



HAL
open science

Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux pour la thérapie des gliomes

Archibald Paillard

► To cite this version:

Archibald Paillard. Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux pour la thérapie des gliomes. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00482293

HAL Id: tel-00482293

<https://theses.hal.science/tel-00482293>

Submitted on 10 May 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et
devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux
pour la thérapie des gliomes

Thèse DE DOCTORAT
Spécialité : NEUROSCIENCES

ECOLE DOCTORALE : BIOLOGIE SANTE

Présentée et soutenue publiquement
Le 15 décembre 2009
à Angers

par **Archibald PAILLARD**

Devant le jury ci-dessous :

Dr Sandrine SAGAN Directrice de Recherche DR2 CNRS, UMR CNRS 7203, Paris	Rapporteur
Pr Gilles PONCHEL Professeur à l'Université de Paris-XI, UMR CNRS 8612	Rapporteur
Pr Jean-Pierre BENOIT Professeur à l'Université d'Angers, INSERM U646	Examineur
Pr Didier BETBEDER Professeur à l'Université d'Artois, EA 2689 - IFR 114	Examineur
Pr Igor CHOURPA Professeur à l'Université de Tours, EA 4244 – IFR 135	Examineur
Dr Emmanuel GARCION Chargé de recherche CR1 INSERM, INSERM U646, Angers	Directeur de thèse

Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et
devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux
pour la thérapie des gliomes

Thèse DE DOCTORAT
Spécialité : NEUROSCIENCES

ECOLE DOCTORALE : BIOLOGIE SANTE

Présentée et soutenue publiquement
Le 15 décembre 2009
à Angers

par **Archibald PAILLARD**

Devant le jury ci-dessous :

Dr Sandrine SAGAN Directrice de Recherche DR2 CNRS, UMR CNRS 7203, Paris	Rapporteur
Pr Gilles PONCHEL Professeur à l'Université de Paris-XI, UMR CNRS 8612	Rapporteur
Pr Jean-Pierre BENOIT Professeur à l'Université d'Angers, INSERM U646	Examineur
Pr Didier BETBEDER Professeur à l'Université d'Artois, EA 2689 - IFR 114	Examineur
Pr Igor CHOURPA Professeur à l'Université de Tours, EA 4244 – IFR 135	Examineur
Dr Emmanuel GARCION Chargé de recherche CR1 INSERM, INSERM U646, Angers	Directeur de thèse

Remerciements

**Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements
à tous les Membres du Jury
pour avoir bien voulu accepter de consacrer du temps
à l'évaluation de ce travail.**

Et plus spécialement

**Madame Sandrine Sagan,
Directrice de Recherche CNRS de l'UMR CNRS 7203**

et

**Monsieur Gilles Ponchel,
Professeur à l'Université de Paris-XI
Membre de l'UMR CNRS 8612,**

**qui m'ont fait l'honneur
d'être mes Rapporteurs de Thèse.**

A Monsieur Jean-Pierre Benoît,

**Professeur à l'Université d'Angers
Directeur de l'Unité INSERM U646**

que je remercie très vivement

de m'avoir accueilli dans son Laboratoire

où j'ai pu préparer ma thèse dans les meilleures conditions

Merci aussi pour ses encouragements réguliers

et ses conseils judicieux.

Mention particulière pour mon Directeur de Thèse

Monsieur Emmanuel Garcion

Chargé de recherche INSERM CR1 de l'Unité INSERM U646

Permetts moi, Emmanuel de te remercier très amicalement

pour m'avoir encadré sans relâche.

J'ai apprécié ta rigueur et ton investissement.

Je suis heureux d'avoir pu apprendre à tes côtés,

pendant ces années passées ensemble.

Grand Merci aussi à

Monsieur Didier Betbeder

**Professeur à l'Université d'Artois,
Membre de l'EA 2689 - IFR 114**

**pour l'enthousiasme dont il a toujours fait preuve
dans nos nombreuses collaborations,
de son encadrement dans le Laboratoire de Lens,
et de m'avoir aidé dans ma recherche de Thèse.**

Je remercie également

Monsieur Igor Chourpa,

**Professeur à l'Université de Tours
Membre de l'EA 4244 – IFR 135**

pour sa participation au jury en tant qu'examineur,

mais aussi d'avoir bien voulu partager

ses connaissances avec moi.

Je garderai un souvenir chaleureux de cette collaboration.

Ma plus vive gratitude à l'égard de

**Madame Catherine Passirani
Professeur à l'Université d'ANGERS**

**pour son professionnalisme,
son humanisme,
sa patience
et son humour**

et

**Monsieur Patrick Saulnier
Professeur à l'Université d'Angers**

**pour sa pédagogie
et sa passion très communicative
pour la Science en général
et la physicochimie en particulier**

ainsi qu'à

**Monsieur François Hindré
Maître de conférences à l'Université d'Angers**

**pour son aide efficace
dans le domaine des traceurs radioactifs**

Je tiens à adresser aussi mes remerciements à

La Ligue Contre le Cancer,

au Comité Départemental de Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer

qui m'ont financé pendant ces années de Thèse

et m'ont permis de présenter mes travaux

à l'occasion du

9^{ème} Colloque sur la politique de recherche de la Ligue Contre le Cancer.

Merci enfin
à tous les Membres de l'U646,
qui m'ont fait passer ces années de Thèse
dans des conditions scientifiques
et humaines formidables

Avec notules spéciales pour

Christina Uber, Hélène Dervaux, Anne Pauly et Pascal Gabar. Tous différents, vous avez été les premières personnes que j'ai encadrées. Nous avons donc appris ensemble et j'en suis ravi, c'était vraiment « super ». Je souhaite à tout le monde d'avoir des stagiaires aussi volontaires, sérieux et efficaces. Meilleurs vœux de réussite dans vos futures trajectoires professionnelles.

Arnaud, merci pour les supers parties de half life et ta bonne humeur. A Omaha tu as sûrement du faire le plein de souvenir de camions. Maintenant à Besançon tu vas pouvoir te poser un peu plus et t'adonner à ta deuxième grande passion (l'aquarelle) ou en trouver d'autres. Bon courage dans ta nouvelle carrière, je suis persuadé que tu seras un super prof.

Merci Alexandra, travailler à tes côtés a été un réel plaisir, brillante et toujours le sourire aux lèvres (Hiii!), je sais que ton avenir est déjà sur les rails. Depuis ton départ les oiseaux ne chantent plus le soir au labo, mais je sais qu'ils volent vers Paris en ce moment (en particulier les cigognes). Plein de bonheur pour cette nouvelle vie qui commence.

Merci Maud. Tous deux extraterrestres, mais issus de deux planètes différentes, nous avons eu notre lot de problèmes de traduction ; cependant ces embarras linguistiques ne sont rien comparés aux heures de folie, d'humour décalé et de soutien. Ta grande valeur morale et tes grandes qualités professionnelles n'ont jamais failli. Ce sont des qualités que j'admire chez toi, bon courage pour la suite.

Ps : remercie pour moi Brigitte, Cristal, Lady Di, Miss liberty et la cruelle sorcière des neiges.

Merci Thanh pour ta gentillesse, ton amitié et ton courage. Je sais que tu auras un avenir brillant et que tu rentreras chez toi avec tous les honneurs. Tu ne le vois pas encore mais pierre après pierre tu as déjà bâti de grandes choses.

Les Zémilies, toujours inséparables, aussi « fofolles » l'une que l'autre. Emilie A. ta candeur et ton fort degré d'autodérision font de toi une personne formidable, ne change pas et bonne chance pour ta nouvelle carrière à Tours. Emilie R., ton énergie et ton enthousiasme m'ont toujours impressionné. Propose ta candidature à l'EDF, car tu produis plus d'énergie qu'une centrale nucléaire. Relativise ... et tu trouveras enfin la paix qui te manque tant pour accéder au bonheur.

Mimy, membre du fameux trio des « trois glorieuses » avec Jacqueline et Gisèle. Nos grandes discussions pendant les manips du complément ou de radioactivité ont été « géniales ». J'espère que nous continuerons encore longtemps nos pauses café. A bientôt et profite bien de ta nouvelle vie, pleine de bonheur.

Mathilde, merci pour nos discussions scientifiques productives. Organisée, déterminée et toujours sérieuse, tu te donnes toujours à fond et je sais que tu as ce qu'il faut en toi pour réussir tous les défis à venir. Beaucoup comptent sur toi – trop peut être ! - mais tu as suffisamment de maturité, de recul et d'intelligence pour ne jamais perdre de vue l'essentiel. Nos séances de « cônes » me manqueront beaucoup. Bon courage pour la suite ! Je ne doute pas un seul instant que nous serons de supers futurs collaborateurs.

Merci Erika pour ton amitié, ta bonne humeur, nos discussions constructives et drôles. Ensemble nous avons réussi ! On les a les points ! Presque quatre ans à boire du chocolat tous les matins pour gagner enfin nos bols ! Et c'est maintenant que je pars... enfin profite en bien et surtout prépare bien ton autre grand moment. Courage, je suis sûr que tu vas l'avoir ta bourse et que tu finiras ta thèse dans les meilleures conditions, d'autant que maintenant que tu es prête pour Harvard.

Marie M. toujours candide, drôle et pétillante. Je me souviendrai longtemps de nos grandes soirées défis à chercher des œufs de pâques ou toi faisant un gâteau (très réussi) les yeux bandés pour récupérer « alex ». Bonne chance à Bordeaux, je suis convaincu que tu vas t'y plaire et que Julien te rejoindra très vite (ça c'est sûr, il n'oubliera pas).

Merci au « Welsh », merci Béa et James. Je crois qu'à moi seul j'ai du vous faire exploser la consommation de GINI. Merci aussi à toute la bande : Raffaëla (promis-juré, les cure-dents c'est fini !), Simon (un jour je l'aurais l'immunité !), Guillaume (dit « l'homme le plus fort du monde dont j'attends toujours avec impatience la démonstration de remorquage de R5 avec une oreille), Mathieu (PS : une boulette en papier n'est pas un avion), Elisa (courage bientôt l'Espagne) et Stéphanie (bonne chance pour le futur ... qui, dit-on, ne manque pas d'avenir).

Le LGDLB : à tous les membres de cette organisation clandestine du rire et de la bonne humeur. Merci d'avoir montré qu'il était possible de faire son travail avec sérieux, efficacité et un grand investissement personnel, tout en démontrant qu'un esprit d'équipe, de l'humour et de la joie dans le travail, augmentait la productivité de chacun en créant un climat réjouissant, d'entraide et de jovialité au sein du laboratoire.

PS : remerciez « spider cochon » pour moi d'être venu de Springfield juste pour marcher sur mon plafond.

Merci également à toutes les nombreuses personnes que j'ai côtoyées au Laboratoire, qui se sont toujours montrées disponibles et chaleureuses : Jérôme C., Nolwenn, Sandy, Laurent, Claire, Céline et Franck L., J-P K., Emilien Florian, Marie W. (dite la Grande Marie, repose toi bien et bon courage), Livia, Kathy, Jacqueline, Gisèle, Gaétan, Florence, Olivier, Edith, Catherine C, Jérôme B., Kaïs, Alya, Thomas, Kamel, Pascal, Trinh, Ahmed, José, Laurence, Anne, Pierre, David, M^{me} Claudia Montero-Menei, M. Philippe Menei, M^{me} Nathalie Faisant, M. Franck Boury, M. Jean-Luc Courthaudon, M^{me} Marie-Clare Venier-Julenne, M. Jean-Jacques Le Jeune, M. Frédéric Lagarce, M. Olivier Couturier ...

Merci aussi Jiang, Maya, Rima (les trois lensoises) et Sébastien (de liège) pour nos collaborations et surtout votre chaleur humaine, bon courage pour vos futurs parcours professionnelles. Je suis déjà sûr qu'ils seront brillants.

Je remercie enfin toute la famille : merci de votre soutien et de m'avoir régulièrement ramené sur Terre. Je vous aime !

* * * *

Sommaire

Introduction générale	p15
Les nanovecteurs	p21
A. Les nanoparticules de poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA-NPs).....	p24
1. Le poly(lactic-co-glycolic acid)	p24
2. La préparation des nanoparticules de PLGA.....	p27
3. Généralités sur les PLGA-NPs.....	p31
4. Modification des PLGA-NPs.....	p32
5. Les PLGA-NPs utilisées dans notre étude.....	p33
6. La transferrine et l'albumine sérique bovine.....	p35
B. Les nanoparticules polysaccharidiques (NPS).....	p42
1. Les maltodextrines	p42
2. Les nanogels	p44
3. Les propriétés et les modifications des nanogels.....	p48
4. Préparation des NPS	p51
C. Les nanocapsules lipidiques (LNCs).....	p55
1. Les différents excipients des LNCs	p55
2. Les nanovecteurs lipidiques	p59
3. La préparation des LNCs	p64
La pathologie cancer : Le glioblastome	p67
Le franchissement de barrières biologiques	p76
A. L'accès aux cellules cibles dans le système nerveux central.....	p78
1. La voie intraveineuse.....	p78

a) La barrière sanguine	p80
b) La barrière hémato-encéphalique	p85
2. La voie locorégionale dans le système nerveux central.....	p92
B. L'accès au site d'action moléculaire.....	p96
1. Les différentes barrières biologiques érigées par la cellule.....	p96
a) Les franchissements des membranes cellulaires.....	p97
b) Les cheminements intracellulaires.....	p109
c) Les systèmes d'élimination.....	p118
2. Les conséquences de l'utilisation des nanovecteurs.....	p122
3. Modèle de glioblastome	p125

Chapitre 1 : Barrières tissulaires.....

p127

Publication n°1 :

« Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers».....p130

Publication n°2 :

« Protein adsorption onto the surface of PLGA nanoparticles governs their interactions with biological systems from blood to brain cancer cells ».....p155

Chapitre 2 : Barrières cellulaires et subcellulaires.....

p180

Publication n°3 :

« A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats».....p182

Publication n°4 :

« Analysis of the subcellular behaviour of lipid nanocapsules in cancer cells reveals specific skills for lysosome escape and size-dependent pharmacological activity ».....p196

Chapitre 3 :
L'intégrité des nanovecteurs dans les cellules cibles.....p240

Discussion générale.....p247

A. L'accès aux cellules cibles dans le système nerveux central.....p248

B. L'accès au site d'action moléculaire dans les cellules F98.....p251

Annexes.....p255

Publication annexe n°1 :
« Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–
brain barrier in vitro ».....p256

Publication annexe n°2 :
« In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by
convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy ».....p264

Références.....p276

Introduction générale

Dans le domaine médical, des progrès répétés, notamment en matière d'imagerie et de protocoles thérapeutiques, ont permis d'améliorer le traitement de nombreuses maladies. Cependant ces progrès n'ont eu qu'un impact limité dans la lutte contre le cancer, incitant au développement de nouvelles stratégies. Une des nouvelles stratégies proposées est d'améliorer l'efficacité thérapeutique des principes actifs via l'utilisation de systèmes de transport de taille nanométrique, appelés nanovecteurs. Ce concept de nanotechnologie à visée médicale a donc comme objectif non seulement d'augmenter l'efficacité, mais aussi la spécificité et la sécurité biologique des médicaments en améliorant leur administration. Ce concept s'apparente à celui de « magic bullet » imaginé par Paul Ehrlich il y a une centaine d'années, considéré par certains comme « le » père de la chimiothérapie et dont l'objectif était d'éliminer spécifiquement un organisme pathogène « cible ». En raison de leur taille nanométrique et des avancées dans le domaine de la chimie des vecteurs, ces systèmes de délivrance de principes actifs se proposent d'augmenter la quantité des molécules thérapeutiques accédant à leurs sites d'action tout en les détournant des sites où ils manifestent une toxicité. Cette stratégie a déjà montré son efficacité, comme dans le cas de la doxorubicine. En effet cette molécule présente une toxicité cardiaque quand elle est administrée sous une forme libre. En revanche comme l'ont montré Rahman et al. en 1985, sa toxicité est plus limitée et son efficacité thérapeutique augmentée si elle est incorporée dans des vecteurs en permettant d'administrer des doses plus importantes (Rahman et al. 1985).

Les nanovecteurs déjà développés sont d'une grande diversité de composition et de structure, leur permettant une grande modularité. D'une manière générale, ils sont définis par une taille comprise entre 5 et 300 nm (Faraji and Wipf 2009), une capacité à accroître la concentration d'un principe actif dans une préparation administrable et leur faculté à en améliorer l'efficacité. Cependant, bien que créés pour véhiculer des molécules à visée

thérapeutique, leur synthèse en est le plus souvent indépendante. Par ailleurs, le principe actif n'étant plus qu'un élément rajouté après fabrication des nanovecteurs ou mis à la place d'une partie des excipients, son devenir dans l'organisme après administration devient donc d'abord dépendant du nanovecteur le transportant, puis de ses propriétés intrinsèques. La compréhension du comportement des nanovecteurs dans des situations biologiques précises et définies, est donc indispensable pour leur utilisation rationalisée et optimale. Leur potentiel thérapeutique ne doit donc pas être pensé simplement en termes d'efficacité apparente des principes actifs transportés. Il doit également être évalué en termes d'identification et de compréhension des paramètres physiques, chimiques et biologiques conduisant à la délivrance sous une forme active de la molécule thérapeutique à un endroit précis et à un moment donné. En disposant ainsi d'une pléiade de nanovecteurs aux capacités diverses connues et bien définies, il sera alors possible de trouver la meilleure combinaison nanovecteur/principe actif pour une situation biologique particulière.

Auparavant plusieurs verrous technologiques doivent être levés afin de permettre la maîtrise parfaite des nanovecteurs, notamment ceux de leurs capacités à franchir des barrières biologiques restreignant l'accès aux sites d'action cellulaire et moléculaire des principes actifs. Ainsi, dans le traitement du glioblastome, une tumeur cérébrale maligne entraînant généralement la mort du patient moins de 1 an après le diagnostic, un nanovecteur, tout comme un principe actif libre, doit franchir un grand nombre de barrières biologiques avant d'agir. Dans le travail présenté ici, axé plus particulièrement sur le modèle biologique du glioblastome, nous étudierons le franchissement par les nanovecteurs de deux groupes de ces barrières biologiques: d'une part celles restreignant l'accès aux cellules cibles et d'autre part celles érigées par les cellules où le principe actif transporté par le nanovecteur doit agir. Nous appréhenderons également en parallèle l'intégrité des nanovecteurs lorsqu'ils interagissent

avec les cellules, afin de caractériser la libération du principe actif hors du nanovecteur et leur éventuelle toxicité.

Les barrières biologiques restreignant l'accès des nanovecteurs aux cellules tumorales cérébrales sont multiples et dépendent des différentes voies d'administration possibles dans l'organisme : voie orale, voie mucoale, voie intraveineuse et plus directement voie locorégionale. Cependant hormis cette dernière, toutes les autres voies empruntent plus ou moins rapidement le réseau sanguin pour accéder à leurs cibles. Nous serons donc amenés à étudier dans un premier temps le franchissement des barrières après une administration sanguine ou locorégionale puis celui des barrières cellulaires que les nanovecteurs doivent franchir, une fois arrivés au contact des cellules cibles. Enfin, nous traiterons de l'influence des interactions entre la cellule et le nanovecteur sur l'intégrité du nanovecteur et sur la libération d'un principe actif en termes d'environnement moléculaire et de localisation subcellulaire au cours du temps.

Le franchissement de chacune de ces barrières par un nanovecteur est d'abord influencé par une multitude de paramètres physiques et chimiques. Parmi tous ces paramètres, nous avons axé notre étude sur la nature, la charge, la spécificité et la taille des nanovecteurs. Tous ces paramètres ne pouvant être évalués à l'aide d'un seul type de nanovecteur, nous avons travaillé avec plusieurs nanovecteurs différemment modulables. Ainsi pour chacune de ces barrières, nous avons testé, quand cela n'avait pas déjà été fait, trois types de nanovecteurs différents. Il s'agit des nanoparticules polymériques faites de poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA-NP), des nanoparticules polysaccharidiques (NPS) à base de maltodextrines et les nanocapsules lipidiques (LNC). Notre travail s'inscrit donc dans la continuité d'études précédentes sur ces nanovecteurs et commence logiquement par une démarche visant à les

comparer afin de déterminer le potentiel de chacun et les principaux paramètres influençant leur franchissement des barrières biologiques. Après un rappel des données existantes sur les différents vecteurs colloïdaux étudiés ici (à savoir les PLGA-NP, NPS et les LNCs), sur la pathologie gliomale ainsi que sur les différentes barrières biologiques restreignant l'accès aux sites d'action cellulaires et moléculaires des principes actifs, nous nous concentrerons sur le franchissement de la barrière sanguine, puis sur le franchissement des barrières cellulaires et enfin sur l'intégrité du nanovecteur conduisant à la libération du principe actif dans la cellule. Enfin une discussion générale permettra d'ouvrir de nouvelles perspectives.



Paul Ehrlich (1854-1915), prix Nobel de médecine en 1908 (photos issue de nobelprize.org)

Les nanovecteurs

Le concept de « magic bullet », précédemment incarné par les anticorps monoclonaux, pourrait être incarné aujourd’hui par les nanotechnologies à visées médicales. Comme les « magic bullets » imaginées par Paul Ehrlich (Strebhardt and Ullrich 2008), les nanovecteurs ont pour objectif d’augmenter l’efficacité, la spécificité et la sécurité biologique des principes actifs, ici en améliorant leur administration. Extrêmement modulables, ces nanovecteurs restent néanmoins définis par leur taille comprise entre 5 et 300 nm (Faraji and Wipf 2009), leur capacité à accroître la concentration d’un principe actif dans une solution administrable et leur faculté à en améliorer l’efficacité.

Certains nanovecteurs existent déjà en application clinique ; il s’agit de liposomes encapsulant de l’amphotéricine B ou de la doxorubicine (Ambisome[®], Nextar, Abelcet[®], The Liposomes Co, Doxil[®], Alza Pharmaceuticals, Abraxane[®]). Cependant, les raisons principales de leur nombre réduit sont à relier aux problèmes de coût ou encore de stabilité au cours de leur conservation ou lors de leur administration. C’est pourquoi la recherche ne cesse de développer de nouveaux nanovecteurs, et il en existe actuellement une grande variété ayant des compositions et des structures très diverses, comme l’illustre la Figure 1.

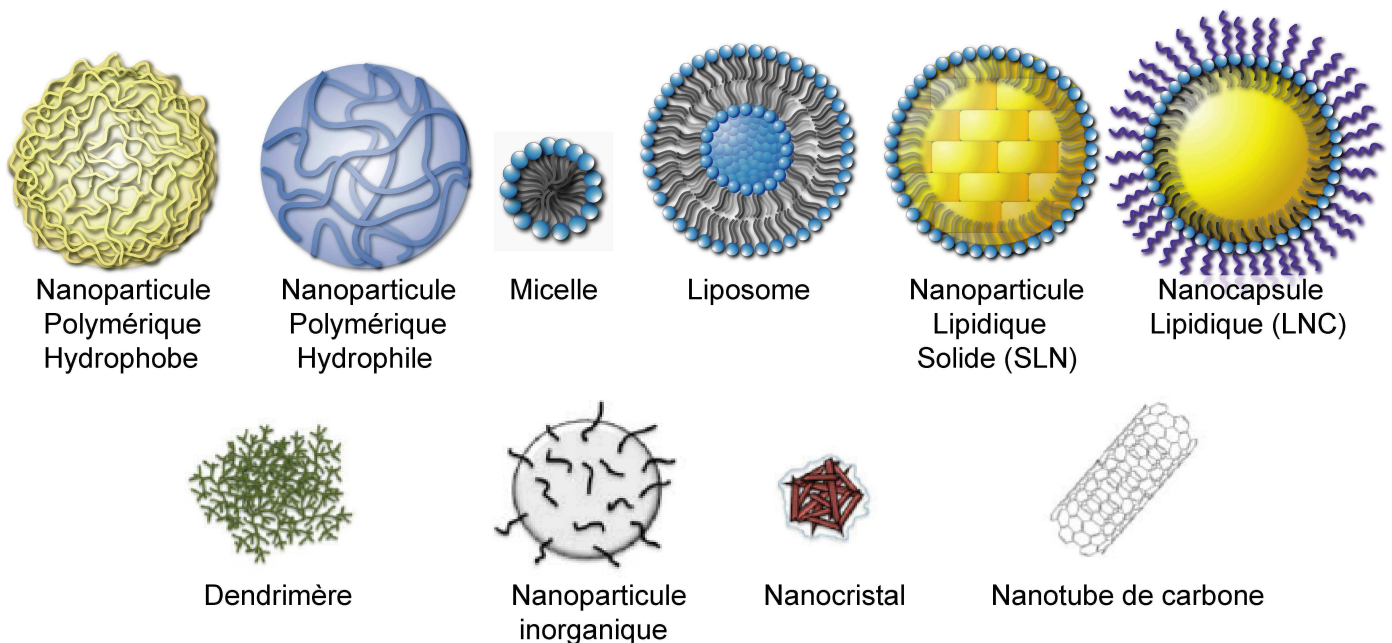


Figure 1. Représentation schématique des principaux nano objets utilisés en recherche biomédicale (Faraji and Wipf 2009, Kabanov and Vinogradov 2009)

Nombreuses sont les barrières biologiques que doivent franchir les nanovecteurs pour augmenter l'index thérapeutique *in vivo* des principes actifs transportés. Le franchissement de chacune de ces barrières est influencé par une multitude de paramètres physiques et chimiques. La sélection des nanovecteurs les plus aptes à les franchir permet de déterminer les facteurs les plus influents et de modifier certains nanovecteurs selon ces critères. Ainsi modifiés, leur capacité à franchir cette barrière sera augmentée. C'est notamment le cas des nanovecteurs dits «furtifs» qui ont été modifiés ou créés pour répondre à des critères permettant d'augmenter leur temps de circulation plasmatique par rapport à celui des vecteurs classiques (Klibanov et al. 1990). Ce fut également le cas des nanovecteurs utilisant des molécules autorisant un ciblage actif, comme les immuno-liposomes (Huwyler et al. 1996).

Parmi tous ces paramètres, nous nous sommes focalisés sur la nature, la charge, la spécificité et la taille des nanovecteurs. Tous ces paramètres ne pouvant être évalués à l'aide d'un seul nanovecteur, nous avons travaillé avec plusieurs nanovecteurs modulables de manières différentes profitant de l'expérience acquise à l'Inserm U646, en nous servant des nanocapsules lipidiques (LNC), ainsi que de l'expérience acquise dans d'autres laboratoires via des collaborations. C'est ainsi que les autres nanovecteurs nous ont été fournis par M. le Pr Didier Betbeder, Mme le Dr Jiang Chang, Mme Maya Kroubi et M. le Dr Youssef Jallouli, pour les nanoparticules polysaccharidiques (NPS) et les nanoparticules de poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA-NP). Ces trois nanovecteurs permettent d'avoir un large éventail de propriétés tout en restant comparables. Ils ont tous une taille comprise entre 50 et 100 nm, mais les LNCs nous permettent d'étudier le paramètre de la taille à l'aide de LNC de trois tailles distinctes (20, 50, 100 nm). Ils peuvent tous encapsuler des principes actifs hydrophobes, en revanche seules les nanoparticules polysaccharidiques peuvent charger en leur coeur des molécules hydrophobes ou hydrophiles, voire les deux à la fois. L'utilisation

des trois permet de comparer des nanovecteurs de trois charges différentes : neutres pour les LNC et les nanoparticules polysaccharidiques, cationiques pour les nanoparticules polysaccharidiques modifiées à cet effet, anioniques pour les nanoparticules de PLGA. Enfin les nanoparticules de PLGA nous ont permis d'étudier facilement le ciblage actif à l'aide de protéines modifiant leurs surfaces.

A. Les nanoparticules de poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA-NPs)

Le terme de nanoparticules polymériques désigne généralement les nanoparticules de polymères hydrophobes, mais il existe aussi celles faites de polymères hydrophiles ou d'une combinaison de polymères hydrophobes et de polymères hydrophiles. Ici nous étudierons les nanoparticules les plus représentatives faites de polymères hydrophobes : les nanoparticules de PLGA.

1. Le poly(lactic-*co*-glycolic acid)

Le poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) est un polyester biodégradable qui peut être obtenu par polymérisation de monomères d'acide lactique et de monomères d'acide glycolique. Cependant ceux sont le plus souvent les dimères cycliques di-ester de ces acides (le lactide pour l'acide lactique et le glycolide pour l'acide glycolique) qui sont utilisés, permettant une polymérisation par ouverture de cycle (Ring-opening polymerization (ROP)) (Figure 2). Cette réaction forme alors une liaison ester entre deux acides. Pour favoriser la

polymérisation, des catalyseurs sont généralement utilisés comme l'étain (II) 2-éthylhexanoate, l'étain (II) alkoxides, ou isopropylate aluminium (Huh et al. 2003).

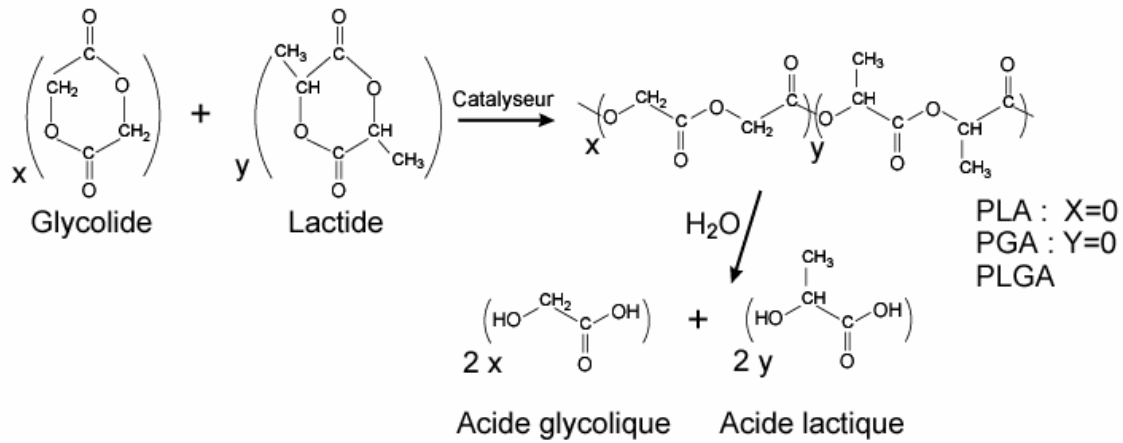


Figure 2. Synthèse et dégradation du PLGA

Des molécules d'eau suffisent pour hydrolyser les liaisons esters, finissant par libérer des molécules libres d'acides lactiques et d'acides glycoliques. Ces deux molécules dans l'eau sont déprotonées et sont alors appelées lactate et glycolate. Dans l'organisme humain ces deux molécules sont facilement éliminées, car ce sont également deux sous-produits des différentes voies métaboliques. Une fois dans la circulation sanguine, elles sont éliminées, par le foie, en entrant dans le cycle de Krebs, notamment pour le lactate, recyclé en acide pyruvique (Jain 2000, Shive and Anderson 1997). Une partie de l'acide glycolique est également éliminée par l'urine (Brady et al. 1973). Puisque le corps humain traite efficacement les produits de décomposition du PLGA, celui-ci a été classé parmi les polymères biodégradables. Ceci lui permet donc d'être approuvé pour de nombreuses applications thérapeutiques par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (la Food and Drug Administration (FDA)). En plus, d'être également non immunogène, ce polymère a l'avantage de pouvoir être produit à grande échelle ainsi que d'avoir une structure modifiable. Il est ainsi utilisé dans diverses applications pharmaceutiques et médicales. Le PLGA est utilisé pour former de nombreux dispositifs

biomédicaux tels que : des greffes, des sutures, des implants, des prothèses, des microparticules (Giteau et al. 2008) et des nanoparticules. A titre d'exemple, il fut utilisé pour la synthèse de microsphères délivrant du 5-Fluoro-uracil (5-FU) (Roullin et al. 2002) dans le cadre d'essais cliniques visant la thérapie du gliome, mais également pour supporter de manière tridimensionnelle des cellules, sous forme de « microcarriers pharmacologiquement actifs » (MPA) visant la reconstruction de tissu après implantation (Tatard et al. 2007).

Toutes ces applications nécessitent une grande maîtrise de la dégradation du polymère, ce que permet le PLGA, notamment en modifiant le ratio lactide / glycolide utilisé lors de sa synthèse. En effet puisqu'il est composé d'acide lactique et d'acide glycolique, il paraît donc logique que les propriétés du PLGA, comme sa dégradation, soient directement dépendante du ratio entre acide lactique et acide glycolique. C'est pourquoi les co-polymères de PLGA sont souvent nommés en associant ce ratio, comme par exemple le PLGA 50:50 dont la composition est de 50% d'acide lactique et de 50% d'acide glycolique. Les polymères d'acide lactique (PLA) sont plus hydrophobes, plus cristallins et sont aussi les plus lents à se dégrader, alors que les polymères d'acides glycoliques (PGA), plus hydrophiles et plus amorphe, se dégradent plus rapidement. D'où la règle suivante : le temps de dégradation des co-polymères de PLGA est proportionnel au nombre d'unité de glycolides, donc plus il y aura d'unités glycolides, plus la dégradation sera rapide. Le PLGA 50:50 est d'ailleurs la seule exception à cette règle, puisqu'il présente une dégradation plus rapide que les autres ratios.

Nombreux sont les autres paramètres déterminant la solubilité dans l'eau et la cinétique de dégradation de ce co-polymère. Il y a les paramètres intrinsèques structurels tels que le poids moléculaire du polymère, son indice de polydispersité, la composition de l'extrémité de la chaîne du polymère ou la séquence des monomères (Bala et al. 2004). A ceux-ci s'ajoutent les conditions extérieures telles que le pH, la température et la force ionique. En général, le temps de dégradation sera plus court pour les polymères de bas poids moléculaire et plus long

pour les co-polymères de PLGA qui sont finalisés par des esters (par opposition à l'acide carboxylique libre). Pour délivrer des principes actifs, il faut donc choisir judicieusement le PLGA. Plusieurs critères sont alors à prendre en compte. Le premier d'entre eux est le solvant à utiliser. Heureusement le PLGA peut être dissous par une large gamme de solvants comme les solvants chlorés, le tétrahydrofuranne, l'acétone ou l'acétate d'éthyle. Ensuite il faut choisir un PLGA avec ratio lactide / glycolide permettant un taux de charge suffisant et une libération du principe actif à un temps voulu. Cependant il faut prendre en compte que les molécules encapsulées influencent aussi la dégradation du PLGA. Par exemple, les drogues acides et basiques sont connues pour catalyser la dégradation du PLGA (Visscher et al. 1986). De plus des anti-acides sont parfois nécessaires, tels que le $Mg(OH)_2$, dans les structures faites de PLGA. Cette incorporation est utilisée notamment dans le cas d'encapsulation de protéines. En effet la dégradation des PLGA entraîne une diminution du pH suite au relargage des ions H^+ lors de la solubilisation des acides en lactate et glycolate. Cet environnement local acidifié est connu pour être une des raisons principales de l'inactivation des protéines encapsulées dans les structures de PLGA (Fournier et al. 2003). Enfin un autre paramètre rentrant fortement en ligne de compte pour le choix du ratio de PLGA, est l'environnement futur des structures de PLGA, surtout *in vivo*. En effet, il a déjà été démontré que leurs hydrolyses étaient catalysées par des enzymes (Hariharan et al. 2006).

2. La préparation des nanoparticules de PLGA

Très bien toléré par l'organisme et couramment employé en clinique, le poly(lactic-co-glycolic acid) est devenu un des composants classiquement utilisé pour la synthèse de nanoparticules biocompatibles. Il existe plusieurs techniques de fabrication de ces particules qui peuvent être réparties selon deux principes :

- ✓ Soit la préparation requiert l'utilisation de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, puis leur polymérisation pour former des nanoparticules (Pinto Reis et al. 2006, Soppimath et al. 2001).

- ✓ Soit la préparation requiert l'utilisation de polymères déjà formés pour la synthèse des nanoparticules.

La deuxième solution est la plus courante puisqu'elle permet de choisir judicieusement le ratio lactide / glycolide et le poids moléculaire du co-polymère selon les utilisations souhaitées des nanoparticules. Il existe plusieurs procédés utilisant les polymères préformés et permettant la synthèse de nanoparticules de PLGA. Elles sont toutes abordées dans plusieurs revues (Legrand et al. 2007, Pinto Reis et al. 2006, Quintanar-Guerrero et al. 1998, Soppimath et al. 2001). On peut néanmoins identifier un principe commun à tous ces procédés qui commencent tous par solubiliser les polymères de PLGA préformés dans un ou plusieurs solvants (S1), puis immergent cette solution dans un autre solvant (S2) où le PLGA ne sera pas soluble. Le retrait des S1 se faisant soit vers le S2 (si les S1 y sont miscibles), soit par la chaleur ou le vide. Le départ des S1 entraîne alors instantanément la solidification du PLGA en particules. Les principales méthodes existantes sont :

- **la méthode d'émulsification - évaporation de solvant** : Il s'agit de former une émulsion grossière en solubilisant le polymère dans un S1 non miscible dans le S2. Cette émulsion est alors passée dans un homogénéisateur ou aux ultrasons pour en réduire la taille. Ici le retrait du S1 se fait par évaporation de

solvant sous l'effet de la chaleur, du vide ou des deux (Ng et al. 2009, Panyam and Labhasetwar 2003a), comme illustré en Figure 3.

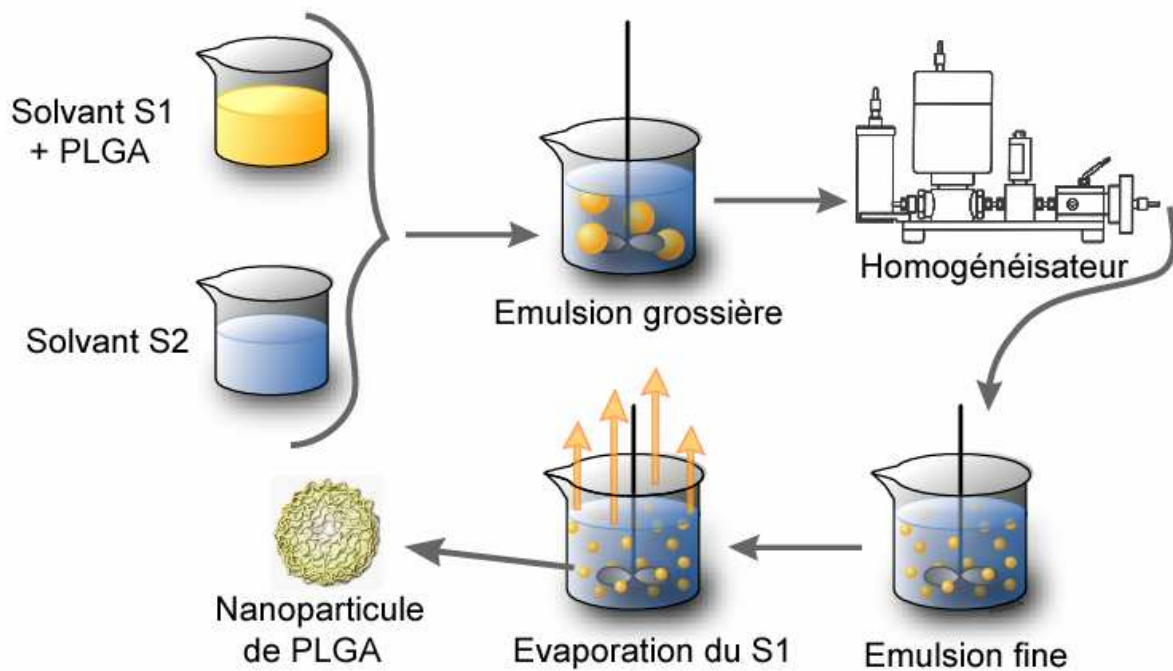


Figure 3. Préparation des nanoparticules de PLGA par la méthode d'émulsification - évaporation de solvant.

- **La nanoprécipitation :** Ici le S1 choisi est totalement miscible dans le S2. Par conséquent la formation des nanoparticules se fait uniquement par injection au goutte à goutte de la solution polymère/ S1 dans une solution S2 agitée (Barichello et al. 1999), contenant souvent en plus un surfactant ou un stabilisateur pour modifier la taille ou les propriétés de surface des nanoparticules, comme l'illustre la Figure 4.

Remarque : Le défi pour ce procédé est de trouver la bonne combinaison : principe actif à encapsuler / polymère / solvant S1 / solvant S2.

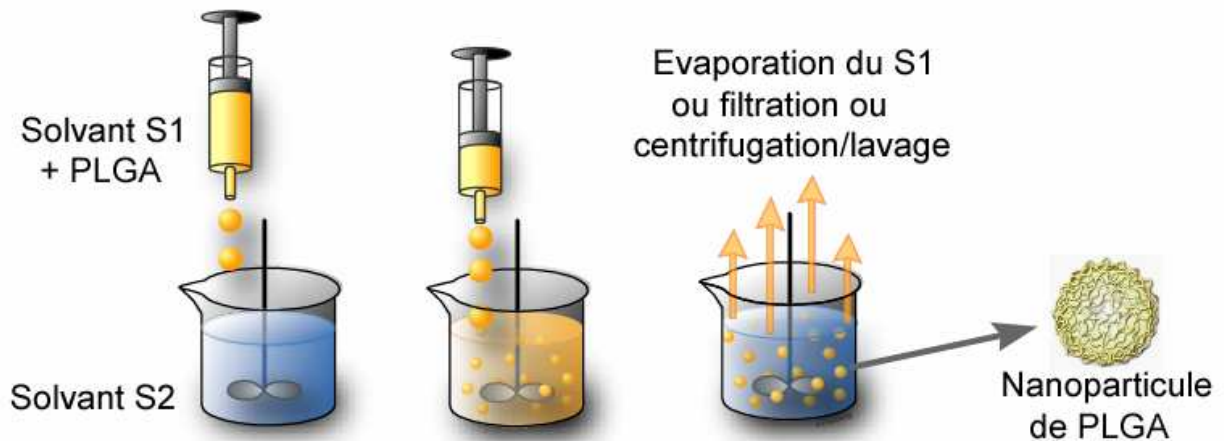


Figure 4. Préparation des nanoparticules de PLGA par la méthode de nanoprecipitation.

- **La méthode dite de « salting out » :** Ici le S1 est miscible dans le S2, seulement le S2 est saturé par des électrolytes (ex : le chlorure de magnésium) empêchant la diffusion du S1 dans le S2. Ce non retrait de S1 permet, grâce à une agitation mécanique forte, de créer une émulsion. Il est alors possible de laisser diffuser le S1 par ajout de S2 diluant les électrolytes, permettant la miscibilité de S1, comme illustré Figure 5.

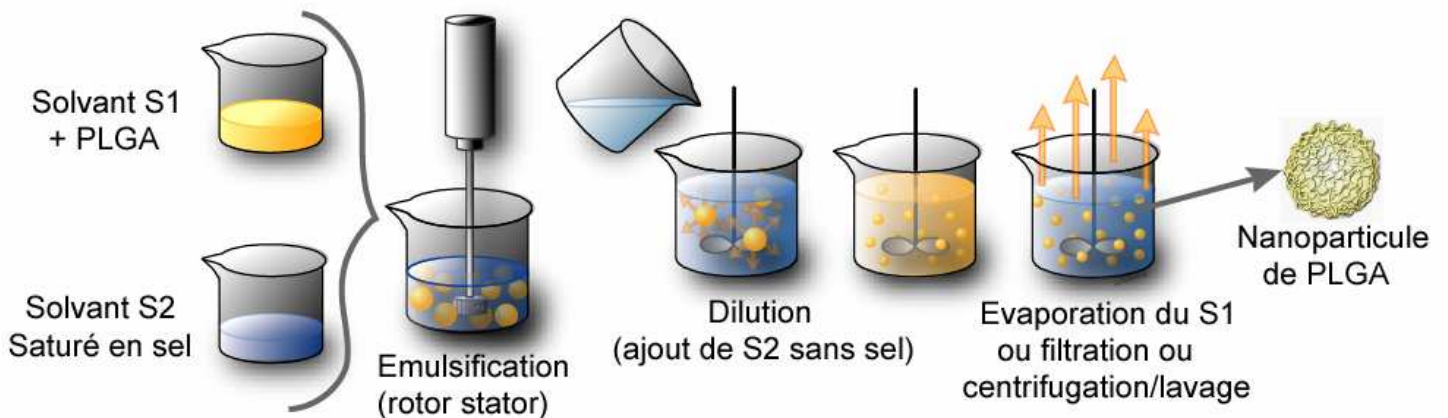


Figure 5. Préparation des nanoparticules de PLGA par la méthode dite de « salting out ».

- **La méthode d'émulsification - diffusion :** Il s'agit d'utiliser un S1 peu miscible dans le S2. Il faut mélanger d'abord S1 et S2 pour les saturer. Comme il y a plus de S1 que ne peut en contenir S2, une partie de S1 n'est plus

miscible. Il faut également saturer la solution S1/ PLGA avec un peu de S2. Une fois les phases saturées, les deux solutions sont mélangées mécaniquement et forment une émulsion. Pour laisser diffuser le S1, il faut alors rajouter du S2 non saturé en S1, ce qui permettra la miscibilité de S1 (Figure 6).

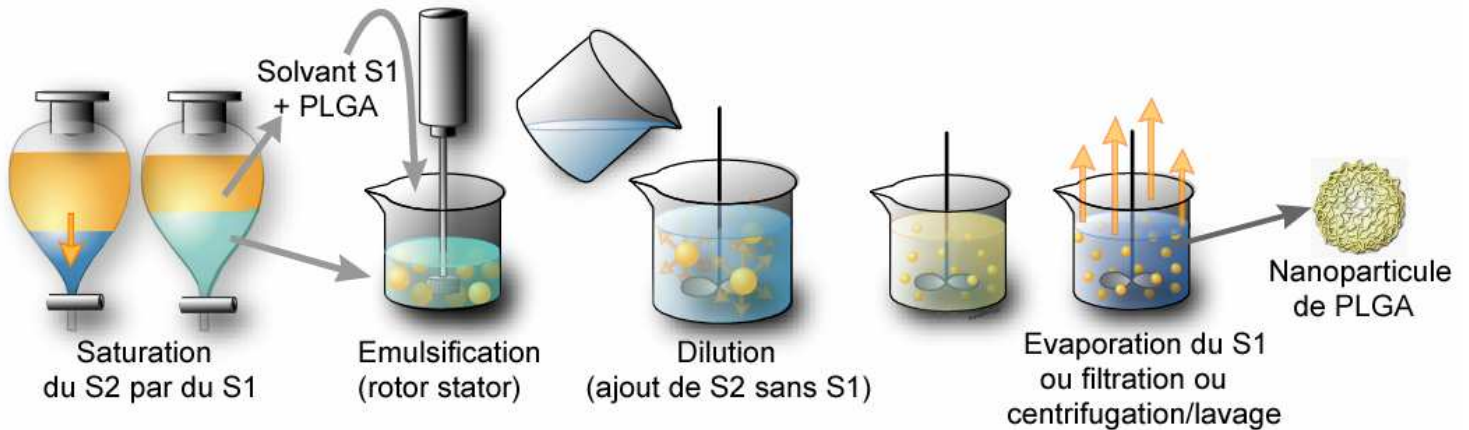


Figure 6. Préparation des nanoparticules de PLGA par la méthode d'émulsification -diffusion.

