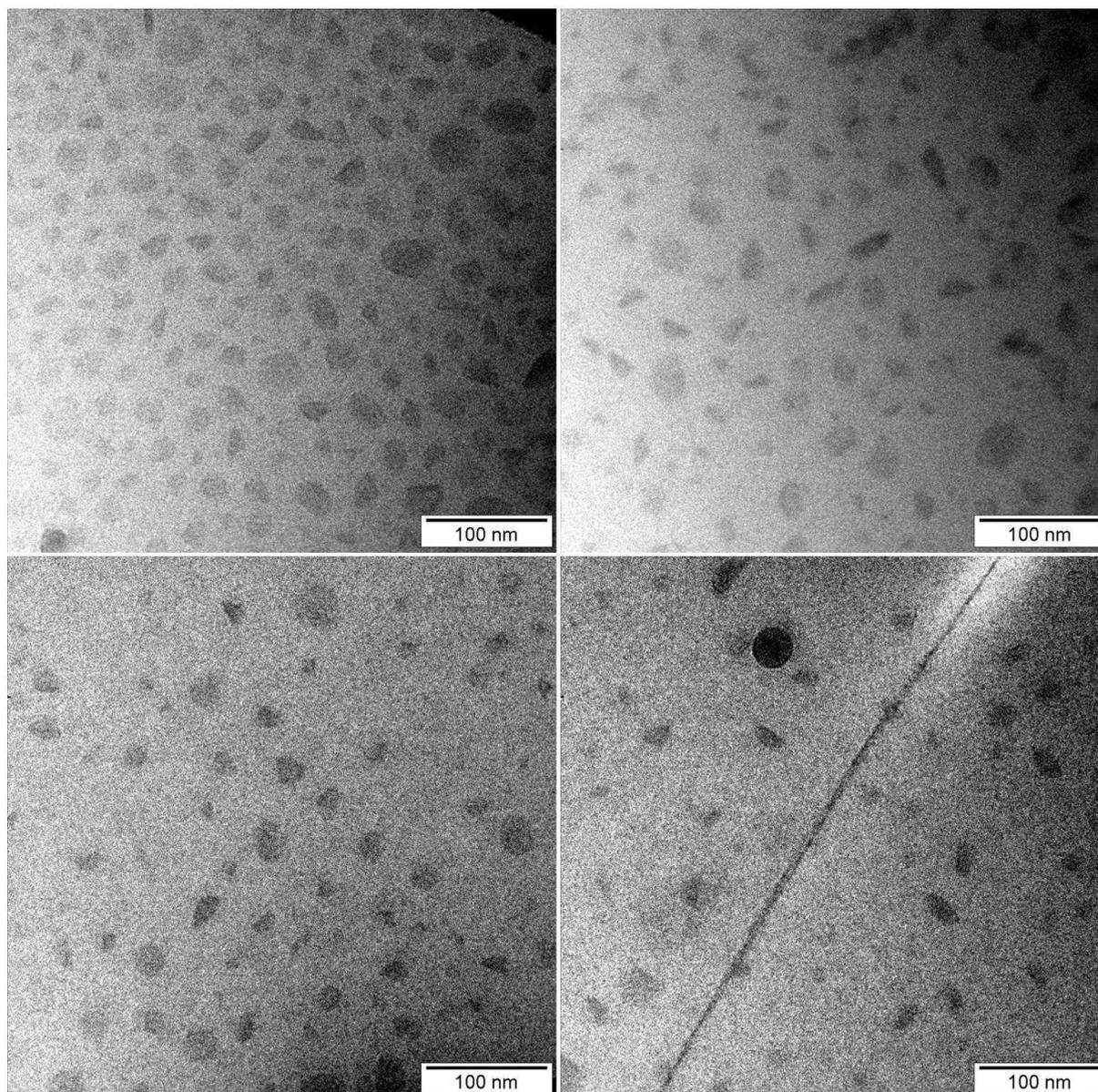
La préparation des échantillons consiste à déposer la solution sur une grille en carbone puis à éliminer la majorité de la solution de manière à ne laisser qu'un film de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur dans les trous de la grille. La grille est ensuite rapidement plongée dans un bain d'éthane liquide ( $\sim -180^\circ\text{C}$ ) formant ainsi des films de glace amorphe. L'échantillon est ensuite placé dans une station de transfert maintenue à  $-190^\circ\text{C}$  (azote liquide) qui est introduite dans la chambre du microscope électronique en transmission (MET).

Les grilles sont alors observées sur un MET (JEOL 2100HC) travaillant à 200 kV équipé d'un filament LaB6. Les analyses ont été réalisées par Audrey Royère en collaboration avec le service de microscopie électronique de l'institut de biologie intégrative (IFR 83).

Les clichés représentés Figure III-8 montrent des particules de taille variable et aussi de formes différentes. En effet, si certaines particules semblent sphériques, on observe également des formes plus allongées. Si on suppose que toutes les particules ont la même forme mais qu'elles sont observées selon des orientations différentes alors deux formes distinctes sont envisageables :

- soit les particules sont des tubes,
- soit ce sont des disques épais.

Or on observe peu de formes sphériques ayant des diamètres compatibles avec la plus petite dimension des particules aux formes allongées. A l'inverse il y a plus de forme circulaire ayant une taille comparable avec la plus grande dimension des colloïdes oblongs. Ce constat signifie donc que l'hypothèse de particules sous forme de disques est à privilégier. Le rapport mesuré entre la hauteur des disques et leur diamètre est en moyenne de 0,5.



**Figure III-8 : Clichés de cryo-microscopie électronique en transmission de nano-émulsions issus de la formulation de référence.**

Ces structures rappellent celles de nanoparticules lipidiques solides (SLN) déjà observées en CryoTEM nommées « plaquettes » mais en plus épais [84].

Cette technique permet également de vérifier les informations obtenues par diffusion quasi-élastique de la lumière. La polydispersité des nano-émulsions mesuré par DLS est également observée sur les clichés de cryo-microscopie. Cependant les tailles des particules observées semblent légèrement inférieures à celles obtenus par diffusion quasi-élastique de la lumière.

### III.3.2.4. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry ou DSC en anglais) est une technique thermo-analytique permettant d'obtenir les températures de transition de phase des matériaux, ainsi que les enthalpies qui y sont associées. Le principe de la mesure repose sur la différence de chaleur que l'on doit fournir à un échantillon donné par rapport à une référence inerte pour les amener à une même température. La calorimétrie différentielle à balayage permet donc de visualiser les transitions exothermiques telles que la cristallisation, et les transitions endothermiques comme la fusion.

Le mélange huileux constitué d'huile de soja, de Suppocire<sup>®</sup> NC et de lécithine est un solide à température ambiante, et devient liquide autour de 37°C. Cette propriété physique est due à la Suppocire<sup>®</sup> NC. Ainsi, l'analyse calorimétrique du mélange huileux montre bien la présence d'un phénomène endothermique s'étalant sur une large gamme de température centrée autour de 37°C qui correspond à la fusion (Figure III-9).

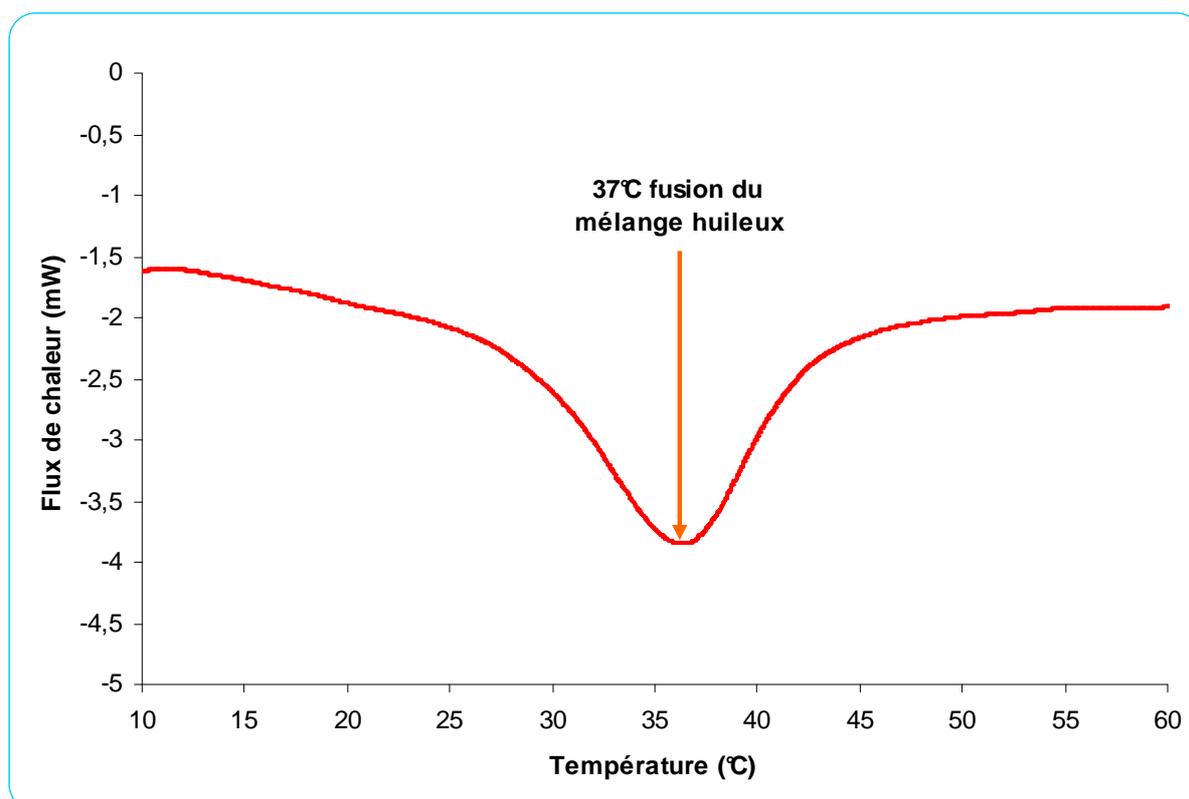


Figure III-9 : Thermogramme du mélange huileux entrant dans la composition des nano-émulsions.

Il est intéressant de savoir dans quel état se trouve le cœur lipophile des globules après émulsification. L'analyse des solutions de nano-émulsions nécessite d'utiliser des capsules

fermées afin d'éviter les perturbations engendrées par l'évaporation de la phase continue. Les données obtenues pour les nano-émulsions indiquent l'absence de transition de phase entre 5 et 45°C : la fusion de la cire n'est plus observée (Figure III-10). L'hypothèse la plus probable est que la nano-structuration des globules empêche la solidification de la cire lors de la diminution de la température après l'émulsification. Il faut rappeler que l'émulsification se déroule à une température supérieure à la température de fusion de la Suppocire<sup>®</sup> NC, environ 50°C, afin de favoriser la fragmentation des globules.

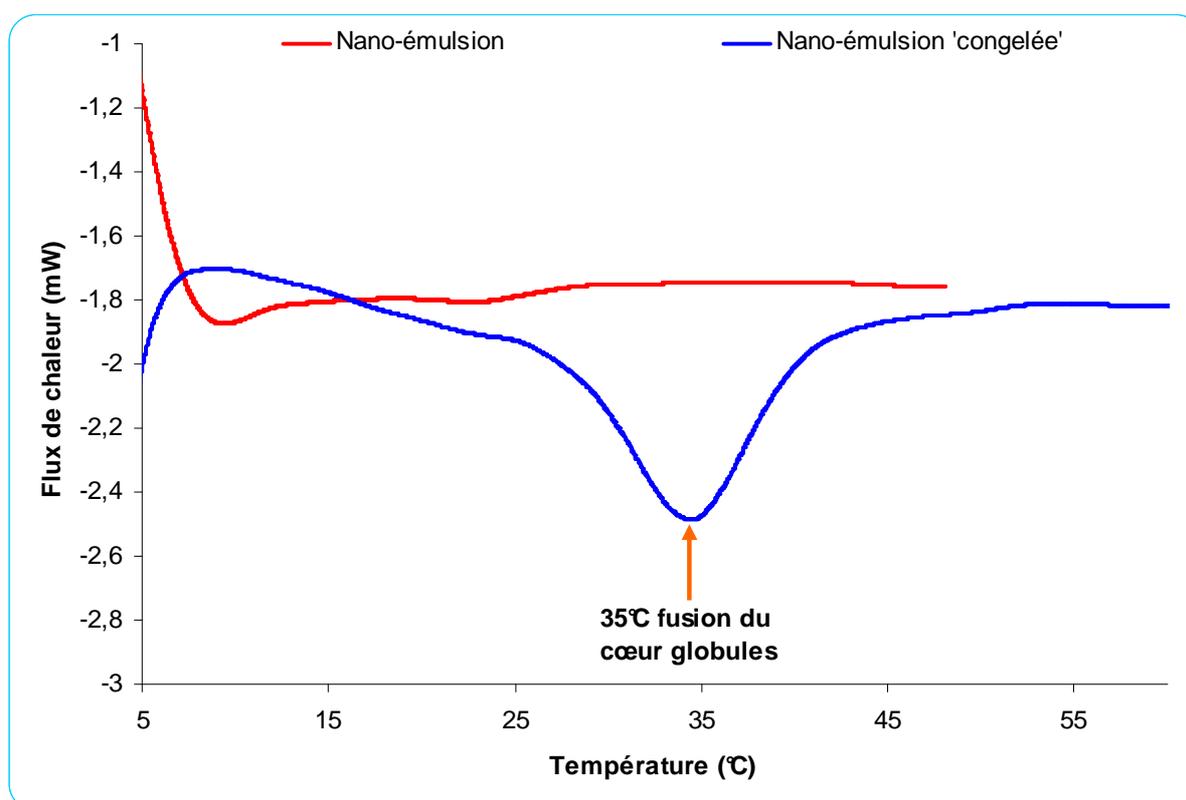


Figure III-10 : Effet de la congélation sur les thermogrammes de nano-émulsions.

Le comportement d'une solution de nano-émulsions a ensuite été étudié sur une plage de température plus large : entre -20°C et 60°C. Cette fois le phénomène endothermique associé à la fusion de la cire est clairement visible autour de 35°C (Figure III-10). La congélation et la décongélation de l'échantillon ont donc permis de retrouver la transition de phase de la Suppocire<sup>®</sup> NC. La fusion s'étale néanmoins sur une gamme de température légèrement décalée (autour de 35°C contre 37°C pour le mélange huileux non émulsionné).

Il est important de noter que la congélation et la décongélation des nano-émulsions engendrent une importante déstabilisation colloïdale entraînant la coalescence des globules. En effet après conservation à -20°C les solutions deviennent opaques, indiquant ainsi

l'augmentation du diamètre moyen des globules. Les mesures par diffusion quasi-élastique de la lumière confirment l'analyse visuelle puisqu'elles indiquent l'apparition d'une population de globules submicroniques d'environ 200 nm de diamètre (Figure III-11).

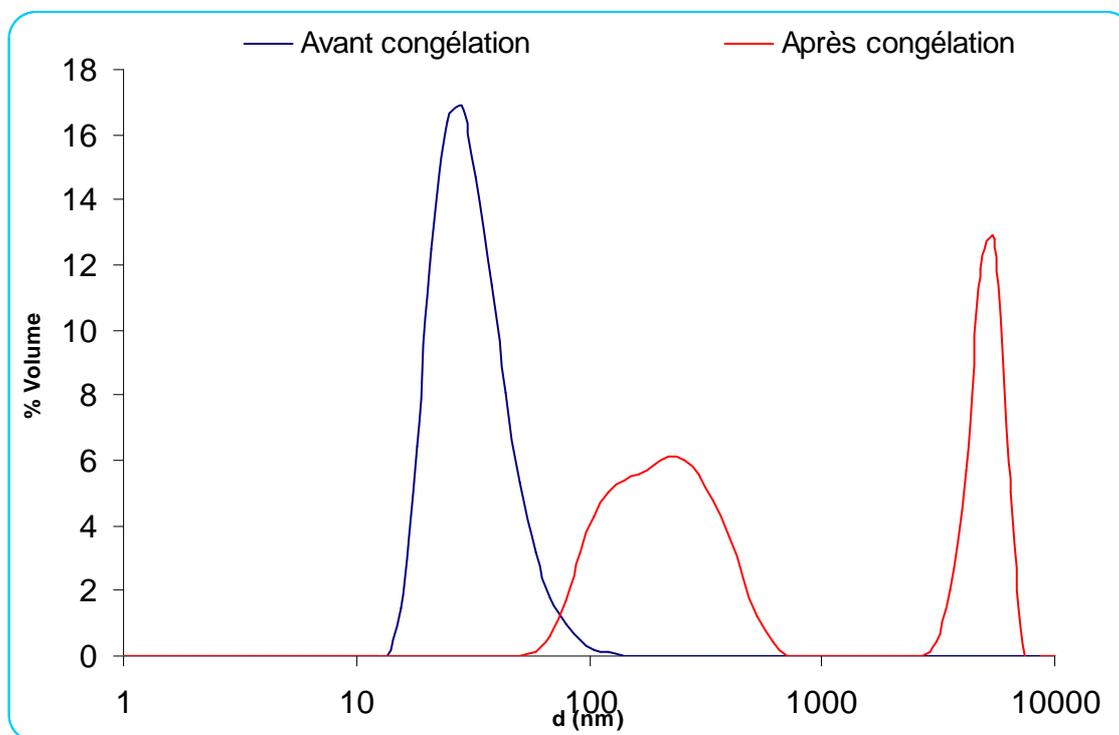


Figure III-11 : Effet de la congélation sur la distribution en taille de nano-émulsions issues de la formulation de référence. L'échantillon ayant subi la congélation a été maintenu à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 12 heures avant d'être lentement ramené à température ambiante en vue de la mesure par diffusion quasi-élastique de la lumière.

En conclusion, il semble donc que ce soit le très faible diamètre des nano-émulsions (35 nm) qui perturbe le changement d'état de la phase dispersée. La nano-structuration entraîne en effet un phénomène de surfusion au niveau des globules [85]. La congélation de ceux-ci engendre leur déstabilisation et une augmentation de la taille moyenne, ce qui explique que l'on retrouve dans ce cas la transition de phase de la Suppocire<sup>®</sup> NC.

#### III.3.3. Stabilité et évolution dans le temps

Aucune opacification des solutions de nano-émulsions n'est observée au cours de leur conservation à température ambiante jusqu'à au moins 18 mois. Cela indique l'absence de vieillissement colloïdal, puisque la formation d'une faible proportion de globules de tailles supérieures à 100 nm suffirait à troubler les solutions. Cette observation visuelle est

confirmée lorsque l'on compare les spectres de distribution en taille d'une nano-émulsion réalisés juste après l'émulsification et après plus de 18 mois de stockage (à température ambiante, soit environ 20°C, et à l'abri de la lumière). Aucune différence significative n'est observée (Figure III-12).

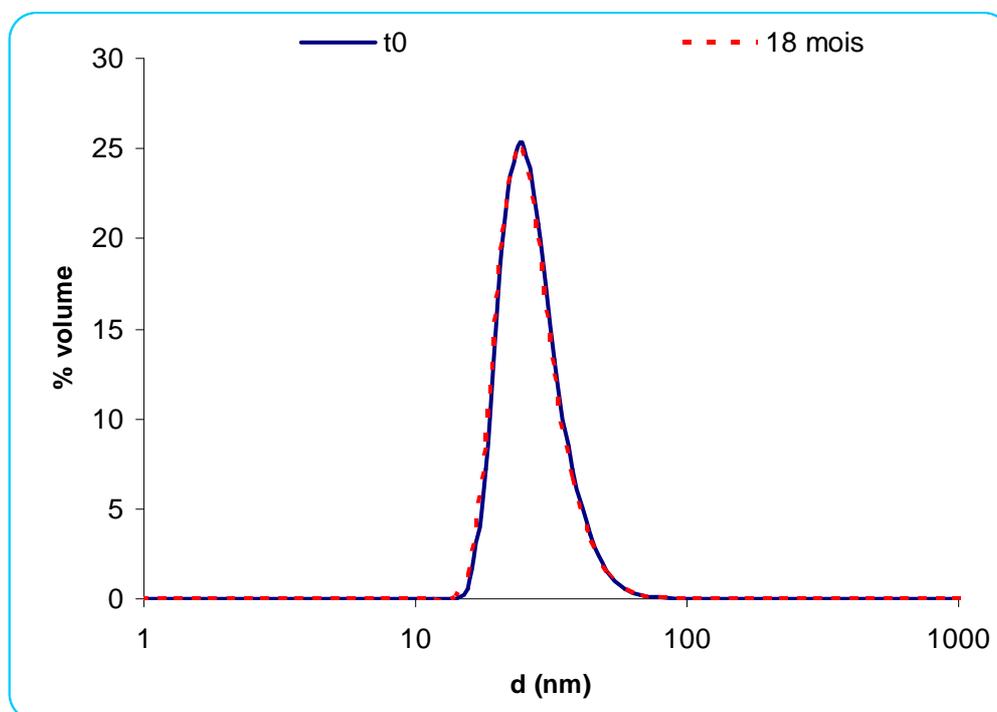


Figure III-12 : Distribution en taille de nano-émulsions issues de la formulation de référence après fabrication et après 18 mois de conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière.

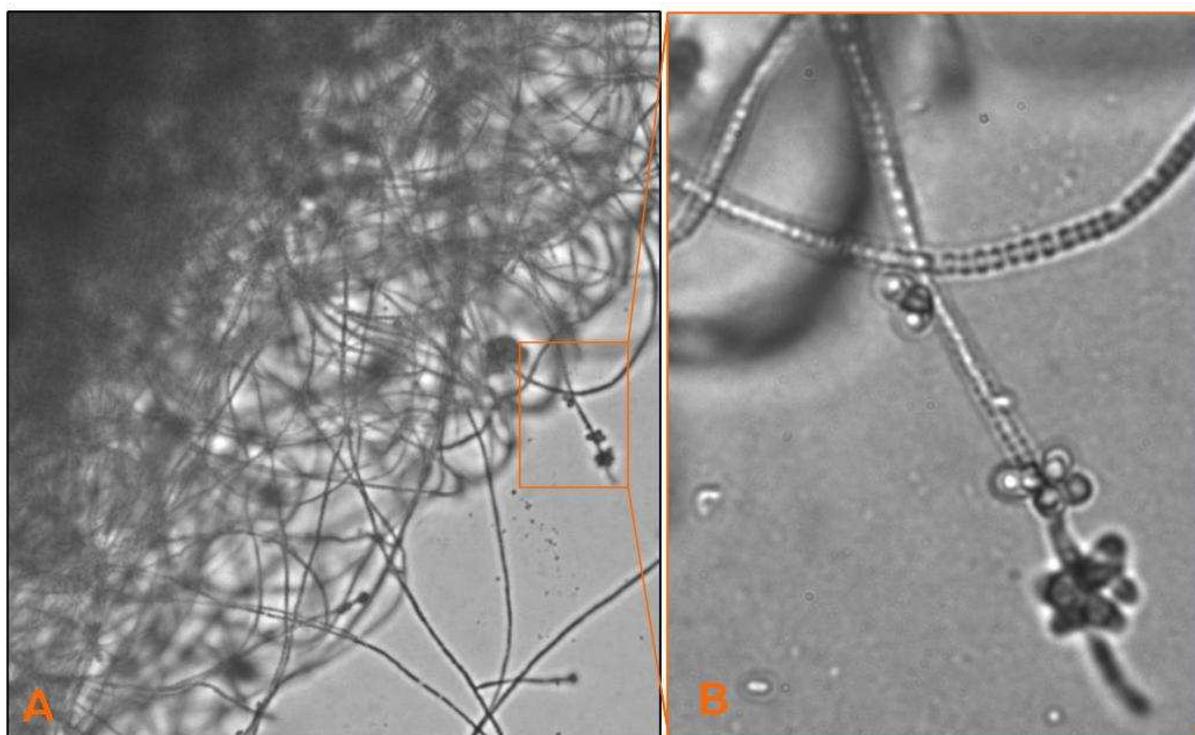
La formulation de référence est ainsi très stable dans le temps, tant au niveau de la taille des globules que du potentiel zêta qui n'évolue pas avec le temps.

Cependant, même si la grande majorité des échantillons ne semble pas évoluer avec le temps, certains d'entre eux ont été déstabilisés.

La première instabilité constatée est de type physico-chimique : au bout d'un temps relativement long, une année environ, des grains blancs se forment dans certaines solutions. La présence de ces particules est systématiquement accompagnée d'un pH acide d'environ 3. Les solutions n'étant pas acides après émulsification, elles se sont donc acidifiées au cours du temps. La diminution du pH peut être au moins en partie reliée au phénomène d'oxydation des acides gras et notamment des acides gras insaturés et polyinsaturés. En effet, l'apparition de diverses molécules acides lors d'études sur la stabilité d'émulsions micrométriques est décrite dans la littérature [86, 87]. De plus, l'acidification des solutions a également été observée dans le cadre d'une étude sur la stabilité de la fluorescence (voir Chapitre IV). Cette

expérience a permis de constater que l'apparition des grains blancs est beaucoup plus rapide dans le cas des solutions dont le pH a été fortement abaissé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique. La formation des particules blanches est donc bien une conséquence de la diminution du pH.

La seconde instabilité constatée est de type biologique. Certaines solutions s'opacifient localement à cause du développement d'un microorganisme qui apparaît sous la forme de fibres enchevêtrées (Figure III-13). L'observation microscopique permet également de visualiser quelques globules dont le diamètre est proche de 500 nm. Le développement du microorganisme (probablement une moisissure) entraîne donc une déstabilisation des globules. Il est probable que pour s'assurer un apport en lipides, les microorganismes libèrent dans la solution des enzymes de type lipases qui vont dégrader les triglycérides constituant les nano-émulsions. Les produits issus de la réaction enzymatique sont plus solubles dans l'eau ; ils favorisent donc le mûrissement d'Ostwald, et par conséquent l'apparition de globules de tailles plus importantes.



**Figure III-13 : Observation microscopique du microorganisme se développant dans les échantillons de nano-émulsions. A : grossissement  $\times 20$  / B : grossissement  $\times 100$ .**

En conclusion, afin d'augmenter la stabilité des nano-émulsions, il peut être utile d'utiliser une solution tampon de manière à limiter l'acidification des solutions lors de l'oxydation des acides gras et/ou de conditionner les solutions sous atmosphère inerte. De

plus, l'utilisation de molécules antioxydantes liposolubles telles que la vitamine E (ou tocophérols) pourrait limiter la dégradation des lipides. Enfin, l'ajout d'antimicrobien dans la phase continue permettrait d'éliminer la croissance de microorganismes responsables de la déstabilisation colloïdale des nano-émulsions, sachant que pour des applications en biologie, il est de toute façon nécessaire de stériliser les solutions de nano-émulsions de manière adaptée (par exemple par filtration). En tenant compte de ces remarques, la stabilité des nano-émulsions pourrait être améliorée, même si elle est d'ores et déjà très satisfaisante puisqu'elle excède une année.

### ***III.4. Variations autour de la formulation dite de référence***

A partir de la formulation de référence de nombreuses autres compositions ont été élaborées. Les formulations présentées dans cette partie ont été conçues pour évaluer l'impact de certains paramètres sur la taille des nano-émulsions. Les paramètres étudiés sont les suivants : la nature du cœur lipophile, la quantité globale de surfactants par rapport à la phase dispersée, le ratio entre les surfactants pegylés et la lécithine, et enfin la nature du surfactant pegylé. Ces formulations ont également été réalisées afin d'évaluer ultérieurement l'effet des modifications apportées vis-à-vis de la biodistribution après injection intraveineuse dans le petit animal (voir Chapitre V).

#### **III.4.1. Nature du cœur lipophile**

Afin de pouvoir étudier l'effet de la modification de la composition du cœur lipophile sur la taille des nano-émulsions, une nouvelle série de formulations différentes a été réalisée : toutes les formulations ont la même quantité de phase dispersée, qui représente 10 % de la masse totale de l'émulsion, mais la nature et les proportions des constituants de cette phase varient (Tableau III-5).

Composition	Huile de soja	Suppocire <sup>®</sup> NC	Huile de lin
A	0	100	10
B	25	75	0
C	50	50	0
D	75	25	0
E	0	75	25
F	0	50	50
G	0	25	75

**Tableau III-5 : Composition des différentes phases dispersées en pourcentage massique.**

Les différentes phases dispersées testées sont composées de Suppocire<sup>®</sup> NC pure, de Suppocire<sup>®</sup> NC et d'huile de soja, et de Suppocire<sup>®</sup> NC et d'huile de lin (Tableau III-5). L'huile de lin est une huile d'origine végétale composée de triglycérides dont les acides gras comportent majoritairement 18 atomes de carbone et sont insaturés (Tableau III-6). Cette huile est nettement plus riche en C18 :3 ( $\omega$  3) que l'huile de soja.

Nature des acides gras	Pourcentage
C16	4,0 à 7,0 %
C16 :1	0,1 %
C18	3,0 à 6,0 %
C18 :1	13,0 à 29,0 %
C18 :2	17,0 à 30,0 %
C18 :3	47,0 à 55,0 %

**Tableau III-6 : Composition de l'huile de lin.**

La quantité de surfactants est identique pour toutes les formulations (0,14 mmol/mL). Cependant, le ratio molaire diffère de celui de la formulation de référence puisque qu'il est de 50 % de lécithine / 50 % de Myrj 53 au lieu de 66,7 % / 33,3 %. Ainsi la lécithine représente 5% de la masse totale et le surfactant pegylé 16,55 %. Ce changement a été effectué afin de diminuer la quantité de lécithine par lot, permettant ainsi de réduire la proportion de Suppocire<sup>®</sup> NC dans la phase dispersée sans engendrer de problème de solubilité pour les formulations pauvres en cire. La formulation comprend également 2,5 % de glycérol afin d'augmenter la viscosité pour faciliter le processus d'émulsification. Enfin, une solution saline (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4) constitue les 65,95 % restants (Tableau III-7).

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Solution A-G	200	10
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	q.s.p 2000	65,9
Surfactants	Lécithine	100	5
	Myrj 53	331	16,6

Tableau III-7 : Composition des formulations testées pour évaluer l'impact de la composition du cœur lipophile sur les nano-émulsions (lot de 2 mL).

L'histogramme suivant (Figure III-14) représente le diamètre moyen des globules obtenus en utilisant le même protocole d'émulsification que pour la formulation de référence, en fonction de la composition de la phase dispersée.

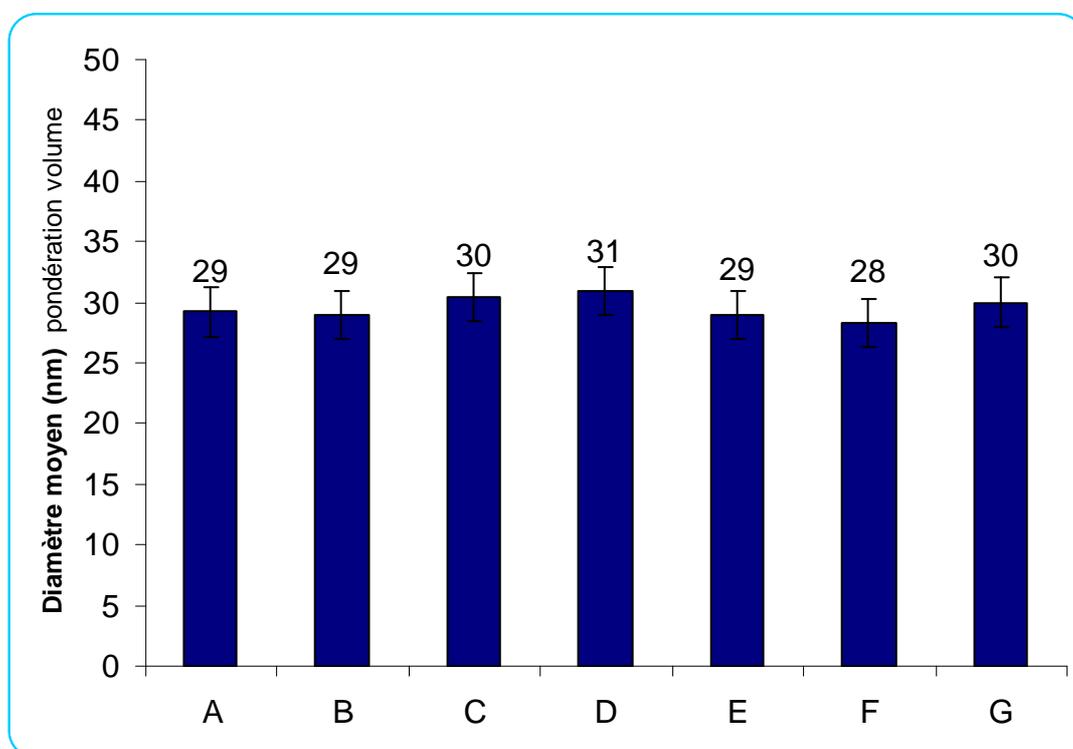


Figure III-14 : Evolution du diamètre moyen en fonction de la composition de la phase dispersée.

Les différences de composition de la phase dispersée n'induisent pas de changement du diamètre moyen des nanoparticules. La taille moyennée des particules pour l'ensemble de ces formulations est de  $29,5 \pm 2,0$  nm. Le potentiel zêta n'évolue pas non plus avec les changements de nature du cœur lipophile effectués, puisqu'il conserve sa valeur de  $-5 \pm 2$  mV pour toutes les formulations testées.

Il est ainsi possible de faire varier la nature de la phase dispersée, et donc ses propriétés de solubilisation, sans influencer le diamètre moyen des particules et sans modifier le potentiel zêta. Il est très intéressant de pouvoir faire varier la composition du cœur lipophile, notamment afin de s'adapter aux propriétés de solubilité de molécules que l'on désirerait encapsuler.

### III.4.2. Quantité totale de surfactants

L'influence de la quantité totale de surfactants par rapport à la phase dispersée a ensuite été explorée.

Pour cela, une série de différentes solutions d'émulsions a été réalisée. Pour toutes les formulations, la phase dispersée représente 10 % de la masse totale et est composée à 75 % de Suppocire<sup>®</sup> NC et à 25 % d'huile de soja. La quantité totale de surfactants est variable, mais les proportions molaires entre les deux composants sont toujours de 66,7 % de lécithine et 33,3 % de Myrj 53. La fraction de glycérol est de 2,5 % de la masse totale pour l'ensemble des formulations. Enfin, le volume de la solution aqueuse (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4) est ajusté pour chaque composition afin que la masse totale des solutions soit identique pour toutes les formulations. Les compositions des différentes formulations sont regroupées dans le Tableau III-8.

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,50
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,50
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	q.s.p 2000	65,9 - 85,7
Surfactants	Lécithine	14 - 168	0,7 - 8,4
	Myrj 53	22 - 264	1,1 - 13,2

**Tableau III-8 : Composition des formulations testées pour évaluer l'impact de la quantité totale de surfactants sur les émulsions (lot de 2 mL).**

La Figure III-15 représente le diamètre moyen pondéré en volume des globules en fonction de la quantité totale de surfactants, exprimée en millimoles par millilitre de solution.

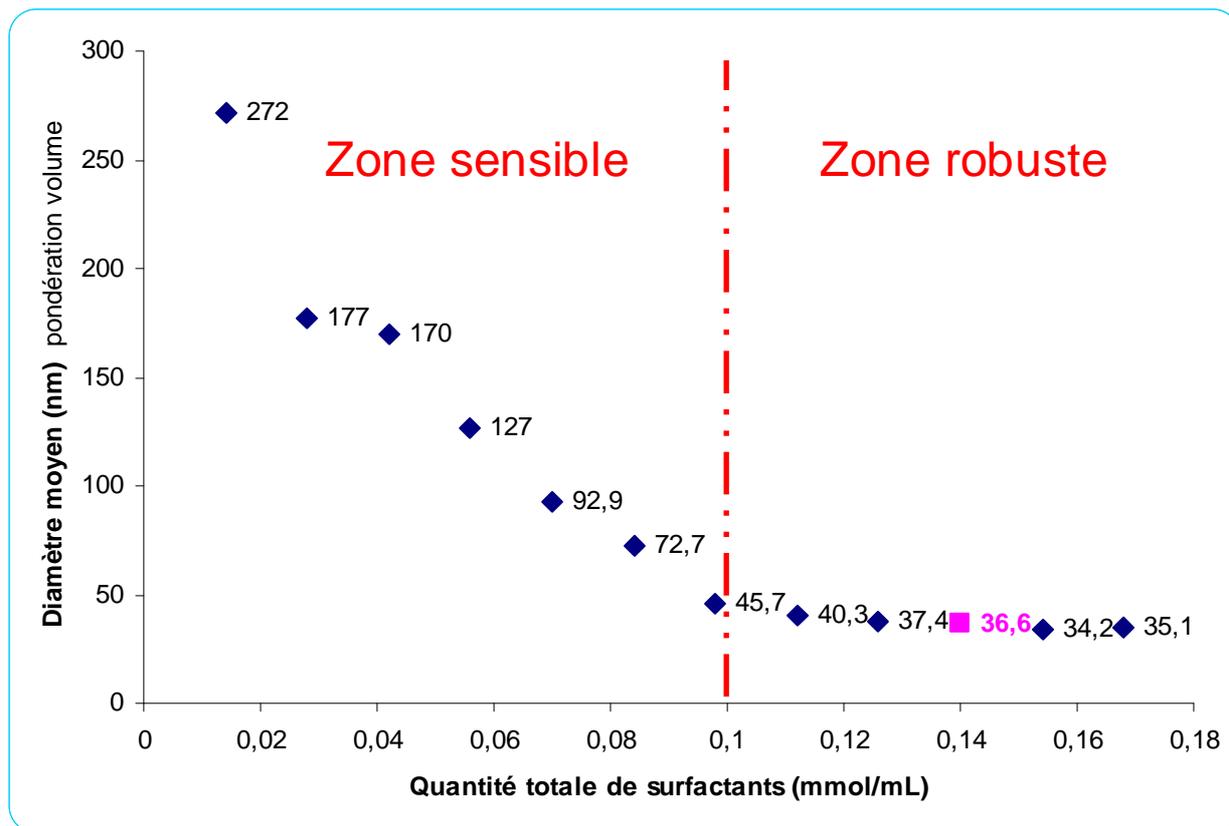


Figure III-15 : Evolution du diamètre en fonction de la quantité totale de surfactants. Le carré rose représente la formulation de référence.

L'influence du ratio surfactants / huile est intuitif : plus il y a de surfactants pour la même quantité de phase huileuse, plus celle-ci peut être finement dispersée. L'analyse du graphique indique cependant qu'il existe deux régimes différents qui sont fonction de la quantité totale de surfactants : une « zone sensible », et une « zone robuste » qui correspond aux formulations riches en surfactants. La limite entre les deux zones pour ces formulations se situe autour de 0,1 mmol / mL de surfactants. Dans la zone sensible, le diamètre des globules évolue fortement avec la quantité de surfactants, ce qui correspond au comportement classique attendu : plus la quantité de surfactants est importante, plus la surface totale de l'interface huile/eau qu'ils peuvent stabiliser est grande et donc plus la taille des globules diminue. Dans la zone robuste en revanche, la diminution du diamètre avec l'augmentation de la quantité de surfactants est très limitée.

Dans le cadre d'applications des nano-émulsions, notamment dans le domaine biologique, il peut être utile de se placer dans les conditions de la zone robuste, dans la mesure où de faibles variations de composition entre deux lots de formulation identiques n'auront pas d'impact sur le diamètre des particules.

La formulation de référence est représentée sur le graphique par le carré rose. Cette composition se situe dans la zone robuste, ce qui explique la grande reproductibilité observée d'un lot à l'autre.

#### III.4.3. Ratio phospholipides / surfactants pegylés

La couche de surfactants stabilisant les globules est constituée d'un mélange de deux surfactants différents : la lécithine et un surfactant pegylé. Les séries d'expériences sur la nature du cœur lipophile (III.4.1) et sur la quantité de surfactants (III.4.2) montrent que pour une même quantité globale de surfactants (0,14 mmol/mL), la taille des globules obtenus est différente : environ 30 nm et 35 nm respectivement. Or, entre ces deux séries de formulations, le ratio phospholipides / surfactant pegylé n'est pas identique, laissant supposer que la composition des surfactants impacte le diamètre des globules. Une série de formulations a donc été élaborée afin d'évaluer l'influence de la proportion respective de ces deux surfactants sur la taille finale des globules de la nano-émulsion. Comme précédemment, la phase dispersée représente 10 % de la masse totale et est composée à 75 % de Suppocire<sup>®</sup> NC et à 25 % d'huile de soja. En revanche, la quantité totale en moles de surfactants est cette fois identique pour toutes les formulations (0,14 mmol/mL), tandis que les proportions entre les deux surfactants varient entre 100 % de lécithine et 100 % de Myrj 53. Leurs masses molaires n'étant pas identiques, la masse totale de surfactants ne sera par contre pas constante d'une solution à l'autre. Le glycérol représente toujours 2,5 % de la masse totale, et le volume de la solution tampon (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4) est ajusté pour chaque composition afin que la masse totale des solutions soit identique pour toutes les formulations. Le Tableau III-9 résume les compositions des différentes formulations étudiées.

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,50
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,50
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	q.s.p 2000	53,3 - 77,2
Surfactants	Lécithine	0 -206	0 -10,3
	Myrj 53	0 - 685	0 - 34,2

**Tableau III-9 : Composition des formulations testées pour évaluer l'impact du rapport entre les phospholipides et les surfactants pegylés sur les nano-émulsions (lot de 2 mL).**

Le Figure III-16 représente le diamètre moyen des émulsions en fonction du pourcentage molaire de surfactants pegylés. La formulation de référence est représentée par un carré rose sur ce graphique.

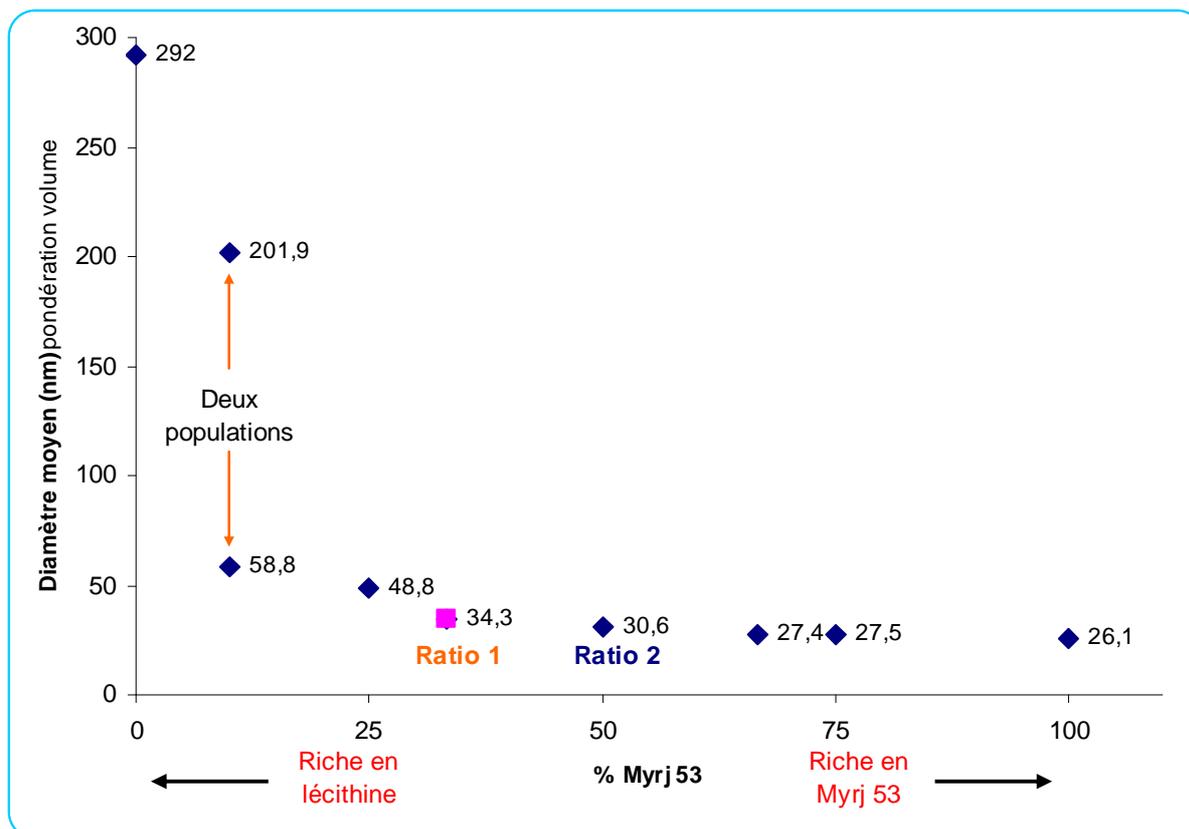


Figure III-16 : Evolution du diamètre moyen des globules en fonction du pourcentage molaire de surfactant pegylé. La formulation de référence est représentée par le carré rose. Les ratios molaires 1 et 2 correspondent respectivement à 66,7 % lécithine / 33,3 % Myrj 53 et 50 % lécithine / 50 % Myrj 53.

L'analyse de ces données indique que le diamètre moyen des globules diminue quand la proportion en surfactants pegylés augmente. Les formulations comportant uniquement de la lécithine ne permettent pas d'obtenir des particules inférieures à 200 nm. A l'inverse, l'ajout de Myrj 53 permet une réduction très efficace de la taille des globules. Ainsi, pour un ratio molaire de 10 % en Myrj 53, il apparaît une population de globules dont le diamètre est de 58,8 nm. Pour un ratio molaire de 25 % en Myrj 53, le diamètre des globules est déjà descendu en dessous de 50 nm. L'augmentation du pourcentage de surfactants pegylés permet de réduire encore la taille des particules mais la diminution est alors nettement moins prononcée. A partir d'un ratio molaire de 66,7 %, l'augmentation de la quantité de Myrj 53 n'a que très peu d'effet sur le diamètre.

S'il est impossible d'obtenir des nano-émulsions en employant uniquement de la lécithine, il est en revanche possible d'obtenir des globules de moins de 30 nm de diamètre en utilisant exclusivement le surfactant pegylé.

La combinaison de toutes les données obtenues pour les formulations à base de lécithine et de Myrj 53 permet de tracer le graphique représenté Figure III-17. Pour toutes les formulations, la phase dispersée (composée à 75 % de Suppocire® NC et à 25 % d'huile de soja) représente 10 % de la masse totale de la solution.

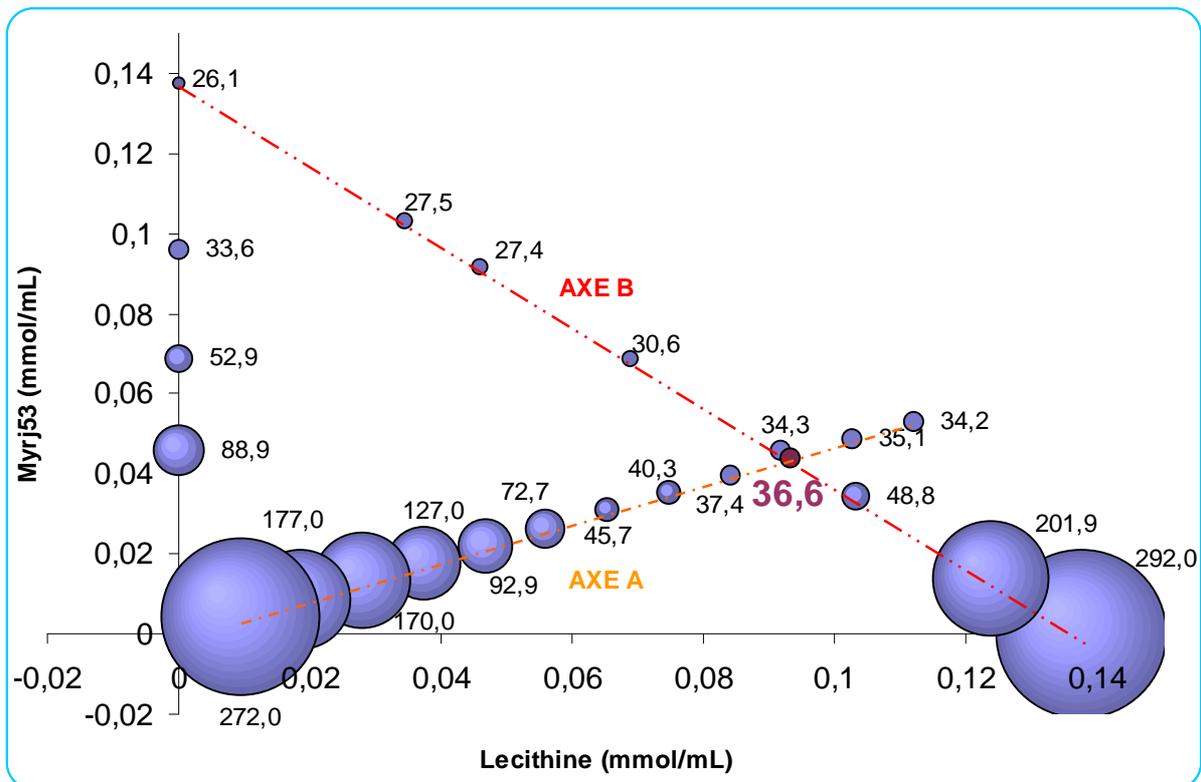


Figure III-17 : Evolution du diamètre en fonction de la quantité de lécithine et de Myrj 53. La taille des particules est représentée sous la forme d'un disque dont le diamètre est proportionnel au diamètre moyen pondéré en volume des globules (dont la valeur est indiquée à proximité des disques). La formulation de référence est représentée par le disque violet.

Ce graphique permet de représenter à la fois l'influence de la quantité totale de surfactants lorsque le ratio molaire lécithine/Myrj 53 66,7 : 33,3 est conservé (AXE A), l'impact du ratio lécithine/Myrj pour une quantité globale de surfactant fixée (AXE B), et enfin le diamètre des globules en présence de surfactant pegylé uniquement (axe des ordonnées).

Ce graphique illustre la « souplesse » de la formulation qui peut ainsi être adaptée en fonction de la taille moyenne souhaitée. Il met également en évidence l'importance du

surfactant pegylé dans la réduction du diamètre des particules. En effet, si la lécithine est utilisée seule, ou avec une faible quantité de surfactants pegylés (axe des abscisses), la taille des globules ne diminue pas significativement malgré une quantité de surfactants importante. A l'inverse, en présence du surfactant pegylé uniquement (axe des ordonnées), une réduction importante du diamètre est observée avec des concentrations très faibles.

La capacité des surfactants pegylés à réduire la taille des globules peut être liée à leur structure. En effet, leurs longues chaînes polyoxyéthylène forment une tête hydrophile de taille très importante, beaucoup plus que celle des phospholipides. Cela induit un rayon de courbure de l'interface huile/eau plus grand et favorise donc les globules dont le rayon de courbure est le plus élevé, soit ceux de faibles diamètres.

### III.4.4. Longueur et structure des chaînes pegylées

Nous avons vu dans le paragraphe précédent l'importance du surfactant pegylé sur le contrôle de la taille des globules, mais jusqu'à présent toutes les formulations testées contenaient le même type de surfactant pegylé : le Myrj 53.

Un nouveau paramètre a donc été testé : il s'agit de la nature des surfactants pegylés, avec d'une part la longueur des chaînes polyoxyéthylène, et d'autre part la structure de ces chaînes qui peuvent être ramifiées ou linéaires. Les surfactants pegylés utilisés pour cette étude sont des stéarates de polyoxyéthylène (Myrj 49 ; Myrj 53 ; Myrj 59) à chaîne linéaire et le monooléate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 80) dont la chaîne est ramifiée. Les structures et les propriétés physiques de ces surfactants sont respectivement rappelées Figure III-18 et Tableau III-10.

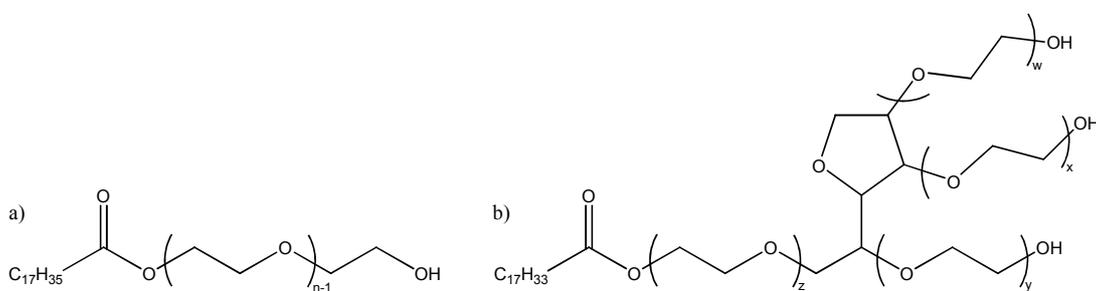


Figure III-18 : Structures des surfactants pegylés. a) Stéarate de polyoxyéthylène (avec  $n = 20$  ;  $50$  ;  $100$ ) ; b) Tween 80 (avec  $w+x+y+z=20$ ).

### Chapitre III : Nouvelles formulations de nano-émulsions

Surfactant pegylé	Nombre de motifs POE	Poids moléculaire (g/mol)	Masse (mg) pour un lot de 2 mL	% w/w
Tween 80	20	1310	180	9
Myrj 49	20	1164	160	8
Myrj 53	50	2484	331	16,6
Myrj 59	100	4684	644 (322)	32,2 (16,1)

**Tableau III–10 : Masses molaires et nombre de motifs des surfactants pegylés.**

Plusieurs formulations employant ces différents surfactants pegylés ont ainsi été préparées (voir Tableau III–12 et Tableau III–10). Ces formulations sont basées sur celles utilisées lors de l'étude de l'impact du ratio lécithine / surfactant pegylé, et plus particulièrement sur les formulations dites « Ratio 1 » et « Ratio 2 » (III.4.3). En effet, afin d'évaluer l'impact de la structure des surfactants pegylés et de mettre en évidence un éventuel effet de la concentration, deux ratios molaires sont étudiés : 66,7 % de lécithine / 33,3 % de surfactant pegylé (Ratio 1) et 50 % de lécithine / 50 % de surfactant pegylé (Ratio 2).

Les solutions contiennent 10 % en masse de phase dispersée composée à 75 % de Suppocire<sup>®</sup> NC et à 25 % d'huile de soja. La quantité molaire de surfactants est identique pour toutes les formulations (0,14 mmol/mL), avec soit un ratio molaire de 66,7 % de lécithine / 33,3 % de surfactant pegylé (Ratio 1), soit un ratio molaire de 50 % de lécithine / 50 % de surfactant pegylé (Ratio 2). Toutes les formulations comprennent également 2,5 % de glycérol, toujours dans le but d'augmenter la viscosité pour faciliter le processus d'émulsification. Enfin, le volume de solution tampon (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4) est ajusté pour chaque composition, afin que la masse totale des solutions soit identique pour toutes les formulations.

La masse molaire du Myrj 59 est élevée ; par conséquent, la quantité de surfactant pegylé nécessaire est également très grande puisqu'elle va représenter plus de 20 % ou plus de 30 % de la solution selon le ratio considéré. Cela va induire une viscosité trop importante et perturber le processus d'émulsification. C'est pourquoi, pour les solutions à base de Myrj 59, une concentration deux fois plus faible en phase dispersée (5 %) a été utilisée. Les quantités de surfactant nécessaires ont été adaptées en conséquence. Les valeurs utilisées pour ces solutions « diluées » sont indiquées entre parenthèses dans les Tableau III–11 et Tableau III–12.

**Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo***

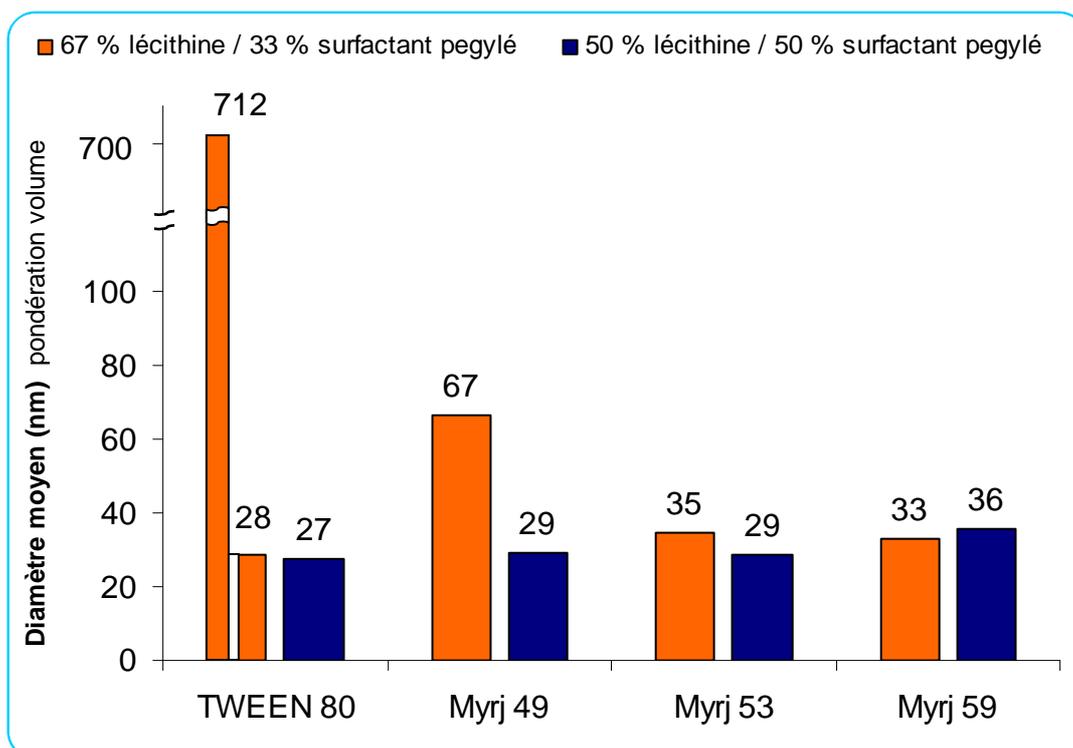
Surfactant pegylé	Ratio 1		Ratio 2	
	Masse (mg) pour un lot de 2 mL	% w/w	Masse (mg) pour un lot de 2 mL	% w/w
Tween 80	120	6,0	180	9,0
Myrj 49	107	5,4	160	8,0
Myrj 53	228	11,4	331	16,6
Myrj 59	431 (215)	21,5 (10,8)	644 (322)	32,2 (16,1)

**Tableau III-11 : Quantité massique des surfactants pegylés. Ratio 1 : 66,7% lécithine / 33,3% surfactant pegylé ; Ratio 2 : 50% lécithine / 50% surfactant pegylé.**

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Huile de soja	50 (25)	2,50 (1,25)
	Suppocire® NC	150 (75)	7,50 (3,75)
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	1384	65,9 - 73,9
Surfactants	Lécithine	Ratio 1	138 (69)
		Ratio 2	100 (50)
	Surfactant pegylé	107 - 331	5,4 - 16,6

**Tableau III-12 : Composition des formulations testées (lot de 2 mL).**

La Figure III-19 représente le diamètre moyen des globules en fonction du ratio Lécithine / Myrj et de la nature du surfactant pegylé.



**Figure III-19 : Evolution du diamètre moyen en fonction de la nature du surfactant pegylé. Ratio 1 : 66,7% lécithine / 33,3% surfactant pegylé ; Ratio 2 : 50% lécithine / 50% surfactant pegylé. La solution réalisée avec le tween 80 et le ratio 1 est composée de deux populations distinctes de globules, l'une autour de 28 nm de diamètre et l'autre à plus de 700 nm de diamètre.**

Les résultats montrent que pour les concentrations en surfactants pegylés importantes (Ratio 2), la structure de la chaîne polyoxyéthylène a peu d'influence sur le diamètre des globules. En effet, il n'y a pas d'écart significatif entre les solutions contenant le Tween 80, le Myrj 49 et le Myrj 53, les globules stabilisés par le Myrj 59 étant quant à eux très légèrement plus gros.

Néanmoins, dans le cas où la concentration en surfactants pegylés est plus faible (Ratio 1), la structure semble avoir une importance plus importante sur le diamètre des globules. Il apparaît effectivement que pour un même nombre de motifs polyoxyéthylène, une structuration ramifiée (Tween 80) conduise à deux populations de globules, l'une avec un diamètre d'environ 28 nm et l'autre largement plus grande (712 nm de diamètre). Pour une chaîne linéaire (Myrj 49) en revanche, une seule population avec un diamètre autour de 67 nm est observée.

Ces résultats illustrent le rôle essentiel des chaînes polyoxyéthylène dans le contrôle du diamètre des globules. Cette influence est liée à la quantité de surfactants pegylés mais également à leurs structures.

### **III.5. Conclusions**

La problématique était de concevoir des nanoparticules organiques biocompatibles furtives et stables. Nous avons ainsi développé des nano-émulsions de type huile dans eau de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, dont la phase dispersée est composée d'un mélange d'huile de soja et de Suppocire<sup>®</sup> NC, les globules étant stabilisés par l'association de lécithine et de surfactants pegylés.

La solubilisation de la lécithine dans la phase dispersée grâce à l'utilisation de la Suppocire<sup>®</sup> NC permet de grandement faciliter la production de formulations riches en surfactants, et simplifie ainsi l'obtention de particules dont le diamètre est inférieur à 100 nm par rapport à ce qui était proposé précédemment dans la littérature. La technique de fabrication permet ainsi de pouvoir facilement et rapidement obtenir des nano-émulsions de

taille contrôlée. De plus, la formulation est suffisamment souple pour permettre de modifier certains paramètres tels que la composition de la phase dispersée, la nature du surfactant pegylé ou la taille des particules (voir Figure III-17).

La taille des nano-émulsions est un paramètre clé à maîtriser car elle impacte non seulement les propriétés de circulation dans le système sanguin, mais également les possibilités de stérilisation des solutions et leur stabilité colloïdale. En effet, la littérature indique que les globules de faibles diamètres échappent plus facilement à la capture par les macrophages que les particules submicrométriques [64]. Or les nano-émulsions issues de la formulation de référence ont un diamètre de 35 nm. La faible taille des globules permet une stérilisation des solutions par filtration, méthode moins « agressive » que les techniques de stérilisation par la chaleur couramment employées. Enfin les particules sont suffisamment petites pour s'affranchir des phénomènes de déstabilisation colloïdale réversibles que sont le crémage et la sédimentation.

Les nano-émulsions développées sont d'une grande stabilité puisque qu'on ne mesure aucune variation de la taille ou du potentiel zêta, même après plus de dix-huit mois de conservation à température ambiante. C'est le choix des surfactants et surtout l'utilisation de surfactants pegylés qui vont générer une barrière stérique autour des globules qui permet de prévenir leur coalescence. En effet, la stabilité des globules vis-à-vis des phénomènes de floculation et de coalescence n'est pas due aux forces de répulsions électrostatiques comme dans d'autres cas rapportés dans la littérature puisque les nano-émulsions présentent un potentiel zêta proche de la neutralité. Cette stabilité est liée à la formation par les chaînes polyoxyéthylène des surfactants pegylés d'une couche de répulsion stérique suffisamment dense pour prévenir la fusion des gouttelettes. Les caractéristiques des globules sont d'ailleurs très sensibles à la concentration en surfactants pegylés et, quand ceux-ci sont présents en faible quantité, à leur structure.

Toutefois, le principal facteur de vieillissement rapporté dans la littérature pour les émulsions nanométriques est le mûrissement d'Ostwald. Nous n'avons cependant pas observé d'évolution dans la distribution en taille des particules. Les formulations choisies permettent donc de réduire ce phénomène grâce à la faible solubilité dans l'eau de l'huile de soja, conférant ainsi aux nano-émulsions une stabilité très importante.

La désignation de ces nanoparticules sous le terme de nano-émulsions peut paraître injustifiée. On observe effectivement sur les clichés de CryoTEM que les nanoparticules lipidiques ont une forme en plaquette qui est couramment observée pour les SLN. De plus

l'utilisation de la Suppocire<sup>®</sup> NC, une huile cristalisable solide à température ambiante mais pas à la température de l'être humain, laisse penser que le cœur des nanoparticules est solide. Néanmoins les études par calorimétrie différentielle à balayage montrent que le cœur des nanoparticules n'est pas solide, mais liquide, cela est sans doute dû à un retard à la cristallisation. Ainsi les nanoparticules que nous avons développées ne peuvent pas être classées parmi les SLN, elles se situent plus vraisemblablement à l'interface entre les nano-émulsions à cœur liquides et les SLN à cœur solide. Le terme de nano-émulsions pouvant englober les deux définitions c'est celui que nous avons utilisé pour désigner ces objets.

Même si dans ce chapitre la furtivité réelle des nano-émulsions n'a pas été évaluée (voir Chapitre V), l'importante stabilité des particules, malgré la faible valeur absolue du potentiel zêta associée à la forte densité de la « couche » de chaînes polyoxyéthylène, est de bon augure en ce qui concerne la furtivité *in vivo* de ces nanoparticules.

D'autre part, tous les constituants des nano-émulsions sont reconnus comme inoffensifs par la FDA. Cependant, le fait qu'ils soient structurés sous forme de nanoparticules est susceptible d'engendrer une certaine toxicité comme cela a pu être observé pour des nanomatériaux inorganiques. Il est évident qu'une étude complète de toxicité est indispensable avant de pouvoir réellement statuer sur l'innocuité de ces nano-émulsions. Nous pouvons malgré tout supposer que leur toxicité sera relativement faible, notamment du fait des grandes similitudes de structure existant entre ces particules et celles naturellement en circulation dans les organismes vivants (chylomicrons et lipoprotéines). De plus, le fait que des microorganismes aient pu se développer, voire assimiler les lipides constituant les nano-émulsions apparaît comme positif vis-à-vis de leur biocompatibilité.

Ainsi les nanoparticules organiques développées sont stables, biocompatibles et, nous l'espérons, furtives. Toutes les raisons énoncées ici font donc des nano-émulsions des particules de choix pour transporter *in vivo* des molécules d'intérêt, et notamment des fluorophores pour l'imagerie optique.



**Chapitre IV :**  
***Nano émulsions***  
***fluorescentes***

Le chapitre II a permis d'illustrer les avantages de l'imagerie de fluorescence *in vivo* dans le domaine du proche infrarouge en termes de sensibilité, de contraintes de manipulation, de rapidité d'acquisition, et de coût de fonctionnement, par rapport aux autres techniques d'imagerie moléculaire. Cependant, s'il existe de nombreuses molécules organiques utilisables en tant qu'agent de contraste pour ces types d'imagerie, les traceurs de type nanoparticules sont rares, à l'exception principale des nano-cristaux semi-conducteurs de type « Quantum dots » (ou boîtes quantiques en français) dont la composition soulève néanmoins de nombreuses interrogations liées à leur toxicité potentielle [88, 89]. Pourtant, l'utilisation de nanoparticules permettrait de disposer plus facilement de traceurs plus performants et plus modulables que les fluorophores organiques.

Les nanoparticules décrites dans le chapitre III sont des nano-émulsions d'huile naturelle dans l'eau, stabilisées par de la lécithine et des surfactants pegylés, dont les globules ont un diamètre moyen de 35 nm. Leur facilité de production, leur stabilité, leurs propriétés physiques et leur composition biocompatible font de ces systèmes des candidats pertinents pour le développement de nouveaux traceurs. Cependant, pour être utilisables en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*, les nano-émulsions doivent avoir des propriétés d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge. Or les constituants des nano-émulsions n'ont aucune propriété optique satisfaisante de ce point de vue ; il convient donc de les doper avec des molécules fluorescentes.

Ce chapitre est donc consacré au dopage des nano-émulsions par des fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge, et à l'étude des propriétés optiques de ces nanoparticules fluorescentes. Dans un premier temps, le choix de la localisation des molécules fluorescentes au sein des nano-émulsions, ainsi que le choix des fluorophores seront discutés. Ensuite, le protocole général de dopage, son efficacité et son impact sur les propriétés physiques des nano-émulsions seront détaillés. Les propriétés optiques de ces nanoparticules fluorescentes, telles que les spectres d'absorption et d'émission, le rendement quantique, la durée de vie de fluorescence, et le photoblanchiment seront étudiés. Pour finir, la stabilité du dopage en fluorophore des nano-émulsions sera présentée.

## IV.1. Localisation du fluorophore au sein des nanoparticules

Le dopage des nano-émulsions implique de déterminer au préalable la zone d'incorporation des molécules fluorescentes. Etant donnée la structure des globules, trois localisations différentes sont envisageables pour accueillir les fluorophores (Figure IV-1):

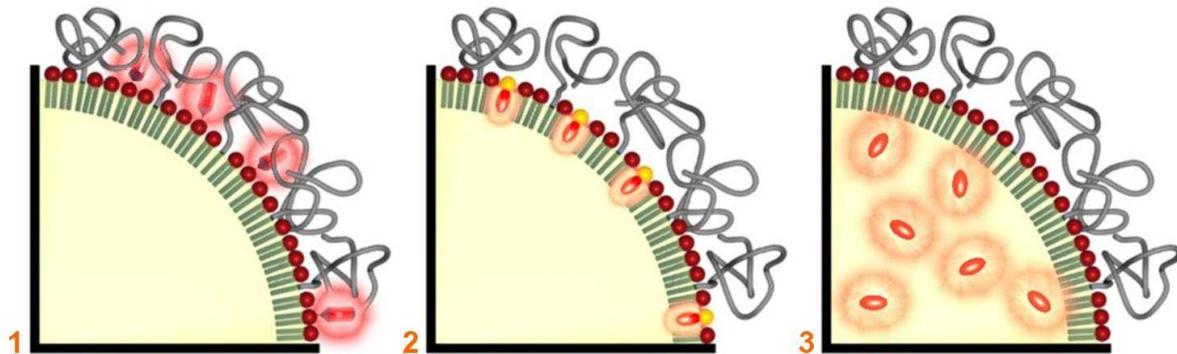


Figure IV-1 : Localisations envisageables des fluorophores :

- 1 : Le fluorophore est à l'extérieur du globule, lié de façon covalente à un surfactant, ou juste adsorbé sur la couche de surfactants.
- 2 : Le fluorophore fait partie intégrante de la couche de surfactants.
- 3 : Le fluorophore est situé dans le cœur lipophile du globule.

Chacun des trois cas implique que les fluorophores possèdent des propriétés physico-chimiques et donc des structures adaptées à la localisation prévue : ils doivent être hydrophiles pour la localisation en surface, amphiphiles pour prendre place dans la couche de surfactants, et lipophiles pour rester dans le compartiment huileux. Ainsi une même molécule ne peut pas occuper les trois localisations en même temps de façon durable.

Le Tableau IV-1 résume les avantages et les inconvénients attendus en fonction du type d'incorporation, pour cinq paramètres importants : l'étape d'incorporation (flexibilité de l'étape de dopage au cours du processus de fabrication); le choix des molécules fluorescentes (nombre de molécules commerciales candidates); l'impact sur les propriétés de surface (telle que la modification du potentiel zêta ou l'altération de la furtivité) ; la stabilité physique du dopage (diffusion du fluorophore dans le milieu continu); et la stabilité chimique (dégradation chimique ou extinction de la fluorescence par des molécules du milieu continu par exemple).

**Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo***

Critère évalué	Localisation des fluorophores		
	Surface	Interface	Cœur
<b>Etape d'incorporation</b>	Incorporation lors de l'émulsification ou fonctionnalisation post-émulsification <b>+++</b>	Incorporation lors de l'émulsification, possibilité d'incorporation post-émulsification <b>+</b> <b>-</b>	Incorporation lors de l'émulsification <b>+</b> <b>-</b>
<b>Choix des molécules</b>	Grand choix de molécules fluorescentes hydrophiles greffables <b>+++</b>	Peu de molécules ont de bonnes propriétés optiques et surfactantes <b>---</b>	Choix restreint <b>-</b>
<b>Impact sur les propriétés de surface</b>	L'exposition des fluorophores à la surface peut diminuer la furtivité <b>---</b>	Impact faible car la partie hydrophile devrait être masquée par la couche de PEG <b>+</b> <b>-</b>	Pas d'impact sur la surface <b>+++</b>
<b>Stabilité physique</b>	La molécule est susceptible de se désolidariser de la nano-émulsion <b>---</b>	Molécule amphiphile donc soluble en milieu aqueux (au moins faiblement) <b>-</b>	Une molécule lipophile a peu de probabilité de passer en phase aqueuse <b>+++</b>
<b>Stabilité Chimique</b>	Très sensible au milieu extérieur <b>-</b>	Peu sensible au milieu extérieur <b>+</b>	Très peu sensible au milieu extérieur <b>+++</b>

**- : Inconvénient**

**+ : Avantage**

**Tableau IV-1 : Avantages et inconvénients des trois localisations envisageables.**

Le principal avantage de l'incorporation du fluorophore au niveau de la surface est le nombre important de molécules hydrophiles greffables disponibles commercialement. Cependant, ce type de localisation expose fortement le fluorophore au milieu extérieur, ce qui peut entraîner des modifications rapides et irréversibles des propriétés optiques en fonction du milieu continu. En outre, les échanges constants de surfactants entre la membrane et le milieu continu sont problématiques car la présence de molécules fluorescentes libres en solution va perturber l'interprétation du signal de fluorescence associé à la nanoparticule.

L'encapsulation des molécules fluorescentes dans le cœur des globules permet quant à elle de les isoler du milieu extérieur, et donc de protéger leurs propriétés optiques tout en ne modifiant pas la surface des nano-émulsions. Cependant le dopage des globules après émulsification est difficilement envisageable, ce qui impose de le réaliser durant la production des nano-émulsions.

Enfin, l'incorporation des molécules fluorescentes au sein de la membrane de surfactants offre peu d'avantages par rapport à une encapsulation dans le cœur, et peu de molécules commerciales ont de plus les propriétés amphiphiles recherchées.

Parmi les objectifs définis lors de la conception des nano-émulsions, la stabilité dans le temps ainsi que la facilité d'industrialisation ont été identifiées comme primordiales. C'est pourquoi il a été choisi de localiser le fluorophore au niveau du cœur lipophile, puisque cette localisation propose l'encapsulation la plus stable et la moins sensible au milieu extérieur. Ce choix impose cependant de trouver des molécules lipophiles absorbant et émettant dans le proche infrarouge.

## ***IV.2. Choix des fluorophores***

### **IV.2.1. Structure générale de fluorophores compatibles avec l'imagerie de fluorescence in vivo**

Il existe différents types de fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge qui peuvent dès lors être compatibles avec l'imagerie de fluorescence : on peut citer les oxazines [90-92], les borondipyromethenes (Bodipy®) [93, 94], les squaraines [95], et dans une moindre mesure les bactériochlorines [96-98], mais la grande majorité des fluorophores dans ce domaine de longueur d'onde fait partie de la classe des cyanines [99] (Figure IV-2).

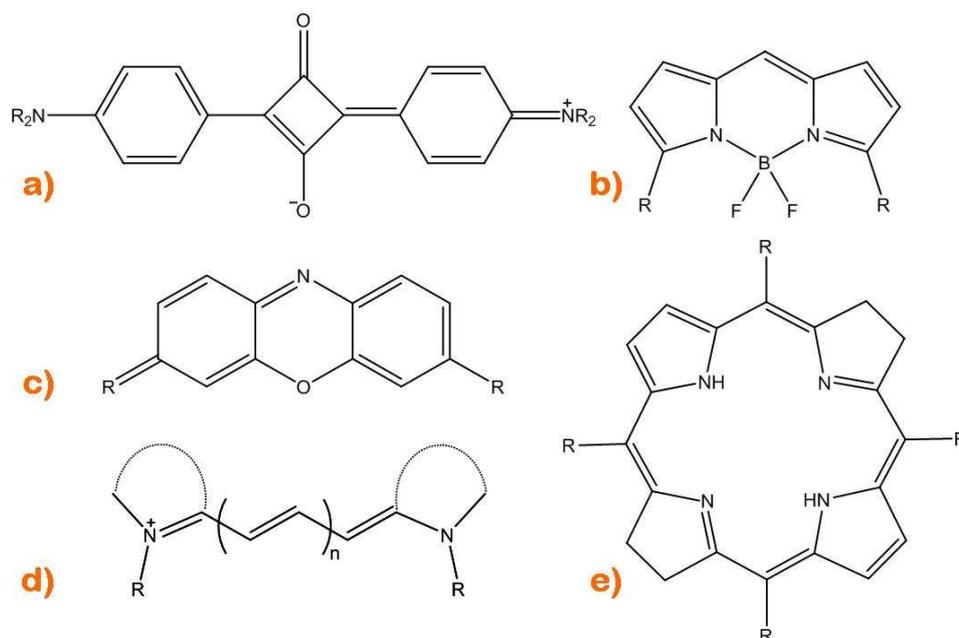


Figure IV-2 : Structures générales de fluorophores pouvant émettre et absorber dans le proche infrarouge : a) squaraines ; b) borondipyrométhènes ; c) oxazines ; d) cyanines ; e) bactériochlorines.

Les bactériochlorines sont trop faiblement fluorescentes dans le proche infrarouge. La présence d'un cycle cyclobutène hautement réactif rend les squaraines chimiquement peu stables. Ces deux types de molécules n'ont donc pas été testés. Les trois autres structures sont envisageables pour le dopage des nano-émulsions. Ainsi des essais d'encapsulation ont été réalisés avec l'oxazine 750 ( $\lambda_{abs}^{max} \approx 665 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{fluo}^{max} \approx 700 \text{ nm}$  (méthanol))<sup>1</sup> et un boron dipyrométhène, le Bodipy® 665/676 ( $\lambda_{abs}^{max} \approx 665 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{fluo}^{max} \approx 676 \text{ nm}$  (méthanol)), dont les structures sont représentées à la Figure IV-3. Cependant, il est apparu que l'oxazine diffuse rapidement vers le milieu continu, et que le Bodipy® 665/676 n'est pas chimiquement stable dans les nano-émulsions, où il se dégrade rapidement et perd ses propriétés de fluorescence. L'étude de leur encapsulation a donc été stoppée et seules les études réalisées avec les cyanines, présentées au paragraphe suivant, ont été poursuivies.

<sup>1</sup> Les notations  $\lambda_{abs}^{max}$  et  $\lambda_{fluo}^{max}$  correspondent respectivement aux longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption et l'émission du fluorophore sont maximales.

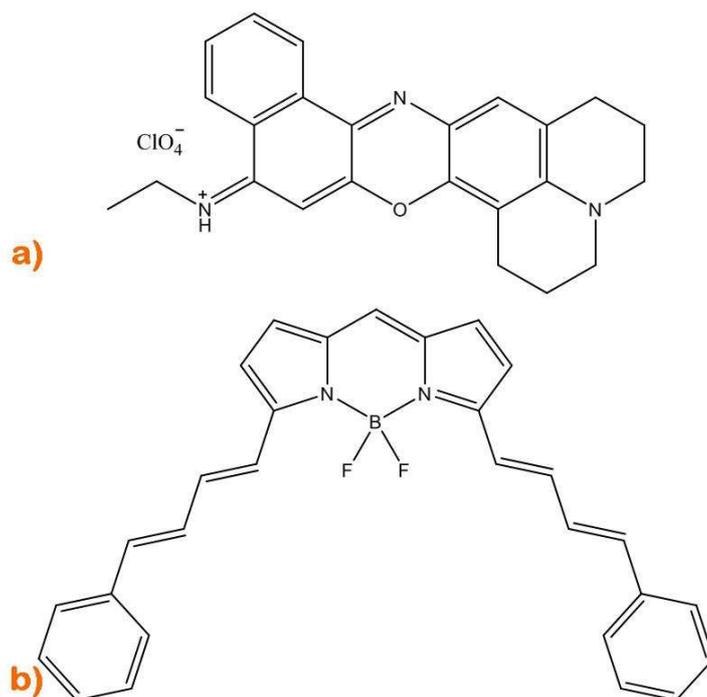


Figure IV-3 : Structures des fluorophores testés : a) Oxazine 750 ; b) Bodipy® 665/676.

## IV.2.2. Cyanines

Les cyanines sont des chromophores synthétiques ayant de très bonnes propriétés optiques. Leur structure de base se compose de deux atomes d'azote, jouant le rôle de donneur ou d'accepteur d'électrons, reliés par une chaîne conjuguée de longueur variable (Figure IV-2). Les atomes d'azote font généralement partie d'hétérocycles et notamment de noyaux indoliques. Ces molécules sont couramment utilisées dans certaines applications biologiques (tel le marquage de protéines ou d'acides nucléiques) et dans l'industrie (la couche chimique des disques compacts enregistrables (CD-R) est en effet à base de cyanines).

S'il existe de nombreuses cyanines commerciales, les fabricants ne précisent que rarement les structures et les propriétés physico-chimiques de leurs molécules. Il faut néanmoins préciser qu'étant donné que ces fluorophores sont principalement utilisés en biologie, leur solubilité dans l'eau a été optimisée, notamment grâce à l'ajout de groupements sulfonates sur les molécules. Parmi les cyanines hydrophiles absorbant et émettant dans le proche infrarouge, on peut notamment citer : la Cyanine 5 ( $\lambda_{abs}^{max} \approx 650 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{fluo}^{max} \approx 665 \text{ nm}$ ) et la Cyanine 7 ( $\lambda_{abs}^{max} \approx 750 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{fluo}^{max} \approx 775 \text{ nm}$ ) commercialisées par Amersham ou leurs

équivalents dans le catalogue d'Invitrogen, respectivement l'Alexa 647 et l'Alexa 750 (Figure IV-4 et IV-5).

Cependant, pour être incorporés de façon optimale dans le cœur des nano-émulsions, les fluorophores doivent être lipophiles. Les dialkylcarbocyanines, une sous-classe de cyanines, et en particulier celles dont les chaînes alkyles portées par les azotes sont composées d'au moins 12 atomes de carbone, possèdent une lipophilie importante. Ces molécules ont initialement été développées pour marquer la bicouche de phospholipides formant la membrane cellulaire, et ainsi être utilisées en tant que traceur pour les neurones [100]. Elles ont également été employées pour marquer la membrane de cellules hématopoïétiques *ex vivo*, puis suivre leur déplacement *in vivo* après injection dans des souris, les animaux étant imagés grâce un système d'imagerie de fluorescence similaire à celui décrit dans le Chapitre II [101]. Un autre exemple d'utilisation de ces fluorophores lipophiles est le marquage de lipoprotéines modifiées. Des lipoprotéines de basse densité sont prélevées dans le plasma de donneurs sains, puis sont marquées après purification par intercalation du fluorophore dans la monocouche de phospholipides. La lipoprotéine (apoB-100) est ensuite modifiée chimiquement par des acides foliques. Les lipoprotéines ainsi modifiées sont dans un premier temps incubées avec des cellules cancéreuses exprimant des récepteurs à l'acide folique, puis injectées dans des souris porteuses des mêmes cellules cancéreuses, le ciblage des tumeurs étant observé par imagerie de fluorescence *in vivo* [31].

Parmi les dialkylcarbocyanines commercialisées par Invitrogen, le DiD et le DiR possèdent les caractéristiques nécessaires pour doper efficacement les nano-émulsions, à savoir à la fois une bonne lipophilie, et des propriétés d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge compatibles avec l'imagerie optique *in vivo*. Le DiD ou perchlorate de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine est un analogue de la Cyanine 5 (Figure IV-4), tandis que le DiR ou iodure de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine est un analogue de la Cyanine 7 (Figure IV-5). Les structures des dialkylcarbocyanines et celles de leurs analogues hydrophiles présentent de grandes similitudes, en particulier au niveau de la partie aromatique, représentée en rouge sur les Figure IV-4 et Figure IV-5. Or c'est cette partie aromatique qui détermine les propriétés optiques des cyanines ; seuls les groupements de solubilité diffèrent entre les molécules hydrophiles Cyanine 5 / Cyanine 7 (groupement sulfonate) et lipophiles DiD / DiR (groupement octadécyl).

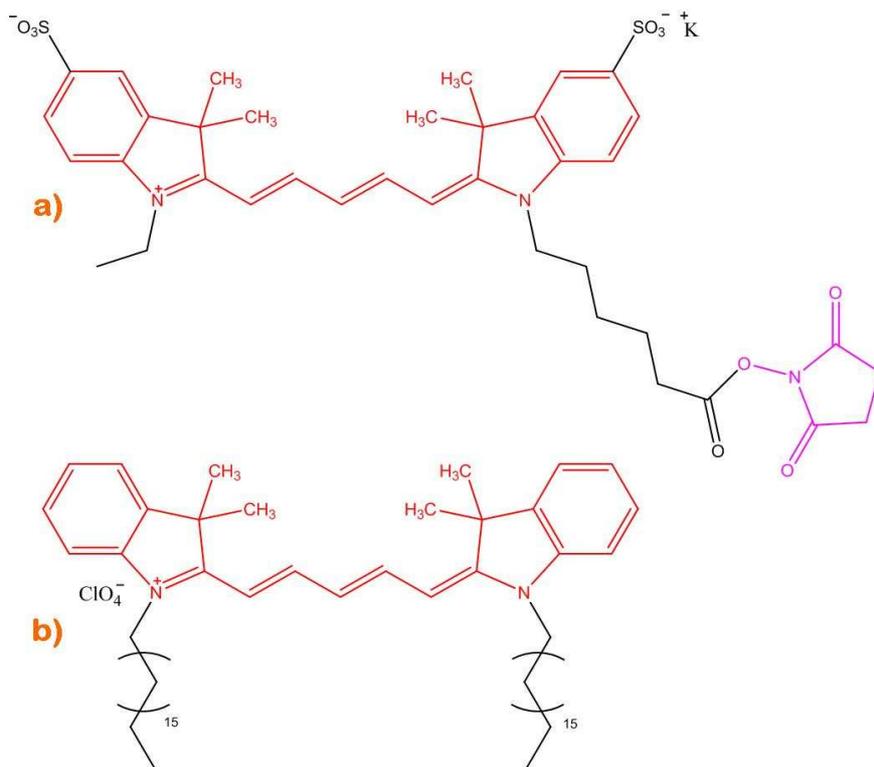


Figure IV-4 : Structure des molécules fluorescentes a) Cyanine 5 (Cy5) ; b) DiD. Les sous-structures représentées en rouge font ressortir l'analogie structurale entre les deux fluorophores en ce qui concerne la partie aromatique responsable des propriétés optiques. La sous-structure du fluorophore hydrophile représentée en violet correspond aux groupes de greffage, ici des esters activés par un groupement N-hydroxysuccinimide capable de former une liaison amide avec des amines.

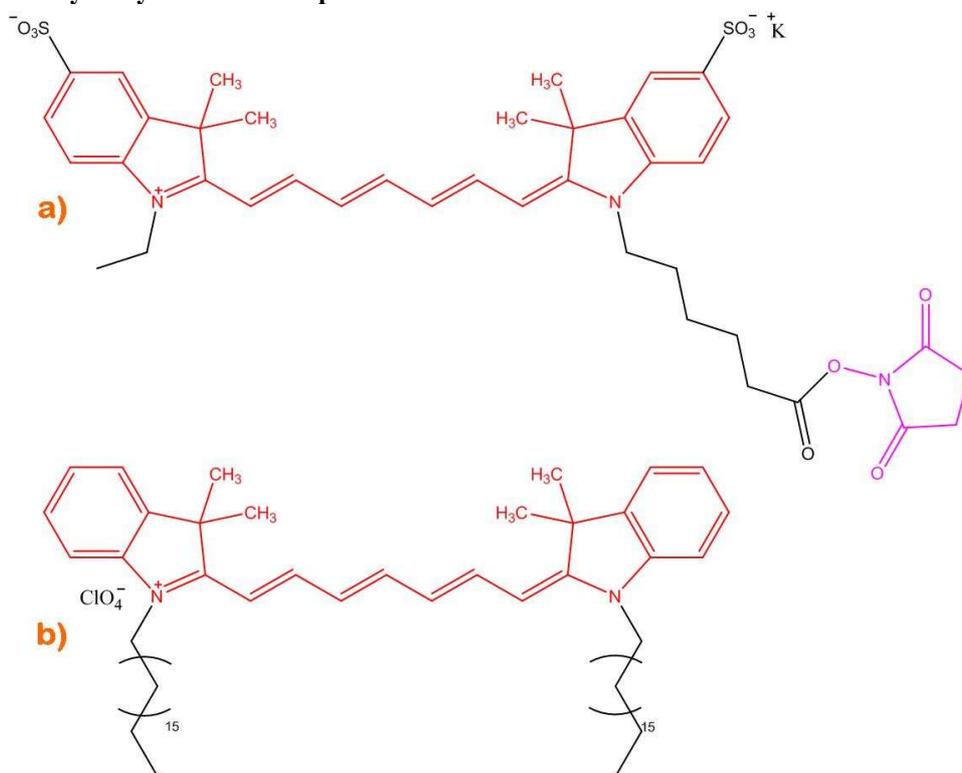


Figure IV-5 : Structure des molécules fluorescentes a) Cyanine 7 (Cy7) ; b) DiR. Les sous-structures représentées en rouge font ressortir l'analogie structurale entre les deux fluorophores en ce qui concerne la partie aromatique des propriétés optiques. La sous-structure du fluorophore hydrophile représentée en violet correspond aux groupes de greffage, ici des esters activés par un groupement N-hydroxysuccinimide capable de former une liaison amide avec des amines.

Les propriétés optiques des deux cyanines lipophiles (DiD et DiR) en solution dans un solvant organique ou encapsulées dans les nano-émulsions sont détaillées dans les paragraphes suivants.

## ***IV.3. Incorporation des fluorophores dans les nano-émulsions***

### **IV.3.1. Production de nano-émulsions fluorescentes**

#### **IV.3.1.1. Mode de production**

Comme énoncé précédemment, l'utilisation de fluorophores lipophiles impose un dopage des nano-émulsions avant émulsification. Les molécules fluorescentes sont donc ajoutées dans la phase huileuse (composée du mélange huile / cire et de la lécithine) avant le mélange avec la phase continue et la sonication. Pour faciliter leur dispersion dans la phase huileuse, les fluorophores sont préalablement dissous dans un solvant organique comme le chloroforme, le dichlorométhane, le méthanol, l'éthanol, ou le DMSO. Cette solution de fluorophores est ensuite ajoutée à la phase huileuse, la solution est homogénéisée et le solvant organique est retiré par évaporation sous vide. La suite du protocole de fabrication est similaire à celui décrit dans le paragraphe III.2.3 (voir Chapitre III). Brièvement, la phase aqueuse, contenant entre autres le surfactant pegylé, est ajoutée à la phase huileuse et ce mélange diphasique est homogénéisé par ultrasons, de manière à former des nanoparticules piégeant en leurs cœurs les fluorophores lipophiles. Les solutions de nano-émulsions ainsi obtenues sont ensuite purifiées par dialyse de manière à éliminer les molécules n'ayant éventuellement pas été encapsulées. Le protocole complet d'obtention de nano-émulsions dopées DiD est décrit dans l'annexe V.

Un cliché photographique représentant des solutions de nano-émulsions après dialyse est visible en Figure IV-6 ; il permet de visualiser l'encapsulation des fluorophores DiD et DiR.



Figure IV-6 : Photographie de solutions de nano-émulsions : de gauche à droite, nano-émulsions dopées DiR, non dopées et dopées DiD.

### IV.3.1.2. Efficacité d'encapsulation

Le mode de fabrication décrit ci-dessus assure l'encapsulation totale des fluorophores (DiD ou DiR) dans les globules. En effet, la comparaison des spectres d'absorption avant et après purification par dialyse montre bien que la totalité des molécules fluorescentes est piégée dans les nanoparticules (ceci sera détaillé au paragraphe IV.5.1). Le taux d'incorporation du fluorophore dans les nano-émulsions étant de 100%, la quantité de fluorophores encapsulés correspond donc à la quantité de fluorophores initialement introduite lors de la fabrication (préparation de la phase huileuse).

Le dopage en fluorophores est ici exprimé en micro molaire ( $\mu\text{M}$ ). Cette valeur correspond à la quantité en moles de fluorophores pour 1 litre de solution de nano-émulsions, avec un pourcentage de phase dispersée (huile + cire) de 10%. Par exemple, un lot de 2 mL de la formulation classique (10% de phase dispersée) contenant 800 nmol de fluorophores correspond à un dopage de 400  $\mu\text{M}$  ( $400 \times 10^{-6} = \frac{800 \times 10^{-9}}{2 \times 10^{-3}}$ ).

### IV.3.2. Calcul du nombre de fluorophores par globule

En se basant sur le fait que le taux d'encapsulation (ou taux de dopage) est de 100%, et sachant que le diamètre moyen des nano-émulsions n'est pas modifié par l'encapsulation des fluorophores (ceci sera détaillé au paragraphe IV.5.1), il est possible d'obtenir une indication sur le nombre de molécules de fluorophores contenues dans chaque globule d'émulsion. Ce

calcul reste cependant très approximatif étant donné le nombre d'hypothèses et d'approximations qui vont être utilisées pour obtenir le résultat.

Le nombre de molécules fluorescentes par globule  $N_{Fluo/Glob}$  est calculé grâce à la formule suivante (Équation IV-1)

$$N_{Fluo/Glob} = \frac{N_{Fluo}}{N_{Glob}} \quad (\text{Équation IV-1})$$

Le nombre de fluorophores  $N_{Fluo}$  s'obtient grâce à l'équation IV-2, où  $C_{dopage}$  correspond au taux de dopage,  $V_{lot}$  au volume du lot, et  $N_A$  au nombre d'Avogadro.

$$N_{Fluo} = C_{dopage} \times V_{lot} \times N_A \quad (\text{Équation IV-2})$$

La détermination du nombre de globules  $N_{Glob}$  est accessible via l'équation IV-3, dans laquelle  $\langle v \rangle$  représente le volume moyen d'un globule (directement obtenu à partir de son diamètre moyen  $\langle d \rangle$  et de l'équation IV-4), et  $V_{\varphi d}$  le volume total de la phase dispersée.

$$N_{Glob} = \frac{V_{\varphi d}}{\langle v \rangle} \quad (\text{Équation IV-3})$$

$$\langle v \rangle = \pi \frac{\langle d \rangle^3}{6} \quad (\text{Équation IV-4})$$

La détermination de  $V_{\varphi d}$  constitue le point critique du calcul car elle repose sur une hypothèse et une approximation. La proportion des surfactants par rapport à la quantité d'« huile » est telle qu'elle ne peut être négligée. On fait donc l'hypothèse que la totalité des surfactants participe à la stabilisation des globules. Ainsi le volume peut être estimé grâce à l'équation IV-5, à partir de la masse totale de la phase dispersée (huile, cire, lécithine, et surfactants pegylés) et de la densité globale de la phase dispersée (cette densité varie en fonction des formulations ; elle sera approximée à 1,1).

$$V_{\varphi d} = \frac{m_{\varphi d}}{d_{\varphi d}} = \frac{1}{d_{\varphi d}} \times (m_{huile} + m_{cire} + m_{lécithine} + m_{s. pegylés}) \quad (\text{Équation IV-5})$$

On obtient ainsi pour des nano-émulsions de la formulation de référence, dopée à 400  $\mu\text{M}$  en DiD (lot de 2 mL) et dont le diamètre moyen est de 35 nm, environ 21 molécules de fluorophores par globule.

### IV.3.3. Impact de l'encapsulation sur les propriétés des nano-émulsions

#### IV.3.3.1. Distribution en taille et taille moyenne

Le diamètre des nano-émulsions est mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière (voir Chapitre 3). Cependant, la longueur d'onde du faisceau laser utilisé par l'appareil de mesure pour éclairer la solution colloïdale est de 633 nm, longueur d'onde à laquelle le DiD absorbe fortement (IV.4.1.2). Cela induit donc une augmentation de l'absorption du faisceau lumineux par les particules dopées DiD, mais entraîne également l'apparition d'un signal de fluorescence qui risque de perturber la mesure. En effet, une évolution de la distribution en taille est observée entre des échantillons concentrés ou dilués : la distribution est plus fine et plus homogène pour les mesures réalisées avec les solutions diluées. Le graphique ci-dessous représente la distribution en taille (avec une pondération en volume) de trois solutions de nano-émulsions, dont la formulation de base est identique (formulation de référence) excepté pour le dopage : nano-émulsions non dopées ; nano-émulsions dopées DiD 400  $\mu\text{M}$  ; nano-émulsions dopées DiR 400  $\mu\text{M}$  (Figure IV-7). Avec ces formulations, les solutions sont suffisamment diluées pour qu'aucune différence significative ne soit observée entre les nano-émulsions non dopées et dopées DiD ou DiR. Dans ce cas, l'encapsulation de molécules fluorescentes ne modifie pas le diamètre des nano-émulsions : les globules de la formulation de référence ont ainsi un diamètre moyen de  $35 \pm 2$  nm, qu'ils soient dopés en fluorophores ou non.

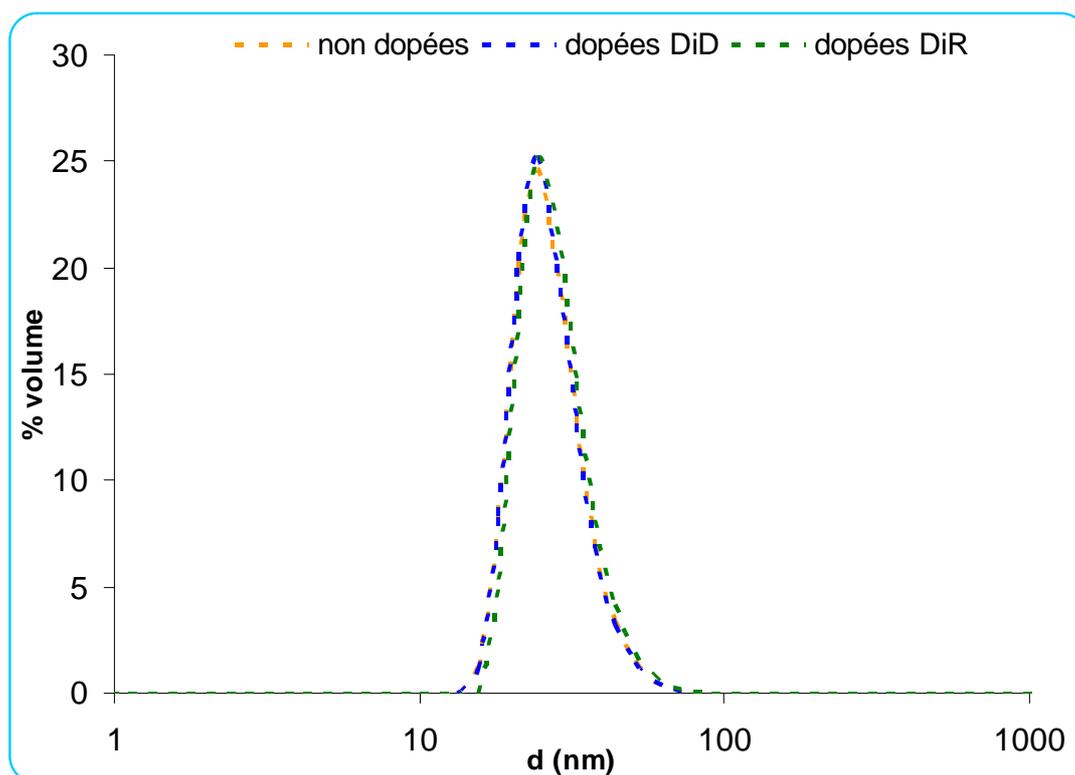


Figure IV-7 : Comparaison de la distribution en taille de nano-émulsions en fonction du dopage

#### IV.3.3.2. Potentiel zêta

L'encapsulation des molécules de fluorophores ne perturbe pas la double couche ionique qui se forme autour des globules en solution dans l'eau. Ainsi le potentiel zêta des nano-émulsions dopées en fluorophore (DiD) est identique à celui mesuré pour les nano-émulsions non dopées, soit  $-5 \pm 2$  mV.

#### IV.3.3.3. Morphologie

Les clichés de CryoTEM représentés Figure IV-8 sont similaires à ceux décrits dans le Chapitre III. L'encapsulation de fluorophores (DiD) au sein des nano-émulsions ne modifie donc pas la morphologie de ces dernières.

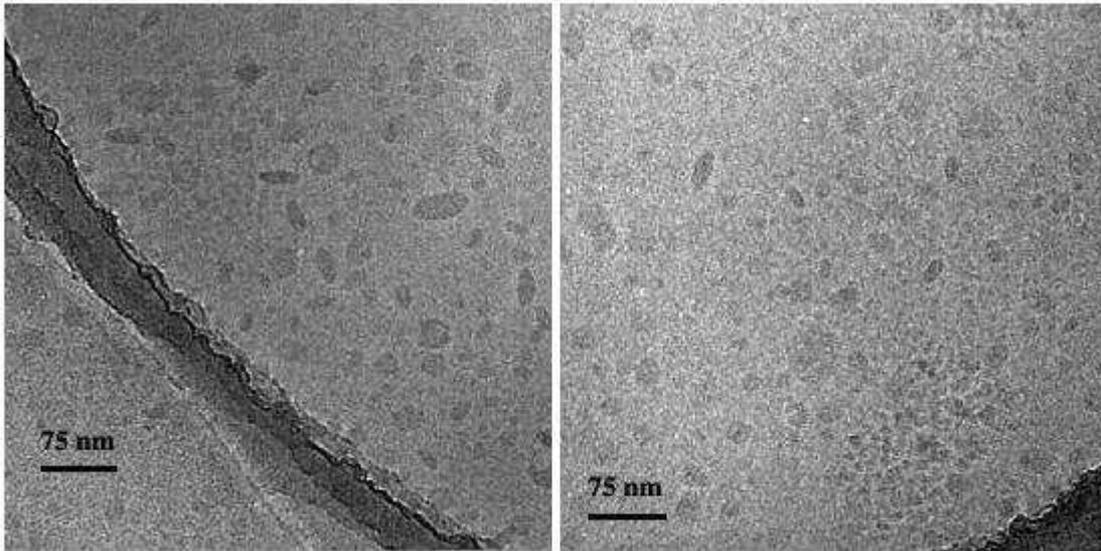


Figure IV–8 : Clichés de Cryo-microscopie électronique en transmission de nano-émulsions encapsulant du DiD.

## ***IV.4. Propriétés optiques des nano-émulsions fluorescentes***

Nous allons au cours de cette section détailler les propriétés optiques des nano-émulsions dopées en fluorophores. La majorité des expériences porte sur les nano-émulsions dopées DiD, car les tests biologiques *in vitro* et *in vivo* ont principalement été réalisés avec ce type de dopage.

### **IV.4.1. Spectres d'absorption et d'émission**

#### **IV.4.1.1. Nano-émulsions non dopées**

Bien que translucides, les solutions de nano-émulsions non dopées ne sont pas totalement transparentes dans le domaine du visible : elles possèdent une légère coloration jaune. La Figure IV–9 représente le spectre d'absorption d'une nano-émulsion non dopée en fluorophores.

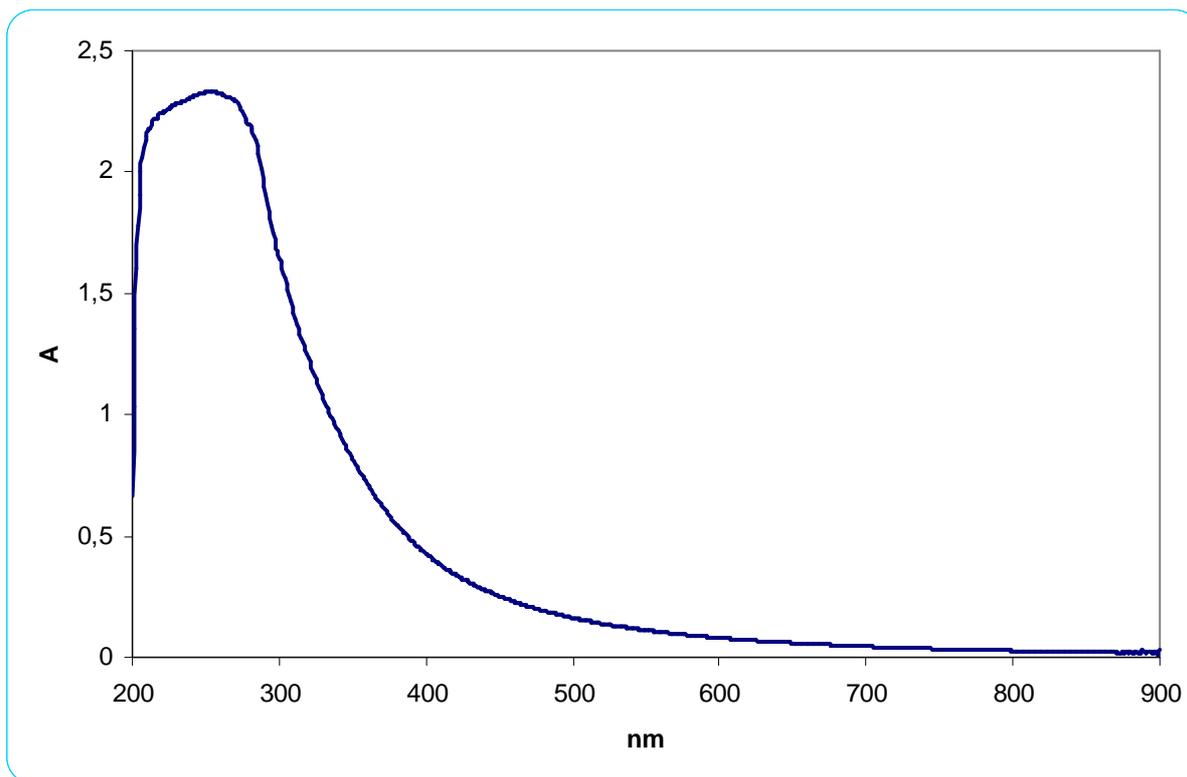


Figure IV-9 : Spectre d'absorption d'une nano-émulsion non dopée.