3. Généralités sur les PLGA-NPs

Par ces méthodes, il est possible de former des PLGA-NPs chargées efficacement en principes actifs hydrophobes, mais faiblement en principes actifs hydrophiles. Cependant les molécules thérapeutiques peuvent également être adsorbées ou greffées chimiquement à la surface des PLGA-NPs (Panyam and Labhasetwar 2003a). Les PLGA-NPs ont alors été utilisées pour délivrer des médicaments de faible poids moléculaire comme la dexaméthasone (Panyam et al. 2002), des macromolécules comme les protéines pour des vaccins (Moghimi et al. 2001) ou de l'ADN plasmidique (Cohen et al. 2000, Guzman et al. 1996). Cette capacité variable de chargement a permis aux PLGA-NPs d'être étudiées pour de nombreuses applications, comme le franchissement de la barrière hématoencéphalique (BHE) *in vitro* (Chang et al. 2009) et *in vivo* (Costantino et al. 2006). De plus en raison de leurs propriétés physiques, chimiques intrinsèques ou obtenues après modification, elles ont montré des

comportements intracellulaires de grand intérêt. Par exemple les PLGA-NPs sont cationiques en milieu acide et anioniques à pH alcalin ou neutre, ce qui leur permet d'avoir une surface cationique dans le compartiment endo-lysosomale. Ce changement de potentiel de surface leur évite d'être orientées vers les lysosomes, épargnant la dégradation des principes actifs transportés (Panyam et al. 2002).

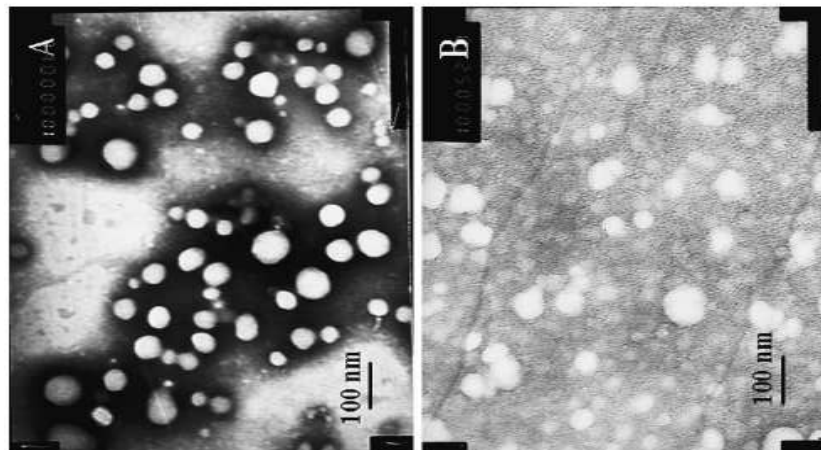


Figure 7. PLGA-NPs vues en microscopie électronique à transmission (Chang et al. 2009).

4. Modification des PLGA-NPs

Leurs capacités ne sont cependant pas encore optimales ; par exemple il a été montré que les PLGA-NPs intracellulaire pouvaient subir jusqu'à 85 % d'exocytose en 30 minutes (Panyam and Labhasetwar 2003b), limitant ainsi fortement l'efficacité du transport de principe actif. C'est pour cette raison que de nombreuses recherches sont actuellement en cours visant à comprendre et à modifier les propriétés physiques de ces nanoparticules y compris leur hydrophobicité, leur charge de surface et leur taille (Ng et al. 2009, Prabha et al. 2002). Une des modifications les plus prometteuses est actuellement le changement des propriétés interfaciales de ces nanoparticules pouvant s'effectuer selon deux principes :

- **Soit par un changement lors de la formulation des PLGA-NPs :** Il est possible d'utiliser un émulsifiant (par exemple, polyvinyle alcool, PVA) rendant la surface des PLGA-NPs plus neutre et plus hydrophile, mais diminuant leur entrée dans les cellules (Sahoo et al. 2002). Pour rendre également la surface plus hydrophile, il est possible d'utiliser des PLGA comprenant aussi des unités de poly(éthylène glycol) (PEG) (Gref et al. 1994, Leroux et al. 1994, Redhead et al. 2001, Stolnik et al. 1994b).
- **Soit en les modifiant après leur formulation :** En effet il est possible de fonctionnaliser les PLGA-NPs soit par adsorption électrostatique (Messai et al. 2003, Sukhorukov et al. 1998, Voigt and Zintl 1999), hydrophobe (Hawley et al. 1997, Muller and Wallis 1993, Stolnik et al. 1994a, Stolnik et al. 1994b) ou par liaison chimique à leur surface (Gref et al. 1994, Nobs et al. 2003). Par exemple l'adsorption de Poly-L-lysine (PLL) permet une internalisation 4 fois plus grande et plus rapide des PLGA-NPs (Vasir and Labhasetwar 2007), alors que la liaison de glyco-heptapeptides améliore leur passage de la BHE (Costantino et al. 2006).

5. Les PLGA-NPs utilisées dans notre étude

Ces nanoparticules de PLGA ont été préparées selon la méthode de nanopréciipitation, en utilisant du PLGA 50 : 50 de masse moléculaire de 26 500 g/mol. Brièvement, 10 mg de PLGA sont solubilisés dans de l'acétone dans lequel est ajouté par la suite de l'éthanol à 97%. Cette phase organique est ensuite versée dans 10 ml d'eau déminéralisée sous agitation

magnétique à 1 000 rpm. La solution ainsi préparée est mise à évaporer pendant 3 heures afin de retirer l'éthanol et l'acétone. Pour suivre les PGA-NPs par fluorescence, du 1,1-dioctadecyl 3, 3, 3, 3-tetramethylindo-carboxycyanate perchlorate (DiI) (ex: 549nm; em: 565nm) est ajouté dans la solution d'acétone /PLGA. Après filtration sur des filtres ayant des pores 0,2µm, les PLGA-NPs sont stockées à 4°C avant d'être utilisées. Elles sont caractérisées par une taille allant de 70 nm +/- 10nm et un potentiel de surface de - 40mV +/- 8mV.

Dans notre étude, ces nanoparticules vont permettre de suivre l'influence de la modification de surface notamment pour la rendre plus hydrophile et plus ciblée. Pour cela de l'albumine bovine sérique (BSA) ou de la transferrine sont adsorbées à la surface des nanoparticules. Les PLGA-NPs sont mises en suspension dans du tampon Ringer-Hepes (pH 7,4) et à une concentration de 1 mg / mL. Les protéines sont ensuite ajoutées à un ratio de 1 / 1 (masse / masse). Ces protéines ayant des propriétés surfactantes, elles vont s'adsorber à la surface par leurs parties hydrophobes. Après 3 heures à température ambiante, sous agitation modérée, l'adsorption est arrêtée (Ataman-Onal et al. 2006). Le surplus des protéines est alors retiré lors de plusieurs rinçages par ultrafiltration sur filtre 100kDa. Enfin les particules sont filtrées sur des filtres ayant des pores de 0,2µm et stockées à 4°C. La quantité moyenne de protéines adsorbées sur les PLGA-NPs a été estimée à 1,1 g/cm³ des nanoparticules (Chang et al. 2009). L'adsorption des protéines a été caractérisée comme étant stable à 37°C plus de 10 jours (Chang et al. 2009). L'adsorption de la BSA et de la transferrine rend la surface des PLGA-NPs plus hydrophile, neutralise faiblement leur potentiel de surface autour de - 30mV +/- 8mV et augmente leur taille autour de 90 nm +/- 10nm.

6. La transferrine et l'albumine sérique bovine

Nous avons choisi de modifier la surface des PLGA-NPs en y adsorbant de la BSA et de la transferrine pour leurs propriétés particulières que nous allons brièvement détailler ici :

- **La transferrine (ou sidérophiline):**

Il s'agit d'une glycoprotéine plasmatique d'environ 80 kDa (entre 81 et 76 selon des déficits liés à alcoolisme), constituée chez l'homme de 679 acides aminés formant deux lobes (un portant l'extrémité C-terminale et l'autre l'extrémité N-terminale) et de deux chaînes glucidiques (Moos et Morgan 200). Elle a pour rôle de véhiculer le fer dans sang, mais également dans d'autres liquides biologiques tels que le liquide cérébro-spinal (LCS) ou le liquide amniotique. Elle assure ce rôle par sa capacité de liaison de deux atomes de fer (sous forme Fe^{3+}). Chaque site de liaison se situe dans un lobe différent, mais est constitué des mêmes acides aminés (deux tyrosines, une histidine et un acide aspartique). Les formes anioniques de l'acide aspartique et des deux tyrosines permettent de fournir les trois charges négatives assurant l'attraction d'une molécule de Fe^{3+} . Dans l'organisme la transferrine existe sous quatre formes : l'apotransferrine (sans fer), les deux transferrines monoferriques avec fer fixé en C-terminal (haute affinité) ou en N-terminal (affinité moindre) et la transferrine diferrique (la holo-transferrine).

La majorité du fer contenu dans l'organisme est situé dans l'hémoglobine des érythrocytes ; mais le fer est aussi indispensable pour les cellules en division, pour le bon fonctionnement des cytochromes et des enzymes hémiques (catalases, peroxydases etc.). La transferrine est synthétisée par les macrophages des organes lymphoïdes, accessoirement par les lymphocytes et certaines cellules cérébrales, comme les oligodendrocytes (De Arriba

Zerpa et al. 2000), mais principalement par les hépatocytes où la quantité de fer présente dans la cellule détermine son taux de synthèse. Comme le foie est l'organe stockant le plus de fer, si les stocks de fer diminuent dans les hépatocytes, il y aura plus de transferrine synthétisée et inversement trop de stock de fer inhibera la synthèse de transferrine (Hentze et al. 2004). Son rôle de transporteur de fer est primordial pour l'homéostasie du fer. En effet, le corps humain contient de 3 000 à 4 000 mg de fer et en élimine environ 1 à 2mg par jour via la bile, l'urine, les cellules perdues par l'intestin, la peau, les muqueuses ainsi que les pertes de sang (Hentze et al. 2004). Ces pertes sont donc compensées par une faible absorption duodénale provenant de l'alimentation. Par conséquent, la plus grande partie du métabolisme du fer se fait en circuit fermé et il faut que le fer soit continuellement recyclé et transporté des tissus donneurs ou stocks vers les tissus demandeurs.

De par sa fonction de transporteur la transferrine doit rester longtemps dans le sang, ce qui explique son long temps de demi-vie d'environ 8 jours. Par l'intermédiaire du sang la transferrine délivre le fer aux cellules grâce à un récepteur (le récepteur de la transferrine (Tf-R)) disposé à leur surface. Le Tf-R est un homodimère transmembranaire de 176 kDa, constitué de 2 monomères identiques reliés par deux ponts disulfures (Enns and Sussman 1981). Chacun de ses monomères est capable de lier une molécule de la transferrine, mais uniquement si elle contient au moins une molécule de fer. La concentration de ce récepteur est régulée selon les besoins en fer de la cellule. Le Tf-R est très fortement exprimé sur les hépatocytes, les érythrocytes, les cellules intestinales, les monocytes, mais également sur les cellules endothéliales cérébrales (Moos et al. 2007). Par ailleurs, il est surexprimé sur la surface des cellules à forte activité mitotique comme les cellules de gliome (Recht et al. 1990), favorisant aussi le ciblage des tumeurs cérébrales.

Une fois que la transferrine chargée en fer s'est fixée à son récepteur, ils sont tous deux internalisés dans une vésicule. Hormis dans le cas de la transcytose chez les cellules endothéliales cérébrales, ces vésicules sont internalisées par endocytose clathrine dépendante et fusionnent ensuite avec l'endosome précoce (Fleming et al. 1998). Le pH acide de cet endosome, engendré par des pompes à ions hydrogènes (H^+ + ATPases), va alors réduire les formes anioniques de l'acide aspartique et des deux tyrosines de la transferrine et libérer le fer. La transferrine toujours liée à son récepteur est ensuite transportée vers l'endosome de recyclage, puis retourne vers la surface de la cellule. Ce n'est qu'une fois retournée à la surface cellulaire et à un pH neutre que la transferrine se détache du récepteur et peut à nouveau fixer du fer.

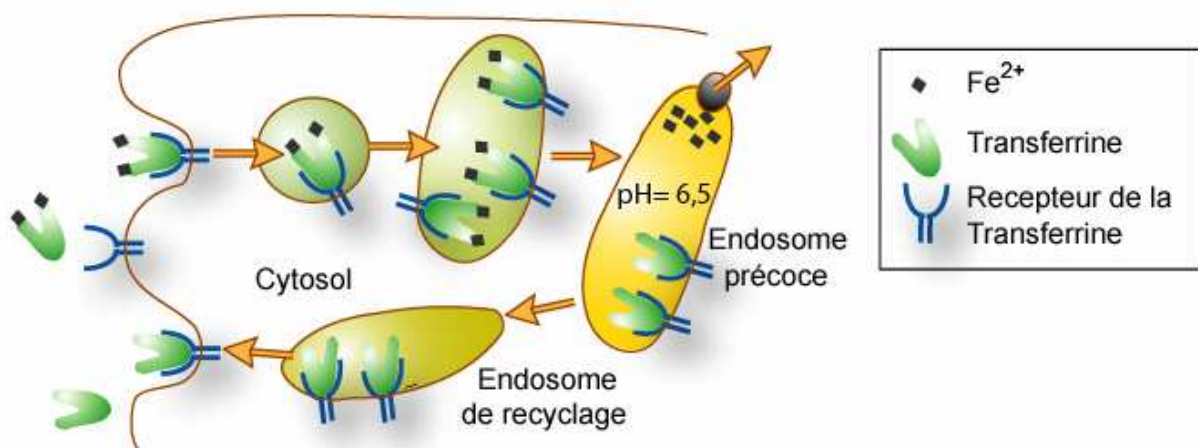


Figure 8. Cycle cellulaire de la transferrine

Dans le cas particulier des cellules endothéliales cérébrales, il est admis que la transferrine chargée en fer se fixe sur son récepteur à la surface des cellules de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Puis le fer apporté par la transferrine va servir en partie pour la cellule endothéliale, mais aussi pour les autres cellules du parenchyme cérébral. Pour cela, selon Moos et Morgan, les vésicules contenant ce complexe seraient acidifiées, libérant le fer de la transferrine (Moos et al. 2007). Puis ces vésicules libéreraient leurs contenus à la surface basale des cellules. Le fer serait alors pris en charge par le citrate, l'ascorbate (Bradbury

1997) ou de nouvelles molécules de transferrines présentes dans le liquide interstitiel venant des oligodendrocytes. En effet, ici la transferrine venant du plasma serait toujours fixée à son récepteur en raison du pH faible de ce liquide interstitiel et de la forte affinité de l'apotransferrine pour son récepteur en milieu acide. Enfin le complexe retournerait à la surface luminale de la cellule où le pH neutre plasmatique libérerait l'apotransferrine de son récepteur. Ici, toujours à visée thérapeutique contre le gliome, nous utilisons la transferrine pour modifier la surface des nanoparticules de PLGA. L'objectif est de profiter ainsi de certaines de ses propriétés, telles que son long temps de résidence dans le sang et de la sur expression des Tf-R à la surface des cellules épithéliales cérébrales pour cibler activement ces cellules.

- **L'albumine sérique bovine (BSA):**

Connue depuis le début du XX^{ème} siècle, l'albumine est la protéine la plus abondante contenue dans le sang, elle représente plus de 50% de la totalité des protéines du sérum, soit entre 30 et 50 g par litre de sang chez un être humain. D'abord purifiée du sang en utilisant uniquement le sulfate de sodium (Howe 1921), l'albumine doit son surnom de « fraction V » à la méthodologie mise au point par Edwin Cohn pour l'isoler. Il s'agit d'utiliser différents pH, différentes concentrations de solvant, de sels et plusieurs températures pour sortir successivement toutes les fractions du plasma sanguin, jusqu'à la cinquième et dernière fraction contenant uniquement l'albumine. Par cette méthode, l'albumine humaine a pu être commercialisée pour un usage médical, puis ce fut le tour de l'albumine sérique bovine.

L'albumine sérique bovine est caractérisée par une masse molaire d'environ 66 kDa, une taille de 7 ± 2 nm et une charge de surface de -6 ± 2 mV. Cette protéine est composée uniquement de 583 acides aminés pour la forme bovine et de 585 pour la forme humaine,

constituant toujours une seule chaîne comportant trois domaines homologues. Après avoir longtemps été imaginée en structure linéaire, c'est la forme de cœur (Figure 9), depuis les études de cristallographies par rayons X (Carter and Ho 1994), qui prédomine pour toutes les albumines sériques. Cette conformation permet facilement à l'albumine de s'étendre et de reprendre sa structure native, expliquant sa grande résistance à la dénaturation en milieu acide ou à la chaleur.

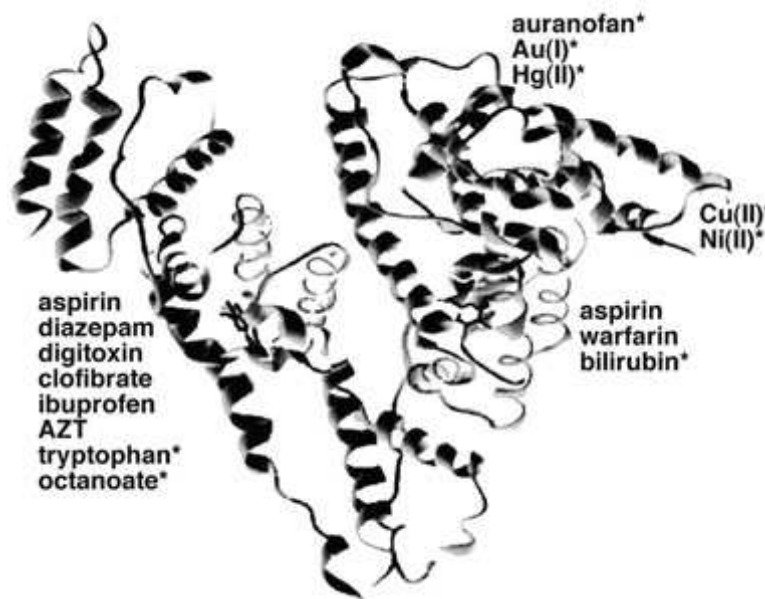


Figure 9. Représentation de l'albumine humaine et des différents composés s'y liant (Mitzner et al. 2006)

D'abord synthétisée sous forme de préalbumine dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, elle est ensuite clivée en proalbumine avant son transfert vers l'appareil de Golgi. De là une autre protéase va la cliver en albumine et elle sera transportée dans des vésicules de sécrétion avant d'être libérée dans la circulation sanguine. Peters *et al.* ont montré qu'il ne fallait que 20 minutes après le début de sa synthèse pour la retrouver dans le sang chez le rat (Peters et al. 1971). Cette synthèse doit être continue dans le foie afin de compenser l'élimination de l'albumine par les reins à un rythme compris entre 10 et 30 mg par jour et sa consommation par les muscles et le foie mais également par tous les tissus de

l'organisme. Cette protéine plasmatique a néanmoins une demi-vie plasmatique moyenne de 15 jours chez l'être humain (Peters Jr. 1977).

L'albumine est une protéine modèle qui sert pour des preuves de concepts ou pour des expériences de mise au point, mais également comme constituant principal de certaines nanoparticules (Lu et al. 2005) ou pour modifier des nanoparticules (Bickel et al. 2001, Tanaka and Mizojiri 1999). En effet, en plus de son long temps de circulation plasmatique, elle joue plusieurs rôles fondamentaux dans l'organisme, comme le maintien de la pression osmotique et du pH sanguin. Elle a aussi un rôle nutritif, puisqu'elle sert de réservoir en acides aminés pour les cellules qui l'hydrolysent. Elle sert également de transporteur grâce à plusieurs sites de liaison, pour de nombreuses molécules telles que des hormones, des acides gras libres etc. Elle peut également transporter de nombreuses drogues, pouvant servir ainsi à détoxifier le sang, comme illustré Figure 9 (Doumas and Peters 1997, Quinlan et al. 2005). L'albumine véhicule généralement ces composés jusqu'à des transporteurs membranaires appartenant à la superfamille des transporteurs d'anions organiques polypeptides (Oatps/OATPs). L'albumine et ces transporteurs permettent de faciliter l'acheminement de certaines molécules, comme la thyroxine (tétraiodothyronine) (Pizzagalli et al. 2002), dans des tissus comme le poumon, le cœur, les intestins, les reins, le placenta et les testicules (Tamai et al. 2000). Ils permettent également la clairance hépatique de nombreuses molécules, mais aussi le passage de ces molécules au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou des plexus choroïdes (Pardridge and Fierer 1990). En raison de toutes ces propriétés, l'albumine est fréquemment utilisée en médecine ou en laboratoire. En médecine l'albumine sérique humaine sert d'antidote par dialyse, grâce à ses affinités pour de nombreux sels métalliques tels que le chlorure de mercure (II), le sulfate de cuivre, le nitrate d'argent. Elle est aussi utilisée comme substitut de plasma en cas d'hypovolémie, ainsi qu'en imagerie

médicale moléculaire diagnostique (par exemple sous forme de macroagrégats radioactifs dans les scintigraphies pulmonaires de perfusion (de Torquat et al. 1976). En laboratoire l'albumine sérique bovine est la plus couramment employée en raison de sa stabilité, son absence d'effet de nombreuses réactions biochimiques, et son faible coût. Très utilisée pour des applications biochimiques, immuno-blot et immunohistochimie, elle sert également d'élément nutritif dans certains milieux de cultures cellulaires et microbiens.

Dans notre étude, nous utilisons l'albumine pour modifier nos formulations de nanoparticules en espérant qu'elles bénéficieront ainsi de son fort temps de résidence plasmatique et de sa totale biocompatibilité. Nous l'utilisons également comme modification control hydrophile et aspécifique en comparaison des modifications hydrophobes, comme l'insertion de phospholipide, ou des modifications visant à rendre plus spécifique la surface des nanoparticules comme lors de l'utilisation de transferrine.

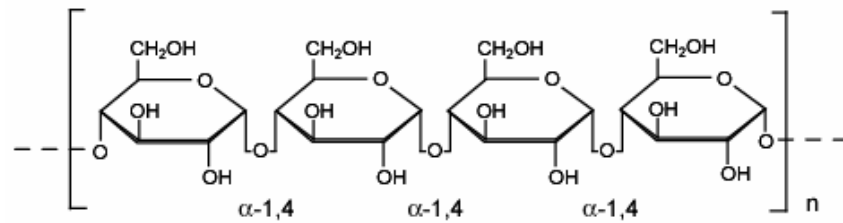
B. Les nanoparticules polysaccharidiques (NPS)

Le terme de nanoparticules polymériques désigne généralement les nanoparticules de polymères hydrophobes tels que les nanoparticules de PLGA, mais parmi ce type de nanoparticules il existe d'autres catégories, comme les dendrimères (système polymérique réticulé macroscopique), les nanoparticules faites de polymères hydrophiles (PEI, chitosan, alginate etc.) et les micelles polymériques faites de copolymères ayant une partie hydrophile et une autre hydrophobe. Les NPS, présentées dans la suite du texte peuvent être classées parmi les nanoparticules de polymères hydrosolubles également répertoriées sous le nom de nanoparticules d'hydrogel ou plus récemment de nanogels et sont formulées à partir de maltodextrines.

1. Les maltodextrines :

Les maltodextrines sont issues de l'hydrolyse de l'amidon qui est un polyside végétal constitué de plusieurs polymères linéaires de α D-glucose ne contenant que des liaisons α -1,4 (l'amylose), ou contenant en plus des liaisons de ramification α -1,6 tout les 24 ou 30 oses (l'amylopectine). Elles sont les résidus de son hydrolyse, comportant uniquement des polysides linéaires α D-glucose liés en α -1,4, mais ayant une hétérogénéité de longueur. Utilisé par toutes les cellules de l'organisme, l' α D-glucose est la principale source d'énergie des animaux. Il est stocké principalement dans les cellules hépatiques et les cellules musculaires. Le glucose y est entreposé sous une forme très proche de l'amylopectine : le

glycogène (une seule chaîne de polymère de α D-glucose lié en α -1,4 et ramifié en α -1,6 tout les 8 à 14 oses).



Maltodextrine

Figure 10. Représentation d'une chaîne de maltodextrine

Ce glycogène permet d'assurer une partie des besoins énergétiques des cellules en fournissant du glucose par sa dégradation (appelé glycolyse), mais la majorité des besoins est pourvue par utilisation de l' α D-glucose circulant dans le sang. Pour cela les cellules ont besoin d'internaliser de grandes quantités de glucose et utilisent les transporteurs de la famille GLUT. Les membres de la famille des protéines transmembranaires GLUT n'ont pas tous les mêmes capacités. Ils ont un taux d'expression et une localisation dépendant du besoin en glucose des tissus. Par exemple GLUT3 et GLUT1 sont surtout exprimés dans le cerveau, le placenta et les érythrocytes (Hutchinson et al. 2008) et c'est GLUT 1 qui assure le transport du glucose au travers des cellules de la BHE. Les transporteurs de la famille GLUT facilitent l'entrée du glucose et ont besoin d'un gradient suffisamment élevé de glucose pour assurer ce transport. Il faut que la concentration de glucose sanguin (la glycémie) soit maintenue à un niveau élevé, pour que celle de glucose extracellulaire reste elle-même élevée, mais il faut aussi que les cellules gardent un niveau bas de glucose. Pour maintenir ce niveau au plus bas, les cellules convertissent le glucose en glucose-6-phosphate. Cette réaction est irréversible puisque les cellules dégradant le glycogène ne peuvent aller jusqu'à la reformation d' α D-glucose libre. Elles arrêtent leur dégradation du glycogène au glucose-6-phosphate par manque de l'enzyme glucose-6-phosphatase (Seematter et al. 2009). Seuls les hépatocytes

sont capables d'exprimer cette enzyme, ce qui leur permet de réguler la glycémie en sécrétant du glucose issu du glycogène (Nordlie et al. 1999). Par conséquent la dégradation des maltodextrines dans l'organisme, à fortiori si elles sont sous forme de nanoparticules, ne devrait entraîner que la production de petit polyosides, allant jusqu'au glucose-6-phosphate dans la plupart des cellules. Il n'y a que dans l'appareil digestif (lors d'une administration par voie orale) ou dans le foie que leur dégradation pourrait conduire à libération d' α D-glucose s'il n'est pas stocké. C'est pourquoi la FDA et l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) ont autorisé leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire, mais également par les industries pharmaceutiques comme excipient selon les applications.

2. Les nanogels :

Les nanogels sont définis comme des réseaux polymériques réticulés et formant des particules d'hydrogel de taille nanométrique. Leur réticulation peut se faire chimiquement (liaisons covalentes, liaisons hydrogènes...) ou physiquement (interactions ioniques, hydrophobe) (Gratton et al. 2007, Rolland et al. 2005). Différentes méthodes existent pour les préparer (Kabanov and Vinogradov 2009) et peuvent être réparties en trois groupes, classés selon la complexité des unités servant à la préparation :

- **Les méthodes utilisant la polymérisation de monomères :** Ici les nanogels sont obtenues par polymérisation de plusieurs unités de monomères identiques ou non. La taille nanométrique est contrôlée par limitation du temps de polymérisation (Donini et al. 2002) ou bien par confinement spatial. Dans le cas du confinement, il s'agit par exemple d'initier la polymérisation dans un « environnement colloïdal », comme une nano ou micro émulsion « eau dans

huile » stabilisée par des tensioactifs (Sahiner et al. 2006). Le polymère va alors se former tout en étant contraint à se condenser et à prendre la forme de son réceptacle. Cette méthode permet de maîtriser la dégradation des nanogels par le choix des liaisons unissant les monomères, comme pour les nanogels pH sensibles qui s'hydrolysent à pH acide (Murthy et al. 2003).

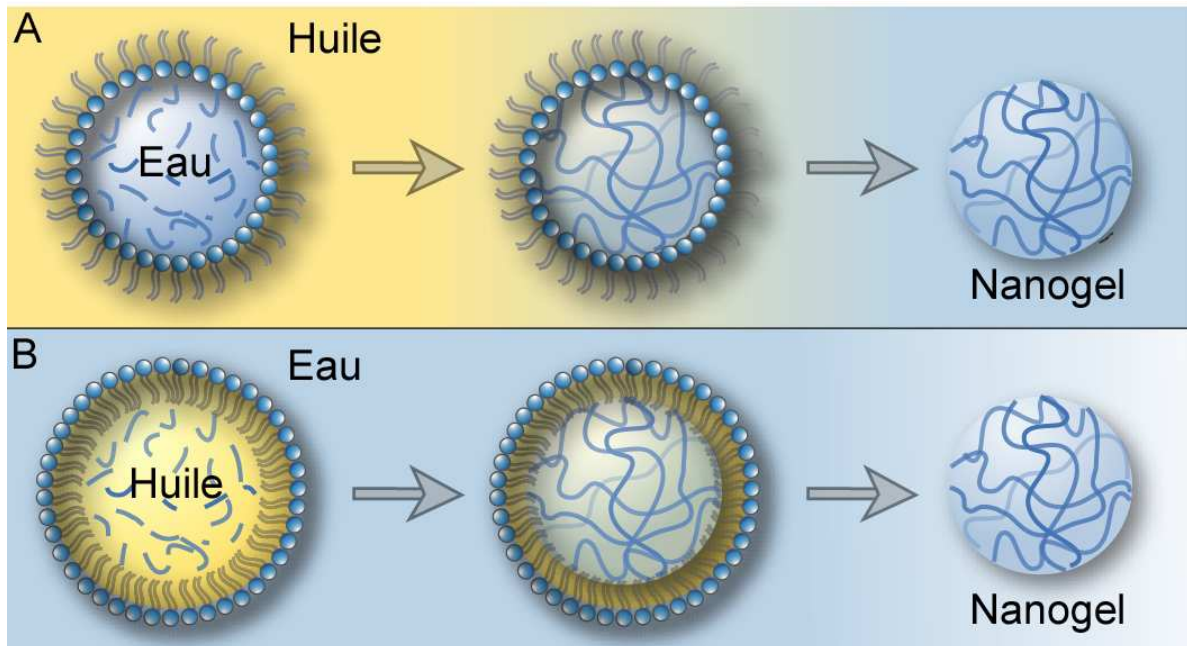


Figure 11. Illustration des méthodes utilisant la polymérisation de monomères.

- **Les méthodes utilisant des polymères déjà formés :** Ici les nanogels sont obtenues par réticulation de polymères préexistants. Cette réticulation peut se faire de deux façons :
 - **Soit par interactions physiques :** La cohésion entre les polymères est due à des liaisons faibles réversibles (liaisons d'hydrogènes, ioniques, interactions électrostatiques de type Van der Waals, hydrophobe, hydrophile). Les nanogels ainsi formés ne sont pas permanents, mais permettent une préparation

en conditions douces et aqueuses. Ceci est le cas des nanogels de protéines préparées par gélification des protéines de charge opposée induite par le changement de pH, comme l'ovalbumine et de lysozyme ou ovotransferrine (Yu et al. 2006).

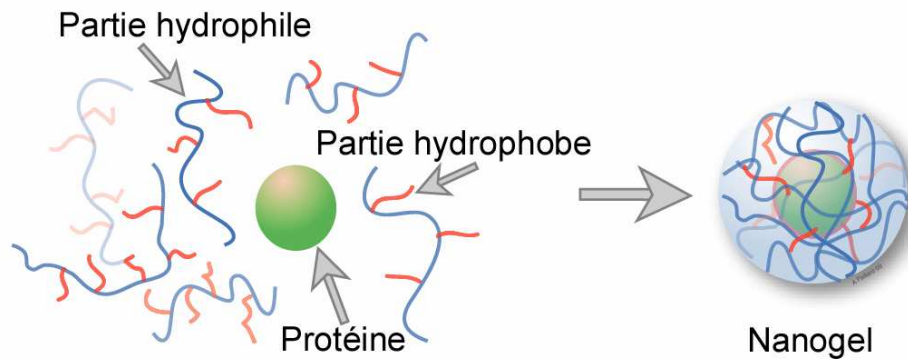


Figure 12. Illustration d'une méthode utilisant des polymères déjà formés et structurés par interactions physiques

- **Soit par liaison covalente** : La cohésion entre les polymères est due à des liaisons de fortes énergies créant des liens entre les chaînes de polymères. Par cette méthode il est possible de faire des nanogels comprenant plusieurs polymères différents comme un cationique (le polyéthylénimine (PEI)) et un neutre (le polyéthylène glycol (PEG)) (Vinogradov et al. 1999). Cependant ces nanogels sont plutôt hétérogènes et présentent de grandes tailles de pores (Hennink and Van Nostrum 2002, Kabanov and Vinogradov 2009).

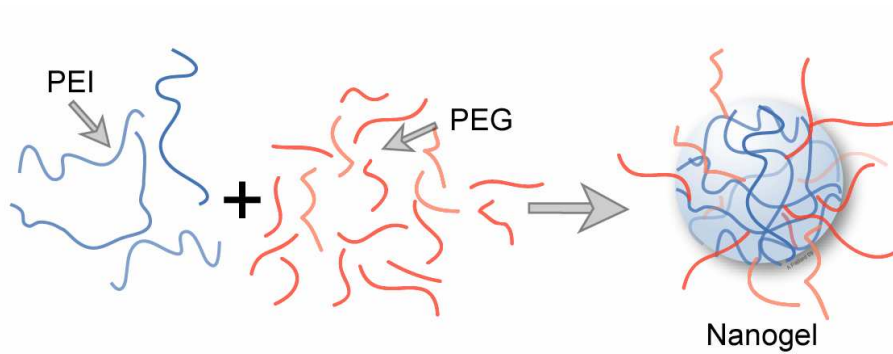


Figure 13. Illustration d'une méthode utilisant des polymères déjà formés et structurés par liaisons covalentes (Kabanov and Vinogradov 2009).

- **Les méthodes utilisant des hydrogels déjà formés :** Il s'agit ici de former des hydrogels homogènes et de grande taille, puis de leur faire subir divers traitements visant à en obtenir des particules de tailles nanométriques. C'est le cas de NPS, dont la préparation est détaillée dans la section B.4), mais également de nanogels décrites par Rolland et al. Leur méthode consiste à déposer un hydrogel préformé sur des moules et à y appliquer une certaine pression pour que l'hydrogel se découpe et se répartisse dans le moule. Cette technique permet de former des nanogels de tailles et de formes parfaitement homogènes et contrôlées (Gratton et al. 2007, Rolland et al. 2005).

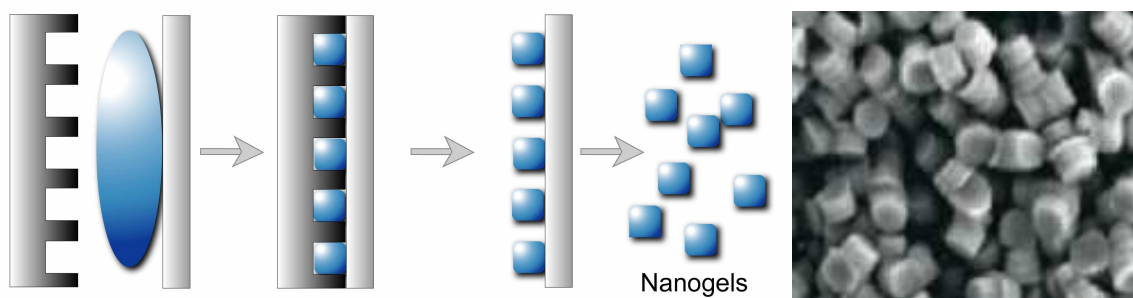


Figure 14. A : Illustration de la méthode utilisant des hydrogels déjà formés, puis façonnés pour faire des nanoparticules (ici la méthode appelé « PRINT ») ; B : image en microscopie électronique à balayage de nanoparticules d'un diamètre de 200nm formées par cette méthode (Gratton et al. 2008)

3. Les propriétés et les modifications des nanogels

Les nanogels résultant de ces préparations peuvent être composés de divers polymères synthétiques (comme les PEI, PEG etc.) (Vinogradov et al. 1999, Vinogradov et al. 2004) ou non synthétiques comme des polysaccharides (le chitosan, l'alginate, le pullulan Mannan, amilopectin et dextran) (Liu et al. 2008). Par la sélection du polymère, de sa polymérisation, de sa réticulation ou de sa préparation, il est alors possible de choisir les propriétés du nanogel selon les applications désirées, comme la libération du principe actif à une valeur de pH voulue (Hamidi et al. 2008). Cependant les nanogels gardent tous en commun d'être des particules flexibles et d'avoir une configuration tridimensionnelle leur permettant de s'imbiber de grandes quantités d'eau ou de liquide biologique. Malgré cette forte affinité pour l'eau, notamment grâce à des groupements hydrophiles (OH, CONH- etc.) (Kabanov and Vinogradov 2009), les nanogels résistent très bien à la déshydratation, comme lors d'une lyophilisation.

La maîtrise de l'hydratation des particules permet de contrôler leur gonflement, c'est-à-dire leur taille générale, mais aussi la taille des pores et des espaces internes vides. Le gonflement des nanogels est dépendant de leur structure (la composition du polymère, le degré de réticulation, la densité de charges, etc.), mais également de leur environnement (le pH, la force ionique, la température, les ondes lumineuses, etc.) (Hamidi et al. 2008). Par exemple Ricka et Tanaka ont montré que l'équilibre entre la pression osmotique et l'élasticité de polymère déterminait les dimensions physiques d'une particule hydrogel (Ricka and Tanaka 1984).

Le chargement des principes actifs dans les nanogels peut se faire selon deux méthodes :

- **Le principe actif est greffé sur les polymères du nanogels.** C'est le cas du cisplatine qui peut être greffé sur les nanogels de poly éthylène glycol /poly (acide méthacrylique) (PEG/PMA) (Bronich et al. 2006, Donini et al. 2002).

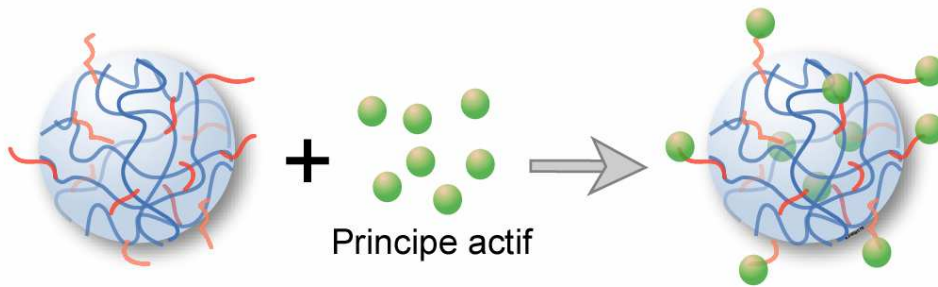


Figure 15. Illustration du greffage d'un principe actif sur un nanogel.

- **La deuxième méthode consiste à retenir physiquement ou à charger spontanément le principe actif à la surface ou dans le nanogel.** Soit en l'emprisonnant lors de la formation du nanogel ou lors d'un gonflement provoqué du nanogel, soit à cause d'interactions attractantes électrostatiques, de van der Waals ou hydrophobes entre les polymères et le principe actif. Le plus souvent, il s'agit d'une combinaison des deux.

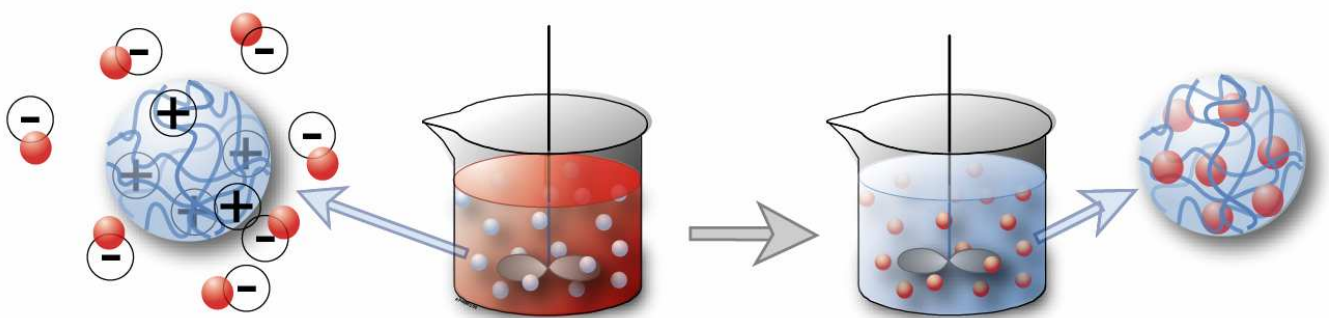


Figure 16. Illustration du chargement spontané d'un principe actif par interactions électrostatiques.

C'est le cas des oligonucléotides phosphorothioates encapsulés dans des nanogels de PEG/PEI. On a pu montrer que ces nanogels renforçaient le transport des oligonucléotides incorporés à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) *in vitro* et *in vivo* (Vinogradov et al. 2004). Il a également été démontré que cette traversée de la BHE par ces nanogels était accentuée par l'ajout en surface de la transferrine bovine ou d'insuline. Les principes actifs hydrophobes sont également encapsulés par ces méthodes, comme la prostaglandine E2. Le cœur des nanogels est rendu hydrophobe par la présence du cholestérol (Kato et al. 2007), ce qui attire la prostaglandine E2 et permet sa solubilisation au cœur du nanogel. L'insertion de phospholipide dans le cœur des nanogels permet également de charger des principes actifs hydrophobes (Loiseau et al. 2002), c'est notamment la méthode utilisée par les NPS.

Et c'est par la séparation de liaison covalente ou des contraintes physiques que le nanogel pourra libérer le principe. Cette libération est dépendante d'un changement de l'environnement des nanogels (changement de température, de pH, pression osmotique, etc.) ou induite par divers stimuli (ondes lumineuses, champs magnétiques etc.) (Kabanov and Vinogradov 2009).

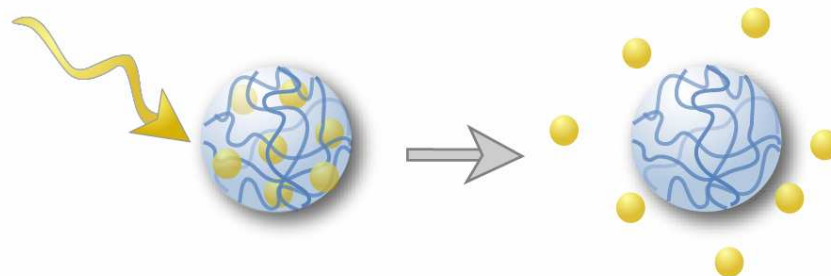


Figure 17. Illustration d'une libération d'un principe actif, hors d'un nanogel, déclenchée par une onde électromagnétique.

4. Préparation des NPS

Les NPS sont des nanogels composés d'un réseau polymérique de maltodextrines réticulées, leur conférant une structure présentant de larges pores (Santos et al. 1997). Elles sont préparées par une méthode utilisant des hydrogels de grande taille déjà formés, puis façonnés pour obtenir des hydrogels de tailles nanométriques.

La première étape de préparation de ces nanogels est donc la formation d'un hydrogel de grande taille (Castignolles et al. 1996, Prieur et al. 1996). Celui-ci va se former par réticulation chimique de maltodextrines, d'une masse molaire de 2500 Daltons. Cette réticulation se fait en condition réductrice par l'ajout de borohydrure de sodium (NaBH_4) et à pH basique par ajout d'hydroxyde de sodium. L'agent réticulant utilisé est l'épichlorhydrine (aussi appelé 1-chloro-2,3-époxypropane). Mis en large excès, il va permettre de lier deux chaînes de maltodextrine en formant une molécule de glycérol reliée au glucose par deux liaisons éthers (De Miguel et al. 1999). Pour obtenir des NPS de charge cationique (NPS^+), du glycidyltriméthylammonium chloride (GTMA) est ajouté à cette préparation, avec pour conséquence la fixation des groupements ammoniums quaternaires sur les maltodextrines par liaison covalente. L'obtention de NPS natives de charge neutres (NPS^0) et de NPS^+ permettra d'évaluer l'influence de la charge de surface sur le comportement biologique de ces nanovecteurs.

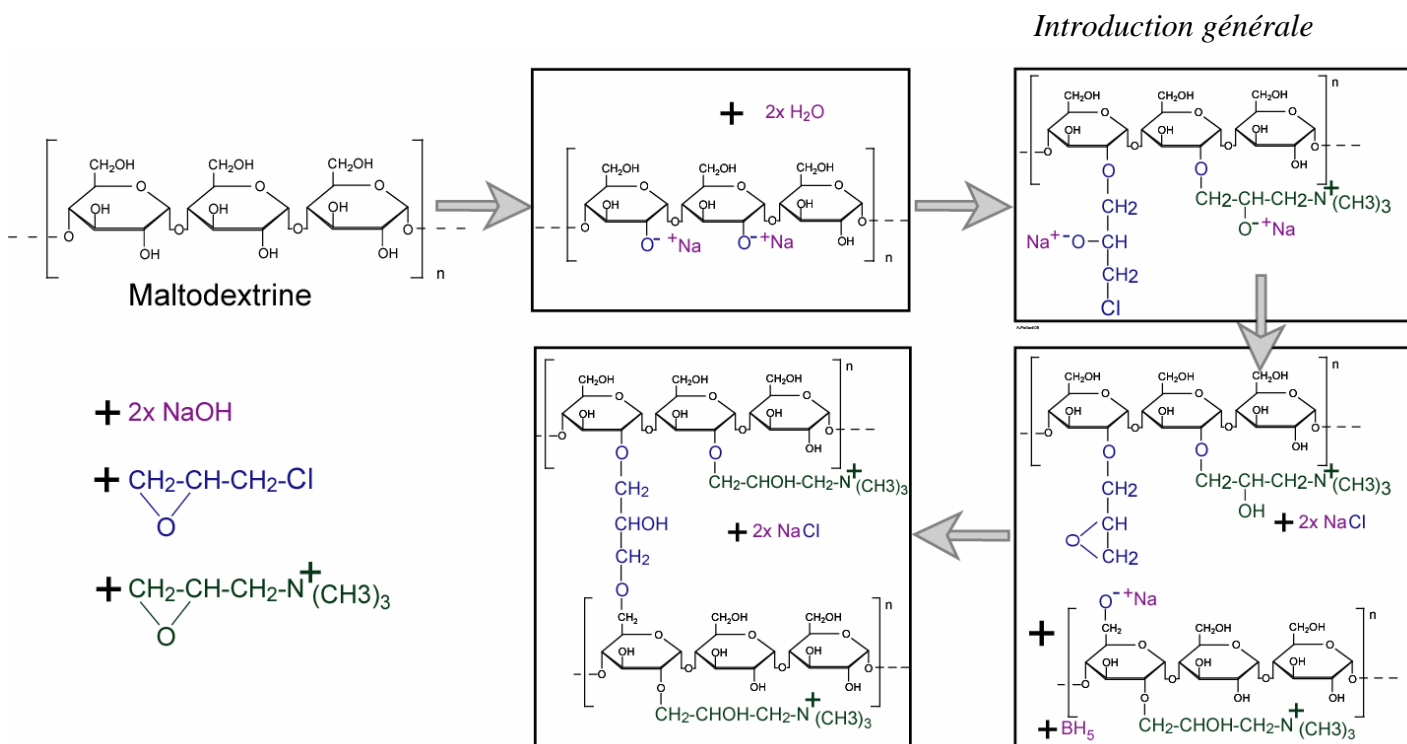


Figure 18. Schéma représentant la réaction de synthèse des NPS

Un hydrogel très dense est alors obtenu. Il est hydraté et acidifié par l'ajout d'eau et d'acide acétique pour arrêter la réticulation. Cet hydrogel est alors façonné pour former des particules de tailles nanométriques, à l'aide d'un homogénéisateur à haute pression. Cette étape permet d'obtenir une solution de nanogels homogènes et de taille contrôlée.