Les nano-émulsions non dopées absorbent principalement dans l'ultraviolet (entre 200 et 300 nm) puis, entre 300 et 900 nm, l'absorption décroît avec une dépendance en  $\lambda^{-4}$ . Cette décroissance est caractéristique des phénomènes de diffusion de la lumière dus à la taille des nanoparticules. En effet, l'approximation de Rayleigh est valable dans ce cas puisque le diamètre des particules est inférieur au dixième de la longueur d'onde de la lumière diffusée. Il n'y a donc pas d'absorption significative dans la fenêtre optique utilisée en imagerie de fluorescence (650-900 nm), seule une légère diffusion est observée. Les nano-émulsions non dopées ne sont pas fluorescentes.

#### IV.4.1.2. Nano-émulsions dopées DiD

Comme attendu au regard de leur structure (Figure IV-4), les spectres d'absorption et d'émission du DiD dans le méthanol et ceux du Cy5 en milieu aqueux sont similaires (Figure IV-10).

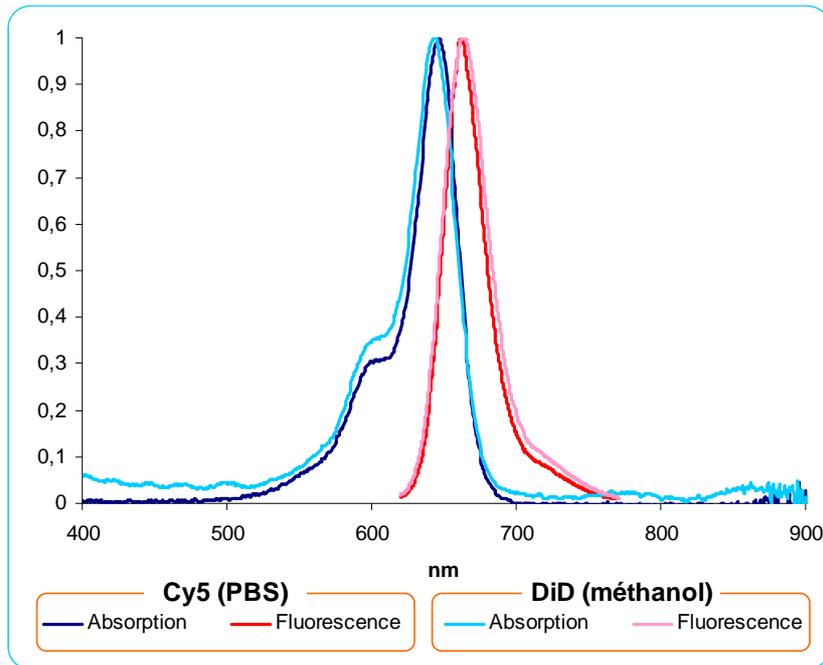


Figure IV-10 : Spectres d'absorption et d'émission de la Cyanine 5 en solution dans une solution tampon PBS (Phosphine Buffer Saline) et du DiD en solution dans le méthanol.

Les valeurs des longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption et l'émission sont maximales sont regroupées pour chaque fluorophore dans le Tableau IV-2.

Fluorophore	$\lambda_{abs}^{max}$	$\lambda_{fluo}^{max}$
Cy5 (PBS)	646	663
DiD (méthanol)	644	665

Tableau IV-2 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales du Cy5 dans le PBS et du DiD dans le méthanol.

Le DiD est une molécule très lipophile et est donc peu soluble dans l'eau. En effet, en milieu aqueux, il s'agglomère puis précipite afin de diminuer les interactions avec les molécules d'eau. Le spectre d'absorption du DiD en solution aqueuse, représenté Figure IV-11, montre une forte augmentation de la bande à 600 nm, ce qui est caractéristique de la formation de dimères. Dans cette configuration, les molécules perdent leur propriété de fluorescence [102].

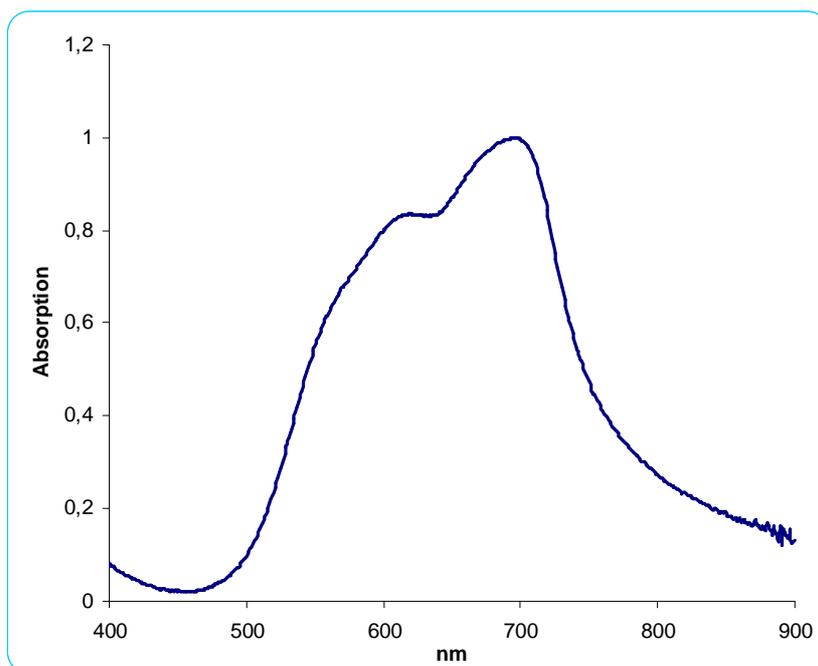


Figure IV-11 : Spectre d'absorption du DiD en solution aqueuse.

L'encapsulation du fluorophore dans le cœur des nano-émulsions via le protocole décrit précédemment (IV.3.1.1) ne modifie pas ses spectres d'absorption et d'émission par rapport à ceux obtenus dans le méthanol (Figure IV-12). Seul un léger décalage de quelques nanomètres vers le rouge est observé après incorporation du DiD dans les particules (Tableau IV-3). On retrouve sur le spectre d'absorption la forme caractéristique du signal du fluorophore, mais également le phénomène de diffusion dû à la taille des nanoparticules qui se traduit par une faible absorbance sur tout le spectre, cette absorbance augmentant légèrement dans les faibles longueurs d'onde.

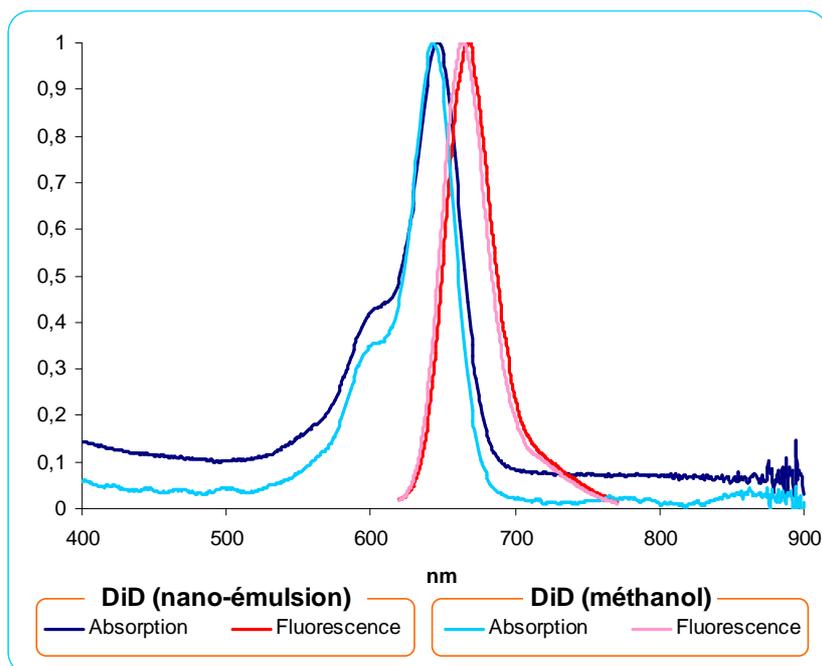


Figure IV-12 : Comparaison des spectres d'absorption et d'émission de nano-émulsions dopées DiD avec ceux du DiD en solution dans le méthanol.

Fluorophore	$\lambda_{abs}^{max}$	$\lambda_{flu}^{max}$
DiD (nano-émulsion)	646	668
DiD (méthanol)	644	665

Tableau IV-3 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales des nano-émulsions dopées DiD et du DiD en solution dans le méthanol.

Le spectre d'absorption est donc la résultante de deux composantes distinctes : l'absorption par le fluorophore, et la diffusion par les nanoparticules. Le rapport entre l'absorbance à 400 nm (due à la diffusion) et celle à 650 nm (due au fluorophore) est uniquement lié au dopage, donc au nombre moyen de fluorophores par globule, et est indépendant de la dilution de l'échantillon. Ainsi, plus les nano-émulsions sont dopées en fluorophores, plus le phénomène de diffusion devient faible par rapport à l'absorption du fluorophore, pour une même taille de nanoparticules.

#### IV.4.1.3. Nano-émulsions dopées DiR

Le DiR a une structure chimique très proche de celle du DiD (Figure IV-4 et Figure IV-5). En effet, les deux molécules se différencient uniquement par la longueur de la chaîne carbonée conjuguée entre les 2 noyaux indoliques : celle du DiR est composée d'une

insaturation supplémentaire, ce qui décale ses spectres d'absorption et d'émission d'une centaine de nanomètres vers l'infrarouge. Néanmoins, excepté du point de vue optique, leurs propriétés physico-chimiques sont similaires.

La Figure IV-13 illustre, comme pour le DiD, l'absence de différences significatives entre les spectres d'absorption et d'émission du DiR en solution dans du méthanol et encapsulé dans les nano-émulsions (Tableau IV-4). Le spectre d'absorption des nano-émulsions encapsulant le DiR présente également le phénomène de diffusion, qui est particulièrement visible dans les faibles longueurs d'onde.

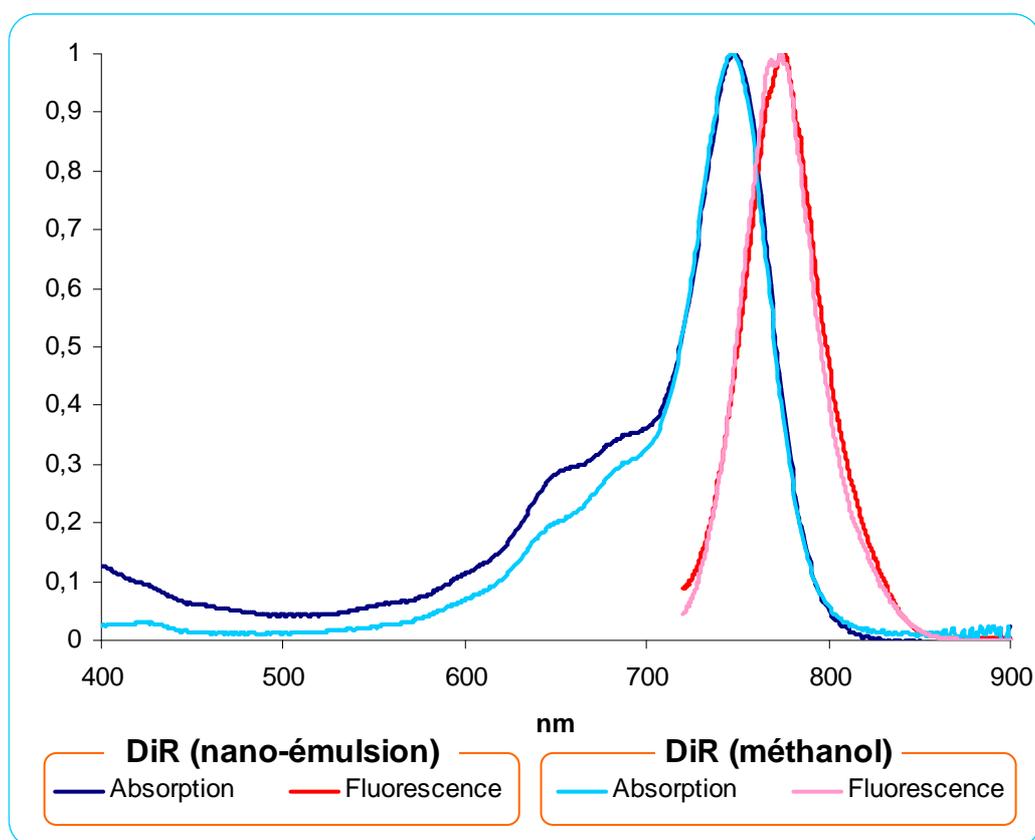


Figure IV-13 : Comparaison des spectres d'absorption et d'émission de nano-émulsions dopées DiR avec ceux du DiR en solution dans le méthanol.

Fluorophore	$\lambda_{abs}^{max}$	$\lambda_{fluo}^{max}$
DiR (nano-émulsion)	748	775
DiR (méthanol)	747	774

Tableau IV-4 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales des nano-émulsions dopées DiR et du DiR en solution dans le méthanol.

## IV.4.2. Rendement quantique de fluorescence

### IV.4.2.1. Définition et méthode de calcul

Le rendement quantique de fluorescence est la valeur caractéristique de l'efficacité relative de la fluorescence (désexcitation radiative) comparée aux autres voies de désexcitation non radiatives du fluorophore dans son état excité. Il correspond au rapport du nombre de photons émis par seconde sur le nombre de photons absorbés par seconde.

Les rendements quantiques de fluorescence des fluorophores organiques dans le proche infrarouge sont généralement compris entre 0,10 et 0,30. Ils sont fortement dépendants des conditions de solvation : solvant, température, pH. Ainsi, outre les problèmes de solubilité, le rendement quantique d'un fluorophore est souvent plus faible en milieu aqueux que dans un solvant organique. D'une manière générale, plus la fluorescence est décalée vers l'infrarouge, plus le rendement quantique diminue [103].

La détermination directe du rendement quantique d'un fluorophore est relativement difficile, puisqu'elle impose de connaître de façon exacte le nombre de photons absorbés et émis. Il est plus couramment obtenu par comparaison avec une molécule fluorescente de référence dont le rendement quantique est connu (Équation IV-6).

$$\Phi_{éch} = \Phi_{réf} \times \frac{\int I_{fluo}^{éch} d\lambda}{\int I_{fluo}^{réf} d\lambda} \times \frac{1 - 10^{-Abs^{réf}}}{1 - 10^{-Abs^{éch}}} \times \frac{n_{réf}^2}{n_{éch}^2} \quad (\text{Équation IV-6})$$

avec  $\Phi_{éch}$  : Rendement quantique de la solution étudiée

$\Phi_{réf}$  : Rendement quantique de la solution de référence

$\int I_{fluo}^{éch} d\lambda$  : Intégrale du spectre de fluorescence de la solution étudiée

$\int I_{fluo}^{réf} d\lambda$  : Intégrale du spectre de fluorescence de la solution de référence

$Abs^{éch}$  : Absorbance de la solution étudiée à la longueur d'onde d'excitation

$Abs^{réf}$  : Absorbance de la solution de référence à la longueur d'onde

d'excitation

$n_{éch}$  : Indice de réfraction du solvant de la solution étudiée

$n_{réf}$  : Indice de réfraction du solvant de la solution de référence

La molécule utilisée en tant que référence doit être excitée à la même longueur d'onde que la solution étudiée ; elles doivent donc avoir des propriétés spectrales proches.

#### IV.4.2.2. Nano-émulsions dopées DiD

Le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi$ ) du DiD en solution dans le méthanol a été mesuré en utilisant la Cyanine 5 comme molécule fluorescente de référence (Tableau IV-5). L'efficacité de fluorescence est supérieure pour le DiD en milieu organique que pour la Cyanine 5 en milieu aqueux. Le rendement quantique de fluorescence du DiD en milieu aqueux est lui quasi nul.

Fluorophore	$\Phi$
Cy5 (PBS)	0,28 ± 0,02
DiD (Méthanol)	0,33 ± 0,02

Tableau IV-5 : Rendement quantique de fluorescence du Cy5 en solution dans le PBS et du DiD en solution dans le méthanol. Les solutions de fluorophores sont excitées à 600 nm.

Les mesures d'absorption ont montré que les nano-émulsions diffusent légèrement la lumière et ce, également à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, soit 600 nm (IV.4.1.1). Ce phénomène engendre une diminution du rendement quantique puisque la valeur d'absorption du fluorophore est alors surestimée. En conséquence, les rendements quantiques sont corrigés de manière à tenir compte de la diffusion des particules, afin de mettre en évidence l'effet de la seule encapsulation sur les propriétés optiques du fluorophore.

On obtient ainsi, pour la formulation de référence dopée DiD à 400  $\mu\text{M}$ , un rendement quantique de fluorescence  $\Phi = 0,38 \pm 0,02$  (non corrigé  $\Phi = 0,31$ ).

Les variations effectuées sur la composition du cœur lipophile ne montrent qu'une très légère influence sur le rendement quantique de fluorescence (Tableau IV-6). Cependant, il semblerait que l'efficacité de fluorescence augmente faiblement avec le pourcentage de Suppocire<sup>®</sup> NC.

## Chapitre IV : Nano-émulsions fluorescentes

Composition du cœur lipophile	$\Phi$
100 % Suppocire® NC	0,38 ± 0,02
75% Suppocire® NC / 25% huile de soja	0,37 ± 0,02
25% Suppocire® NC / 75% huile de soja	0,36 ± 0,02

**Tableau IV-6 : Rendements quantiques de fluorescence (corrigés) de nano-émulsions dopées DiD à 400  $\mu$ M en fonction de la composition du cœur lipophile.**

La diffusion de la lumière augmente fortement avec la taille moyenne des particules. Ainsi une diminution conséquente du rendement quantique de fluorescence « brut » (non corrigé) est attendue pour les particules dont le diamètre est important. C'est effectivement ce qui est observé pour des nano-émulsions dopées à 400  $\mu$ M en DiD dont le diamètre moyen varie de 35 à 200 nm. Toutefois, la correction de l'absorbance permet de retrouver des valeurs de rendements quantiques similaires à celles précédemment obtenues (Tableau IV-7).

Diamètre (nm)	$\Phi$ « brut »	$\Phi$ corrigé	$N_{Fluo/Glob}$
35 nm	0,31 ± 0,02	0,38 ± 0,02	21
45 nm	0,27 ± 0,02	0,38 ± 0,02	45
100 nm	0,22 ± 0,02	0,38 ± 0,02	490
200 nm	0,05 ± 0,02	0,39 ± 0,02	3922

**Tableau IV-7 : Evolution du rendement quantique avant et après correction en fonction de la taille des globules, pour un taux de dopage en DiD de 400  $\mu$ M.**

Les molécules de type cyanines ayant la propriété d'éteindre mutuellement leur fluorescence si elles sont suffisamment proches dans l'espace [102], on pourrait craindre qu'à partir d'une valeur seuil de dopage, le rendement quantique de fluorescence diminue avec l'augmentation de la quantité de fluorophores inclus dans les nanoparticules. Le Tableau IV-8 indique les valeurs des rendements quantiques (corrigés) obtenues pour des nano-émulsions (issues de la formulation de référence) possédant des taux de dopages en fluorophores différents. Ce tableau indique que pour des dopages allant jusqu'à 1000  $\mu$ M, aucun phénomène significatif d'extinction de fluorescence n'est observé.

Dopage DiD ( $\mu\text{M}$ )	$\Phi$	$N_{\text{Fluo}/\text{Glob}}$
78	$0,37 \pm 0,02$	4
156	$0,37 \pm 0,02$	8
234	$0,36 \pm 0,02$	12
313	$0,36 \pm 0,02$	16
400	$0,38 \pm 0,02$	21
1000	$0,35 \pm 0,02$	53

Tableau IV-8 : Evolution du rendement quantique en fonction du taux de dopage en DiD des nano-émulsions. Tous les globules ont un diamètre de 35 nm.

En conclusion, les nano-émulsions dopées DiD ont un excellent rendement quantique de fluorescence ( $\Phi = 0,38$ ) pour des fluorophores étant in fine dispersés en milieu aqueux. L'augmentation du rendement quantique entre le DiD en solution dans du méthanol ( $\Phi = 0,33$ ) et le DiD encapsulé dans les nano-émulsions ( $\Phi = 0,38$ ) pourrait s'expliquer par la différence de viscosité entre les deux milieux (IV.6.1).

#### IV.4.2.3. Nano-émulsions dopées DiR

Les rendements quantiques de fluorescence ( $\Phi$ ) du DiR, en solution dans le méthanol et encapsulé dans les nano-émulsions, ont été calculés grâce à l'équation IV-6 en utilisant l'HITC ou iodure de 1,1',3,3',3'-Hexaméthylindotricarbocyanine comme molécule fluorescente de référence (Figure IV-14). Le HITC est une cyanine dont la structure, et notamment la partie aromatique, est très proche de celle du DiR. Son rendement quantique est de 0,28 lorsqu'elle est solubilisée dans le méthanol et excitée à 700 nm.

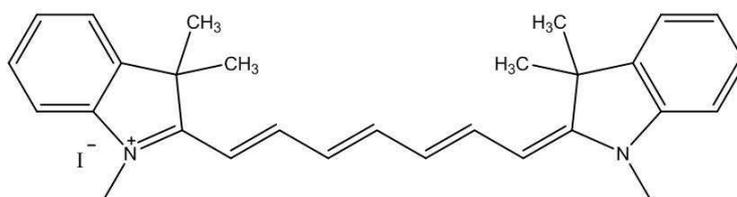


Figure IV-14 : Structure du HITC.

Le Tableau IV-9 indique les résultats obtenus pour le DiR en solution dans le méthanol et pour des nano-émulsions dopées en DiR à 400  $\mu\text{M}$ . On observe ici une très faible diminution du rendement quantique lors de l'encapsulation du fluorophore dans les nano-émulsions.

Solution	$\Phi$
HITC (méthanol)	$0,28 \pm 0,02$
DiR (méthanol)	$0,28 \pm 0,02$
Nano-émulsions dopées DiR	$0,25 \pm 0,02$

**Tableau IV-9: Rendement quantique de fluorescence du HITC en solution dans le méthanol, du DiR en solution dans le méthanol, et de nano-émulsions dopées en DiR à 400  $\mu$ M. Les solutions de fluorophores sont excitées à 700 nm.**

### IV.4.3. Durée de vie de fluorescence

La durée de vie de l'état excité, ou durée de vie de fluorescence, correspond au temps moyen pendant lequel la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental par émission de fluorescence ou par désexcitation non radiative.

Ce paramètre est primordial pour l'imagerie de fluorescence résolue en temps. Cette technique vise en effet à réduire l'auto-fluorescence des tissus biologiques qui parasite le signal, en utilisant des sondes fluorescentes dont la durée de vie est supérieure à celle de l'auto-fluorescence des tissus. L'excitation est alors réalisée par un laser pulsé, et le signal de fluorescence est recueilli dans une fenêtre temporelle décalée par rapport à l'impulsion d'excitation. Ceci permet d'observer uniquement le signal émis par le traceur en évitant le signal d'auto-fluorescence des tissus (Figure IV-15). Ainsi, plus la durée de vie de fluorescence de l'agent de contraste est élevée, plus la fenêtre d'observation sera grande, et donc plus la sensibilité sera importante.

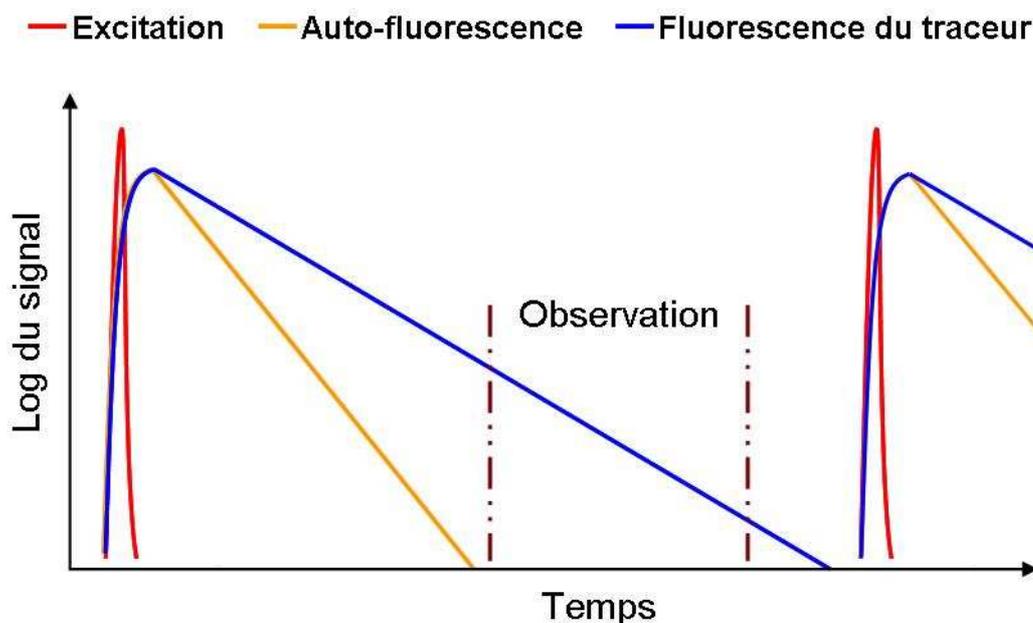


Figure IV-15 : Schéma illustrant le principe de l'imagerie de fluorescence résolue en temps. Après une excitation brève (quelques picosecondes), l'auto-fluorescence des tissus décroît plus vite que l'émission de fluorescence du traceur dans le cas où la durée de vie de fluorescence du traceur est supérieure à celle des tissus. L'observation de la fluorescence peut alors être réalisée sur une fenêtre décalée dans le temps par rapport à l'impulsion d'excitation, de manière à prendre en compte uniquement le signal d'intérêt (celui du traceur) et en s'affranchissant des signaux parasites (auto-fluorescence des tissus et signal d'excitation). La répétition à haute cadence des acquisitions permet d'obtenir un signal de bonne qualité.

Les durées de vie de fluorescence sont calculées à partir des déclin de fluorescence enregistrés sur des bancs expérimentaux au laboratoire (voir annexe II). Le Tableau IV-10 regroupe les valeurs obtenues pour les fluorophores DiD et DiR en solution dans le méthanol ou encapsulés dans des nano-émulsions (en suspension dans du PBS - 10 mM - pH 7,3).

Fluorophore	Durée de vie de fluorescence $\tau$ (ps)
DiD en solution dans le méthanol	1200 $\pm$ 50
DiD encapsulé dans une nano-émulsion	2000 $\pm$ 50
DiR en solution dans le méthanol	800 $\pm$ 50
DiR encapsulé dans une nano-émulsion	1200 $\pm$ 50

Tableau IV-10 : Durée de vie de fluorescence pour les fluorophores DiD et DiR en solution dans le méthanol ou encapsulés dans les nano-émulsions avec un dopage de 400  $\mu$ M.

Les résultats montrent que plus les fluorophores émettent loin dans le proche infrarouge, plus la durée de vie de fluorescence est courte, mais l'information la plus intéressante est l'augmentation significative de la durée de vie de fluorescence avec

l'encapsulation. En effet, les valeurs obtenues sont nettement supérieures à celle des fluorophores hydrophiles analogues Cy5 et Cy7 en milieu aqueux : respectivement  $1000 \pm 50$  ps et  $450 \pm 10$  ps. Cela représente une amélioration de 100 % entre les cyanines hydrophiles et les nano-émulsions fluorescentes.

### IV.4.4. Vitesse de photoblanchiment

Le photoblanchiment est un phénomène photo-induit conduisant à la dégradation du fluorophore. Lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant, ce qui induit une décroissance de l'intensité de fluorescence au cours du temps. Le photoblanchiment représente un inconvénient majeur des fluorophores organiques par rapport aux nano-cristaux semi-conducteurs (boîtes quantiques ou quantum dots).

Pour déterminer la vitesse de photoblanchiment, un dispositif d'imagerie du laboratoire a été utilisé. Le spectre d'excitation est centré autour de 633 nm et la densité de puissance de l'éclairage est de  $2 \mu\text{W}/\text{mm}^2$ . Cinq solutions ont été testées : Cyanine 5 en solution dans du PBS (Phosphine Buffer Saline); Cyanine 5 en solution saline ( $[\text{NaCl}] = 154$  mM) ; DiD en solution dans du méthanol ; DiD encapsulé dans des nano-émulsions dispersées dans une solution saline ( $[\text{NaCl}] = 154$  mM) ; DiD encapsulé dans des nano-émulsions dispersées dans du PBS. Toutes ces solutions ont une concentration en fluorophores (Cy5 ou DiD) de  $10 \mu\text{M}$ .  $100 \mu\text{L}$  de chaque solution sont introduits dans des capillaires fermés puis les cinq capillaires sont placés sous la zone d'éclairage de la caméra de la FRI. Une séquence permet alors d'enregistrer une série de clichés à intervalles réguliers (toutes les 2 minutes pendant 180 minutes puis toutes les 10 minutes entre 225 minutes et 24 heures), l'éclairage étant constamment allumé tout au long de l'expérience. Des zones d'intérêt de surface identique et centrées sur chaque capillaire permettent d'avoir accès à la fluorescence émise par chaque échantillon en fonction du temps.

Le graphique Figure IV-16 représente l'évolution pour chaque solution du rapport  $\frac{(Fluorescence\ capillaire(t) - fond)}{(Fluorescence\ capillaire(t_0) - fond)} \times 100$  en fonction du temps.

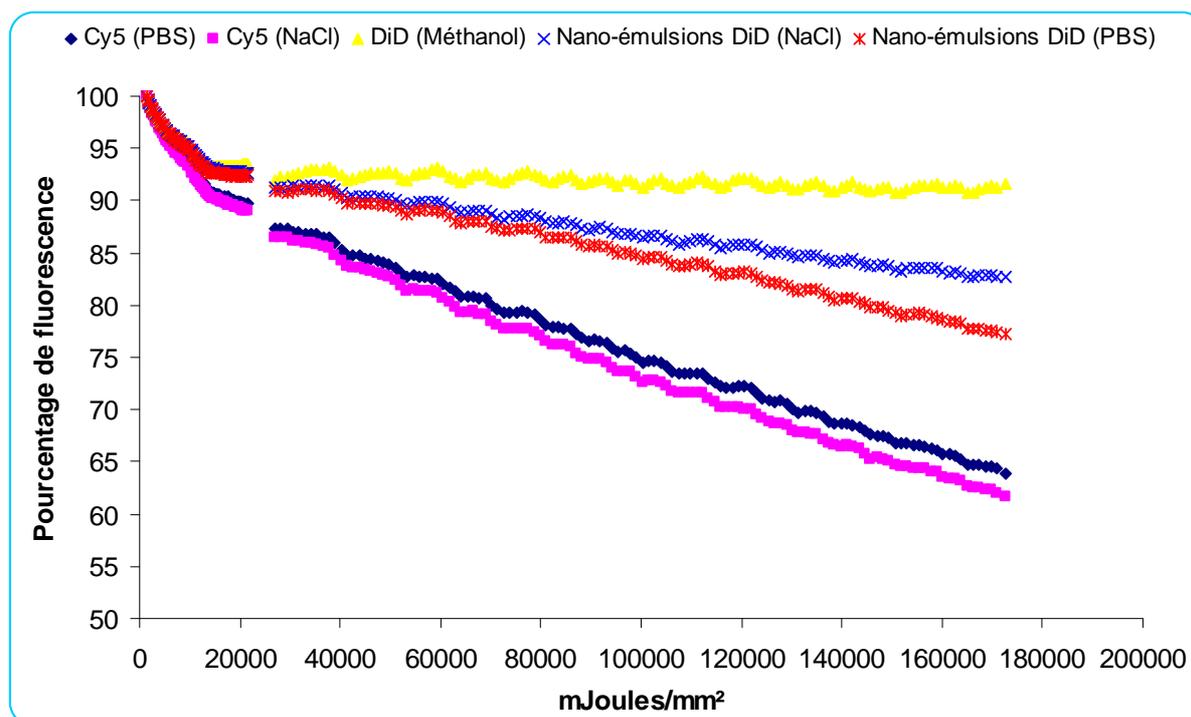


Figure IV-16 : Evolution de la fluorescence émise par cinq solutions en fonction du nombre de joules par millimètre carré. Les solutions sont soumises à une excitation continue pendant toute la durée de la mesure, soit 24 heures.

Pour toutes les solutions, le graphique montre une rapide diminution de la fluorescence dans les premiers instants, puis une décroissance linéaire avec des vitesses de dégradation différentes en fonction des solutions. Les variations sinusoïdales observées pour toutes les solutions de façon synchronisée sont dues à la fluctuation régulière dans le temps de la puissance d'excitation. Cette fluctuation ne perturbe pas la décroissance globale qui peut être considérée comme uniquement due au photoblanchiment.

Il ressort de l'analyse de ces résultats que le DiD est très stable en milieu organique (méthanol). Son encapsulation dans les nano-émulsions le rend légèrement plus sensible au photoblanchiment, mais il reste nettement plus stable que les solutions de Cyanine 5. Il semble également que la vitesse de dégradation pour les fluorophores encapsulés dans les nanoparticules dépende du milieu continu ; cela est également vrai pour la Cyanine 5 mais dans une moindre mesure. Les molécules de DiD piégées dans les nanoparticules en solution dans le PBS se dégradent en effet plus vite que celles diluées dans la solution saline.

La différence de sensibilité au photoblanchiment entre le fluorophore en solution dans le méthanol et le fluorophore encapsulé dans les nanoparticules peut donc être attribuée, au moins en partie, à des échanges entre l'intérieur des globules et le milieu continu. Quoi qu'il

en soit, les nano-émulsions dopées en fluorophores sont plus résistantes au photoblanchiment que les cyanines hydrophiles.

### ***IV.5. Encapsulation et stabilité***

Un des paramètres primordiaux dans le développement des nano-émulsions est la stabilité du dopage en fluorophores. En effet, le fluorophore ne doit pas diffuser des globules vers le milieu continu au cours du temps (stabilité physique), et il ne doit également pas se dégrader chimiquement à l'intérieur du cœur lipidique (stabilité chimique).

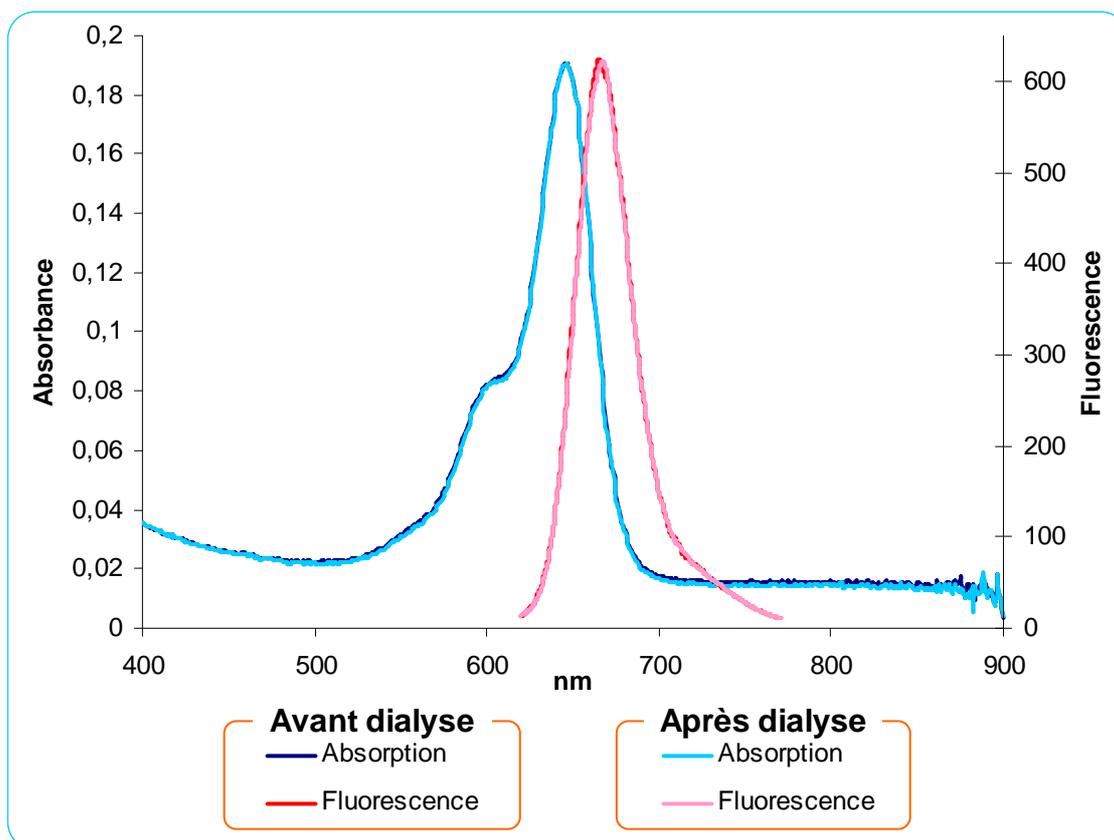
#### **IV.5.1. Stabilité de l'encapsulation**

La faible solubilité des fluorophores DiD et DiR en milieu aqueux permet de supposer que l'encapsulation dans les nano-émulsions sera d'une part totale, mais aussi qu'elle sera stable dans le temps. Le taux d'encapsulation et la stabilité physique des molécules fluorescentes peuvent être vérifiés par simple dialyse d'une solution de nano-émulsions fluorescentes, en enregistrant un spectre d'absorption avant et après la purification. La dialyse permet d'éliminer les molécules dont la taille est inférieure à la taille des pores de la membrane séparant la solution à purifier du dialysat.

Lors de la dialyse, le système tend à équilibrer chaque côté de la membrane. Les molécules dont la taille est inférieure au seuil de coupure (notamment le fluorophore dont la taille est proche de 1 kDa) égalisent leurs concentrations de part et d'autre de la membrane. Etant donné que le volume du dialysat est plusieurs centaines de fois supérieur au volume dialysé, cela permet d'éliminer presque totalement les petites molécules de la solution dialysée. Cependant, comme la concentration des objets dont la taille est supérieure au seuil de coupure ne peut s'équilibrer par passage au travers de la membrane, c'est donc l'eau qui va traverser la membrane en sens inverse afin de diminuer la concentration de ces objets par dilution, et ce jusqu'à ce que la pression à l'intérieur de la membrane empêche l'arrivée de molécules d'eau supplémentaires. Il en résulte une dilution de la solution dialysée, ce qui ne permet pas de comparer directement les spectres d'absorption des solutions avant et après

dialyse, la concentration en nano-émulsions n'étant pas conservée. Une correction est donc appliquée au spectre de la solution dialysée de manière à faire correspondre les parties des signaux liés à la diffusion engendrée par la présence des nanoparticules.

La Figure IV-17 représente les spectres d'absorption corrigés du facteur de dilution d'une nano-émulsion dopée avec du DiD, avant et après dialyse. La solution a été dialysée pendant 15 jours à 37°C contre de l'eau déionisée et avec une membrane dont le seuil de coupure est de 12-14000 kDa. Après correction, les parties des spectres d'absorption liées aux fluorophores se superposent parfaitement, indiquant tout d'abord que le taux d'encapsulation du fluorophore est bien de 100 %, mais aussi qu'il n'y a pas de diffusion des molécules fluorescentes vers le milieu continu. Etant données les similitudes entre les structures du DiD et du DiR, on peut légitimement extrapoler ce résultat aux nano-émulsions encapsulant du DiR.



### IV.5.2. Stabilité chimique du fluorophore

La stabilité physique de l'encapsulation du fluorophore étant maintenant admise, il convient d'étudier la stabilité chimique du fluorophore. En effet, le fluorophore peut se dégrader au cours du temps, perdant ainsi ses propriétés optiques. Certaines solutions de nano-émulsions encapsulant du DiD ont par exemple tendance à changer de couleur au cours de leur stockage à température ambiante, passant du bleu au vert, voire au jaune clair dans certains cas.

Pour évaluer ce phénomène, nous avons choisi d'analyser l'influence du pH, paramètre connu pour altérer les cyanines, sur la fluorescence de solutions de nanoparticules encapsulant du DiD. Pour cela, deux nano-émulsions (formulation de référence - voir annexe V) avec une concentration en DiD de 400  $\mu\text{M}$  ont été préparées, l'une avec un tampon HBS (Hepes : 0,02 M / EDTA : 0,01 M) qui correspond au tampon de greffage qui sera utilisé ultérieurement (voir Chapitre 6), et l'autre avec de l'eau déionisée. Ces solutions sont ensuite aliquotées et diluées (respectivement avec le tampon HBS et de l'eau déionisée) de manière à obtenir une concentration en DiD de 100  $\mu\text{M}$ . Le pH de chaque aliquot est ajusté via l'ajout de base ou d'acide forts (NaOH 1 M / HCl 1M). Neuf solutions dans le tampon HBS (pH compris entre 3 et 11) et treize solutions dans l'eau déionisée (pH compris entre 1,5 et 12,75) ont ainsi été préparées. Régulièrement, 10  $\mu\text{L}$  de chaque aliquot sont prélevés et dilués dans 990  $\mu\text{L}$  d'eau déionisée de manière à obtenir une concentration de fluorophores de 1  $\mu\text{M}$ , puis les spectres d'absorption et d'émission de ces solutions sont enregistrés.

Il est à noter qu'une dérive du pH a été observée au cours du temps. En effet, une acidification des solutions les plus basiques a été observée, notamment pour les solutions préparées avec l'eau déionisée. Cette acidification peut être due à la migration des acides gras piégés dans les globules vers la surface, libérant ainsi leur hydrogène labile dans le milieu continu. Cependant, elle est plus sûrement liée à l'apparition de certains produits de dégradation acides lors de l'oxydation des lipides [86, 87] (voir Chapitre III).

La Figure IV-18 représente l'intégrale du signal de fluorescence en fonction du pH des solutions, juste après leur préparation et après 100 jours de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière. Lorsque le pH a été modifié après 100 jours, le nouveau point correspondant est indiqué par une flèche.

La Figure IV-19 représente quant à elle l'évolution de la fluorescence dans le temps pour trois solutions caractéristiques (pH 1,5 ; pH 6 ; pH 10).

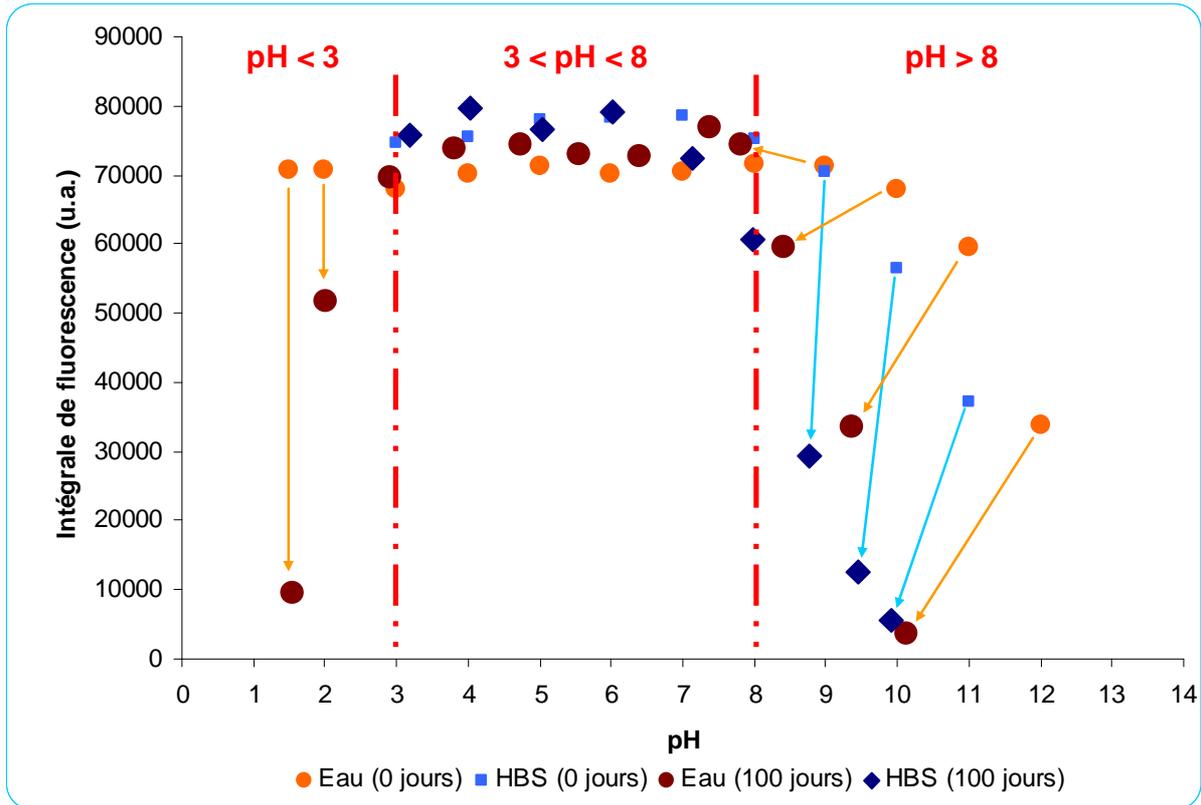


Figure IV-18 : Evolution de la fluorescence en fonction du pH.

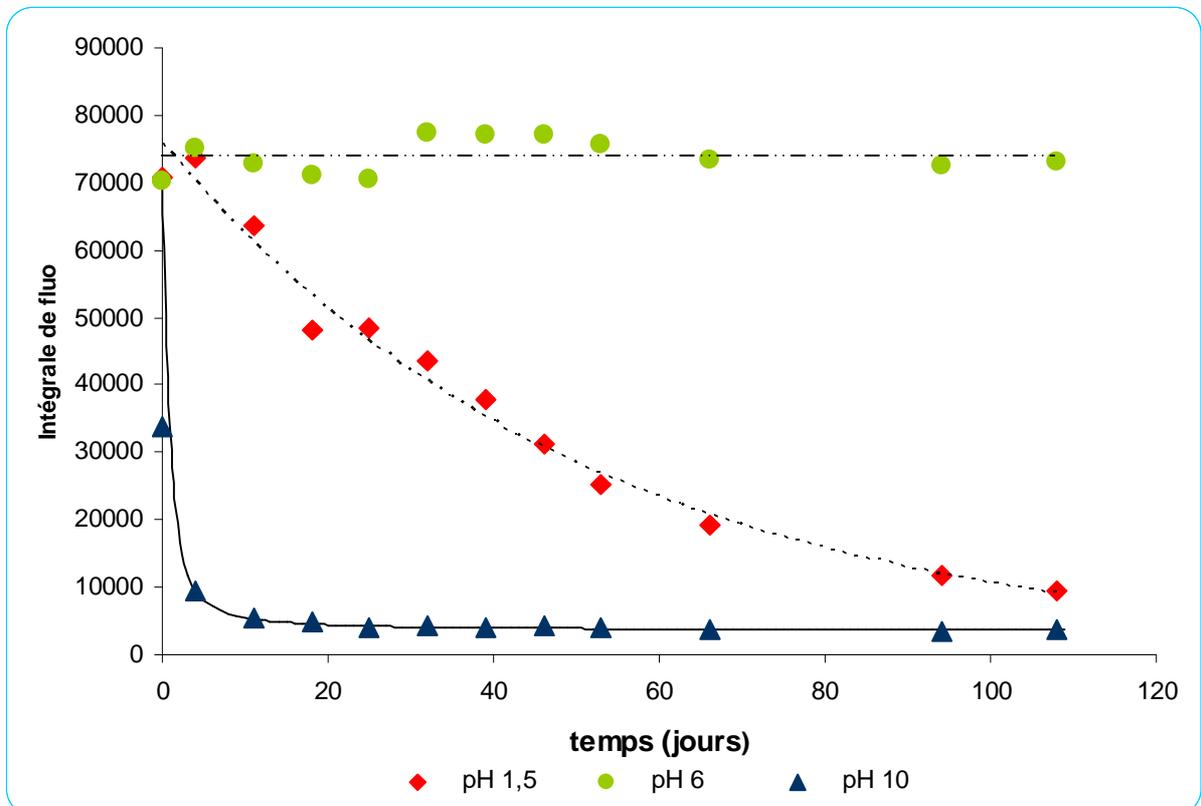


Figure IV-19 : Evolution de la fluorescence en fonction du temps pour trois solutions de pH différents.

L'analyse de ces deux graphiques met en évidence l'existence de trois comportements différents qui sont fonction du pH :

- Pour les pH compris entre 3 et 8, la fluorescence est stable au cours du temps.
- Pour les pH supérieurs à 8 (faiblement basiques à basiques), le signal de fluorescence diminue quand le pH augmente. Cette baisse de fluorescence est relativement rapide puisqu'elle intervient dans les premiers jours. D'un point de vue visuel, la diminution de la fluorescence s'accompagne d'une évolution de la coloration : les solutions passent du bleu au vert puis au jaune pour les solutions les plus basiques. L'analyse des spectres d'absorption permet d'expliquer ce phénomène de jaunissement des solutions par une dégradation chimique du fluorophore. En effet, la comparaison des spectres d'une solution à pH 6 (restée bleue) et d'une solution à pH 10 (devenue jaune) met en évidence la disparition de la bande d'absorption du fluorophore à 650 nm, ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande à 465 nm pour la solution à pH 10 (Figure IV–20). L'excitation de cette nouvelle bande d'absorption engendre de la fluorescence avec un maximum d'émission à 497 nm. Les conditions basiques entraînent donc une dégradation chimique du fluorophore qui modifie ses propriétés optiques.

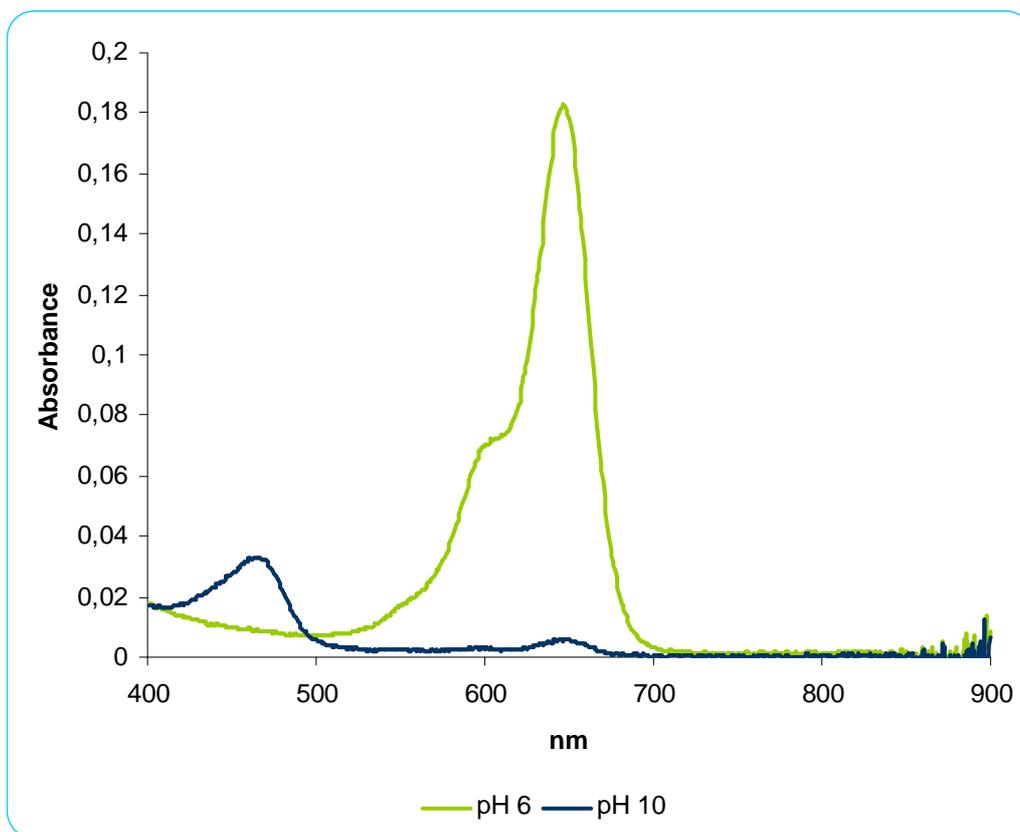


Figure IV–20 : Comparaison des spectres d'absorption de solutions dont le pH est basique et neutre.