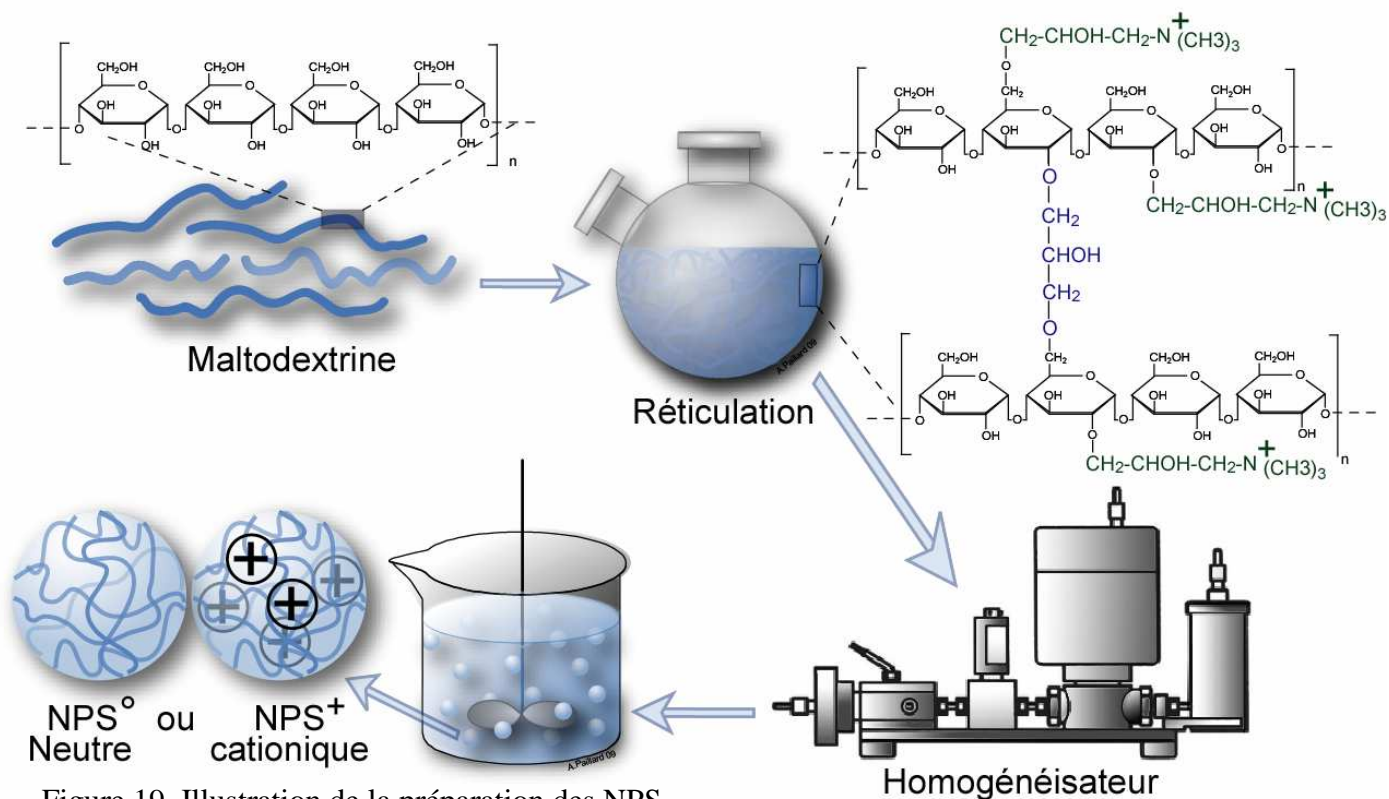


Figure 19. Illustration de la préparation des NPS

Ensuite cette solution est filtrée en circuit fermé sur un appareil d'ultrafiltration : les particules circulent sous pression à la surface d'une membrane permettant une filtration tangentielle. Les différents ions (Na^+ , Cl^- , etc.), l'excès d'épichlorhydrine réduite en glycérol, mais aussi les débris occasionnés lors de l'étape de façonnage sont tous éliminés par cette filtration. La solution ne contient alors plus que des nanogels de tailles homogènes dans une solution d'eau osmosée.

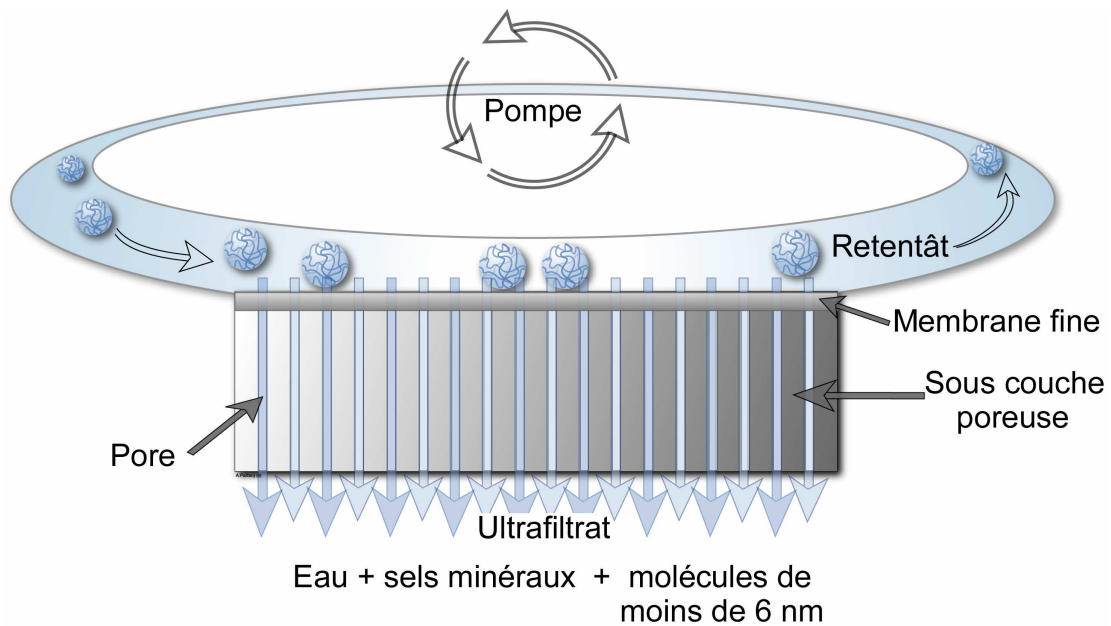


Figure 20. Illustration de la filtration tangentielle de la préparation de NPS

L'incorporation de BSA ou des 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG) dans les NPS^+ va permettre d'étudier l'influence du chargement interne de molécules hydrophiles ou hydrophobes sur le comportement biologique de ces nanovecteurs. Ces molécules anioniques sont chargées spontanément et retenues à l'intérieur des NPS^+ par interactions ioniques.

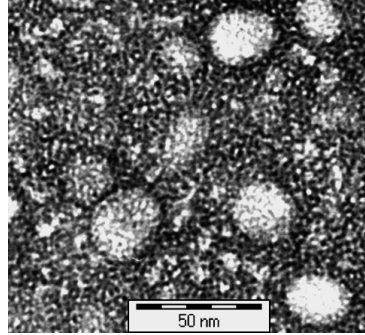


Figure 21. Image de microscopie électronique à transmission de NPS⁺, chargées avec 70% (massa/masse) de DPPG

Afin de suivre par fluorescence les NPS, de la fluorescein isothiocyanate (FITC) (ex : 490 nm, em : 522 nm) est greffée par liaison covalente sur des NPS déjà formées mises en conditions basiques. Du 1,1-dioctadecyl 3, 3, 3, 3-tetramethylindo-carboxycyanate perchlorate (DiI) (ex: 549nm; em: 565nm) est également incorporé avec le DPPG pour suivre de manière fluorescente cette incorporation (DG-NPS⁺). Les NPS utilisées, dans la suite du texte, sont toutes caractérisées par une taille homogène de 60 nm, non modifiée par l'incorporation de BSA ou de DPPG. Les NPS⁰ présentent un potentiel de surface de 0mV, alors que celui des NPS⁺ est de + 30mV, même pour les NPS⁺ ayant incorporées des DPPG. Cependant ce potentiel de surface est diminué lorsque de très fortes quantités de BSA sont chargées dans les NPS⁺, allant jusqu'à la neutralisation pour des DG-NPS⁺ chargées en BSA.

Les NPS⁺ ont permis de charger et de libérer des protéines ou des médicaments lipophiles insérés dans la base de phospholipides (Baudner et al. 2002, Debin et al. 2002, El mir et al. 2001, Loiseau et al. 2002). Enfin *in vivo* chez des souris par administration intranasale, elles ont augmenté l'activité antinociceptive de la morphine grâce au chargement de celle-ci (Betbeder et al. 2000). Parallèlement l'utilisation de ces nanovecteurs chargés d'ovalbumine a induit une tolérance pour cette protéine dans un modèle de souris où l'ovalbumine induit de l'asthme (Razafindratsita et al. 2007).

C. Les nanocapsules lipidiques (LNCs)

Les lipides forment un groupe hétérogène de composés ayant des structures très différentes qui sont réunis pour leurs propriétés de solubilités. Ils sont tous solubles dans les solvants organiques et insolubles ou très faiblement solubles dans l'eau. Ils sont fréquemment utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour véhiculer des principes actifs hydrophobes. C'est dans ce but que de nombreux nanovecteurs lipidiques ont été imaginés, comme les liposomes, mais aussi les LNCs.

1. Les différents excipients des LNCs :

Les LNCs sont des nanovecteurs lipidiques, constituées d'un cœur de triglycérides, entourés et stabilisés par deux tensioactifs, l'un non ionique plus hydrophile qu'hydrophobe, l'autre zwitterionique et plus lipophile qu'hydrophile. Tous les composants des LNCs ont été approuvés par la FDA et l'AFSSA pour une administration orale, topique et parentérale.

■ Le cœur de triglycérides :

Dans la formulation choisie pour les études présentées dans ce manuscrit, ce cœur lipidique est composé de triglycérides à chaînes moyennes (TCM) qui sont liquides pour des températures physiologiques et de stockages (hormis la congélation). Pour cela les trois acides gras, liés par liaison ester au glycérol, ont des longueurs de chaînes carbonées comprises entre

6 et 12 carbones. Dans notre cas, il s'agit des acides capryliques et capriques. L'acide caprylique est le nom commun de l'acide gras saturé possédant huit atomes de carbones ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COOH}$) d'où son nom issu de la nomenclature systématique d'acide octanoïque. Pour l'acide caprique, il s'agit également d'un nom commun, selon la nomenclature systématique il s'agit de l'acide décanoïque puisqu'il possède 10 atomes de carbone ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{-COOH}$).

Ces triglycérides sont naturellement retrouvés dans la noix de coco (d'où ils sont généralement extraits), l'huile de palme, mais également chez l'être humain dans le lait maternel. Ils sont d'ailleurs très bien assimilés par le corps humain, car ils ne nécessitent pas d'énergie pour leur absorption, leur utilisation ou leur stockage, contrairement aux triglycérides à longues chaînes. Lors de ces différentes étapes ces triglycérides, ainsi que d'autres lipides et des protéines (les apolipoprotéines), sont véhiculés dans l'organisme en étant les composants majeurs de particules endogènes de taille nanométrique (les lipoprotéines). Parmi ces particules, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ont même une structure et une taille très similaire aux LNCs : un cœur lipidique fait de triglycérides stabilisés par des phospholipides et une taille comprise entre 30 et 80 nm (Goldberg 1996). Après avoir été véhiculés, les triglycérides à chaînes moyennes sont utilisés ou principalement stockés comme tous les triglycérides, pour servir de réserve énergétique. Après hydrolyse, ils libèrent les acides gras qui sont ensuite dégradés par oxydation pour fournir de l'énergie dans les mitochondries. On comprend ainsi pourquoi ces lipides ont été approuvés par l' AFSSA et la FDA pour des utilisations dans le domaine pharmaceutique, notamment dans des émulsions parentérales ou des spécialités injectables.

■ **Le tensioactif non ionique très hydrophile :**

Afin de stabiliser le cœur de triglycérides à chaîne moyennes des LNCs, un mélange de dérivés du Poly (éthylène glycol) (PEG) est utilisé comme tensioactif. Les PEG sont également connus sous le nom de Macrogol, poly (oxyde d'éthylène) (PEO). Ce sont des polymères synthétiques constitués de molécules d'éthylènes glycols (HO-CH₂-CH₂-OH) reliées par des liaisons éther. Ces polyéthers (HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂-)_n-CH₂-OH) sont généralement synthétisés par polymérisation anionique aqueuse d'oxyde d'éthylène. Dans notre cas il s'agit d'un mélange de mono- ou di-esters de 12-hydroxy stéarate de poly (éthylène glycol) ayant une masse molaire de 660 kDa (HS-PEG). L'hydroxy stéarate est issu de l'acide gras saturé à 18 carbones : l'acide stéarique (= acide octadécanoïque). Il correspond à la partie lipophile de ce tensioactif qui va s'insérer dans le cœur lipidique des LNCs, alors que la partie hydrophile interagissant avec l'eau est faite de la partie PEG.

Les PEGs sont très stables, ils résistent aux hautes températures ainsi qu'aux acides et aux bases et sont très peu réduits *in vivo*. En effet la majorité des molécules de PEG (74%) est éliminée par l'organisme sans être modifiée. Les 26 % restant ne sont en général que peu raccourcis par certaines enzymes, comme le cytochrome P450 (Friman et al. 1993). Quand les PEGs font moins de 30 kDa, ils sont majoritairement éliminés par voie rénale et à partir de 20 kDa, ils commencent à être éliminés par le foie qui via la bile les envoie dans les selles (Harris and Chess 2003, Veronese and Pasut 2005, Yamaoka et al. 1994). Très bien éliminés et présentant une faible toxicité, les PEGs sont considérés par l'AFSSA et la FDA comme des produits sûrs (Harris and Chess 2003, Working et al. 1997). La FDA a d'ailleurs approuvé leurs utilisations pour des applications pharmaceutiques lors d'administrations par voie

intraveineuse, orale et cutanée chez l'homme, comme par exemple dans des liposomes contenant de la doxorubicine et des PEGs (Gabizon et al. 1994).

■ **Le tensioactif zwitterionique à ancrage plus lipophile :**

Dans la formulation des LNCs que nous avons étudiées, afin de stabiliser le cœur lipidique des LNCs, nous avons utilisé en plus un mélange de tensioactifs. En effet ce mélange de phospholipides extraits du soja, composé à 69% de phosphatidylcholines, a déjà démontré sa capacité à augmenter significativement la stabilité des LNCs (Vonarbourg et al. 2005, Working et al. 1997). Comme les triglycérides, les phospholipides ont une structure basée sur le glycérol. Pour les phospholipides, il n'y a que deux acides gras liés au glycérol et le troisième groupement alcool du glycérol est lié à un groupement phosphate, ce qui rend ces molécules amphiphiles. Dans le cas des phosphatidylcholines, le groupement phosphate est lui-même relié à une choline donnant son caractère de zwitterion aux phosphatidylcholines. Leur partie hydrophile est donc composée du groupement phosphate et choline, alors que la partie lipophile s'insérant dans le cœur lipidique des LNCs est faite des chaînes aliphatiques des acides gras (possédant entre 12 et 24 atomes de carbone) fixés au glycérol.

Constituant important de l'organisme, les phospholipides sont naturellement gérés par celui-ci. Ils peuvent provenir de l'alimentation ou d'une synthèse endogène. Comme les triglycérides, ils sont véhiculés dans le sang dans des lipoprotéines et peuvent servir à fournir de l'énergie par dégradation des acides gras après hydrolyse enzymatique. Cependant le rôle principal des phospholipides et surtout des phosphatidylcholines est d'entrer dans la composition des membranes cellulaires. Ainsi ces molécules sont généralement considérées comme pratiquement non toxiques pour l'homme et approuvées par l'AFSSA et la FDA pour

de multiples applications. Elles sont notamment approuvées dans le domaine pharmaceutique, où elles sont utilisées pour former des liposomes.

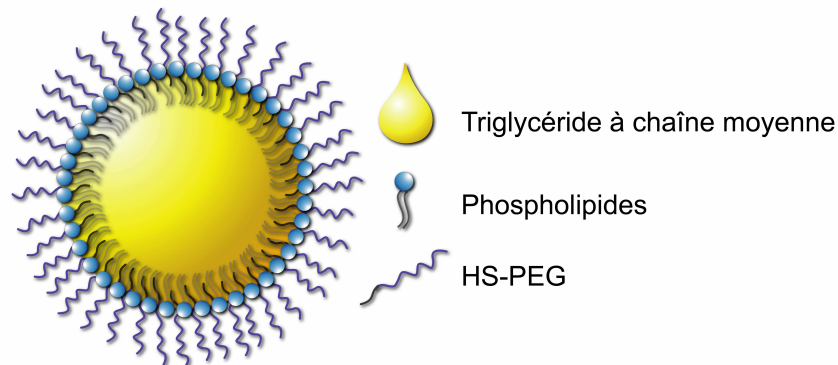


Figure 22. Illustration des différents excipients des LNCs

2. Les nanovecteurs lipidiques :

Les nanovecteurs lipidiques sont hétérogènes, cependant il est possible de les classer selon leurs structures dans deux grandes familles de nanovecteurs : ceux fait uniquement de tensioactifs (lipidiques ou polymériques) et ceux ayant un cœur de lipides hydrophobes.

- **Les nanovecteurs faits uniquement de tensioactifs :** Leur formulation est basée sur une association spontanée de tensioactifs qu'ils soient lipidiques (ex : phospholipides) ou polymériques (ex : copolymère de PEG et de PLA) dans l'eau. Ces arrangements peuvent s'effectuer selon deux dispositions :

- **Arrangement sous forme micellaire :**

Il s'agit d'un agrégat de forme sphérique pouvant faire de 1 à 100nm (Soussan et al. 2009). La partie hydrophile des tensioactifs est dirigée vers l'eau et la partie hydrophobe vers l'intérieur

formant le cœur de la particule. La formation des micelles ne se fait qu'au-dessus de la concentration micellaire critique. C'est la concentration seuil en dessous de laquelle il n'y a pas d'autoassemblage des tensioactifs sous forme de micelles. Les principes actifs transportés par des micelles peuvent être greffés sur la partie hydrophile ou solubilisés dans la partie hydrophobe, selon leur affinité. Composés historiquement de phospholipides, plus récemment de nombreuses autres molécules amphiphiles ont été testées pour former des micelles. C'est le cas de nouveaux copolymères étant par exemple pH sensibles.

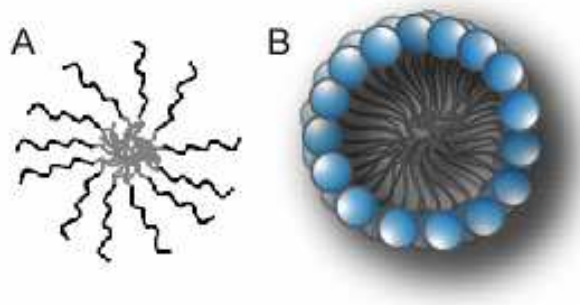


Figure 23. Illustration d'une micelle polymérique en A (Van Butsele et al. 2007) et en B d'une micelle de phospholipides

- **Arrangement en bicouche :**

Leurs formulations sont basées sur un arrangement stable de tensioactifs sous forme de bicouche. Il y a donc formation de vésicules pouvant contenir d'autres vésicules faites aussi d'une bicouche de tensioactifs, mais surtout créant un compartiment interne aqueux. Elles ont une taille variable comprise entre 10 et 1000 nm. Les interphases internes et externes de la bicouche de tensioactif sont faites des parties hydrophiles, alors que les parties hydrophobes des tensioactifs forment la partie centrale de la bicouche. Par ce compartiment aqueux ces nano objets peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes au centre de la bicouche, d'autres hydrophiles dans le compartiment aqueux ou par greffage. Comme pour les micelles, les premiers composants étudiés pour la formation de ces vésicules furent les phospholipides.

Cependant de nombreux autres composés amphiphiles sont maintenant testés pour faire ces structures vésiculaires. Ces vésicules sont alors nommées selon les composés utilisés pour leurs fabrications. Ainsi les liposomes sont faits de phospholipides (Chrai et al. 2001), les polymersomes de copolymères amphiphiles (Rameez et al. 2008), les niosomes de tensioactifs lipidiques non ioniques (Uchegbu et al. 1998) etc. Après leurs synthèses ces vésicules peuvent être modifiées, notamment par insertion de PEG à leur surface, leur permettant de rester beaucoup plus longtemps dans le sang (Allen et al. 1991).

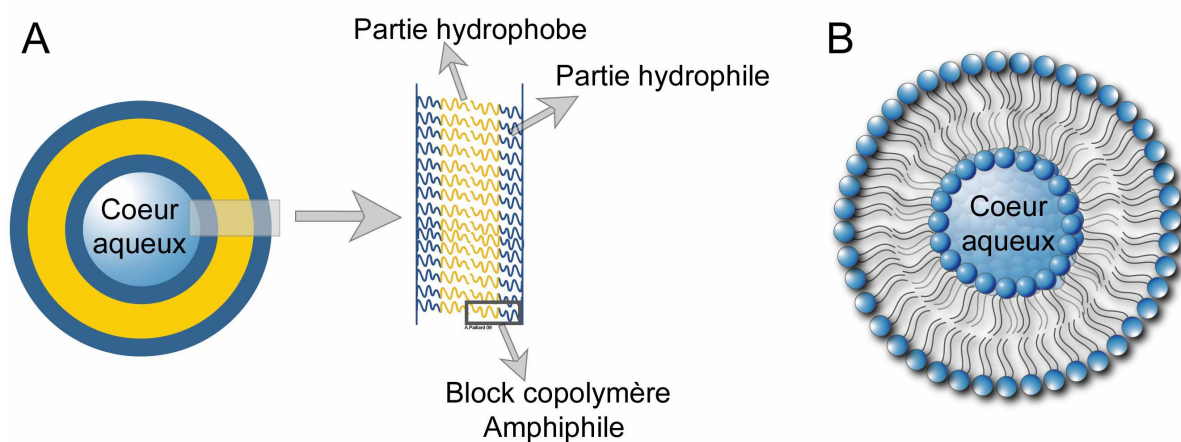


Figure 24. Illustration d'un polymersome unilamellaire en A et d'un liposome unilamellaire en B

- **Les nanovecteurs ayant un cœur de lipides hydrophobes** : Ils permettent de solubiliser des principes actifs hydrophobes en plus grande quantité que dans les nanovecteurs faits uniquement de tensioactifs, grâce à leur cœur hydrophobe. Cependant ces lipides, en général des glycérides (esters d'acides gras et de glycérol), ne sont pas miscibles dans l'eau. En conséquence quand ils sont mélangés avec l'eau pour être administrés, ils forment une dispersion de fines gouttelettes de lipides dans l'eau. Ces émulsions peuvent former des objets de tailles diverses, même nanométriques. Il existe plusieurs méthodes pour les préparer, comme en utilisant un homogénéisateur ou par la méthode d'inversion de phase. Cependant ces gouttelettes de lipides tendent à fusionner entre elles ; c'est le

phénomène de coalescence, pour diminuer la tension interfaciale entre l'eau et les lipides. Afin d'empêcher ce phénomène, il existe plusieurs moyens pour stabiliser ces émulsions, comme :

- **Stabilisation principalement selon cristallisation du cœur lipidique :**

C'est le cas des nanoparticules lipidiques solides (SLN). Ici la stabilisation des gouttelettes de lipides hydrophobes est principalement fondée sur le choix des lipides hydrophobes qui seront à l'état solide pour des températures physiologiques et de stockages (Muller et al. 2002a, Muller et al. 2002b, Saupe et al. 2006). En général faites de glycérides à chaînes longues, ces gouttelettes peuvent être également stabilisées par l'emploi de tensioactifs qui vont diminuer la tension interfaciale entre l'eau et les lipides hydrophobes dans l'attente de leurs solidifications (Soussan et al. 2009). Elles forment donc des nano objets très stables, de tailles comprises entre 50 et 1000 nm et dont le cœur est constitué de lipides cristallisés ou partiellement cristallisés. En effet lors de la formulation, la cristallisation des lipides peut s'effectuer en différentes structures cristallines plus ou moins stables, selon le polymorphisme cristallin des lipides. Dans le cas des glycérides, ils peuvent s'arranger principalement en structure dites α , β et β' (Sato and Garti 1988). En général le cœur lipidique cristallise sous forme α , qui est peu stable, mais qui évoluera lors du stockage vers la forme stable β , en passant par β' . C'est cette cristallisation qui est la plus grande limite de ces nano objets puisqu'elle restreint fortement la capacité de chargement de drogue. De plus l'évolution de la cristallisation entraîne une perte de la sphéricité initiale de la particule et l'expulsion des principes actifs hors du réseau cristallin stabilisé (Freitas and Muller 1999a, Freitas and Muller 1999b).

- **Stabilisation grâce à une coque polymérique :**

Il s'agit notamment de la méthode employée pour formuler les nanocapsules polymériques (NCP). Les gouttelettes de lipides hydrophobes sont stabilisées cette fois par contraintes physiques, grâce à une coque imperméable de polymère formée autour d'elles. Cette fine couche de polymère est obtenue par la technique de dépôt interfacial, soit d'homopolymères hydrophobes (ex : PLA ou PLGA) (Mosqueira et al. 1999) ou copolymère amphiphile (partie hydrophobe face lipidique et partie hydrophile interagissant avec l'eau) (Pereira et al. 2008). Les polymères préformés ou les monomères sont solubilisés dans l'eau à l'aide d'un solvant organique (ex : l'acétone). Après formation des gouttelettes, ils se déposent à l'interface lipide/ eau par polymérisation ou évaporation de solvant. Ces nanocapsules sont stables mais présentent plusieurs défauts, notamment la difficulté d'élimination des produits secondaires résultant de leur synthèse et la toxicité qui en résulte (Soussan et al. 2009).

- **Stabilisation uniquement avec l'aide de tensioactifs :**

Les tensioactifs permettent de diminuer la tension interfaciale entre l'eau et les lipides hydrophobes, ce qui peut stabiliser l'émulsion. Dès lors c'est principalement la concentration en tensioactif qui déterminera la stabilité de l'émulsion (Anton et al. 2008, Huynh et al. 2009). Ainsi avec une concentration adéquate de tensioactif, comme dans le cas des LNCs, les gouttelettes lipidiques formeront des émulsions de tailles nanométriques stables. Pour les LNCs, cette stabilisation est renforcée par l'usage de deux types de tensioactifs, formant une coque de tensioactifs autour d'un cœur de triglycéride (Heurtault et al. 2002). En plus du rôle d'abaissement de la tension interfaciale, le tensioactif non ionique (HS-PEG), en raison de sa longue partie PEG très hydratée et flexible, va créer une barrière répulsive à la surface des

LNCs, alors que le surfactant ionique (principalement de la phosphatidylcholine) va renforcer l'ancrage hydrophobe de cette coque de tensioactif.

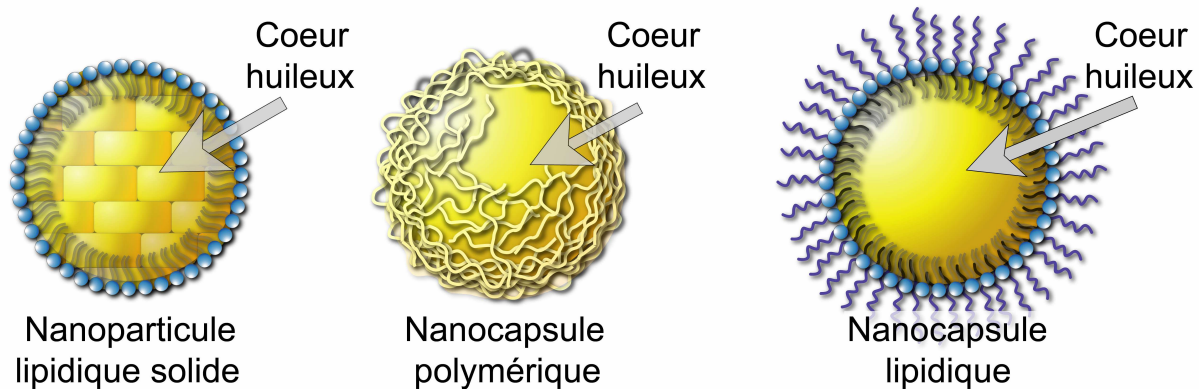


Figure 25. Illustration des différents types de nanovecteurs ayant un cœur de lipides hydrophobes.

3. La préparation des LNCs :

Comme nous venons de le voir précédemment les LNCs peuvent être classées comme étant des nanovecteurs lipidiques faits d'un cœur de lipide hydrophobe et stabilisés uniquement à l'aide de tensioactifs. Elles sont préparées selon un processus d'inversion de phase (Heurtault et al. 2002) entre une émulsion huile dans eau (H/E) et une émulsion eau dans huile (E/H) selon l'augmentation et une diminution de la température du milieu réactionnel (Figure 26.A). Le changement de phase peut être suivi en conductimétrie ce qui permet de connaître la température où il faut ajouter l'eau froide. Ainsi le refroidissement rapide du système de micro émulsion de type Winsor IV conduit à la formation de nanocapsules lipidiques (Anton et al. 2008, Huynh et al. 2009).

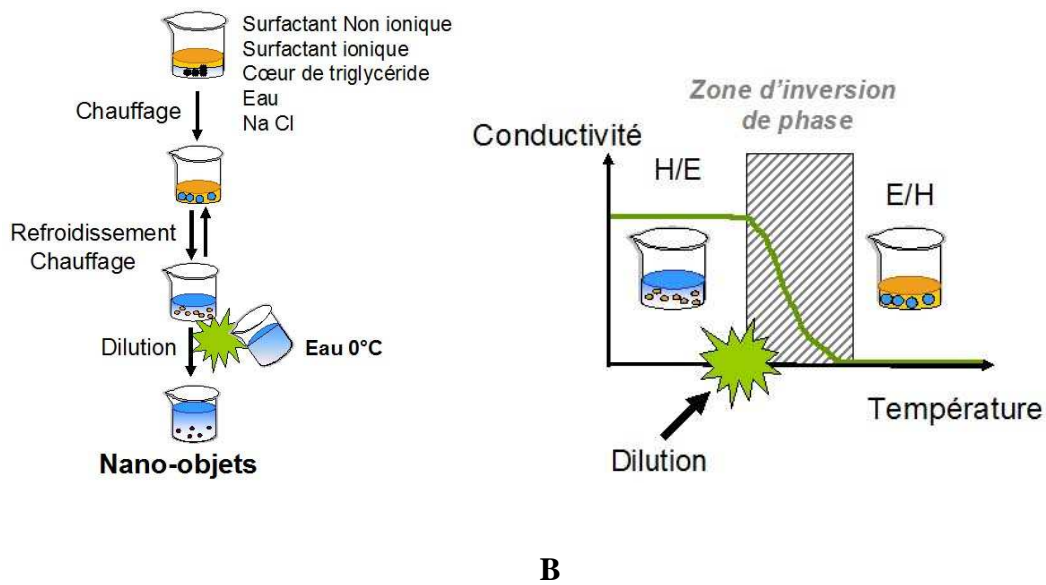


Figure 26. Illustration du mode de préparation des LNCs en A et mesure de la conductivité de la préparation en fonction de la température en B

La préparation des LNCs a notamment pour avantage de ne pas faire intervenir de solvant organique. Ceci, avec la biocompatibilité de tous ses excipients, permet aux LNCs d'être des particules totalement biocompatibles. Leur processus de formulation leur garantit une stabilité supérieure à 18 mois, lors d'un stockage à 4°C, et leur permet même d'être lyophilisées si un cryoprotecteur, tel que le mannitol, est rajouté. Ce processus leur permet également d'avoir une distribution extrêmement monodispersée, en général, choisie autour d'une taille de 50 nm et d'un potentiel de surface de -3 mV. De plus grâce à leur cœur lipidique hydrophobe liquide et leur coque de tensioactifs, elles peuvent encapsuler des principes actifs variés. Par exemple dans le cœur hydrophobe : des médicaments anticancéreux eux même très hydrophobes tels que l'étoposide, le docétaxel et le paclitaxel (Lacoeuille et al. 2007), des molécules radiopharmaceutique actives (Allard et al. 2008). Elles ont également montré une grande plasticité leur permettant notamment d'encapsuler des complexes lipophiles d'acides nucléiques (Vonarbourg et al. 2009). Il est aussi possible de modifier leurs surfaces en utilisant des dérivés de PEGs plus long pour une administration orale (véhiculant du β -carotène) (Gonnet 2010) ou après leur formulation, par post-insertion

pour améliorer leur temps de résidence plasmatique (Beduneau et al. 2006). Des ligands spécifiques, notamment du récepteur de la transferrine (ex : OX26), peuvent être greffés sur des dérivés de PEGs rajoutés de cette manière (Beduneau et al. 2007).

Ainsi la composition des LNCs peut être adaptée selon les besoins, notamment en modifiant la proportion des différents excipients, la taille des LNCs peut être ajustée à 20, 50 ou 100nm tout en restant monodispersée. C'est d'ailleurs à cause de cette capacité que nous avons utilisé les LNCs pour comprendre l'influence de la taille d'un nano objet sur les interactions pouvant exister avec divers milieux biologiques. Pour cela du Rouge Nile (NR) (ex : 515 nm, em : 580 nm) est incorporé dans le cœur des LNCs, afin de les suivre par fluorescence, tout comme du BodiPY PC (ex : 500 nm, em : 510 nm) et des complexes de technétium (Ballot 2006).

La pathologie cancer : Le glioblastome

Dans l'organisme, il n'est pas rare que des cellules endurent de nombreux événements (rayons UV, stress oxydatif, etc.) occasionnant une ou plusieurs altérations de leurs fonctions principales. Cependant quand ces cellules ne parviennent pas à réparer les dégâts, ceux-ci entraînent la mort programmée de la cellule (l'apoptose) afin de maintenir l'intégrité de l'organisme. Toutefois dans de rares cas, certaines altérations entraînent une inactivation du processus d'apoptose, cette propriété ainsi que d'autres, illustrées à la Figure 27, entraînant une prolifération incontrôlée et anarchique de ces cellules dans un tissu sain de l'organisme. En se multipliant indéfiniment, ces cellules forment alors une masse tumorale altérant le bon fonctionnement de l'organe. Cette pathologie est désignée sous le terme de cancer. Dans certaines circonstances, cette masse peut se disséminer dans le corps pour créer de nouvelles masses tumorales (appelées alors métastases) jusque dans des organes très éloignés du site originel. Si le processus n'est pas enrayé, les perturbations seront si importantes qu'elles entraîneront un arrêt des fonctions vitales. Malgré les progrès faits dans le domaine du dépistage et des traitements, la pathologie cancéreuse reste encore très meurtrière, c'est pourquoi des nouveaux traitements prometteurs, dont les nanotechnologies, sont en développement.



Figure 27. Illustration des différentes capacités fonctionnelles acquises par les cellules tumorales (modifié à partir de (Hanahan and Weinberg 2000))

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les cancers les plus fréquents sont ceux des poumons, des seins et le cancer colorectal, alors que les tumeurs cérébrales représentent moins de 2% des cancers. Cependant ces cancers sont parmi les plus dramatiques, en raison des fonctions et de la fragilité de ce tissu, ainsi que de la résistance de ces cancers aux différentes thérapies. Très hétérogène ce groupe de cancer est classé par l'OMS en fonction du type cellulaire dont dérivent les cellules composant la tumeur. Ce groupe comprend des tumeurs issues de cellules cérébrales telles que des neurinomes (se développant à partir d'une cellule de Schwann), des gliomes (issues des cellules de la glie), des méningiomes (ayant pour origine des cellules des couches méningées) (Vescovi et al. 2006). Cependant il comprend aussi des tumeurs secondaires (métastases), donc provenant de tumeurs localisées dans d'autres tissus. Nous avons orienté nos différentes études sur la thérapie du glioblastome qui est une forme particulière de gliome, encore sans traitement curatif.

■ **Les gliomes :**

Ce sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. En plus du type cellulaire à l'origine de la tumeur (ici astrocytes ou oligodendrocytes), ces tumeurs sont classées selon la gravité et la tendance évolutive de la tumeur (classé en Grade de I à IV) (Behin et al. 2003, Legler et al. 1999). Pour cela un examen histologique est pratiqué. Il définit d'abord le type histologique (astrocytaire, oligodendrogliome ou mixte) des cellules, puis prend en compte le degré de différenciation, la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique, la nécrose et la prolifération vasculaire pour déterminer le grade. L'OMS distingue alors trois catégories (Louis et al. 2007) :

- Les gliomes dérivés d'oligodendrocytes (les oligodendrogliomes) qui peuvent être de grade II et III.
- Les gliomes mixtes dérivés d'oligodendrocytes et d'astrocytes (les oligoastrocytomes) qui peuvent être également de grade II et III.
- Les gliomes dérivés uniquement d'astrocytes (les astrocytomes) : ils peuvent être de tous les grades (I à IV). A part le grade I qui est bénin, les autres sont diffus et s'infiltrent dans le cerveau, la forme la plus sévère (le grade IV) étant appelée également glioblastome. L'OMS estime sa survenue à cinq nouveaux cas pour 100 000 habitants chaque année (Behin et al. 2003, Legler et al. 1999).

Grade	Pronostic de survie
<i>Astrocytomes</i>	
• Grade I (Astrocytomes pilocytiques)	Curable par la chirurgie
• Grade II (astrocytomes diffus)	10-15 ans
• Grade III (Astrocytomes anaplasiques)	2-3 ans
• Grade IV (Glioblastomes)	< 1 an
<i>Oligodendrogliomes</i>	
• Grade II	10-15 ans
• Grade III	5-10 ans
<i>Gliomes mixtes</i>	
• Grade II (oligoastrocytomes mixtes)	10-15 ans
• Grade III (oligoastrocytomes anaplastiques)	3-5 ans

Figure 28. Tableau résumant les différentes formes de gliomes, établi à partir de (Louis et al. 2007)

■ Les différentes thérapies :

Les recherches dans le domaine des techniques de diagnostic et de traitement ont beaucoup progressé au cours des vingt dernières années. Cependant la thérapie reste toujours classique, impliquant une résection chirurgicale, lorsqu'elle est possible, associée à une radiothérapie et/ou une chimiothérapie adjuvante (Stupp et al. 2005).

- **L'exérèse chirurgicale :** Il s'agit de retirer, lorsque c'est possible, le maximum de tissu tumoral. Cependant en raison de son caractère diffus et infiltrant, il est encore impossible de retirer la totalité des cellules tumorales, provoquant dans 100 % des cas, une récurrence, générale localisée à la limite de l'exérèse. L'acte chirurgical reste néanmoins très utile pour trois raisons (Mitchell et al. 2005). D'abord il permet d'obtenir des prélèvements pour bien déterminer le type histologique de la tumeur indispensable pour prévoir l'évolution de la maladie et la suite du traitement. Ensuite il diminue le nombre de cellules tumorales, notamment celles en hypoxies qui semblent moins sensibles aux radiations et à la

chimiothérapie. Enfin il améliore l'état clinique des patients en réduisant les symptômes liés à la masse tumorale compressive (hémiparalysie, troubles du langage et/ou de la vision, attaques cérébrales, augmentation de la pression intracrânienne . . .) permettant ainsi d'améliorer la qualité de vie.

- **La radiothérapie :** L'objectif est de soumettre le patient à un rayonnement ionisant pour entraîner la mort des cellules tumorales. Ce rayonnement est dirigé sur un volume précis contenant le plus de tissu tumoral possible et le moins de tissus sains. La mort cellulaire est liée à la gravité des dommages faits notamment sur l'ADN (Acide Désoxyribonucléique). Ces dommages étant proportionnels à l'énergie du rayonnement et à son temps d'exposition. La source de ces radiations peut être située à l'extérieur (radiothérapie externe classique) ou à l'intérieur de l'organisme (radiothérapie métabolique ou radiothérapie après injection d'un radiopharmaceutique *in situ*, en recherche actuellement).
- **La chimiothérapie :** Des molécules chimiques sont utilisées pour leurs cytotoxicités ou leurs propriétés de sensibilisation à la radiothérapie. Le choix de ces molécules est dépendant de l'analyse histologique et cytologique de la tumeur, puisque la réponse au traitement est très variable selon le type tumoral. Cette stratégie thérapeutique est principalement limitée, dans le cadre de la thérapie des tumeurs cérébrales, par la présence d'une barrière biologique séparant le milieu sanguin du parenchyme cérébral : la barrière hémato-encéphalique (BHE).

- **Les études en cours de réalisations :** Beaucoup de nouvelles stratégies antitumorales sont à l'étude, également applicables au glioblastome. C'est le cas de l'immunothérapie qui cherche à stimuler les moyens de défense immunitaire de l'organisme contre les cellules (Moingeon 2001); de la thérapie génique qui consiste à faire exprimer du matériel génétique favorisant la mort de la cellule (Ram et al. 1997); de la thérapie anti-angiogénique cherchant à réduire la création des vaisseaux sanguins desservant la tumeur (Kerbel and Kamen 2004).

En dépit de tous ces traitements, le glioblastome reste pour le moment incurable puisque ni la chimiothérapie, ni la radiothérapie n'arrivent à empêcher la réapparition, après chirurgie, de tumeurs. En dépit des nouvelles thérapies mises en place, ce cancer entraîne toujours une mort extrêmement rapide, avec une médiane de survie des patients atteints de glioblastome ne dépassant pas 1 an après le diagnostic (Louis et al. 2007).

■ **Les raisons de ces échecs :**

A l'heure actuelle, l'origine de la survenue des glioblastomes reste encore inconnue, même si plusieurs études tendent à pointer des facteurs liés aux risques professionnels, ainsi qu'à l'impact de l'environnement et du mode vie. En revanche l'identification des raisons de l'incurabilité de ce cancer est plus avancée, quatre raisons majeures étant proposées :

- **L'imprécision de la cible :** En effet le glioblastome forme des tumeurs extrêmement infiltrantes, pouvant avoir des cellules jusqu'à plusieurs centimètres de la masse tumorale. Par conséquent l'exérèse peut difficilement tout retirer.

- **La sensibilité du tissu environnant :** C'est notamment le cas de la radiothérapie externe qui est limitée à un volume élargi de la masse tumorale. En effet elle ne peut être faite sur la totalité du cerveau pour éradiquer les cellules tumorales infiltrantes, puisque les cellules saines y sont également sensibles.
- **La chimio- et radio- résistance des cellules tumorales :** Le glioblastome est constitué de cellules hétérogènes. Certaines des cellules de la tumeur présentent d'énormes capacités de réparation des lésions causées par des substances chimiques ou des rayonnements ionisants. Il semble que les cellules les plus résistantes soient celles situées dans des zones d'infiltration ou en hypoxie. Des travaux récents estiment d'ailleurs en avoir identifiées à l'aide d'un marqueur spécifique, les cellules souches (CD133) (Bao et al. 2006). Les cellules ayant le marqueur CD133 seraient beaucoup plus résistantes à la radiothérapie et auraient une plus forte capacité à recréer une masse tumorale même à de très faibles concentrations.
- **L'inaccessibilité du système nerveux central :** En effet, les cellules de glioblastomes bénéficient de l'isolement du système nerveux central. Habituellement cet isolement sert à protéger le parenchyme cérébral, notamment par la BHE, mais ici la trop forte sélectivité de la BHE empêche l'accès à presque 99 % des molécules thérapeutiques (Pardridge 2003). De plus le contournement de la voie sanguine est peu efficace, puisque les injections intracérébrales classiques ne permettent une diffusion dans le parenchyme que de quelques millimètres (Vinchon-Petit et al. 2009).

C'est dans ce contexte difficile que s'inscrit ce travail de thèse puisque toutes les études détaillées dans la suite du texte ont été réalisées dans l'optique d'améliorer le traitement du glioblastome. Comme nous venons de le voir le défi d'une future thérapie efficace contre le glioblastome est de traiter uniquement les cellules tumorales en ciblant de préférence les plus résistantes, les plus difficiles d'accès, mais aussi celles dont la localisation n'est pas encore connue. De nouvelles molécules sont à l'étude pour répondre à tous ces besoins, cependant les besoins étant essentiellement liés à un problème d'administration au patient, l'utilisation de vecteurs nanoparticulaires semblent particulièrement adaptée ici. Pour répondre à tous ces besoins les nanovecteurs vont donc devoir interagir avec de nombreux systèmes biologiques et franchir chacune des barrières biologiques posées par ces systèmes, avant d'être utilisés en clinique. Profitant de l'expertise de notre laboratoire dans le domaine de la vectorisation particulaire et aussi dans la thérapie du glioblastome, nous avons focalisé donc nos études sur le franchissement des barrières biologiques rencontrées par les nanovecteurs dans le cadre de la thérapie du glioblastome.

Le franchissement de barrières biologiques

Dans le contexte d'un traitement du glioblastome, un principe actif aura généralement une action dirigée contre les capacités acquises des cellules tumorales (Figure 27) ou leurs conséquences ; ainsi les principes actifs agissant afin de supprimer la résistance à la mort de ces cellules. Cependant avant de pouvoir agir sur son site d'action moléculaire, un principe actif va devoir franchir plusieurs barrières biologiques. Les nanotechnologies se proposent de répondre à ces difficultés, notamment pour traiter sélectivement les cellules tumorales en ciblant de préférence les plus résistantes, les plus difficiles d'accès, mais aussi celles encore non localisées. En nous focalisant sur certaines de ces barrières biologiques, nous détaillerons dans un premier temps les barrières biologiques restreignant l'accès aux cellules tumorales. Ensuite, nous aborderons les obstacles limitant l'accès au site d'action moléculaire. Ces obstacles comprennent les barrières biologiques érigées par la cellule, ainsi que les conséquences liées à l'utilisation d'un nanovecteur pour délivrer un principe actif dans une cellule. En effet, pour traverser chacune de ces barrières, si le principe actif, transporté par un nano objet, bénéficie de l'aide de son véhicule, il en devient aussi totalement tributaire. Le franchissement de ces barrières se fera donc avec de nouvelles contraintes liées aux nano objets. Pour chacune de ces parties nous passerons en revue les différentes barrières à franchir, mais également les principales méthodes et modèles utilisés dans nos études visant à reproduire et à évaluer les paramètres limitants l'accès du principe actif à sa cible lorsqu'il est véhiculé par un nano objet.

A. L'accès aux cellules cibles dans le système nerveux central

Dans le contexte d'un traitement du glioblastome, un nanovecteur tout comme un principe actif libre devra franchir les barrières biologiques restreignant l'accès à ses cellules cibles. Dans nos études, nous avons privilégié les barrières biologiques rencontrées lors d'une administration sanguine (la barrière sanguine et la barrière hémato encéphalique) ou lors d'une administration locorégionale. En effet, bien qu'il existe plusieurs voies d'administrations, comme la voie orale et la voie mucosale, toutes les voies finissent par emprunter le réseau sanguin pour accéder à leurs cellules cibles, à l'exception de la voie locorégionale. Nous détaillerons pour chacune ces deux voies, les barrières qu'elles érigent ainsi que les principales méthodes et modèles utilisés dans nos études.

1. La voie intraveineuse

Siège de l'activité cérébrale, l'encéphale est très consommateur d'oxygène et de glucose, il lui en faut donc un apport constant et en grande quantité. L'alimentation des cellules du parenchyme cérébral, doit donc ce faire à l'aide d'un réseau vasculaire particulièrement efficace. A cette fin, ce réseau vasculaire se ramifie à l'extrême, formant des capillaires d'un diamètre compris entre 4 et 8 μm et un réseau microvasculaire très dense dont la longueur est estimée à 650 km (Figure 29). Grâce à cette forte concentration de vaisseaux la distance entre deux capillaires n'est évaluée qu'à 40 μm , assurant une irrigation quasi individuelle pour chaque neurone.

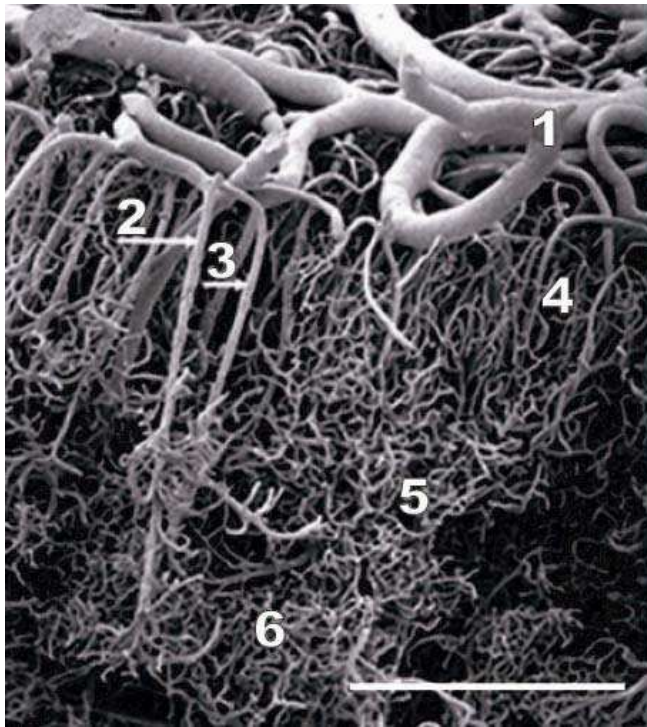


Figure 29.
Image de microscope électronique à balayage de capillaires cérébraux (Rodriguez-Baeza et al. 2003) : la barre d'échelle = 0,86 mm ; (1) vaisseau ; (2) grosse artère ; (3) artère moyenne ; (4) zone capillaire superficielle ; (5) zone capillaire moyenne ; (6) zone capillaire profonde

La voie intraveineuse semble donc particulièrement adaptée pour accéder, de manière non invasive, à toutes les cellules du parenchyme cérébral, même les cellules tumorales isolées non localisées. Cependant avant d'arriver à ces cellules, lors d'une administration intraveineuse, les principes actifs sont confrontés à deux barrières biologiques, celle de l'élimination sanguine et la barrière hématoencéphalique. En effet il faut d'abord que le principe actif reste suffisamment longtemps dans le sang pour atteindre et diffuser dans le parenchyme cérébral. Ensuite le tissu cérébral étant très protégé, les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral ne s'effectuent pas comme dans les autres tissus, mais grâce à des capillaires spécialisés formant la barrière hémato-encéphalique. Ces deux barrières vont donc être maintenant détaillées.

a) **La barrière sanguine**

■ **Le sang :**

Il s'agit d'un tissu conjonctif spécialisé liquide, composé d'éléments figurés répartis dans un liquide (le plasma). Parmi les éléments figurés du sang sont comptés les érythrocytes (la grande majorité) transporteurs de l'oxygène et du CO₂, les leucocytes (cellules du système immunitaire comprenant : granulocytes, lymphocytes et monocytes) et les thrombocytes (les plaquettes) responsables du début de la coagulation sanguine.

Alors que le plasma sanguin est constitué principalement d'eau et d'ions (Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺....) on y trouve aussi de nombreuses et diverses molécules circulantes comme du glucose libre, des lipides dans les lipoprotéines, des hormones, de multiples protéines telles des protéines du complément (rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire et de l'inflammation), la BSA, la transferrine et le fibrinogène etc.

Sans insister, cette grande complexité de composition permet, entre autres fonctions, au sang de remplir quatre de ses rôles fondamentaux pour l'organisme :

- Apporter des éléments indispensables aux processus vitaux, pour tous les tissus (oxygène, glucose...).
- Permettre la communication entre différents tissus, en véhiculant notamment des hormones.
- Permettre également un accès rapide vers tous les tissus aux cellules et molécules du système immunitaire.

- Exercer un rôle de transport des divers déchets vers les sites d'évacuations (foie, reins, poumons, tube digestif, peau).

L'utilisation de la voie intraveineuse en chimiothérapie a pour objectif de profiter du rôle de transporteur qu'est le sang, pour accéder à tous les tissus. Cependant l'efficacité de cette stratégie se heurte en pratique à un biais important : le sang ne permet pas un accès équivalent à tous les organes. Cet accès est déterminé principalement par deux paramètres : la perméabilité des capillaires et l'affinité du tissu pour le principe actif ou le nanovecteur. Ce biais peut entraîner une distribution dans des organes non souhaités, engendrant des effets secondaires comme une toxicité ou une élimination des principes actifs ou des nanovecteurs par les différents sites d'épuration du sang (principalement le foie et les reins), avant qu'ils n'aient pu atteindre leurs sites d'action. L'un des enjeux du franchissement de la barrière sanguine est donc de faire en sorte que les principes actifs reste suffisamment longtemps dans le sang pour qu'ils soient distribués passivement ou activement dans les tissus à traiter. On doit donc s'intéresser aux paramètres influençant le temps de résidence plasmatique des nanovecteurs.

■ **Modalité de l'élimination plasmatique des nanovecteurs :**

Les principes actifs libres sont généralement éliminés par filtration rénale à cause de leur faible masse moléculaire. Alors que pour les nanovecteurs leur élimination se fait majoritairement par le foie pour deux raisons principales :

- **La taille de fenestration des capillaires.** En effet il existe trois types d'endothélium vasculaire : le continu (sans pore), le fenestré ayant des pores entre 50 et 70 nm et les

sinusoïdes ayant des pores de 0,1 à 3 μ m. Les fenestrés sont notamment présents dans les reins et l'intestin grêle, alors que les capillaires sinusoïdes sont retrouvés dans le foie, la rate, les os et certaines glandes endocrines. La taille du nanovecteur est donc une des raisons de son élimination par le foie plutôt que par les reins.

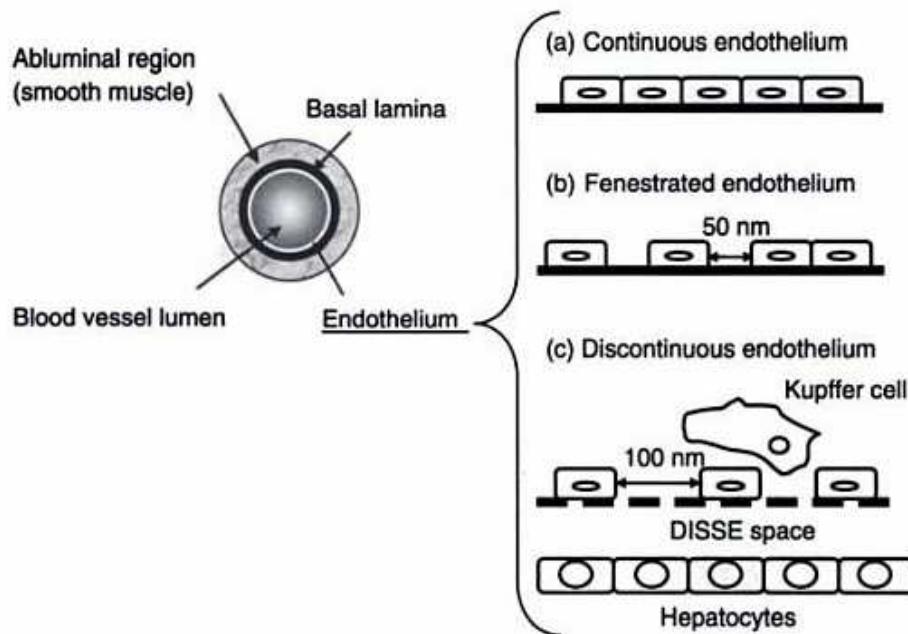


Figure 30. Taille des fenestrations des capillaires sanguins, extrait de (Passirani and Benoit 2005)

- **L'opsonisation.** La raison principale de l'élimination hépatique des nanovecteurs est leur opsonisation, c'est-à-dire leur recouvrement par des protéines plasmatiques (les opsonines) selon des interactions non spécifiques (Vonarbourg et al. 2006a). Parmi les opsonines il y a des protéines du système du complément (les protéines C3 et C4), des immunoglobulines (IgG et IgM), la fibronectine, l'albumine et des apolipoprotéines et principalement les protéines du système du complément, rendent les nanovecteurs plus visibles pour le système phagocytaire mononucléé ((MPS), surtout les macrophages résidents du foie (les cellules de Kupffer) (Muller-Eberhard 1988).

Appartenant au système immunitaire inné, le système du complément est le premier élément du système immunitaire à s'activer après la pénétration d'un corps étranger. Dans le cas des nanovecteurs, c'est principalement la voie alterne qui s'active spontanément par simple fixation de la protéine C3. Cette activation aboutit à une augmentation de la reconnaissance des nanovecteurs par le MPS et à la formation complexe d'attaque membranaire (MAC), capable de déstabiliser certains nanovecteurs. Elle permet également de recruter des cellules phagocytaires par activation de phénomènes inflammatoires suite à la libération d'anaphylatoxines (Vonarbourg et al. 2006a).

De nombreuses études ont été réalisées pour tester différentes stratégies visant à limiter ce phénomène. On peut citer notamment l'incorporation de Monosialoganglioside GM1 à la surface des nanovecteurs. Cette stratégie vise à rendre le nanovecteur biomimétique en imitation de Globules Rouge (Allen and Chonn 1987, Gabizon and Papahadjopoulos 1988). De nos jours la stratégie la plus répandue reste cependant l'utilisation de chaîne de PEG. Cette stratégie a permis à des nanovecteurs de circuler pendant plusieurs heures ; jusqu'à 45h chez les souris, les rats et les humains (Gabizon et al. 1994, Klivanov et al. 1990).

- **La méthodologie mise en place :** Afin d'évaluer l'élimination plasmatique des nanovecteurs testés dans nos études, nous avons procédé à deux tests :
 - **Un test *in vitro* : le test hémolytique CH50 :** Ce test vise à évaluer la capacité de nano objets à fixer des opsonines, donc à subir une élimination liée au phénomène d'opsonisation (Kazatchkine et al. 1986, Mayer 1961).

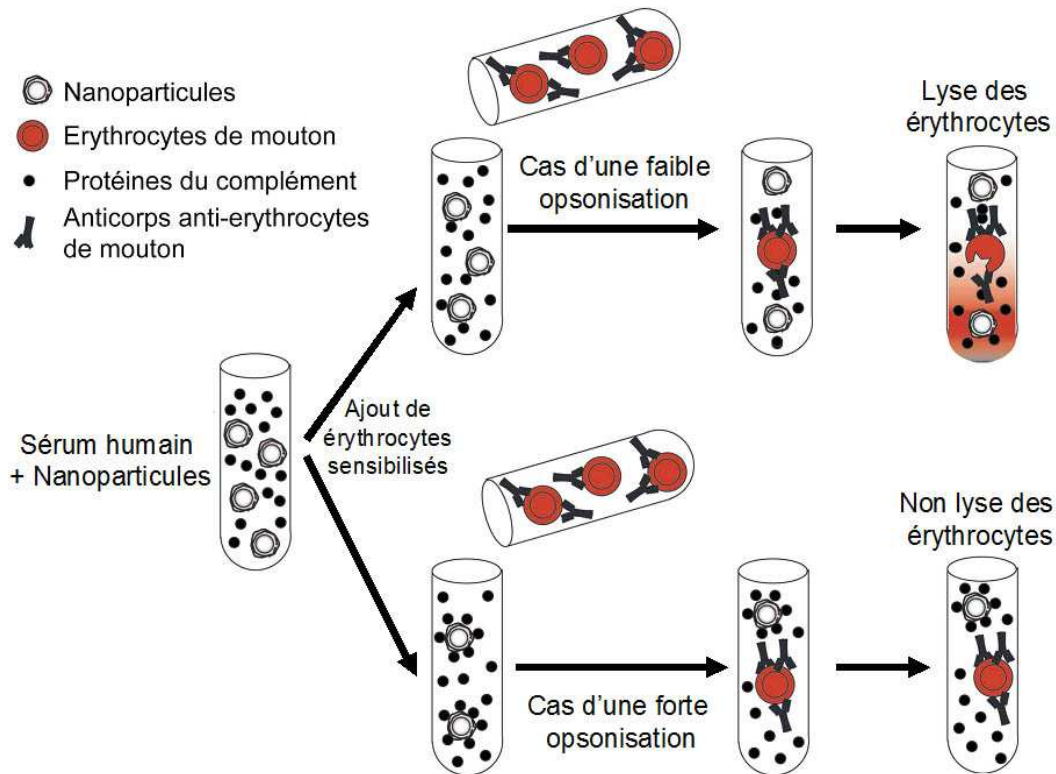


Figure 30. Illustration méthodologique du test CH50, modifiée à partir de (Vonarbourg et al. 2006a)

Il s'agit d'incuber des concentrations croissantes de nano objets (exprimées en surface de nano objets) avec une quantité fixe de sérum humain. La fixation des opsonines sera évaluée grâce à l'activité hémolytique du sérum humain sur des érythrocytes de moutons préalablement sensibilisés. En effet, si les protéines du complément se sont fixées sur les nano objets, alors elles ne seront plus libres pour entraîner la lyse des érythrocytes. Inversement si les nano objets ne fixent pas de protéines du complément, ces protéines seront libres pour entraîner la lyse des érythrocytes. Ce test est alors exprimé en pourcentage de lyse des érythrocytes selon une surface croissante de nano objets (Kazatchkine et al. 1986, Labarre et al. 1993, Mayer 1961).

- **Un test *in vivo* : l'étude pharmaco-cinétique** : Il s'agit d'administrer les nano objets par voie intraveineuse chez des souris ou des rats selon le strict respect des

règlements du ministère français de l'agriculture. Puis, des prises de sang sont faites pour déterminer les quantités restantes de nano objets au cours du temps.

b) La barrière hémato-encéphalique

Dans le cadre de la thérapie du glioblastome, atteindre les cellules tumorales via la circulation sanguine est rendu encore plus ardu parce que les échanges entre le milieu sanguin et le parenchyme cérébral sont très limités. En effet, l'isolement du système nerveux central (SNC) est connu depuis la fin du 19^{ème} siècle grâce à Paul Ehrlich et Edwin Goldman qui ont montré une différence de coloration du SNC selon le site d'injection du bleu de Trypan (dans le sang ou dans le liquide cérébro-spinal). Pour atteindre les cellules situées dans le parenchyme cérébral via la circulation sanguine, les principes actifs et les nanovecteurs peuvent emprunter deux itinéraires, comme le montre la Figure 31.

Le premier consiste à traverser directement les capillaires cérébraux au sein même du parenchyme cérébral, au travers d'une seule barrière : la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le deuxième itinéraire consiste à atteindre ces cellules en passant par le liquide cérébro-spinal (LCS). Cette solution nécessite de franchir deux barrières : la barrière hémato-méningée et la barrière méningo-encéphalique. La barrière hémato-méningée, au niveau des plexus choroïdes, est formée des cellules endothéliales et des cellules épithéliales des plexus choroïdes reposant sur une lame basale, elle permet l'accès au LCS. Alors que la barrière méningo-encéphalique est constituée notamment des cellules épendymaires au niveau des « citernes » intracérébrale et par la pie-mère au niveau des espaces sous arachnoïdiens, elle permet les échanges entre le LCS et les cellules du parenchyme cérébral.

L'isolement engendré par ces barrières est si efficace qu'actuellement 98 % des principes actifs, inférieurs à 500 Daltons et 100 % de ceux supérieurs à 500 Daltons seraient bloqués par ces barrières (Pardridge 2003).

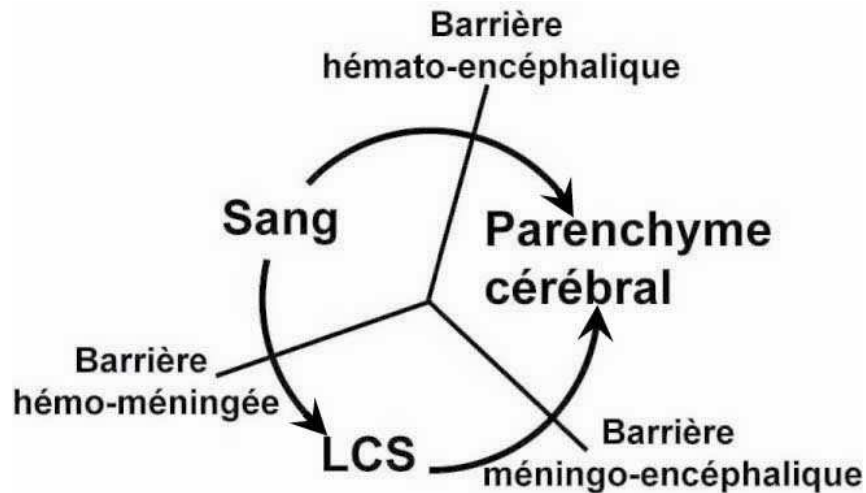


Figure 31. Illustration des différentes barrières cellulaires rencontrées pour passer du sang au parenchyme cérébral, en passant ou non par le liquide cébro-spinal (LCS)

■ **La BHE :**

Pressentie dès le début du 20^{ème} siècle, la BHE fut véritablement caractérisée dans les années 60 par Reese, Karnovsky et Brightman (Brightman and Reese 1969, Reese and Karnovsky 1967). Cette barrière anatomique contrôle les échanges entre le sang et les cellules du parenchyme cérébral pour préserver l'homéostasie cérébrale en limitant l'accès aux agents pathogènes, en assurant l'élimination des déchets et l'approvisionnement du tissu cérébral. La BHE assure ces fonctions grâce à une structure anatomique unique et à des propriétés cellulaires caractéristiques (Abbott et al. 2006).

- **Structure anatomique de la BHE :** Il s'agit de cellules endothéliales spécialisées sur lesquelles repose une lame basale riche en collagène de type IV, elle-même recouverte de prolongements cellulaires. Ceux-ci viennent des astrocytes formant un manchon autour des capillaires (appelés les pieds astrocytaires) (Brightman and

Reese 1969, Reese and Karnovsky 1967). D'autres cellules peuvent cependant être en contact avec les cellules endothéliales, c'est le cas des péricytes et de certains neurones, mais ils ne participent pas à la BHE. Fonctionnellement ce sont les cellules endothéliales spécialisées qui assurent le contrôle des échanges avec le sang et c'est grâce à leurs étroites relations avec les astrocytes qu'elles acquièrent cette spécialisation (Brightman and Reese 1969).

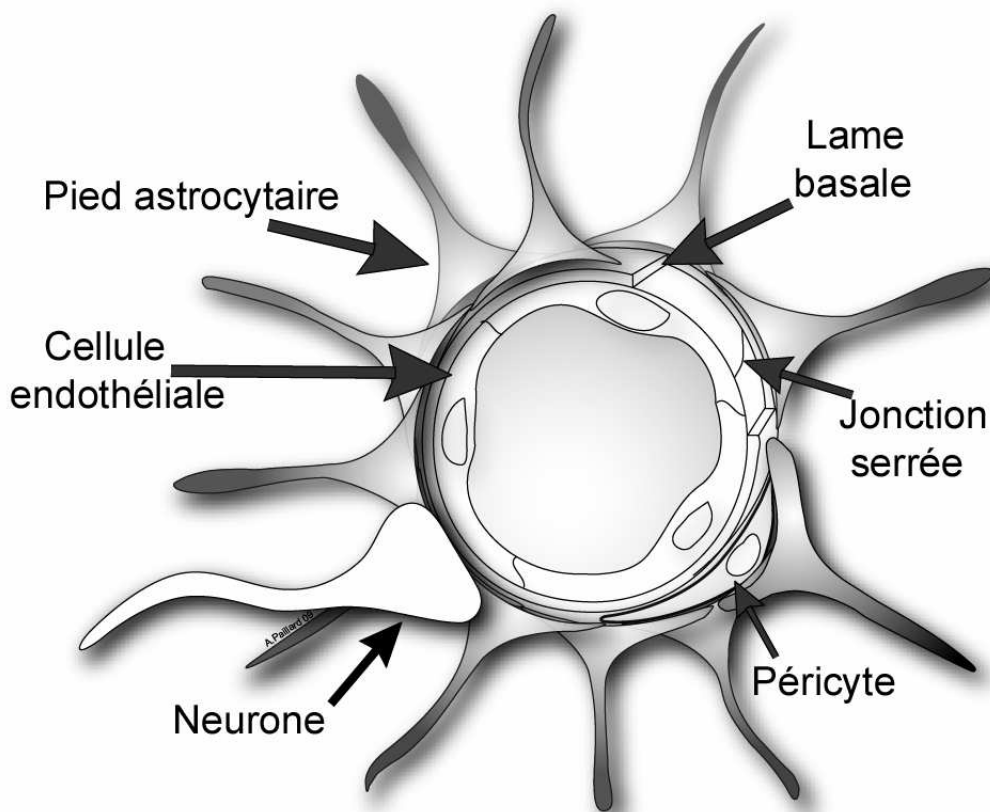


Figure 32. Support anatomique de la barrière hémato-encéphalique

- **Spécificités des cellules endothéliales de la BHE :**

- Morphologiquement ces cellules sont longues, aplaties, polarisées et présentent de très nombreuses mitochondries (Betz et al. 1980, Pardridge 2003, Rubin and Staddon 1999). Elles ne présentent pas de fenestration et sont reliées entre elles par des jonctions serrées empêchant le passage des

molécules entre les cellules (voie paracellulaire). Par conséquent toutes les molécules voulant franchir la BHE doivent passer au travers des cellules endothéliales.

- Pour franchir ces cellules, trois mécanismes sont alors possibles : diffuser simplement au travers (uniquement pour de l'O₂, du CO₂, l'alcool et des petites molécules lipophiles), utiliser des transporteurs (ex : GLUT1 pour le glucose) et/ou utiliser des vésicules d'endocytose. Lorsque ces vésicules ne font que traverser la cellule pour déverser leur contenu au niveau de la lame basale, ce phénomène prend le nom de transcytose. Elle peut être spécifique via des récepteurs (ex : LDL) (Meresse et al. 1989) ou bien aspécifique (entrée des protéines fortement chargées cationiquement) (Abbott et al. 2006, Hardebo and Kahrstrom 1985).

- Les cellules limitent encore plus le passage des molécules vers les cellules du parenchyme cérébral, en ayant une très forte concentration en pompes d'efflux (ex : P-glycoprotéine). Ces pompes vont rejeter la plupart des molécules diffusant au travers de ces cellules.

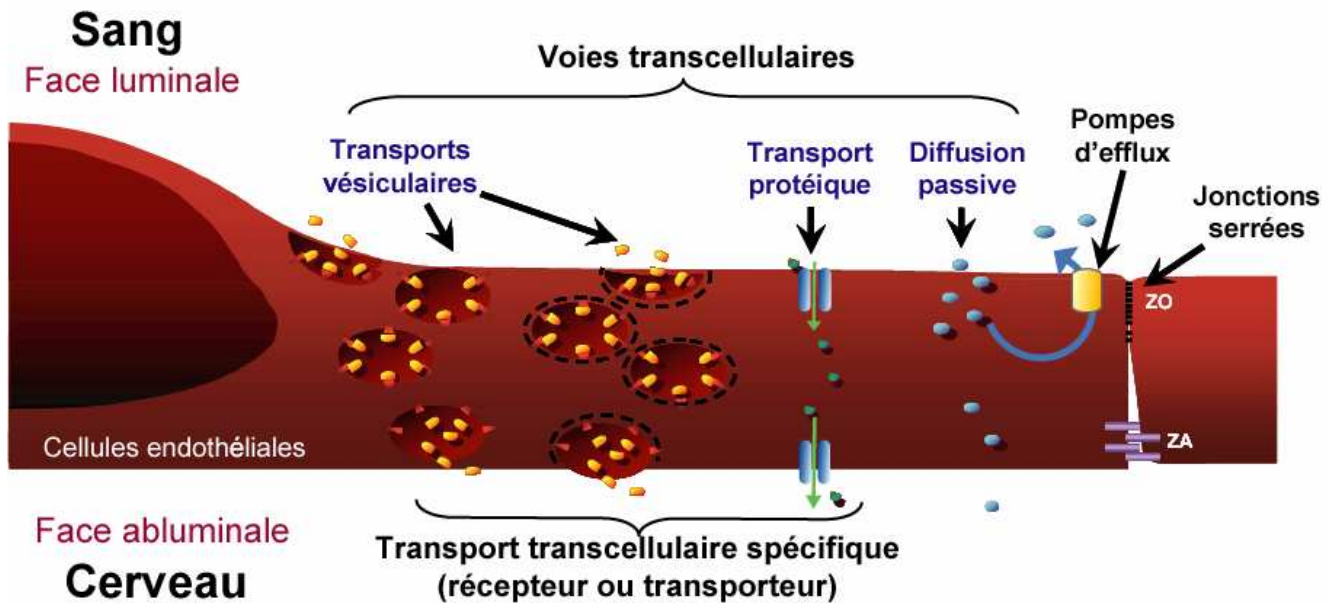


Figure 33. Les différentes voies de transport au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux.

- **Conditions altérant l'intégrité de la BHE :**

- Altérations pathologiques : Il existe plusieurs conditions pathologiques où la BHE est altérée, notamment en cas d'inflammation, mais aussi dans les stades avancés des tumeurs cérébrales, comme le glioblastome. En effet, en atteignant un volume important les tumeurs ont besoin de faire naître de nouveaux vaisseaux sanguins pour assurer leurs approvisionnements. Cependant, ces vaisseaux sont imparfaits et ne présentent pas de BHE intègre (Bergers et al. 2003). Cette imperfection des néo-vaisseaux tumoraux est connue pour augmenter l'accès et la rétention dans les tumeurs de principes actifs, encapsulés ou non dans des nanovecteurs. Cet effet porte le nom d'effet EPR pour "enhanced permeability and retention effect" (Matsumura and Maeda 1986). Malheureusement dans le cadre de la thérapie du glioblastome, l'utilisation de cet effet est particulièrement restreinte. En réalité les masses tumorales étant assez grandes pour en posséder, sont généralement retirées par

exérèse et les infiltrations tumorales d'où repartira la tumeur, sont encore trop petites pour avoir déjà généré cet effet.

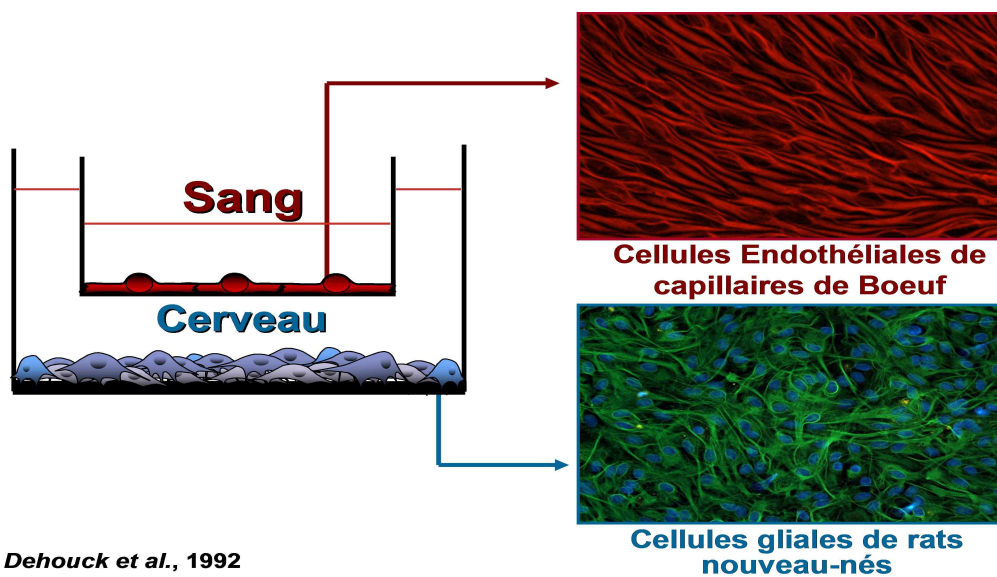
- Altérations volontaires : L'idée de l'altération de la BHE fut reprise pour améliorer l'accès au parenchyme cérébral. Il y a 3 principales méthodes pour induire cette perméabilisation de la BHE. D'une part l'utilisation d'agents osmotiques (ex : le mannitol), mais cette méthode s'est avérée neurotoxique (Muldoon et al. 2007). D'autre part l'utilisation de molécules mimantes ou induisant l'état inflammatoire comme par exemple le TNF- α (Descamps et al. 1997). Enfin, il existe une méthode utilisant des microbulles de gaz soumises à des ultrasons, cette méthode semblant induire une perméabilisation transitoire et non toxique de la BHE (McDannold et al. 2005).

■ **Stratégie mises en place pour franchir la BHE sans l'altérer** :

Deux stratégies non invasives ont été élaborées. La première consiste à augmenter la diffusion passive d'un principe actif en le rendant plus hydrophobe. Cette méthode peut améliorer de façon importante le franchissement de cette barrière, mais n'est possible que pour peu de molécules (Sampath et al. 2003). La deuxième stratégie consiste à augmenter le transport du principe actif au travers des cellules. Cette augmentation peut se faire en favorisant un transport aspécifique, comme rendre plus cationique une protéine (ex : BSA) (Abbott et al. 2006, Hardebo and Kahrstrom 1985). Ou bien, elle peut se faire en stimulant une entrée spécifique, comme celle de la transferrine. Cette stratégie a déjà démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo* en utilisant des nanovecteurs (ex : ciblage du récepteur de la transferrine) (Huwyler et al. 1996).

■ **Le modèle *in vitro* de cellules endothéliales de la BHE :**

Afin d'évaluer le passage à travers les cellules endothéliales de la BHE et de la lame basale, nous avons utilisé un modèle *in vitro*. Ce modèle consiste en une co-culture dans un système d'insert, de cellules primaires endothéliales issues de capillaires cérébraux de bœuf et de cellules gliales (astrocytes) de rat. Les cellules endothéliales sont cultivées sur un insert recouvert de collagène, puis différenciées en cellules endothéliales de la BHE. Cette différenciation s'effectue lorsque les deux types cellulaires sont mis en co-culture (Dehouck et al. 1990). Dans ces conditions, les cellules endothéliales obtenues présentent les caractéristiques des cellules endothéliales de la BHE *in vivo* (Dehouck et al. 1992).



Dehouck et al., 1992

Figure 33. Modèle *in vitro* de cellules endothéliales de la BHE (Dehouck et al. 1992)

2. La voie locorégionale dans le système nerveux central

Cette voie consiste à administrer les principes actifs ou les vecteurs directement dans le tissu à traiter. Dans le cas du glioblastome cette administration s'effectue généralement après l'exérèse de la masse tumorale, mais peut également se faire directement dans la masse tumorale, notamment pour les cas inopérables. Après exérèse de la masse tumorale, les principes actifs peuvent être administrés localement selon plusieurs méthodes : par injection directe dans le parenchyme cérébral ou par implantation d'un système de délivrance de principes actifs. Puisque dans 90% des cas la récurrence tumorale se produit dans les 2 cm entourant la zone retirée (Liang et al. 1991, Wallner et al. 1989), l'une des stratégies possibles fut d'imaginer des systèmes implantables permettant la libération progressive et prolongée de principes actifs. Actuellement seul le système « Gliadel[®] » est exploité en clinique (Westphal et al. 2003). D'autres systèmes de délivrance prolongée ont également été testés, comme les microsphères de PLGA faisant 50µm et délivrant le 5-fluorouracile (Menei et al. 1994, Veziers et al. 2001). Cependant les principes actifs ou les nanovecteurs administrés selon ces méthodes se heurtent tous à une barrière biologique qui est celle de leur diffusion dans le parenchyme cérébral.

■ **Le parenchyme cérébral :**

Formant les diverses structures de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral, cervelet), le parenchyme cérébral est composé de substance blanche et de substance grise. La substance blanche est principalement constituée de fibres nerveuses myélinisées et de cellules gliales, alors que la substance grise comporte surtout les corps cellulaires des neurones, des cellules

gliales et des fibres nerveuses amyéliniques. Les neurones conduisent et traitent les informations, alors que les cellules gliales assurent principalement un rôle de soutien, de défense, de nutrition et de recouvrement des neurones. En plus des cellules, le parenchyme comporte une matrice extracellulaire lui fournissant notamment sa structure. Cette matrice est composée principalement de collagène, de glycoprotéines (laminine, fibronectine, ténectine etc.), de glycosaminoglycannes et de protéoglycannes (Lukes et al. 1999).

■ **Les barrières limitant la diffusion dans le parenchyme cérébral :**

Le premier type de barrière est « mécanique », en rapport avec la composition et l'organisation tissulaire du parenchyme cérébral. Par exemple, dans la substance grise, la diffusion sera homogène et multidirectionnelle, alors que dans la substance blanche la diffusion s'alignera sur l'orientation des fibres nerveuses (Bobo et al. 1994). Dans le cadre de la thérapie d'une tumeur cérébrale, il faut également tenir compte de l'environnement lésionnel. En effet, la tumeur étant hétérogène avec en général une zone nécrotique au centre et des œdèmes, cela engendre des zones de densités et de pressions différentes qui seront responsables d'une diffusion faible et asymétrique du principe actif (Vavra et al. 2004).

Le deuxième type de barrière est lié à l'élimination du principe actif ou du nanovecteur à partir du milieu extracellulaire. En effet, la diffusion se fait toujours dans le milieu extracellulaire selon le gradient de concentration ayant pour origine le point d'injection ou le point de sortie des systèmes de délivrance. Pour que le gradient s'étende, il faut que la concentration reste forte dans le milieu extracellulaire. Ainsi la diffusion déjà freinée mécaniquement, est aussi dépendante d'une part du maintien à un niveau élevé de cette concentration et d'autre part de l'élimination à partir du milieu extracellulaire qui peut se

produire de deux manières : soit par internalisation dans les cellules, soit par évacuation hors du parenchyme cérébral via la BHE ou le LCS.

■ **Apports et contraintes liées à l'usage des nanovecteurs :**

Cette stratégie vise à augmenter la diffusion d'un principe actif, généralement des molécules très petites, en les transportant dans des structures beaucoup plus grosses. Evidemment la taille des nanovecteurs constitue une contrainte mécanique pour cette diffusion. Cependant les nanovecteurs apportent de nombreux avantages, comme la modification de l'internalisation cellulaire du principe actif. C'est notamment le cas de la doxorubicine qui pénètre très bien à l'état libre dans la cellule, entraînant ainsi une rapide diminution de sa concentration dans le milieu extracellulaire. Encapsulée dans des liposomes, son internalisation cellulaire est plus lente, lui laissant dès lors plus de temps pour diffuser à partir des liposomes (Saito et al. 2006).

Plusieurs paramètres influencent ces contraintes et ces avantages liés à l'utilisation de nanovecteurs ; notamment leur taille, leur charge, leur composition, leurs propriétés de surface. Par exemple, la charge cationique a déjà montré qu'elle limitait fortement le temps de résidence des liposomes (MacKay et al. 2005). Il a été également envisagé d'utiliser des vecteurs modifiés en leur surface pour entrer de manière plus ciblée dans des cellules radiorésistantes.

■ **La méthodologie mise en place :**

Dans notre travail, nous avons cherché à évaluer l'accessibilité des nano objets aux cellules tumorales lorsque ces nano objets sont administrés par voie locorégionale. Ceux-ci ont été injectés par stéréotaxie en intra tumoral par injection simple ou par injection par gradient de pression positif selon la méthode dite de « Convection-Enhanced Delivery » (CED). Ces expérimentations et plus particulièrement la dernière citée ont été réalisées et mises en place par Madame Vinchon-Petit dans le cadre d'une collaboration interne. La CED est une méthode d'injection par perfusion, à pression positive (Bobo et al. 1994). Elle permet notamment de limiter les « freins mécaniques » rencontrés lors de l'infusion/perfusion des solutions injectées, mais également de pouvoir augmenter les volumes de distribution en couplant la convection intraparenchymateuse des principes actifs à leur diffusion. De nombreux nano objets ont déjà été testés par cette méthode, comme des liposomes (Saito et al. 2006).

B. L'accès au site d'action moléculaire

1. Les différentes barrières biologiques érigées par la cellule

Après avoir franchi toutes les barrières limitant l'accès à la cellule cible, le principe actif doit encore parvenir jusqu'à son site d'action moléculaire. Dans le cas où ce site est sur la membrane plasmique de la cellule, le principe actif pourra agir directement sans franchir de nouvelles barrières biologiques, c'est notamment de cas des molécules activant des récepteurs à la surface des cellules (des intégrines, des molécules se fixant aux récepteurs de facteur de croissance et des interleukines). L'une des plus utilisées est interleukine 2 qui permet notamment de stimuler le système immunitaire (Burchill et al. 2007). Cependant la grande majorité des sites d'action moléculaire des principes actifs se trouvent dans la cellule. Pour y accéder les principes actifs devront donc franchir plusieurs barrières biologiques érigées par la cellule. Celles-ci pourront être communes ou différentes selon les différents principes actifs ou selon la localisation intracellulaire des sites et des moyens utilisés par les principes actifs pour y parvenir. Dans tous les cas, le défi posé par ces barrières biologiques reste de faire parvenir, le principe dans un état actif, au site d'action moléculaire.

En raison de la grande diversité des principes actifs, leurs sites d'action moléculaire peuvent être localisés partout dans la cellule, cependant les localisations essentielles de ces sites sont :

- Le hyaloplasme (cytosol et cytosquelette), notamment pour des molécules anti-cancéreuses comme le paclitaxel qui agit sur les microtubules.

- le noyau cellulaire, pour la thérapie génique.
- les mitochondries qui sont principalement la cible de médicaments pro-apoptotiques.

Plusieurs barrières biologiques entravent l'accès à chacun de ces emplacements. On peut cependant identifier trois types communs de barrières : les membranes cellulaires, le cheminement intracellulaire et les systèmes d'élimination. Nous détaillerons donc ces différents types de barrières, tout en montrant les solutions que peuvent apporter l'utilisation de nanovecteurs pour les franchir. Nous verrons également les barrières spécifiques que cette utilisation engendre, ainsi que les principaux modèles et méthodes choisies dans la suite de notre présentation pour évaluer les différents nanovecteurs dans le cadre de la thérapie du glioblastome.

a) Les franchissements des membranes cellulaires

Lorsqu'un principe actif veut atteindre son site d'action moléculaire, il aura au moins une membrane cellulaire à franchir, la membrane plasmique, et parfois des membranes intracellulaires (Figure 34). Cette contrainte a pour origine la fonction première des membranes biologiques qui sont les structures physico-chimiques formant des espaces clos, délimitant et isolant le contenu cellulaire ou celui d'un organe. Loin d'être des interfaces inertes, les membranes présentent une perméabilité sélective contrôlant les entrées et les sorties. Ce rôle d'isolement et de contrôle des flux les traversant permet à chaque organe cellulaire, mais également à toute la cellule, d'avoir une composition spécifique. Les principes actifs vont avoir des capacités diverses pour franchir ce type de barrière et le recours aux nanovecteurs est une des nouvelles stratégies permettant de faciliter ce franchissement (Akita et al. 2009).

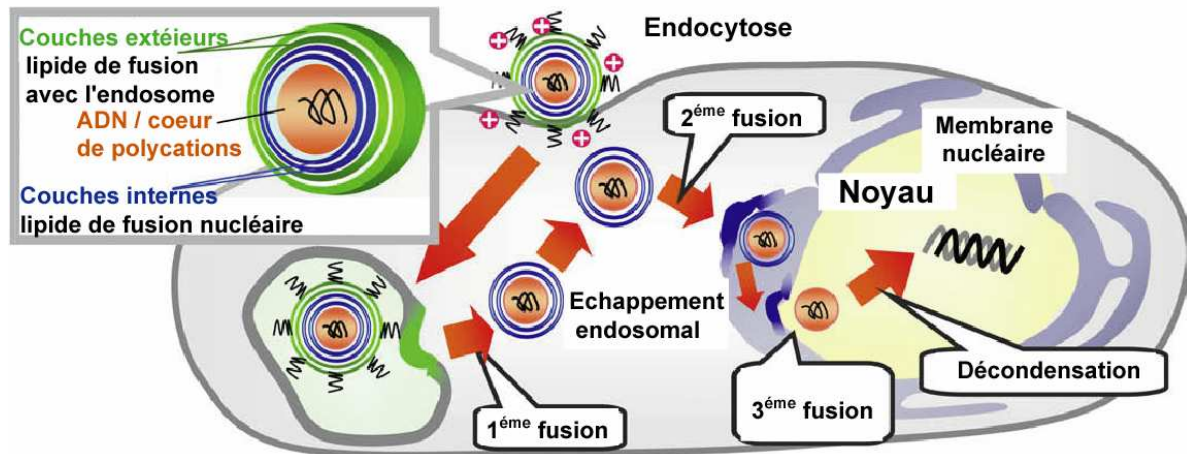


Figure 34. Modèle extrait de Akita et al de 2009 montrant le franchissement de quatre membranes cellulaires avant que le principe actif (ici de l'ADN) n'atteigne son site d'action moléculaire (Akita et al. 2009).

■ Caractéristiques communes aux membranes cellulaires :

En dépit des relations qu'il peut y avoir entre les différentes membranes cellulaires, celles-ci ne sont pas identiques ni dans leurs compositions ni dans leurs fonctions. Mais elles ont en commun d'avoir une épaisseur comprise entre 5 et 10 nm et d'être formées de divers lipides (principalement des phospholipides) et protéines. Elles peuvent également contenir des sucres associés à des lipides (glycolipides) ou à des protéines (glycoprotéines). Elles présentent toutes une structure en double feuillet, conséquence de l'organisation en bicouche des phospholipides et sont rigidifiées par du cholestérol. La répartition de leurs composés n'est pas homogène, pouvant créer des microdomaines aux propriétés diverses, comme par exemple les radeaux lipidiques. Les membranes restent toujours des structures dynamiques par leur constant renouvellement, mais également par le perpétuel mouvement de ces composants en leur sein.

Bien que très isolantes, les membranes ne sont pas pour autant imperméables, elles permettent des échanges entre l'extérieur et l'intérieur de leurs enceintes, le plus souvent de manières très sélectives. Ainsi seules des molécules ayant des caractéristiques particulières peuvent les franchir et ceci par divers mécanismes. Nous allons d'abord passer en revue les différents types de franchissements, puis les différents facteurs moléculaires ou physiques permettant de faciliter cette traversée.

- **Les différents types de franchissements :**

Ils peuvent être répartis en deux catégories : ceux permettant un franchissement physique total de la membrane et ceux aboutissant à la formation d'une vésicule, sans franchissement physique de la membrane.

- Le franchissement complet de la membrane : Ce franchissement peut être direct par diffusion à travers la bicouche de phospholipide, sinon il nécessite l'utilisation de protéines membranaires, comme la L-DOPA qui traverse la BHE à l'aide d'une protéine transporteuse d'acides aminés (del Amo et al. 2008, Gomes and Soares-da-Silva 1999), ou de facteurs de déstabilisation des membranes, comme les lipides cationiques. Lors d'une diffusion passive, facilitée ou non par des protéines, le franchissement est énergie indépendant, et concentration dépendant, ce qui réclame un apport important de principe actif jusqu'à la cellule. Inversement avec les transporteurs actifs, le passage est concentration indépendant, et énergie dépendant. C'est le cas des molécules ressorties des cellules par la P-glycoprotéine (Juliano and Ling 1976). Enfin avec l'utilisation de facteurs de déstabilisation membranaire, cette traversée est concentration dépendante. En revanche elle peut être énergie indépendante, comme lors du franchissement de la membrane

plasmique par des nanoparticules d'or (Verma et al. 2008), ou indirectement énergie dépendante comme par exemple avec les polymères agissant comme des « éponges à protons » (Akinc et al. 2005).