- Pour les pH inférieurs à 3 (fortement acides), le signal de fluorescence diminue dans le temps. Cependant, cette décroissance est beaucoup plus lente que celle observée en milieu basique. D'un point de vue visuel, on observe la formation de « grains » et les solutions deviennent opaques. Ce constat est confirmé par l'analyse des spectres d'absorption de la solution à pH fortement acide (Figure IV-21) ; celle-ci montre en effet une très forte augmentation de l'absorbance liée au phénomène de diffusion, ainsi qu'une diminution de l'absorbance du fluorophore. La diminution de l'intensité de fluorescence est donc à la fois liée à une dégradation du fluorophore mais aussi à une déstabilisation colloïdale. Néanmoins, la dégradation du fluorophore doit suivre un mécanisme différent de celle observée en milieu en basique car le phénomène de jaunissement n'a pas été détecté.

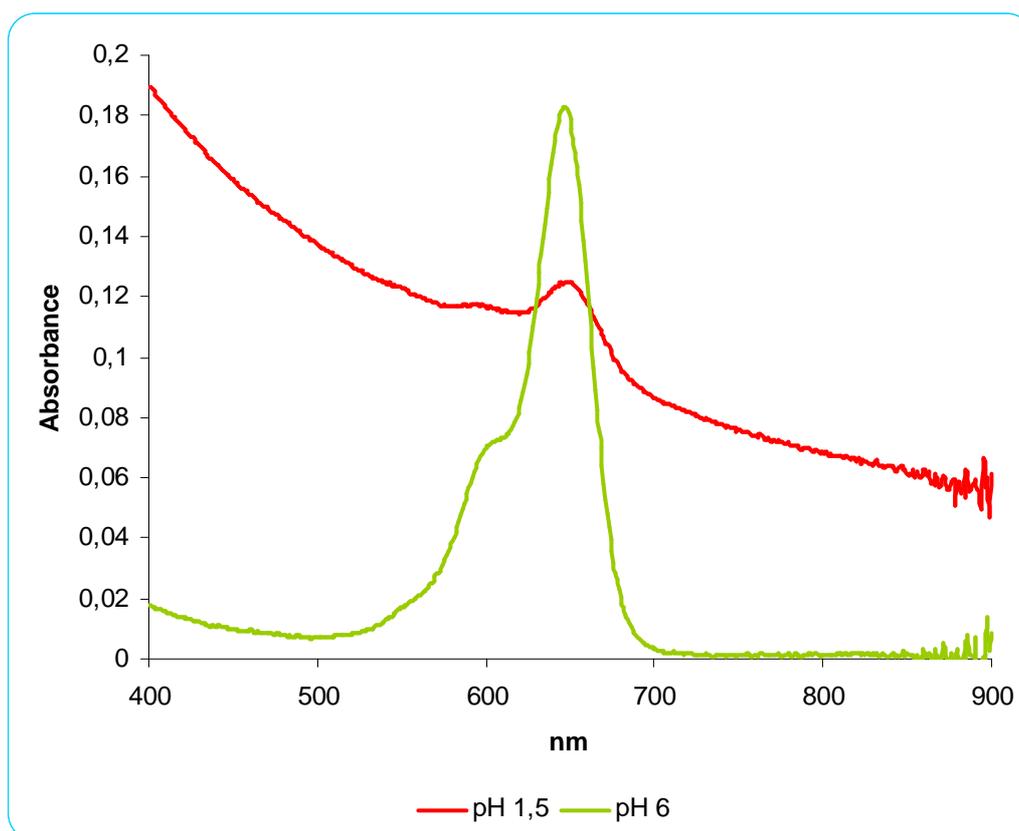


Figure IV-21 : Comparaison des spectres d'absorption de solutions dont le pH est acide et neutre.

En conclusion, nous pouvons dire que les fluorophores de type dialkylcarbocyanine (DiD et DiR) sont bien encapsulés dans les nano-émulsions. Cependant, ils restent sensibles au milieu extérieur et plus particulièrement au pH. En effet, deux types de dégradation ont été

observés : l'un en milieu basique et l'autre en milieu fortement acide, ce dernier s'accompagnant d'une déstabilisation des nano-émulsions. Toutefois, pour un pH compris entre 3 et 8, la fluorescence est très stable puisqu'elle est supérieure à une année (Figure IV–22).

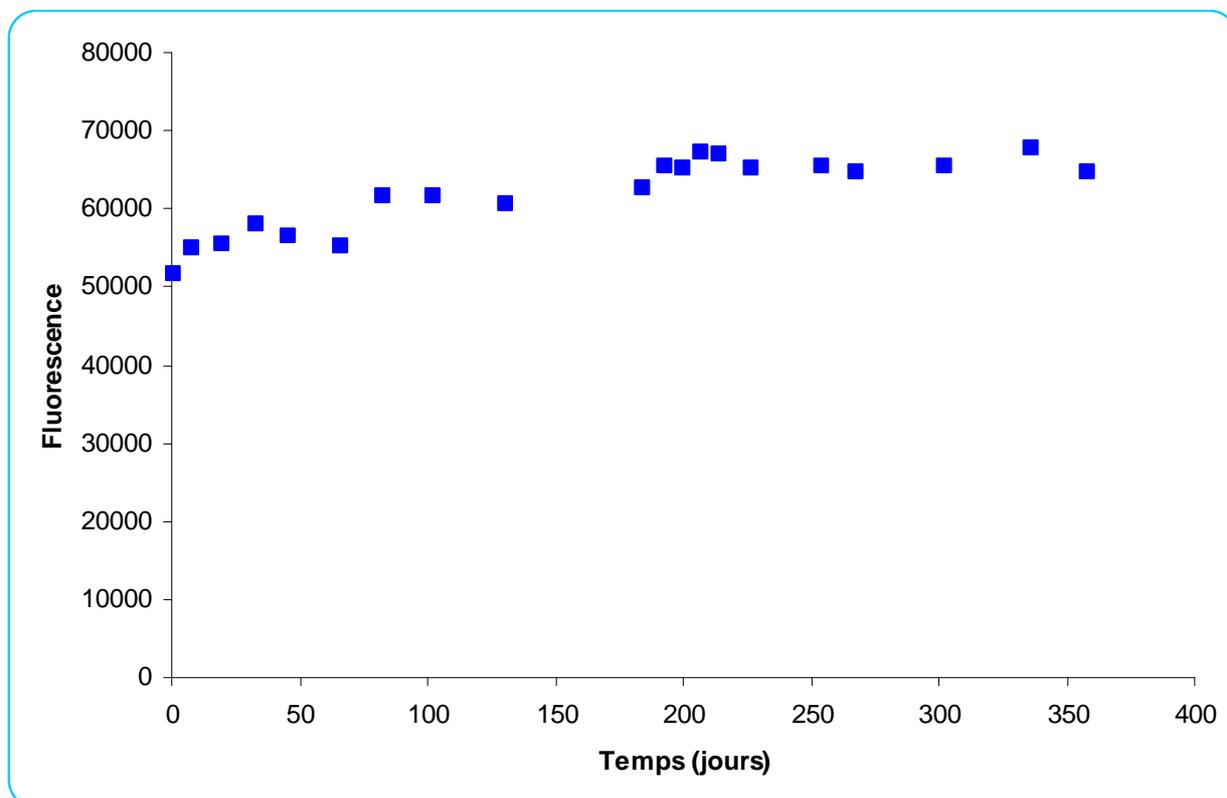


Figure IV–22 : Evolution de la fluorescence avec le temps. La solution suivie est une nano-émulsion issue de la formulation de référence dopée en DiD à 400  $\mu\text{M}$ . Le pH de la solution tampon (Hepes : 0,02 M / EDTA : 0,01 M) est d'environ 5,5. La solution est conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'unité de fluorescence est une unité arbitraire.

## IV.6. Discussion et conclusions

### IV.6.1. Discussion

Les résultats obtenus démontrent que l'encapsulation de fluorophores lipophiles dans les nanoparticules confère aux nano-émulsions de très bonnes propriétés optiques.

Elle n'engendre pas de décalage significatif des spectres d'absorption et d'émission des fluorophores lipophiles DiD ( $\lambda_{abs}^{max} = 644 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{flu}^{max} = 665 \text{ nm}$ ) et DiR ( $\lambda_{abs}^{max} = 748$

nm ;  $\lambda_{fluo}^{max} = 775$  nm) par rapport à leur solvation dans le méthanol (IV.4.1). On observe néanmoins une augmentation de la durée de vie de fluorescence lors de l'encapsulation dans les nanoparticules des fluorophores DiD ( $\tau = 2000$  ps dans les nano-émulsions contre  $\tau = 1200$  ps dans le méthanol) et DiR ( $\tau = 1200$  ps dans les nano-émulsions contre  $\tau = 800$  ps dans le méthanol) (IV.4.3). En ce qui concerne les rendements quantiques de fluorescence, seul le DiD semble profiter de l'encapsulation ( $\Phi = 0,38$  dans les nano-émulsions contre  $\Phi = 0,33$  dans le méthanol) puisque l'efficacité de fluorescence du DiR est légèrement inférieure à celle mesurée lorsque le DiR est en solution dans le méthanol ( $\Phi = 0,25$  dans les nano-émulsions contre  $\Phi = 0,28$  dans le méthanol) (IV.4.2).

Nous pensons que le paramètre qui entraîne les améliorations des propriétés optiques est la viscosité du milieu dans lequel évoluent les fluorophores, qui module les probabilités de désexcitations non radiatives.

Il est connu que certains fluorophores peuvent, pour des raisons énergétiques, changer de configuration à l'état excité, par exemple par rotation de la molécule autour d'au moins une de ses liaisons, pour prendre une autre géométrie ; on parle alors de photo-isomérisation. Le cas de la photo-isomérisation du 11-cis rétinol qui est à l'origine du mécanisme de la vision en est un parfait exemple (Figure IV-23). Ainsi, après absorption de l'énergie lumineuse, les deux tiers des molécules de 11-cis rétinol à l'état excité changent de configuration pour devenir tout trans rétinol, ce qui déclenche une cascade réactionnelle aboutissant à l'envoi d'impulsions électriques dans le nerf optique à destination du cerveau.

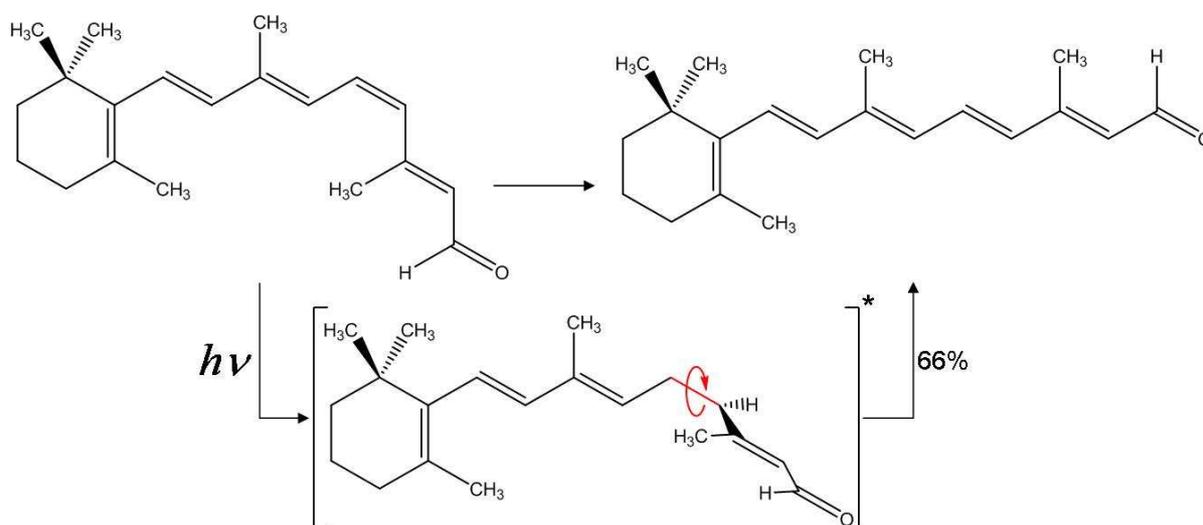


Figure IV-23 : Photo-isomérisation du 11-cis rétinol en tout trans rétinol.

Les cyanines, dont font partie le DiD et le DiR, ont également été décrites comme pouvant se photo-isomériser par un processus similaire à celui précédemment décrit [104]. Ainsi une fois excitées (état  $S_1$ ), une partie des molécules de cyanines (probabilité  $k_{conf}$ ) vont changer de configuration (état  $S_1^{conf}$ ) car ce nouvel état est énergétiquement plus stable. Cependant, l'état  $S_1^{conf}$  n'est pas un état émissif ; la molécule retourne donc à l'état fondamental par une désexcitation non radiative (Figure IV-24). Ce phénomène de photo-isomérisation est concurrent de l'émission de fluorescence et contribue donc à diminuer la concentration de molécules à l'état excité ( $S_1$ ), ce qui entraîne une diminution de l'efficacité de fluorescence.

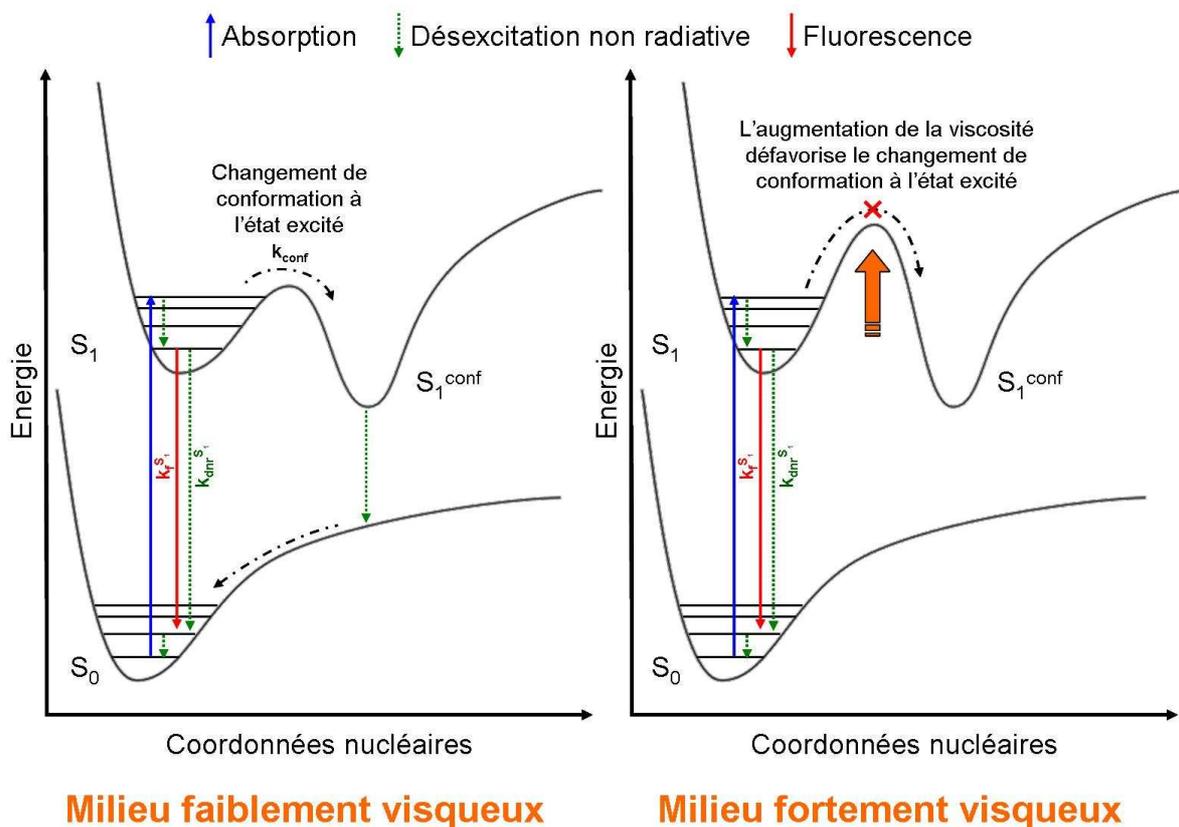


Figure IV-24 : Schéma simplifié des états électroniques fondamentaux et excités d'une molécule fluorescente pouvant changer de configuration à l'état excité en fonction de la viscosité du milieu.

En simplifiant, il y a ainsi pour le fluorophore à l'état excité  $S_1$  trois voies de retour à l'état fondamental :

- l'émission de fluorescence (avec un taux  $k_f^{S_1}$ )
- la désexcitation non radiative (avec un taux  $k_{dnr}^{S_1}$ )

- le changement de configuration (avec un taux  $k_{conf}$ )

Le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_f$ ) et la durée de vie de fluorescence ( $\tau_f$ ) peuvent également être décrits à partir des différents taux de désexcitation grâce aux équations suivantes (Équations IV-7 et IV-8 respectivement) :

$$\Phi_f = \frac{k_f^{S_1}}{\sum_i k_i} = \frac{k_f^{S_1}}{k_{dnr}^{S_1} + k_f^{S_1} + k_{conf}} \quad (\text{Équation IV-7})$$

$$\tau_f = \frac{1}{\sum_i k_i} = \frac{1}{k_{dnr}^{S_1} + k_f^{S_1} + k_{conf}} \quad (\text{Équation IV-8})$$

$\sum_i k_i$  qui représente l'ensemble des phénomènes de désexcitation possible est ici ramené aux trois phénomènes précédemment décrits.

Le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence sont ainsi liés par la relation suivante (Équation IV-9) :

$$\Phi_f = k_f^{S_1} \times \tau_f \quad (\text{Équation IV-9})$$

Le changement de configuration relatif à la photo-isomérisation est influencé par la viscosité. En effet, plus le solvant sera visqueux, plus la vitesse de formation de la nouvelle configuration à l'état excité sera lente car la rotation sera mécaniquement gênée (Figure IV-24). Ainsi  $k_{conf}$  diminue en milieu visqueux, et la durée de vie de l'état excité augmente (Équation IV-8). De plus, le rapport de l'émission de fluorescence ( $k_f^{S_1}$ ) sur l'ensemble des processus de désexcitation augmente puisque  $k_{conf}$  est plus faible, ce qui explique l'amélioration du rendement quantique de fluorescence (Équation IV-7). Cela confirmerait également l'évolution de l'efficacité de fluorescence observée lors de l'étude de la modification du cœur lipophile des nanoparticules, au cours de laquelle il a été démontré que plus la phase huileuse est riche en Suppocire<sup>®</sup> NC plus le rendement quantique est important (Tableau IV-6).

Ces explications correspondent aux observations effectuées sur les nano-émulsions dopées en DiD, et partiellement à celles réalisées avec les nano-émulsions dopées DiR. Comme la chaîne polyéthylène du DiR est plus longue que celle du DiD, la molécule est plus « flexible » ; on peut alors supposer que l'effet de la viscosité sera plus faible et que  $k_{conf}$  diminuera plus légèrement que dans le cas du DiD. Ainsi cette flexibilité pourrait expliquer

les gains moins importants sur la durée de vie de fluorescence engendrés par l'encapsulation de DiR par rapport au DiD.

Cependant, cela n'explique toujours pas pourquoi le rendement quantique du DiR est plus faible quand il est encapsulé dans les particules que lorsqu'il est en solution dans le méthanol. Comme la durée de vie de fluorescence augmente mais le rendement quantique diminue et que ces deux paramètres sont liés par l'équation IV-9, cela implique que  $k_f^{S_1}$  est plus faible quand le DiR est confiné dans les nanoparticules que lorsqu'il est en solution dans le méthanol.

Il semble ainsi que l'effet de l'encapsulation ne soit pas uniquement dû à la viscosité mais également à la nature même du solvant. La viscosité à l'intérieur des globules permet de diminuer  $k_{conf}$ , mais le mélange de glycérides qui compose le cœur lipidique semble par ailleurs affaiblir  $k_f^{S_1}$  et a aussi certainement une influence sur les autres processus de désexcitation non radiatifs.

L'encapsulation des fluorophores lipophiles dans les nano-émulsions est d'un point de vue optique très bénéfique. Néanmoins, d'un point de vue de la stabilité chimique et de la protection des molécules fluorescentes vis-à-vis du milieu extérieur, l'encapsulation semble moins profitable (IV.5.2).

En effet, le fluorophore se dégrade rapidement en milieu basique (pH > 8) et en milieu fortement acide (pH < 3) ce qui indique que des espèces chimiques, et plus particulièrement des protons peuvent diffuser du milieu continu vers le cœur des globules.

La gamme de pH pour laquelle la fluorescence reste stable ( $3 < \text{pH} < 8$ ) est tout de même suffisamment large pour être compatible avec les milieux biologiques. Le sang, qui est le principal milieu dans lequel les nano-émulsions séjournent *in vivo*, a en effet une valeur de pH autour de 7,4.

L'expérience de photoblanchiment a d'autre part montré une plus grande stabilité de la fluorescence des fluorophores encapsulés dans les nano-émulsions par rapport à celle des molécules fluorescentes hydrophiles analogues au DiD.

L'encapsulation des fluorophores est également satisfaisante du point de vue de la stabilité physique puisque nous n'observons pas de diffusion des molécules fluorescentes des globules vers le milieu continu. Ce paramètre est primordial pour l'imagerie de fluorescence *in vivo* si l'on veut pouvoir associer le signal détecté à la présence des nano-émulsions et non uniquement au fluorophore.

## IV.6.2. Conclusion

En conclusion, l'encapsulation de fluorophores lipophiles ne perturbe ni la taille des nanoparticules, ni leur potentiel zêta et ne modifie pas non plus leur stabilité dans le temps.

En revanche, l'insertion de molécules fluorescentes (DiD ou DiR) dans le cœur des nanoparticules permet de conférer à ces dernières de très bonnes propriétés optiques (rendement quantique et durée de vie de fluorescence). Les nanoparticules fluorescentes étant *in fine* en solution aqueuse, ces propriétés doivent être comparées à celles des fluorophores hydrophiles analogues tels que le Cy5, le Cy 7 et l'Alexa 750, qui sont parmi les fluorophores organiques les plus performants disponibles commercialement (Tableau IV-11).

Fluorophore	Solvant	$\lambda_{abs}^{max}$	$\lambda_{Fluo}^{max}$	$\phi$	$\tau$
Cy5	PBS	646 nm	663 nm	0,28	1000 ps
DiD	Méthanol	644 nm	665 nm	0,33	1200 ps
DiD	Nano-émulsions	646 nm	668 nm	0,38	2000 ps
Cy7	PBS	749 nm	774 nm	0,13	450 ps
Alexa 750	PBS	747 nm	775 nm	0,11	500 ps
DiR	Méthanol	747 nm	774 nm	0,28	800 ps
DiR	Nano-émulsions	748 nm	775 nm	0,25	1200 ps

**Tableau IV-11 : Résumé des principales caractéristiques optiques des fluorophores lipophiles en milieu organique et encapsulés dans les nano-émulsions, ainsi que celles des molécules fluorescentes hydrophiles analogues au DiD et au DiR.**

Il est évident, d'après les données rassemblées dans ce tableau, que les nano-émulsions fluorescentes sont d'un point de vue optique nettement plus performantes que les fluorophores hydrophiles commerciaux actuels. Leurs propriétés optiques leur permettent de soutenir la comparaison avec les nano-cristaux semi-conducteurs de type boîte quantique (quantum dots). Ces nanoparticules inorganiques possèdent en effet des caractéristiques optiques remarquables. Elles ont des rendements quantiques compris entre 0,20 et 0,65, une très grande stabilité au photoblanchiment, des durées de vie de fluorescence de l'ordre de la dizaine de nanosecondes, un spectre d'absorption très large, et un spectre d'émission étroit [39, 105]. Cependant, leur caractère inorganique et notamment la présence de métaux lourds et toxiques (cadmium, plomb, mercure ou arsenic par exemple) rend leur utilisation *in vivo* problématique

## Chapitre IV : Nano-émulsions fluorescentes

---

[88, 89]. Les nano-émulsions fluorescentes apparaissent donc comme une alternative biocompatible à ces particules, pour lesquelles le comportement en milieu biologique reste à étudier.



**Chapitre V :**  
**Comportement des**  
**nano-émulsions en**  
**milieu biologique**

Les chapitres précédents ont présenté le développement et l'étude de nouvelles nanoparticules fluorescentes dans le proche infrarouge. Ils ont montré que les propriétés physico-chimiques et optiques de ces nouvelles formulations de nano-émulsions font de ces objets des traceurs prometteurs pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*. Les objectifs de ce chapitre sont d'étudier le comportement des nano-émulsions dans la souris saine, et notamment d'obtenir des premières indications sur la toxicité et la biodistribution de ces nanoparticules.

Dans un premier temps, il convient de déterminer la voie d'administration des nano-émulsions dans les souris. Le système sanguin irriguant tous les organes et tissus de l'organisme, cela fait de lui une voie privilégiée pour atteindre les tissus ou cellules ciblés. Il existe plusieurs voies d'accès au système sanguin : les voies entérales (principalement au niveau de la muqueuse gastro-intestinale et de la zone sublinguale), la voie percutanée, la voie pulmonaire et les voies parentérales (injection sous-cutanée, musculaire ou veineuse). Le mode d'administration que nous avons privilégié pour l'étude des nano-émulsions est l'injection par voie veineuse, car elle permet de s'affranchir des différents problèmes d'absorption liés aux autres voies et permet ainsi de maîtriser réellement la quantité en circulation dans le sang au moment de l'administration.

## ***V.1. Le sang, un véhicule de distribution et d'élimination des nanoparticules***

Comme expliqué dans l'introduction, les nano-émulsions vont être injectées directement dans le sang afin de s'affranchir de leur passage à travers certaines barrières biologiques (intestin, peau, ...). C'est lors de leur séjour dans le compartiment sanguin que se joue le devenir des particules. Il est donc utile de rappeler la composition de ce milieu ainsi que les processus d'élimination qui participent au maintien de ses nombreuses et indispensables fonctions.

### V.1.1. Composition du sang

Le sang est un fluide corporel dont la fonction principale est de transporter les nutriments et l'oxygène vers les tissus biologiques. Il joue également un rôle primordial dans le système immunitaire. Les cellules du sang sont les érythrocytes ou globules rouges (environ 99 % des cellules du sang), les leucocytes ou globules blancs (0,2%) et les thrombocytes ou plaquettes (entre 0,6 et 1 %).

- Les globules rouges ne sont pas réellement des cellules car ils ne possèdent pas de noyau ni d'organites. Ils contiennent principalement de l'hémoglobine, une protéine dont la fonction est de transporter l'oxygène mais également le dioxyde de carbone issu de la respiration cellulaire.
- Les globules blancs regroupent différentes cellules du système immunitaire : les granulocytes, les lymphocytes et les monocytes.
- Les thrombocytes ne sont pas non plus des cellules en tant que telles car à l'instar des globules rouges ils n'ont pas de noyau. Ils initient la polymérisation du fibrinogène, protéine du plasma, et sont ainsi responsables de la coagulation sanguine.

Ces cellules représentent seulement 45 % du sang complet. Les 55 % restant constituent le plasma sanguin, liquide assurant la suspension des cellules sanguines. Le plasma est une solution aqueuse (l'eau représente 91% de la masse totale du plasma) contenant de nombreuses molécules organiques et inorganiques. Il est effectivement composé de nombreux ions participant entre autres à l'activité catalytique de plusieurs enzymes, à la stabilisation des membranes cellulaires, et au maintien du pH sanguin entre 7,35 et 7,45 grâce à leur pouvoir tampon.

La pression osmotique et le pH du sang sont ainsi des paramètres critiques et il est important de ne pas les modifier lors des injections au risque de détruire les globules rouges. Le plasma transporte également de nombreuses molécules organiques que l'on peut classer en deux catégories : les substances en transit et les protéines plasmatiques. Les substances en transit correspondent aux nutriments tels que le glucose, les acides aminés et les lipides (sous forme de lipoprotéines), les hormones et les déchets métaboliques comme l'urée. Les protéines plasmatiques, quant à elles, sont des protéines qui ont vocation à rester dans le sang. Elles contribuent notamment à maintenir le pH et à équilibrer la pression osmotique. Parmi

les protéines plasmatiques, on peut entre autres citer l'albumine, le fibrinogène, mais également les anticorps (immunoglobulines) et les protéines du complément qui jouent un rôle prépondérant dans le système immunitaire.

### V.1.2. La circulation sanguine des nanoparticules

L'injection des nano-émulsions se fait dans la veine caudale de la souris. Cette veine permet au sang de remonter vers l'oreillette droite du cœur, puis de passer dans le ventricule droit qui l'envoie dans l'artère pulmonaire en direction des poumons pour être ré-oxygéné. Il retourne ensuite vers le cœur au niveau de l'oreillette gauche via la veine pulmonaire, puis passe dans le ventricule gauche qui va le projeter dans l'aorte. Cette dernière, en se subdivisant en de nombreuses artères et artérioles, permet d'irriguer tous les organes de l'organisme. Le sang est ensuite collecté au niveau des organes par un réseau de veines qui vont ensuite se déverser dans l'oreillette droite du cœur, et entamer ainsi un nouveau cycle.

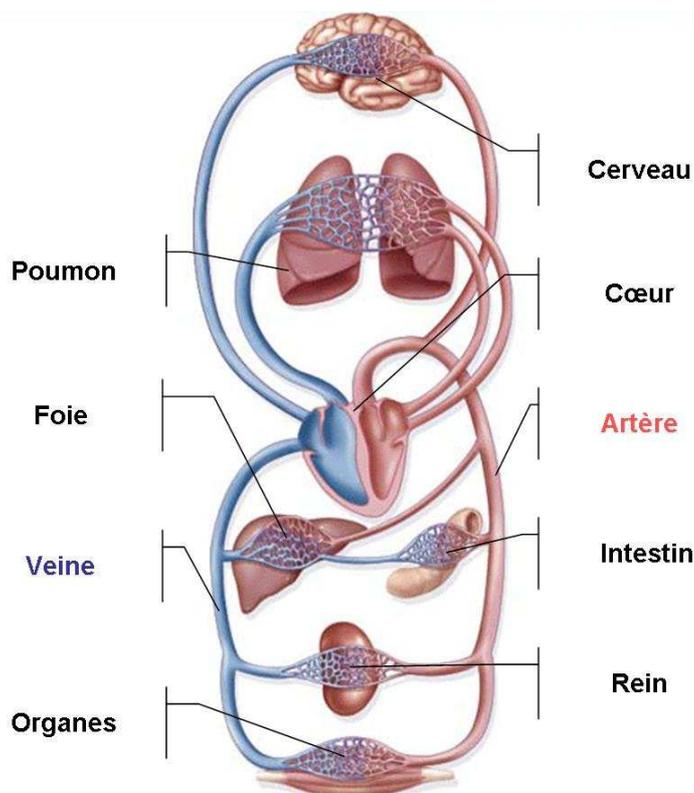


Figure V-1 : Schéma de la circulation sanguine.

Les plus petits vaisseaux sanguins humains font autour de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre ; pour la souris ce diamètre est légèrement plus faible (3  $\mu\text{m}$ ) [106]. Les globules des nano-émulsions

ont un diamètre inférieur à 100 nm ; ils ne devraient donc pas rester bloqués dans les vaisseaux pour des raisons géométriques. Cependant, il est possible qu'ils puissent s'échapper de la circulation sanguine à travers des fenestrations dans les cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins. La taille de ces fenestrations dépend de chaque organe.

### V.1.3. L'élimination des nanoparticules du sang

Le sang a également pour fonction de transporter les éléments indésirables vers les organes qui vont les traiter. Ces éléments indésirables sont en grande majorité des déchets liés au fonctionnement de l'organisme (acide lactique, urée ou déchets de cellules sanguines par exemple), mais peuvent aussi être de nature étrangère (toxines, métabolites de médicament, bactéries, et vecteurs colloïdaux).

Les éléments indésirables sont soit directement excrétés hors de l'organisme, soit pris en charge par le système réticuloendothélial afin d'être dégradés, puis excrétés. Les principaux organes d'excrétion sont les reins, et dans une moindre mesure le foie. Les paragraphes suivants détaillent brièvement le rôle des reins, du système réticuloendothélial et de deux organes fortement associés à « l'entretien » du sang, le foie et la rate.

#### V.1.3.1. Le rein

Le rein est le principal organe d'excrétion. La purification est effectuée par filtration du sang suivi de la réabsorption de certains des éléments filtrés. Le rein est notamment responsable de l'excrétion de l'urée et de l'acide lactique, du maintien du pH sanguin et plus largement de la concentration dans le sang de nombreux ions et molécules. Il est également responsable d'une grande partie de l'élimination des métabolites des principes actifs des médicaments. Il semble cependant qu'il y ait une taille limite au-delà de laquelle les objets ne peuvent plus être éliminés par le rein, car trop volumineux pour être filtrés. La taille des pores, appelés également fenestrations, est d'environ 60 nm. Cependant, ces pores sont recouverts d'un diaphragme en forme de roue étoilée qui obstrue une grande partie de l'ouverture [107, 108]. Ainsi l'élimination des particules colloïdales est souvent liée à d'autres processus impliquant notamment le système réticuloendothélial.

### V.1.3.2. Le système réticuloendothélial

Le système réticuloendothélial correspond à une partie du système immunitaire en charge de l'élimination des corps étrangers (particules ou bactéries) et des cellules sanguines en fin de vie. Au cours de leur transit, les objets indésirables sont marqués par des opsonines ce qui va déclencher leur phagocytose par les macrophages. Les opsonines regroupent les anticorps et certaines protéines du complément qui vont se lier à la surface des éléments à éliminer. Les anticorps sont spécifiques des antigènes présents à la surface des corps étrangers, les antigènes étant généralement des protéines, des polysaccharides ou des dérivés lipidiques. Les protéines du complément peuvent quant à elles se fixer spontanément sur toutes les surfaces. Des mécanismes de régulation permettent néanmoins de supprimer rapidement la complexation des protéines du complément sur les cellules de l'organisme, évitant ainsi leur destruction. Les macrophages possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques des opsonines activées. Une fois les particules opsonisées reconnues par les macrophages, ceux-ci vont développer une invagination de manière à encapsuler la particule dans une vésicule appelée phagosome qui va être internalisée au sein de la cellule. Celle-ci fusionne ensuite avec un lysosome pour former un phagolysosome afin de dégrader la particule. Si la particule est dégradée par le cocktail d'enzymes, par le peroxyde d'hydrogène ou par les anions superoxydes générés dans le phagolysosome, alors les produits de dégradation sont absorbés par le macrophage ou rejetés à l'extérieur de la cellule. En revanche, si les particules ne sont pas dégradées, alors elles restent piégées dans les phagosomes au sein des cellules phagocytaires, jusqu'à la mort du macrophage.

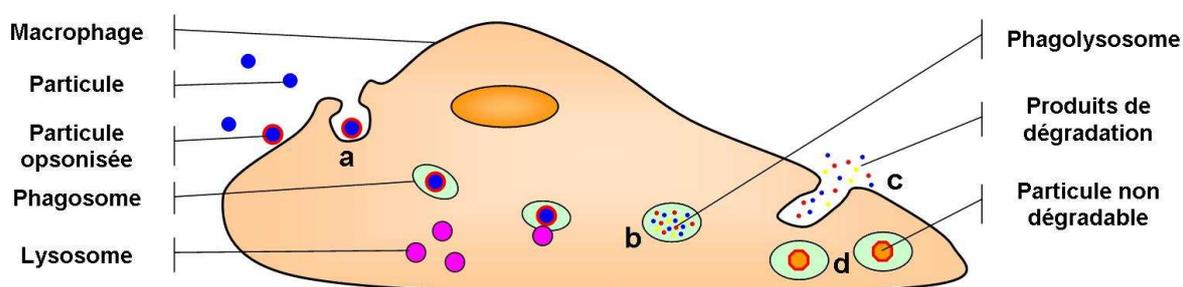


Figure V-2 : Phagocytose d'une particule par un macrophage : (a) internalisation de la particule dans un phagosome ; (b) dégradation de la particule après fusion du phagosome et d'un lysosome ; (c) les produits de dégradation sont absorbés par le macrophage ou expulsés hors de la cellule ; (d) les particules non dégradables sont conservées par la cellule dans ses phagosomes.

### V.1.3.3. Le foie

Le foie est le principal lieu de métabolisation de l'organisme, il est également responsable d'une partie de l'excrétion, et il joue aussi un rôle important dans le système réticuloendothélial.

Les veines irrigant le foie se subdivisent en sinusoides, sorte de capillaires dont les parois sont fortement fenestrées. Les fenestrations font entre 100 et 300 nm de diamètre et sont dépourvues de diaphragme ; elles représentent entre 6 et 8 % de la surface totale des capillaires [109]. On peut donc considérer les sinusoides comme un tamis autorisant ou non le passage des particules vers les hépatocytes. Ainsi les nanoparticules dont la taille est inférieure à celles des pores vont pouvoir traverser l'endothélium et passer dans l'espace de Disse où elles seront en contact avec les hépatocytes. Le passage des fenestrations est à double sens et les nanoparticules peuvent repasser de l'espace de Disse vers la sinusoides. A l'inverse, les particules dont la taille est trop importante pour franchir les fenestrations vont rester dans la circulation sanguine.

La principale fonction du foie est la métabolisation. Les hépatocytes sont effectivement fortement impliqués dans de nombreux processus métaboliques : celui des lipoprotéines au cours duquel les fenestrations de l'endothélium jouent un rôle primordial puisqu'il discrimine les chylomicrons selon leur diamètre, mais aussi les métabolismes du glucose et de certaines protéines. Ces cellules sont également en charge de la détoxification de l'organisme, et en particulier de la dégradation des toxines et des principes actifs absorbés lors de la digestion. Le foie est en effet le premier organe à travers lequel le sang chargé des molécules issues de l'intestin va passer. Les hépatocytes sont aussi responsables de la production de la bile, qui sert à la digestion des graisses ingérées. Certaines molécules absorbées (et dégradées) par les hépatocytes peuvent ainsi être libérées dans les canalicules biliaires en même temps que la bile. C'est pourquoi le foie est également considéré comme un organe d'excrétion.

Enfin, le foie est fortement impliqué dans le système réticuloendothélial puisqu'une grande majorité des particules opsonisées sont phagocytées par les macrophages résidents du foie : les cellules de Kupffer. Ces cellules, qui se situent en contact avec la circulation sanguine au niveau des sinusoides du foie, représentent la moitié de tous les macrophages du corps humain.

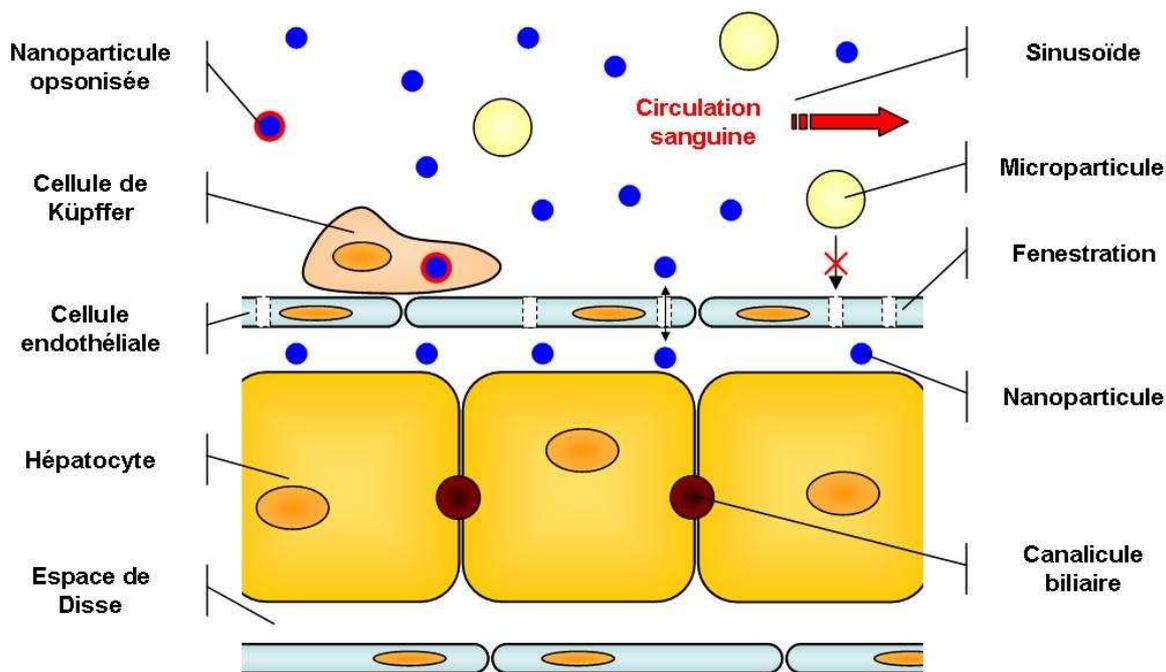


Figure V-3 : Schéma de la structure fine du foie.

#### V.1.3.4. La rate

La rate peut être considérée comme deux organes distincts : un organe du système immunitaire (la pulpe blanche) et un organe phagocytaire (la pulpe rouge). Une des fonctions principales de la rate est l'élimination des érythrocytes en fin de vie, le foie s'occupant plus particulièrement des globules rouges endommagés [110].

L'élimination des globules rouges vieillissants se base sur un procédé de filtration. Les artérioles apportant le sang depuis l'artère splénique dans la pulpe rouge aboutissent dans des sinusoides nommés cordons cellulaires. Ces cordons sont en contact avec les sinus veineux qui permettent l'évacuation du sang. Cependant, ces sinus sont structurés de telle façon que seuls les globules rouges suffisamment flexibles puissent passer. En effet, la paroi des sinus est constituée de cellules endothéliales qui sont toutes parallèles entre elles et par rapport à l'axe du vaisseau sanguin comme les planches de bois d'un tonneau. Un système de fibres de stress permet la formation d'interstices plus ou moins importants entre ces cellules endothéliales. Les fentes ainsi formées sont de forme rectangulaire d'environ 5  $\mu\text{m}$  de long sur moins de 1  $\mu\text{m}$  de large avec une profondeur de 2 à 3  $\mu\text{m}$  [111]. Les érythrocytes ayant une taille d'environ 7  $\mu\text{m}$ , ils doivent se déformer pour pouvoir traverser les interstices. Cependant, en vieillissant ils perdent leur capacité à se déformer et ne peuvent donc plus passer dans les sinus. Les particules ne pouvant pas passer à travers les interstices des sinus

## Chapitre V : Comportement des nano-émulsions en milieu biologique

sont alors prises en charge par les macrophages résidant dans les cordons cellulaires de la pulpe rouge qui éliminent les objets indésirables de la circulation sanguine.

La structuration de l'arborescence sanguine de la rate implique qu'une partie importante du sang transite également à travers la pulpe blanche riches en lymphocytes T. Celle-ci regroupe également une multitude de compartiments lymphoïdes (follicules lymphatiques), ressemblant à autant de ganglions lymphatiques rassemblant de nombreux lymphocytes B. Cette organisation favorise la reconnaissance des antigènes déjà connus par l'organisme, mais également l'établissement d'une réponse immunitaire dite adaptative face à de nouveaux pathogènes.

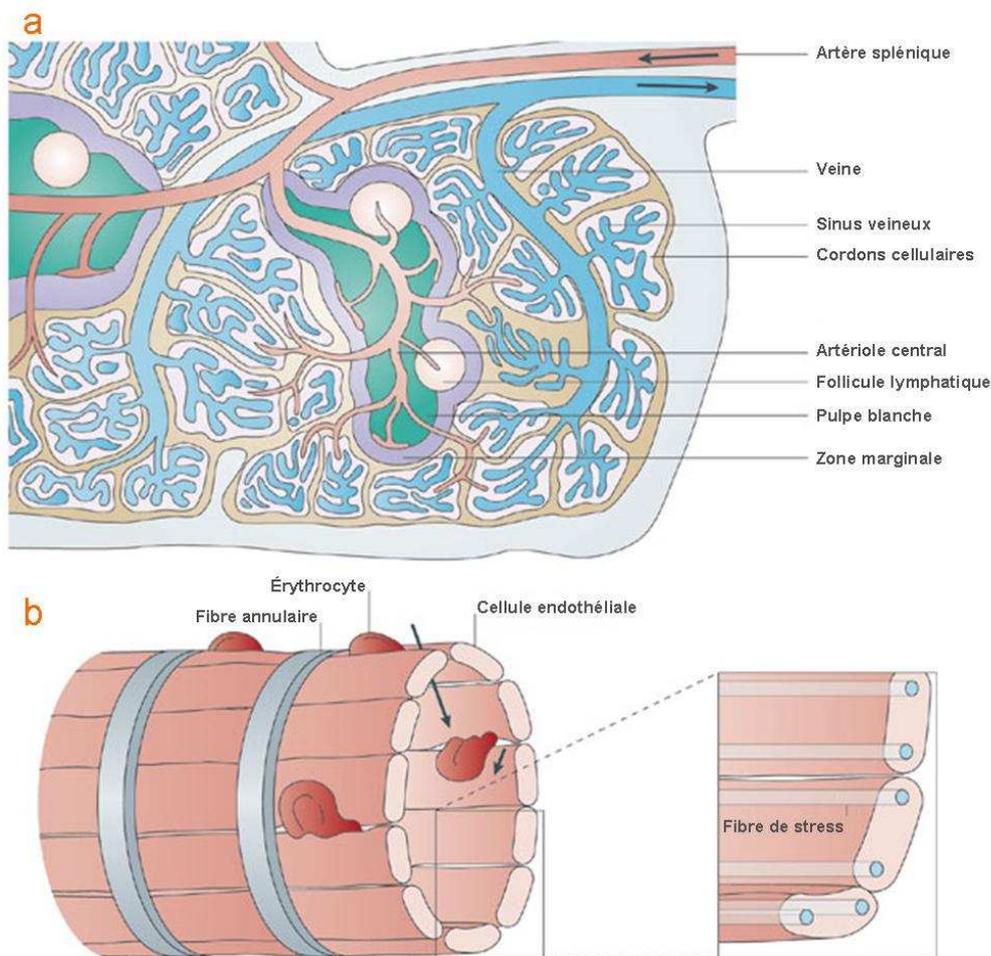


Figure V-4 : a - Schéma de la rate ; b - Schéma d'un sinus veineux situé dans un cordon cellulaire de la pulpe rouge.

La structure histologique de l'endothélium vasculaire de la rate, à l'instar de celle du foie, va donc favoriser l'accumulation des vecteurs colloïdaux dans ces organes. Même en limitant la capture des nanoparticules par les macrophages, notamment grâce à un revêtement

et des charges de surface adaptés, celles-ci peuvent s'accumuler de manière passive (par convection) dans ces tissus.

## **V.2. Compatibilité ex vivo entre le sang et les nano-émulsions**

Avant de passer aux tests *in vivo* sur l'animal, il est important de vérifier que les nano-émulsions fluorescentes et le sang sont compatibles.

### **V.2.1. Stabilité de la fluorescence des nano-émulsions en milieu sanguin**

Un des premiers points à vérifier est la stabilité de la fluorescence des émulsions dans le système sanguin. L'expérience présentée ici a donc pour objectif d'évaluer l'impact de la dispersion des nano-émulsions dans le sang sur leur fluorescence.

#### **V.2.1.1. Protocole expérimental**

Le sang utilisé est du sang d'origine humaine fourni par l'établissement français du sang (EFS). Il a été additionné d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) pour éviter sa coagulation. Une partie du sang est centrifugée (5000 g pendant 5 minutes à température ambiante) pour isoler le plasma.

Une nano-émulsion (formulation de référence) dopée à 400  $\mu\text{M}$  en DiD est préparée selon le protocole décrit précédemment dans le chapitre IV. La solution saline dans laquelle la nano-émulsion est préparée est une solution de chlorure de sodium à 154 mM ; elle est donc isotonique avec le sang. Enfin la nano-émulsion est diluée avec une solution de PBS dont le pH est auparavant ajusté à 7,4, elle aussi isotonique avec le sang, de manière à obtenir une concentration en fluorophores de 50  $\mu\text{M}$ . La solution est stérilisée par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ) avant utilisation.

## Chapitre V : Comportement des nano-émulsions en milieu biologique

Quatre solutions sont ensuite préparées selon les données fournies dans le tableau ci-dessous (Tableau V-1).

Nom de la solution	Composition	
A (Plasma + NE)	1,1 mL de plasma	200 $\mu$ L nano-émulsion
B (Sang + NE)	3 mL de sang	300 $\mu$ L nano-émulsion
C (PBS + NE)	1,1 mL PBS (pH 7,4)	200 $\mu$ L nano-émulsion
D (Sang)	2 mL sang	

**Tableau V-1 : Composition des solutions utilisées pour l'étude de l'évolution de la fluorescence dans le sang. Les 3 mL de sang de la solution B contiennent 1,65 mL de plasma, ainsi la concentration en nano-émulsion (NE) dans le plasma est similaire à celle de la solution A.**

Les solutions sont incubées à 37 °C pendant la durée de l'expérience. Des prélèvements sont ensuite effectués à différents temps (30 minutes ; 1 heure ; 5 heures ; 24 heures et 48 heures) de manière à pouvoir mesurer l'évolution de la fluorescence du plasma ou de la solution saline. Pour les échantillons contenant du sang complet (B et D), 300  $\mu$ L de solution sont centrifugés (5000 g pendant 5 minutes à température ambiante) afin de pouvoir prélever 99  $\mu$ L de plasma qui sont ensuite dispersés dans 551  $\mu$ L de PBS (pH 7,4). Pour les échantillons A et C, 99  $\mu$ L de plasma sont directement prélevés et dispersés dans 551  $\mu$ L de PBS (pH 7,4).

Les solutions ainsi préparées sont rapidement analysées par spectrométrie de fluorescence : les solutions sont soumises à une excitation à 600 nm, et leur émission est recueillie entre 620 et 770 nm.

### V.2.1.2. Résultats et discussion

La Figure V-5 représente l'évolution de l'intégrale du spectre de fluorescence (exprimée en unité arbitraire) en fonction du temps d'incubation pour les 4 solutions.

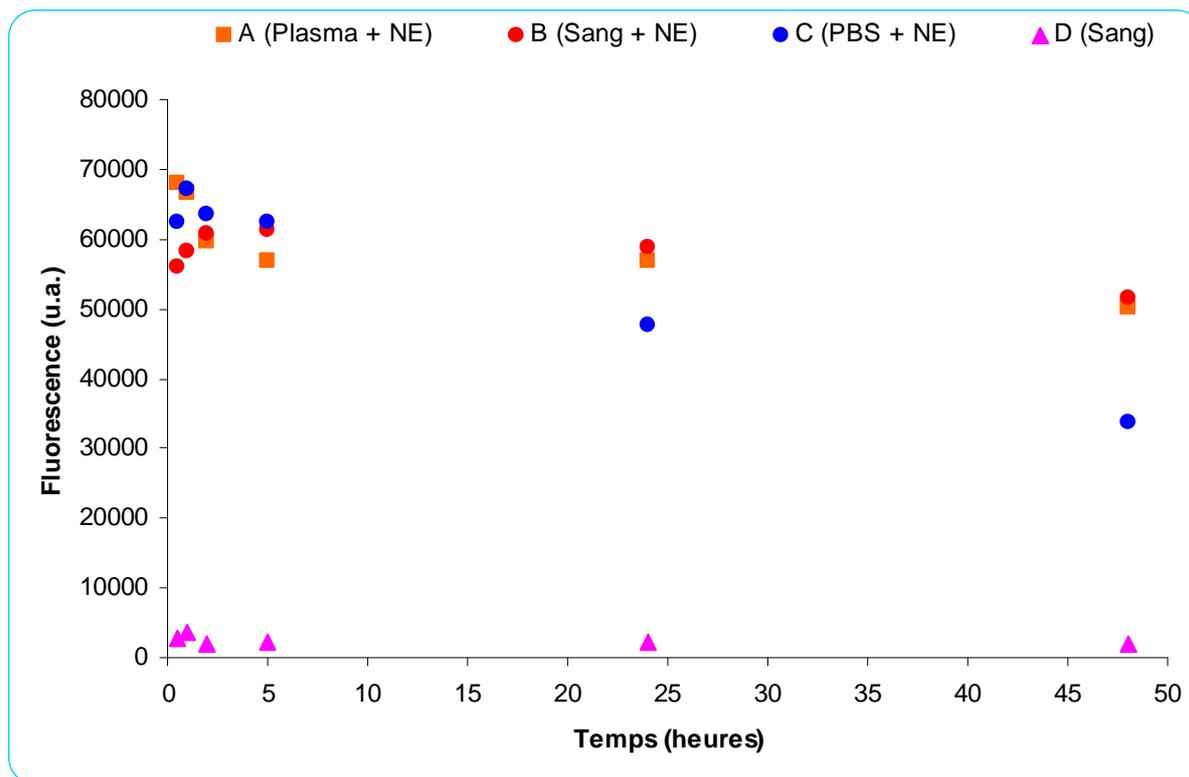


Figure V-5 : Evolution de la fluorescence en fonction du temps. A : 1,1 mL de plasma + 200  $\mu$ L de nano-émulsion ; B : 3 mL de sang + 300  $\mu$ L de nano-émulsion ; C : 1,1 mL de PBS (pH 7,4) + 200  $\mu$ L de nano-émulsion ; D : 2 mL de sang. La fluorescence est exprimée en unité arbitraire.