- Le franchissement partiel de la membrane à l'aide de vésicules : Ce franchissement de membrane concerne surtout les phénomènes d'endocytose, d'exocytose, ainsi que les transferts d'un compartiment cellulaire à un autre. Ce type de franchissement ne permet pas aux principes actifs d'accéder directement au cytosol. Cependant il peut permettre à certains d'accéder à leur site d'action. Les principes actifs transportés peuvent être alors beaucoup plus volumineux et ne sont donc pas nécessairement libérés rapidement de leurs nanovecteurs. En effet ces vésicules peuvent fusionner ou mûrir pour délivrer leur contenu dans différents compartiments cellulaires. Par exemple, des enzymes lysosomales atteignent ainsi leurs lieux d'action : le lysosome, pour y traiter des maladies lysosomales comme la maladie de Gaucher (Gregoriadis 1978).

- **Les différents facteurs facilitant ces franchissements** :

Ces facteurs peuvent être répartis en deux groupes : les facteurs moléculaires et les facteurs physiques permettant de faciliter la traversée des membranes.

- Utilisation de molécules favorisant la traversée : Ces molécules entraînent une action directe sur la membrane, ou indirecte en agissant par exemple sur le milieu contenu dans l'enceinte de la membrane. Ces molécules ont principalement été étudiées pour aider des oligonucléotides à entrer dans la cellule ou à éviter une dégradation lysosomale, Il s'agit de lipides, de protéines, de peptides ou de

polymères qui peuvent être associés directement au principe actif pour former des complexes ayant pour certains de multiples effets (ex : les polyconjugués dynamiques (Rozema et al. 2007)), des nanoparticules par autoassemblage (Liu et al. 2009) ou bien associées à des nanovecteurs. Il est possible de les classer en trois groupes :

➤ Les molécules agissant directement sur la membrane :

Elles permettent de franchir une ou plusieurs membranes par des mécanismes qui ne nécessitent pas d'énergie. Dans le cas des lipides, ce sont principalement les cationiques qui sont utilisés. Très fortement chargés, les lipides cationiques vont s'associer aux lipides anioniques de la membrane, engendrant des tensions. Celles-ci vont provoquer un réarrangement entre la membrane, les lipides cationiques et le principe actif, conduisant à une libération du principe actif de l'autre côté de la membrane (Legendre and Szoka 1992, Pinnaduwa et al. 1989). Les lipides cationiques les plus étudiés sont notamment le N[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA) et le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP) (Felgner et al. 1987, Wrobel and Collins 1995). Ils sont généralement associés au 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) pour diminuer leur toxicité. Ces lipides servent généralement pour former des nanovecteurs lipidiques, principalement des liposomes (Felgner et al. 1987, Wrobel and Collins 1995). Il existe aussi des polymères, ainsi que plusieurs séquences peptidiques ou protéiques qui permettent de franchir des membranes. Certains fusionnent avec les membranes, comme certaines protéines ou peptides de pénétration cellulaire (CPP) (Zorko and Langel 2005), alors que d'autres créent des pores membranaires (Zemel et al. 2003) ou des micelles inverses sur la membrane, comme ceux de type « penetratin » (Joliot and Prochiantz 2004). Ces séquences

d'acides aminés peuvent être synthétiques, issues de séquences biologiques ou mixtes et peuvent induire une fusion membranaire permettant la traversée de ce qui leur est associé. Ces protéines de fusion proviennent le plus souvent de virus (ex : Sendai Virus). Elles ont déjà permis à des nanoparticules qui en étaient recouvertes, de franchir la membrane plasmique (Deniger et al. 2006, Kunisawa et al. 2005), et d'être ainsi délivrées directement dans le cytosol. D'autres séquences peptidiques peuvent être pH sensibles, n'entraînant une fusion avec la membrane que pour des pH acides. C'est le cas les liposomes utilisant la séquence peptidique de fusion GALA (Sasaki et al. 2008). D'autres particules franchissent la membrane plasmique en induisant la formation de trous permettant leur diffusion (Verma et al. 2008).

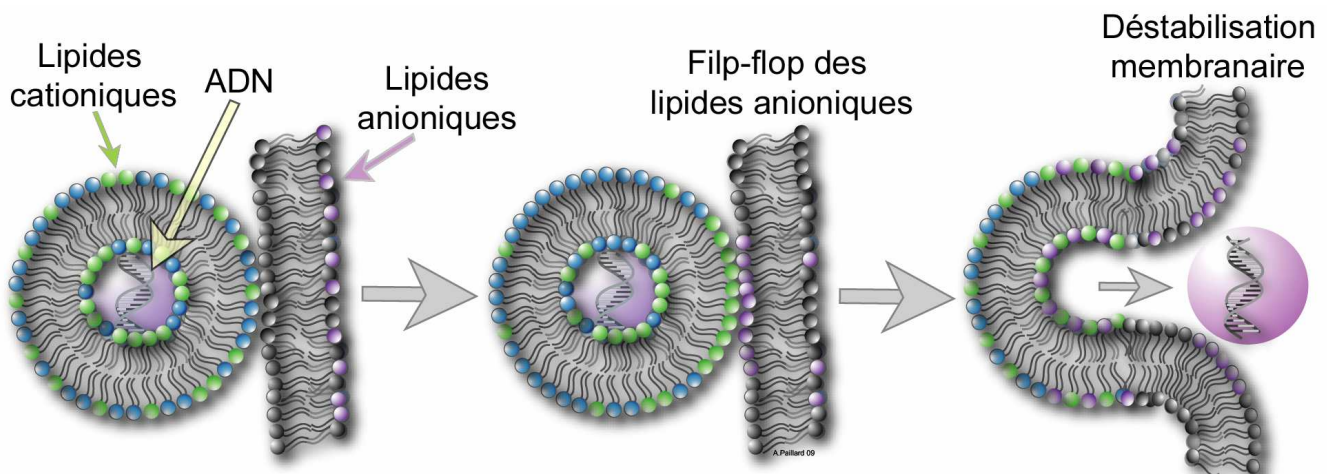


Figure 35. Déstabilisation membranaire par des lipides cationiques

➤ Les molécules activant des mécanismes cellulaires de franchissement :

Plusieurs mécanismes d'action sont possibles pour le franchissement de la membrane, mais ils impliquent tous une reconnaissance cellulaire de ces molécules : il s'agit principalement de protéines ou de peptides. Par exemple, certains CPPs entraînent un franchissement de membrane par formation de vésicules, comme la protéine 86-mer-trans-activating transcriptional activator (TAT), isolée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

(Frankel and Pabo 1988, Green and Loewenstein 1988, Torchilin 2006). En effet il semblerait que cette protéine provoquerait une entrée dans la cellule par endocytose (ici par macropinocytose). Cette stratégie est utilisée par de nombreux nanovecteurs pour cibler une cellule et y entrer. C'est notamment le cas des particules ayant à leur surface des anticorps, comme OX26 dirigé contre le récepteur de la transferrine. Enfin d'autres séquences sont reconnues par des structures transmembranaires, comme les pores nucléaires qui les laissent alors passer avec ce qui leur est associé. Ainsi des séquences d'acides aminés « signal de localisation nucléaire » (NLS) peuvent être associées à des principes actifs pour leur faire atteindre l'intérieur du noyau cellulaire (Chaloin et al. 1998, Morris et al. 1997).

➤ Les molécules ayant un effet sur le milieu contenu dans l'enceinte :

Cette stratégie n'est possible qu'à l'intérieur de petites vésicules. Sa principale application est d'ailleurs de libérer des principes actifs des lysosomes. Les molécules les plus utilisées dans cette stratégie sont des polymères agissant comme des « éponges à protons », comme le Poly (ethyleneimine) (PEI) et le poly(amidoamine) (PAMAM). Ces molécules pourront accaparer les ions H^+ par leurs très nombreux groupes amines, les rendant très cationiques. Pour compenser la séquestration des ions H^+ et donc la non diminution du pH, de nombreux autres ions H^+ seront entrés par des pompes membranaires. A cause de la trop forte concentration en charge cationique (les H^+ libres et les groupes amines), de nombreux contre ions (Cl^-) rentreront aussi dans le lysosome. Cette trop forte concentration en ions va alors causer une forte diffusion d'eau vers l'intérieur du lysosome, jusqu'à son éclatement (Akinc et al. 2005, Sonawane et al. 2003).

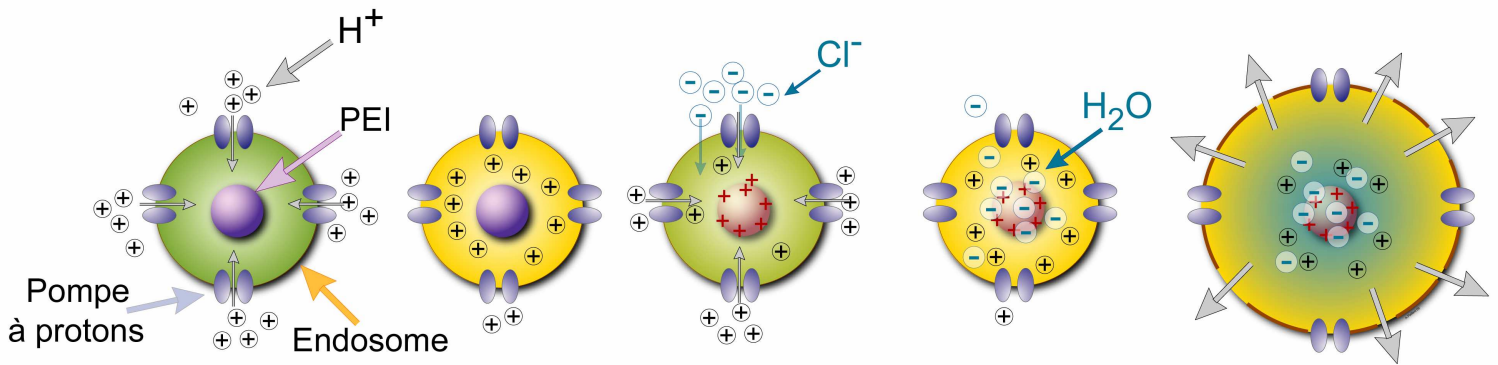


Figure 36. Hypothèse dite de « l'éponge à protons »

- Utilisation de facteurs extérieurs physiques : Plusieurs méthodes utilisent des facteurs extérieurs pour provoquer le franchissement des membranes. Il est possible de les distinguer selon le facteur extérieur utilisé (Niidome and Huang 2002, Torchilin 2006). Par exemple la méthode d'électroporation (Rols and Teissie 1998), utilisant une exposition à un champ électrique et celle de « gene gun », lorsque les cellules sont exposées à un tir de particules, généralement d'or, recouvertes du principe actif : l'ADN (Lin et al. 2000). Il existe également une méthode utilisant des ultrasons pour faire osciller des microbulles de gaz, ce qui permet de perméabiliser la membrane plasmique des cellules pour les transférer (Newman and Bettinger 2007). Une autre méthode enfin, utilise des ondes lumineuses. Il s'agit de stimuler par ces ondes, des composés photosensibles qui déstabilisent les membranes (Hogset et al. 2000). Cette méthode a déjà permis le franchissement membranaire par des complexes nanométriques (Nishiyama et al. 2005). Toutefois, elle est limitée par la faible diffusion des ondes lumineuses à travers les tissus ou les organes et par sa toxicité encore trop importante.

■ **Particularités de la membrane plasmique :**

La membrane plasmique possède de nombreuses particularités, lui permettant d'accomplir des rôles spécifiques. Elle permet la communication intercellulaire, l'adhérence de la cellule au milieu extérieur, ainsi que la sélection des entrées et des sorties de la cellule. Pour assurer toutes ces fonctions la membrane plasmique comporte une composition et une organisation particulière.

Son organisation est asymétrique, entre le milieu interne et externe, en termes de répartition des lipides et des protéines. Sa face externe présente par exemple, chez toutes les cellules, des sucres attachés à des protéines ou des lipides, formant le glycocalyx (aussi appelé « cell coat »). Cette structure hydrophile permet de limiter le rapprochement entre deux membranes, jouant donc un rôle d'espaceur qui protège, selon son épaisseur, la membrane plasmique des interactions avec des agents pathogènes. Le glycocalyx est également impliqué dans les phénomènes de reconnaissance et de communication. Ainsi il limitera l'accès des principes actifs libres ou non, à la bicouche de phospholipide, aux protéines membranaires et donc l'accès à l'intérieur de la cellule.

La membrane plasmique s'ancre des deux côtés. Du côté externe elle s'ancre aux molécules de la matrice extracellulaire, alors qu'en face interne, elle se lie aux protéines du cytosquelette. Ce cytosquelette sert de structure de soutien, définissant la forme de la cellule. Cependant il reste dynamique, ce qui lui permet de mouvoir la cellule, mais surtout les molécules ou les vésicules dans la cellule. En effet grâce au cytosquelette, la membrane peut se déformer et créer des invaginations pouvant donner lieu à des vésicules. Ce phénomène, appelé endocytose, permet le franchissement de cette membrane à l'aide de vésicules.

L'endocytose est un processus propre à la membrane plasmique qui nécessite de l'énergie. Elle peut être ou non induite par une reconnaissance spécifique via la reconnaissance d'un récepteur. C'est surtout de cette manière que les principes actifs et plus particulièrement ceux associés à des nanovecteurs, franchissent la membrane plasmique.

Nombreux sont les paramètres influençant l'activation de ce phénomène, comme la charge de surface, l'hydrophobie et la taille. Ces paramètres détermineront la voie d'endocytose choisie par la cellule pour les faire entrer. Ces voies peuvent être classées à partir de plusieurs paramètres. Nous exposerons ici la classification établie par Conner et Schmid qui distingue deux modes d'endocytose présentés Figure 37 (Conner and Schmid 2003) :

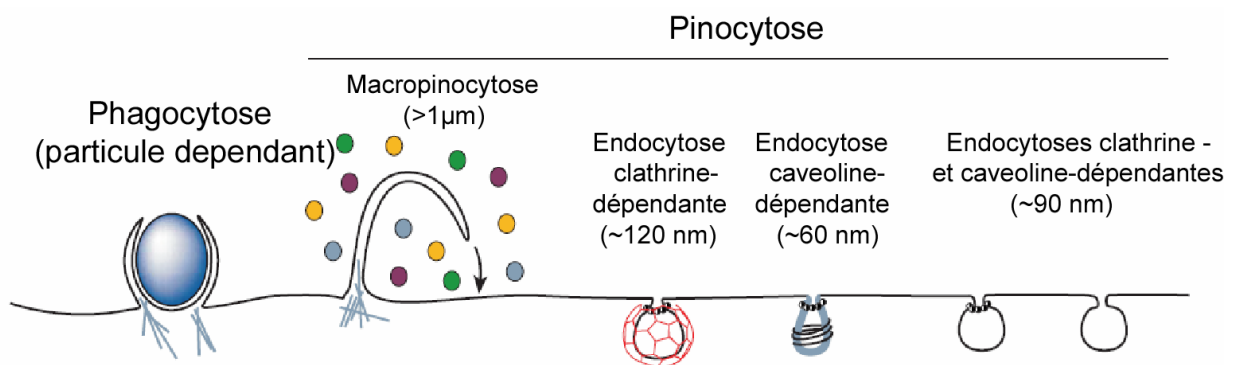


Figure 37. Les différentes voies d'endocytose extrait de (Conner and Schmid 2003)

- **La phagocytose :** Ce mode particulier d'endocytose n'est présent que dans certains types de cellules spécialisées comme les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Rabinovitch 1995, Wasungu and Hoekstra 2006). La phagocytose autorise l'entrée dans la cellule de grosses particules, comme les microorganismes et de cellules mortes mais pour les dégrader.

- **La pinocytose** : Ce mode d'endocytose est beaucoup plus ubiquitaire que la phagocytose et peut être subdivisé en quatre sous-groupes selon les composants membranaires et les mécanismes impliqués.

La macropinocytose : Elle est également appelée endocytose en phase fluide et elle correspond à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (0,5 à 5µm) appelées macropinosomes. Les vésicules sont formées par de larges protrusions membranaires, soutenues par le cytosquelette d'actine. Cette endocytose est très présente chez les cellules tumorales et chez les cellules dendritiques (Watts 1997).

La pinocytose clathrine dépendante : Visualisée en 1964 par microscopie électronique (Roth et Porter 1964), cette endocytose entraîne la formation de puits recouverts de clathrine très caractéristiques. Elle utilise également des protéines adaptatrices (les AP2) (Pearse and Robinson 1984) et de la dynamine permettant la dissociation vésicule / membrane (De Camilli et al. 1995). Cette voie est prépondérante lorsque des récepteurs membranaires sont mis en jeu pour activer une endocytose.

La pinocytose impliquant la formation des cavéolae : Visualisée depuis 1953 par G. Palade en microscopie électronique, cette endocytose est plus fréquente chez les cellules épithéliales et endothéliales. Elle implique des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en glycosphingolipides (caractéristiques des rafts), ainsi que des protéines spécifiques, les cavéolines, qui se lient au cholestérol (Rothberg et al. 1992). L'endocytose par cavéolae peut être liée à une reconnaissance spécifique, comme pour le virus SV40 (Pelkmans et al. 2001).

La pinocytose indépendante des clathrines et des cavéolines : Elle est considérée comme faisant entrer des molécules dans des vésicules d'endocytose qualifiées de « nues », c'est-à-dire sans structures visibles autour des vésicules en microscopie électronique. Encore peu caractérisée, elle peut être avec ou sans dynamine ou flotilline (Brandenburg et al. 2007, Frick et al. 2007). Cette pinocytose permet notamment l'entrée de l'interleukine-2 après fixation sur son récepteur dans les lymphocytes. Elle permet également l'internalisation de virus comme le virus influenza (Rust et al. 2004).

Il est intéressant de noter que ces voies de pinocytose permettent l'entrée de macromolécules et de nanovecteurs divers. Ces objets semblent même pouvoir entrer dans la cellule en impliquant ces voies de pinocytose, alors qu'ils ont un diamètre supérieur au diamètre des vésicules de pinocytose (reporté en Figure 37). Une étude récente permet un début d'explication de ce phénomène. En effet, Saffarian *et al.* ont montré que la pinocytose clathrine dépendante pouvait entraîner la formation et l'entrée de plaques de pinocytose recouvertes de clathrine qui présentent un diamètre beaucoup plus important que les vésicules recouvertes de clathrine (Saffarian et al. 2009).

Après l'endocytose, mais également comme après tous les autres méthodes de franchissement de membrane, les principes actifs encore associés ou non à des nanovecteurs devront faire face à deux autres types de barrières biologiques. En effet, il leur faudra se mouvoir jusqu'à leurs sites d'action moléculaire et éviter les systèmes d'éliminations cellulaires rencontrés sur le chemin (comprenant l'élimination par dégradation enzymatique et l'élimination par reflux).

b) Les cheminements intracellulaire

Le cheminement intracellulaire du principe actif, encore associé ou non à un vecteur, se fait selon sa localisation : soit par diffusion dans le milieu intracellulaire, soit en suivant le trafic intracellulaire des vésicules. Afin de détailler les divers facteurs impliqués dans ces deux types de cheminement, nous illustrerons notre propos en nous focalisant sur les cheminements intracellulaires qui suivent le franchissement de la membrane plasmique.

■ La diffusion dans le hyaloplasme :

Un principe actif, associé ou non à un nanovecteur, peut atteindre le hyaloplasme en franchissant la membrane plasmique ou celle d'un organelle intracellulaire (ex : endosome). Dans le hyaloplasme, le principe actif ou le nanovecteur devra se mouvoir jusqu'à son site d'action moléculaire, qu'il soit dans le hyaloplasme ou dans un organelle (ex : noyau). Or ce cheminement est freiné par le hyaloplasme, c'est-à-dire le cytosol et le cytosquelette.

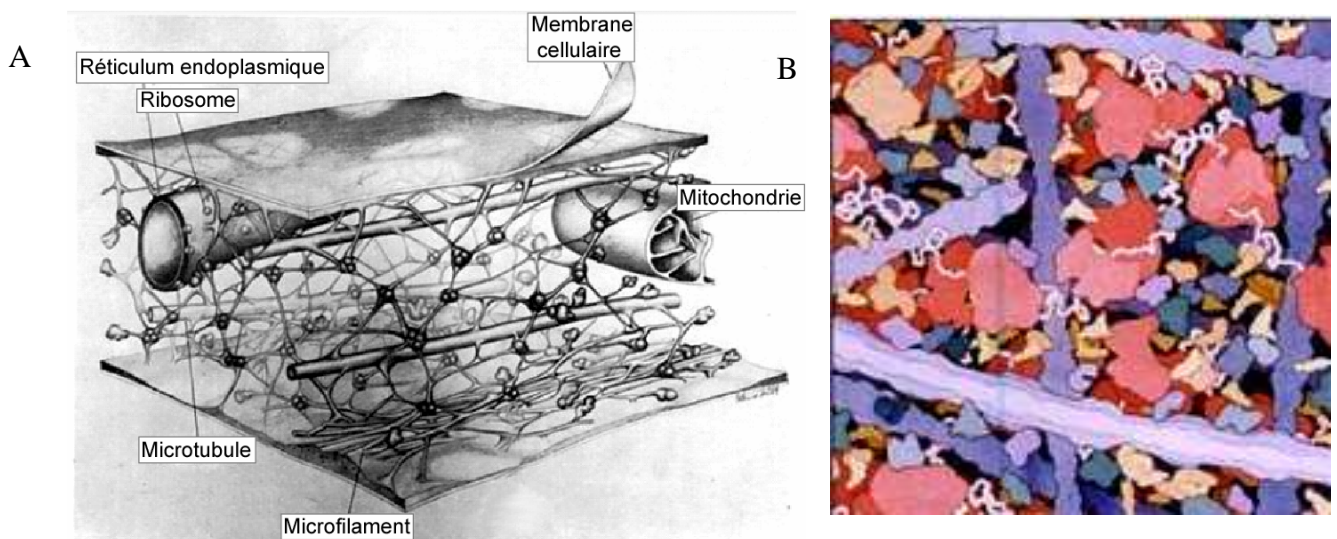


Figure 38. **A** : Illustration du cytosquelette (extrait du livre « Anatomie microscopique: atlas de microscopie optique et électronique » - de Pietro Motta – 1988) ; **B** : Illustration de l'encombrement du hyaloplasme montrant des ribosomes (en rouge), diverses protéines (en beiges, vert et bleu), des acides nucléiques (en blanc) (extrait du livre « Biologie cellulaire » de T-D Pollard, W-C Earnshaw - 2004)

Le cytosol est la phase aqueuse du hyaloplasme, il est composé d'eau, d'ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.), de protéines (ex : des ribosomes), d'ARN, ainsi que de nombreux autres constituants (ex : des glucides, des acides aminés). Sa composition exacte change constamment et diffère selon la fonction de la cellule et son activité. Ce changement entraîne la modification des caractéristiques physiques du cytosol (viscosité, hydratation, fluidité, plasticité, contractilité, etc.). Le hyaloplasme comporte également le cytosquelette qui est composé de l'ensemble des éléments : microfilaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires. Ces éléments forment des structures tridimensionnelles reliant la membrane plasmique aux autres structures cellulaires comme sur la Figure 37A. Cet ensemble de structures dynamiques sera responsable de la forme de la cellule, de ses mouvements, de ceux des organites et des vésicules intracellulaires, mais aussi des mouvements de certaines protéines et de certains ARNs (Ainger et al. 1993, Vale 2003).

Bien que tous les éléments du cytosol soient mobiles, ils constituent, avec le maillage du cytosquelette, un milieu de diffusion très encombré comme l'illustre la Figure 38B. Par conséquent un principe actif ou un nanovecteur sera freiné dans sa diffusion par l'encombrement stérique, mais aussi par différentes interactions (ex : interactions ioniques, hydrophobes) avec les constituants du hyaloplasme, pouvant aller jusqu'à l'immobiliser (Luo and Saltzman 2000, Pelkmans and Helenius 2003). Ce phénomène a notamment été décrit pour les oligonucléotides, ce révélant un facteur important, parmi d'autres pour leur efficacité. En effet dans le cas d'un plasmide, il a été montré que son efficacité était beaucoup plus grande s'il était amené directement dans le noyau plutôt que dans le hyaloplasme. L'une des raisons invoquées pour expliquer cette différence d'efficacité est la difficulté avec laquelle le plasmide diffuse dans le hyaloplasme (Dowty et al. 1995). Les paramètres influençant cette

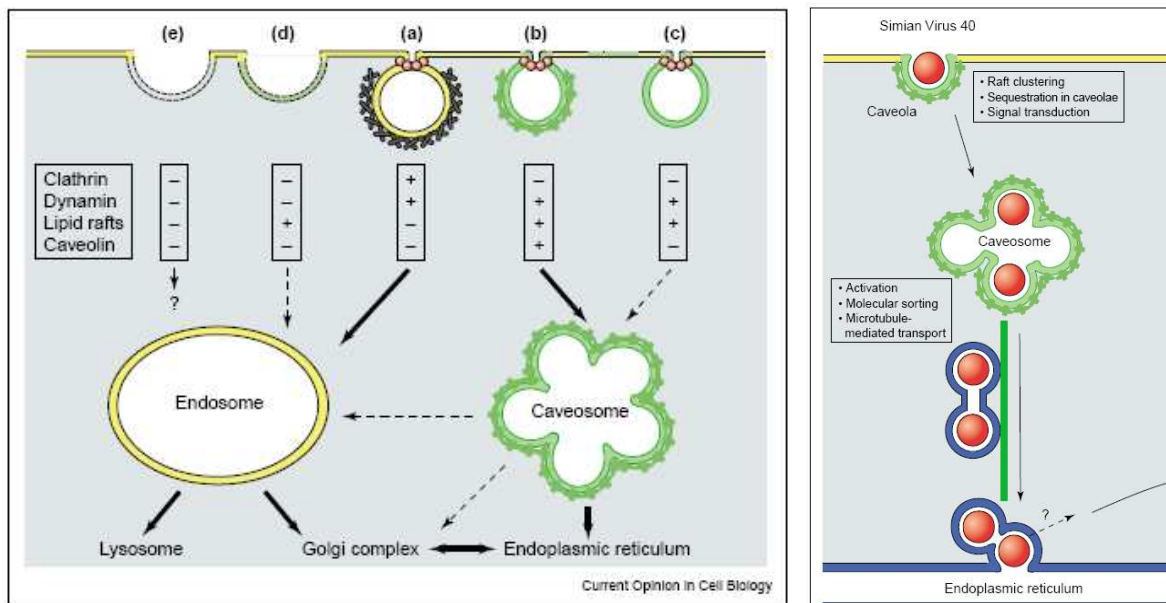
faible mobilité dans le hyaloplasme ont été identifiés comme étant principalement la taille et la conformation (linéaire ou compactée) du plasmide (Ward et al. 2001), mais également les accroches à des composants anioniques comme l'actine (Xu and Szoka 1996).

De plus en plus étudié, cet aspect de l'utilisation des nanovecteurs a déjà révélé qu'ils pouvaient aider à franchir cette barrière biologique. En effet il a été montré qu'après avoir employé certains nanovecteurs pour franchir des membranes, l'ADN devenait plus compact. Il présente alors une taille plus petite et une structure moins linéaire, améliorant ainsi sa mobilité dans le hyaloplasme et par conséquent l'efficacité de la transfection (Pollard et al. 1998). D'autres études ont montré que des nanovecteurs pouvaient être conçus pour améliorer le franchissement des membranes, mais aussi le cheminement intracellulaire des principes actifs encore encapsulés dans les nanovecteurs (Akita et al. 2009). Il est même envisageable d'utiliser le cytosquelette pour véhiculer les principes actifs dans la cellule, comme certains ARNs qui utilisent le cytosquelette pour se déplacer dans les oligodendrocytes (Ainger et al. 1993).

■ **Le trafic vésiculaire :**

L'autre cheminement possible dans la cellule implique les vésicules intracellulaires qui se déplacent grâce au cytosquelette. En conséquence les principes actifs ou les nanovecteurs contenus dans ces vésicules vont cheminer de manière active dans le hyaloplasme. Cependant leur itinéraire sera alors dépendant de ces vésicules et de leurs centres d'aiguillage. Par exemple dans le cas de la phagocytose, la vésicule venant de la membrane plasmique n'aura pour destination que de s'associer aux lysosomes, envoyant ainsi son contenu vers une

dégradation. En revanche les vésicules qui proviennent d'une endocytose peuvent véhiculer leurs contenus vers de multiples organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, lysosome, etc.). Ces itinéraires et les paramètres les influençant peuvent être différents selon le type de cellule et son activité. Le trafic vésiculaire (également appelé diffusion facilitée), ainsi que le devenir du contenu des différentes vésicules issues de l'endocytose font encore l'objet de débats. Cependant il est possible d'établir un consensus sur certaines structures et certaines étapes-clés des itinéraires de ces vésicules. Dans la suite de notre exposé, nous nous fonderons sur les étapes et les structures décrites par Pelkmans et Helenius en 2003.



- **Les principaux centres d'aiguillage :**

L'un des consensus établi sur le trafic intracellulaire des vésicules issues de l'endocytose, est qu'elles convergent vers des organites de tri qui détermineront le devenir de leur contenu. Par conséquent les vésicules d'endocytose vont fusionner ensemble ou avec des organites

préexistants. Cette fusion membranaire est contrôlée par un type de protéines appelées les SNAREs pour « Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Proteins Receptor » (Sollner et al. 1993). Ces protéines sont généralement classées en deux groupes : les V-SNARE (V car ces molécules sont à la surface des vésicules) et les T-SNARE (T pour « target » qui sont sur les compartiments recevant les vésicules). Actuellement deux destinations préférentielles sont identifiées juste après la formation des vésicules : l'endosome précoce, également dénommé endosome de tri, et le cavéosome.

- L'endosome précoce (également appelé endosome de tri) : Il s'agit d'un compartiment intracellulaire formant un réseau tubulo-vésiculaire (Gruenberg and Maxfield 1995), dont le pH est de 6,5 (Demaurex 2002). Les vésicules issues de plusieurs voies d'endocytose semblent y converger pour que leurs contenus y soient triés, comme le montre la Figure 39. C'est en effet l'organite de tri de la plupart des endocytoses déclenchées par l'activation d'un récepteur membranaire. Sa fonction d'aiguillage du contenu des vésicules d'endocytose vers d'autres organites (Hopkins et al. 1990), fait de lui une structure très dynamique. En effet sa composition évolue constamment par un apport ou une perte de membrane et de contenu arrivant des vésicules d'endocytose, ou partant vers les organites suivants. Cependant il est a été possible d'identifier des marqueurs spécifiques de cet organite, comme la protéine Rab5 (une protéine GTPase contribuant à la mobilité endosome) (Zerial and McBride 2001). Plusieurs destinations sont possibles à partir de cet endosome ; les plus clairement identifiées étant l'endosome tardif, l'endosome de recyclage et l'appareil de Golgi.

- Les cavéosomes : Identifiées beaucoup plus récemment, en suivant le trafic intracellulaire du virus simien 40 (SV40) (Pelkmans et al. 2001), les fonctions exactes de cet organite restent encore controversées. Les cavéosomes sont des organites plurilobés, riches en cavéoline-1, ils ont une distribution éparse dans tout le hyaloplasme (Pelkmans and Helenius 2003). Contrairement aux endosomes précoces, les cavéosomes ont un pH neutre et ne présentent pas de marqueurs classiques des endosomes (de tri, de recyclage ou tardif), comme des protéines Rab. Les voies d'endocytose cavéoline dépendantes et les voies cavéoline/clathrine indépendantes mais dépendantes de la dynamine, viendraient fusionner avec les cavéosomes, comme le montre la Figure 39. Très dynamique comme l'endosome précoce, les cavéosomes ont montré leur capacité comme site d'aiguillage, notamment pour le SV40 qui sera redirigé vers le réticulum endoplasmique (Pelkmans et al. 2001) et pour la choléra toxine qui sera redirigée vers l'appareil de Golgi (Le and Nabi 2003, Nabi and Le 2003, Nichols et al. 2001). Ils peuvent également communiquer avec l'endosome précoce (Pelkmans et al. 2004). Cette capacité serait impliquée dans ses autres fonctions, comme la séquestration des récepteurs pour diminuer leur activation. C'est par exemple le cas du récepteur du TGF β (Transforming growth factor beta) qui serait séquestré dans les cavéosomes pour diminuer son activation (Di Guglielmo et al. 2003, Razani et al. 2001).

La maîtrise du cheminement intracellulaire de ces vésicules permettra d'adresser les principes actifs et les nanovecteurs vers les organites désirés. Ces organites pouvant être soit le lieu de localisation de leurs sites d'action, soit un organite qui constituera un lieu de passage

nécessaire au nanovecteur dans son itinéraire. Ces organites peuvent alors être ceux les plus proche du compartiment cellulaire cible (ex : le noyau) ou bien un organite avec des caractéristiques nécessaires à la maturation du principe actif ou à sa libération du nanovecteur (ex : les lysosomes). Cette maîtrise passe par la détermination des différents paramètres influençant ce trafic vésiculaire, comme la taille, la charge de surface du nanovecteur. Cependant même si tous ces paramètres ne sont pas encore identifiés et maîtrisés, plusieurs stratégies ont déjà été développées pour modifier ce trafic vésiculaire.

- **Les stratégies visant à influencer le trafic intracellulaire :**

Pour modifier l'itinéraire d'un principe actif ou d'un nanovecteur se trouvant dans une vésicule d'endocytose, il faut avant tout connaître sa destination naturelle et surtout sa destination souhaitée. En effet ces deux prérequis sont indispensables puisque la destination désirée d'un principe actif pourra être celle à éviter pour un autre principe actif. Par exemple, la destination que cherchent le plus à éviter les nanovecteurs est le lysosome, alors que certains traitements cherchent justement à l'atteindre. C'est en particulier le cas des liposomes chargés en enzymes lysosomales qui doivent atteindre les lysosomes pour compenser la défaillance de ces enzymes chez ces malades (Gregoriadis 1978, Gregoriadis and Dean 1979). Une fois que la destination naturelle et celle désirée sont connues, plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour mettre en adéquation ces deux destinations. La majorité des stratégies développées, l'ont été pour éviter l'orientation vers les lysosomes puisque cette destination entraîne généralement la dégradation des principes actifs et des nanovecteurs. Cependant toutes ces stratégies n'agissent généralement que sur deux étapes clés de l'itinéraire d'une vésicule d'endocytose. Elles agissent soit sur le choix de la voie d'endocytose empruntée pour entrer dans la cellule, soit sur l'orientation déterminée dans les centres d'aiguillages.

- Changer de voie d'endocytose : Comme nous l'avons vu précédemment toutes les voies d'endocytose ne mènent pas au même compartiment d'aiguillage et ces organites n'ont pas le même potentiel de redirection. Par conséquent pour changer de destination, une des stratégies imaginées fut de changer de voie d'endocytose pour changer d'organe de tri. Donc pour éviter les lysosomes, ces stratégies tentent de ne plus faire rentrer les nanovecteurs par des voies conduisant aux lysosomes, comme la voie clathrine dépendante, mais de leur faire emprunter des voies n'y conduisant pas comme la voie des cavéoles. Pour maîtriser cette stratégie, il faut bien connaître les différents paramètres déterminant l'entrée des nanovecteurs : leur taille, leur charge, leur hydrophobie de surface, les sites de reconnaissance, les éléments biologiques impliqués, etc. C'est pour améliorer ces connaissances que nous avons testé plusieurs de ces paramètres, en utilisant différents nanovecteurs. Cette stratégie a en effet déjà prouvé son efficacité, notamment si on modifie la surface du nanovecteur par divers peptides (del Pozo-Rodriguez et al. 2009, Mudhakar et al. 2008) ou diverses molécules, comme l'acide folique (Gabrielson and Pack 2009). Ces modifications ont ainsi permis à ces nanovecteurs d'entrer par la voie caveoline dépendante au lieu d'emprunter la voie clathrine dépendante.

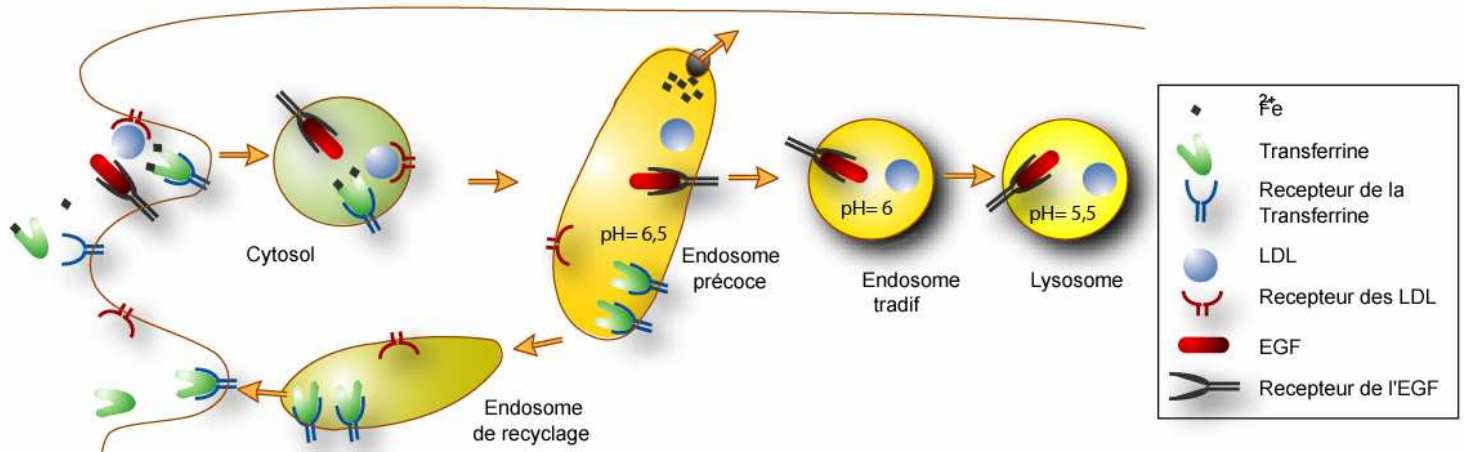


Figure 40. Illustration du trafic vésiculaire des LDLs, des EGF recteurs et de la transferrin

- Changer l'orientation dans le compartiment de tri : En effet par leur fonction, les organites de tri n'adressent pas tout leur contenu vers le même compartiment intracellulaire, même si des composés y arrivent en suivant la même voie d'endocytose. C'est par exemple le cas de la transferrine, des LDL et des récepteurs EGF (Epidermal Growth Factor) qui sont internalisés par la voie d'endocytose clathrine dépendante et qui arrivent tous dans l'endosome précoce. Cependant, la transferrine et son récepteur sont dirigés vers l'endosome de recyclage pour revenir à la surface de la cellule (Ghosh and Maxfield 1995). Alors que les LDL sont séparés de leurs récepteurs dans l'endosome précoce. Ainsi les récepteurs des LDL iront vers l'endosome de recyclage, alors que les LDL et les récepteurs EGF seront orientés vers les lysosomes (Dunn and Maxfield 1992, Dunn et al. 1989). Pour maîtriser ces stratégies, il faut donc connaître les différents paramètres déterminant ces orientations. Certains d'entre eux ont déjà été identifiés, comme les motifs cytoplasmiques spécifiques de certains récepteurs qui les orientent vers les lysosomes (Gruenberg and Maxfield 1995). La charge de surface d'un nanovecteur a également été identifiée comme un paramètre déterminant l'orientation du nanovecteur dans l'endosome précoce. Ainsi une

charge de surface négative tend à aiguiller les nanovecteurs vers les lysosomes (Lai et al. 2007, Rejman et al. 2004). De nombreuses stratégies cherchent à modifier cet adressage, notamment en utilisant des peptides d'adressage, des composants influençant l'orientation ou bien en utilisant des constituants qui changent de charge selon le pH. Pour les nanoparticules de PLGA, on a déjà montré que le pH légèrement acide de l'endosome précoce, entraîne la modification de la charge de surface des nanoparticules. Ce pH rend les nanoparticules cationiques, ce qui leur fait éviter une orientation vers les lysosomes (Panyam et al. 2002).

Après avoir franchi les barrières biologiques que sont les membranes et le cheminement intracellulaire, les principes actifs encore associés ou non à des nanovecteurs devront encore franchir un dernier type de barrière biologique. Il s'agit des systèmes d'élimination cellulaire.

c) Les systèmes d'élimination

En effet sur le chemin d'accès ou dans le lieu où est localisé le site d'action peuvent se trouver différents systèmes qui conduisent à l'élimination du principe actif ou d'un nanovecteur. Ces systèmes peuvent être classés en deux catégories : les systèmes d'élimination par dégradation ou dénaturation et les systèmes d'élimination par reflux.

■ Les systèmes d'élimination par dégradation :

Indispensables à la cellule pour son métabolisme, de nombreuses enzymes et caractéristiques des milieux forment des conditions très réactives. Ces conditions sont capables de dénaturer ou dégrader des macromolécules jusqu'à leurs plus simples unités. En conséquence si des principes actifs ou des nanovecteurs rentrent en contact avec ces milieux ou ces enzymes, ils seront inactivés en étant dénaturés ou dégradés. Ces conditions sont le plus souvent restreintes à un organite, mais peuvent également exister dans le hyaloplasme. C'est par exemple le cas des nucléases qui limitent très fortement l'efficacité de thérapies impliquant des oligonucléotides (Neves et al. 1999). En effet les oligonucléotides nus sont très vulnérables à ces phosphodiesterases, ainsi le temps de demi-vie d'un plasmide n'est estimé qu'entre 50 et 90 minutes dans le hyaloplasme (Lechardeur et al. 1999). Il existe également des conditions particulièrement dégradantes comme les conditions acides qui sont principalement contenues dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Ces deux compartiments possèdent en effet de nombreuses pompes V-ATPases responsables de l'acidification de leur milieu (Kane 2006). Cette acidité, inférieure à 6 pour les endosomes tardifs et inférieure à 5,5 pour les lysosomes, est déjà très dénaturante, mais elle sert surtout à activer des enzymes (Demaurex 2002, Maxfield and McGraw 2004). Ces enzymes sont principalement des lipases, des glycosides hydrolases, des protéases et des nucléases. Enfin il faut également citer les conditions oxydantes. Principalement contenues dans les péroxysomes et les mitochondries, ces conditions sont liées à la présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette molécule extrêmement réactive est produite par les mitochondries, puis elle est utilisée par les peroxysomes notamment pour dégrader des acides gras. Pour assurer sa fonction de détoxification, le peroxysome comporte également de nombreuses enzymes, comme des catalases et des oxydases. Ces enzymes et le peroxyde d'hydrogène forment alors des conditions très dégradantes.

■ **Les systèmes d'élimination par reflux :**

Il s'agit de systèmes permettant un efflux du principe actif hors de l'organite ou de la cellule renfermant le site d'action moléculaire. Ils font écho aux phénomènes permettant le franchissement naturel des membranes biologiques. Ainsi il est possible d'en distinguer deux formes. Les systèmes utilisant un transport vésiculaire et ceux utilisant des transports actifs faits de protéines membranaires.

Le premier système d'élimination correspond surtout au trafic vésiculaire entraînant une exocytose. Il s'agit d'un système naturel de transport vésiculaire vers le milieu extracellulaire. Les vésicules sortantes proviennent essentiellement de l'appareil de Golgi ou de l'endosome de recyclage (Mukherjee et al. 1997, Steinman et al. 1983). Ces deux transports permettent de faire ressortir des déchets, d'apporter de nouveaux composants à la membrane et de recycler les éléments rentrés par endocytose. Ainsi les principes actifs ou les nanovecteurs empruntant ces voies au cours de leur cheminement intracellulaire risquent de revenir à leur point de départ. Le défi de ces systèmes de reflux vésiculaire renvoie donc au défi de l'orientation du trafic vésiculaire évoqué précédemment.

Le deuxième système correspond surtout aux pompes d'efflux. Il fait principalement écho au franchissement de membrane par diffusion. En effet il s'agit de transporter des molécules pour leur faire franchir une membrane par un transport actif, ne tenant donc pas compte de la différence de concentration entre les deux côtés de la membrane. Ce système est principalement assuré par des transporteurs de la famille des transporteurs ABC pour « ATP-binding cassette ». Le transporteur le plus connu de cette famille est la P-glycoprotéine (P-

gp), aussi dénommé MDR1 (Juliano and Ling 1976). Ces transporteurs sont très présents à la surface de nombreuses cellules de l'organisme, principalement dans le foie, les reins, l'intestin, mais aussi au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Rao et al. 1999). Cependant ces transporteurs sont surtout connus pour être très présents à la surface des cellules tumorales, limitant ainsi fortement l'efficacité des chimiothérapies (Gottesman et al. 2002). Ils permettent le transport de très nombreux substrats qui sont tous hydrophobes ou amphiphiles et d'un poids moléculaire inférieur à 1900 Da (Schinkel et al. 1997). Ces transporteurs ont pour objectif de diminuer la concentration intracellulaire de leurs substrats. Ils peuvent servir pour accélérer l'élimination des déchets cellulaires, notamment ceux du parenchyme cérébral au niveau de la BHE (Borst et al. 1999). Cependant leur effet le plus étudié reste l'efflux de principes actifs, comme le paclitaxel hors des cellules tumorales (Ramachandra et al. 1998, Schinkel et al. 1997).

■ **La protection contre les systèmes d'élimination par utilisation de nanovecteurs :**

Les nanovecteurs permettent d'offrir plusieurs types de protection face à ces systèmes d'élimination. D'abord, les nanovecteurs peuvent exercer une protection directe sur le principe actif en le rendant inaccessible aux conditions dénaturantes et aux pompes d'efflux. Ainsi dans le cytoplasme, des nanovecteurs peuvent alors servir de réservoir intracellulaire de principe actif et aider ces molécules cheminant dans tout le cytoplasme (Deniger et al. 2006, Kunisawa et al. 2005). Ils peuvent alors délivrer leurs principes actifs près de leurs sites d'action ou les aider à franchir de nouvelles barrières membranaires, comme les membranes nucléaires (Akita et al. 2009). Ensuite, ils permettent d'éviter des compartiments cellulaires impliqués dans l'élimination des principes actifs. Cet évitement peut se faire en changeant le

cheminement intracellulaire des molécules thérapeutiques, comme nous l'avons détaillé précédemment, notamment en changeant de voie d'endocytose (del Pozo-Rodriguez et al. 2009).

Enfin, les nanovecteurs peuvent permettre de rendre inefficace ces systèmes d'élimination, en faisant entrer beaucoup plus de principe actif, ce qui sature les enzymes et les pompes d'efflux. Ils peuvent véhiculer, en plus du principe actif, des inhibiteurs de ces systèmes ou agir pour annuler les conditions dégradantes. C'est par exemple le cas des stratégies visant à inactiver l'acidification des lysosomes, en utilisant des molécules inhibant l'acidification des lysosomes, pour diminuer l'activité des hydrolases acides (Huss and Wieczorek 2009). Une autre stratégie est par exemple de déstabiliser les lysosomes pour que les enzymes soient inactivées par le pH neutre du cytoplasme (Akinc et al. 2005, Sonawane et al. 2003). Cependant ces stratégies sont limitées par la toxicité qu'elles induisent.

2. Les conséquences de l'utilisation des nanovecteurs

Le recours à des nanovecteurs procure de nombreux avantages, notamment pour franchir les diverses barrières biologiques limitant l'accès aux cellules ou aux sites d'action moléculaire. Cependant l'utilisation des nanovecteurs engendre également des conséquences dont il faut tenir compte. Ces conséquences peuvent être classées en deux catégories :

- **Les contraintes liées à l'encapsulation d'un principe actif :**

Lorsqu'un nanovecteur est utilisé pour véhiculer une molécule thérapeutique, cette stratégie a pour objectif d'augmenter l'efficacité de cette molécule. Seulement pour réaliser cet objectif, plusieurs contraintes doivent être prises en compte. Il faut déjà réussir à charger le principe actif dans un nanovecteur et que celui-ci permette de franchir toutes les barrières biologiques rencontrées. Enfin, après avoir franchi toutes ces barrières, il faut encore que le principe actif soit libéré du nanovecteur sous forme active pour qu'il puisse agir. Moins étudié que les contraintes de chargement dans un nanovecteur et de franchissement des barrières biologiques, la libération du principe actif n'en reste pas moins déterminante pour son efficacité. Certains nanovecteurs tiennent déjà compte ce paramètre, comme ceux ayant une libération contrôlée (déclenchée par le pH (Van Butsele et al. 2009) ou un champ magnétique etc.) (Kabanov and Vinogradov 2009). Cependant lorsque cette libération est étudiée, c'est en général dans le milieu de stockage pour connaître la stabilité et la conservation de l'encapsulation ou bien dans des milieux biologiques artificiels pour évaluer leur stabilité in situ, comme dans les milieux gastro-intestinaux (Roger et al. 2009). Il existe cependant quelques données sur cette libération mais dans une cellule elles concernent principalement la décomplexation de l'ADN et des composants du nanovecteur (Zabner et al. 1995, Zelphati and Szoka 1996). Ainsi il a été montré que la libération de l'ADN d'un nanovecteur pouvait prendre entre 1 et 2 heures, et qu'elle pouvait être aidée par la présence de certains lipides comme le DOPE (Cornelis et al. 2002, Fasbender et al. 1997). Enfin il a été montré que l'ADN ainsi libéré pouvait être plus condensé améliorant ainsi son efficacité (Ward et al. 2001).

C'est pour répondre à ce besoin d'évaluation que nous avons étudié l'effet des interactions cellules/nanovecteurs sur l'intégrité du nanovecteur, par imagerie spectrale (Chapitre 3). Cette technique nous permettra de suivre le changement de spectre d'émission

des molécules fluorescentes incorporées dans les nanovecteurs testés (les LNCs), selon leurs environnements moléculaires.

■ **Les effets propres du nanovecteur sur la cellule :**

En effet si les nanovecteurs sont conçus pour faire franchir diverses barrières biologiques à des principes actifs, c'est qu'ils ont des effets indépendants du principe actif sur les cellules. Ces effets sont divers et il convient de les connaître pour choisir entre ceux qui sont acceptables voire avantageux et ceux qui sont à éviter selon l'utilisation désirée. Parmi ces effets, il y a les réactions inflammatoires (Yew et al. 1999, Yew et al. 2000), le décollement des cellules, mais le principal effet qu'il convient de particulièrement bien appréhender est la toxicité de ces nanovecteurs (Peer et al. 2007). En effet, bien que l'emploi de nanovecteurs puisse diminuer les effets toxiques indésirables de certains composés (Gabizon et al. 1993), ces objets restent en eux-mêmes toxiques. Ce n'est qu'une question de dose et de temps d'exposition. Il faut donc en connaître la toxicité, mais surtout les composants qui en sont responsables pour en limiter l'usage. Ainsi il sera possible d'établir les meilleures conditions d'utilisation apportant un risque de toxicité le plus bas possible pour une efficacité thérapeutique la plus élevée possible. Parmi les composés déjà identifiés comme favorisant la toxicité des nanovecteurs, il y a notamment les lipides cationiques ayant un ammonium quaternaire. Ces lipides sont surtout utilisés pour se complexer avec l'ADN (Scheule et al. 1997, Tousignant et al. 2000). Des solutions de remplacement, ont été proposées comme l'utilisation de groupes pyridinium ou la guanidine, qui restent des lipides cationiques mais dont la toxicité est plus faible (Moreau et al. 2002). Cependant la toxicité pourrait également être liée aux stratégies de franchissement de barrière biologique utilisées par les nanovecteurs.

C'est par exemple le cas de celles lysant les lysosomes, puisque cette lyse à forte dose, entraîne la mort de la cellule (Boya and Kroemer 2008, Dubowchik et al. 1995).

3. Modèle de glioblastome :

Pour évaluer les comportements biologiques des nanoparticules polymériques faites de poly(lactic-co-glycolic acid) (NP-PLGA), polysaccharidiques (NPS) et les nanocapsules lipidiques (LNC), lors de leurs interactions avec des cellules de glioblastome, nous avons utilisé des cellules tumorales de lignées établies de glioblastome (les cellules F98). Mais plusieurs modèles cellulaires sont déjà validés comme reproduisant un gliome de haut grade, spécialement chez les rongeurs. Pour cela plusieurs critères ont été évalués, notamment le fait que ces cellules dérivent de cellules gliales, et qu'elles ont une croissance prévisible et reproductible (Barth 1998). Parmi les modèles cellulaires les plus employés, il y a les cellules F98, les 9L et les C6. Les cellules F98 sont des cellules issues d'un gliome induit par l'injection de N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) chez une ratte Fisher au 20^{ème} jour de gestation (Barth 1998). Implantées, ces cellules reproduisent de nombreux critères des glioblastomes, comme leur caractère infiltrant et une grande résistance à un grand nombre de thérapie. Pour la radiorésistance, il semble que se soit les cellules 9L les plus résistantes (Bencokova et al. 2008), expliquant leur fréquente utilisation. Cependant morphologiquement et histologiquement, il semble que ce soit les F98 les plus proches du glioblastome humain ; elles expriment par exemple la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP). Nous avons donc choisi de les prendre pour modèle cellulaire, non seulement, pour leur plus grande ressemblance avec les glioblastomes humains, mais aussi à cause de leur forte

reproductibilité, la régularité et la rapidité de leur croissance et parce qu'elles font partie des cellules les plus utilisées comme cellule-modèle.

Nous avons utilisé, les cellules F98 ainsi que d'autres modèles et tests précédemment décrits afin d'évaluer l'influence des paramètres de charge de surface, d'hydrophobicité, de taille et de recouvrement des nanovecteurs (NP-PLGA, NPS et LNC), sur leurs aptitudes à franchir différentes barrières biologiques. Puis nous avons cherché à évaluer l'influence de ces paramètres sur l'intégrité du nanovecteur soumis aux diverses interactions cellulaires.

Toutes ces études sont regroupées dans les trois chapitres suivants :

- Chapitre 1 : Barrières tissulaires : regroupant les barrières biologiques rencontrées lors d'une administration intraveineuse et locorégionale.

- Chapitre 2 : Barrières cellulaires et subcellulaires.

- Chapitre 3 : L'intégrité des nanovecteurs dans les cellules cible lorsqu'ils interagissent avec les cellules F98.

Enfin un dernier chapitre sera consacré à une discussion générale et à l'ouverture de nouvelles perspectives.

Chapitre 1 :

Barrières tissulaires

Dans ce chapitre sont présentés différents travaux originaux se rapportant au comportement des nanovecteurs vis-à-vis des barrières tissulaires rencontrées lors de l'administration intraveineuse et plus particulièrement ici la barrière sanguine. Ce comportement pour les LNCs ayant déjà été décrit par Vonarbourg *et al.* et Beduneau *et al.* dans cet environnement, seront concernées d'une part les NPS et d'autre part les PLGA-NPs. Ces études ont été réalisées en collaboration avec M. le Pr Didier Betbeder, Mme le Dr Jiang Chang et Mme Maya Kroubi, de l'EA 2689 - IFR 114 de Lille. Ces travaux sont regroupés sous la forme de deux articles, le premier est paru dans la revue «Pharmaceutical Research» et l'autre est en cours de soumission.

La première publication est intitulé « Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers » (Paillard *et al.* 2009). Il porte sur la caractérisation du chargement des NPSs de charge cationique (NP⁺), en BSA et/ou en phospholipides anioniques, avec le dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG). Cet article regroupe également les travaux évaluant l'effet de la charge des NPSs et du chargement des NP⁺s, en BSA ou DPPG, sur leurs interactions avec les protéines du complément. Ces interactions ont été évaluées à l'aide du test CH50.

La deuxième publication a pour titre « Protein adsorption onto the surface of PLGA nanoparticles governs their interactions with biological systems ». Les travaux présentés dans cet article évaluent l'effet de l'adsorption de transferrine ou de BSA à la surface des PLGA-NPs sur leurs interactions avec les protéines du complément (à l'aide du test CH50). Ils permettent également de caractériser l'influence de ces adsorptions sur le comportement de ces nanovecteurs avec les cellules F98, les astrocytes, mais aussi les cellules THP-1 qui modélisent les monocytes ou les macrophages.

Le comportement de ces nanovecteurs vis-à-vis de la barrière hémato-encéphalique ou la possibilité d'injecter ces nanovecteurs directement dans le système nerveux central ont également été appréhendés, grâce à une collaboration interne ou à des travaux antérieurs à la thèse, qui ont fait l'objet de deux autres publications présentés en annexe. La première, « Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro » est parue dans la revue « International Journal of Pharmaceutics » (Jallouli et al. 2007). La seconde parue dans la revue « Journal of Neuro-Oncology » s'intitule « In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy » (Vinchon-Petit et al. 2009).

Publication n°1 :

« Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers»

Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers

Archibald Paillard ^a, Catherine Passirani ^{a#}, Patrick Saulnier ^a, Maya Kroubi ^b, Emmanuel Garcion ^a, Jean-Pierre Benoît ^a, Didier Betbeder ^{b,c}

^a *Inserm U646, Pôle pharmaceutique, CHU d'Angers, Université d'Angers, 10 rue André Boquel, 49100, Angers, France*

^b *EA 2689, IFR 114 laboratoire de physiologie; Université de Lille 2, 1 place de verdun, Lille 59045 cedex, France*

^c *Université d'Artois, Rue du Temple, Arras, 62000, France.*

[#] Corresponding author: Catherine Passirani : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646 ; 10 rue André Boquel, 49100 Angers, France. Tél. : 33 (0)2 41 73 58 50 –Fax : 33 (0)2 41 73 58 53 ; E-mail : catherine.passirani@univ-angers.fr ; Internet : www.u646.angers.inserm.fr

Abstract

PURPOSE: Stealth nanoparticles are generally obtained after modifying their surface with hydrophilic polymers such as PEG. In this study we analysed the effect of a phospholipid (DG) or protein (BSA) inclusion in porous cationic polysaccharide nanoparticle (NP⁺) on their physico-chemical structure and the effect on complement activation. **METHODS:** NP⁺s were characterised in terms of size, zeta potential (ζ) and static light-scattering (SLS). Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) by measuring the residual haemolytic capacity of the complement system. **RESULTS:** DG-loading did not change their size or ζ whereas progressive BSA loading decreased lightly their ζ . An electrophoretic mobility analysis study showed the presence of 2 differently-charged sublayers at the NP⁺ surface which are not affected by DG-loading. Complement system activation, studied via a CH50 test, was suppressed by DG- or BSA-loading. We also demonstrated that NP⁺s could be loaded by a polyanionic molecule such as BSA, after their preliminary filling by a hydrophobic molecule such as DG. **CONCLUSION:** These nanoparticles are able to absorb large amounts of phospholipids or proteins without change in their size or zeta potential. Complement studies showed that stealth behaviour is observed when they are loaded and saturated either with anionic phospholipid or proteins.

Key Words : Haemolytic CH50 test, phospholipid, protein, 'soft' electrophoresis, nanomedicine

1. Introduction

Although new types of drugs (oligonucleotides, peptides, proteins and new anticancer drugs) are produced daily, their final therapeutic relevance, including their specificity and safety, is largely dependent on their bioavailability and specific distribution. These drugs need to be protected from degradation in biological fluids before reaching their targets, and need to be transported to specific sites prior to release. Colloidal drug carriers such as nanoparticles (NPs) or liposomes are expected to fulfil these requirements (1, 2). The main route for a large biodistribution of colloidal drug carriers remains intravenous (*i.v.*) administration (3). Unfortunately, many colloidal drug carriers undergo rapid elimination from the bloodstream and cannot be injected. The reason of this elimination is their recognition by the mononuclear phagocytic system (MPS) (4). This recognition is enhanced by blood-protein adsorption (opsonisation) and, in particular, by the presence of proteins of the complement system (5). Interactions between opsonins and colloidal drug carriers can be evaluated by several tests, such as the haemolytic CH50 test (6, 7). A greater understanding of complement-system protein interactions with particles has allowed the development of different strategies to reduce opsonisation. Normally, without opsonins that are bound or adsorbed on the particle surface, phagocytes are not able to bind or recognise foreign particles. Indeed, some nanoparticles are able to circulate for several hours; up to 45h in mice, rats and humans (8-10). In this case, NPs would have more chance to find their target or to benefit from the Enhanced Permeability and Retention effect (EPR effect), which is a specific characteristic of solid tumour (11, 12). The most common strategy is to modify the nanoparticle surface to create a displayed steric barrier, hence impeding protein adsorption (*e.g.* polyethylene glycol (PEG), heparin, dextran etc.). For this reason, most nanoparticles include PEG polymers in

their formulation in order to decrease complement system activation and macrophage uptake (13).

A drug delivery system based on synthetic polysaccharide nanoparticles has recently been developed (14). These nanoparticles are made of maltodextrin residues reticulated with epichlorhydrin. They can also be grafted with cationic ligands (NP^+ s). Anionic molecules, such as dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DG) can be inserted inside their structure (DGNP^+)(15). They have been used as a delivery system for proteins, or lipophilic drugs inserted in the phospholipid core (15-18). These NPs have also been used by intranasal administration to increase the antinociceptive activity of nasal morphine in mice (19). After sub-lingual administration these cationic nanoparticles loaded with ovalbumin enhanced an induction of tolerance on an asthma model (20). Recently these neutral and cationic nanoparticles have also been shown to cross an *in vitro* model of the blood brain barrier (14, 21). In the present work, we characterised these cationic nanoparticles in terms of anionic model drug-loading (lipid or protein), surface charge study and complement protein activation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Maltodextrin (Glucidex[®]) was purchased from Roquette (France) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DG) from Lipoid[®] (Germany). 1-chloro-2,3-epoxypropan (epichlorhydrin) and glycidyltrimethylammonium chloride (hydroxycholine) came from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France) and bovine serum albumin (BSA) came from Sigma (Steinheim, Germany). Normal human serum (NHS) was provided by the *Etablissement Français du Sang* (Angers, France) and rabbit, anti-sheep, erythrocyte antibodies were supplied by Biomérieux (Sérum hémolytique, Biomérieux, France). NaCl was obtained from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus R system (Millipore, Paris, France) and saturated with N₂. The specific conductivity (18.2mΩ.cm⁻¹) and the surface tension (72mN.m⁻¹) of this quality of water indicated that it was free of surface-active impurities.

2.2. Preparing, loading and labelling nanoparticles

Polysaccharide particles were prepared from US Pharmacopoeia maltodextrin, as described previously (15, 22). Briefly, 100g of maltodextrin was dissolved in 2N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Further, 1-chloro-2,3-epoxypropane (epichlorhydrin), or a mixture of epichlorhydrin and glycidyl-trimethylammonium chloride (hydroxycholine, cationic ligand) was added to make neutral and cationic polysaccharide gels, respectively. The gels were then neutralised with acetic acid and sheared under high pressure

in a Minilab homogeniser (Rannie; APV Baker, Evreux, France). The 60nm neutral and cationic polysaccharide nanoparticles (NP^0 s and NP^+ s respectively) obtained were ultra-filtered on an SGI Hi-flow system (hollow fibre module: 30 UFIB/1 S.6/40 kDa; Setric Génie Industriel, Toulouse, France) to remove low-molecular weight reagents and salts.

Porous cationic nanoparticles (NP^+ s) into which anionic phospholipids were loaded (DGNP^+), were prepared according to Loiseau *et al.* by mixing at 60°C polysaccharide nanoparticles and ethanolic DG for 1 hour at different DG/cationic nanoparticle ratios (w/w) (10%, 30%, 50% and 70%), named $_{10, 30, 50}$ or $_{70}\text{DGNP}^+$ s (15). The addition of DG was performed at a temperature above the gel-to-liquid phase transition temperature of the phospholipid (23).

BSA-loaded nanoparticles (BSANP^+ s and $\text{BSA}/_{70}\text{DGNP}^+$ s) were made by mixing NP^+ s or $_{70}\text{DGNP}^+$ s at 20°C for 10 min. with increasing amounts of BSA at different BSA / NPs ratios (w/w) (100%, 200%, 300%), named $_{100, 200}$ or $_{300}\text{BSANP}^+$ s and $_{100}$ or $_{200}\text{BSA}/_{70}\text{DGNP}^+$ s. After that, NPs were dialysed and packaged after a 0.2 μm filtration.

The binding of BSA or DG to the NPs was evaluated using gel permeation chromatography on Sephadex and was found to be total. Biacore studies confirmed these results (24). Stability studies also showed that even after five days no protein was released from the NPs. DGNP^+ samples of over a year in solution were found to be stable in term of size, zeta potential and lipid insertion (data not shown).

2.3. Size and zeta potential determination

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index of nanoparticles were determined by dynamic light scattering using a Malvern Autosizer 4700 (Malvern Instruments

S.A., Worcestershire, UK) fitted with a 488nm laser beam at a fixed angle of 90°. Measurements were taken at 25°C, with 0.89×10^{-2} Pa.s viscosity and a refractive index of 1.33. The nanoparticles were concentrated at 0.5mg/ml in 15mM NaCl solution, to enable measurements (performed in triplicate), in order to assure a convenient scatter intensity on the detectors. The zeta potential measurements were carried out using a Zeta Sizer 2000 (Malvern Instruments, France) equipped with an AZ-4 cell and were based on the laser-doppler effect. Each sample was properly diluted with 15mM NaCl solution, in order to maintain the number of counts per second to around 600. Three measurements were carried out for each sample and mean values with standard deviations were calculated.

2.4. Static Light Scattering (SLS)

Molecular weight measurements were determined by SLS using a Malvern Autosizer 4700 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) fitted with a 488nm laser beam at a fixed angle of 90°. Measurements used sample time-averaged intensity on a long time-scale relative to molecular diffusion (seconds to minutes) to determine the molecular weight (Mw) (in the typical range of 1kDa to 20MDa) (25, 26). They were taken at 25°C, with 0.89×10^{-2} Pa.s viscosity and a refractive index of 1.33. The nanoparticles were concentrated at 0.5 mg/ml in deionised water.

2.5. Electrophoretic mobility measurements

Electrophoretic mobility (μ) ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) measurements of NP⁺s and ₇₀DGNP⁺s (particle speed in a given electric field) were performed using a Malvern Zeta Sizer 2000.

Measurements were made as a function of NaCl concentrations in water at 25°C, with a dielectric constant of 79, a refractive index of 1.33, viscosity of 0.89×10^{-2} Pa.s, cell voltage of 150V, and a current of 5mA. The nanoparticles were diluted in Milli-Q water and different NaCl concentrations were used: 1.5, 2, 10 and 50mM. Each particle sample was diluted at the concentration of 1.16mg of NP/ml in Milli-Q water and the conductivity was measured at room temperature. Nanoparticle electrokinetic characteristics were determined using 'soft' particle electrophoresis analysis, as described by Ohshima (27), representing the best curve fitting the two-layer model. Analysis was carried out as described previously (28).

2.6. Transmission Electron Microscopy (T.E.M.) of nanoparticles

Electron microscopy images were obtained on a JEOL JEM2010 TEM. The direct observation of ${}_{70}\text{DGNP}^+$ s was carried out by placing 10 μL of ${}_{70}\text{DGNP}^+$ solution onto a copper grid with a porous carbon film. The copper grid was placed on a piece of filter paper, so that buffer solution could be removed by filter paper. Negative staining was obtained by placing 10 μL of 7 % uranyl acetate solution onto a sample grid for 5 minutes. Excess liquid was then removed from the sample by lightly touching the edge of filter paper with the edge of the grid. The sample grids were put in a desiccator overnight before the T.E.M. examination took place.

2.7. Complement activation

Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) by measuring the residual haemolytic capacity of the complement system after contact with NP^0 s, NP^+ s, 10, 30, 50

and $_{70}\text{DGNP}^{\text{+s}}$ or $_{100, 200}$ and $_{300}\text{BSANP}^{\text{+s}}$. The technique consisted in determining the amount of serum required to haemolyse 50 % of a fixed number of sensitised sheep erythrocytes (CH50 units). A veronal-buffer saline containing 0.15mM Ca^{2+} and 0.5mM Mg^{2+} was prepared as previously described (VBS⁺⁺) (7). Sheep erythrocytes were sensitised by rabbit anti-sheep erythrocyte antibodies and suspended at a final concentration of 1.10^8 cells/ml in VBS⁺⁺. To assess the consumption of CH50 units in the presence of the particles during a constant incubation time, increasing amounts of particle suspensions were added to NHS diluted in VBS⁺⁺ so that the final dilution of NHS in the reaction mixture was $\frac{1}{4}$ (V/V) in a final volume of 1ml. After 60 minutes of incubation at 37°C with gentle agitation, the suspension was diluted at $\frac{1}{25}$ (V/V) in VBS⁺⁺ then aliquots at different dilutions were added to a given volume of sensitised sheep erythrocytes. After 45 minutes of incubation at 37°C, the reaction mixture was centrifuged at 2,000rpm for 10 minutes. The absorption of the supernatant was determined at 415nm with a microplate reader (Multiskan Anscnt, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France) and compared to the results obtained with the control serum. After determining the CH50 units remaining in the serum, the results were expressed as the consumption of CH50 units as a function of the nanoparticle surface area calculated as described elsewhere (28) in order to compare nanoparticles of different average diameters.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of DG or BSA insertion in NP⁺s

Table 1 shows the mean hydrodynamic diameter, size distribution and zeta potential (ζ) of free NP or NP loaded with DG or BSA. We observed that neutral and cationic NPs had the same mean size and that DG-loading did not change the cationic NP size. Neutral nanoparticles (NP⁰) had, as expected, a zeta potential of 0mV. All cationic NPs had a zeta potential around 30mV, even when they were prepared with increasing amounts of DG. No free liposomes were observed since DG liposomes prepared using the same conditions had a mean diameter of 250nm and a zeta potential of -41.5mV as previously described (29). Taken together, these results suggest that the anionic lipids strongly interact with the cationic NPs and penetrate totally within their structure. Indeed DG is an anionic lipid that can strongly interact with the cationic charges of the porous NP⁺s. Experimentally we were not able to prepare NP with higher amounts of DG, since irreversible aggregation occurred, suggesting that the NP core was saturated by an excess of anionic lipids. NP⁺s could also absorb large amounts of BSA (6.8nm, $\zeta = -5.6$ mV) without size modification (Table 1). With BSA, the zeta potential decreased progressively with the increase of BSA loading. So, as for DG inclusion, no free BSA was observed, suggesting a total encapsulation of BSA.

Particle type	Mean diameter (nm)	p.i.	Zeta potential (mV)
DG Liposomes	250.0± 0.20	0.16	- 41.5 ± 5.70
Free BSA	6.80 ± 2.22	0.25	- 5.6 ± 1.9
NP ⁰	60.3 ± 3,11	0.25	0.1 ± 0.90
NP ⁺	63.1 ± 0,40	0.21	25.5 ± 17.50
₁₀₀ BSANP ⁺	62.0 ± 0,30	0.17	20.8 ± 10.30
₂₀₀ BSANP ⁺	61.1 ± 0.55	0.11	16.8 ± 8.47
₃₀₀ BSANP ⁺	61.7 ± 0.23	0.17	12.1 ± 3.89
₁₀ DGNP ⁺	58.4 ± 6.77	0.19	31.1 ± 1.92
₃₀ DGNP ⁺	60.9 ± 1.64	0.14	29.9 ± 0.81
₅₀ DGNP ⁺	60.2 ± 5.70	0.19	30.6 ± 0.90
₇₀ DGNP ⁺	59.0 ± 3.60	0.20	30.6 ± 6.79
₁₀₀ BSA/ ₇₀ DGNP ⁺	61.7 ± 2.31	0.15	16.0 ± 4.94
₂₀₀ BSA/ ₇₀ DGNP ⁺	62.1 ± 3.72	0.23	2.16 ± 3.85

Table I
Physical characterisation of NP

Mean diameters, polydispersity index (p.i.) and zeta potential values of NP⁺, ₁₀, ₃₀, ₅₀, ₇₀DGNP⁺, DG liposomes and free BSA. ± indicates the SD of experimentations.

DG insertion did not inhibit the additional insertion of BSA in DGNP⁺s (Table 1). Saturation of the loading of the nanoparticles with BSA was faster in DGNP⁺s compared to NP⁺s (Fig. 1). Maximum BSA incorporation in ₇₀DGNP⁺s was 200% (w/w, protein/NP). BSA loading in NPs was confirmed by zeta potential and size analysis. BSA incorporation did not change DGNP sizes (Table 1). No additional peaks or polydispersity index rises were observed, indicating that no free proteins were detected. A decrease of zeta potential was observed when BSA incorporation exceeded 200% for NP⁺s and 100% for ₇₀DGNP⁺s (Fig. 1). These results confirmed that the DG is inside the NP⁺ core, limiting BSA loading, owing to

the saturation of the NP⁺ core by DG. The zeta potential decrease reflects the BSA progression from the inside toward the NP⁺ surface as the core is progressively saturated (Fig. 1). The negative influence of BSA became more pronounced in DGNP⁺s than NP⁺s. Thus ₂₀₀BSA/₇₀DGNP⁺s had a neutral zeta potential. We observed that zeta potential standard deviation of free NP⁺s is high while this standard deviation is lowered when lipids or proteins are absorbed. This result could be explained by the high mobility of the oligosaccharides on the surface of the nanoparticles where they are not filled by lipids or proteins. The absorption of anionic compounds should impair this surface mobility by structuring the inner part of the nanoparticles therefore lowering these movements and surface charge density.

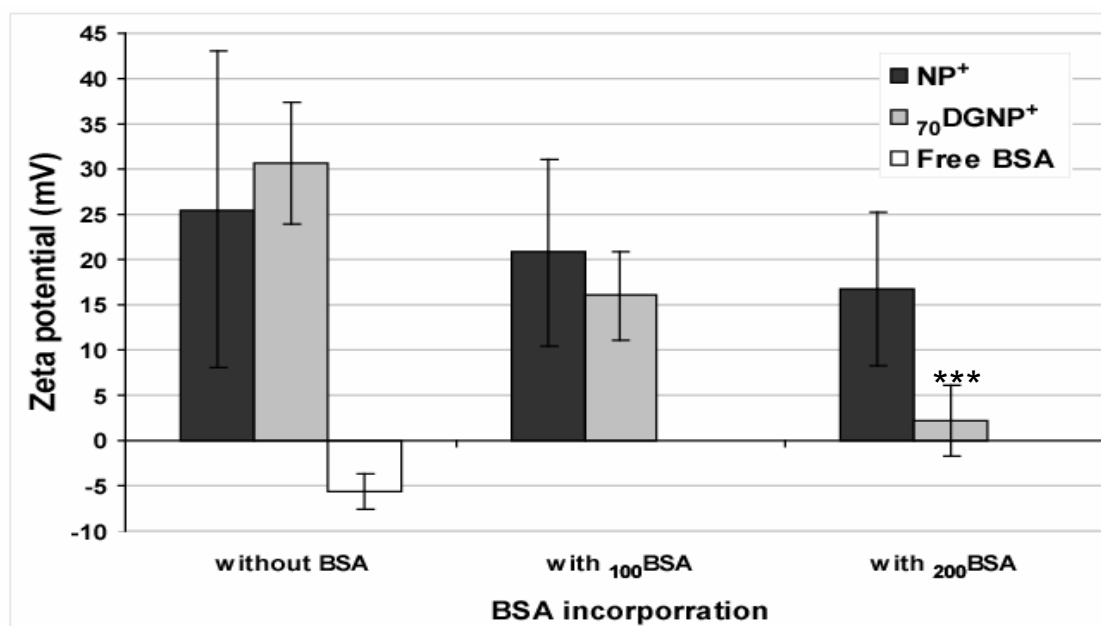


Figure 1

Zeta potential evolution for NP⁺ and ₇₀DGNP⁺ with BSA increasing incorporation in the presence of 15mM NaCl. ***, $p < 0.01$ (Fisher's test)

3.2. T.E.M of nanoparticles and molecular weight determination

The ${}_{70}\text{DGNP}^+$ s were observed by negative staining via T.E.M, in contrast to NP^+ s and NP^0 s (Fig. 2). These experiments, supported by observations made by De Miguel *et al.*, indicated that NP might collapse due to dehydration and that its porous polysaccharide matrix was not dense enough for electron transmission (30).

The static light scattering measurement revealed an approximate Molecular weight of 4,000kDa for unloaded NP^+ s which increased up to 11,000 kDa after post insertion of DG for ${}_{70}\text{DGNP}^+$ s. Finally, T.E.M. observation, size and SLS measurements and zeta potential variations provided evidence that DG is indeed located inside the NP^+ s.

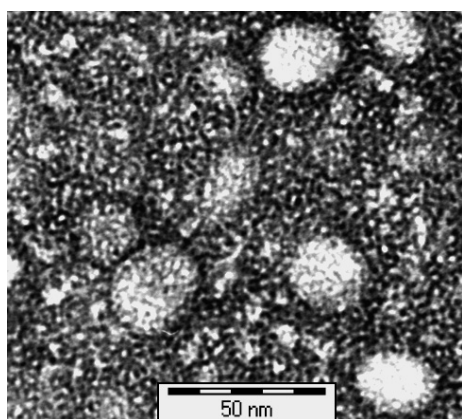


Figure 2

Transmission electronic microscopy images of ${}_{70}\text{DGNP}^+$ after uranyl acetate treatment; bar represents 50nm.

3.3. Interfacial structure of NP predicted from 'soft' particle electrophoresis analysis

Electrophoretic mobility (μ) represents the velocity of a particle in a given electric field and its value is often converted into zeta potential value. 'Soft' particle electrophoresis analysis has been put into practice to predict NP interfacial structures (31). 'Soft' particle electrophoresis analysis, as described by Ohshima, has shown that 'soft' particle μ depended

on the volume charge density distribution in the polyelectrolyte layer, particle size and also on applied oscillating electric field frequency. It depended upon frictional forces exerted on liquid flow by polymer segments, in the polyelectrolyte layer (27).

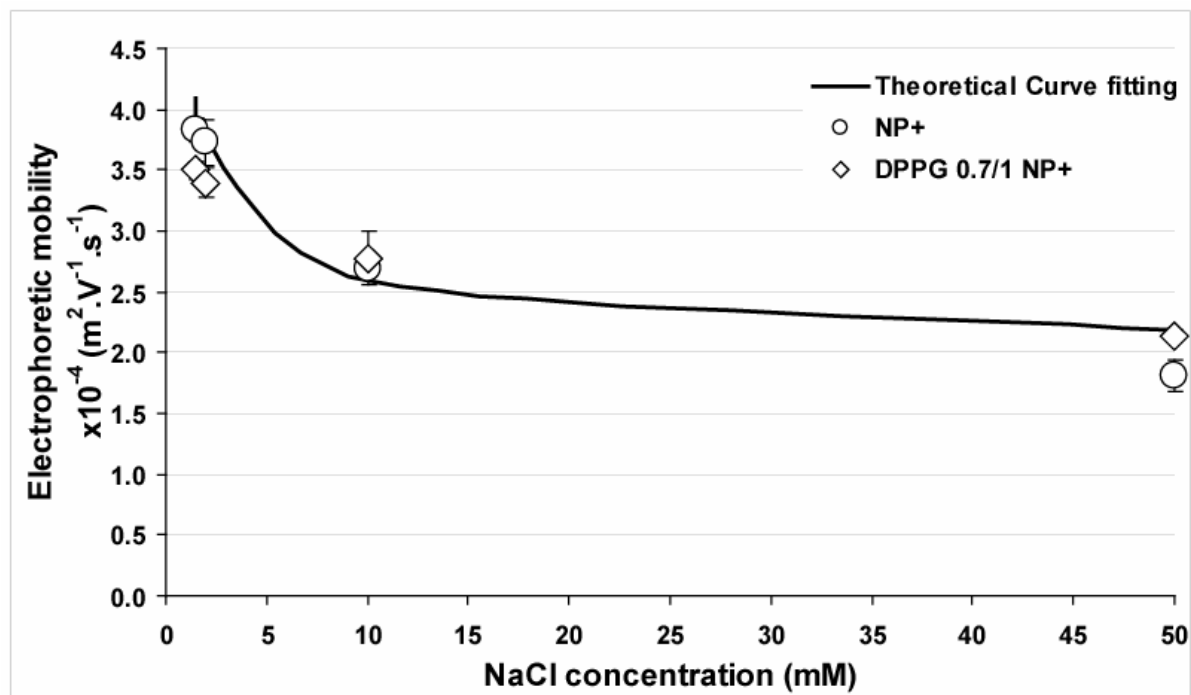


Figure 3

Evolution of electrophoretic mobility as a function of NaCl concentration at physiologic pH (7.4) for NP⁺ (○) and ₇₀DGNP⁺ (◇). Theoretical curve fitting (—) was obtained from the equation described previously with ZN and $1/\lambda$, chosen in order to fit as closely as possible the experimental curve.

'Soft' particle theory allowed Na⁺ and Cl⁻ penetrability studies in different accessible layers on the NP surface (32). This theory can be used when μ is influenced by only one sublayer (33) or when it is influenced by two sublayers (34). Theoretical values of μ were calculated via soft-particle electrophoresis analysis (28) and compared to experimental data (Fig. 3). Two sublayers were considered at the NP⁺ surface (Fig. 3): an outer-sublayer (sublayer 1) characterised by a charge density Q1 for ionised groups and a thickness d, and an inner-sublayer (sublayer 2) with a charge density Q2 (34). The parameter λ characterises the degree of friction exerted on the liquid flow at the surface layer. The reciprocal of λ ($1/\lambda$) has

the dimension of a length and can be considered as a 'softness' parameter. Q_1 , Q_2 , $1/\lambda$ and d were determined by a curve-fitting procedure. NP^+ s and ${}_{70}DGNP^+$ s displayed comparable results. Identical values were found for best NP^+ and ${}_{70}DGNP^+$ curve-fitting analysis. This showed that their μ might be dependent on two sublayers with different charges ($R^2 = 0.97$). The outer sublayer was found to have a $Q_1 = 2.40 \times 10^6 C.m^{-3}$ and a thickness $d = 2.99 \times 10^{-9} m$. The inner-sublayer had a $Q_2 = 4.48 \times 10^2 C.m^{-3}$ and these NPs had a $1/\lambda = 4.00 \times 10^{-9} m$ (Table 2). Despite the incorporation of high amounts of DG in NP^+ s, these NPs presented no significant difference in their surface charge accessibility. The presence of these two sublayers might be surprising, especially because cationic groups are grafted homogeneously during the synthesis of the NP^+ gel. This could be explained by the hypothesis of the presence of a counter-ion gradient (Fig. 4). During nanoparticle synthesis, cationic groups provided by a quaternary ammonium graft ($RN-(CH_3)_3^+$), were associated with anionic counter ions. During the last step of nanoparticle synthesis, most of the counter ions were eliminated by ultrafiltration in Milli-Q water.

Particle	$Q_1 (C.m^{-3})$	$Q_2 (C.m^{-3})$	$1/\lambda (m)$	$d (m)$
Curve-fitting for NP^+ and ${}_{70}DGNP^+$	2.40×10^6	4.48×10^2	4.00×10^{-9}	2.99×10^{-9}

Table II

Values of surface charge density, softness parameter and thickness of NP^+ and ${}_{70}DGNP^+$ interfacial structures

Q_1 , Q_2 , $1/\lambda$ and d parameters for NP^+ and ${}_{70}DGNP^+$ determined by the calculation of curve-fitting by using Ohshima's method. The correlation between the experimental and theoretical curves was determined for NP^+ and ${}_{70}DGNP^+$ ($R^2=0.97$)

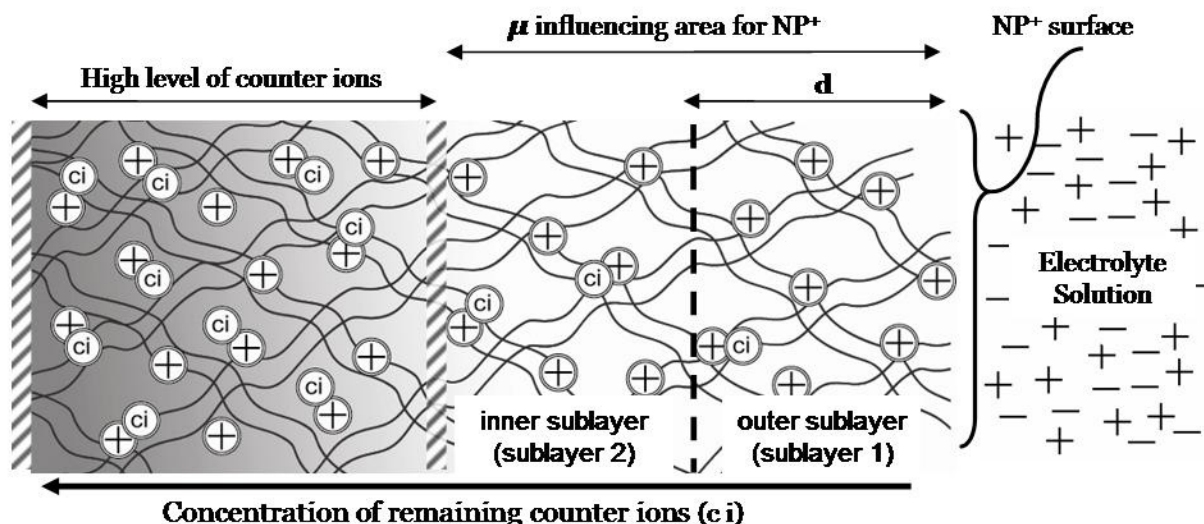


Figure 4

Schematic representation of NP^+ internal organisation with two charged surface sublayers where d is the thickness of sublayer 1 and (ci) is the remaining counter ions

The BSA and DG incorporation into ${}_{70}DGNP^+$ s and ${}_{100}$ and ${}_{200}BSANP^+$ s did not modify the size, the zeta potential nor the electrophoretic mobility curves. This might suggest that DG and BSA are internalised too deeply inside the NP^+ core to influence its μ and consequently the ζ . This is not the case for high amounts of BSA and for NP^+ s already filled with DG and secondly filled with BSA (Table 1).

3.4. Complement activation

Opsonisation is the process whereby foreign organisms or particles become covered with opsonin proteins, thereby making them more visible to phagocytic cells. The capacity of NPs to bind opsonin proteins can be appreciated by different assays, one of them being the haemolytic CH50 test. This test can be considered as an *in vitro* indicator before intravenous (i.v.) administration in animals (35). The CH50 test consists in measuring the haemolytic activity of a human serum versus 50% of sheep erythrocyte concentration remaining after

contact with particles (6, 7, 36). The consumption of CH50 units is measured at a fixed amount of human serum (HS) in the presence of an increasing surface area of particles.

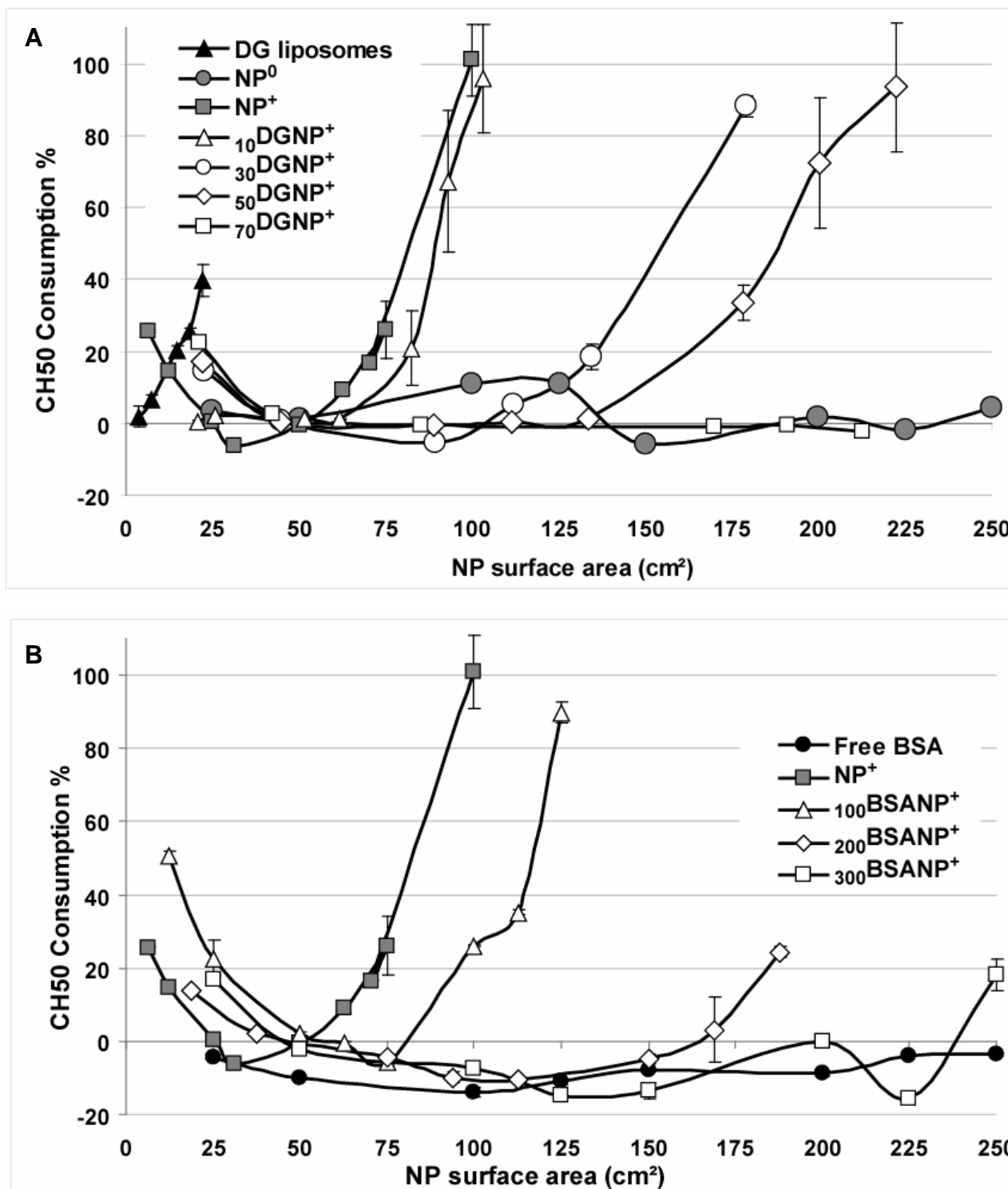


Figure 5

Consumption of CH50 units in the presence of single DPPG liposomes (▲), NP⁰ (●), NP⁺ (■), 10 (△), 30 (○), 50 (◇), 70 (□) DGNP⁺ (A). Consumption of CH50 units in the presence of single free BSA (●), NP⁺ (■), 100 (△), 200 (◇), 300 (□) BSANP⁺ (B).

As shown in Fig. 5, CH50 unit consumption for cationic NP⁺s without any DG or BSA was tested and was shown to be a strong activator of the complement system: 100% activation was obtained for 100cm²/ml of NP⁺ surface area. This is equivalent to what has already been observed with synthetic poly (methyl methacrylate) NPs which were found to have a half-life of only 3 minutes in mice plasma circulation (37). Two factors could be involved in this high level of activation. The first is the high cationic charge at the NP⁺ surface. The literature has described that charged particles, particularly cationic ones, are generally strong activators of the immune system (38, 39). Any of several attractive forces including Van der Waals, electrostatic, ionic and hydrogen bonds can be involved in opsonin binding to the NP⁺ surface (40). The second is the presence of a polysaccharide backbone including many hydroxyl (OH) groups. Indeed, the complement proteins C3b were known to bind on dextran particle surfaces thanks to polysaccharidic OH groups (41, 42). They result from complement proteins C3 cleavage which makes the internal thioester bond available to react with OH groups. Thioester bond was formerly located inside a hydrophobic pocket (43) and becomes visible thanks to the C3 cleavage. This high level of interaction with the complement protein C3b can trigger alternative pathways of complement system activity (44). A nucleophilic link between OH groups and C3b thioester bonds depends on OH electronic density, but also on the polymer backbone type and polymer conformation (44). This can explain dextran ability to decrease complement activation depending on their brush or mushroom conformation at NP surfaces (37). However NP⁰s, which are made with the same polysaccharide backbone, did not activate the complement system, even at 250cm²/ml (Fig. 5a), in accordance with the literature (3, 45). We can conclude that this polymer backbone is not a complement activator despite the presence of OH groups and that ionic interactions of NP⁺s play a key role in the complement activation of these porous nanoparticles.

40% activation was obtained for $22\text{cm}^2/\text{ml}$ for DG liposomes. These liposomes are rather rigid with a negative charge at their surface (Fig. 5a) (29, 46). These two parameters are often associated with high levels of complement activation. However, contrary to what might be expected, DG incorporation inside NP^+ s decreased CH50 unit consumption. Nanoparticles containing 10% of DG were still strong activators (Fig. 5a). When DG percentage was increased to 30%, no activation was observed for the same surface area. 100% activation was obtained at around 180cm^2 . A strong decrease of CH50 consumption units was correlated to an increase of DG content with a dramatic effect observed when nanoparticles contained 50% or 70% of DG. Indeed 100% activation was reached for a $222\text{cm}^2/\text{ml}$ for $_{50}\text{DGNP}^+$ s and $_{70}\text{DGNP}^+$ s even at $250\text{cm}^2/\text{ml}$ did not activate the complement system (Fig. 5a).