Premièrement, cette expérience confirme que la dégradation de la fluorescence en milieu légèrement basique est rapide (voir Chapitre IV), puisque la fluorescence dans le PBS (pH de 7,4) a diminué d'environ 50 % en 48 heures d'incubation. Il est de plus vraisemblable que la température d'incubation (37°C) favorise la dégradation chimique du fluorophore.

L'incubation des nano-émulsions avec le plasma ou le sang complet entraîne également une diminution de la fluorescence au cours du temps, mais celle-ci est moins importante qu'avec la solution tampon (PBS ; pH 7,4) puisque qu'elle est inférieure à 20 %. Ainsi la dispersion des nanoparticules dans le plasma permet d'atténuer la dégradation du fluorophore, ce qui laisse supposer que la détérioration du fluorophore n'est pas uniquement due au pH, mais sans doute aussi à la présence de certains ions en solution. Il est à noter que la fluorescence du plasma est tout à fait négligeable.

La diminution de la fluorescence dans le sang complet est donc relativement faible (20 %) sur 48 heures d'incubation à 37°C, ce qui est suffisant pour que les nano-émulsions fluorescentes soient utilisables en imagerie *in vivo*.

### V.2.2. Stabilité des globules rouges en présence de nano-émulsions

Si l'expérience précédente portait sur l'impact du sang sur la fluorescence des nano-émulsions, celle décrite ici se focalise sur l'effet des nano-émulsions sur le sang, et plus particulièrement sur l'hémolyse des globules rouges.

Les globules rouges sont des cellules sensibles aux variations de leur environnement. La modification de leur milieu peut en effet induire leur lyse (on parle alors d'hémolyse) qui conduit à la destruction des globules et à la libération d'hémoglobine dans le plasma.

#### V.2.2.1. Protocole expérimental

C'est l'absorption spécifique de l'hémoglobine qui est utilisée ici pour évaluer l'hémolyse. Cette protéine absorbe fortement autour de 400 nm mais également à 538 nm et 575 nm. Cependant, l'absorption à 400 nm peut être faussée par l'absorption d'autres protéines et la diffusion des particules, et la bande d'absorption à 575 nm est trop proche de celle du fluorophore ; c'est donc l'absorbance à 538 nm qui est utilisée.

Ainsi quatre solutions ont été préparées selon les données fournies dans le tableau ci-dessous (Tableau V-2), afin de visualiser l'influence du pH, de la présence de surfactant pegylé (Myrj 53), et de la présence des nanoparticules, sur l'hémolyse.

Nom de la solution	Composition	
E1	300 µL de sang	200 µL de solution de nano-émulsion (NE) pH 7,4
E2	300 µL de sang	200 µL de PBS pH 7,4
E3	300 µL de sang	200 µL de PBS pH 7,4 + 2 % Myrj 53
E4	300 µL de sang	200 µL de solution de nano-émulsion (NE) pH 7,4 dialysée

**Tableau V-2 : Composition des solutions utilisées pour l'étude de l'hémolyse.**

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, ces solutions sont centrifugées (5000g pendant 5 minutes à température ambiante) afin de pouvoir prélever 99 µL de plasma qui sont ensuite dilués dans 551 µL de PBS (pH 7,4). Ces solutions sont ensuite rapidement analysées par spectrophotométrie d'absorption.

### V.2.2.2. Résultats et discussion

La Figure V-6 représente l'absorbance à 538 nm de toutes les solutions préparées.

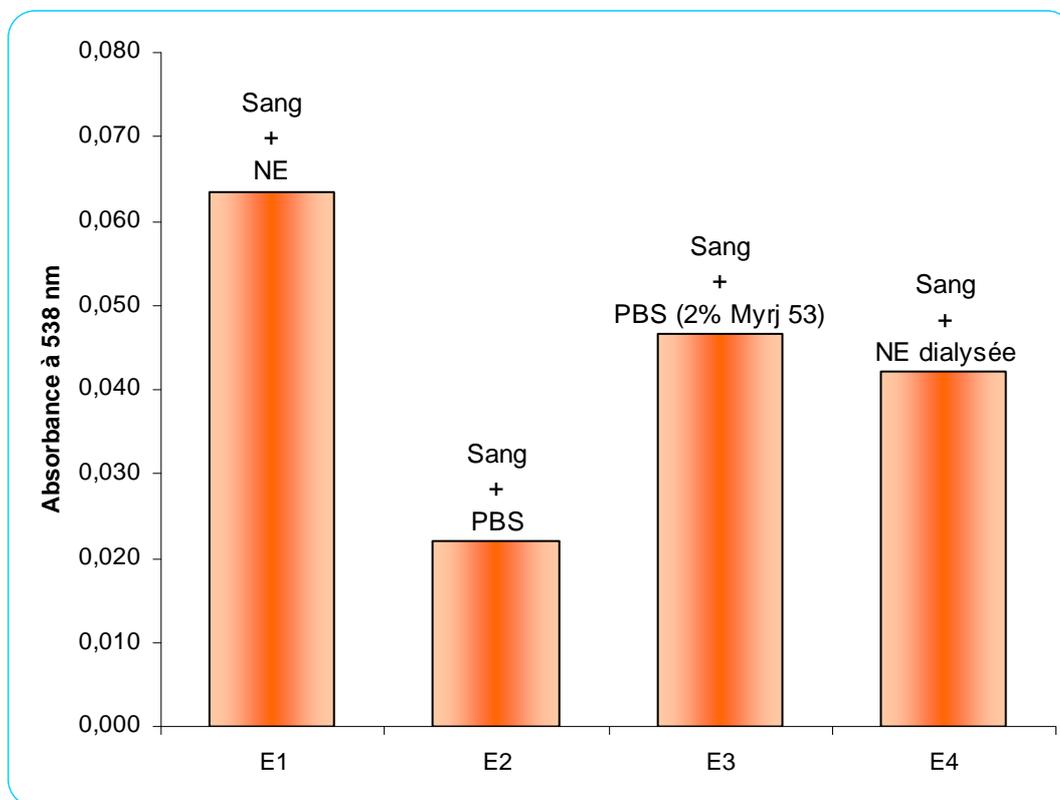


Figure V-6 : Absorbance à 538 nm en fonction des solutions.

Le graphique montre que la présence des nanoparticules, et plus particulièrement des surfactants en solution, favorise l'hémolyse. On observe en effet, une augmentation de la concentration d'hémoglobine dans le plasma lors de l'incubation de la solution E1 (sang + nano-émulsion) par rapport à la solution E2 (sang + PBS). Le rôle des surfactants pegylés est mis en avant car leur ajout favorise l'hémolyse même en l'absence de nanoparticules (solution E3). Ces molécules peuvent en effet entraîner une perturbation de la membrane cellulaire, conduisant ainsi à sa rupture. La dialyse de la nano-émulsion (solution E4) de manière à éliminer l'excès de surfactants permet d'ailleurs de limiter l'hémolyse par rapport à la solution non dialysée (solution E1).

Un effet hémolytique des nanoparticules est donc observé, mais il est modéré et reste tout à fait acceptable. Il peut toutefois être minimisé en dialysant les solutions afin de supprimer l'excès de surfactants. De plus, une étude de Morey *et al.* sur l'hémolyse engendrée

par des micro-émulsions de taille nanométrique a également montré que ce phénomène pouvait être considéré comme négligeable [112].

### V.2.3. Conclusions

Les expériences de compatibilité *ex vivo* entre le sang et les nano-émulsions fluorescentes ont montré que les nanoparticules n'engendrent pas une hémolyse significative des globules rouges, et que leur fluorescence est suffisamment stable pour pouvoir envisager de réaliser des expériences d'imagerie *in vivo* sans risque majeur pour les animaux.

## V.3. Etude de la biodistribution des nanoparticules sur souris saine

Avant d'utiliser des nano-émulsions fluorescentes pour imager un processus biologique donné, il est primordial de connaître leur biodistribution au sein de l'organisme, et notamment de savoir quels organes accumulent les globules fluorescents et quelle est l'évolution de cette accumulation au cours du temps. L'utilisation des systèmes d'imagerie de fluorescence permet d'accéder facilement et qualitativement à la biodistribution des nanoparticules organe par organe. De plus, différentes formulations sont testées afin d'évaluer l'impact de certains paramètres, tels que la taille des particules et la nature des surfactants pegylés, sur la biodistribution.

Il est important de rappeler que l'imagerie par fluorescence ne permet pas d'observer les particules proprement dites mais uniquement le signal émis par le fluorophore. En effet, il n'est pas possible de savoir si le fluorophore, dont la fluorescence est nulle en milieu aqueux (voir Chapitre IV), est resté encapsulé dans les nanoparticules ou s'il a été pris en charge par une autre structure lipophile naturellement présente dans l'organisme des animaux (lipoprotéine, membrane cellulaire ...).

Toutes les expériences avec les animaux ont été réalisées à l'institut Albert Bonniot à La Tronche par Véronique Josserand et ses collaborateurs.

## V.3.1. Evolution de la biodistribution des nanoparticules en fonction du temps

### V.3.1.1. Protocole

#### V.3.1.1.1. Nano-émulsions issues de la formulation de référence

Une nano-émulsion issue de la formulation de référence dopée à 312  $\mu\text{M}$  en DiD est préparée selon le protocole décrit précédemment (voir Chapitres III et IV). La solution saline dans laquelle la nano-émulsion est préparée est une solution de chlorure de sodium à 154 mM. Afin d'éliminer les molécules non désirées (glycérol, surfactants pegylés en excès) et d'ajuster le pH, la solution est dialysée pendant 90 minutes contre une solution de chlorure de sodium à 154 mM dont le pH est ajusté à 7,4, le dialysat étant changé toutes les trente minutes. La concentration finale en fluorophores après purification est déterminée par dosage fluorimétrique. La solution est ensuite diluée avec une solution de NaCl à 154 mM (pH 7,4) de manière à obtenir une concentration en fluorophores de 50  $\mu\text{M}$ , et est enfin stérilisée par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ). Cette solution peut ensuite être directement utilisée comme traceur fluorescent pour l'imagerie fonctionnelle *in vivo*.

#### V.3.1.1.2. Animaux

Huit souris *Swiss Nude* femelles de 5 à 6 semaines (IFFA-Credo, Marcy l'Etoile, France) maintenues sous conditions sans pathogènes sont utilisées comme modèle animal pour analyser la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme. Toutes les injections et acquisitions d'images sont réalisées alors que les souris sont maintenues sous anesthésie générale par voie gazeuse (isoflurane).

L'injection des nano-émulsions se fait dans la queue de la souris par voie intraveineuse à raison de 200  $\mu\text{L}$  de solution à 50  $\mu\text{M}$  par souris (d'environ 20 à 25 g). Cela correspond à 10 nmol de fluorophores DiD et à 3,2 mg de phase huile (huile de soja et Suppocire<sup>®</sup> NC).

#### V.3.1.1.3. Imagerie

Les animaux anesthésiés sont imagés à l'aide d'un dispositif d'imagerie de fluorescence par réflectance comportant comme source d'excitation une couronne de LEDs

munies de filtres interférentiels et émettant à 633 nm (puissance d'éclairement  $50 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) [113]. Les images sont recueillies par une caméra CCD (Orca BTL, Hamamatsu) avec un temps d'exposition de 20 ms, après passage à travers un filtre coloré RG665 de densité optique supérieure à 5 à la longueur d'onde d'excitation. Les signaux sont quantifiés à l'aide du logiciel de traitement d'images Wasabi.

Les souris sont imagées à plusieurs intervalles de temps après injection : 20 minutes, 1 heure, 3,5 heures, 5 heures, 24 heures, 48 heures et 144 heures (6 jours).

### **V.3.1.1.4. Analyse du sang et des organes**

Afin d'étudier l'évolution de la biodistribution dans le temps, deux animaux sont sacrifiés et disséqués après 1 heure, 5 heures, 24 heures et 144 heures après injection. Les principaux organes sont prélevés et disposés sous le dispositif d'imagerie de fluorescence par réflectance afin de mesurer le signal émis par chacun d'entre eux. Lors de la dissection, une partie du sang est également prélevée puis centrifugée afin de récupérer le plasma et d'en mesurer la fluorescence grâce au spectrofluorimètre. Le volume sanguin total d'une souris est compris entre 1,5 et 2 mL. Pour le calcul de la quantité de fluorophore en circulation, la valeur maximale (2 mL) est utilisée, ce qui correspond à 1,1 mL de plasma. Comme 200  $\mu\text{L}$  de solution représentant 10 nmol de fluorophores sont injectés, la concentration plasmatique théorique juste après injection est de 7,7  $\mu\text{M}$ , ce qui correspond à la valeur de 100 % sur la Figure V-8. Les mesures de fluorescence permettent alors de remonter à une concentration en fluorophores dans le plasma lors du prélèvement, qui est ensuite convertie en pourcentage de la quantité de fluorophores restant en circulation.

Dans un second temps, afin d'évaluer cette fois l'impact de la formulation sur la biodistribution, les animaux sont sacrifiés 24 h après injection.

## **V.3.1.2. Résultats**

### **V.3.1.2.1. Clichés de fluorescence**

L'analyse des clichés de fluorescence obtenus montre une bonne distribution des nanoparticules dans l'organisme des souris : la totalité de la souris émet du signal (Figure V-7). Dans les premières minutes après l'injection, le système sanguin est clairement visible au travers de la peau. On observe toutefois une accumulation préférentielle dans le foie mais

également, pour certains animaux, une augmentation du signal au niveau du postérieur de la souris.

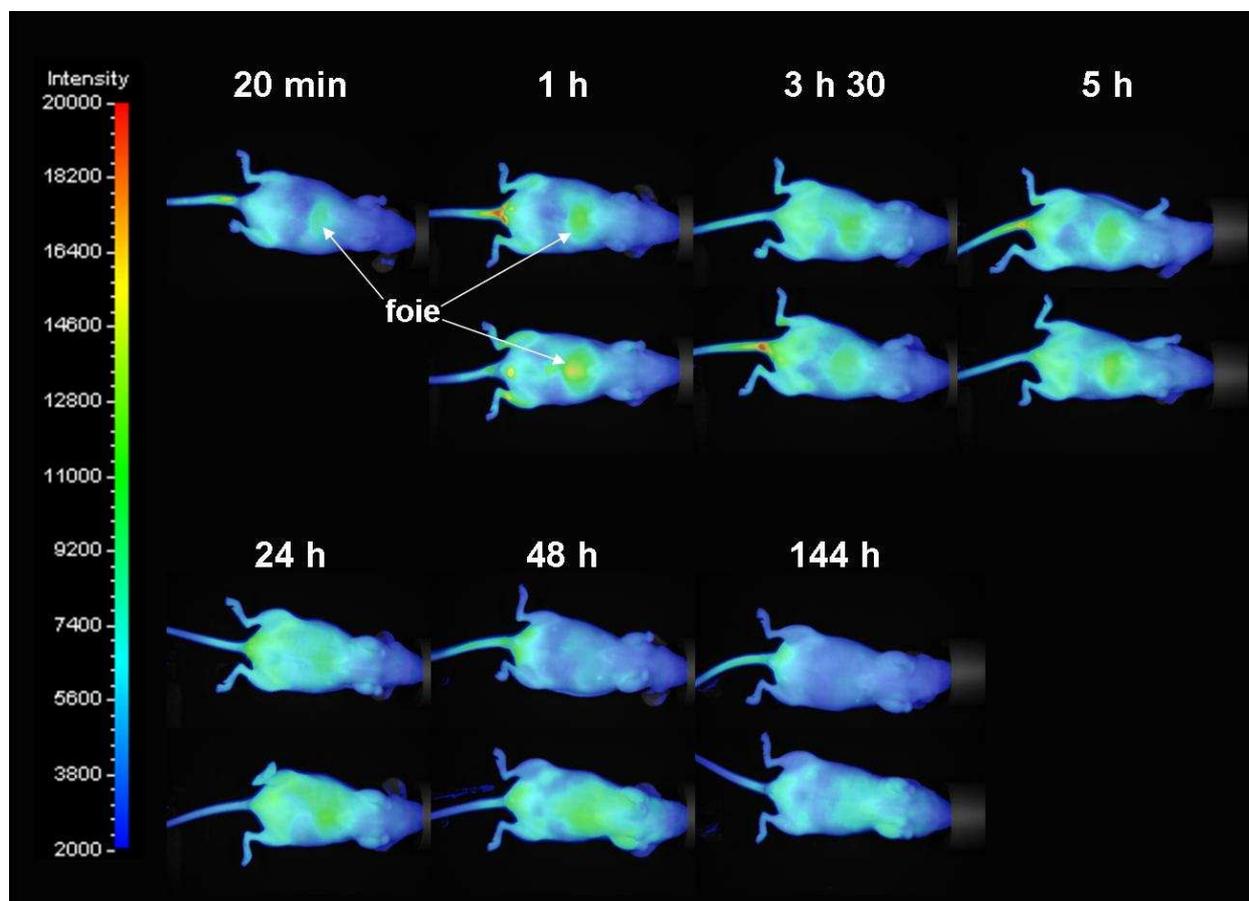


Figure V-7 : Clichés de fluorescence réalisés à différents intervalles de temps après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. Les animaux sont positionnés sur le dos de manière à ce que leur ventre soit face à la caméra (M20ms / 2000-20000).

#### V.3.1.2.2. Dosage plasmatique

Le dosage de la fluorescence dans le plasma permet d'avoir un ordre de grandeur de la quantité de nano-émulsion fluorescente restant en circulation sanguine. Le graphique ci-dessous (Figure V-8) représente ainsi l'évolution du pourcentage de la quantité de nano-émulsion présente dans le plasma en fonction du temps. Cette courbe ne tient cependant pas compte de la dégradation chimique du fluorophore dans le système sanguin, ce qui signifie que les valeurs présentées sont sans doute sous-estimées. La valeur de 100 % sur le graphique correspond à la concentration théorique en fluorophores dans le plasma après injection déterminée par calcul (7,7 µM).

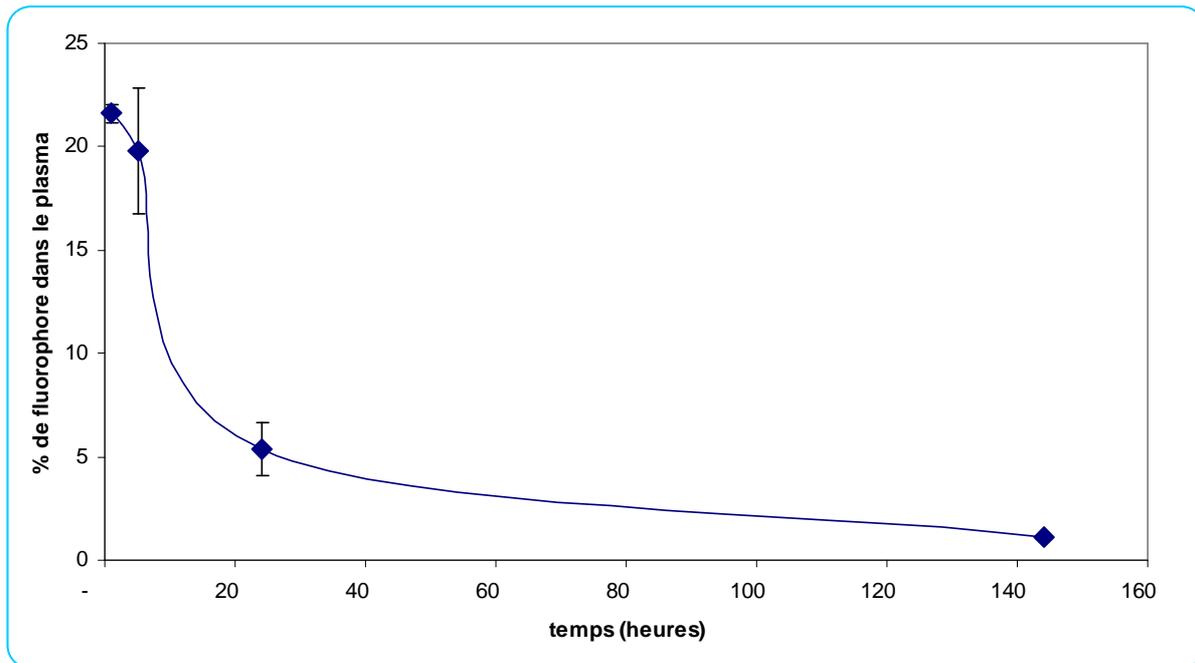


Figure V-8 : Evolution de la quantité de fluorophores dans le plasma en fonction du temps. Cette quantité est exprimée en pourcentage de la quantité totale injectée.

### V.3.1.2.3. Analyse des organes

Le sacrifice et la dissection des souris permettent d'observer la fluorescence émise par différents organes.

La Figure V-9 représente les principaux organes susceptibles d'accumuler ou d'éliminer les nanoparticules après leur injection par voie intraveineuse. Les poumons sont, après l'injection intraveineuse dans la queue de la souris, le premier réseau de capillaires que vont rencontrer les nanoparticules. Le foie et la rate sont d'importants sites d'élimination/séquestration des corps étrangers ; ils possèdent en effet des quantités importantes de macrophages pouvant phagocyter les nanoparticules. Ces organes se caractérisent également par un endothélium vasculaire fortement fenestré qui peut favoriser l'extravasation des nanoparticules hors de la circulation sanguine. Le système digestif est quant à lui fortement vascularisé. Enfin, le système rénal (rein et vessie) constitue la voie d'excrétion majoritaire de l'organisme.

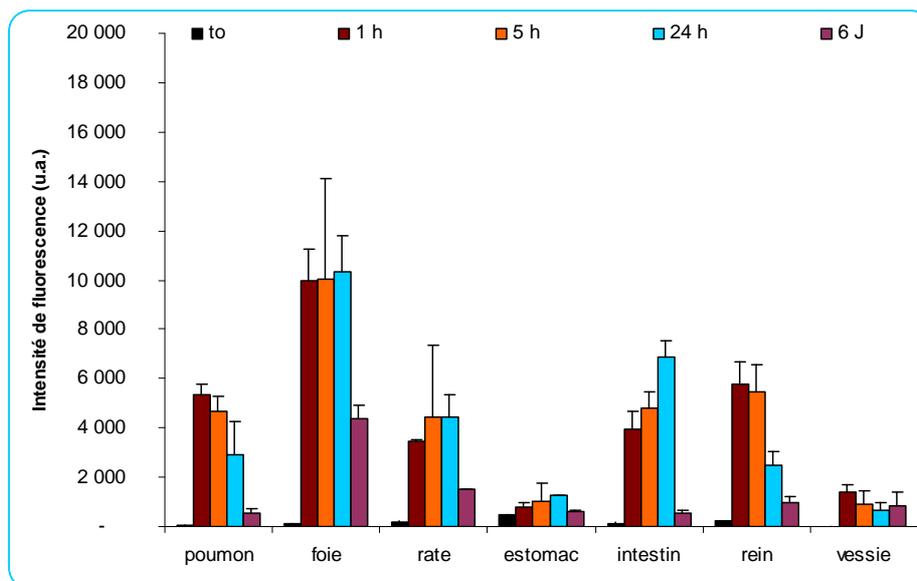


Figure V-9 : Evolution de la fluorescence des principaux organes d'élimination des nanoparticules en fonction du temps après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores.

Les organes peuvent être classifiés suivant deux comportements : pour certains, la fluorescence émise par les tissus diminue avec le temps ; pour d'autres, la fluorescence augmente avec le temps au moins jusqu'à 24 h après injection puis diminue ensuite. L'étude de la fluorescence d'autres organes de la souris permet de retrouver ces deux types de cinétiques (Figure V-10).

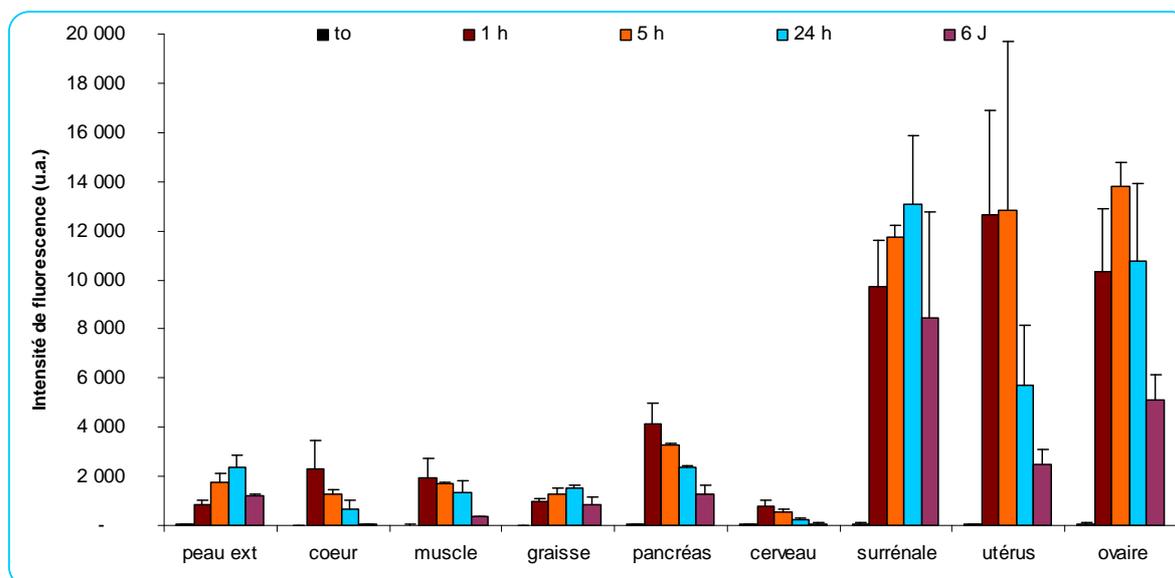


Figure V-10 : Evolution de la fluorescence de divers organes en fonction du temps après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores.

### V.3.1.3. Discussion

#### V.3.1.3.1. Clichés de fluorescence

Les clichés de fluorescence montrent une distribution relativement homogène dans l'organisme des animaux, et ce dès les premières minutes après l'injection du traceur. En effet, on observe l'absence de séquestration du fluorophore par un organe en particulier, avec toutefois une accumulation plus ou moins importante au niveau du foie (Figure V-7).

Le signal global de fluorescence mesuré augmente au cours des premières 24 h suivant l'injection puis diminue jusqu'à atteindre un signal de fluorescence qui reste non négligeable après 144 h (6 jours). La lente augmentation du signal dans les premières heures correspond à l'extravasation du traceur, ou tout du moins du fluorophore, du compartiment sanguin vers les tissus et notamment vers les tissus superficiels tels que le derme. En effet, plus le fluorophore est proche de la « surface » de l'animal, moins la lumière qu'il reçoit ou celle qu'il émet en retour est absorbée ou diffusée, et donc plus le signal de fluorescence recueilli est important. Autrement dit, le dispositif d'imagerie détecte plus facilement et plus intensément la fluorescence émise près de la surface de l'animal.

On note également à partir de ces clichés que la zone postérieure (base de la queue) de nombreux animaux émet un signal de fluorescence supérieur à la zone environnante. Cela est d'autant plus visible sur les vues de flanc ou de dos (Figure V-11).

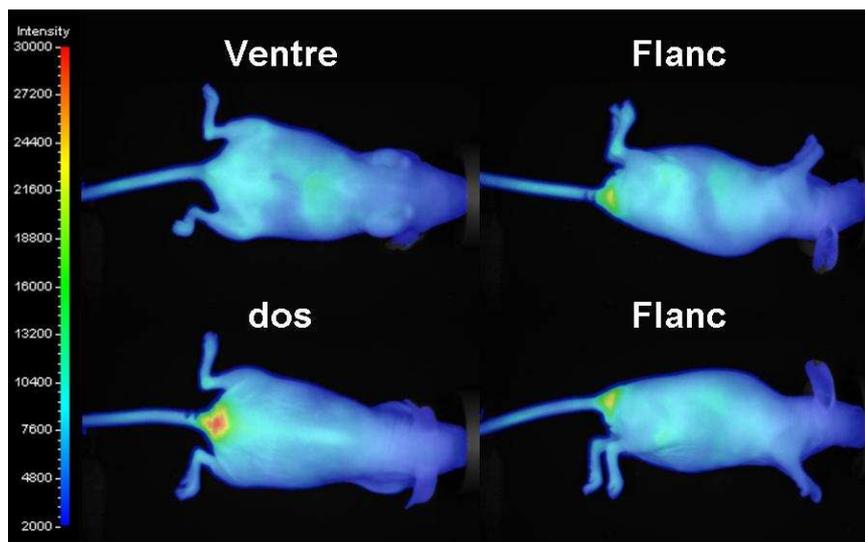


Figure V-11 : Clichés de fluorescence d'une souris dans différentes positions 3h30 après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. (M20ms / 2000-30000).

Lors de l'injection intraveineuse du traceur, cette partie de l'animal est irritée par frottement, ce qui peut expliquer l'émission de signal de fluorescence dans cette zone. En réponse à une irritation, les capillaires sanguins se vasodilataient en effet de manière à faciliter le passage de l'endothélium (les fenestrations peuvent alors atteindre 700 nm), que se soit pour l'évacuation des toxines générées au niveau de l'inflammation, ou pour apporter les éléments nécessaires à la guérison, en particulier des globules blancs. La présence des nanoparticules fluorescentes dans la zone d'inflammation peut ainsi s'expliquer par deux mécanismes : soit l'augmentation de l'espace entre les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins causée par la vasodilatation favorise l'extravasation des nanoparticules vers les tissus inflammés ; soit les nano-émulsions sont préalablement capturées par les leucocytes qui migrent ensuite dans la zone irritée.

#### **V.3.1.3.2. Dosage plasmatique**

Les mesures de fluorescence dans le plasma montrent une diminution du signal de fluorescence dans le temps qui est plus importante que celle observée lors des tests de stabilité de la fluorescence dans le sang (V.2.1). Ce résultat prévisible confirme qu'en plus de la détérioration « physico-chimique » du fluorophore, il se produit une extravasation des fluorophores, et à fortiori des nanoparticules, du sang vers d'autres tissus. Néanmoins, il semble que la furtivité du traceur soit suffisante pour maintenir en circulation près de 20 % de la dose injectée en fluorophores après 5 h et 5 % après 24 h. La courbe de la concentration en fluorophores dans le plasma ne suit toutefois pas une décroissance exponentielle classique. On n'observe effectivement qu'une très faible diminution de la fluorescence entre 1 heure et 5 heures après l'injection du traceur. Cela pourrait être dû soit à la libération des nanoparticules fluorescentes après leur séquestration dans une zone telle que l'espace de Disse du foie ou les sinus de la rate, soit à la remise en circulation du fluorophore sous une nouvelle forme après destruction des nanoparticules.

La fluorescence mesurée ici est celle de nanoparticules dans le plasma ; cela signifie qu'elle n'englobe pas celle émise par les nanoparticules éventuellement capturées par les globules blancs. Ainsi cette mesure montre bien que les nanoparticules sont circulantes et qu'elles disposent d'une certaine furtivité vis-à-vis des défenses de l'organisme.

Il semble donc que les nano-émulsions fluorescentes ont une bonne furtivité mais ce résultat doit cependant être nuancé étant donné que l'on suit uniquement le fluorophore et non la particule.

### V.3.1.3.3. Analyse des organes

La dissection et l'analyse de fluorescence émise par les organes a mis en évidence deux classes d'organes avec deux cinétiques différentes :

- Classe I : on observe une diminution de la fluorescence dès la première heure suivant l'injection.
- Classe II : on observe une augmentation progressive du signal dans les premières heures suivant l'injection puis une diminution du signal pour les temps plus longs.

La Figure V-12 et la Figure V-13 représentent les valeurs obtenues pour les organes appartenant respectivement au premier et au second type de cinétique en fonction du temps.

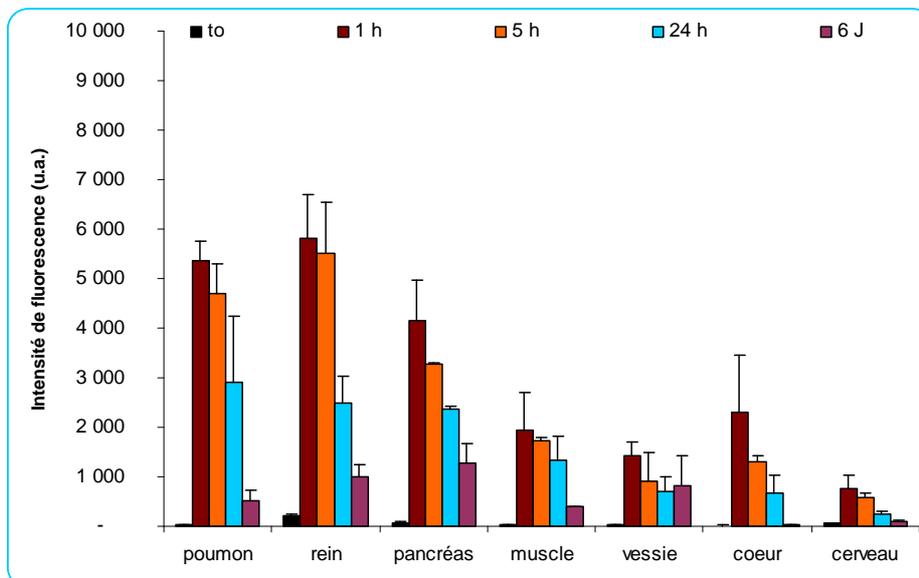


Figure V-12 : Evolution de la fluorescence émise par les organes dont la cinétique est de classe I en fonction du temps après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. Les organes sont classés en fonction de leur fluorescence moyenne 24 heures après l'injection du traceur. Les valeurs « t<sub>0</sub> » correspondent à l'auto-fluorescence des organes (fluorescence sans injection de traceurs).

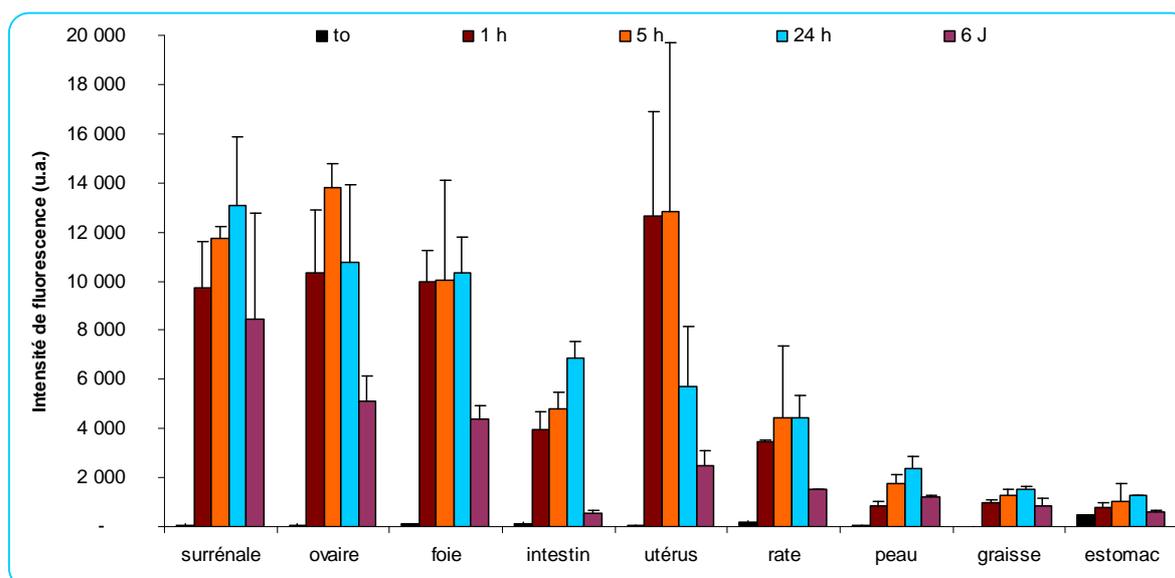


Figure V-13 : Evolution de la fluorescence émise par les organes dont la cinétique est de classe II en fonction du temps après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. Les organes sont classés en fonction de leur fluorescence moyenne 24 heures après l'injection du traceur. Les valeurs « t<sub>0</sub> » correspondent à l'auto-fluorescence des organes (fluorescence sans injection de traceurs).

Le premier type de cinétique (classe I) s'apparente fortement à celle de la quantité de fluorophores dans le plasma. Les organes qui sont soumis à cette cinétique sont les poumons, les reins, les muscles, le cœur, le cerveau, et dans une moindre mesure la vessie. Les poumons et les reins sont des organes fortement vascularisés ; une grande partie de la fluorescence émise par ces organes peut donc être liée à leur forte teneur en sang. Il est effectivement important de rappeler que les organes n'ont pas été traités pour éliminer le sang résiduel. Il est ainsi légitime de supposer qu'il n'y a pas ou peu d'accumulation du traceur fluorescent dans ces organes. Le poumon joue également un rôle dans le système réticuloendothélial grâce aux macrophages alvéolaires. La faible fluorescence de cet organe semble donc indiquer que la phagocytose par les macrophages résidents n'est pas très importante, attestant ainsi d'une bonne furtivité des nanoparticules. Il est également à noter que la fluorescence émise par le cerveau est très faible ; les nanoparticules ne semblent donc pas franchir de façon notable la barrière hémato-encéphalique protégeant le cerveau.

Ces résultats indiquent également qu'il n'y a pas ou peu d'excrétion des nanoparticules par la voie rénale. En effet, le signal émis par la vessie est faible et évolue peu avec le temps, confirmant ainsi que la taille des nanoparticules est trop importante pour qu'elles puissent passer à travers les pores des reins. De plus, la fluorescence des reins évolue selon le premier type de cinétique, ce qui traduit l'absence d'accumulation dans ces organes. Cette donnée est intéressante pour la délivrance de médicaments pour laquelle l'accumulation

## Chapitre V : Comportement des nano-émulsions en milieu biologique

au niveau des reins et la toxicité rénale qui en découle est souvent un effet secondaire important et rédhibitoire.

Le deuxième type de cinétique observé (classe II) traduit quant à lui une accumulation des nanoparticules, ou tout du moins du fluorophore, au sein des tissus concernés. On observe ainsi une réelle accumulation dans le foie, l'intestin et la rate.

Le comportement du foie et de la rate était prévisible étant donné leurs structures fenestrées et l'abondance de macrophages dans ces tissus. En revanche, l'augmentation tardive du signal au niveau de l'intestin semble être plutôt liée à un mécanisme différent. En effet, il est possible que ce signal soit lié à un phénomène de recapture du traceur fluorescent. Les nanoparticules qui s'accumulent dans le foie sont au moins en partie internalisées par les hépatocytes (peut-être à cause de leur mimétisme avec les lipoprotéines). Ces cellules hépatiques dégradent ensuite les particules et évacuent ainsi le fluorophore par les canalicules biliaires, la bile étant une voie d'élimination de l'organisme. La bile contenant les fluorophores passe ensuite dans l'intestin afin de rétablir le pH et d'émulsionner les graisses ingérées. Les cellules intestinales absorbent alors le fluorophore en parallèle des graisses, libérant ensuite les lipides sous forme de chylomicrons dans la lymphe. On peut alors supposer que le fluorophore suit la même route et se retrouve de nouveau encapsulé dans ces particules lipidiques.

Le cas des organes reproducteurs (ovaire et utérus) est délicat à analyser car le cycle de la souris est très court (4 à 5 jours). Or de nombreuses modifications de la vascularisation des organes reproducteurs ont lieu au cours de ce cycle, et ces changements sont susceptibles de fortement favoriser l'extravasation des nanoparticules vers les tissus.

### **V.3.1.3.4. Conclusions**

L'injection de nano-émulsions fluorescentes entraîne une distribution homogène de la fluorescence au sein de l'animal. Le dosage plasmatique et l'évolution de la biodistribution dans les organes indiquent clairement que les nanoparticules sont circulantes et qu'elles possèdent donc une bonne furtivité leur permettant d'échapper à l'action du système réticuloendothélial.

Il semble cependant que les nanoparticules suivent la voie de dégradation des lipoprotéines, comme le suggère l'évolution du signal de fluorescence des intestins.

La technique d'imagerie de fluorescence ne permet pas de connaître la localisation exacte des nanoparticules fluorescentes, et ne renseigne pas complètement sur le mécanisme d'accumulation. On observe par exemple une accumulation dans le foie, mais celle-ci peut être engendrée par la capture des nanoparticules par les macrophages, par l'extravasation des nanoparticules à travers les fenestrations de l'endothélium ou par la combinaison des deux processus. Cela illustre l'utilité d'effectuer des analyses histologiques complémentaires afin d'avoir une compréhension plus fine des phénomènes d'accumulation dans les organes. De plus, à cause des propriétés optiques d'absorption et de diffusion des tissus, on ne peut pas comparer quantitativement les signaux d'un organe à un autre. Cette technique apporte néanmoins très rapidement et à moindre coût une information qualitative sur le devenir des nano-émulsions.

### **V.3.2. Evolution de la biodistribution en fonction de la formulation**

Afin d'évaluer l'impact de la taille des particules et de la nature du surfactant pegylé sur la pharmacocinétique des nano-émulsions fluorescentes, la biodistribution des nanoparticules a été analysée pour différentes formulations 24 h après l'injection du traceur.

#### **V.3.2.1. Protocole**

##### **V.3.2.1.1. Nano-émulsions**

Pour évaluer l'impact de la taille des nanoparticules, trois types de nano-émulsions sont préparés selon les formulations décrites dans le Chapitre III afin d'obtenir des solutions pour lesquelles le diamètre des nanoparticules est d'environ 35, 45 et 100 nm (diamètre mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière et pondéré en volume).

De la même manière, afin d'évaluer l'influence de la nature du surfactant pegylé, quatre types de nano-émulsions sont préparés afin d'obtenir des particules d'environ 30 nm de diamètre stabilisées par les surfactants suivants :

- Tween 80 : surfactant dont la chaîne est ramifiée et qui comporte 20 motifs polyoxyéthylènes.

## Chapitre V : Comportement des nano-émulsions en milieu biologique

- Myrj 49 : surfactant dont la chaîne est linéaire et qui comporte 20 motifs polyoxyéthylènes.
- Myrj 53 : surfactant dont la chaîne est linéaire et qui comporte 50 motifs polyoxyéthylènes.
- Myrj 59 : surfactant dont la chaîne est linéaire et qui comporte 100 motifs polyoxyéthylènes.

Chacune des sept nano-émulsions est dopée à 400  $\mu\text{M}$  en DiD selon les protocoles décrits dans le chapitre IV. Avant leur injection, les solutions sont dialysées pendant 90 minutes en changeant le dialysat toutes les 30 minutes. La dialyse se fait contre une solution de chlorure de sodium à 154 mM dont le pH est ajusté à 7,4. La concentration en fluorophores après purification est déterminée par dosage fluorimétrique puis les solutions sont diluées avec une solution de NaCl à 154 mM (pH 7,4) de manière à obtenir une concentration finale en fluorophores de 50  $\mu\text{M}$ . Enfin les solutions sont stérilisées par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ) avant injection.

### V.3.2.1.2. Animaux

Pour chacune des sept formulations, trois souris *Swiss Nude* femelles de 5 à 6 semaines (IFFA-Credo, Marcy l'Etoile, France) sont utilisées comme modèle animal. Toutes les injections et acquisitions d'image sont réalisées alors que les souris sont maintenues sous anesthésie générale par voie gazeuse (isoflurane).

L'injection des nano-émulsions se fait dans la queue de la souris par voie intraveineuse à raison de 200  $\mu\text{L}$  de solution à 50  $\mu\text{M}$  par souris (d'environ 20 à 25 g). Cela correspond à 10 nmol de fluorophores DiD et à 2,5 mg de phase huile (huile de soja et Suppocire<sup>®</sup> NC).

### V.3.2.1.3. Imagerie

Les animaux anesthésiés sont imagés 24 heures après l'injection du traceur à l'aide du dispositif d'imagerie de fluorescence décrit précédemment (V.3.1.1.3).

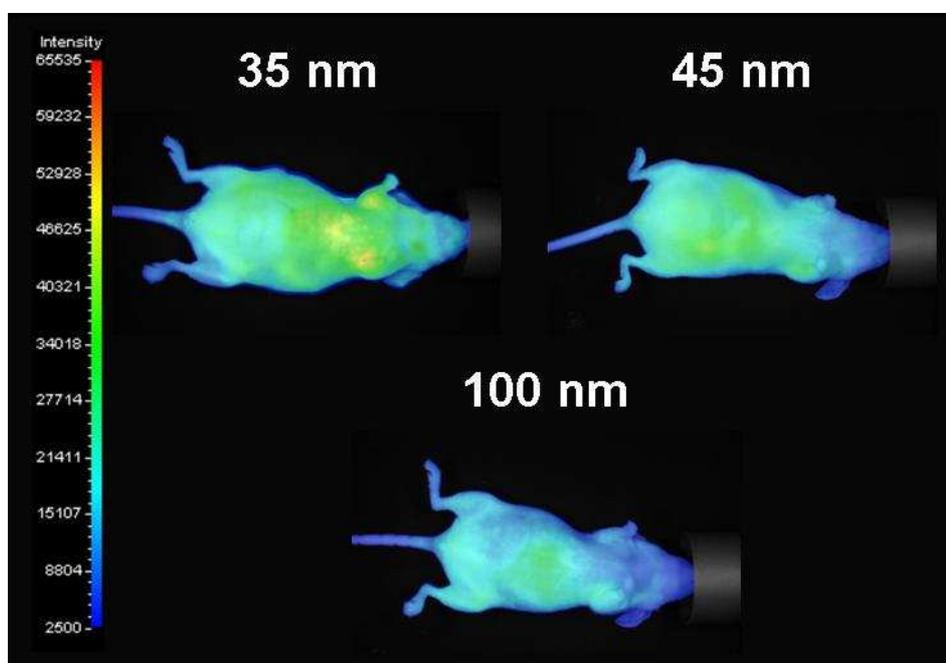
### V.3.2.1.4. Analyse des organes

Après avoir été imagés, les animaux sont sacrifiés et disséqués. Les principaux organes sont prélevés et sont placés sous le dispositif d'imagerie de fluorescence par réflectance afin de mesurer le signal émis par chacun d'entre eux.

### **V.3.2.2. Résultats**

#### **V.3.2.2.1. Clichés de fluorescence**

La Figure V-14 et la Figure V-15 représentent les clichés de fluorescence obtenus 24 h après injection des traceurs.



**Figure V-14 : Clichés de fluorescence réalisés 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores, en fonction de la taille moyenne des nanoparticules. Les animaux sont positionnés sur le dos de manière à ce que leur ventre soit face à la caméra (M200ms / 2500-65500).**

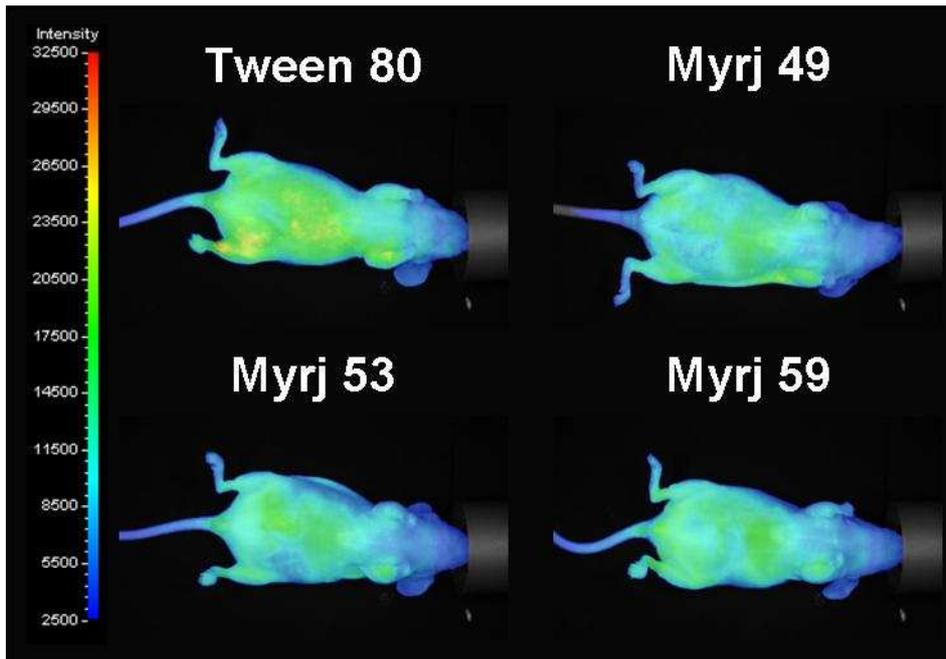


Figure V-15 : Clichés de fluorescence réalisés 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores pour des nanoparticules stabilisées par différents surfactants pegylés. Les animaux sont positionnés sur le dos de manière à ce que leur ventre soit face à la caméra (M200ms / 2500-32500).

#### V.3.2.2.2. Analyse des organes

Le sacrifice des animaux 24 h après injection du traceur permet, après dissection, de mesurer l'intensité de fluorescence de différents organes.

La Figure V-16 et la Figure V-17 comparent respectivement l'impact de la taille des nanoparticules et de la nature du surfactant pegylé sur la biodistribution.

Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*

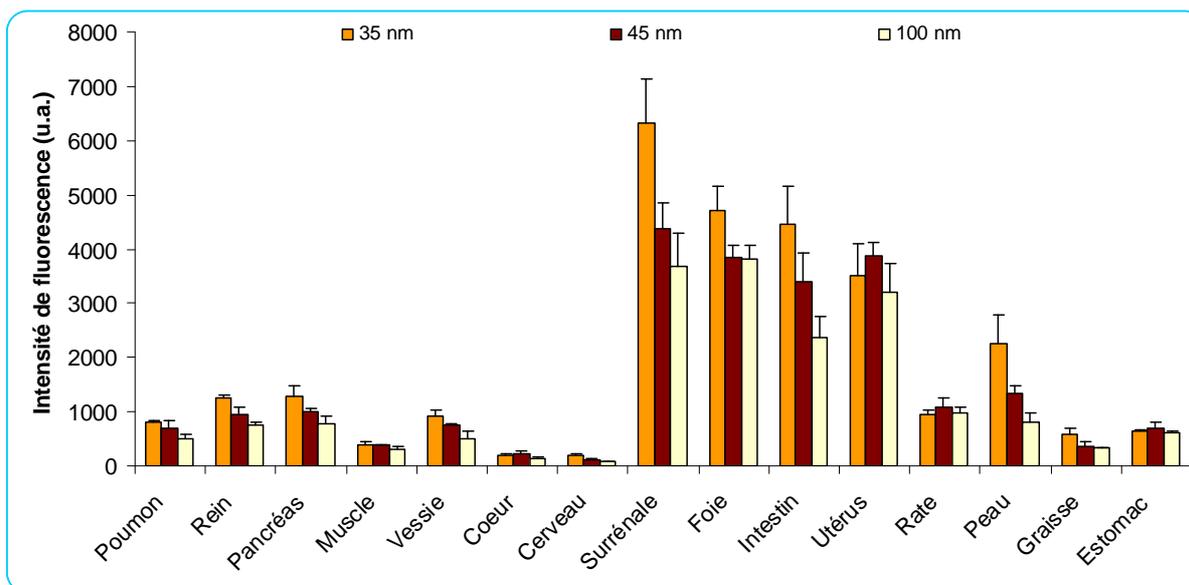


Figure V-16 : Intensité de fluorescence émise par différents organes en fonction de la taille des nanoparticules, 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores.

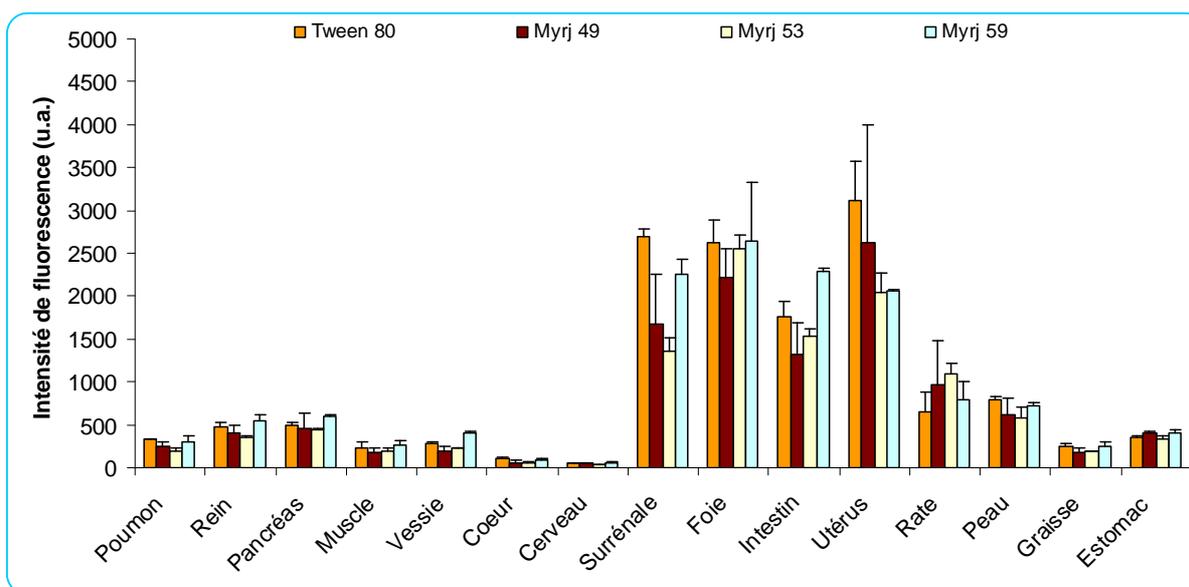


Figure V-17 : Intensité de fluorescence émise par différents organes en fonction de la nature du surfactant pegylé, 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200µL de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores.

Les ovaires ne sont pas représentés sur ces deux graphiques car leur intensité de fluorescence est trop importante et masque les données des autres organes. En effet, l'intensité de fluorescence mesurée est environ trois fois supérieure à celle du foie, et cela quel que soit le paramètre considéré (taille des nanoparticules ou nature du surfactant pegylé), ce qui n'était pas le cas lors de l'étude de la biodistribution de la formulation de référence. Ceci est sans doute dû au fait que ces expériences ont été réalisées à différentes étapes du cycle de la souris.

### V.3.2.3. Discussion

#### V.3.2.3.1. Impact de la taille des globules

Les clichés de fluorescence (Figure V-14) montrent que l'intensité globale de la fluorescence diminue quand le diamètre des nanoparticules augmente. Cette observation nous permet de supposer que l'accumulation dans la peau est plus faible pour les nanoparticules de taille supérieure. En effet, à cause des phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière par les tissus biologiques, la peau, de par sa position (directement sous la caméra), contribue fortement à l'intensité globale de fluorescence mesurée par le dispositif.

Cette hypothèse est confirmée par l'analyse de la fluorescence émise par les organes après dissection (Figure V-16). Effectivement, le signal de fluorescence émis par la peau diminue avec l'augmentation du diamètre des particules.

La taille des nanoparticules semble également avoir la même incidence relativement faible sur la distribution au sein des autres organes. Ainsi ces résultats nous laissent penser que les particules de plus grand diamètre sont éliminées de la circulation sanguine plus rapidement que les celles de faible diamètre, qui seraient plus furtives. Cela expliquerait la fluorescence plus faible des organes n'accumulant pas les nanoparticules tels que les poumons, les reins et le pancréas.

On note également une différence significative du signal émis par les intestins en fonction du diamètre des particules. Ainsi, il semble que le phénomène d'élimination biliaire du fluorophore suivi de sa recapture par les intestins soit moins prononcé pour les nanoparticules dont le diamètre est proche de 100 nm.

Néanmoins, les variations de biodistribution entre les particules de diamètres différents sont très faibles. Aucune modification majeure n'est observée, la fluorescence restant toujours relativement homogène entre tous les organes. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a, en ce qui concerne le diamètre, qu'un facteur 3 entre les différentes particules testées. De plus, toutes les nano-gouttelettes restent d'un diamètre inférieur aux fenestrations du foie (150 nm) et supérieur à celles des reins (autour de 5 nm en tenant compte du diaphragme).

#### **V.3.2.3.2. Influence de la nature du surfactant pegylé**

Comme le montrent la Figure V-15 et la Figure V-17, la nature du surfactant pegylé semble n'avoir aucun impact sur le devenir des particules *in vivo*. En effet, aucune différence significative de la biodistribution n'est observée.

Cela peut laisser supposer que quel que soit le surfactant choisi, la couche de polyoxyéthylène est suffisamment dense pour qu'il n'y ait pas ou peu de différences au niveau de la partie accessible des nanoparticules. Toutes les particules présentent ainsi une surface similaire, ce qui conduit à une biodistribution identique.

## **V.4. Conclusion**

Les premiers tests biologiques ont confirmé l'intérêt des nano-émulsions fluorescentes pour l'imagerie optique.

Premièrement, les expériences de compatibilité *ex vivo* entre le sang et les nano-émulsions fluorescentes montrent que les traceurs sont injectables, tant d'un point de vue optique que biologique. En effet, la stabilité de la fluorescence des nanoparticules dans le sang est largement suffisante pour permettre leur observation plus de 48 heures après injection. La mise en contact des nanoparticules avec le sang n'engendre en outre qu'un faible phénomène d'hémolyse.

L'administration de nano-émulsions fluorescentes par injection en intraveineuse dans des souris montre également que le traceur a une distribution homogène. Il ne s'accumule pas au niveau des reins, ni au niveau de certains organes riches en macrophages tels que les poumons et la rate. Cela laisse présumer que les nano-émulsions ont une furtivité suffisante pour limiter leur phagocytose. Des analyses par cytométrie en flux de leucocytes prélevés sur une souris 24 heures après l'injection d'une nano-émulsion fluorescente montrent d'autre part que seule une partie des monocytes (macrophages circulants) deviennent fluorescents (Résultats non présentés réalisés par Sandrine Duffort à l'Institut Albert Bonniot).

Ainsi, les surfactants pegylés confèrent aux nano-émulsions une furtivité efficace pour échapper au système réticuloendothélial. L'élimination des nanoparticules n'étant pas prise en charge par la voie rénale ni par le système réticuloendothélial, elle semble incomber aux hépatocytes par un mécanisme similaire à celui du métabolisme des lipoprotéines ou des chylomicrons [64, 114].

Les variations de la formulation n'ont pas mis en évidence de modification significative de la biodistribution des nano-émulsions fluorescentes, traduisant ainsi la grande robustesse de cette dernière.

Enfin, en ce qui concerne la toxicité éventuelle des nano-émulsions, il est impossible, en l'absence d'expériences dédiées, d'apporter des conclusions précises. On peut néanmoins signaler qu'aucun animal n'est décédé avant la fin prévue de l'expérimentation (soit 19 jours après injection pour le suivi le plus long). Ce résultat va donc dans le sens de l'inocuité de ces nanoparticules, même s'il est toutefois envisageable, au vue de la biodistribution observée, que les nano-émulsions perturbent le métabolisme des lipoprotéines.

En conclusion, le comportement des nano-émulsions dans l'organisme montre que grâce à leur furtivité, les nanoparticules esquivent le système réticuloendothélial et une capture massive par le foie. Elles restent circulantes suffisamment longtemps pour envisager de cibler un tissu spécifique ou d'imager un processus biologique donné.



**Chapitre VI :**  
***Nano-émulsions***  
***fonctionnalisées***  
***pour la détection***  
***des tumeurs***

Les chapitres précédents ont illustré les propriétés physiques et optiques des nano-émulsions, ainsi que leur comportement *in vivo*. Outre leur grande stabilité et la robustesse du procédé de fabrication, les nano-émulsions, via l'encapsulation de fluorophores organiques, possèdent des propriétés optiques remarquables pour des particules organiques en milieu aqueux. Leur formulation leur confère de plus une furtivité suffisante pour rester dans la circulation sanguine pendant plusieurs heures après l'injection, conduisant ainsi à une biodistribution homogène au sein de l'organisme des animaux.

Ce chapitre se focalisera sur l'utilisation des nano-émulsions pour la détection de tumeurs. Nous montrerons également l'intérêt de la fonctionnalisation de la surface des nanoparticules pour favoriser un ciblage spécifique de la zone tumorale et/ou l'internalisation des particules par les cellules ciblées.

## **VI.1. Les tumeurs, considérations générales**

### **VI.1.1. Description**

Le terme tumeur est issu du latin *tumere* qui signifie enfler, et désigne en médecine l'augmentation de volume d'un tissu. Il existe de nombreux types de tumeurs qui peuvent être classés en deux catégories :

- les tumeurs bénignes, qui se caractérisent par la croissance lente et délimitée dans l'espace de cellules matures et bien différenciées.
- les tumeurs malignes, qui se caractérisent par une croissance rapide et invasive de cellules immatures ayant de nombreuses altérations au sein de leurs génomes.

Les tumeurs bénignes (verrues ou grains de beauté par exemple) sont, comme leur nom l'indique, sans gravité pour l'organisme. Cependant, certaines d'entre elles peuvent dégénérer et devenir malignes. Les tumeurs malignes, appelées également cancers, ont un développement rapide qui dégrade le fonctionnement de l'organe dont elles sont issues ; elles ont également la propriété de générer des cellules filles qui sont transportées par le sang ou la lymphe vers d'autres tissus où elles vont développer des métastases, autrement dit de nouvelles tumeurs.

## Chapitre VI : Nano-émulsions fonctionnalisées pour la détection des tumeurs

Les cancers sont la cause d'environ 150 000 décès par an en France et près de 7 millions à l'échelle mondiale, d'après les chiffres de l'Institut National du Cancer (<http://www.e-cancer.fr>). Les tumeurs représentent donc un problème de santé majeur dont l'incidence risque encore d'augmenter avec le vieillissement de la population mondiale.

Il existe aujourd'hui plusieurs stratégies pour le traitement des cancers, les trois principales étant la chimiothérapie, la radiothérapie et l'exérèse (ablation chirurgicale), auxquelles s'ajoutent l'hormonothérapie et l'immunothérapie pour certains types de tumeurs. Si ces techniques font l'objet d'importants travaux de recherche conduisant à l'amélioration de leur efficacité, le principal facteur de guérison reste la détection précoce de la tumeur. En effet, il est primordial de prendre en charge les tumeurs le plus tôt possible afin de limiter leur développement et surtout leur dispersion sous forme de métastases dans l'organisme. Toutes les techniques d'imagerie décrites dans le Chapitre II sont utilisées pour le dépistage des cancers.

### **VI.1.2. L'angiogénèse, un phénomène clé dans le développement et la détection des tumeurs**

La tumeur débute à partir d'une seule cellule, qui mute de telle manière que les mécanismes de suicide cellulaire ne sont plus fonctionnels, et qui se multiplie alors rapidement. Cependant, cette division exagérée des cellules tumorales aboutit à la formation d'un tissu cancéreux très dense qui limite l'arrivée des nutriments indispensables au développement de ces cellules. Or, lorsque les cellules ont besoin de plus d'oxygène, elles libèrent des molécules déclenchant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi, au cours du développement des tumeurs, les cellules cancéreuses vont libérer dans leur environnement de nombreuses molécules, et plus particulièrement une protéine appelée facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF (sigle anglais pour « Vascular Endothelial Growth Factor »). Le VEGF stimule l'angiogénèse, c'est-à-dire la création de nouveaux vaisseaux sanguins qui vont irriguer la tumeur, permettant ainsi son développement mais aussi le passage dans la circulation sanguine de cellules filles responsables des métastases (Figure VI-1).

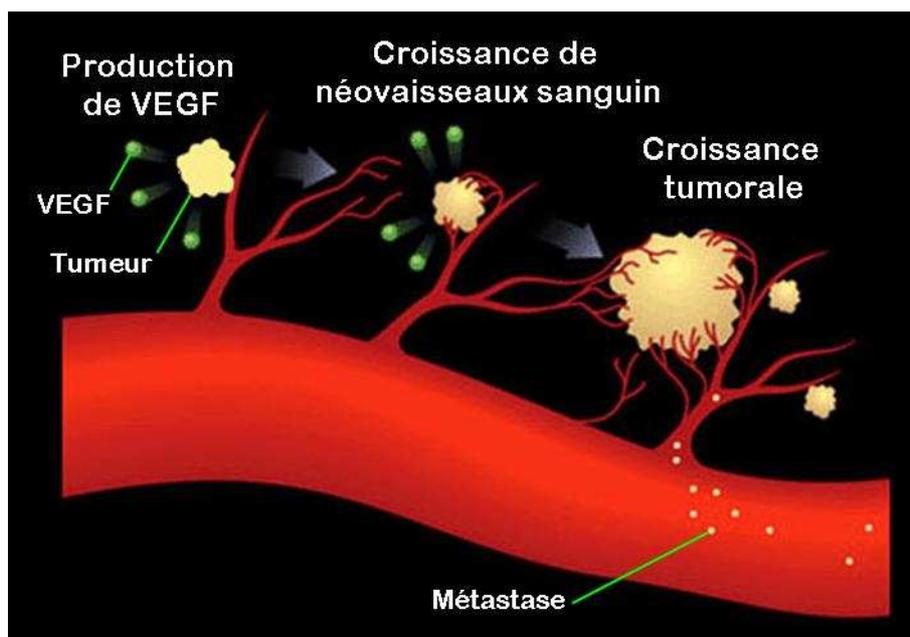


Figure VI-1 : Schéma du processus d'angiogénèse associé au développement tumoral. Les cellules tumorales libèrent dans le milieu extracellulaire une protéine, le VEGF, qui stimule la formation de néo-capillaires qui vont irriguer la tumeur et lui apporter tous les nutriments nécessaires à sa croissance. Ces nouveaux vaisseaux sanguins permettent aussi le passage dans la circulation sanguine de cellules tumorales qui vont essaimer dans l'organisme et former des métastases. D'après [www.genetech.com](http://www.genetech.com).

La libération du VEGF et l'angiogénèse qui en découle impliquent souvent une hypervascularisation des tumeurs solides. Cependant, les néo-capillaires n'ont pas une structure aussi organisée que les vaisseaux sanguins classiques.

Les parois des capillaires sont normalement constituées d'une couche de cellules endothéliales épaisse de seulement une cellule, ce qui permet la diffusion des nutriments du sang vers les tissus environnants. Néanmoins, les cellules endothéliales se recouvrent partiellement au niveau des jonctions entre les cellules de manière à empêcher le passage d'objets de taille importante dans les interstices. La couche de cellules endothéliales est entourée par une membrane basale qui assure la cohésion de l'ensemble.

La formation lors de l'angiogénèse de nouveaux vaisseaux sanguins conduit à une structure imparfaite de la paroi vasculaire. La jonction entre les cellules endothéliales est plus lâche, formant ainsi des interstices de taille importante entre les cellules. Ces pores, appelés également fenestrations, peuvent atteindre dans ce cas plusieurs centaines de nanomètres de diamètre. De plus, la membrane basale est également interrompue en de nombreux lieux ; les fenestrations traversent donc toute la paroi vasculaire. Du fait de ces défauts, les néo-capillaires ont une porosité supérieure à celle des capillaires classiques (Figure VI-2).

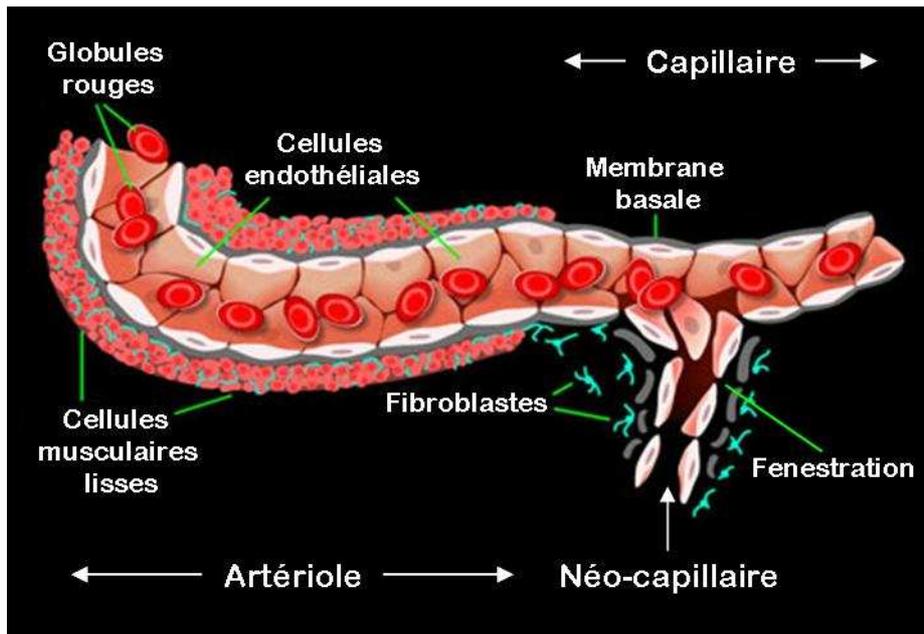


Figure VI-2 : Schéma de la structure d'une artériole, d'un capillaire et d'un néo-capillaire. Les capillaires sont formés par une couche de cellules endothéliales entourées par la membrane basale qui leur offre un support et permet le maintien de la structure. L'artériole relie les artères aux capillaires ; elle se différencie de ces derniers par la présence d'une couche de cellules musculaires lisses sur la face extérieure de la membrane basale qui permet de réguler par contraction le débit dans les capillaires. Les néo-capillaires induits par le phénomène d'angiogénèse sont des capillaires pour lesquels les jonctions entre deux cellules endothéliales adjacentes sont imparfaites, formant ainsi des interstices importants entre les cellules nommés fenestrations. La membrane basale entourant ces cellules endothéliales est elle aussi perturbée dans les néo-capillaires puisqu'elle y est fortement lacunaire. D'après [www.genetech.com](http://www.genetech.com).

Les tumeurs solides sont donc caractérisées par un réseau vasculaire important mais fenestré et un drainage lymphatique faible. En effet, la rapide croissance tumorale induit une forte densité, ce qui réduit l'espace intercellulaire et limite le drainage par la lymphe. Ces caractéristiques induisent au niveau des tumeurs solides un phénomène nommé EPR en anglais (pour « Enhanced Permeation and Retention ») : ce phénomène correspond à un accroissement de la perméation engendré par les fenestrations de l'endothélium vasculaire, ainsi qu'à une augmentation de la rétention à cause du faible drainage lymphatique. L'effet EPR favorise notamment l'accumulation de macromolécules et de nanoparticules au sein des tumeurs solides [115]. C'est pourquoi la grande majorité des systèmes de délivrance de médicaments par des colloïdes se base sur l'effet EPR pour apporter les principes actifs au sein des tumeurs.

## **VI.2. Le ciblage des tumeurs**

Afin d'améliorer l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs, leur surface peut en outre être fonctionnalisée par des ligands de ciblage spécifique (anticorps, protéines, peptides, aptamères ou saccharides par exemple), de manière à favoriser leur capture par les cellules de la zone tumorale. Dans un premier temps le choix des récepteurs, ainsi que celui des ligands associés utilisés pour fonctionnaliser la surface des nano-émulsions, seront discutés. Ensuite, la technique de couplage de ces ligands et son application à la fabrication de nano-émulsions fonctionnalisées seront présentées.

### **VI.2.1. Le couple ligand / récepteur**

Le choix de la cible biologique doit répondre aux critères suivants :

- La cible doit être accessible : elle doit être exposée sur la surface des cellules, et si possible sur des cellules en contact avec la circulation sanguine, afin de maximiser les chances d'interaction avec les particules en suspension dans le sang.
- La cible doit être spécifique de la zone tumorale, ou au moins exprimée plus fortement au sein des tumeurs que dans les autres organes.
- La cible doit pouvoir être « accrochée » par un ligand ou un anticorps possédant une grande affinité et une forte sélectivité pour la cible.

#### **VI.2.1.1. Le récepteur : l'intégrine $\alpha_V\beta_3$**

Comme indiqué précédemment, le développement de tumeurs solides s'accompagne souvent d'un phénomène d'angiogénèse (VI.1.2). La cible biologique que nous avons choisie est un marqueur de ce phénomène : il s'agit de l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  qui est surexprimée par les cellules de l'endothélium vasculaire au cours de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

Les intégrines sont des protéines réceptrices transmembranaires. Elles se présentent sous la forme d'hétérodimères constitués de deux sous-unités appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . Actuellement,

## Chapitre VI : Nano-émulsions fonctionnalisées pour la détection des tumeurs

18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été identifiées chez les vertébrés, mais seulement 24 intégrines ont été découvertes à l'heure actuelle [116]. Ces récepteurs sont composés de trois domaines : le domaine extracellulaire qui correspond à l'extrémité N de chaque sous-unité et qui forme le site de reconnaissance de leur ligand ; le domaine transmembranaire qui permet d'ancrer la protéine dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire ; le domaine intracellulaire qui est relié au cytosquelette via de nombreuses protéines (Figure VI-3).

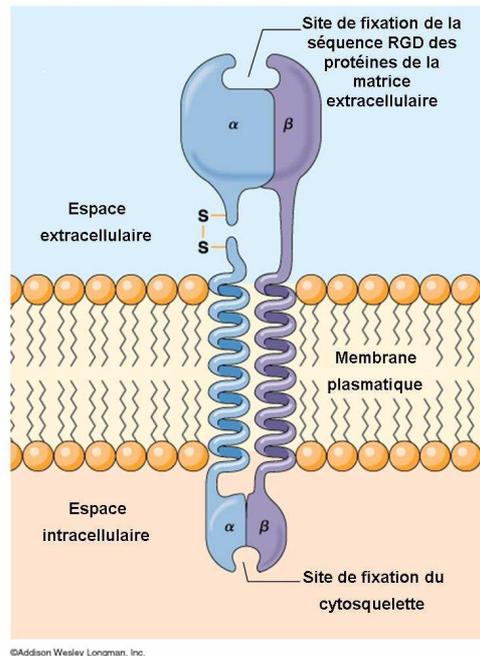


Figure VI-3 : Schéma d'une intégrine.

De nombreuses intégrines reconnaissent une courte séquence peptidique : arginine - glycine - acide aspartique (RGD). Cette séquence est présente dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (MEC), notamment la fibronectine et la vitronectine. Les intégrines assurent en effet une part importante de l'adhésion des cellules sur la MEC mais elles sont également impliquées dans la transduction du signal via leur connexion avec le cytosquelette, permettant notamment la migration et la prolifération des cellules.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  fait partie des récepteurs de la séquence peptidique RGD, et plus spécifiquement de la vitronectine. Cette intégrine est particulièrement impliquée dans l'angiogénèse. Les cellules endothéliales qui forment les parois des néovaisseaux expriment en grande quantité cette intégrine, et bien qu'elles soient liées à l'adhésion des cellules avec la matrice extracellulaire, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont également exprimées sur la surface luminale de ces cellules et sont donc accessibles depuis la circulation sanguine [117]. Les intégrines

$\alpha_v\beta_3$  sont en conséquence des cibles de choix pour la détection de l'angiogénèse et plus largement des tumeurs.

### VI.2.1.2. Le ligand : cRGD

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont des récepteurs intéressants pour la détection de tumeurs. Cependant leur ligand, qui est une courte séquence peptidique, est également reconnu par d'autres intégrines. Celles-ci n'ont toutefois pas toutes la même affinité pour les différentes protéines porteuses de la séquence RGD. Ainsi chaque intégrine semble privilégier une conformation différente de la séquence. En effet, bien que l'enchaînement des trois peptides RGD soit présent dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, l'environnement proche du tripeptide est différent pour chacune d'entre elles et la conformation de la séquence n'est donc pas identique. Il a ainsi été démontré que certains peptides synthétiques dont la conformation est bloquée par cyclisation ont une affinité et une sélectivité supérieures à celles de peptides analogues mais linéaires. Le choix des acides aminés qui participent au cyclopeptide (de part et d'autre de l'enchaînement arginine - glycine - acide aspartique) permet de contrôler la conformation et donc la sélectivité du ligand vis-à-vis des différents types d'intégrines reconnaissant la séquence RGD [118, 119].

Le ligand que nous utilisons pour cibler les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  est un cyclopentapeptide (Figure VI-4) dont la séquence est la suivante : L-arginine ; L-glycine ; L-acide aspartique ; D-phénylalanine ; L-lysine (soit cRGDfK selon le code à une lettre). La présence de la lysine et de la phénylalanine favorise une conformation du cyclopeptide qui est reconnue spécifiquement par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , conférant ainsi au cRGDfK une grande affinité et une sélectivité élevée pour ces intégrines. La lysine permet en outre, grâce à sa fonction amine présente sur sa chaîne latérale, de greffer le peptide sur des vecteurs et plus particulièrement sur les nano-émulsions.

Un analogue de cette molécule dans lequel la glycine est substituée par l'alanine est utilisé en tant que témoin négatif, le cRADfK. Cette molécule n'a en effet aucune affinité pour les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ .

Afin d'alléger la notation dans la suite du travail, le cRGDfK sera nommé uniquement cRGD et le cRADfK sera appelé cRAD.

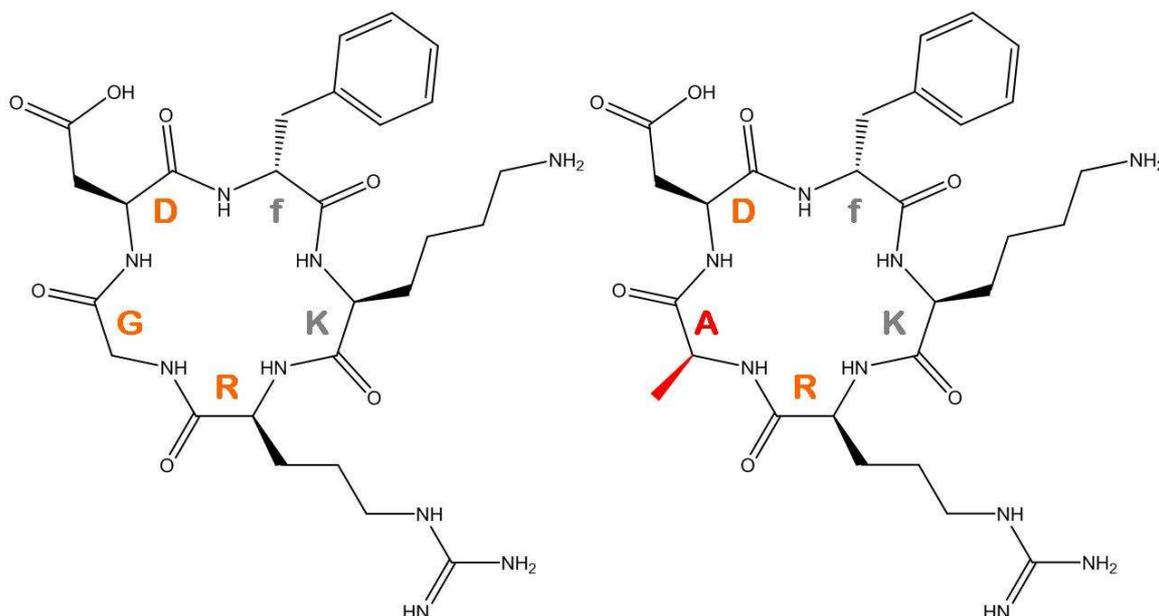


Figure VI-4 : Structure chimique du cRGD à gauche et du cRAD à droite. La substitution de la glycine par l'alanine au sein du cRAD est représentée en rouge.

## VI.2.2. Le couplage chimique des ligands sur les nanoparticules

Afin d'obtenir un ciblage actif, les ligands doivent être reliés à la surface de la nanoparticule, préférentiellement par une liaison covalente de manière à limiter les dissociations entre les particules et les ligands. Cela impose donc de modifier les nano-émulsions afin de pouvoir greffer les ligands de manière covalente. La surface des nanoparticules étant constituée d'une couche de molécules amphiphiles, il est donc nécessaire, en vue de réaliser le greffage, d'introduire des surfactants fonctionnalisables dans la couche stabilisatrice des gouttelettes.

Le greffage, qui correspond au couplage chimique entre le surfactant et le ligand, peut être réalisé à deux étapes distinctes du processus de fabrication des nano-émulsions fonctionnalisées : soit le couplage est réalisé dans un premier temps, puis les surfactants fonctionnalisés sont ajoutés à la formulation qui est ensuite émulsifiée ; soit à l'inverse les surfactants fonctionnalisables sont incorporés dans la formulation et réagissent avec les ligands après émulsification (on parle alors de greffage *in situ*).

Le greffage avant émulsification nécessite de réaliser un lot d'émulsion pour chaque ligand. Cela impose donc d'utiliser des quantités importantes de ligands, l'émulsification devenant délicate en dessous d'un volume total de 2 mL. Le couplage *in situ* permet quant à

lui de travailler avec des quantités de ligands plus faibles puisqu'il est possible de réaliser le greffage sur le volume d'émulsion désiré : il est ainsi envisageable de réaliser différentes fonctionnalisations avec le même lot de nano-émulsion fonctionnalisable. Etant donné qu'un seul lot d'émulsion est suffisant pour réaliser de nombreuses expériences biologiques (que se soit *in vitro* ou *in vivo*), c'est la technique de greffage *in situ* qui sera utilisée.

Le choix de la réaction chimique de couplage doit répondre à de nombreux critères pour être compatible avec un greffage *in situ* : elle doit se dérouler en milieu aqueux, à un pH compatible avec la stabilité colloïdale, ne doit pas modifier la stabilité chimique des fluorophores encapsulés dans les globules, tout en étant la plus quantitative, rapide, et spécifique possible.

La réaction chimique choisie pour greffer les cRGD, et plus généralement les ligands biologiques à la surface des nano-émulsions, est basée sur la réactivité entre les maléimides et les thiols [120]. Cette réaction s'effectuant en milieu aqueux et à pH neutre conduit à la formation d'une liaison covalente de type thioester entre le surfactant porteur d'un groupement maléimide et un ligand présentant une fonction thiol (Figure VI-5).

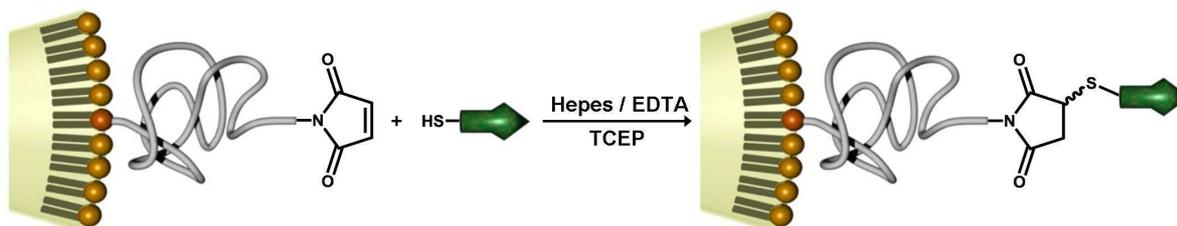


Figure VI-5 : Principe du greffage *in situ* de ligands biologiques à la surface des nanoparticules.

Les cRGD et cRAD décrits dans le paragraphe précédent ne portent pas de fonction thiol. Cependant, le groupe amine porté par la chaîne latérale de la lysine peut être modifié. Les ligands utilisés sont donc transformés par dérivation de l'amine par un groupement contenant une fonction thiol sous une forme protégée par un groupe S-acétyle. Cette protection sera clivée juste avant réaction avec le maléimide afin de limiter les réactions parasites liées à la réactivité des thiols.

Une vision schématique des globules fluorescents et fonctionnalisés est présentée ci-dessous (Figure VI-6).

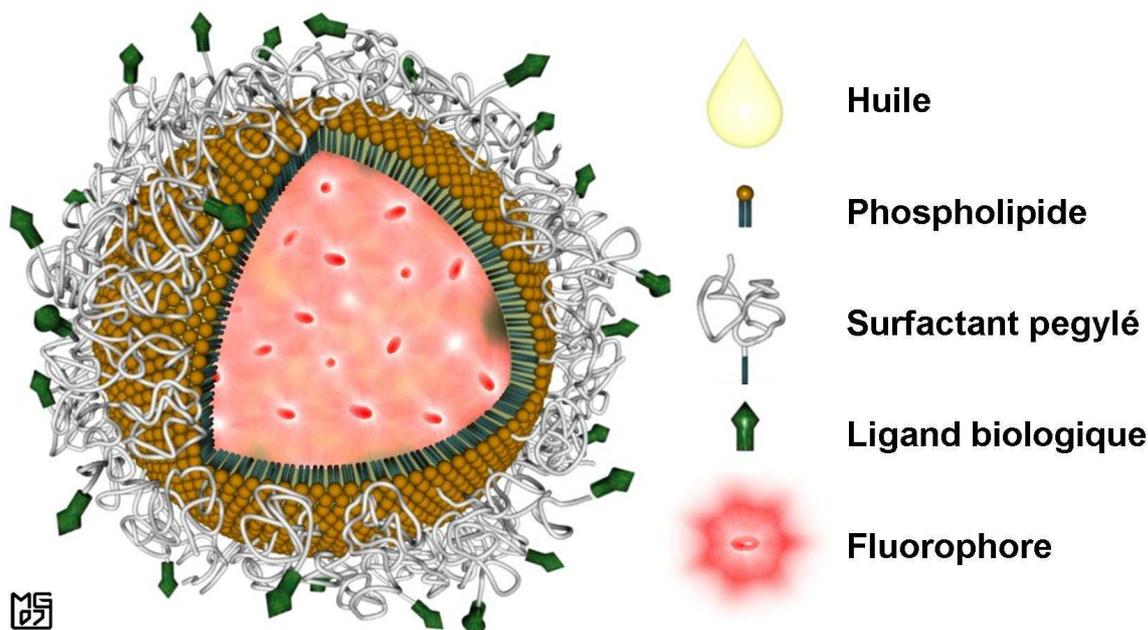


Figure VI-6 : Représentation graphique en 3 dimensions de la structure d'un globule fluorescent et fonctionnalisé par un ligand biologique.

### VI.2.3. Préparation de nano-émulsions fonctionnalisées

Comme décrit dans le paragraphe précédent, la fonctionnalisation des nanoparticules s'effectue *in situ*, soit après émulsification. Elle nécessite cependant l'incorporation de surfactants fonctionnalisables dans la formulation de la nano-émulsion. En vue des validations biologiques, trois types de fonctionnalisation sont réalisés pour chaque lot de nano-émulsion : cRGD (ciblant spécifiquement les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ) ; cRAD (peptide témoin négatif pour les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ) ; et OH (nanoparticule non fonctionnalisée par un peptide mais par une courte molécule possédant une fonction hydroxyle – témoin négatif).

#### VI.2.3.1. Surfactant fonctionnalisable

Le surfactant fonctionnalisable est un dérivé de la phosphatidyléthanolamine, dont l'amine terminale est impliquée dans la formation d'une liaison amide avec une chaîne pegylée (notée PEG) elle-même porteuse à l'autre extrémité d'un groupement maléimide (noté MAL) (Figure VI-7). Le poids de la chaîne PEG est de 5000 g/mol, ce qui correspond à environ 110 motifs polyoxyéthylènes. Cette taille a été choisie pour être supérieure à celle des polymères formant la couche stérique des nano-émulsions (dont le poids est de 2250 g/mol,

soit environ 50 motifs dans le cas de la formulation dite de référence). Cela permet aux ligands de ne pas être piégés dans cette couche et favorise donc leur liberté de mouvement au-dessus des chaînes de PEG.

Le surfactant fonctionnalisable, ou PE-PEG-MAL, est préparé selon le protocole décrit dans l'annexe VI et résumé sur la Figure VI-7. Brièvement, la phosphatidyléthanolamine et le polymère bisfonctionnel sont dissous dans du dichlorométhane. La solution est basifiée par ajout de triéthylamine puis le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante sous argon. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le produit redispersé dans un volume connu de dichlorométhane. La solution de PE-PEG-MAL obtenue entre directement dans la composition des nano-émulsions sans autre purification, les sous-produits de la réaction étant en effet éliminés lors de la dialyse finale des nano-émulsions. La masse molaire du surfactant fonctionnalisable ainsi obtenu est de 5886 g/mol.

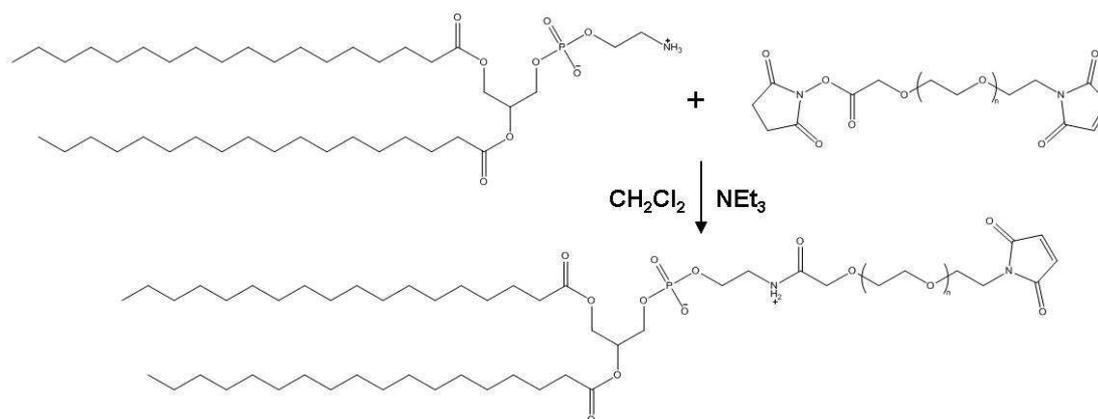


Figure VI-7 : Synthèse du surfactant fonctionnalisable PE-PEG-MAL.

### VI.2.3.2. Préparation des émulsions

La fabrication des nano-émulsions fonctionnalisables est similaire à celle des nano-émulsions précédemment décrites (voir Chapitre III), excepté qu'une partie des surfactants pegylés est remplacée par le surfactant fonctionnalisable.

#### VI.2.3.2.1. Compositions

Deux formulations basées sur la formulation de référence ont été conçues, chacune contenant des quantités de surfactant fonctionnalisable différentes. Le nombre de moles de surfactants est identique pour les deux formulations et est similaire à celui de la formulation

## Chapitre VI : Nano-émulsions fonctionnalisées pour la détection des tumeurs

de référence soit 0,138 mmol/mL (ou 0,276 mmol de surfactants pour un lot de 2 mL). L'ajout de PE-PEG-MAL est donc compensé par une diminution de la quantité de Myrj 53 afin de conserver la même quantité molaire globale de surfactants.

Les deux compositions testées contiennent respectivement 0,5 % et 2,5 % en masse de surfactant fonctionnalisables (Tableau VI-1 et Tableau VI-2).

Dans tous les cas, les nano-émulsions sont dopées DiD à hauteur de 400  $\mu$ M (voir Chapitre IV pour plus de détails sur le dopage).

		Masse (mg)	% m/m	$\mu$ mol
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,5	/
	Suppocire	150	7,5	/
Phase continue	Glycérol	50	2,5	/
	Solution saline	q.s.p 2000	<b>66,4</b>	/
Surfactants	Lécithine	138	6,9	183,5
	<b>Myrj 53</b>	<b>224</b>	<b>11,2</b>	<b>90,1</b>
	<b>PE-PEG-MAL</b>	<b>10</b>	<b>0,5</b>	<b>1,7</b>

Tableau VI-1 : Composition de la formulation à 0,5 % m/m de surfactant fonctionnalisable (lot de 2 mL). Les variations entre les deux compositions sont présentées en rouge.

		Masse (mg)	% m/m	$\mu$ mol
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,5	/
	Suppocire	150	7,5	/
Phase continue	Glycérol	50	2,5	/
	Solution saline	q.s.p 2000	<b>65,3</b>	/
Surfactants	Lécithine	138	6,9	183,5
	<b>Myrj 53</b>	<b>207</b>	<b>10,4</b>	<b>83,3</b>
	<b>PE-PEG-MAL</b>	<b>49</b>	<b>2,5</b>	<b>8,4</b>

Tableau VI-2 : Composition de la formulation à 2,5 % m/m de surfactant fonctionnalisable (lot de 2 mL). Les variations entre les deux compositions sont présentées en rouge.

### VI.2.3.2.2. Préparation

Le protocole d'émulsification est proche de ceux décrits dans les chapitres précédents, à la différence notable que le PE-PEG-MAL est ajouté dans la phase huileuse et non dans la phase aqueuse, contrairement aux surfactants pegylés classiques, afin de favoriser leur participation à la stabilisation des globules.

Brièvement, la fabrication des nano-émulsions consiste à préparer dans un premier temps une phase aqueuse correspondant à une solution saline (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ;

pH 7,4) dans laquelle le surfactant pegylé et le glycérol sont dissous, et une phase huileuse contenant l'huile de soja, la Suppocire<sup>®</sup> NC, la lécithine, le fluorophore et le surfactant fonctionnalisable. La phase aqueuse est ensuite ajoutée à chaud à la phase huileuse et le mélange est soniqué afin d'obtenir une solution de nanoparticules fluorescentes et fonctionnalisables exposant des groupements maléimides en surface.

### VI.2.3.3. Fonctionnalisation

La solution de nanoparticules ainsi obtenue est divisée en trois parties, une pour chacune des fonctionnalisations (cRGD ; cRAD ; OH).

Les peptides cRGD et cRAD (Asynth Service B.V., Pays-Bas), dont les fonctions thiols sont masquées par un groupement S-acétyle, sont préalablement mis en solution dans l'eau déionisée avec deux équivalents de TCEP pendant 30 minutes. Le TCEP (acronyme pour tris(2-carboxyéthyl)phosphine) est un agent de réduction couramment utilisé en biologie pour couper les ponts disulfures. Il est également capable de cliver le groupement protecteur S-acétyle, libérant ainsi la fonction thiol des ligands indispensable au greffage. Son utilisation pour ce type de déprotection est préférée par rapport à celle plus classique de l'hydroxylamine, car cette dernière entraîne une dégradation du fluorophore encapsulé dans les nanoparticules.

Les solutions de cRAD et de cRGD déprotégés, ainsi qu'une solution contenant uniquement du TCEP en même proportion (qui conduira aux nanoparticules OH) sont ensuite ajoutées aux nanoparticules dispersées dans une solution tampon adéquate pour le greffage (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4). Les quantités de cyclopeptides ajoutées correspondent à environ 1,5 équivalents de peptides par rapport à la quantité de maléimides. Chacune des trois solutions ainsi formées est agitée pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, avant l'ajout de 3 équivalents (toujours par rapport aux maléimides) de  $\beta$ -mercapto-éthanol. Les solutions sont ensuite agitées pendant 30 minutes supplémentaires. Le  $\beta$ -mercapto-éthanol possède une fonction thiol ; c'est pourquoi il est utilisé pour neutraliser les maléimides n'ayant éventuellement pas réagi avec les ligands et tous les groupements de la solution ne contenant pas de peptides.

Les solutions sont ensuite dialysées contre une solution de NaCl à 154 mM de manière à éliminer les différents sous-produits et les molécules non greffées, ainsi que pour remplacer le tampon de greffage par une solution saline adéquate pour une injection intraveineuse. Les

## Chapitre VI : Nano-émulsions fonctionnalisées pour la détection des tumeurs

solutions sont dialysées contre 500 fois leur volume ; le dialysat est changé 3 fois (toutes les 30 minutes d'agitation) afin d'éliminer toutes les molécules indésirables.

Après purification, les solutions sont dosées par spectrométrie de fluorescence et diluées avec une solution de NaCl à 154 mM de manière à obtenir une concentration en fluorophores de 50  $\mu$ M. Elles sont enfin stérilisées par filtration (0,22  $\mu$ m) avant leur utilisation lors des expériences biologiques.

Un protocole complet de fonctionnalisation de nano-émulsion pour la formulation à 2,5 % m/m de surfactant fonctionnalisable est disponible dans l'annexe VII.

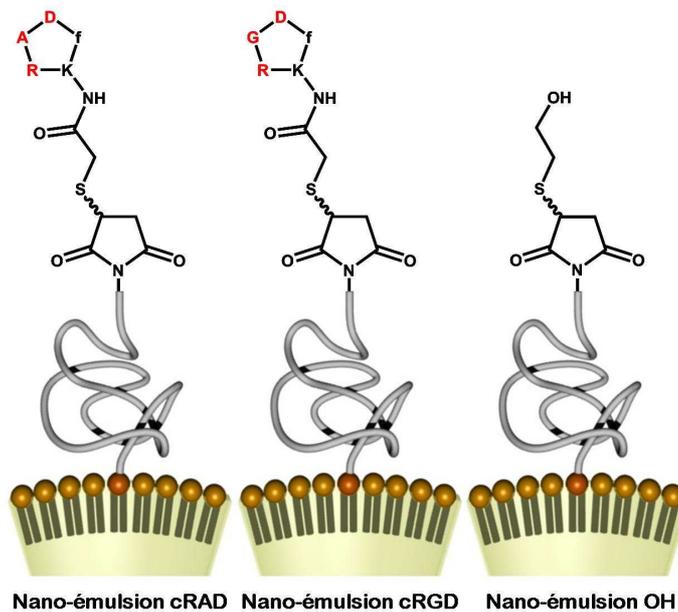


Figure VI-8 : Schéma des 3 types de nano-émulsion fonctionnalisée (cRAD; cRGD; OH).

### VI.2.3.4. Calcul du nombre de ligands biologiques exposés en surface

De la même manière que pour les fluorophores, il est possible de calculer une valeur approximative du nombre de ligands biologiques exposés à la surface des nanoparticules.

En se basant sur le diamètre moyen des nanoparticules, et en supposant d'une part que l'incorporation du surfactant fonctionnalisable est totale, et que tous ces surfactants ont bien été couplés avec les ligands d'autre part, on peut obtenir une indication sur le nombre de ligands exposés à la surface de chaque globule. Le principe de calcul est similaire à celui décrit dans le Chapitre IV. Ainsi, le nombre de ligands par globule ( $N_{Ligands / Glob}$ ) est calculé grâce à l'équation VI.1 :

$$N_{Ligands / Glob} = \frac{N_{Ligands}}{N_{Glob}} \quad (\text{équation VI.1})$$

Le nombre de ligands ( $N_{Ligands}$ ), ici assimilé à celui des surfactants fonctionnalisables, s'obtient grâce à l'équation VI.2 où  $N_{S. Fonc}$ ,  $M_{S. Fonc}$ ,  $n_{S. Fonc}$ ,  $m_{S. Fonc}$  représentent respectivement le nombre de molécules de PE-PEG-MAL, sa masse molaire, la quantité en moles de surfactant fonctionnalisable, et la masse correspondante ; enfin  $N_A$  est le nombre d'Avogadro.

$$N_{Ligands} = N_{S. Fonc} = n_{S. Fonc} \times N_A = \frac{m_{S. Fonc}}{M_{S. Fonc}} \times N_A \quad (\text{Équation VI.2})$$

La détermination du nombre de globules  $N_{Glob}$  est identique à celle décrite dans le Chapitre IV. Pour rappel, le nombre de globules est calculé grâce à l'équation VI.3 dans laquelle  $V_{\varphi d}$  correspond au volume total de la phase dispersée et  $\langle v \rangle$  représente le volume moyen d'un globule (directement obtenu grâce à l'équation VI.4 où  $\langle d \rangle$  représente le diamètre moyen du globule).

$$N_{Glob} = \frac{V_{\varphi d}}{\langle v \rangle} \quad (\text{Équation VI.3})$$

$$\langle v \rangle = \pi \frac{\langle d \rangle^3}{6} \quad (\text{Équation VI.4})$$

La détermination de  $V_{\varphi d}$  est basée sur l'hypothèse que l'ensemble des surfactants de la formulation participe à la stabilisation des globules. Le volume peut ainsi être estimé grâce à l'équation VI.5, à partir de la masse totale de la phase dispersée (huile, cire, lécithine, surfactants pegylés et surfactants fonctionnalisables) et de la densité globale de la phase dispersée (cette densité globale varie en fonction des formulations ; elle sera arbitrairement fixée à 1,1).

$$V_{\varphi d} = \frac{m_{\varphi d}}{d_{\varphi d}} = \frac{1}{d_{\varphi d}} \times (m_{huile} + m_{cire} + m_{lécithine} + m_{s. pegylés} + m_{S. Fonc}) \quad (\text{Équation VI.5})$$

Le diamètre moyen des globules n'est pas influencé par la fonctionnalisation : il est en effet d'environ 35 nm pour les deux formulations. Ainsi, en fonction des compositions indiquées précédemment (Tableau VI-1 et Tableau VI-2), les globules issus des formulations à 0,5 % m/m et 2,5 % m/m en surfactant fonctionnalisable possèdent respectivement environ 44 et 208 ligands exposés à leur surface (Tableau VI-3).

Formulation	PE-PEG-MAL		$N_{Ligands}$	$N_{Glob}$	$N_{Ligands/Glob}$	Densité (Ligands/nm <sup>2</sup> )
	masse (mg)	quantité (μmol)				
0,5 %	10	1,699	$1,023 \cdot 10^{18}$	$2,316 \cdot 10^{16}$	44	0,011
2,5 %	49	8,325	$5,013 \cdot 10^{18}$	$2,405 \cdot 10^{16}$	208	0,054

**Tableau VI-3 : Calcul du nombre théorique de ligands par globule pour les formulations à 0,5 % m/m et à 2,5 % m/m en surfactant fonctionnalisable.**

Ces valeurs calculées sont des valeurs maximales puisque nous n'avons pas de valeur ni d'information sur la quantité de surfactant fonctionnalisé réellement incorporée au sein des nanoparticules, et nous ne disposons pas non plus du taux de greffage des ligands lors du couplage *in situ*. Ces valeurs sont d'autant plus approximatives que les diamètres mesurés par diffusion quasi-élastique de la lumière sont des diamètres hydrodynamiques qui englobent par conséquent aussi les couches de solvation.

La densité de ligands (exprimée en ligands par nm<sup>2</sup>) se révèle après calcul relativement faible pour les deux formulations, puisque l'on trouve environ 1 ligand tous les 80 nm<sup>2</sup> pour la formulation à 0,5 % m/m et 1 tous les 20 nm<sup>2</sup> pour la formulation à 2,5 % m/m.

### VI.3. Les modèles tumoraux et validation in vitro

#### VI.3.1. Modèles de cellules tumorales

Différentes lignées cellulaires tumorales, humaines ou animales, ont été utilisées pour évaluer l'intérêt des nano-émulsions pour la détection des tumeurs. Les protocoles de culture des différentes lignées sont détaillés dans l'annexe VIII.

#### **VI.3.1.1. Cellules tumorales Ts/Apc**

Les cellules tumorales Ts/Apc ou TSA sont issues du cancer du sein de souris femelle de la lignée BALB/c [121]. Elles se caractérisent par une croissance tumorale rapide engendrant la formation de nombreux néovaisseaux fortement fenestrés.

#### **VI.3.1.2. Cellules tumorales OVCAR-3**

Les cellules OVCAR-3 sont des cellules tumorales issues d'un adénocarcinome ovarien humain. De manière similaire aux Ts/APC, ces cellules ont une croissance rapide conduisant à un endothélium vasculaire imparfait.

#### **VI.3.1.3. Cellules tumorale HEK $\beta$ 3**

La lignée HEK293( $\beta$ 3) est un sous-clone de la lignée de cellules embryonnaires humaines de rein HEK293, transfectée de manière stable par un plasmide codant pour la sous-unité humaine de l'intégrine  $\beta$ 3. Ces cellules tumorales nommées par la suite HEK  $\beta$ 3 surexpriment ainsi les intégrines  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ 3 à leur surface. La croissance de telles cellules, une fois implantées dans des souris, est néanmoins plus lente que celle des cellules Ts/Apc ou OVCAR-3. Les tumeurs qui se développent à partir des cellules HEK  $\beta$ 3 sont moins bien vascularisées et les vaisseaux sanguins qui les irriguent ont moins de fenestrations.

### **VI.3.2. Test *in vitro* de reconnaissance cellulaire des nanoparticules - cRGD**

Les cellules HEK  $\beta$ 3 exposent naturellement à leur surface un grand nombre d'intégrines  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ 3, ce qui permet de les utiliser pour réaliser des tests *in vitro* de reconnaissance cellulaire, et ainsi valider le couplage des ligands sur les différents types de nanoparticules fonctionnalisées. Les trois fonctionnalisations décrites précédemment (cRGD, cRAD et OH) ont ainsi été testées.

### VI.3.2.1. Protocoles expérimentaux

Pour réaliser les tests de reconnaissance cellulaire, un million de cellules HEK  $\beta$ 3 sont resuspendues dans 200  $\mu$ L de PBS (Phosphine Buffer Saline), ou de DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), contenant les nano-émulsions fonctionnalisées dont la concentration finale est de 0,2  $\mu$ M en fluorophores. Après 15 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont rincées et resuspendues avant d'être analysées par cytométrie en flux.

Pour les analyses par microscopie de fluorescence, les cellules sont cultivées sur des lamelles. Elles sont rincées avec du PBS avant d'être mises en contact avec 200  $\mu$ L d'une solution de PBS contenant les nano-émulsions fonctionnalisées, dont la concentration finale est de 0,2  $\mu$ M en fluorophores. Après une incubation de 15 minutes à 4°C, les cellules sont rincées puis fixées avec du PFA (paraformaldéhyde). Le noyau des cellules est coloré par une solution de Hoechst et les lames sont enfin observées au microscope optique à fluorescence.

Les protocoles expérimentaux des analyses par cytométrie de flux et d'observation par microscopie de fluorescence sont détaillés dans l'annexe VIII. Ces expérimentations cellulaires ont été réalisées à l'IAB de l'équipe de Jean-Luc Coll par Sandrine Duffort.