To evaluate if the decrease of complement activation was due to the filling of the NP^+ frame by any component, or especially by the hydrophobic component, we assessed CH50 consumption units for hydrophilic molecule (BSA)-loaded NP^+ s. Free BSA did not activate the complement system even at $250\text{cm}^2/\text{ml}$. $_{100}\text{BSANP}^+$ s were also strong activator with 90% activation obtained for a 125cm^2 nanoparticle surface area (Fig. 5b). When BSA incorporation increased to 200% and 300% a large decrease in CH50 unit consumption was observed. Indeed, the maximum level of activation for $_{200}\text{BSANP}^+$ s and for $_{300}\text{BSANP}^+$ s was only of 20% at 190 and $250\text{cm}^2/\text{ml}$ of particles, respectively (Fig. 5b). These results demonstrated that filling the NP^+ frame with high amounts of anionic model drugs, BSA or DG in our case, led to stopping the activation of the complement system, whereas BSA- and DG-loading did not cancel the zeta potential of NP^+ s.

In contrast to BSA, it seems that opsonins might not be loaded in $_{70}\text{DGNP}^+$ s because of their high molecular weight (over 150kDa) (5, 47). Porous parts of NP^+ not filled by DG might be too small to contain opsonins.

Our study showed an inhibition of complement activation by BSA or DG loading inside NP⁺ which might be compared to inhibition obtained after long chain of poly(ethylene glycol) (PEG) addition to strong activator nanoparticles, as shown by Van Butsele et al., Aqil et al. and Layer et al. (48-51). Indeed PEG create a steric barrier around particles able to protect against protein adsorption due to a decrease of surface hydrophobicity and a neutralization of surface potential. However high BSA or high DG loading inside NP⁺ inhibit the complement activation as much as PEG addition on poly (methylmethacrylate-co-methacrylic acid) nanoparticle surface (52), but without cancelling the surface potential of these nanoparticles.

4. Conclusion

These studies performed on cationic nanoparticles have demonstrated that they behave as sponges able to absorb high amounts of BSA and DG. This absorption changed neither their surface nor their size up to a certain amount. The incorporation of DG was characterised by an increase of NP molecular weight analysed by static light scattering. Studies performed on complement protein consumption showed that DG insertion progressively lowers the amount of complement proteins adsorbed up to a level of total inhibition. We have also demonstrated that NP⁺s can be loaded by a polyanionic molecule such as BSA despite their preliminary filling by a hydrophobic molecule such as DG. Thus these NPs could be considered as a genuine co-delivery system. In contrast to other nanostructured systems (8, 9, 37) in our case, the loaded drug itself was able to generate stealth NPs and represents an alternative to the use of PEG. We are currently studying the pharmacokinetics and biodistribution of these nanoparticles after *in vivo* administration and their potential as delivery system of a lipophilic drug

5. Acknowledgments

We would like to thank Myriam Moreau, Christina Hubert (Inserm U646) and Pierre Legras (Animalerie Hospitalo-Universitaire, CHU, Angers, France) for technical support as well as Dr Alain Chevalier (Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Espace Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers) for normal human serum supplies. We would like also to thank Robert Filmon and Romain Mallet from the *Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques* and Michel Terray from Malvern Instruments. A. Paillard was supported by a grant from *Le comité départemental de la Ligue Contre le Cancer*. This work was also supported by the *Cancéropôle Grand-Ouest* and by *la Ligue National Contre le Cancer* via *Equipe Labellisée 2007* funding.

Bibliography

1. M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, and J. P. Benoit. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **29**: 3477-96 (2008).
2. D. C. Drummond, C. O. Noble, M. E. Hayes, J. W. Park, and D. B. Kirpotin. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *J Pharm Sci* **97**: 4696-740 (2008).
3. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* **53**: 283-318 (2001).
4. C. Passirani and J. P. Benoit. Complement activation by injectable colloidal drug carriers. In R. I. Mahato (ed), *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids* (R. I. Mahato, ed), New York: CRC, 2005, pp. 187-230.
5. H. J. Muller-Eberhard. Molecular Organization and Function of the Complement System. *Annual Review Biochemistry* **57**: 321-343 (1988).
6. M. Mayer. Complement and Complement fixation. In M. M. Kabat EA (ed), *Experimental immunochemistry* (M. M. Kabat EA, ed), 2nd ed. Springfield : Thomas, 1961, pp. 133-156.
7. M. Kazatchkine, G. Hauptmann, and U. Nydegger. Techniques du Complement. *Livre ed. INSERM collection technique en immunologie* 22-33 (1986).
8. A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **268**: 235-7 (1990).
9. T. M. Allen and A. Chonn. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* **223**: 42-6 (1987).

10. A. Gabizon, R. Isacson, E. Libson, B. Kaufman, B. Uziely, R. Catane, C. G. Ben-Dor, E. Rabello, Y. Cass, T. Peretz, A. Sulkes, R. Chisin, and Y. Barenholz. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncologica* **33**: 779-786 (1994).
11. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**: 271-84 (2000).
12. Y. Matsumura and H. Maeda. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**: 6387-92 (1986).
13. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, and J. P. Benoit. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* **78**: 620-8 (2006).
14. Y. Jallouli, A. Paillard, J. Chang, E. Sevin, and D. Betbeder. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. *Int J Pharm* **344**: 103-9 (2007).
15. P. M. Loiseau, L. Imbertie, C. Bories, D. Betbeder, and I. De Miguel. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1597-601 (2002).
16. A. Debin, R. Kravtsoff, J. V. Santiago, L. Cazales, S. Sperandio, K. Melber, Z. Janowicz, D. Betbeder, and M. Moynier. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine* **20**: 2752-63 (2002).
17. S. El mir, A. Casanova, D. Betbeder, and F. Triebel. A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. *Eur J Cancer* **37**: 1053-60 (2001).
18. B. C. Baudner, O. Balland, M. M. Giuliani, P. Von Hoegen, R. Rappuoli, D. Betbeder, and G. Del Giudice. Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. *Infect Immun* **70**: 4785-90 (2002).
19. D. Betbeder, S. Sperandio, J. P. Latapie, J. de Nadai, A. Etienne, J. M. Zajac, and B. Frances. Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm Res* **17**: 743-8 (2000).
20. A. Razafindratsita, N. Saint-Lu, L. Mascarell, N. Berjont, T. Bardou, D. Betbeder, L. Van Overtvelt, and P. Moingeon. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J Allergy Clin Immunol* **120**: 278-85 (2007).
21. L. Fenart, A. Casanova, B. Dehouck, C. Duhem, S. Slupek, R. Cecchelli, and D. Betbeder. Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1017-22 (1999).
22. M. Major, E. Prieur, J. F. Tocanne, D. Betbeder, and A. M. Sautereau. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. *Biochim Biophys Acta* **1327**: 32-40 (1997).
23. M. C. Woodland and D. Papahadjopoulos. Liposome preparation and size characterization. *Methods Enzymol* **171**: 193-217 (1989).
24. J. P. Siguier, M. Major, and O. Balland. Development of a new method to characterize (SMBV) antigen formulations using surface plasmon resonance technology. *Int J Pharm* **242**: 411-5 (2002).

25. M. M. Domingues, P. S. Santiago, M. A. R. B. Castanho, and N. C. Santos. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *Journal of Peptide Science* **14**: 394-400 (2008).
26. E. Serefoglou, J. Oberdisse, and G. Staikos. Characterization of the soluble nanoparticles formed through coulombic interaction of bovine serum albumin with anionic graft copolymers at low pH. *Biomacromolecules* **8**: 1195-1199 (2007).
27. H. Ohshima. Electrokinetics of soft particles. *Colloid & Polymer Science* **285**: 1411-1421 (2007).
28. A. Vonarbourg, P. Saulnier, C. Passirani, and J. P. Benoit. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* **26**: 2066-75 (2005).
29. K. Matsuzaki, M. Harada, S. Funakoshi, N. Fujii, and K. Miyajima. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1063**: 162-70 (1991).
30. I. De Miguel, L. Imbertie, V. Rieumajou, M. Major, R. Kravtsoff, and D. Betbeder. Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV) used as drug carriers. *Pharm Res* **17**: 817-24 (2000).
31. H. Ohshima. Electrophoretic Mobility of Soft Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **163**: 474-483 (1994).
32. V. Ducel, P. Saulnier, J. Richard, and F. Boury. Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements. *Colloids Surf B Biointerfaces* **41**: 95-102 (2005).
33. K. Makino, N. Yamamoto, K. Higuchi, N. Harada, H. Ohshima, and H. Terada. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **27**: 33-39 (2003).
34. K. Makino, M. Umetsu, Y. Goto, A. Nakayama, T. Suhara, J. Tsujii, A. Kikuchi, H. Ohshima, Y. Sakurai, and T. Okano. Interaction between charged soft microcapsules and red blood cells: effects of PEGylation of microcapsule membranes upon their surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **13**: 287-297 (1999).
35. A. Beduneau, P. Saulnier, N. Anton, F. Hindre, C. Passirani, H. Rajerison, N. Noiret, and J. P. Benoit. Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. *Pharm Res* **23**: 2190-9 (2006).
36. D. Labarre, B. Montdargent, M. Carreno, and F. Maillet. Strategy for in vitro evaluation of the interactions between biomaterials and complement system. *Journal of Applied Biomaterials* **4**: 231-240 (1993).
37. C. Passirani, G. Barratt, J. P. Devissaguet, and D. Labarre. Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm Res* **15**: 1046-50 (1998).
38. M. Roser, D. Fischer, and T. Kissel. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm* **46**: 255-63 (1998).
39. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **27**: 4356-73 (2006).
40. C. D. Blackand G. Gregoriadis. Interaction of liposomes with blood plasma proteins. *Biochem Soc Trans* **4**: 253-6 (1976).
41. J. Toufikand D. Labarre. Relationship between reduction of complement activation by polysaccharide surfaces bearing diethylaminoethyl groups and their degree of substitution. *Biomaterials* **16**: 1081-8 (1995).

42. M. P. Carreno, D. Labarre, M. Jozefowicz, and M. D. Kazatchkine. The ability of Sephadex to activate human complement is suppressed in specifically substituted functional Sephadex derivatives. *Mol Immunol* **25**: 165-71 (1988).
43. S. K. Law, T. M. Minich, and R. P. Levine. Binding reaction between the third human complement protein and small molecules. *Biochemistry* **20**: 7457-63 (1981).
44. D. Labarre, A. Laurent, A. Lautier, S. Bouhni, L. Kerbellec, J. M. Lewest, and N. Tersinet. Complement activation by substituted polyacrylamide hydrogels for embolisation and implantation. *Biomaterials* **23**: 2319-27 (2002).
45. D. E. Owens, 3rd and N. A. Peppas. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* **307**: 93-102 (2006).
46. A. Gabizon and D. Papahadjopoulos. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1103**: 94-100 (1992).
47. C. L. Villiers, M. B. Villiers, and P. N. Marche. [Role of the complement C3 protein in the control of the specific immune response]. *Ann Biol Clin (Paris)* **57**: 127-35 (1999).
48. A. Aqil, S. Vasseur, E. Duguet, C. Passirani, J. P. Benoît, A. Roch, R. Müller, R. Jérôme, and C. Jérôme. PEO coated magnetic nanoparticles for biomedical application. *European Polymer Journal* **44**: 3191-3199 (2008).
49. K. V. Butsele, S. Cajot, S. V. Vlierberghe, P. Dubruel, C. Passirani, J.-P. Benoit, R. Jérôme, and C. Jérôme. pH-Responsive Flower-Type Micelles Formed by a Biotinylated Poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) Triblock Copolymer. *Advanced Functional Materials* **19**: 1416-1425 (2009).
50. K. Van Butsele, P. Sibret, C. A. Fustin, J. F. Gohy, C. Passirani, J. P. Benoit, R. Jerome, and C. Jerome. Synthesis and pH-dependent micellization of diblock copolymer mixtures. *J Colloid Interface Sci* **329**: 235-43 (2009).
51. A. Layre, P. Couvreur, H. Chacun, J. Richard, C. Passirani, D. Requier, J. P. Benoit, and R. Gref. Novel composite core-shell nanoparticles as busulfan carriers. *J Control Release* **111**: 271-80 (2006).
52. J. Rieger, C. Passirani, J.-P. Benoit, K. Van Butsele, R. Jérôme, and C. Jérôme. Synthesis of Amphiphilic Copolymers of Poly(ethylene oxide) and Poly(ϵ -caprolactone) with Different Architectures, and Their Role in the Preparation of Stealthy Nanoparticles. *Advanced Functional Materials* **16**: 1506-1514 (2006).

Publication n°2 :

« Protein adsorption onto the surface of PLGA nanoparticles governs their interactions with biological systems from blood to brain cancer cells »

Protein adsorption onto the surface of PLGA nanoparticles governs their interactions with biological systems from blood to brain cancer cells

Jiang Chang ^{a #}, Archibald Paillard ^{b #}, Catherine Passirani ^b, M. Morille ^b,
Jean-Pierre Benoît ^b, Didier Betbeder ^{a, c, ✉}, Emmanuel Garcion ^{b, ✉}

^a EA 2689, IFR 114 laboratoire de physiologie; Université de Lille 2, 1 place de verdun, Lille 59045 cedex, France

^b Inserm U646, Pôle pharmaceutique, CHU d'Angers, Université d'Angers, 10 rue André Boquel, 49100, Angers, France

^c Université d'Artois, Rue du Temple, Arras, 62000, France.

[#] **Equivalent contributions.**

✉ **Corresponding authors :**

Emmanuel Garcion

Inserm U646, 10 rue André Boquel, 49100 Angers, France

Tel.: +33 2 41 73 58 85 ; Fax: +33 2 41 73 58 53

E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Didier Betbeder

EA 2689, IFR 114 laboratoire de physiologie; Université de Lille 2, 1 place de verdun, Lille 59045 cedex, France

Tél. : +33 3 20 62 68 83 ; Fax : +33 3 20 62 69 93

E-mail address : dbetbeder@aol.com

Abstract

Key Words

Haemolytic CH50 test, stealthiness, nanomedicine, glioma, protein adsorption, intracellular drug delivery, cancer therapy.

Abbreviation

NPs, nanoparticles ;

BSA, bovine serum album ;

Tf, transferrin ;

TEM, transmission electron microscopy;

FITC, 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)amino fluorescein;

NHS, normal human serum;

BSA-NPs, BSA coated nanoparticles;

DiI, 1,1'-dioctadecyl 3,3',3'-tetramethylindocarbocyanate perchlorate;

Tf-NPs, transferrin coated nanoparticles;

RH, Ringer-Hepe;

PMA, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate;

DMA 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride

1. Introduction

Glioblastoma are extremely aggressive tumors from the central nervous system (CNS). Although their incidence is increasing, their standard treatment, combining surgical removal when possible to external radiotherapy, has almost not changed during the last thirty years (Stupp et al. 2005). This therapeutic failure is generally due to an important resistance of glioblastoma cells but also to a non optimal administration of treatments (Grossman and Batarra 2004). Hence, eradication of infiltrating tumour cells within the CNS represents a major objective but faces two substantial difficulties that are: from one side the vulnerability of the eloquent neural tissue, and from the other side the reality of the blood-brain barrier (BBB). In parallel, the escalation of drug doses injected by the intravenous pathway is rapidly restricted by the systemic toxicity it triggers.

Among alternatives, drug delivery nanosystems derived from new nanotechnologies get all their relevance and usefulness in this biological context (Peer et al. 2007). Considering liposomes (Cowens et al. 1993, Gabizon et al. 1994, Rahman et al. 1990, Sells et al. 1987, Storm et al. 1998), polymer nanospheres (Gref et al. 1994), polymer nanocapsules (Couvreur et al. 2002), lipid nanocapsules (Garcion et al. 2006, Lacoeyille et al. 2007, Muller and Keck 2004, Pereira de Oliveira et al. 2005) or nano-emulsions (Rapoport et al. 2009), they can either be implanted within the tumor or within the cavity of resection, or instead, route from the blood to the CNS tumor site. As a result of their physicochemical characteristics and size, that can vary from 20 to 100 nm, nano-objects can indeed travel in biological media and interact with life components (Garcion et al. 2006). From infusion site to intracellular target site they may offer new opportunities to tackle a succession of biological obstacles for drug to accomplish its function (Faraji and Wipf 2009). Nano-enveloped drug can thus present a better apparent solubility, with improved biological barrier crossing properties and better

controlled release kinetics, leading to substantial clinical advantages including dose reduction, prevention of side effects and improvement of bioavailability within the targeted tumor cell (Moghimi et al. 2005, Panyam and Labhasetwar 2003, Peer et al. 2007).

In view of BBB crossing, several studies draw attention to the potential value of nanocarriers. Those include the use of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (Tosi et al. 2007), solid lipid nanoparticles (Blasi et al. 2007), poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles (Kreuter et al. 2003) or polycyanoacrylate nanoparticles. In parallel, identification of specific receptors onto the surface of brain capillary epithelium constituted a basis for further decoration of nanoparticles with functional ligands to trigger specific BBB crossing. As such, receptor mediated transcytosis was identified for LDL (Dehouck et al. 1997), insulin (Duffy and Pardridge 1987) or transferrin (Tf) (Descamps et al. 1996). Targeted drug delivery through the transferrin receptor (TfR) pathway has, therefore, kept a special attention with the use of transferrin itself or the one of antibodies directed against the TfR (Qian et al. 2002). Thus, several particles were developed for this purpose including PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles (Li et al. 2003), cationic lipid magnetic nanoparticles (Pan et al. 2008), PLGA nanoparticles (Sahoo and Labhasetwar 2005), lipoplexes nanoparticles (Abela et al. 2008, Zhang et al. 2009), cyclodextrin polymer-based particles (Belloq et al. 2003), gold nanoparticles (Li et al. 2009) and lipid immunonanoparticles (Beduneau et al. 2007).

Among those synthetic objects, PLGA nanoparticles offer the advantage of being made from biocompatible and biodegradable components without induction of any inflammation or immune reaction (Dechy-Cabaret et al. 2004) and, thus, of being approved by the US Food and Drug Administration (FDA). As such, we recently developed 90nm PLGA nanoparticles free from toxic surfactant that were combined to Tf through non-covalent grafting (Chang et al. 2009). They were studied for brain endothelial cell targeting (Chang et al. 2009) as well as

blood-brain barrier crossing (Xu et al. 2009) demonstrating their possible interest for active brain targeting.

However, notably in the case of anti-glioblastoma treatment, many drugs need to be delivered intracellularly to exert their function inside the cytoplasm, the nucleus or specific organelles. Thus, the behaviour of Tf-PLGA nanoparticles requires careful evaluation in targeted glioma cells notably with regard to plasma membrane crossing.

Moreover, when injected through the systemic pathway Tf-PLGA nanoparticles will have to face blood components that include opsonin adsorption, activation of the complement system, phagocytosis by monocyte/macrophage cells and overall removal by the reticulo-endothelial system (Klibanov et al. 1990, Kreuter 1994). Thus, in order to improve the *in vivo* survival rate of nanoparticles, nanovectors of long circulating property with a surface that can avoid subsequent clearance from the body by phagocytes would be of interest. Properties currently known to affect clearance include particle material, size, shape, surface chemistry and surface charge, all of which vary depending on the individual particle type and modifications made for specific applications. As such the use of PLGA as a hydrophilic polymer further combined to a specific ligand, such as transferrin, necessitates evaluation.

Thus, the aim of the present study was to investigate as a function of their protein adsorption characteristics (blank, BSA or Tf) the behaviour of PLGA nanoparticles at the different biological interfaces they are expected to face in order to reach their target within brain cancer cells. As those nano-objects were recently evaluated for their potential to cross the BBB (Chang et al. 2009), a special attention was here given to their interactions with blood components and with plasma membrane of glioma cells. The relevance of each of those nanocarriers for further preclinical or clinical studies involving active targeting is discussed on the basis of the data presented.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLGA (50:50, Resomer[®] RG 503H; Mw=26,500g/mol; Mn=14,700g/mol) was purchased from Boehringer Ingelheim (Germany). Fluorescent dye 1,1'-dioctadecyl 3',3',3'-tetramethylindo-carboxycyanate perchlorate (DiI), bovine serum albumin (BSA), bovine serum albumin-FITC conjugate and human *holo*-transferrin (Tf) ($\geq 98\%$) were from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). Sephadex G25 column (PD 10) was purchased from Amersham, Orsay, France. Phosphate-buffered saline (PBS) is composed of 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.3 mM KH₂PO₄ and 1 mM Na₂HPO₄.7H₂O, pH=7.4; Bicarbonate buffer 0.1 M pH=9.5 is obtained by mixing a NaHCO₃ solution at 0.1 M with a Na₂CO₃ at 0.1 M to obtain a final solution at pH=9.5. Normal human serum (NHS) was provided by the *Etablissement Français du Sang* (Angers, France) and rabbit, anti-sheep, erythrocyte antibodies were supplied by Biomérieux (Sérum hémolytique, Biomérieux, France). Chlorpromazine, nystatin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride (DMA) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Preparing nanoparticles

Blank NPs obtained by a modified solvent diffusion (nanoprecipitation) technique (Barichello et al., 1999). Briefly, PLGA (10 mg) was solubilized in acetone (850 μ L), then 150 μ L ethanol (97%) was added. This organic phase was quickly poured in 10 mL deionized water (aqueous phase) under magnetic stirring at 1000 rpm for 3 hours. Fluorescent NPs were

prepared using the same protocol, DiI was added in the acetone solution of PLGA. The produced suspensions were then kept at 4°C after filtration through 0.22- μ m filter.

Protein (human *holo*-transferrin or bovine serum albumin) was dissolved in Ringer-Hepes buffer (RH, pH=7.4) at a concentration of 1 mg/mL. Blank NPs were added to the protein solutions at the ratio 1/1 (w/w). The adsorption reaction was left for 3 hours at room temperature, with moderate shaking (Ataman-Onal et al., 2006). The protein-NPs were ultra-filtrated by 100 kDa "Millipore" (Amicon Centriplus 100 K MWCO) to eliminate free BSA or Tf. Final concentration in NaCl physiologic serum: 1 mg/mL.

2.3. Size and zeta potential determination

The particle size and size distribution of NPs were measured by N4 PLUS, Submicron Particle Size Analyzer (BECKMAN COULTER, N4 Plus software). Before measurement, the particle suspension was diluted by PBS (pH=7.4). The samples were examined for the mean particle diameter and poly-dispersity. The reported value is mean \pm s.d. (n = 3). Particle size stability at 4 °C or 37°C was evaluated at 1mg/mL of these NPs in sterile water at different time interval. NPs surface charge was investigated through zeta potential measurements in 15 mM NaCl (Zetasizer 4, with a multi-8 correlator 7032, Malvern Instruments).

2.4. Transmission Electron Microscopy (T.E.M.) of nanoparticles

The NPs was examined by transmission electron microscopy (TEM) following negative staining with sodium phosphotungstate solution (0.2%, w/v) . A drop of the sample was

placed onto a carbon-coated copper grid to create a thin film. Before the film dried on the grid, it was negatively stained with phosphotungstic acid by adding a drop of the staining solution to the film; any excess solution was drained off with a filter paper. The grid was allowed to dry, and samples were viewed under a transmission electron microscope (JEOL-100CX-II, Tokyo, Japan).

2.5. Complement activation

Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) (Etablissement Français du Sang, Angers, France) by measuring the residual hemolytic capacity of the complement system after contact with NPs. The technique consisted in the determination of the amount of serum able to hemolyse 50% of a fixed number of sensitised sheep erythrocytes (CH50). A veronal-buffer saline containing 0.15mM Ca^{2+} and 0.5mM Mg^{2+} was prepared as previously described (VBS⁺⁺). Sheep erythrocytes were sensitised by rabbit anti-sheep erythrocyte antibodies and suspended at a final concentration of 1.10^8 cells/ml in VBS⁺⁺. To assess the consumption of CH50 units in the presence of the particles during a constant incubation time, increasing amounts of particle suspensions were added to NHS diluted in VBS⁺⁺ so that the final dilution of NHS in the reaction mixture was ¼ (V/V) in a final volume of 1ml. After 60 minutes of incubation at 37°C with gentle agitation, the suspension was diluted at 1/25 (V/V) in VBS⁺⁺ then aliquots at different dilutions were added to a given volume of sensitised sheep erythrocytes. After 45 minutes of incubation at 37°C, the reaction mixture was centrifuged at 2,000rpm for 10 minutes. The absorption of the supernatant was determined at 415nm with a microplate reader (Multiskan Anscant, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France) and compared to the results obtained with the control serum. After determining the CH50 units remaining in the serum, the results were expressed as the

consumption of CH50 units as a function of the nanoparticle surface area calculated as described elsewhere (Vonarbourg et al. 2005) in order to compare nanoparticles of different average diameters.

2.6. Determination of the *in vivo* plasma circulation time

Swiss mice and Fisher rats were obtained from the Charles River Laboratory. Animal care was carried out in strict accordance to French Ministry of Agriculture regulations. The animals were kept in standard animal facilities with free access to food and water. They were housed in a temperature and humidity-controlled room with a 12h on-off light cycle and were put down at the end of each experiment. Mice and rats were anesthetized with isofluran (3% + O₂) and injected intravenously in the tail vein (200µg of DiI labelled NPs/mouse, n ≥ 3, or 500µg of DiI labelled NPs/rats, n ≥ 3). Blood samples (0.5ml) were withdrawn by orbital sinus or endocardiac blood collection at 1, 5, 15, 30, 60, 120 minutes after injection. Serum was measured at $\lambda_{\text{ex}}= 544\text{nm}$ and $\lambda_{\text{em}}= 590\text{nm}$ with a Spectro-fluorometer Fluoroskan Ascent Fl (Thermo Labsystems).

2.7. Glioma and newborn rat primary astrocytes cultures

Glioma (F98) Fischer rat-derived cell lines were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, United Kingdom) and the American Type Culture Collection (Manassas, VA), respectively. Purified newborn rat primary astrocytes were obtained by the mechanical dissociation method from cultures of cerebral cortex as originally described . The cells were grown at 37°C/5% CO₂ in DMEM with glucose and l-glutamine (Bio Whittaker,

Verviers, Belgium) containing 10% FCS (Bio Whittaker) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

2.8. *In vitro* NPs uptake of macrophages and monocytes

THP-1 cells (human monocyte/macrophage cell line obtained by ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in suspension in a humidifier-incubator (5% CO₂) at 37°C in ATCC suggested medium. THP-1 differentiation on macrophages were obtained by addition of 200 mM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) for 24 h to allow adherence and differentiation (Tsuchiya et al. 1982). Macrophage or monocytes (in 24-well plate) were incubated in presence of NPs (Blank NPs, BSA-NPs or Tf-NPs) at 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL in serum-included culture medium for 2 hours at 37°C. NPs endocytosis analyzed by flow cytometry as previously described (Garcion et al. 2006).

2.9. *In vitro* NPs uptake of F98 glioma cells

Cell treatment with chemical inhibitors of known endocytic pathways

Previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways were used as described elsewhere (Johannes and Lamaze 2002). Briefly, glioma cells were pre-treated with inhibitors for 1 hour at 37°C in serum-free culture medium. Cholesterol depletion was carried out by using methyl-β-cyclodextrin (MβCD) in the presence of lovastatin (Rodal et al. 1999). Chlorpromazine and potassium depletion (Larkin et al. 1983) were used to inhibit clathrin-mediated transport, while PMA was used to selectively disrupt caveolae and DMA to inhibit

macropinocytosis (Liu et al. 2002). Subsequently, Blank-NPs, BSA-NPs, Tf-NPs were incubated at 50 μ g/ml with glioma cells in serum-free medium for 2 hours before flow cytometry analysis, as previously described (Garcion et al. 2006).

Protein competition experiments

Firstly, F98 glioma cells were pre-incubated with free protein (BSA or Tf) at the dose of 1.5mg/mL for 15 min. Secondly, the cells were subsequently treated for 2 hours with Blank, BSA or Tf-NPs. The experiment program was designed as following (Table 1): Subsequently, the cells were analyzed by flow cytometry.

Sample name	Pre-treatment (15 minutes)	Treatment (15 minutes)
Blank	Free medium	Free medium
BSA	BSA (1.5 mg/mL)	BSA (1.5 mg/mL)
BSA-NPs	Free medium	BSA-NPs (50 μ g/mL)
BSA-NPs+BSA	BSA (1.5 mg/mL)	BSA-NPs(50 μ g/mL) + BSA (1.5 mg/mL)
BSA-NPs+Tf	Tf (1.5 mg/mL)	BSA-NPs(50 μ g/mL) + Tf (1.5 mg/mL)
Tf	Tf (1.5 mg/mL)	Tf (1.5 mg/mL)
Tf-NPs	Free medium	Tf-NPs(50 μ g/mL)
Tf-NPs+BSA	BSA (1.5 mg/mL)	Tf-NPs(50 μ g/mL) + BSA (1.5 mg/mL)
Tf-NPs+Tf	Tf (1.5 mg/mL)	Tf-NPs(50 μ g/mL) + Tf (1.5 mg/mL)

Table I.

Experiment program of uptake of NPs by glioma for protein competition experiments

2.12. Statistical analysis

XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for that purpose. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test and by a Fisher's test. The tests were considered as significant with p values of less than 0.05 or 0.01.

3. Results and discussion

3.1. Nanoparticles characterisation

We prepared NPs using the solvent diffusion technique. Transmission electron microscopy showed that the NPs are almost spheric in shape (Figure 1.A). Size distribution of all particles was unimodal with a mean diameter of 63 to 90 nm (Figure 1.B). DiI incorporation in NPs increased their mean hydrodynamic diameter from 63 nm to 79 nm. Furthermore, as expected, a further increase was observed when proteins were adsorbed on their surface.

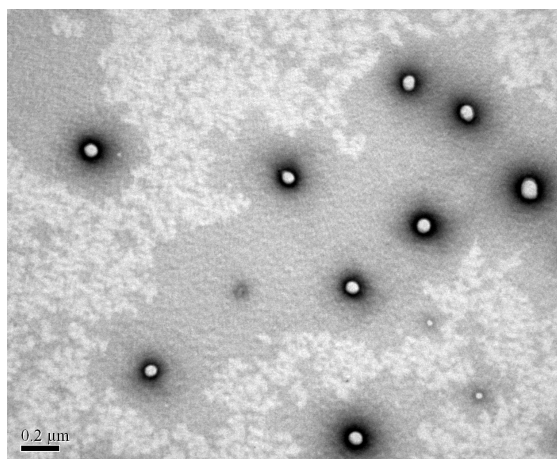


Figure 1

A: Transmission electronic microscopy images of Blank NPs after negative staining; bar represents 0.2μm.

Short term size stability of the particles was evaluated at 4°C and 37°C (data not shown). No size increase was observed at 4°C for 28 days while at 37°C only Blank NPs slowly aggregated after 8 days incubation. Blank NPs were colloidal unstable and rapidly coalesced (Jain 2000). The zeta potential of Blank NPs decreases when BSA or Tf was adsorbed on the NPs, while DiI labeling did not affect their zeta potential (Table II).

Samples	Particle size		Zeta potential
	Mean diameter (nm)	p.i	(mV)
Blank NPs	63,3± 23.6	0,037	-42.6± 6.6
DiI labeled Blank-NPs	79,2 ± 25.3	0,029	-44.2 ± 8.9
DiI labeled BSA-NPs	90,2 ± 26.8	0,132	-33.1 ± 7.7*
DiI labeled Tf-NPs	88,8 ± 27.5	0,176	-32.5 ± 8.2*

Table II.

Mean diameters (nm), polydispersity index (PI) and zeta potential of PLGA NPs (mV) (*p < 0.05; data as mean ± s.d. ; n = 3)

We followed the stability of protein adsorption on NPs at 37°C in RH. No protein desorption was observed even after 12 days incubation (Data not shown). To quantify the endocytosis of NPs by the endothelial cells, we used the fluorescent dye (DiI) as lipophilic marker. High DiI stability was found even after one week incubation at 37°C in RH due to no change of fluorescence intensity of NPs was observed (data not shown). To further confirm this result, NPs were centrifuged at 13,000 ×g for 30 min and NPs were then recovered in suspension and passed through 0.22-µm filter. No DiI was lost during this process, contrary to free DiI which could not be filtered.

3.2. Nanoparticles behaviour with blood elements (*in vitro*)

The figure 2 illustrates the interactions of PLGA-NPs and non-differentiated and non-adhesive human THP-1 cells, which can mimic circulating monocytes (figure 2.A) and the differentiated and adhesive THP-1 cells, which represent the macrophages (figure 2.B). Low concentration of protein NPs (10 µg/mL) didn't trigger the uptake by the mononuclear

phagocyte system (Figure 2). With increase of NPs concentration at 25 μ g/mL, NPs uptake by macrophages increases a lot. But with the continuous increase of NPs concentration (from 25 to 100 μ g/mL, 3-folds), NPs uptake by macrophages increase only 0.6-fold (for Tf-NPs), 0.3-fold (for BSA-NPs) and 0.4-fold (for Blank NPs). The lower uptake of BSA-NPs compared to Tf-NPs might be due to the BSA coating is more stable than transferrin coating.

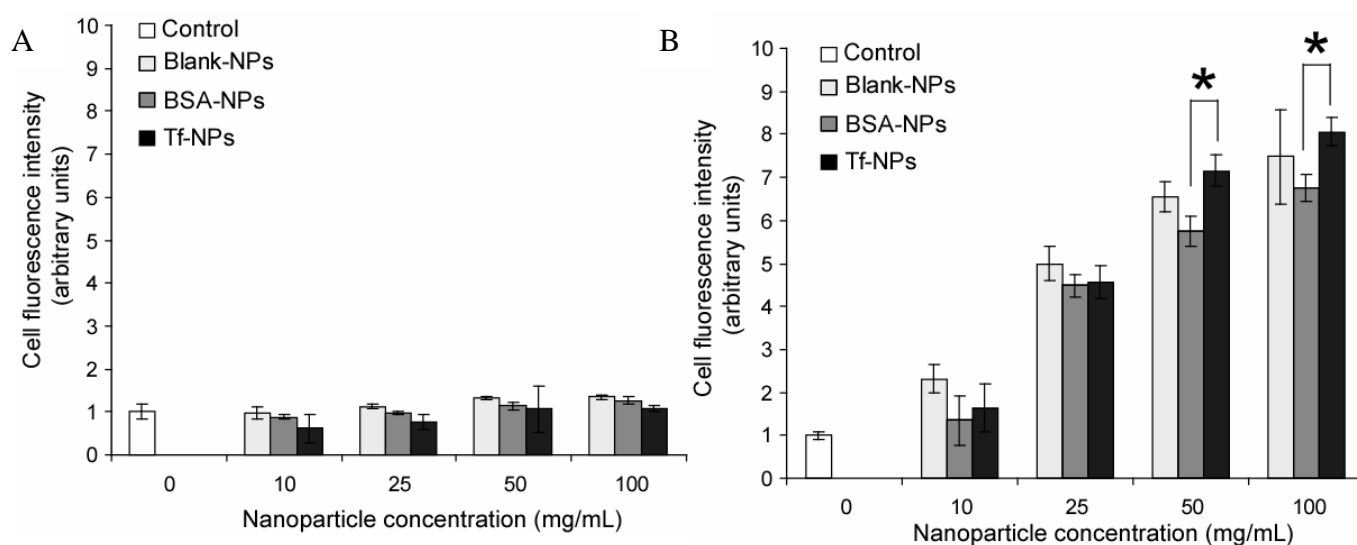


Figure 2

NPs uptake by THP-1 like monocytes (A) or by THP-1 like macrophages (B) depending of NP concentration, * $p < 0.05$

The important point is noted that for all the NPs tested, there is no visualised interaction with monocytes in contrast to macrophages where Tf-NPs has a slightly increased affinity (probably due to the Tf-receptor expression by macrophages). Concerning the NPs circulation in blood, another important element is the complement system. CH50 test revealed strong complement consumption in the presence of Blank-NPs which was increased by transferrin adsorption (Figure 3). However BSA-NPs had lower complement activation until with 300 μ m²/mL of NPs surface.

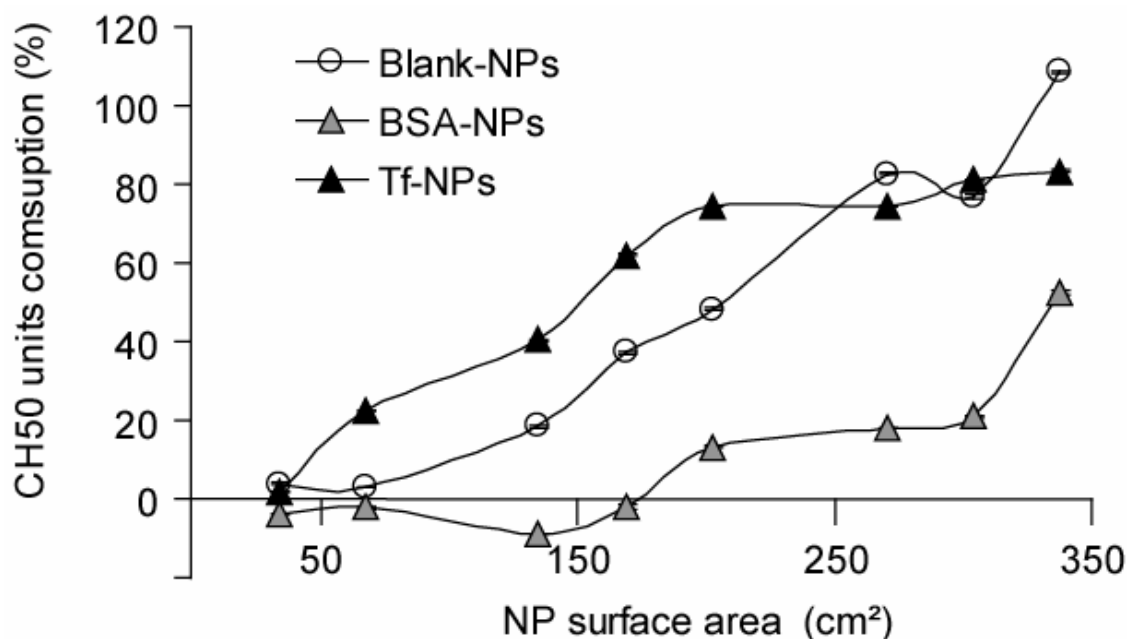


Figure 3

Consumption of CH50 units in the presence of single Blank-NPs (○), BSA-NPs (▲), Tf-NPs (▲)

The coating of PLGA-NPs by protein seems to change the NP vs biological system interactions. According to these observations of both positive and negative behaviours of these NPs with monocytes, macrophages and complement system *in vitro*, it is interesting to verify the *in vivo* plasma half-life of these NPs.

3.3. Determination of the *in vivo* plasmatic circulation time

In the mouse and rat model, the Blank-NPs have the shortest half-life, proof that the protein surface coating prevented the interactions of the serum and the NPs, which could lead to eventual elimination of the vector in blood. Interestingly the Tf surface coating of NPs increased the half-life in mice and in rats compared to the BSA. Protein coated

PLGA-NPs had higher blood remaining for the first 2 hours after i.v. injection (Figure 4. and 4.B).

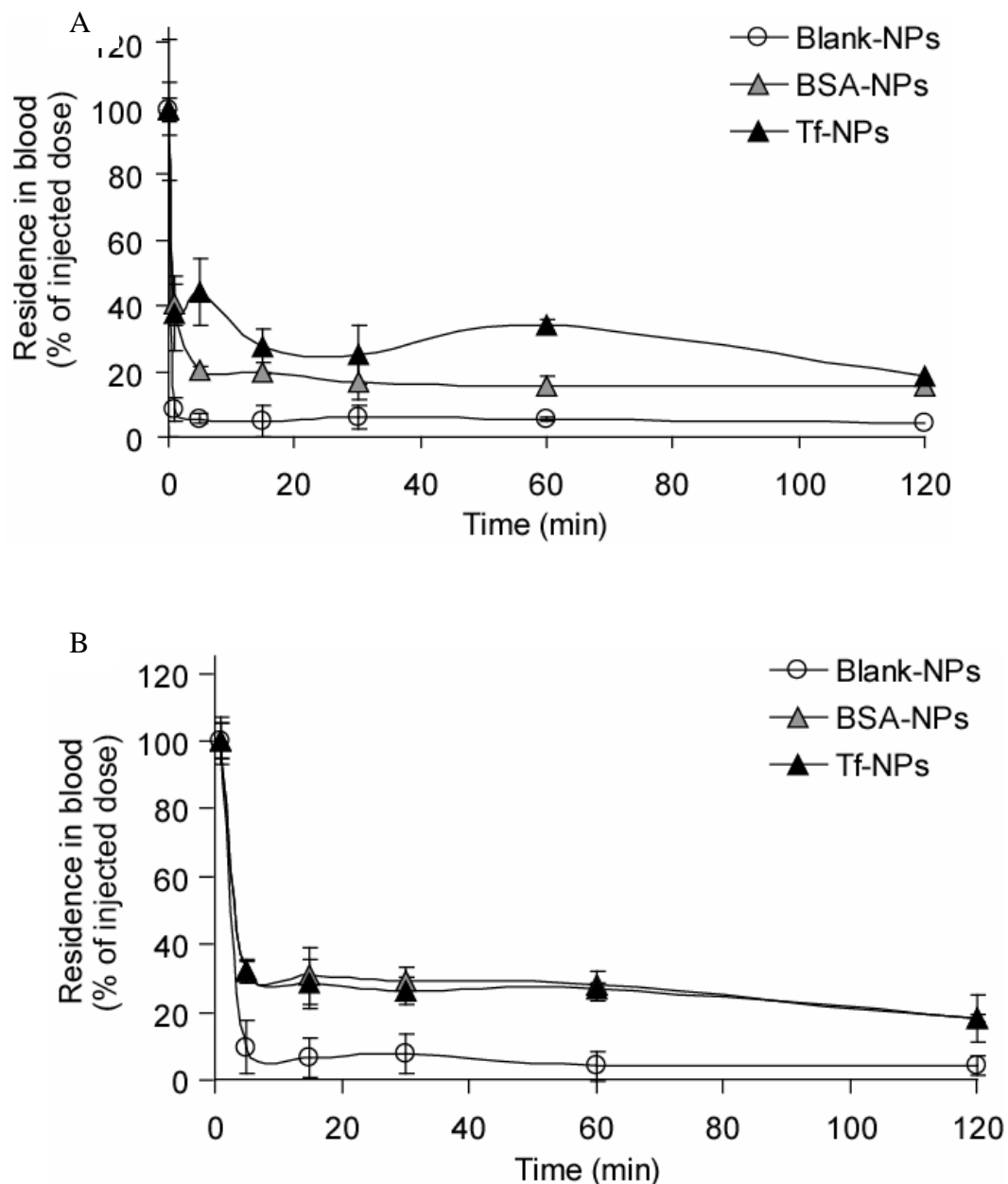


Figure 4

Plasmatic concentration-time profiles of NPs labelled with DiI, after intravenous injection in mice (A) and in rats (B). Results are expressed as % of injected dose. Blank-NPs (○), BSA-NPs (▲), Tf-NPs (▲)

Higher blood clearance of Blank NPs might be due to the NPs aggregation in serum and also of their lipophilic surface which was known to induce the uptake by mononuclear

phagocyte system. The blood circulations of these PLGA-NPs in blood indicates their property of interaction with Blood Brain Barrier and also lead to the question of their direct interaction with the local cells on the central nervous system.

3.4. Effect of Protein adsorption on the NPs behaviour on F98 cells and astrocytes

As shown in figure 5, the three types of PLGA-NPs were internalised inside F98 cells. Tf-NPs have higher uptake by glioma cells compared to BSA-NPs (Figure 6.A). Blank NPs are more internalised by F98 cells than BSA- or Tf-NPs. It might be due to their lower size (60 nm) which are more suitable for the glioma uptake.

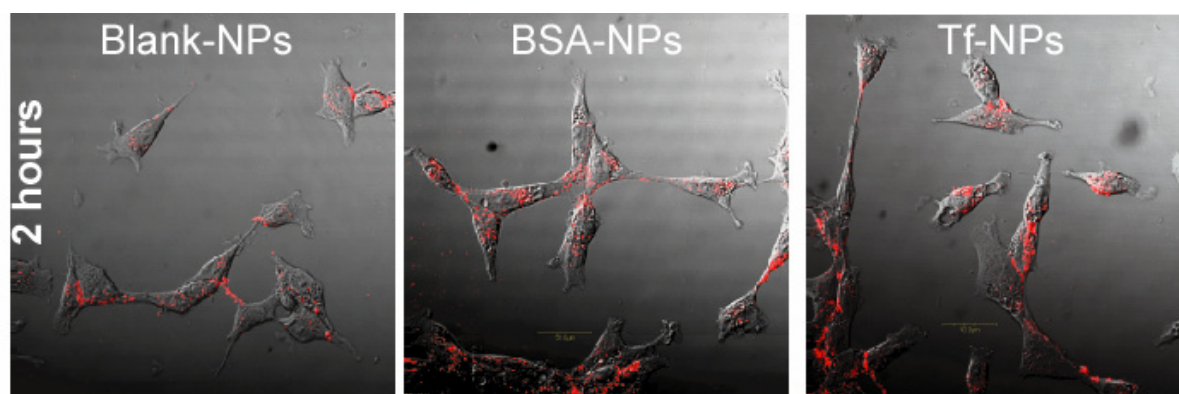


Figure 5

Confocal analysis of NPs localization in F98 cells after 2 hours of incubation at 37°C

The competition experiments with BSA or excess Tf in the culture medium were performed (figure 6.B). Experience of the BSA-NPs demonstrated that the addition of neither Tf nor BSA altered the behaviour of NPs. This underlines the weak interaction of BSA-NPs and F98 cells. The cell recognition is probably specific. Concerning to the Tf-NPs, it was not the Tf but the BSA, who reverse its interaction with glioma cells (as assumed by saturation of Tf-receptor). This result might be explained by the presence of Tf in the serum free medium,

essential for the culture, but which might already have the maximum of inhibition effect on the Tf-NPs uptake or by the non effect of free Tf if the Tf-NPs would have priority. In contrast, free BSA effect on Tf-NPs uptake might suggest that BSA has greater affinity for NPs compared to Tf and the Tf surface coating of NPs could be replaced by the protein in large excess, or that the BSA internalisation compete with Tf internalisation.