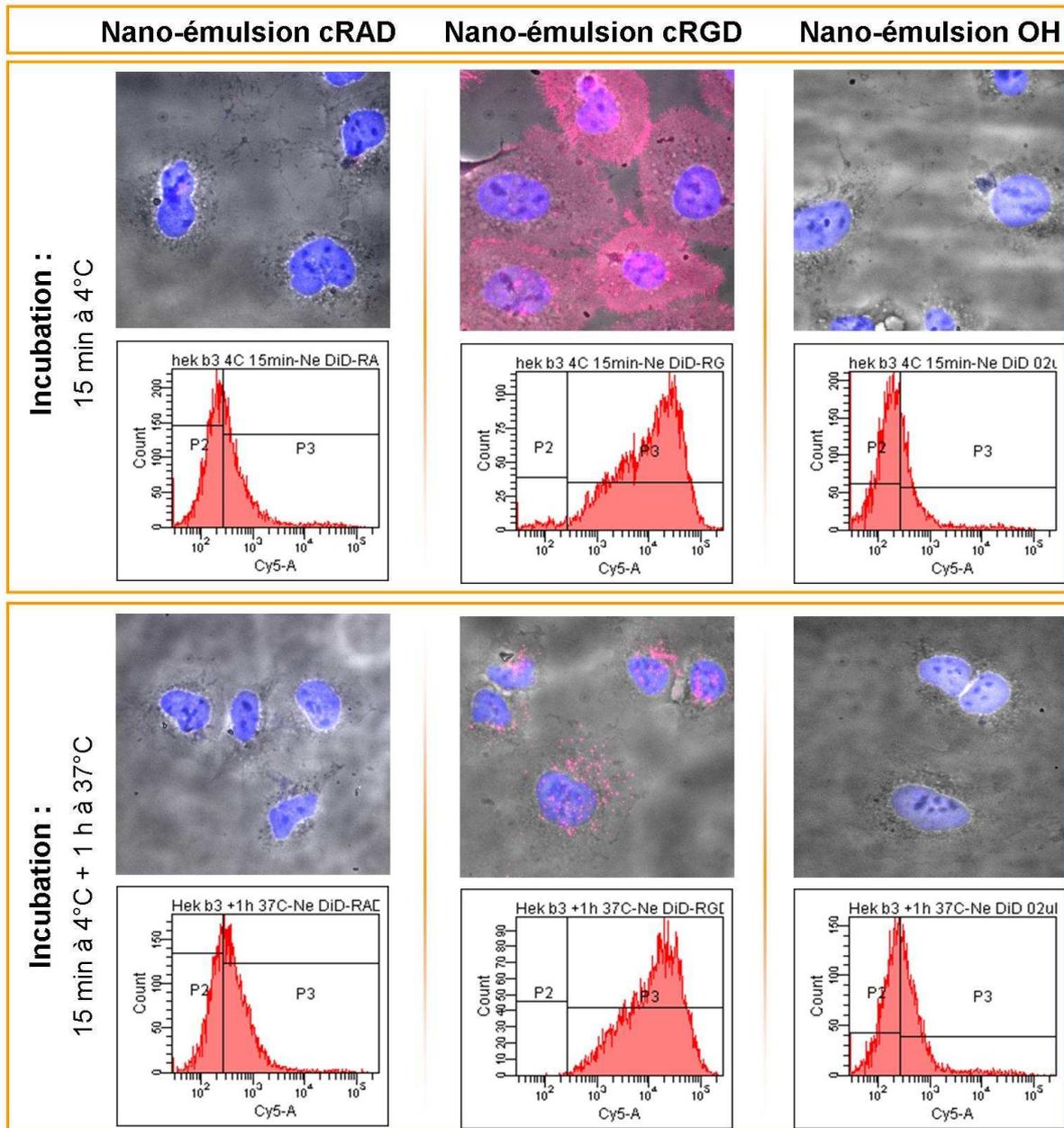
Les nano-émulsions utilisées pour ces deux analyses sont issues de la formulation à 2,5 % m/m en surfactant fonctionnalisable, ce qui correspond à environ 200 ligands par particule, soit une concentration théorique en ligands de 2  $\mu$ M dans les milieux d'incubation.

### VI.3.2.2. Résultats

La Figure VI-9 regroupe les clichés de microscopie et les données de cytométrie en flux pour les trois fonctionnalisations testées, pour deux conditions d'incubation différentes. Les clichés montrent la présence des nanoparticules (coloration rose) uniquement dans le cas où elles sont fonctionnalisées par les cRGD. On observe également une modification de la morphologie des cellules en présence des nanoparticules cRGD : elles sont moins étalées et prennent une forme plus ronde que les cellules incubées en présence des nanoparticules cRAD ou OH. Les analyses réalisées en cytométrie en flux présentent des résultats identiques quel que soit le milieu d'incubation (PBS ou DMEM à 10 % en SVF). Seuls les résultats réalisés

**Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo***

avec le milieu contenant le sérum de veau fœtal sont donc présentés. Les données obtenues indiquent un nombre de cellules fortement fluorescentes nettement plus important dans le cas des nano-émulsions cRGD que pour les autres types de fonctionnalisation.



**Figure VI-9 : Observations microscopiques de cellules HEK  $\beta$ 3 incubées en présence de nanoparticules fonctionnalisées et graphiques de cytométrie en flux correspondants pour deux conditions d'incubation : 15 minutes à 4°C, et 15 minutes à 4°C puis 1 heure à 37°C.**

### VI.3.2.3. Discussion

Les observations en microscopie de fluorescence et les analyses en cytométrie en flux confirment l'existence d'une reconnaissance spécifique par les cellules HEK  $\beta_3$  des nanoparticules fonctionnalisées avec le cRGD, puisque que seules les cellules incubées avec ce type de particules deviennent fluorescentes. D'autre part, les clichés de microscopie montrent que l'incubation à 4°C permet uniquement la fixation entre les ligands et les récepteurs, l'internalisation des nanoparticules ne se produisant que si les cellules sont ensuite maintenues à 37°C. Les nanoparticules fluorescentes semblent alors se concentrer dans certaines zones du cytoplasme.

Ces résultats prouvent à la fois l'efficacité du greffage des ligands à la surface des particules, ainsi que la reconnaissance et la disponibilité des cRGD pour la formation de complexes avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . Le fait que la présence de sérum de veau fœtal lors des analyses de cytométrie en flux ne modifie pas les résultats obtenus par rapport à des conditions plus « idéales » est également important, car cela signifie que la présence de protéines ne gêne pas la reconnaissance des cRGD par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ .

Les résultats présentés ont été obtenus avec des nano-émulsions issues de la formulation à 2,5 % m/m en surfactant fonctionnalisable, mais des résultats similaires en cytométrie en flux ont été observés avec des solutions issues de la formulation à 0,5% m/m (qui comportent environ 5 fois moins de ligands exposés en surface). Cela indique que même une densité de ligands plus faible (1 ligand tous les 80 nanomètres carrés pour la formulation à 0,5% m/m) est suffisante pour permettre un couplage significatif avec des cellules exprimant les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  dans des conditions *in vitro*.

## VI.4. Ciblage actif des tumeurs *in vivo*

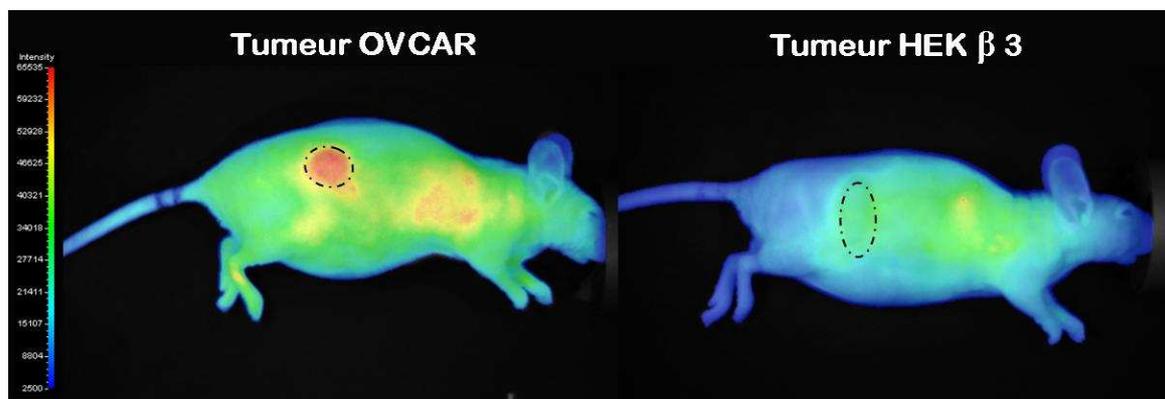
### VI.4.1. Mise en évidence de l'effet EPR (« Enhanced Permeation and Retention »)

Avant d'évaluer l'impact réel de la fonctionnalisation de la surface des nanoparticules pour le ciblage des tumeurs, il est utile de connaître le comportement des nano-émulsions non

fonctionnalisées vis-à-vis des tissus cancéreux. Il est effectivement connu que les défauts de la vascularisation des tumeurs associés au faible drainage lymphatique favorisent l'accumulation passive des nanoparticules au sein de la zone tumorale : c'est l'effet EPR (VI.1.2).

Afin de visualiser l'accumulation passive des nanoparticules fluorescentes non fonctionnalisées dans les tumeurs, 200  $\mu$ L d'une solution de nano-émulsion (issue de la formulation de référence et dopée à 400  $\mu$ M en DiD) correspondant à 10 nmol de fluorophores ont été injectés à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (voir annexe VIII). Deux modèles tumoraux différents ont été étudiés : OVCAR et HEK  $\beta$ 3.

Les clichés de fluorescence réalisés 24 heures après l'injection du traceur montrent des différences importantes au niveau des zones tumorales. En effet, un signal intense de fluorescence est émis depuis la tumeur OVCAR, contrairement à la tumeur HEK  $\beta$ 3 qui n'est pas distinguable sur le cliché de fluorescence.



**Figure VI-10 : Cliché de fluorescence de souris porteuses de tumeurs sous-cutanées OVCAR (gauche) et HEK  $\beta$ 3 (droite) 24 h après injection de 200  $\mu$ L de nano-émulsion non fonctionnalisée (50  $\mu$ M en fluorophores). Les tumeurs sont délimitées par les lignes pointillées.**

Ainsi, il apparaît que l'effet EPR est dans certains cas suffisamment favorable pour induire une accumulation passive des nanoparticules dans la zone tumorale, mais cela dépend fortement de la tumeur et plus particulièrement de la vascularisation de celle-ci.

Dans les expériences suivantes utilisant les nano-émulsions fonctionnalisées, l'utilisation de nano-émulsions OH (non fonctionnalisées par un peptide) permettront de mettre en évidence la part de l'accumulation liée à l'effet EPR.

### VI.4.2. Expérimentation *in vivo* : première série

Une expérience sur souris porteuses de tumeurs TSA est réalisée dans le but d'observer l'accumulation des nanoparticules fluorescentes et fonctionnalisées (cRGD ; cRAD ; OH) dans les tumeurs en fonction du temps. Il sera ainsi possible, grâce à cette étude, de déterminer le temps d'observation après injection le plus pertinent pour quantifier l'accumulation éventuelle des globules dans la zone tumorale.

#### VI.4.2.1. Protocole expérimental

Au cours de cette expérience, 9 souris *Swiss Nude* femelles porteuses de tumeurs issues de cellules Ts/Apc sont utilisées comme modèle animal (annexe VIII). Les nano-émulsions sont injectées par voie intraveineuse dans la queue à raison de 200  $\mu$ L de solution par souris et de trois souris par type de fonctionnalisation. Les solutions injectées sont issues de la formulation à 0,5% m/m en surfactant fonctionnalisable précédemment décrite (VI.2.3.2.1). La quantité administrée pour chaque injection correspond donc à 10 nmol de fluorophores DiD et à environ 20 nmol de ligands.

Toutes les injections et acquisitions d'images sont réalisées alors que les souris sont maintenues sous anesthésie générale par voie gazeuse (isoflurane). Les animaux anesthésiés sont imagés avec le dispositif d'imagerie de fluorescence par réflectance précédemment décrit (voir Chapitres II et V).

Les images sont enregistrées 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures, 6 heures, 24 heures, 31 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures après les injections de nano-émulsions fluorescentes fonctionnalisées.

#### VI.4.2.2. Résultats

Les clichés enregistrés 24 heures après l'injection (Figure VI-11) montrent une accumulation plus importante au niveau de la tumeur qu'au niveau du reste de l'animal. Ce constat est cependant valable pour tous les animaux et semble donc indépendant de la fonctionnalisation des nanoparticules.

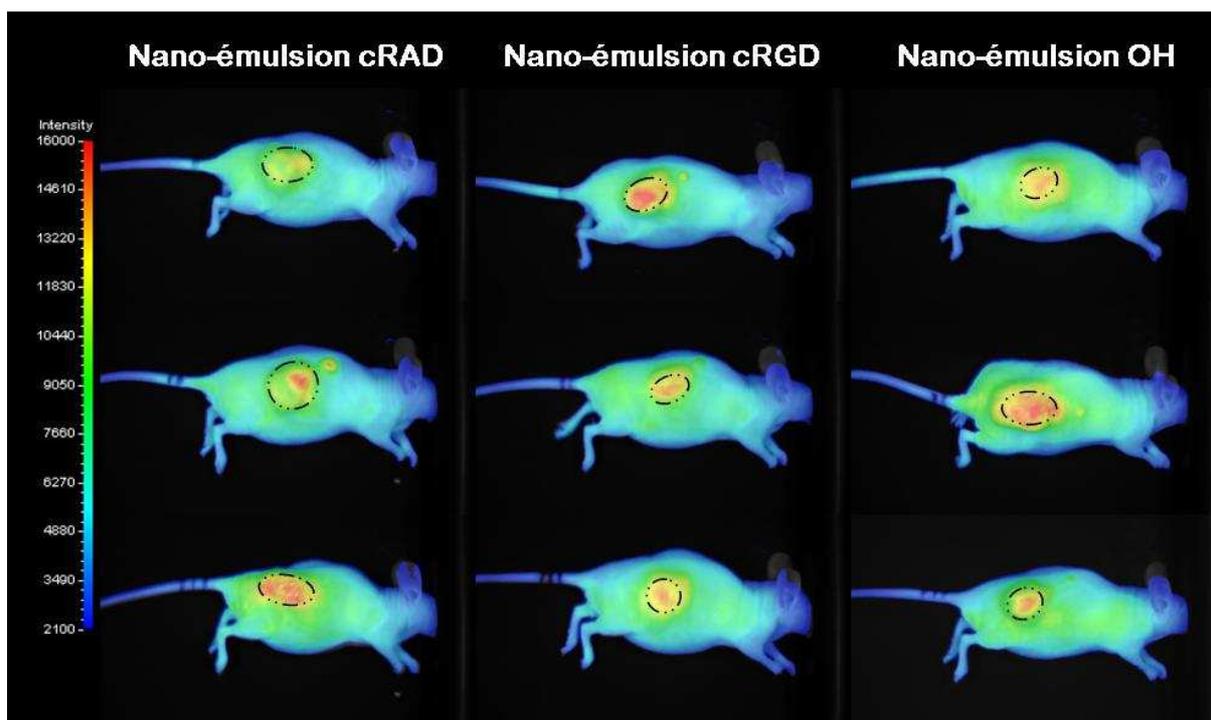


Figure VI-11 : Clichés de fluorescence de souris porteuses de tumeurs Ts/Apc sous-cutanées (10 millions de cellules implantées 12 jours avant l'injection des nano-émulsions) 24 h après injection de 200  $\mu$ L de nano-émulsions fonctionnalisées (50  $\mu$ M en fluorophores). Les tumeurs sont délimitées par les lignes pointillées.

Le traitement de l'ensemble des clichés obtenus permet de déterminer le rapport tumeur / peau via l'équation VI.1 où le rapport tumeur sur peau est noté  $R_{\frac{Tumeur}{Peau}}$  et où  $I_{Tumeur}$ ,  $I_{Peau}$ ,  $I_{Fond}$  désignent respectivement l'intensité moyenne de fluorescence de la tumeur, de la peau, et du fond (ce qui correspond au bruit de la caméra).

$$R_{\frac{Tumeur}{Peau}} = \frac{I_{Tumeur} - I_{Fond}}{I_{Peau} - I_{Fond}} \quad (\text{Équation VI.1})$$

L'évolution de ce rapport avec le temps (Figure VI-12) confirme l'accumulation des nanoparticules dans la zone tumorale, les meilleurs contrastes étant atteints pour des temps après injection supérieurs à 24 heures. On note cependant une différence significative entre les nano-émulsions fonctionnalisées (cRGD et cRAD) et celles qui ne sont pas fonctionnalisées par un peptide (OH).

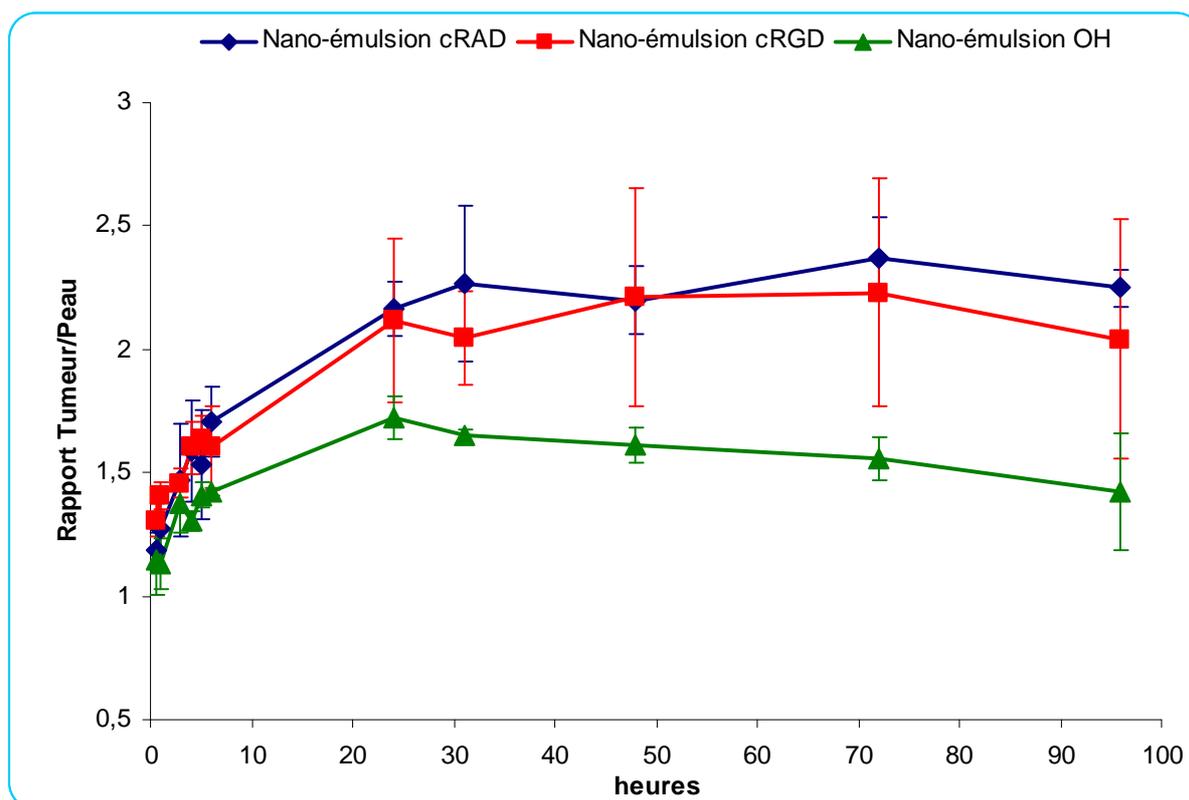


Figure VI-12 : Evolution du rapport tumeur sur peau en fonction de la fonctionnalisation.

### VI.4.2.3. Discussion

Les clichés de fluorescence montrent la présence d'une accumulation des nanoparticules fluorescentes plus importante dans la zone tumorale que dans les tissus annexes tels que la peau, et ce quel que soit la fonctionnalisation des particules. Les rapports tumeur sur peau calculés montrent en effet l'absence de différence entre les globules exposant les cRGD ou les cRAD. Le rapport tumeur sur peau des nanoparticules OH est quant à lui sensiblement plus faible que pour les deux autres types de fonctionnalisation. Ainsi 24 heures après injection, le rapport tumeur sur peau est d'environ 1,7 pour les globules OH alors qu'il est supérieur à 2,1 pour les nanoparticules cRGD ou cRAD (Figure VI-13). En analysant plus précisément les résultats, il apparaît cependant que le signal émis par les tumeurs est similaire pour les trois fonctionnalisations, et qu'une accumulation plus prononcée dans la peau dans le cas des nanoparticules OH est en réalité la cause de la différence observée entre les rapports tumeur sur peau (Figure VI-13).

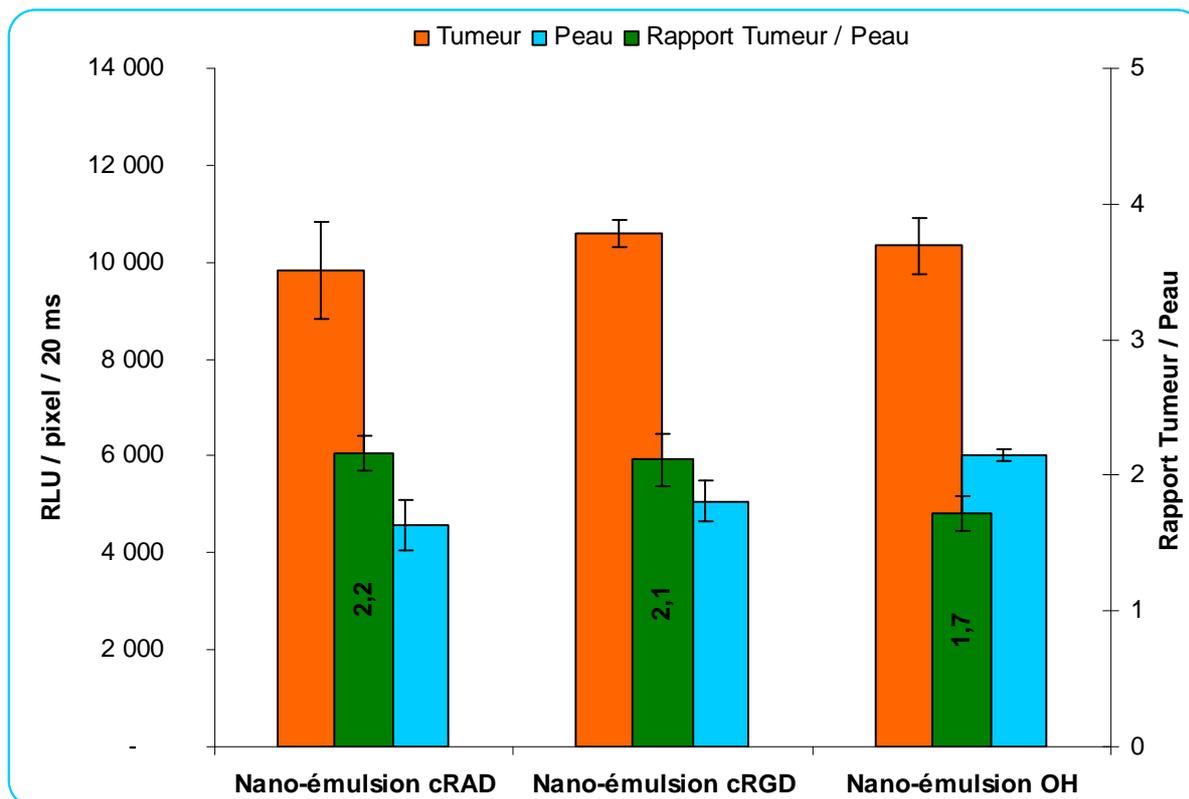


Figure VI-13 : Intensités de fluorescence des tumeurs et de la peau (corrigées de la « fluorescence » du noir) mesurées 24 heures après injection des nano-émulsions fonctionnalisées. La barre verte représente le rapport tumeur sur peau calculé à partir des intensités sus-mentionnées.

L'accumulation au sein de la tumeur n'est donc pas modifiée par la fonctionnalisation des nanoparticules, ce qui signifie qu'il s'agit uniquement d'un phénomène d'accumulation passif lié à la forte fenestration de l'endothélium vasculaire des capillaires irriguant les tumeurs (effet EPR).

Le rapport tumeur sur peau augmente au cours des premières 24 heures puis se stabilise pour toutes les nanoparticules. Cela confirme encore une fois que les nanoparticules ont une durée de demi-vie plasmatique importante, et également que l'accumulation au sein des tumeurs est un processus lent.

#### VI.4.3. Expérimentation *in vivo* : deuxième série

La première expérience a permis d'établir l'évolution du rapport tumeur sur peau en fonction du temps. Au vu des résultats obtenus, le temps d'observation pertinent en terme de contraste a été défini à 24 heures après injection.

La deuxième série d'expérimentations est destinée à évaluer la biodistribution des globules fluorescents dans les organes en fonction de leur fonctionnalisation, 24 heures après administration des nano-émulsions.

### VI.4.3.1. Protocole expérimental

Les mêmes solutions de nanoparticules fonctionnalisées sont injectées (1 semaine après la première expérience) à sept souris *Swiss Nude* femelles porteuses de tumeurs Ts/Apc, à raison de trois souris pour les nanoparticules cRGD et deux souris pour les globules OH et cRAD. Le protocole est identique à celui décrit précédemment (VI.4.2.1), excepté que les souris sont cette fois-ci imagées uniquement 24 heures après l'injection des nano-émulsions, et que les animaux sont ensuite sacrifiés et disséqués afin d'observer la fluorescence émise par les différents organes.

### VI.4.3.2. Résultats

L'analyse des rapports tumeur sur peau (Figure VI-14) ne met plus en évidence de différence entre les nanoparticules fonctionnalisées et non fonctionnalisées par les peptides. De plus, les rapports obtenus sont supérieurs à ceux observés lors de la première expérience (environ 2,5 contre 2,1).

On peut également noter que l'intensité de fluorescence de la peau chez les souris ayant reçu les nano-émulsions non fonctionnalisées est similaire à celle des deux autres types de particules et correspond aux valeurs obtenues pour les globules fonctionnalisés par les cyclopeptides dans la première expérience (Figure VI-13).

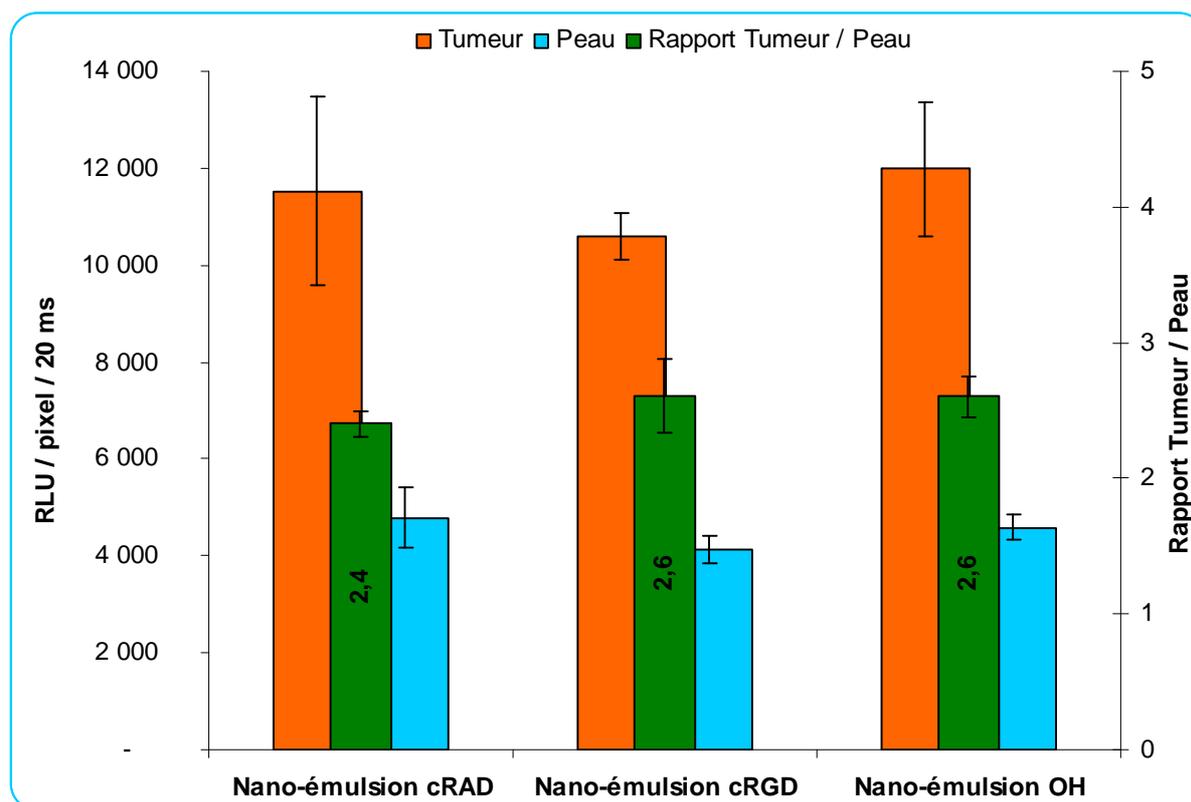


Figure VI-14 : Intensités de fluorescence des tumeurs et de la peau (corrigées de la « fluorescence » du noir) mesurées 24 heures après injection des nano-émulsions fonctionnalisées. La barre verte représente le rapport tumeur sur peau calculé à partir des intensités sus-mentionnées.

Enfin, l'analyse de la fluorescence émise par les organes montre une biodistribution proche de celle observée dans le cas des souris saines, à l'exception bien entendu de la tumeur (Figure VI-15 et Figure VI-16).

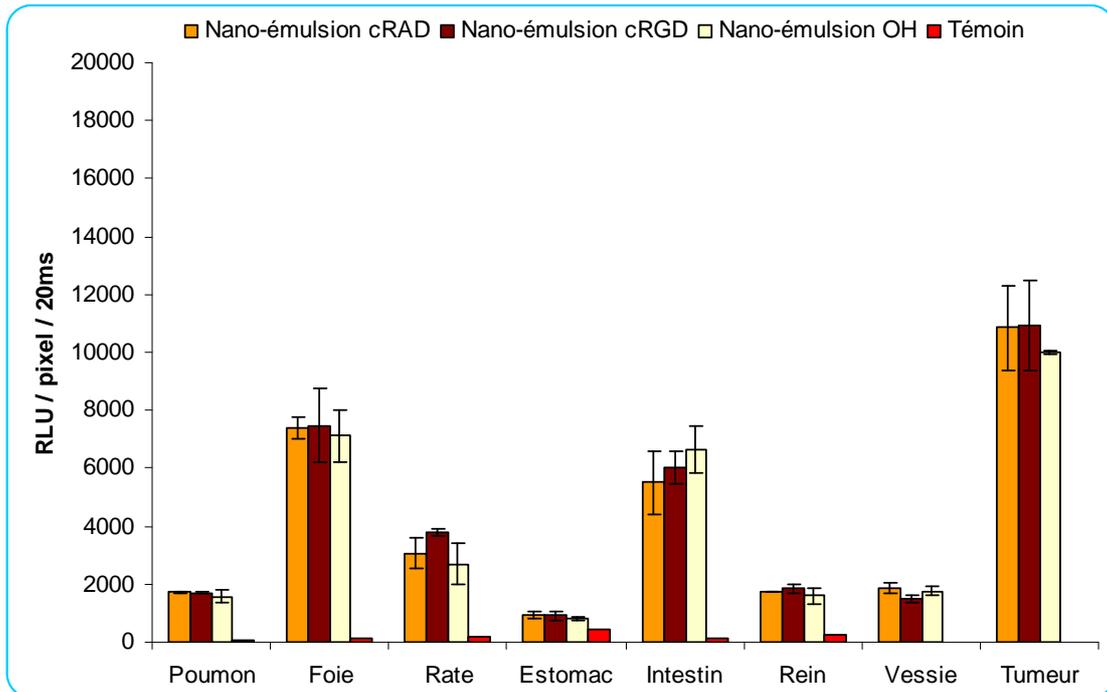


Figure VI-15 : Intensités de fluorescence émises par différents organes en fonction de la fonctionnalisation des nanoparticules, 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. Le témoin est une souris non injectée et correspond à l'auto-fluorescence des organes.

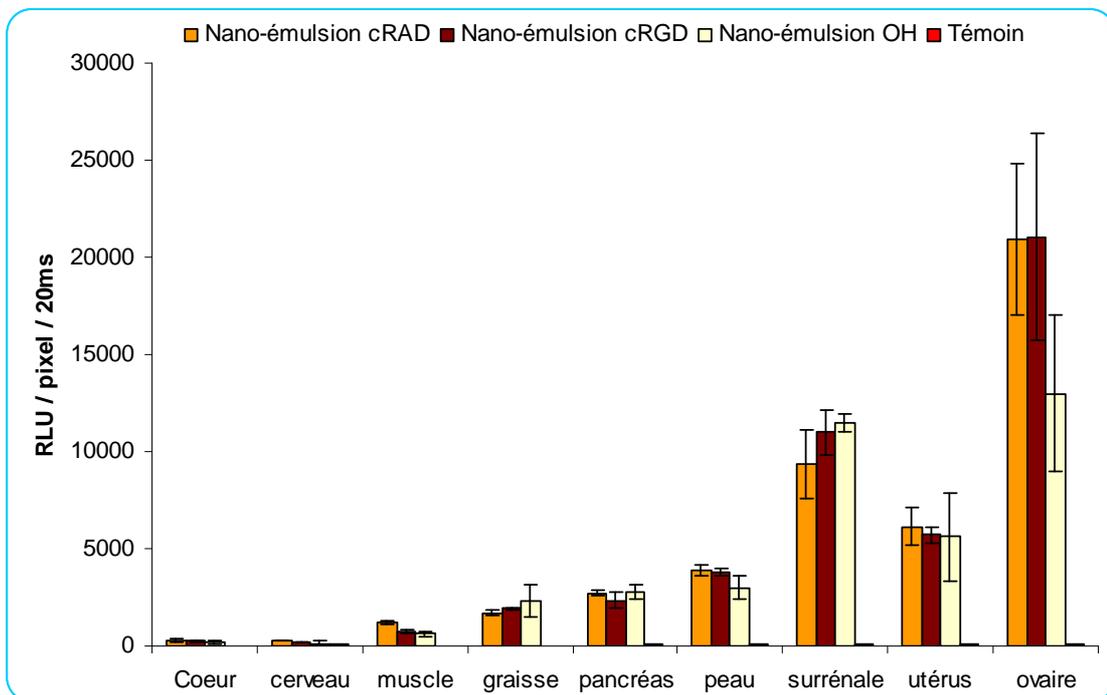


Figure VI-16 : Intensités de fluorescence émises par différents organes en fonction de la fonctionnalisation des nanoparticules, 24 h après l'injection dans la queue de l'animal de 200 $\mu$ L de nano-émulsion fluorescente contenant 10 nmol de fluorophores. Le témoin est une souris non injectée et correspond à l'auto-fluorescence des organes.

### VI.4.3.3. Discussion

Le calcul du rapport tumeur sur peau indique une différence de comportement entre les deux expérimentations. En effet, bien que l'on n'observe toujours pas de signal spécifique dans le cas des nano-émulsions cRGD, le rapport tumeur sur peau et les intensités de fluorescence de la peau et de la tumeur sont dans la seconde série d'expériences similaires pour toutes les particules, y compris celles qui sont fonctionnalisées OH. Il semble ainsi que le vieillissement de quelques jours des nano-émulsions fonctionnalisées OH ait modifié leurs propriétés, notamment en ce qui concerne leur accumulation par la peau, ce qui n'est observé que dans le cas de cette fonctionnalisation. Aucune évolution significative n'est en effet observée au niveau de l'intensité de fluorescence de la peau pour les nano-émulsions cRAD et cRGD entre les deux expériences.

Pour expliquer cette différence de biodistribution des nanoparticules OH à une semaine d'intervalle, on peut émettre l'hypothèse d'un changement des propriétés de surface des globules. En effet, il est envisageable que certains groupements maléimides des surfactants de fonctionnalisation n'aient pas été neutralisés au cours de l'étape de greffage. Les conditions de neutralisation par le  $\beta$ -mercapto-éthanol ne sont peut-être pas suffisantes dans le cas des particules OH. Les groupements maléimides s'hydrolysent alors lentement en milieu aqueux, ce qui entraîne une modification de la surface des nanoparticules OH et peut donc expliquer le changement de biodistribution observé.

D'autre part, la faible augmentation du rapport tumeur sur peau par rapport à l'expérience précédente est engendrée par une accumulation légèrement plus prononcée dans les tumeurs.

Enfin, l'analyse des organes après sacrifice et dissection des souris montre que la présence de tumeurs n'influe pas sur la biodistribution globale des nanoparticules. On retrouve effectivement des niveaux d'accumulation par organe similaires à ceux décrits dans le Chapitre V. Ainsi la fonctionnalisation des nanoparticules fluorescentes ne modifie pas non plus leur distribution dans l'organisme. En ce qui concerne le signal émis par les tumeurs, il est supérieur à celui du foie, comparable à celui des glandes surrénales mais reste inférieur à celui des ovaires.

### VI.4.4. Conclusions

Les deux expériences montrent qu'il existe un important phénomène d'accumulation au sein des tumeurs Ts/Apc. Cependant, l'accumulation est identique quelle que soit la fonctionnalisation ; il s'agit donc uniquement d'un phénomène passif lié à l'effet EPR. Il est en effet difficile de visualiser la composante liée au ciblage actif dans l'accumulation au niveau des tumeurs pour les souris ayant reçu les doses de nano-émulsions cRGD. L'absence d'accumulation préférentielle des particules couplées au cRGD peut être expliquée par la faible densité de ligands exposés en surface par la formulation à 0,5 % m/m en surfactant fonctionnalisable, qui est de 0,011 ligands par  $\text{nm}^2$  soit moins d'un peptide tous les  $80 \text{ nm}^2$  (Tableau VI-3).

Le fait qu'il y ait plus de signal émis par la tumeur que le foie par exemple est un bon résultat qui n'est pas reflété par le calcul du rapport tumeur sur peau. En effet, l'accumulation dans la peau pénalise fortement les valeurs obtenues. Ainsi, si on compare les intensités de fluorescence émises par la tumeur et par les muscles après dissection des animaux, on obtient des rapports tumeur sur muscle d'environ 15 soit jusqu'à plus de six fois supérieurs aux rapports tumeur sur peau.

Quoi qu'il en soit, la furtivité des nano-émulsions fonctionnalisées est suffisante pour éviter l'action du système réticuloendothélial, et ainsi permettre une importante accumulation passive dans les tumeurs en traversant les fenestrations de la paroi des vaisseaux sanguins les irrigant.

### VI.5. *Modèle de cellules tumorales HEK $\beta_3$*

L'expérience qui va suivre consiste à injecter des nano-émulsions fonctionnalisées à des animaux porteurs de tumeurs HEK  $\beta_3$ , afin d'évaluer l'impact du greffage sur l'accumulation au sein des tumeurs dont les cellules surexpriment les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ .

### VI.5.1. Protocole expérimental

Cette expérience est menée sur neuf souris *Swiss Nude* femelles de 6 semaines (Janvier, France) porteuses de tumeurs HEK  $\beta$ 3.

Les nano-émulsions sont injectées par voie intraveineuse dans la queue à raison de 200  $\mu$ L de solution par souris et de trois souris par type de fonctionnalisation. Les solutions injectées sont cette fois issues de la formulation à 2,5% m/m en surfactant fonctionnalisable précédemment décrite (VI.2.3.2.1). La quantité administrée lors de chaque injection correspond ainsi à 10 nmol de fluorophores DiD et à environ 100 nmol de ligands (contre 20 pour les solutions basées sur la formulation à 0,5% m/m).

Toutes les injections et acquisitions d'images sont réalisées alors que les souris sont maintenues sous anesthésie générale par voie gazeuse (isoflurane). Les animaux anesthésiés sont imagés à l'aide du dispositif d'imagerie de fluorescence par réflectance précédemment décrit (voir Chapitres II et V).

Les images sont enregistrées 30 minutes, 1 heure, 3 heures, 7 heures, 24 heures, 48 heures, 120 heures, et 144 heures après les injections de nano-émulsions fluorescentes fonctionnalisées.

### VI.5.2. Résultats

Les clichés de fluorescence enregistrés 24 heures après injection des nano-émulsions montrent une intensité de fluorescence supérieure au niveau de la zone tumorale par rapport aux zones annexes (Figure VI-17).

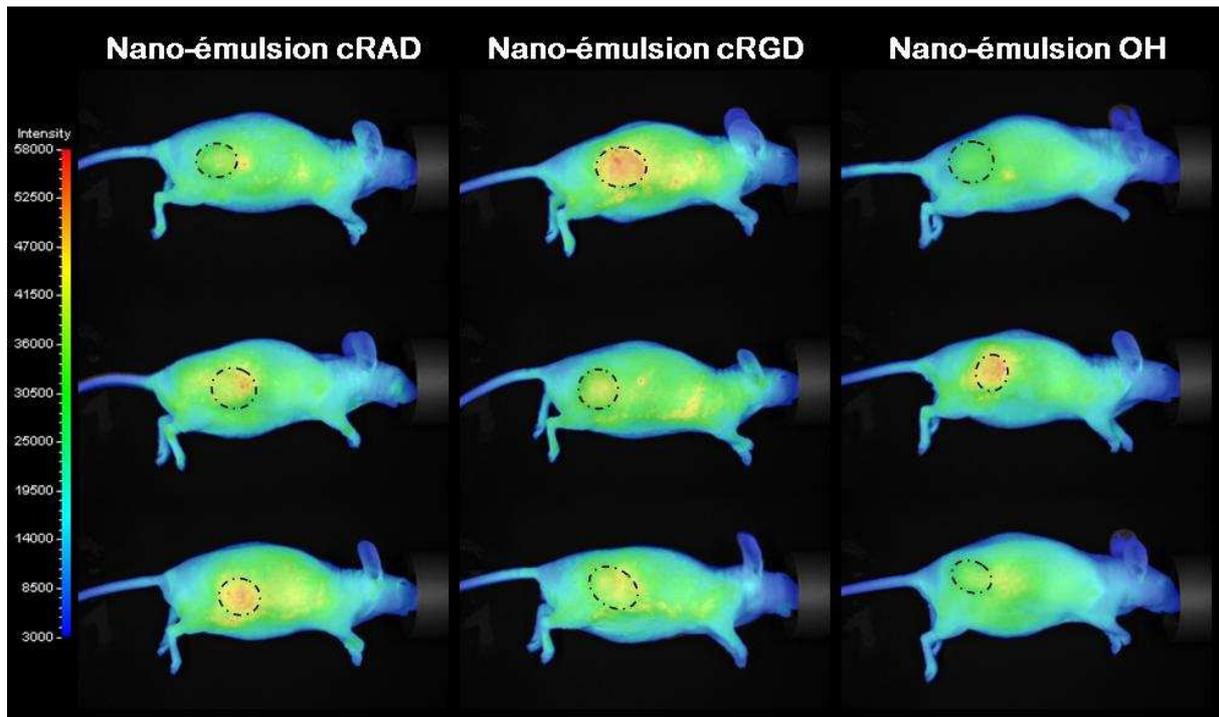


Figure VI-17 : Images de fluorescence de souris porteuses de tumeurs HEK  $\beta$ 3 sous-cutanées (20 millions de cellules implantées environ 6 semaines avant l'injection des nano-émulsions), 24 h après injection de 200  $\mu$ L de nano-émulsions fonctionnalisées (50  $\mu$ M en fluorophores). La localisation des tumeurs est délimitée par les lignes noires pointillées.

L'analyse de l'ensemble des clichés permet de tracer l'évolution du rapport tumeur sur peau en fonction du temps pour les trois types de nanoparticules injectées (Figure VI-18) selon la formule détaillée précédemment (VI.4.2.2). Le détail de l'intensité de fluorescence des tumeurs et de la peau ainsi que le rapport tumeur sur peau obtenus 24 heures après injection sont présentés Figure VI-19.

Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ;  
étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*

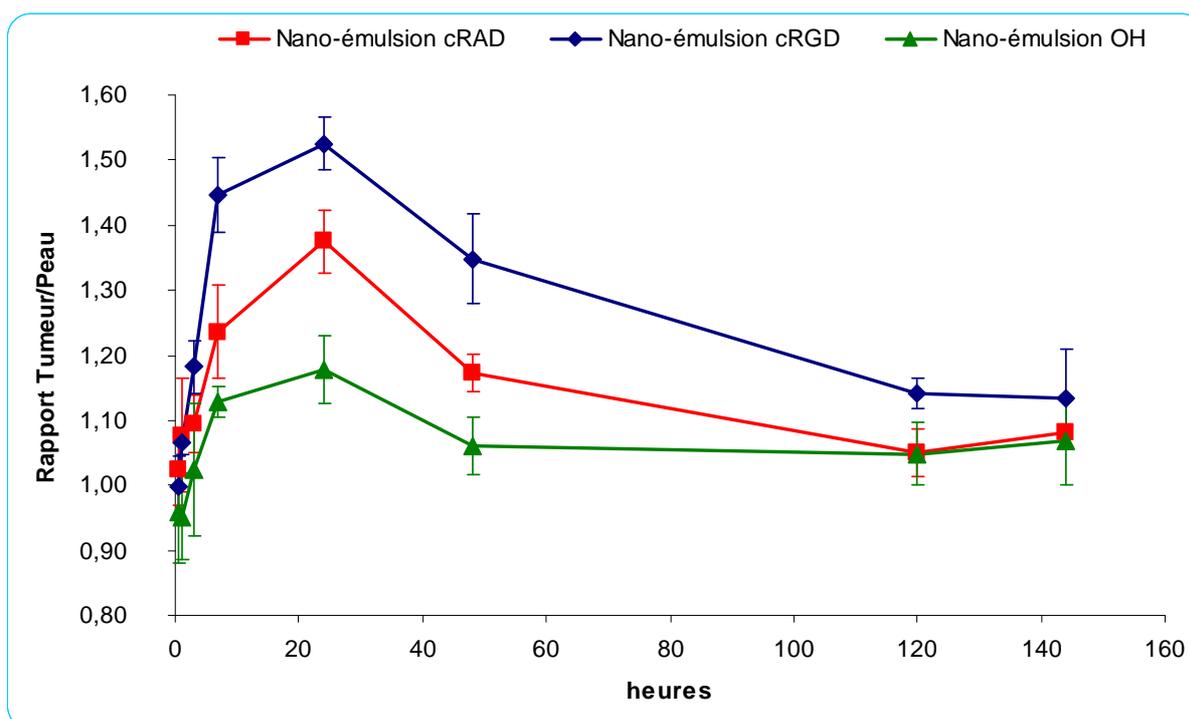


Figure VI-18 : Evolution du rapport tumeur sur peau en fonction de la fonctionnalisation.

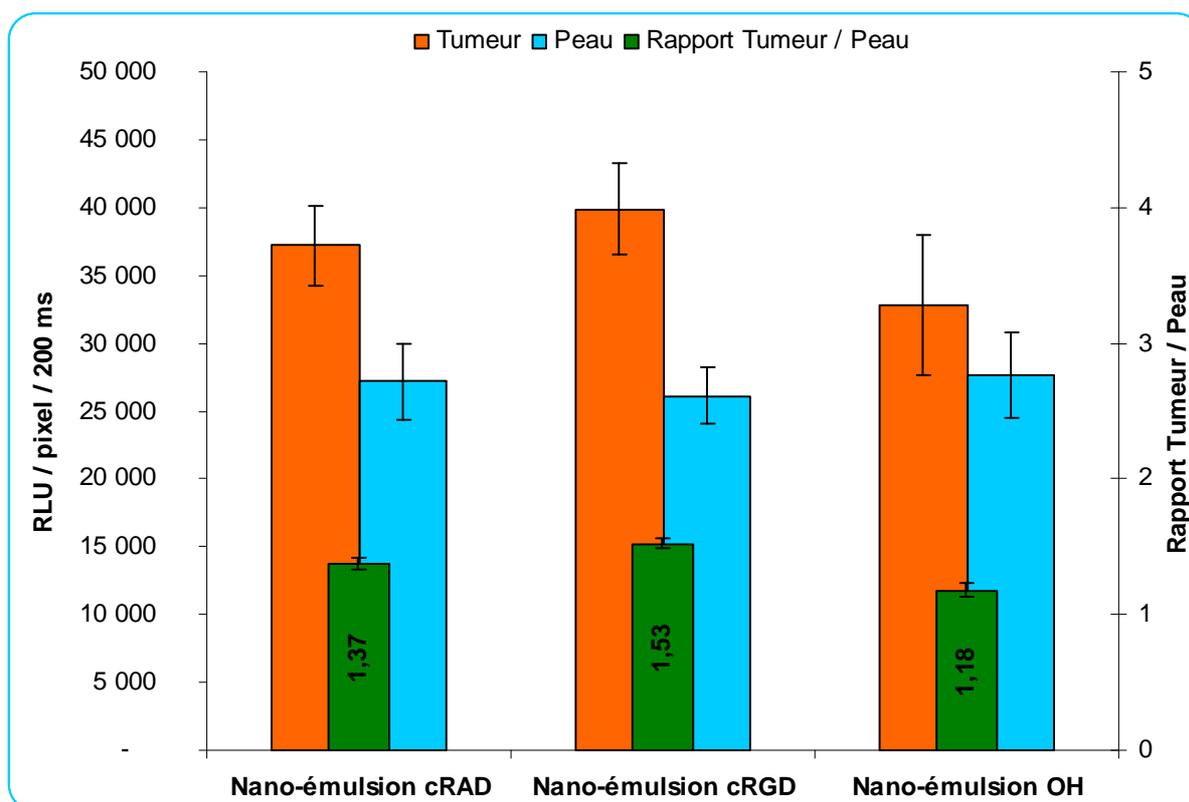


Figure VI-19 : Intensités de fluorescence des tumeurs et de la peau (corrigées de la « fluorescence » du noir), mesurées 24 heures après injection des nano-émulsions fonctionnalisées. La barre verte représente le rapport tumeur sur peau calculé à partir des intensités sus-mentionnées.

### VI.5.3. Discussion

Les résultats obtenus lors de cette expérience confirment l'accumulation passive des nano-émulsions dans les tumeurs puisque que le rapport tumeur sur peau est supérieur à 1 pour toutes les fonctionnalisations. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec les souris porteuses de tumeurs Ts/Apc (VI.3), on observe cette fois-ci des différences de comportement notables entre les trois fonctionnalisations. En effet, l'accumulation est nettement plus importante dans la tumeur que dans la peau dans le cas des nano-émulsions cRGD, les deux témoins négatifs (nanoparticules cRAD et OH) ayant un rapport tumeur sur peau toujours inférieur à celui des globules portant le ligand reconnu par les intégrines. Cependant, les valeurs obtenues pour ces deux fonctionnalisations (cRAD et OH) ne sont pas identiques : les particules cRAD sont accumulées préférentiellement par rapport aux particules OH. La présence d'un ligand peptidique à la surface semble donc modifier l'accumulation dans la zone tumorale.

L'observation des données obtenues 24 heures après injection des agents de contraste permet d'affirmer que la fonctionnalisation des nanoparticules a bien un effet sur l'accumulation au niveau des tumeurs, et que les variations du rapport tumeur sur peau ne sont pas uniquement dues à une fluctuation du signal émis par la peau.

Le ciblage actif permet ainsi une amélioration du rapport tumeur sur peau de 30 % entre les nano-émulsions cRGD et celles qui ne sont pas fonctionnalisées par un peptide. Cette faible augmentation de l'accumulation liée à la reconnaissance des cRGD par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  peut s'expliquer par deux phénomènes :

- La densité de ligands à la surface des globules est faible. Or, le fait qu'ils soient supportés par une nanoparticule diminue encore la probabilité de leur complexation avec les récepteurs.

- Les cellules HEK  $\beta_3$  surexpriment bien les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  mais elles ne sont pas directement accessibles aux nanoparticules qui doivent auparavant s'échapper de la circulation sanguine, notamment par les fenestrations formées dans la paroi des capillaires irriguant la tumeur. Or, il semble que la vascularisation des tumeurs HEK  $\beta_3$  est moindre par rapport à celle des tumeurs Ts/Apc, et leur croissance tumorale étant plus lente, les vaisseaux sanguins sont mieux structurés et donc moins fenestrés. Le passage des nanoparticules des capillaires vers les cellules tumorales est ainsi moins favorisé, ce qui diminue les chances de complexation.

Malgré la présence d'un ciblage actif, l'accumulation globale des nanoparticules reste moindre dans les tumeurs issues des cellules HEK  $\beta 3$  que dans le cas des tumeurs Ts/Apc. En effet, le rapport tumeur sur peau est d'environ 1,5 à 24 heures pour les nano-émulsions cRGD avec les tumeurs HEK  $\beta 3$  alors qu'il est de 2,6 avec les tumeurs Ts/Apc. Ceci est probablement dû à un effet EPR moins prononcé au sein des tumeurs HEK  $\beta 3$  car celles-ci sont certainement moins bien vascularisées. On observe également une diminution du rapport tumeur sur peau après 24 heures alors qu'il était considéré comme stable avec le premier modèle de tumeur. Cette diminution de la fluorescence émise par les tumeurs pourrait s'expliquer par un drainage lymphatique plus efficace : les tumeurs HEK  $\beta 3$  se développant plus lentement, les réseaux lymphatiques ont plus de chance de se développer.

Cette expérience réalisée avec des souris porteuses de tumeurs HEK  $\beta 3$  a donc permis de mettre en avant l'existence d'un ciblage spécifique *in vivo*. Il est cependant nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de mieux comprendre la localisation des nanoparticules au sein même du tissu tumoral.

## **VI.6. Conclusions**

Les diverses expériences présentées dans ce chapitre ont permis de montrer qu'il était possible de fonctionnaliser la surface des nano-émulsions afin d'améliorer leur affinité pour des récepteurs donnés. En effet, le greffage de cRGD sur les nano-émulsions permet leur fixation spécifique sur les cellules HEK  $\beta 3$  exprimant le récepteur de la séquence peptidique, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . Cette reconnaissance n'est pas perturbée *in vitro* par la présence de protéines dans le milieu d'incubation. De plus, la fonctionnalisation des particules est durable car des analyses en cytométrie en flux réalisées sur des particules plus de six mois après leur préparation montre toujours un net marquage spécifique des cellules HEK  $\beta 3$  par les nano-émulsions cRGD.

L'injection des nano-émulsions fluorescentes dans des animaux porteurs de tumeurs à mis en évidence deux mécanismes d'accumulation dans la zone tumorale : un mécanisme passif lié à l'effet EPR, et un mécanisme actif lié à la reconnaissance spécifique de récepteurs par des ligands.

## Chapitre VI : Nano-émulsions fonctionnalisées pour la détection des tumeurs

---

Le phénomène passif s'apparente à celui décrit pour les zones inflammatoires. Il est en effet lié à des défauts de la paroi vasculaire qui favorisent l'extravasation des particules hors de la circulation sanguine. Le faible drainage lymphatique au niveau des zones tumorales autorise alors une accumulation importante des nanoparticules. Ce phénomène est cependant fortement dépendant de la tumeur et en particulier de sa vascularisation.

Le ciblage actif lié à la fixation spécifique de ligands (cRGD) sur des récepteurs cellulaires (intégrine  $\alpha_v\beta_3$ ) permet une augmentation de l'accumulation au sein des tissus ciblés. Cependant ce phénomène est, comme on pouvait s'y attendre, moins efficace *in vivo* que dans les conditions *in vitro*.

Les nano-émulsions fluorescentes constituent donc un agent de contraste capable de s'accumuler passivement dans les tumeurs. La fonctionnalisation des particules rend en outre possible une amélioration de la sélectivité, bien que le gain soit encore faible. D'importantes possibilités d'optimisation du ciblage actif peuvent cependant être envisagées. Il serait notamment intéressant d'augmenter la densité de ligands à la surface des nanoparticules en vue d'augmenter leurs chances de complexation avec les cellules ciblées.



# ***Conclusion générale***

La problématique de ce travail était de concevoir des nanoparticules organiques biocompatibles, furtives, et stables afin de vectoriser des agents thérapeutiques ou d'imagerie.

Nous avons, pour y répondre, développé des nano-émulsions de type huile dans eau de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, dont la phase dispersée est composée d'un mélange d'huile de soja et de Suppocire<sup>®</sup> NC, les globules étant stabilisés par l'association de phospholipides et de surfactants pegylés. Tous ces constituants sont reconnus comme inoffensifs par la FDA et sont autorisés à l'injection chez l'homme.

La technique de fabrication, basée sur l'utilisation d'ultrasons, permet d'obtenir facilement et rapidement des nano-émulsions avec une taille de globules contrôlée. D'autre part, la formulation est suffisamment souple pour permettre de modifier certains paramètres tels que la composition de la phase dispersée, la nature du surfactant pegylé ou la taille des particules, sans altérer la stabilité des nano-émulsions.

Les nano-émulsions développées présentent en effet une importante stabilité. Ainsi, pour la formulation de référence (globules de 35 nm de diamètre), aucune évolution de la distribution en taille des nanoparticules ou du potentiel zêta n'est observée, même après plus de dix-huit mois de conservation à température ambiante. Cette importante stabilité serait due à l'utilisation de surfactants pegylés qui génèrent une barrière stérique autour des globules, permettant ainsi de prévenir leur coalescence. Cependant, il est important de noter qu'en règle générale, la principale cause de déstabilisation irréversible des nano-émulsions n'est pas le phénomène de coalescence mais le mûrissement d'Ostwald. Or, nous n'avons pas observé d'évolution au cours du temps de la distribution en taille des nanoparticules développées ; il est donc vraisemblable que l'utilisation d'une huile insoluble contribue à stabiliser les globules vis-à-vis de ce second phénomène.

En outre, l'encapsulation de fluorophores organiques lipophiles (DiD ou DiR) au sein des nanoparticules permet de leur conférer de très bonnes propriétés optiques telles qu'un rendement quantique et une durée de vie de fluorescence élevés, sans modifier pour autant ni les propriétés physiques ni la stabilité des nanoparticules. Ainsi, les nano-émulsions fluorescentes sont, d'un point de vue optique, plus performantes que les fluorophores hydrophiles commerciaux actuels.

Si l'incorporation de fluorophores nous permet avant tout de suivre les nanoparticules après injection, ils peuvent également être considérés comme des modèles de molécules lipophiles d'intérêt médical permettant d'évaluer les capacités d'encapsulation des

## Conclusion générale

---

nanoparticules vis-à-vis de ce type de molécules. Les résultats obtenus sont de ce point de vue intéressants puisque les nano-émulsions fluorescentes sont stables dans le temps et qu'aucun relargage n'a été observé lors de leur stockage à température ambiante pendant plus d'un an.

Après avoir vérifié la compatibilité physique et biologique entre les nanoparticules et le sang, les nano-émulsions fluorescentes ont été administrées à des souris saines par injection en intraveineuse. Le suivi des particules par imagerie de fluorescence *in vivo* a permis de mettre en évidence la biodistribution homogène de ces traceurs, sans accumulation massive dans le foie, la rate ou les poumons. Ce résultat signifie que la furtivité des nanoparticules est suffisante pour échapper en grande partie au système immunitaire. Il semblerait également qu'une des voies privilégiées du métabolisme des nanoparticules soit liée aux hépatocytes avec une excrétion par voie biliaire.

D'autre part, les variations de la formulation n'ont pas mis en évidence de modification significative du comportement *in vivo* des nanoparticules fluorescentes, traduisant ainsi la grande robustesse de la biodistribution de ces traceurs.

Enfin, l'injection des nano-émulsions à des souris porteuses de tumeurs conduit à leur accumulation au niveau de la zone tumorale. Ce phénomène est plus ou moins marqué en fonction de la vascularisation des tumeurs : il est en effet lié d'une part aux défauts de la paroi vasculaire qui favorisent l'extravasation des particules hors de la circulation sanguine, et au faible drainage lymphatique qui limite d'autre part leur élimination hors de la zone tumorale (effet EPR).

De plus, la fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par des ligands biologiques tels que les cRGD permet, *in vitro*, leur fixation et leur internalisation par des cellules exprimant le récepteur associé à ces ligands : l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . L'injection de ces particules fonctionnalisées à des animaux porteurs de tumeurs met ainsi en évidence, en complément du mécanisme d'accumulation passif précédemment décrit, un mécanisme actif d'accumulation lié à la reconnaissance spécifique des récepteurs par les ligands.

Le gain apporté par la fonctionnalisation des nanoparticules est à l'heure actuelle d'environ 30 % pour le rapport tumeur sur peau. Ces résultats pourraient être encore améliorés mais ils apportent déjà une preuve de concept sur la capacité des nano-émulsions fonctionnalisées à cibler *in vivo* un type cellulaire donné.

Les études réalisées au cours de ces travaux ont pu mettre en évidence les avantages liés à l'utilisation des nano-émulsions développées. Les résultats de l'étude de biodistribution réalisée peuvent néanmoins être nuancés. En effet, l'imagerie de fluorescence *in vivo* permet uniquement de suivre le fluorophore encapsulé et non les nanoparticules elles-mêmes. Il est effectivement impossible de déterminer, avec ce type de nano-émulsions fluorescentes, si le fluorophore est toujours contenu dans le cœur de la particule ou s'il en a été dissocié. C'est pourquoi il est important de développer une nouvelle génération de nano-émulsions fluorescentes qui permettrait de savoir si la particule est intacte ou non. L'utilisation de couples de fluorophores compatibles avec le transfert d'énergie par résonance Förster, ou l'utilisation d'inhibiteurs de fluorescence sont des solutions envisageables pour atteindre cet objectif.

Le transfert d'énergie par résonance Förster (plus connu sous l'acronyme anglais FRET pour « Förster resonance energy transfer ») est défini comme un transfert d'énergie non radiatif entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie). Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur.

Si un donneur et un accepteur d'énergie sont suffisamment proches dans l'espace (quelques nanomètres), il peut alors se produire un transfert d'énergie par résonance entre la molécule donneuse dans son état excité et la molécule acceptrice dans son état fondamental, conduisant à l'excitation de cette dernière et au retour à l'état fondamental de la première. Dans les conditions adéquates, il est ainsi possible d'observer la fluorescence de la molécule acceptrice quand on excite le fluorophore donneur. Comme ce phénomène décroît rapidement avec la distance séparant les deux molécules, il a souvent été mis à profit pour étudier des coupures enzymatiques ou des changements de conformation de protéines.

Dans notre cas, l'encapsulation d'un couple de fluorophores adéquats au sein des nanoparticules nous permettrait d'obtenir des informations sur l'intégrité de ces dernières. En effet, la destruction et/ou la métabolisation des nanoparticules conduiraient inévitablement à l'éloignement des deux types de fluorophores, ce qui impliquerait la disparition du phénomène de FRET. Il serait alors possible, à l'aide d'un dispositif d'imagerie adapté, de visualiser les particules intactes (excitation lumineuse du fluorophore donneur et émission de fluorescence de la molécule acceptrice), puis d'observer les tissus dégradant les

## Conclusion générale

---

nanoparticules et enfin de suivre le devenir des fluorophores une fois libérés (en utilisant des filtres d'excitation et d'émission adaptés à chaque fluorophore).

Parmi les couples de fluorophores commerciaux envisagés, on peut citer le couple DiD / DiR et le couple DiR / ICG. Des tests d'encapsulation et de mesure de l'efficacité de FRET sont actuellement en cours au laboratoire.

Un phénomène similaire basé sur l'encapsulation d'inhibiteurs de fluorescence (« quencher » en anglais) peut également être utilisé pour visualiser la stabilité *in vivo* des nano-émulsions. Dans ce cas, des molécules ayant la propriété de désactiver l'état excité des molécules fluorescentes sans émettre de fluorescence en retour sont encapsulées avec les fluorophores. De manière similaire au FRET, il se produit un transfert d'énergie par résonance entre le fluorophore dans son état excité et l'inhibiteur de fluorescence uniquement si les deux molécules sont suffisamment proches dans l'espace. Il serait ainsi possible, avec les dispositifs d'imagerie actuels, de visualiser les organes ou les cellules responsables de la dégradation des nanoparticules : la fluorescence n'apparaîtrait en effet que si le fluorophore est suffisamment éloigné de l'inhibiteur de fluorescence.

En guise d'ouverture, il est important de signaler que même si nous nous sommes focalisés principalement sur le développement de nano-émulsions encapsulant le DiD et le DiR, nous avons également travaillé sur d'autres molécules d'intérêt. En effet, si ces fluorophores confèrent aux nano-émulsions des performances optiques très honorables, ils ne sont pas autorisés à l'injection humaine. C'est pourquoi nous avons parallèlement étudié l'encapsulation de l'unique molécule ayant des propriétés d'absorption et d'émission à des longueurs d'onde comprises entre 650 et 900 nm qui est autorisée à l'injection chez l'homme : le vert d'indocyanine (ICG). Cette molécule est une cyanine qui, contrairement au DiD et au DiR, n'est pas lipophile mais amphiphile (Figure II-8). Cette propriété physico-chimique limite son taux d'encapsulation au sein des nanoparticules mais n'entraîne pas de relargage du fluorophore au cours du temps. D'autre part, l'encapsulation de l'ICG au sein des nanoparticules ne modifie pas les spectres d'absorption et d'émission du fluorophore par rapport à ceux mesurés en solvant organique (Figure C-1). Enfin, l'encapsulation du fluorophore entraîne l'augmentation de sa durée de vie de fluorescence, de son rendement quantique (par rapport à celui obtenu dans l'eau), et de sa stabilité en milieu aqueux.

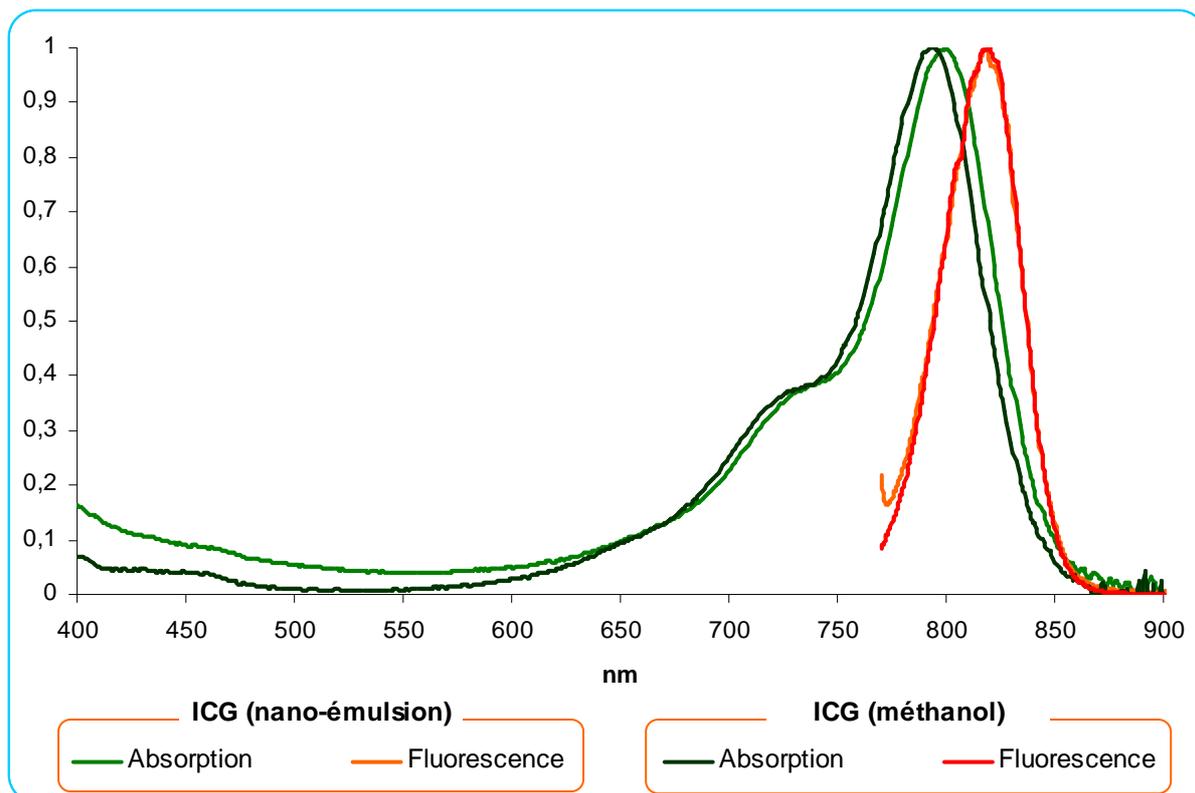


Figure C-1 : Comparaison des spectres d'absorption et d'émission de nano-émulsions dopées ICG avec ceux de l'ICG en solution dans le méthanol.

Il est donc envisageable d'injecter chez l'homme de telles nanoparticules fluorescentes, notamment dans le cadre de la détection du ganglion sentinelle.

Le ganglion sentinelle est le premier ganglion par lequel transite la lymphe issue du drainage lymphatique au sein d'une tumeur. Or, certaines cellules cancéreuses peuvent se désolidariser de la tumeur et être évacuées par le système lymphatique ; ces cellules vont se loger dans ce ganglion et risquent ainsi d'initier le développement de métastases. La détection et l'analyse du ganglion sentinelle sont donc primordiales d'un point de vue clinique, en particulier dans le cas du cancer du sein. En effet, si le ganglion sentinelle est sain, il n'est alors pas nécessaire de retirer la quasi-totalité des ganglions de la région. Dans le cas contraire, la détection de la chaîne ganglionnaire devient essentielle afin de réduire au maximum le risque de développement métastatique.

Des expériences réalisées sur la souris ont mis en évidence l'intérêt des nano-émulsions fluorescentes dans la détection des ganglions sur souris saine et du ganglion sentinelle sur souris porteuse de tumeurs (Figure C-2).

## Conclusion générale

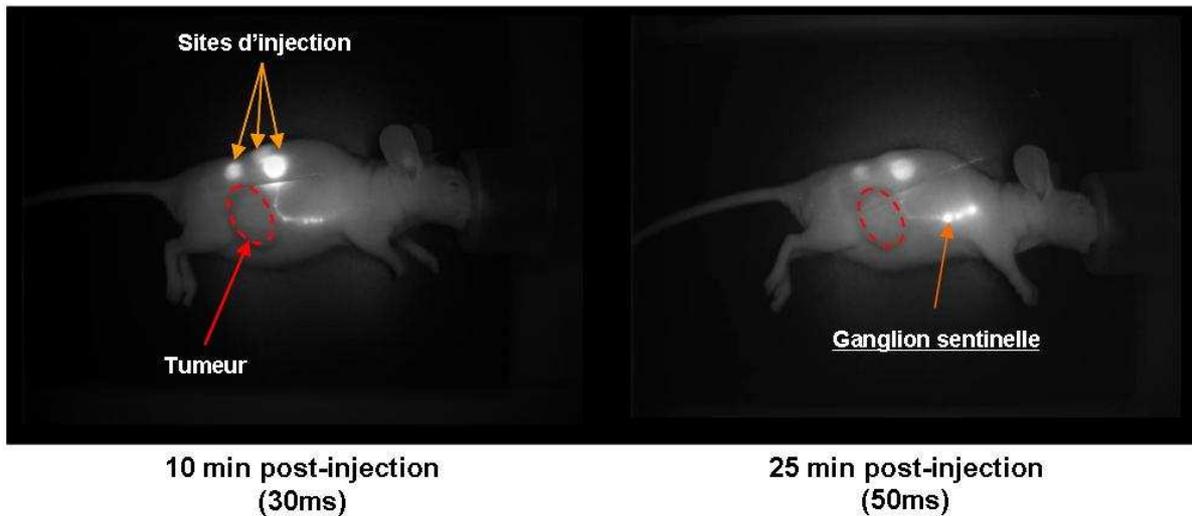


Figure C-2 : Observation du drainage lymphatique et détection du ganglion sentinelle après injection péri-tumorale de nano-émulsion (20  $\mu\text{L}$  à 50  $\mu\text{M}$  en fluorophore).

D'autre part, l'encapsulation au sein des nanoparticules d'agents thérapeutiques tels que des photosensibilisateurs et des principes actifs anticancéreux (taxol) est également en cours au sein du laboratoire.

En conclusion, ce travail de thèse constitue une preuve de concept : les nano-émulsions développées ont la capacité de véhiculer *in vivo* des agents d'intérêt au sein de tumeurs, à la fois par des mécanismes d'accumulation passifs mais également par ciblage actif via la reconnaissance sélective de récepteurs exprimés à la surface de certaines cellules. Pour compléter les travaux réalisés, des études complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre leur biodistribution, d'améliorer la sélectivité de ces nano-transporteurs, ou encore d'étudier leur toxicité. Il est également nécessaire d'étudier l'activité d'agents thérapeutiques délivrés par ces nanoparticules afin de mieux évaluer le potentiel prometteur de ces nano-vecteurs.



# ***Bibliographie***

1. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005. **1**(3): p. 193-212.
2. Li, L.Y., et al., *A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-FLK-1 antibody coated Y-90-labeled nanoparticles*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004. **58**(4): p. 1215-1227.
3. Ito, A., et al., *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005. **100**(1): p. 1-11.
4. Wust, P., et al., *Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - feasibility, tolerance and achieved temperatures*. *International Journal of Hyperthermia*, 2006. **22**(8): p. 673-685.
5. Wilson, B.C. and M.S. Patterson, *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*. *Physics in Medicine and Biology*, 2008. **53**(9): p. R61-R109.
6. Kopelman, R., et al., *Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005. **293**(1): p. 404-410.
7. Vargas, A., et al., *Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004. **286**(1-2): p. 131-145.
8. Kumar, C., ed. *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*. *Nanotechnologies for life science*, ed. C. Kumar. Vol. 2. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
9. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(14): p. 1532-1555.
10. Gregoriadis, G., *Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine .I*. *New England Journal of Medicine*, 1976. **295**(13): p. 704-710.
11. Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, *Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000. **13**(3): p. 155-168.
12. Mukherjee, B., et al., *Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nanoniosomes: An in vitro study*. *International Journal of Nanomedicine*, 2007. **2**(2): p. 213-225.
13. Letchford, K. and H. Burt, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007. **65**(3): p. 259-269.
14. Christian, N.A., et al., *Tat-Functionalized Near-Infrared Emissive Polymersomes for Dendritic Cell Labeling*. *Bioconjugate Chem.*, 2007. **18**(1): p. 31-40.
15. Ghoroghchian, P.P., et al., *Near-infrared-emissive polymersomes: Self-assembled soft matter for in vivo optical imaging*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(8): p. 2922-2927.
16. Ghoroghchian, P.P., et al., *Controlling bulk optical properties of emissive polymersomes through intramembranous polymer-fluorophore interactions*. *Chemistry of Materials*, 2007. **19**(6): p. 1309-1318.
17. Nasonkla, N., et al., *cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004. **43**(46): p. 6323-6327.
18. Liu, S.Q., Y.W. Tong, and Y.Y. Yang, *Incorporation and in vitro release of doxorubicin in thermally sensitive micelles made from poly(N-isopropylacrylamide-*

## Bibliographie

- co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) with varying compositions*. *Biomaterials*, 2005. **26**(24): p. 5064-5074.
19. Oishi, M., K. Kataoka, and Y. Nagasaki, *pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector*. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. **17**(3): p. 677-688.
  20. Sawant, R.M., et al., "*SMART*" *drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers*. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. **17**(4): p. 943-949.
  21. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate Nanocapsules as Potential Lysosomotropic Carriers - Preparation, Morphological and Sorptive Properties*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1979. **31**(5): p. 331-332.
  22. Boas, U. and P.M.H. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. *Chemical Society Reviews*, 2004. **33**(1): p. 43-63.
  23. Vinogradov, S.V., T.K. Bronich, and A.V. Kabanov, *Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**(1): p. 135-147.
  24. Oh, J.K., et al., *The development of microgels/nanogels for drug delivery applications*. *Progress in Polymer Science*, 2008. **33**(4): p. 448-477.
  25. Muller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. **50**(1): p. 161-177.
  26. Wissing, S.A., O. Kayser, and R.H. Muller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**(9): p. 1257-1272.
  27. Mehnert, W. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **47**(2-3): p. 165-96.
  28. Wong, H.L., et al., *Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. **59**(6): p. 491-504.
  29. Heurtault, B., et al., *The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **18**(1): p. 55-61.
  30. Peltier, S., et al., *Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules*. *Pharmaceutical Research*, 2006. **23**(6): p. 1243-1250.
  31. Chen, J., et al., *Ligand Conjugated Low-Density Lipoprotein Nanoparticles for Enhanced Optical Cancer Imaging in Vivo*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007. **129**(18): p. 5798-5799.
  32. Nikanjam, M., et al., *Synthetic nano-low density lipoprotein as targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **328**(1): p. 86-94.
  33. Anton, N., J.P. Benoit, and P. Saulnier, *Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review*. *Journal of Controlled Release*, 2008. **128**(3): p. 185-199.
  34. Solans, C., et al., *Nano-emulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005. **10**(3-4): p. 102-110.
  35. Liu, Y.L., et al., *Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(6): p. 2221-2229.
  36. Parak, W.J., et al., *Biological applications of colloidal nanocrystals*. *Nanotechnology*, 2003. **14**(7): p. R15-R27.
  37. Cheon, J. and J.-H. Lee, *Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology*. *Acc. Chem. Res.*, 2008.

38. Yan, J.L., et al., *Dye-doped nanoparticles for bioanalysis*. Nano Today, 2007. **2**(3): p. 44-50.
39. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
40. Schroeder, J.E., et al., *Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2007. **124**(1-2): p. 28-34.
41. Tada, H., et al., *In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice*. Cancer Research, 2007. **67**(3): p. 1138-1144.
42. Cai, W.B., et al., *Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 669-676.
43. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice*. Pharmacological Reviews, 2001. **53**(2): p. 283-318.
44. Moghimi, S.M. and J. Szebeni, *Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*. Progress in Lipid Research, 2003. **42**(6): p. 463-478.
45. Monfardini, C. and F.M. Veronese, *Stabilization of Substances in Circulation*. Bioconjugate Chem., 1998. **9**(4): p. 418-450.
46. Yang, J., et al., *Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection*. Biomaterials, 2008. **29**(16): p. 2548-2555.
47. Farokhzad, O.C., et al., *Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(16): p. 6315-6320.
48. Zhang, Z.P., S.H. Lee, and S.S. Feng, *Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1889-1899.
49. McNeeley, K.M., A. Annapragada, and R.V. Bellamkonda, *Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma*. Nanotechnology, 2007. **18**(38).
50. Andrieux, K., et al., *Nanotechnologies and new drugs*. Actualite Chimique, 2003(11-12): p. 135-139.
51. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-171.
52. Massoud, T.F. and S.S. Gambhir, *Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light*. Genes & Development, 2003. **17**(5): p. 545-580.
53. Weissleder, R., *Scaling down imaging: Molecular mapping of cancer in mice*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(1): p. 11-18.
54. Lanza, G.M. and S.A. Wickline, *Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy*. Progress in Cardiovascular Diseases, 2001. **44**(1): p. 13-31.
55. Unger, E.C., et al., *Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(9): p. 1291-1314.
56. Louie, A., et al., *In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging*. Nature Biotechnology, 2000. **18**: p. 321-325.
57. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**: p. 626-634.
58. Mobley, J. and T. Vo-Dinh, in *Biomedical Photonics Handbook*, T. Vo-Dinh, Editor. 2003, CRC Press. p. Chapter 2 : Optical properties of tissues.
59. Hassan, M. and A. Klaunberg, *Biomedical applications of fluorescence imaging in vivo*. Comparative Medicine, 2004. **54**: p. 635-644.

## Bibliographie

60. Verkhusha, V. and K. Lukyanov, *The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(3): p. 289-29.
61. Yang, M., et al., *Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1206-1211).
62. Zhang, J., et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nature reviews, 2002. **3**: p. 906-918.
63. Pan, X.Q., R.J. Lee, and M. Ratnam, *Penetration into solid tumor tissue of fluorescent latex microspheres: A mimic of liposome particles*. Anticancer Research, 2004. **24**(5A): p. 3005-3008.
64. Tamilvanan, S., *Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems*. Progress in Lipid Research, 2004. **43**(6): p. 489-533.
65. Fukushima, S., et al., *Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000. **45**(1): p. 65-75.
66. Sonneville-Aubrun, O., J.T. Simonnet, and F. L'Alloret, *Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products*. Advances in Colloid and Interface Science, 2004. **108-109**: p. 145-149.
67. Shafiq, S., et al., *Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **66**(2): p. 227-243.
68. Mason, T.G., et al., *Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2006. **18**(41): p. R635-R666.
69. Wang, L., et al., *Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **314**(1): p. 230-235.
70. Vyas, T.K., A. Shahiwala, and M.M. Amiji, *Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **347**(1-2): p. 93-101.
71. Jafari, S.M., Y. He, and B. Bhandari, *Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques*. Journal of Food Engineering, 2007. **82**(4): p. 478-488.
72. Niazi, S.K., *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations : Sterile Products* Vol. 6. 2004: CRC.
73. Yilmaz, E. and H.-H. Borchert, *Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema--An in vivo study*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **307**(2): p. 232-238.
74. Singh, K.K. and S.K. Vingkar, *Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **347**(1-2): p. 136-143.
75. Seki, J., et al., *A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS(R)), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **273**(1-2): p. 75-83.
76. Teixeira, P.C., et al., *Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **118**(1): p. 15-19.
77. Beare-Rogers, J., A. Dieffenbacher, and J.V. Holm, *Lexicon of lipid nutrition*. Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(4): p. 685-744.
78. Shinoda, K. and H. Saito, *Effect of Temperature on Phase Equilibria and Types of Dispersions of Ternary System Composed of Water Cyclohexane and Nonionic Surfactant*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 70-&.

79. Sajjadi, S., *Nanoemulsion Formation by Phase Inversion Emulsification: On the Nature of Inversion*. Langmuir, 2006. **22**(13): p. 5597-5603.
80. Tadros, T., et al., *Formation and stability of nano-emulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, 2004. **108-09**: p. 303-318.
81. Saupe, A., K.C. Gordon, and T. Rades, *Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **314**(1): p. 56-62.
82. Jafari, S.M., Y.H. He, and B. Bhandari, *Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison*. International Journal of Food Properties, 2006. **9**(3): p. 475-485.
83. Abismail, B., et al., *Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability*. Ultrasonics Sonochemistry, 1999. **6**(1-2): p. 75-83.
84. Jores, K., W. Mehnert, and K. Mader, *Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study*. Pharm Res, 2003. **20**(8): p. 1274-83.
85. Han, F., et al., *Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **315**(1-3): p. 210-216.
86. Villiere, A., et al., *Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(5): p. 1514-1520.
87. van Ruth, S.M., et al., *Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation: Influence of pH*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(10): p. 4365-4369.
88. Tsay, J.M. and X. Michalet, *New light on quantum dot cytotoxicity*. Chemistry & Biology, 2005. **12**(11): p. 1159-1161.
89. Hardman, R., *A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114**(2): p. 165-172.
90. Ho, N.H., R. Weissleder, and C.S. Tung, *Development of water-soluble far-red fluorogenic dyes for enzyme sensing*. Tetrahedron, 2006. **62**(4): p. 578-585.
91. Hintersteiner, M., et al., *In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(5): p. 577-583.
92. Jose, J. and K. Burgess, *Syntheses and properties of water-soluble Nile Red derivatives*. Journal of Organic Chemistry, 2006. **71**(20): p. 7835-7839.
93. Shen, Z., et al., *Boron-diindomethene (BDI) dyes and their tetrahydrobicyclo precursors - en route to a new class of highly emissive fluorophores for the red spectral range*. Chemistry-a European Journal, 2004. **10**(19): p. 4853-4871.
94. Zhao, W.L. and E.M. Carreira, *Conformationally restricted Aza-BODIPY: Highly fluorescent, stable near-infrared absorbing dyes*. Chemistry-a European Journal, 2006. **12**(27): p. 7254-7263.
95. Arunkumar, E., et al., *Squaraine-derived rotaxanes: Sterically protected fluorescent near-IR dyes*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(10): p. 3288-3289.
96. Hammer, R.P., et al., *Asymmetrical, water-soluble phthalocyanine dyes for covalent labeling of oligonucleotides*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **13**(6): p. 1244-1252.

## Bibliographie

97. Gurfinkel, M., et al., *Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: A case study*. Photochemistry and Photobiology, 2000. **72**(1): p. 94-102.
98. Bogaards, A., et al., *Fluorescence image-guided brain tumour resection with adjuvant metronomic photodynamic therapy: pre-clinical model and technology development*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2005. **4**(5): p. 438-442.
99. Bohmer, M. and J. Enderlein, *Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: Methodology and technology*. Chemphyschem, 2003. **4**(8): p. 793-808.
100. Gan, W.B., et al., *Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 219-225.
101. Kalchenko, V., et al., *Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing*. Journal of Biomedical Optics, 2006. **11**(5).
102. Metelev, V., R. Weissleder, and A. Bogdanov, *Synthesis and Properties of Fluorescent NF-B-Recognizing Hairpin Oligodeoxyribonucleotide Decoys*. Bioconjugate Chem., 2004. **15**(6): p. 1481-1487.
103. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 626-634.
104. Ponterini, G. and F. Momicchioli, *Trans Cis Photoisomerization Mechanism of Carbocyanines - Experimental Check of Theoretical-Models*. Chemical Physics, 1991. **151**(1): p. 111-126.
105. Klostranec, J.M. and W.C.W. Chan, *Quantum dots in biological and biomedical research: Recent progress and present challenges*. Advanced Materials, 2006. **18**(15): p. 1953-1964.
106. Hoffman, R.M., *Imaging In Mice With Fluorescent Proteins: From Macro To Subcellular*. Sensors, 2008. **8**: p. 1157-1173.
107. Bearer, E. and L. Orci, *Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study*. J. Cell Biol., 1985. **100**(2): p. 418-428.
108. Stan, R.V., *Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 621-43.
109. Braet, F. and E. Wisse, *Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review*. Comp Hepatol, 2002. **1**(1): p. 1.
110. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(8): p. 606-616.
111. Freitas, R.A., *Nanomedicine Nanomedicine*, ed. R.A. Freitas. Vol. IIA Biocompatibility. 2003: Landes Bioscience.
112. Morey, T.E., et al., *Activity of microemulsion-based nanoparticles at the human bio-nano interface: concentration-dependent effects on thrombosis and hemolysis in whole blood*. Journal of Nanoparticle Research, 2004. **6**(2-3): p. 159-170.
113. Texier, I., et al., *Luminescent probes for optical in vivo imaging*. Proceedings of the SPIE, 2005. **5704**: p. 16-23.
114. Cooper, A.D., *Hepatic uptake of chylomicron remnants*. J. Lipid Res., 1997. **38**(11): p. 2173-2192.
115. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
116. Hynes, R.O., *Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-687.
117. Ruoslahti, E. and E. Engvall, *Integrins and Vascular Extracellular Matrix Assembly*. J. Clin. Invest., 1997. **99**(6): p. 1149-1152.

118. Haubner, R., D. Finsinger, and H. Kessler, *Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the alpha(V)beta(3) integrin for a new cancer therapy*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1997. **36**(13-14): p. 1375-1389.
119. Aumailley, M., et al., *Arg-Gly-Asp Constrained within Cyclic Pentapeptides - Strong and Selective Inhibitors of Cell-Adhesion to Vitronectin and Laminin Fragment-P1*. *Febs Letters*, 1991. **291**(1): p. 50-54.
120. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Second ed. 1996: Academic Press.
121. Lollini, P.L., et al., *Transduction of Genes-Coding for a Histocompatibility (Mhc) Antigen and for Its Physiological Inducer Interferon-Gamma in the Same Cell - Efficient Mhc Expression and Inhibition of Tumor and Metastasis Growth*. *Human Gene Therapy*, 1995. **6**(6): p. 743-752.





# ***Annexes***

## **Annexe I : Matériels**

La Suppocire<sup>®</sup> NC a été gracieusement offerte par Gattefossé (France). Les surfactants pegylés Myrj 49, Myrj 53 et Myrj 59 sont un don de la société Croda (France). Les fluorophores DiD et DiR ont été achetés chez Invitrogen (France). Le MAL-PEG5000-SCM a été acquis chez Creative Biochem (USA). Les peptides cRGD et cRAD ont été fournis par la société Asynth Service B.V. (Pays-Bas). Tous les autres produits chimiques ont été achetés à la société Sigma-Aldrich (France), notamment l'huile de soja sous la référence 8001-22-7 et la lécithine de soja sous la dénomination « L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine *BioChemika*, from soybean,  $\geq 30\%$  as phosphatidylcholine » avec la référence 61758.

## ***Annexe II : Dispositifs de mesure***

### **Spectres d'absorption**

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre CARY 300 scan de Varian.

### **Spectres d'émission**

Les spectres de fluorescence sont enregistrés sur un spectrophotomètre LS50B de Perkin Elmer.

### **Diffusion quasi-élastique de la lumière**

Les mesures de taille des nanoparticules par diffusion quasi-élastique de la lumière sont réalisées sur un Nano ZS (Malvern, Royaume-Uni). Environ 1  $\mu\text{L}$  de nano-émulsion est dispersé dans 999  $\mu\text{L}$  de solution de chlorure de sodium à 154 mM ; 800  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ensuite disposés dans une cuve à usage unique PLASTIBRAND semi micro (PMMA). Les mesures sont réalisées à température ambiante.

### **Potentiel zêta**

Le potentiel zêta des nanoparticules est enregistré à l'aide d'un Nano ZS (Malvern, Royaume-Uni). Environ 1  $\mu\text{L}$  de nano-émulsion est dispersé dans 999  $\mu\text{L}$  de solution de PBS diluée dix fois ; cette solution est ensuite disposée dans une cuve jetable de mesure du potentiel zêta (DTS1060C, Malvern, Royaume-Uni). Les mesures sont réalisées à température ambiante.

## Durée de vie de fluorescence (Fluorophore : DiD)

Le dispositif se compose d'une diode laser émettant à 635 nm (50Mhz) (Becker&Hickel, Allemagne) placée à l'entrée d'une fibre qui éclaire l'échantillon. La lumière diffusée ou la fluorescence émise est collectée par une seconde fibre, dont la seconde extrémité est placée devant un tube photomultiplicateur (Hamamatsu, Japon) couplé à une carte de comptage de photon unique (TCSPC) (Becker&Hickel, Allemagne). Lors de la mesure de la fluorescence émise, un système de filtrage est positionné entre la fibre optique et le photomultiplicateur afin d'éliminer le signal d'excitation.

Un tel dispositif permet de mesurer l'intensité de la fluorescence et de tracer les courbes reflétant le déclin de la fluorescence, c'est-à-dire l'évolution de la fluorescence (exprimée en unités arbitraires) en fonction du temps (picosecondes). Les durées de vie de fluorescence sont ensuite obtenues en utilisant le logiciel SPCImage (Becker&Hickel, Allemagne) grâce à l'ajustement par un déclin mono-exponentiel ( $\chi_r^2 = 1.0$ ) des courbes de déclin de fluorescence déconvoluées de la fonction de réponse instrumentale (IRF).

## Durée de vie de fluorescence (Fluorophore : DiR)

Le système utilisé pour obtenir les déclins de fluorescence du DiR, en solution dans le méthanol ou encapsulé dans les nanoparticules en suspension dans du PBS (10 mM, pH 7,3), est différent de celui décrit plus haut car les spectres d'absorption et de fluorescence des deux fluorophores sont différents.

Les mesures sont réalisées avec un dispositif expérimental utilisant un laser saphir-titane (Tsunami, Spectra-Physics, USA) (80Mhz, 100 femtosecondes), pompé par un laser continu néodyme-vanadate (Millennia Pro, Spectra-Physics, USA) (532 nm, 5W), et dont la longueur d'onde est accordable entre 700 nm et 1000 nm. Pour ces mesures, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 740 nm. Le reste du dispositif est identique à celui utilisé pour mesurer les durées de vie de fluorescence du DiD, excepté les filtres optiques qui sont bien sûr adaptés au spectre de fluorescence du DiR ainsi qu'à la longueur d'onde d'excitation appliquée.

Le calcul des durées de vie de fluorescence s'effectue de manière similaire à celui décrit plus haut.

### **Annexe III : Paramètres de sonication**

L'appareil de sonication utilisé pour obtenir les nano-émulsions est un sonificateur AV505<sup>®</sup> (Sonics, Newtown USA). Le Tableau A-1 regroupe le type de sonde et les paramètres techniques de sonication en fonction de la taille du lot de nano-émulsion fabriquée.

Volume du lot	Sonde	Puissance	Temps de sonication	Pulse	
				on	off
2 mL	∅ 3 mm	25%	5 min	10 s	30 s
5 mL	∅ 3 mm	30%	5 min	10 s	30 s
100 mL	∅ 13 mm	65%	25 min	10 s	30 s

**Tableau A-1 : Paramètres de sonication en fonction de la taille du lot de nano-émulsion à produire.**

## **Annexe IV : Préparation d'une nano-émulsion non dopée issue de la formulation de référence**

Un lot de 2 mL de nano-émulsion non dopée issue de la formulation de référence (Tableau A-2) est préparé par dispersion d'une phase huileuse dans une phase aqueuse par sonication.

La phase huileuse est préparée par ajout d'un mélange d'huile de soja (50 mg), de Suppocire<sup>®</sup> NC (150 mg) et de lécithine (138 mg) dans 1 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité jusqu'à complète dissolution, puis le solvant organique est évaporé sous vide à 45°C.

La phase aqueuse est préparée par ajout de Myrj 53 (228 mg) à une solution aqueuse contenant 50 mg de glycérol et 1,384 mL de solution saline ([NaCl] = 154 mM). Le mélange est agité à 50°C jusqu'à dissolution du surfactant pegylé.

La phase aqueuse est ensuite ajoutée à la phase huileuse, le mélange est chauffé à 50°C puis la solution est soniquée directement jusqu'à obtention d'une nano-émulsion (voir Annexe III pour les paramètres de sonication).

		Masse (mg)	% w/w
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,50
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,50
Phase continue	Glycérol	50	2,50
	Solution saline	q.s.p 2000	69,20
Surfactants	Lécithine	138	6,90
	Myrj 53	228	11,40

**Tableau A-2 : Composition de la formulation de référence pour un lot de 2 mL.**

## ***Annexe V : Préparation d'une nano-émulsion fluorescente issue de la formulation de référence***

Un lot de 2 mL de nano-émulsion dopée DiD à 400  $\mu$ M issue de la formulation de référence est préparé par dispersion d'une phase huileuse contenant les fluorophores dans une phase aqueuse par sonication.

Le fluorophore DiD est dissous dans du dichlorométhane afin d'obtenir une solution à 10 mM.

La phase huileuse est préparée par ajout d'huile de soja (50 mg), de Suppocire<sup>®</sup> NC (150 mg), de lécithine (138 mg), et de la solution de fluorophore (80  $\mu$ L ; 800 nmol) dans 1 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité jusqu'à complète dissolution, puis le solvant organique est évaporé sous vide à 45°C.

La phase aqueuse est préparée par ajout de Myrj 53 (228 mg) à une solution aqueuse contenant 50 mg de glycérol et 1,384 mL de solution saline ([NaCl] = 154 mM). Le mélange est agité à 50°C jusqu'à dissolution du surfactant pegylé.

La phase aqueuse est ensuite ajoutée à la phase huileuse, le mélange est chauffé à 50°C puis la solution est soniquée directement jusqu'à obtention d'une nano-émulsion (voir Annexe III pour les paramètres de sonication).

## Annexe VI : Synthèse du surfactant réactif : PE-PEG-MAL

Le surfactant réactif est obtenu par couplage du MAL-PEG5000-SCM sur la phosphatidyléthanolamine (Figure A-1). Le Tableau A-3 regroupe les informations sur les réactifs engagés au cours de la réaction.

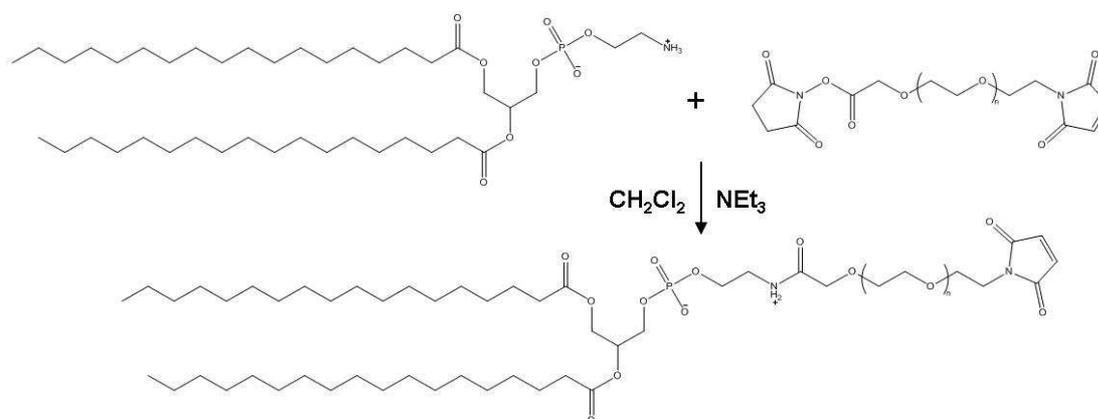


Figure A-1 : Schéma de synthèse du PE-PEG5000-MAL.

	Masse Molaire	éq.	Densité	Nb $\mu\text{mol}$	Masse (mg)	Volume ( $\mu\text{L}$ )
MAL-PEG5000-SCM	5284	1	/	18,925	100	/
Phosphatidyléthanolamine	715,99	1,85	/	35,011	25,068	/
Triéthylamine	101,19	1,90	0,726	35,873	3,630	5,000

Tableau A-3 : Informations sur les réactifs engagés.

100 mg (0,019 mmol) de MAL-PEG5000-SCM et 5  $\mu\text{L}$  (3,630 mg ; 0,036 mmol ; 1,9 éq.) de triéthylamine sont ajoutés à une solution de phosphatidyléthanolamine (25 mg ; 0,035 mmol de PE ; 1,85 éq.) dans 1 mL de dichlorométhane anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2h sous argon. Le contrôle de l'avancement de la réaction s'effectue par chromatographie sur couche mince avec un éluant chloroforme-méthanol 95 : 5 (v/v). Le mélange réactionnel est ensuite évaporé sous vide et redissous dans 2 mL de dichlorométhane.

La masse molaire du PE-PEG5000-MAL est de 5885,99 g/mol. La solution finale a une concentration en PE-PEG5000-MAL de 9,463 mM ou 55,696 g/L.

## **Annexe VII : Préparation d'une nano-émulsion fluorescente issue de la formulation à 2,5 % m/m de surfactant fonctionnalisable**

Le protocole de préparation des nano-émulsions fonctionnalisées est proche de ceux déjà décrits (Annexes IV et V). La principale différence réside dans le remplacement (moles à moles) d'une partie du surfactant pegylé par le surfactant fonctionnalisable (Tableau A-4), ce surfactant fonctionnalisable étant par contre incorporé au sein de la phase huileuse.

		Masse (mg)	% m/m	μmol
Phase dispersée	Huile de soja	50	2,5	/
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,5	/
Phase continue	Glycérol	50	2,5	/
	Solution saline	q.s.p 2000	65,3	/
Surfactants	Lécithine	138	6,9	183,5
	Myrj 53	207	10,4	83,3
	PE-PEG-MAL	49	2,5	8,4

**Tableau A-4 : Composition de la formulation à 2,5 % m/m de surfactant fonctionnalisable (lot de 2 mL).**

La phase huileuse est préparée par mélange dans 0,5 mL de dichlorométhane d'huile de soja (50 mg), de Suppocire<sup>®</sup> NC (150 mg), de lécithine (138 mg), du fluorophore (800 nmol soit 80 μL d'une solution de DiD à 10 mM dans le dichlorométhane), et de PE-PEG5000-MAL (49 mg ; 8,4 μmol soit 880 μL de la solution décrite dans l'annexe VI). Le mélange est agité jusqu'à complète dissolution de tous les composants, puis le solvant organique est évaporé sous vide à 45°C.

La phase aqueuse est préparée par ajout de Myrj 53 (207 mg) à une solution aqueuse contenant 50 mg de glycérol et 1,356 mL de solution tampon de greffage (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4). Le mélange est agité à 50°C jusqu'à dissolution du surfactant pegylé.

La phase aqueuse est ensuite ajoutée à la phase huileuse, le mélange est chauffé à 50°C puis la solution est soniquée directement jusqu'à obtention d'une nano-émulsion (voir Annexe II pour les paramètres de sonication).

La solution de nanoparticules fonctionnalisables est ensuite divisée en 3 fractions de 600  $\mu\text{L}$  chacune, auxquelles sont ajoutés 400  $\mu\text{L}$  de solution tampon de greffage (Hepes 0,05M ; EDTA 0,01 M ; pH 7,4). Chacune de ces solutions de nanoparticules fonctionnalisables contient environ 2,5  $\mu\text{mol}$  de groupement maléimide.

Le cRGD (2,697 mg ; 3,747  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.) et le cRAD (2,751 mg ; 3,747  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.) sont chacun dissous dans 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de TCEP (40 mM soit 8  $\mu\text{mol}$  pour 200  $\mu\text{L}$ ) dans de l'eau déionisée. Ces deux solutions, ainsi qu'une troisième composée uniquement de 200  $\mu\text{L}$  de solution de TCEP (40 mM) dans de l'eau déionisée, sont agitées pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Ces trois solutions sont ensuite ajoutées aux 3 solutions de nanoparticules fonctionnalisables et les mélanges sont agités pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le  $\beta$ -mercapto-éthanol (7,5  $\mu\text{mol}$  ; 3 éq.) est ensuite ajouté à chacune des trois solutions, qui sont agitées pendant 30 minutes supplémentaires à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Les nano-émulsions fonctionnalisées sont ensuite dialysées séparément (seuil de coupure : 12-14000 Da) contre 600 mL d'une solution de NaCl à 154 mM, pendant 90 minutes en changeant le dialysat toutes les 30 minutes.

Après purification, les solutions sont dosées par spectrométrie de fluorescence et diluées avec une solution de NaCl à 154 mM afin d'ajuster la concentration en fluorophores à 50  $\mu\text{M}$ . Enfin les solutions sont stérilisées par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ).

## **Annexe VIII : Protocoles cellulaires**

### **Cultures cellulaires**

Les cellules Ts/Apc sont cultivées dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, France) supplémenté avec du glucose 4,5 g/l (Sigma-Aldrich), 10 % de sérum de veau fœtal (décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C), 1% de glutamine (Sigma-Aldrich), de la pénicilline (50 U.mL<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich), de la streptomycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich) et du β-mercapto-éthanol (50 nM) (Sigma-Aldrich).

Les cellules OVCAR sont cultivées dans du milieu RMPI 1640 (Gibco), supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C), 1% de glutamine, de la pénicilline (50 U.mL<sup>-1</sup>) et de la streptomycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>).

Les cellules HEK β3 sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco), supplémenté avec du glucose à 4,5 g/L, 10 % de sérum de veau fœtal (décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C), 1% de glutamine (Sigma-Aldrich), de la pénicilline (50 U/mL) (Sigma-Aldrich), de la streptomycine (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich) et de la G418 (700 µg/mL)(Gibco).

Les cellules sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont repiquées deux fois par semaine, après dissociation du tapis cellulaire avec un mélange trypsine/EDTA (Gibco).

Les cellules tumorales (10 millions de cellules pour les Ts/Apc ou OVCAR et 20 millions pour les HEK β3) sont implantées en sous-cutané au niveau du haut de la patte des souris *Swiss Nude* NMRI femelles (Janvier, France), âgées de 6 à 8 semaines. L'injection du traceur est réalisé entre 2 et 6 semaines après l'implantation des cellules en fonction de la lignée tumorales (les tumeurs ont alors un diamètre compris entre 6 et 8 mm).

### **Analyse par cytométrie en flux**

Les cellules adhérentes HEK β3 sont mises en suspension avec de la trypsine, puis elles sont rincées une fois avec du PBS 1X à température ambiante et une fois avec du PBS

froid (4°C) contenant 1 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Pour chaque condition expérimentale, un million de cellules est resuspendu dans 200 µL de PBS 1X Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ou de DMEM à 10% de sérum de veau fœtal, contenant les nanoparticules à une concentration finale de 0,2 µM en DiD. L'incubation est réalisée à 4°C pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du PBS 1X Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, puis resuspendues dans 500 µL de PBS 1X Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> avant d'être analysées par un cytomètre en flux (FacsAria, Becton Dickinson, France).

Les cellules sont ensuite incubées avec les nanoparticules (OH – cRGD - cRAD) pendant une heure à 37°C et analysées par cytométrie en flux toutes les quinze minutes.

## **Analyse par microscopie de fluorescence**

Les cellules adhérentes HEK β3 sont cultivées sur des lamelles, en plaque de 24 puits, pendant 24h. Les cellules sont rincées une première fois avec du PBS 1X à température ambiante, puis par du PBS 1X froid (4°C) contenant 1 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à 4°C dans 200 µL de PBS 1X Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, contenant les nanoparticules à une concentration finale de 0,2 µM en DiD. Après deux rinçages avec du PBS 1X Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> à 4°C, les cellules sont fixées pendant 10 minutes avec du PFA 0,5 % et les noyaux des cellules sont colorés avec une solution de Hoechst à 5 µM pendant 10 minutes.

Les lames sont montées avec du Mowiol et observées avec un microscope optique à fluorescence (Axiophot équipé d'une caméra CCD).