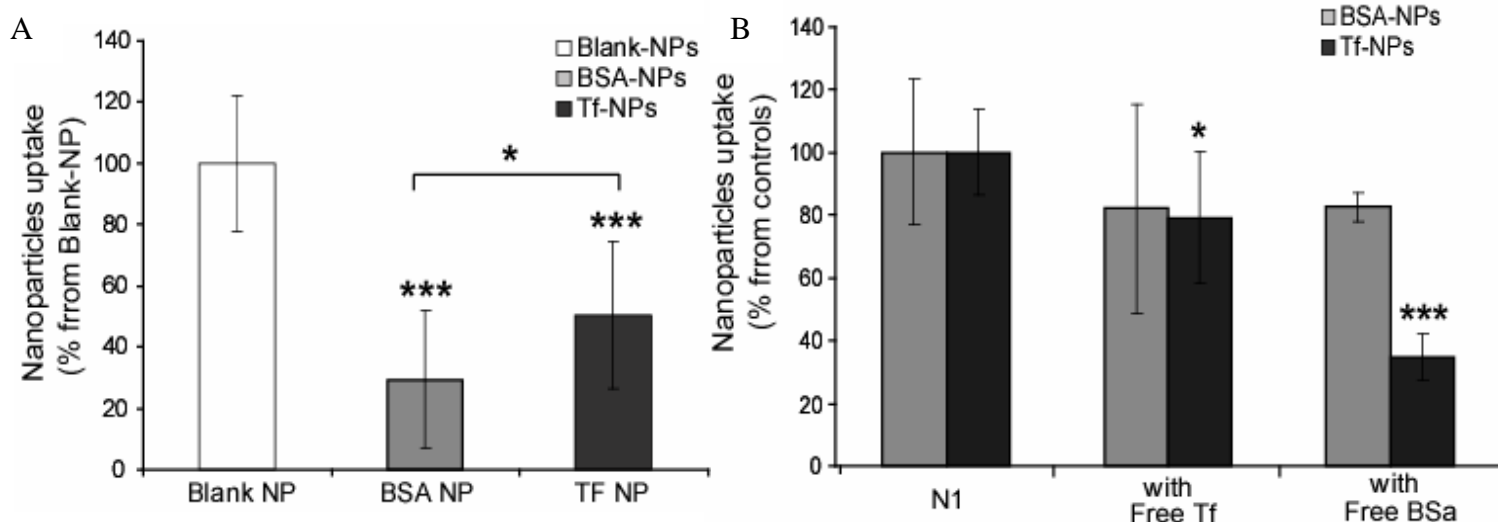


Figure 6

Comparison of NPs uptake with or without adsorption of proteins (A) ; Competition study of Tf-NPs or BSA-NPs with free Tf or BSA (B) ; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

In any case, the fact that the three NPs behave differently in terms of cellular internalisation demonstrates that each type of NPs has its interaction with the surface of F98 cells and this specificity of interaction is conferred by the protein coated or not on the NPs.

The results presented in figure 7 further corroborate the assumption that it is surface coated protein which influences NPs uptake by F98 cells. We find that the Blank-NPs and the Tf-NPs are using very similar endocytic mechanisms in terms of caveolae-pathways inhibitors (MBC and nystatin) and macropinocytosis (DMA). Meanwhile clathrin-pathways is also used (Chlorpromazine and potassium depletion) for Blank-NPs and Tf-NPs uptake by F98 cells.

The different behaviour of Tf-NPs and BSA-NPs definitively demonstrates the endocytic mechanistic specificity is due to the type of protein coating. However, this result raises the question on the selectivity of Tf-NPs on F98 cells and in particular to the Tf-receptor.

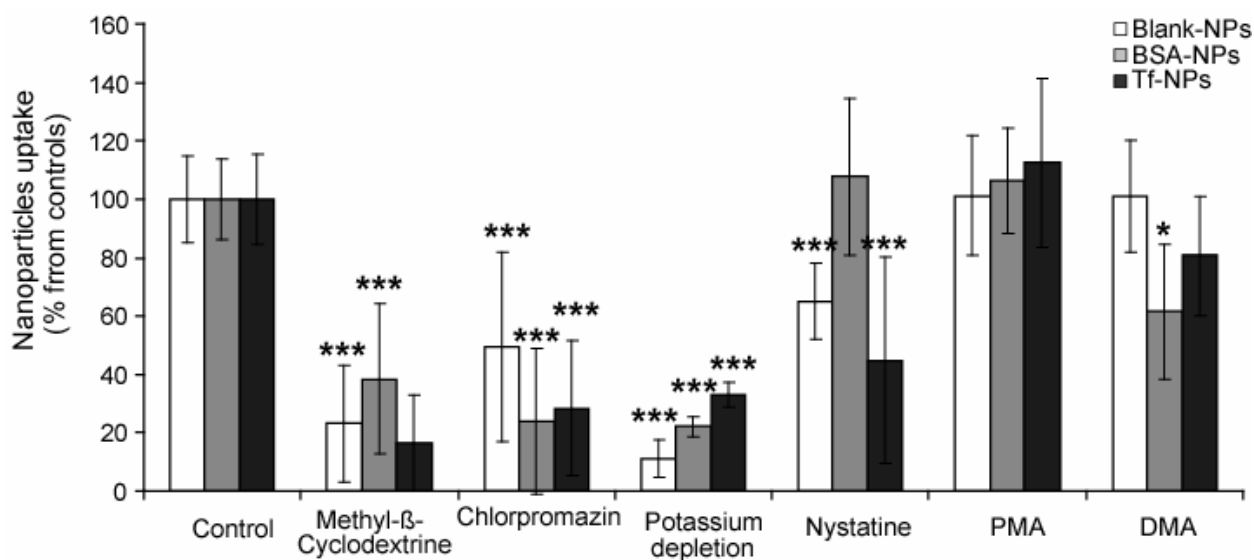


Figure 7

Mechanisms involved in active endocytosis of LNC was assessed by the variation of the basal mean fluorescence intensity of F98 cells after 2 hours incubation with DiI-NPs at 37°C and treatment with known inhibitors of endocytosis ; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

For the endocytosis of PLGA-NPs by central system nervous cells (Figure 8.A and 8.B), there is no or little difference of NPs uptake between F98 glioma cells and primary neonatal rat astrocytes. The results presented on figure 8.B demonstrate effective relation of doses-uptake on the two different cell types with a plateau for the uptake of BSA-NPs in glioma cells, but the Tf-NPs continue to increase their endocytosis when their concentration increased (under no saturation phenomenon). The endocytosis of Tf-NPs by the astrocyte is very low compared to Blank-NPs, unlike by F98 cell in which the endocytosis of Tf-NPs unspecific “follows” with Blank-NPs. These observations could be explained by the metabolic activity of F98 cells whose iron needs increased. This result is also concerned with the 3-to 4-times

higher Tf-receptor expression in F98 cells compared to astrocytes (Figure 8.C). All these results give us the idea of glioma selectivity and targeting by these Tf-NPs.

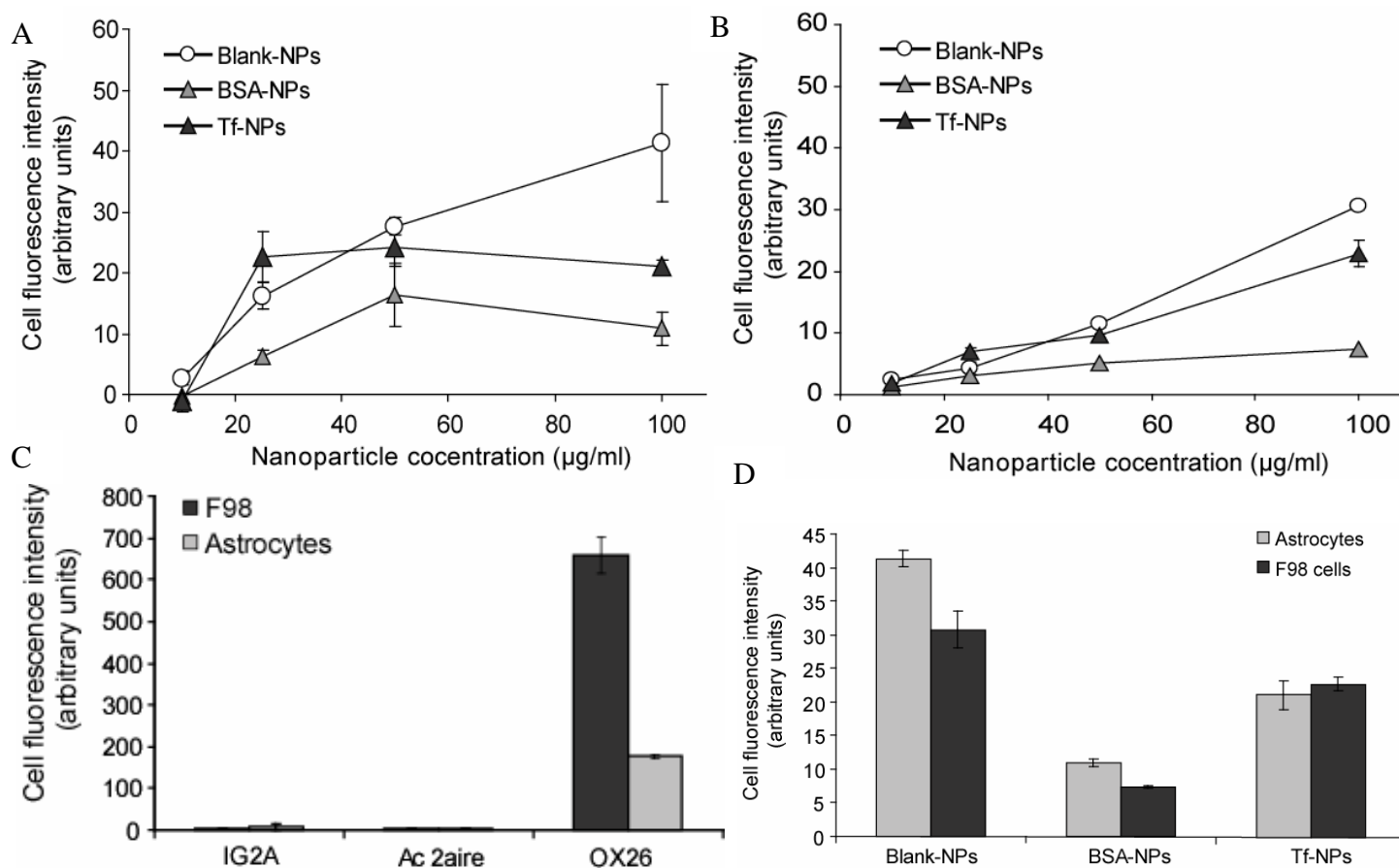


Figure 8

Blank-NPs, BSA-NPs, Tf-NPS uptake dose-response experiments performed with increasing concentration of these DiI-NPs after 2 hours incubation in astrocytes (A) or F98 cells (B). Data are expressed as cell fluorescence intensity. Evaluation of Tf-receptor on F98 cells and astrocytes, with 2nd antibody and IgG2A controls (C). Comparison of NP uptakes in astrocytes or F98 cells with or without adsorption of proteins (at a concentration of incubation of 100µg/ml) (D) ; *p < 0.05, ***p < 0.001

4. Conclusion

NPs can be surface modified with protein, this adsorption slightly modified size and zeta potential (Figure 2, Table II). Above all, we found that protein coating of PLGA-NPs by BSA

or Tf highly modified in vivo plasma clearance of intra-venous injected NPs in rats and mice. Complement experiments showed that protein-NPs did not activate the immune system and prolong their half-life in the blood of rats and mice contrary to Blank-NPs. Meanwhile, they were not recognised by monocytes. We showed in vitro that Tf-NPs were endocytosed by the glioma cells via caveolae- and clathrine-mediated pathway. Weak interaction of BSA-NPs and F98 glioma cells suggested that the glioma cellular recognition is probably specific. Increase of Tf-NPs uptake by F98 glioma cells suggests the interactions between transferrin and the over expressed Tf-receptor on the surface of F98 cell membranes. The different behaviour of Tf-NPs and BSA-NPs definitively demonstrates the endocytic mechanistic specificity is due to the type of coating protein. All these results suggest that these transferrin coated NPs should be tested as drug carrier to treat glioma.

5. Acknowledgments

We would like to thank Pierre Legras (Animalerie Hospitalo-Universitaire, CHU, Angers, France) for technical support as well as Dr Alain Chevalier (Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Espace Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers) for normal human serum supplies. A. Paillard was supported by a grant from *Le comité départemental de la Ligue Contre le Cancer*. This work was also supported by the *Cancéropôle Grand-Ouest* and by *la Ligue National Contre le Cancer* via *Equipe Labellisée 2007* funding.

Bibliography

- Abela, R. A., J. Qian, L. Xu, T. S. Lawrence, and M. Zhang. 2008. Radiation improves gene delivery by a novel transferrin-lipoplex nanoparticle selectively in cancer cells. *Cancer Gene Ther* 15: 496-507.
- Beduneau, A., P. Saulnier, F. Hindre, A. Clavreul, J. C. Leroux, and J. P. Benoit. 2007. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 28: 4978-90.
- Belloq, N. C., S. H. Pun, G. S. Jensen, and M. E. Davis. 2003. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconj Chem* 14: 1122-32.
- Blasi, P., S. Giovagnoli, A. Schoubben, M. Ricci, and C. Rossi. 2007. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 454-77.
- Chang, J., Y. Jallouli, M. Kroubi, X. B. Yuan, W. Feng, C. S. Kang, P. Y. Pu, and D. Betbeder. 2009. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 379: 285-92.
- Couvreur, P., G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, and C. Vauthier. 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19: 99-134.
- Cowens, J. W., P. J. Creaven, W. R. Greco, D. E. Brenner, Y. Tung, M. Ostro, F. Pilkiewicz, R. Ginsberg, and N. Petrelli. 1993. Initial clinical (phase I) trial of TLC D-99 (doxorubicin encapsulated in liposomes). *Cancer Res* 53: 2796-802.
- Dechy-Cabaret, O., B. Martin-Vaca, and D. Bourissou. 2004. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chem Rev* 104: 6147-76.
- Dehouck, B., L. Fenart, M. P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli. 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138: 877-89.
- Descamps, L., M. P. Dehouck, G. Torpier, and R. Cecchelli. 1996. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* 270: H1149-58.
- Duffy, K. R., and W. M. Pardridge. 1987. Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res* 420: 32-8.
- Faraji, A. H., and P. Wipf. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950-62.
- Gabizon, A., R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang, and Y. Barenholz. 1994. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 54: 987-92.
- Garcion, E., A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, and J. P. Benoit. 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 5: 1710-22.
- Gref, R., Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer. 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-3.
- Grossman, S. A., and J. F. Batara. 2004. Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol* 31: 635-44.
- Jain, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475-90.
- Johannes, L., and C. Lamaze. 2002. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 3: 443-51.
- Klibanov, A. L., K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang. 1990. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268: 235-7.

- Kreuter, J. 1994. Drug targeting with nanoparticles. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 19: 253-6.
- Kreuter, J., P. Ramege, V. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. von Briesen, and D. J. Begley. 2003. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res* 20: 409-16.
- Lacoeuille, F., E. Garcion, J. P. Benoit, and A. Lamprecht. 2007. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* 7: 4612-7.
- Larkin, J. M., M. S. Brown, J. L. Goldstein, and R. G. Anderson. 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33: 273-85.
- Li, J. L., L. Wang, X. Y. Liu, Z. P. Zhang, H. C. Guo, W. M. Liu, and S. H. Tang. 2009. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett* 274: 319-26.
- Li, Y., M. Ogris, E. Wagner, J. Pelisek, and M. Ruffer. 2003. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation. *Int J Pharm* 259: 93-101.
- Liu, N. Q., A. S. Lossinsky, W. Popik, X. Li, C. Gujuluva, B. Kriederman, J. Roberts, T. Pushkarsky, M. Bukrinsky, M. Witte, M. Weinand, and M. Fiala. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76: 6689-700.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, and J. C. Murray. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* 19: 311-30.
- Muller, R. H., and C. M. Keck. 2004. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol* 113: 151-70.
- Pan, X., J. Guan, J. W. Yoo, A. J. Epstein, L. J. Lee, and R. J. Lee. 2008. Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery. *Int J Pharm* 358: 263-70.
- Panyam, J., and V. Labhasetwar. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 329-47.
- Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2: 751-60.
- Pereira de Oliveira, M., E. Garcion, N. Venisse, J. P. Benoit, W. Couet, and J. C. Olivier. 2005. Tissue distribution of indinavir administered as solid lipid nanocapsule formulation in *mdr1a (+/+)* and *mdr1a (-/-)* CF-1 mice. *Pharm Res* 22: 1898-1905.
- Qian, Z. M., H. Li, H. Sun, and K. Ho. 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54: 561-87.
- Rahman, A., J. Treat, J. K. Roh, L. A. Potkul, W. G. Alvord, D. Forst, and P. V. Woolley. 1990. A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin. *J Clin Oncol* 8: 1093-100.
- Rapoport, N. Y., A. M. Kennedy, J. E. Shea, C. L. Scaife, and K. H. Nam. 2009. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles. *J Control Release* 138: 268-76.
- Rodal, S. K., G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961-74.

- Sahoo, S. K., and V. Labhasetwar. 2005. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol Pharm* 2: 373-83.
- Sells, R. A., R. R. Owen, R. R. New, and I. T. Gilmore. 1987. Reduction in toxicity of doxorubicin by liposomal entrapment. *Lancet* 2: 624-5.
- Storm, G., M. T. ten Kate, P. K. Working, and I. A. Bakker-Woudenberg. 1998. Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes: effects on bacterial blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system. *Clin Cancer Res* 4: 111-5.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-96.
- Tosi, G., L. Costantino, F. Rivasi, B. Ruozi, E. Leo, A. V. Vergoni, R. Tacchi, A. Bertolini, M. A. Vandelli, and F. Forni. 2007. Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J Control Release* 122: 1-9.
- Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, and K. Tada. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42: 1530-6.
- Vonarbourg, A., P. Saulnier, C. Passirani, and J. P. Benoit. 2005. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* 26: 2066-75.
- Xu, F., W. Lu, H. Wu, L. Fan, X. Gao, and X. Jiang. 2009. Brain delivery and systemic effect of cationic albumin conjugated PLGA nanoparticles. *J Drug Target* 17: 423-34.
- Zhang, X., C. G. Koh, B. Yu, S. Liu, L. Piao, G. Marcucci, R. J. Lee, and L. J. Lee. 2009. Transferrin receptor targeted lipopolyplexes for delivery of antisense oligonucleotide g3139 in a murine k562 xenograft model. *Pharm Res* 26: 1516-24.

Chapitre 2 :

Barrières cellulaires et subcellulaires

Dans ce chapitre sont présentées différentes recherches, se rapportant aux interactions entre des LNCs et les barrières cellulaires et subcellulaires chez les cellules F98. Les travaux évaluant les interactions entre des PLGA-NPs et ces barrières ayant déjà été présentées dans le chapitre 1, ils ne seront abordés à nouveaux que dans la discussion générale, avec les travaux préliminaires concernant les interactions des NPS avec ces barrières. Seront donc présentées ici deux publications constituant une évaluation pionnière au niveau cellulaire et subcellulaire des LNCs.

Le premier article a été publié dans la revue « *Molecular Cancer Therapeutics* » sous le titre : « *A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats* » (Garcion et al. 2006). Le second article s'inscrit dans la continuité des travaux présentés dans le premier. Actuellement en processus de revision, il a pour intitulé : « *Analysis of the subcellular behaviour of lipid nanocapsules in cancer cells reveals specific skills for lysosome escape and size-dependent phamacological activity* ».

Ces travaux ont permis de mettre en place les moyens d'évaluation du comportement des LNCs sur les cellules. En incluant l'influence de la nature lipidique des nanovecteurs, mais aussi de leur taille (20, 50, 100nm), ces études nous ont permis d'évaluer quantitativement et qualitativement leurs entrées dans la cellule, leurs localisations subcellulaires, ainsi que leur capacité à modifier le comportement cellulaire et l'intégrité des lysosomes. Elles nous ont également permis d'appréhender un lien de cause à effet entre l'entrée dans la cellule, le respect de l'intégrité cellulaire et l'activité biologique d'un principe actif vectorisé.

Publication n°3 :

« A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats»

Publication n°4 :

« Analysis of the subcellular behaviour of lipid nanocapsules in cancer cells reveals specific skills for lysosome escape and size-dependent pharmacological activity »

**Analysis of the subcellular behaviour of lipid nanocapsules
in cancer cells reveals specific skills for lysosome escape
and size-dependent pharmacological activity.**

A. Paillard ^a, F. Hindré ^a, J-P. Benoit ^a, E. Garcion ^a✉.

^a Inserm, U646, Angers, F-49100, France ; PRES Université Nantes Angers Le Mans (UNAM), Université d'Angers, Angers, F-49100, France.

✉Corresponding author: Emmanuel Garcion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646, 10 rue André Boquel, 49100 Angers, France. Telephone: +33 2 41 73 58 85; Fax: +33 2 41 73 58 53; E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Running title: Lipid nanocarriers and subcellular trafficking.

Abstract

To establish the finest therapeutic relevance of new nanocarriers, rationalization of knowledge on their interactions with life elements is necessary. By focusing on rat glioma cells, the present paper describes an analysis in which endocytosis, intracellular trafficking and lysosome escape of lipid nanocapsules (LNCs) were evaluated. A particular attention was paid to nanoparticle size and pharmacological activity. Our findings indicated that LNC cell accumulation was rapid (potent after 2 minutes) and mediated predominantly through an active and saturating mechanism that involved endogenous cholesterol. While the nature of LNC influenced their uptake, the size had also an importance with the involvement of clathrin/caveolae-independent pathways for 20/50nm LNCs and less-exclusive pathways for 100nm LNCs. Although initially present in endosomes, LNCs can bypass the endo-lysosomal compartment and did not end in lysosome. As such, LNCs reverted lysosome integrity in a size-dependent fashion with best efficiency for small nanoparticles. When loaded with paclitaxel, LNCs with smallest sizes triggered also the best cell death activity. Those intrinsic nanoparticle biological properties could be linked to the proportion of excipients provided to the cell, among which the non-ionic surfactant hydroxystearate of poly(ethylene glycol). They may be considered toward the development of adjusted and controlled nanomedicines.

Key Words: nanoparticle, nanocarrier endocytosis and subcellular trafficking, intracellular drug delivery, cancer therapy, nanomedicine.

Introduction

Nanotechnologies provide new opportunities to design customized drug-delivery devices for improved specificity, biological safety and efficacy against diseases including cancer (1, 2). Indeed, thanks to their physicochemical properties and submicronic sizes which classically vary from 5 to 200nm, nano-objects and nanomaterials can interact in unique fashion with biological systems. Drugs, appropriately “nano-enveloped”, could present a greater apparent solubility and be protected from degradation before reaching their target. Besides according to the characteristics of the nanoparticles envelope, their membrane passage and their release kinetics could be more carefully controlled (2, 3). Hence, pharmaceutical drug nanocarriers, like liposomes, nanoemulsions or polymeric nanoparticles are expected to bring subsequent clinical advantages : decrease of administered dose, reduction of side effects, increase of drug bioavailability and efficacy in the targeted cell or organ (1, 2).

However, before employment in the clinics most of new drug nanocarriers remain perfectible. Their relevance should not be thought only in terms of apparent drug efficiency but also evaluated in terms of rationalization of knowledge on the interactions between nanocarrier constituents and life elements. An increased knowledge of drug nanocarriers behaviour in a biological environment leads to an optimized drug carrier design, drug-nanocarrier combinations and therefore to a more efficient targeting and a greater drug efficiency. Indeed, many therapeutic molecules involve an intracellular delivery to exert their action inside the cytoplasm, the nucleus or other specialized organelles. Although this challenge can be achieved by nanocarriers, it implies a series of biological events that require careful identification (3, 4). Thus, mechanisms that link biological efficacy to subcellular nanocarrier performance, including the fate of carrier constituents, drug bioavailability and

cell integrity, represent an essential pre-requisite for their wide use as genuine medical tools.

In contrast to free drugs, which can cross plasma membrane by active or passive diffusion, cellular uptake of nanocarriers generally requires endocytosis (4). Most of our current knowledge on this critical step, which defines pathways that are used by nanocarriers to exert their action in a particular cell type, emerges from investigation on viral particles (5). In addition to phagocytosis that occurs in specialized immune cells, endocytosis can be defined on the basis of molecular clathrin-dependence, with multiple subtypes of clathrin-dependent and clathrin-independent pathways (6, 7). Thus far, several co-existing mechanisms have been described such as macropinocytosis also identified as fluid-phase endocytosis (8), caveolae/raft-dependent endocytosis (9) and clathrin/caveolae-independent endocytosis including flotillin-1 pathway (10). Intracellular drug delivery processes will depend on nanocarrier intrinsic properties (11, 12), but also on endocytic pathways in a given cell type (13). Hence, it is important to emphasize that known endocytic pathways differ from one another by the molecular initiation, size and composition of their endocytic vesicles, but also by their vesicular traffic through specific intracellular compartments as early endosome, recycling endosome, lysosome, or more recently described caveosome (4, 14).

Clathrin-mediated endocytosis initiated by specific ligand-receptor interactions on extracellular surface results in the formation of intracellular endosomal vesicles that eventually mature in acidic lysosomes (15). Considering the potential risk of inactivation of therapeutics by a number of acid hydrolases from the endo-lysosomal compartment, nanocarriers able to avoid this pathway would be of interest (16, 17). Nanoparticle characteristics can influence their subcellular outcome as demonstrated for lysosome escape with nanoparticles combined to pH-sensitive fusogenic peptides (18), “fusogenic” lipoplexes (19), “proton sponge” polyplexes (20) or dynamic polyconjugates (21). Thus, they are no longer considered as passive objects but as active entities involved in the modulation of

biological processes.

Lipid nanocapsules (LNC) are synthesized without the use of organic solvent, according to a phase inversion process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily, fatty phase, a non-ionic hydrophilic surfactant and a lipophilic surfactant (22). They can be adjusted to specific sizes (*e.g.* 20 nm, 50 nm, 100 nm) with a narrow distribution through precise modifications in biocompatible excipient proportions (23). Although LNC have already shown stealth properties (24), a potential of radiopharmaceutic (25) or hydrophobic (26, 27) drug carriers and their capability to overcome the multidrug resistance mechanism (26), little is known on their subcellular behaviour. By focusing on cancer cells, and especially on F98 rat-glioma cells, the aim of the present study is to qualitatively and quantitatively investigate LNC relation to endocytosis, intracellular trafficking and lysosome escape. As such, a particular attention was paid to LNC size and pharmacological activity.

Materials and methods

1) Materials

The lipophilic Labrafac[®] WL 1349 (caprylic-capric acid triglycerides, European Pharmacopeia, IVth, 2002) was provided by Gattefossé (Saint-Priest, France). Lipoïd[®] S75-3 (soybean lecithin containing at least 69% of phosphatidylcholine) and Solutol[®] HS 15 were gifts from Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Rabbit polyclonal antibodies to Rab5, Golgi 58K or to cathepsin D were provided by Abcam (Cambridge, UK). Fluorescent mounting medium and polyclonal FITC-conjugated anti-rabbit antibody were from Dako (Trappes, France). Nile red (NR), cholesterol, neutral red, bafilomycine A1, concanamycin-C, lysosome isolation kit, acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase assay kits, chlorpromazine, nystatin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride (DMA) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Paclitaxel powder was from Indena (Milan, Italy). ^{99m}Tc was obtained from a ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator purchased from CIS bio International/Schering (Gif-sur-Yvette, France) and was a kind gift from the *Service de Médecine Nucléaire du CHU d'Angers* (Angers, France).

2) Lipid nanocapsule (LNC) synthesis

a) Blank LNC

LNC were synthesized as described previously (22) by using a phase inversion process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily/fatty phase (triglycerides : Labrafac[®]), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate : Solutol[®]) and a lipophilic surfactant (lecithins : Lipoïd[®]). Briefly, Solutol[®] HS15, Lipoïd[®], Labrafac[®], NaCl and water were mixed and heated under magnetic stirring up to 85°C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85°C and 60°C were then realized. They were finally followed by an irreversible shock induced by dilution with 0°C deionised water added into the inversion phase zone. Required LNC sizes (20, 50 and 100nm) were obtained by adjusting component proportions as previously described (23).

b) ^{99m}Tc radiolabelled LNC (Tc-LNC)

Neutral sulfur-rich lipophilic complex [Bis(perthiobenzoato) (dithiobenzoato) technetium (III)] (^{99m}Tc-SSS) were prepared as described previously (28). The radiochemical purity of the ^{99m}Tc-SSS complexes was checked by thin-layer chromatography. Thin-layer chromatography was carried out using silica gel 60 F254 alumina plates (Merck, Fontenay-sous-Bois, France) and a solution of petroleum ether/dichloromethane (6/4, v/v) as an eluent. The detection was evaluated by using a Cyclone phospho-imager apparatus (Packard Bioscience, Rungis, France). The preparation of ^{99m}Tc radiolabelled LNC (Tc-LNC) was based on the encapsulation of ^{99m}Tc-SSS complexes within the nanoparticles. ^{99m}Tc-SSS complexes in suspension in 0.9% saline solution were added to the raw materials in place of water before starting the magnetic stirring, with the remaining procedure unchanged. At the end of the formulation process, the whole ^{99m}Tc activity was found to be incorporated within the nanoparticles as previously noticed (25).

c) Fluorescent Nile red labelled LNC (NR-LNC)

The fluorescent compound Nile red (NR) was used as previously described (26). Briefly, NR was dissolved in acetone at 1% (w/w), and the resulting NR solution was incorporated in Labrafac[®] at 1:10 (w/w). LNC were then prepared as described in section 2.a. Size exclusion and high-pressure liquid chromatography (HPLC) assays demonstrated a complete encapsulation and retention of NR as previously observed (26).

d) Paclitaxel-loaded LNC (PTX-LNC)

20 mg of paclitaxel (PTX) were firstly solubilized in Labrafac[®] and incorporated within LNC according to the previously described process resulting in the formation of PTX-LNC (26). Precipitated non-encapsulated PTX was removed after filtration of PTX-loaded LNC dispersions on a Millex[®] GV 0.2- μ m filter (Fischer Scientific). PTX concentrations were then measured by HPLC in triplicate experiments. Encapsulation efficiency was calculated by consideration of the initial amount of drug added as previously described (26). PTX-LNC concentrations were adjusted to obtain identical final PTX doses.

3) LNC size determination

LNC were analysed for their size distribution using a Malvern Zetasizer[®] Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). LNC were diluted 1:100 (v/v) in deionised water in order to ensure a convenient scattered intensity on the detector. This photon correlation spectroscopy confirmed that all LNC (Blank LNC, NR-LNC, Tc-LNC,

PTX-LNC) had a monomodal particle size distribution with a narrow distribution (polydispersity index <0.3).

4) Glioma cell and newborn rat primary astrocyte cultures

Malignant rat-glioma cells (F98) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Purified newborn rat primary astrocytes were obtained by the mechanical dissociation method from cultures of cerebral cortex as originally described (29). The cells were grown at 37°C/5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with glucose and L-glutamine (Biowhittaker, Verviers, Belgium) containing 10% Foetal Calf Serum (FCS) (Biowhittaker) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma-Aldrich).

5) Quantitative analysis of cell uptake and release of LNC by radiotracing (kinetics, dose/responses, cell specificity)

F98 cells were plated at $2 \cdot 10^5$ per 25cm² well in 5mL DMEM/10% FCS. After 48 hours, cells were washed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Cambrex, Verviers, Belgium) and were treated with Tc-LNC 20, 50 or 100 at desired concentration from initial suspensions in serum-free medium containing 50% DMEM, 50% Ham's F12 (Biowhittaker) and N1 supplement (Sigma). After desired incubation times at 37°C, cells were washed with HBSS, scrapped and sampled for analysis. For the release analysis, F98 cells were firstly incubated for 2 hours at 37°C in the presence of Tc-LNC. Cells were then washed three times with HBSS and incubated for desired times at 4°C or at 37°C in serum-free medium. Cells were finally washed with HBSS, scrapped and sampled, as washing media and supernatants,

for analysis. ^{99m}Tc was quantified by using a gamma-counter at the energy window of 140 keV F 20% (Cobra II, Packard Bioscience, Rungis, France).

6) Qualitative analysis of LNC cellular uptake by flow cytometry

a) Cell treatment with chemical inhibitors of known endocytic pathways

Previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways were used as described elsewhere (6). Briefly, glioma cells were pre-treated with inhibitors for 1 hour at 37°C in serum-free culture medium. Cholesterol depletion was carried out by using methyl- β -cyclodextrin (M β CD) in the presence of lovastatin (30). Chlorpromazine and potassium depletion (31) were used to inhibit clathrin-mediated transport, while PMA was used to selectively disrupt caveolae and DMA to inhibit macropinocytosis (32). Subsequently, NR-LNC 20, 50 and 100 were incubated at 1/1000 from initial suspension with glioma cells in serum-free medium for 2 hours before flow cytometry analysis.

b) Flow cytometry

A BD FACS CaliburTM fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuestTM software (BD-biosciences, Le Pont de Claix, France) were used to perform flow cytometry analysis as previously described (26).

7) Confocal laser scanning microscopy

F98 cells were plated at 10^4 /mL in eight-well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc, Roskilde, Denmark) in DMEM containing 10% FCS. 24 hours before experimentation F98 cells were washed with HBSS and incubated in serum-free medium. During experimentation cells were incubated in serum-free medium for different times in the presence of NR LNC 20, 50 and 100 at 1/1000 dilution. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 30 minutes at 4°C. After washes in HBSS, immunocytochemistry was applied by using primary rabbit polyclonal immunoglobulins against Rab5 (1/200 in PBS/BSA 4%), Golgi 58K (1/125 in PBS/BSA 4%) or cathepsin D (1/175 in PBS/BSA 4%) incubated overnight at 4°C. A secondary anti-rabbit FITC-conjugated antibody (1/200 in PBS/BSA 4%) was then applied for 1 hour at room temperature. Finally, cells were mounted under coverslip in fluorescent mounting medium (Dako)/PBS (1:1). Confocal microscope images were obtained by using an Olympus Fluoview™ FU 300 confocal laser scanning microscopy imaging system (Paris, France).

8) Assessment of ^{99m}Tc incorporated in F98 lysosomal fractions through isolation of lysosomes from F98 cells treated by Tc-LNC

F98 cells were plated at 2.10^6 per well of 175cm² in 20mL DMEM containing 10% FCS. After 48 hours, cells were washed in HBSS and treated with Tc-LNC 20, 50 or 100 at 1/1000 dilution from initial suspension in serum free-medium. After a 2-hours incubation at 37°C, cells were washed with HBSS, scrapped and lysed by using a mechanical dounce. Lysosomes were isolated on sucrose gradient by using a lysosome isolation kit from Sigma. Using acid phosphatase and β -N-acetyl-glucosaminidase activity quantifications, according to the manufacturer instructions, made identification of lysosomal fractions. Incorporated ^{99m}Tc was analyzed by gamma-counting.

9) Neutral red assay for the assessment of lysosomal integrity

F98 cells were initially plated at $2 \cdot 10^5$ per 9cm^2 well in 2mL DMEM containing 10% FCS. After obtaining confluent cell monolayers, cells were washed and pre-treated for 2 hours at 37°C with neutral red at $10\mu\text{g/mL}$ in serum-free medium as described previously (33, 34). They were then treated in the presence of neutral red for 2 additional hours at 37°C with control (serum-free medium), lysosome affine 70kDa dextran, LNC (at 1/200, 1/500, 1/1000 and 1/2000 dilutions) or lysosome V-ATPase inhibitors (bafilomycine A1 or concanamycin-C). F98 cell monolayers were finally photographed for image analysis. Labelled surface area representing lysosome was quantified on total monolayer area by using the Image J software.

10) Cell survival assay

F98 cells were plated at $2 \cdot 10^5$ per 9cm^2 well in 2mL DMEM containing 10% FCS. After the wash of cells with HBSS, they were firstly treated with control culture medium, blank or PTX-loaded LNC20, 50 or 100 at different concentrations for 2 or 24 hours of incubation at $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. After removal of treatment medium and three washes in HBSS, cells were secondly incubated for 72 hours at 37°C in culture medium. After washes, cell survival expressed as percentage of control cells was assessed by using the tetrazolium-based colorimetric MTT assay as previously described (26).

11) Statistical analysis

XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for that purpose. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test and by a Fisher's test. The tests were considered as significant with p values of less than 0.05 or 0.01.

Results

1) Modalities of accumulation of LNC within F98 cells

a) Kinetics and dose response

To optimize the utilisation of LNC as intracellular drug vehicles in cancer cells, we first wanted to characterise their internalization modalities in terms of passive versus active and saturable versus non-saturable mechanisms in F98 cells. Therefore LNC of three different sizes (20, 50, and 100nm) were studied with quantification of cellular uptake through the use of Tc-LNC. To discriminate active and passive processes, experiments were realised at 37°C and 4°C. Lowering temperature usually turned off global cell metabolic activity among which mechanisms of active uptake (35).

Data presented on Figure 1A showed clear differences between 37°C and 4°C in the transport of Tc-LNC to F98 cells (from 10 minutes for LNC20 or LNC50 and from 30 minutes for LNC100). Although at 37°C the slopes of the kinetic curves were similar for all sizes of LNC, at 4°C the emergence of a plateau occurs later with LNC100 than with LNC20 or LNC50 (Figure 1A).

For dose/response experiments, incubation of Tc-LNC with F98 cells for two hours at 37°C demonstrated a reduction in the ratio of LNC accumulated within cells with increasing nanoparticle concentrations, independently from LNC sizes (Figure 1B). On the contrary at 4°C, a stagnation of LNC binding to the cells is always observed (Figure 1B). Thus, dose/response curves at 37°C and 4°C became parallel from an inflection point around 30µg of LNC20, LNC50 or LNC100.

Taken together, those data support the fact that LNC uptake by F98 cells is an active and saturable process, suggestive of an endocytosis.

b) Selectivity between cancer and quiescent cells

To test the hypothesis that LNC of different sizes may have distinct cell uptake relationship depending on cell nature or cell proliferative status, internalization of Tc-LNC in cancer cells (exemplified by F98 glioma cells) was compared to non-transformed “quiescent” cells (exemplified by rat primary astrocytes). Astrocytes and F98 cells were cultivated in order to obtain homogeneous cell monolayers and incubated with specific concentrations of Tc-LNC. For identical monolayer surface area, the percentage of Tc-LNC transported to cells was found identical for F98 cells and astrocytes (Figure 1C). In contrast, this percentage was improved in astrocytes versus F98 cells when expressing the data in Tc-LNC incorporated per cell (data not shown) instead of in Tc-LNC incorporated per monolayer. Those observations indicate that LNC uptake is dependent on membrane surface size presented by cells and likely less related to cell cycling properties.

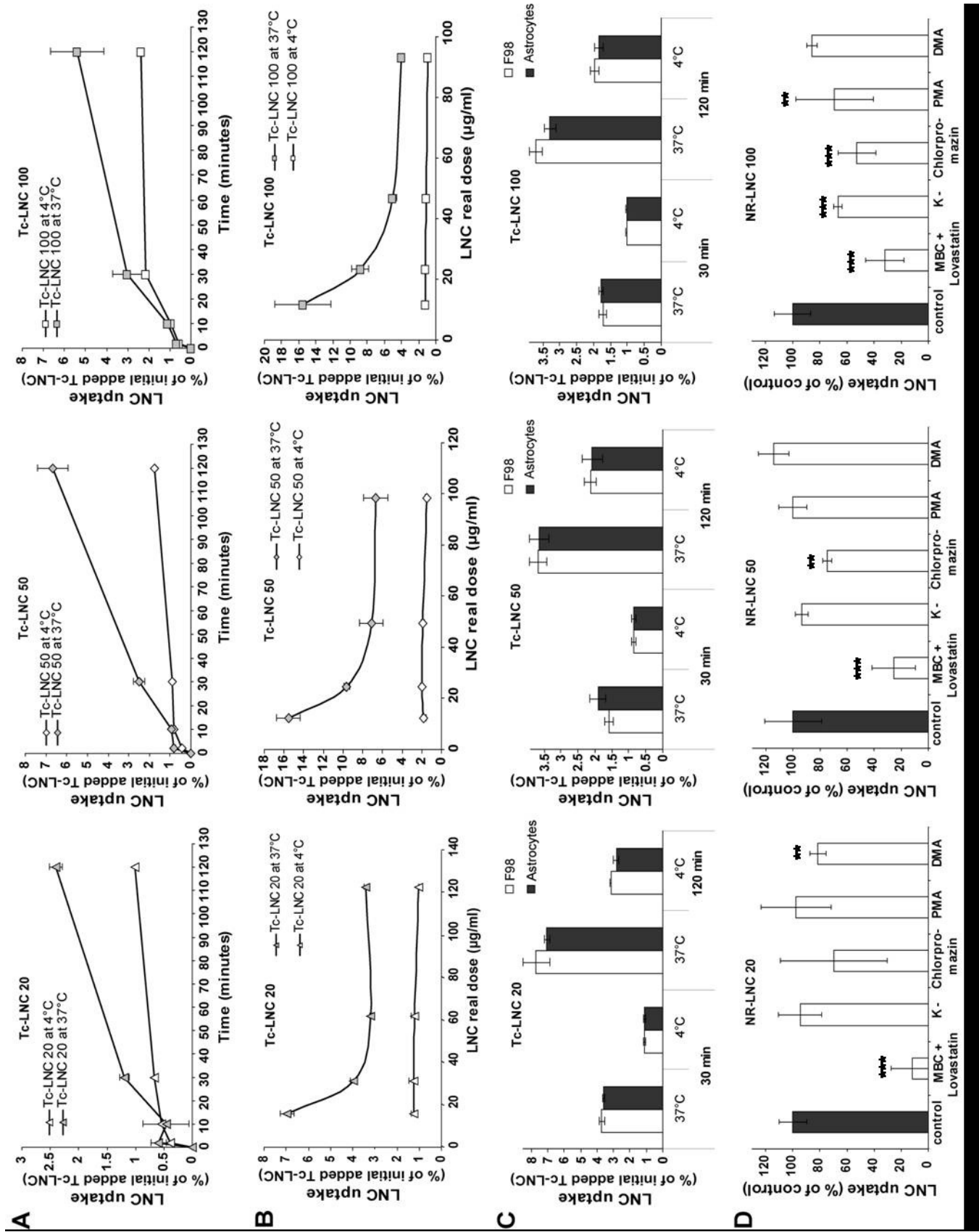


Figure 1

Modalities of accumulation of LNCs within F98 cells. **(A)** Follow-up of LNC uptake kinetics within F98 glioma cells. F98 cells were incubated at 4°C or 37°C with Tc-LNCs at fixed concentration of 1/1000 from initial suspension. Data are expressed as % of initial amounts of Tc-LNC added. Note the rapid interaction of LNCs with F98 cells at 4°C (already potent at 2 minutes). Note also the full activation of LNC internalization between 10 and 30 minutes followed by a slower phase after 30 minutes at 37°C. **(B)** Tc-LNC uptake dose-response experiments performed with increasing concentration of Tc-LNC after 2 hours incubation. Data are expressed as % of initial amounts of Tc-LNC added. Note the difference between saturating and non-saturating mechanisms at 37°C and 4°C, respectively. **(C)** Tc-LNC uptake was compared between F98 cells and astrocytes after 30 or 120 minutes incubation at 37°C or 4°C. Data expressed as % of initial amounts of Tc-LNC added for a identical cell surface area for each cell type. **(D)** Mechanisms involved in active endocytosis of LNC was assessed by the variation of the basal mean fluorescence intensity of F98 cells after 2 hours incubation with NR-LNC at 37°C and treatment with known inhibitors of endocytosis. Dunnett's test: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

c) LNC uptake mechanisms

To identify more precisely energy-dependent processes involved in cellular LNC uptake, NR-LNC were incubated for 2 hours at 37°C with F98 cells. Variation of mean cell fluorescence intensity after treatment with chemical inhibitors of known endocytic pathways was determined by flow cytometry. To enable determination of the NR-LNC fraction internalized within cells, extracellular fluorescence was quenched by using a 0.4% trypan blue solution before fluorescence measurements (36).

The use of M β CD and lovastatin revealed that endogenous cholesterol, known to be involved in clathrin-dependent and clathrin-independent pathways (9, 37), was essential for internalization of LNC whatever the size tested (Figure 1D). However, effects of cholesterol inhibitors were higher at lower LNC sizes, with 31.9 \pm 14.0% LNC remaining internalized for 100nm particles and only 12.1 \pm 15.7% for 20nm particles (Figure 1D). To determine the relative participation of clathrin-dependent uptake mechanisms, inhibitors of clathrin-coated pit formation (chlorpromazine) and clathrin-dependent endocytosis (potassium depletion) were used. In parallel, phorbol esters (PMA), which are activators of protein kinase C known to disrupt caveolae and block their invaginations, and dimethyl-amiloride (DMA), which is known to affect macropinocytosis, a mechanism that mainly contributes to antigen uptake by professional antigen-presenting cells were used. Although chlorpromazine, potassium depletion and PMA have no effect on LNC20 and LNC50 internalization, they decrease LNC100 uptake (Figure 1D). Consequently, our data support that, while requiring endogenous cholesterol, LNC20 and LNC50 accumulation were not dependent on clathrin or caveolae pathways, in contrast to LNC100 accumulation. DMA had minor effects on LNC uptake by F98 cells with only a significant while weak reduction for LNC20 (Figure 1D).

Taken together, our findings support that LNC internalization within F98 glioma cells is mediated through an active and rapid process. This mechanism was predominantly identified as a clathrin/caveolae-independent endocytosis that involves endogenous cholesterol. While the nature of LNC mostly influences their uptake, the size had also an importance as the switch to non-exclusive mechanisms for 100 nm particles was observed.

d) LNC release

After LNC internalization characterisation, the release of LNCs or of their excipients in extracellular spaces was evaluated after Tc-LNC incubation with F98 cells (2 hours at 37°C). After washes in HBSS, F98 cells were then incubated in Tc-LNC-free medium for 120 and 180 minutes at either 4°C or 37°C. Quantification of ^{99m}Tc in cell supernatant at 4°C or 37°C allowed to distinguish between passive release (*e.g.* LNC excipient diffusion, LNC cyto-adhesion reversion) and active exocytosis (*e.g.* intact LNC, cell-processed LNC). As presented on Figure 2A-B, the release of LNC20 material was almost null at 4°C and increased at 37°C, a process that was not saturated between 120 and 180 minutes. In contrast, LNC50 and LNC100 components release at 4°C represented the third of the release observed at 37°C and was not improved at 180 minutes when compared to 120 minutes (Figure 2A-B). Thus, the release of LNC components appeared mostly dependent on active processes with LNC20, but also dependent on passive mechanisms with LNC50 and LNC100. Those facts may reflect size-dependent subcellular LNC behaviour and outcome. However, the maximum release of LNC components, obtained with LNC50 at 120 and 180 minutes, represented only 16% of LNC uptake. Therefore, this observation, demonstrated an important residence time of LNC20, 50 and 100 inside F98 cells that may be beneficial for transported drug activity.

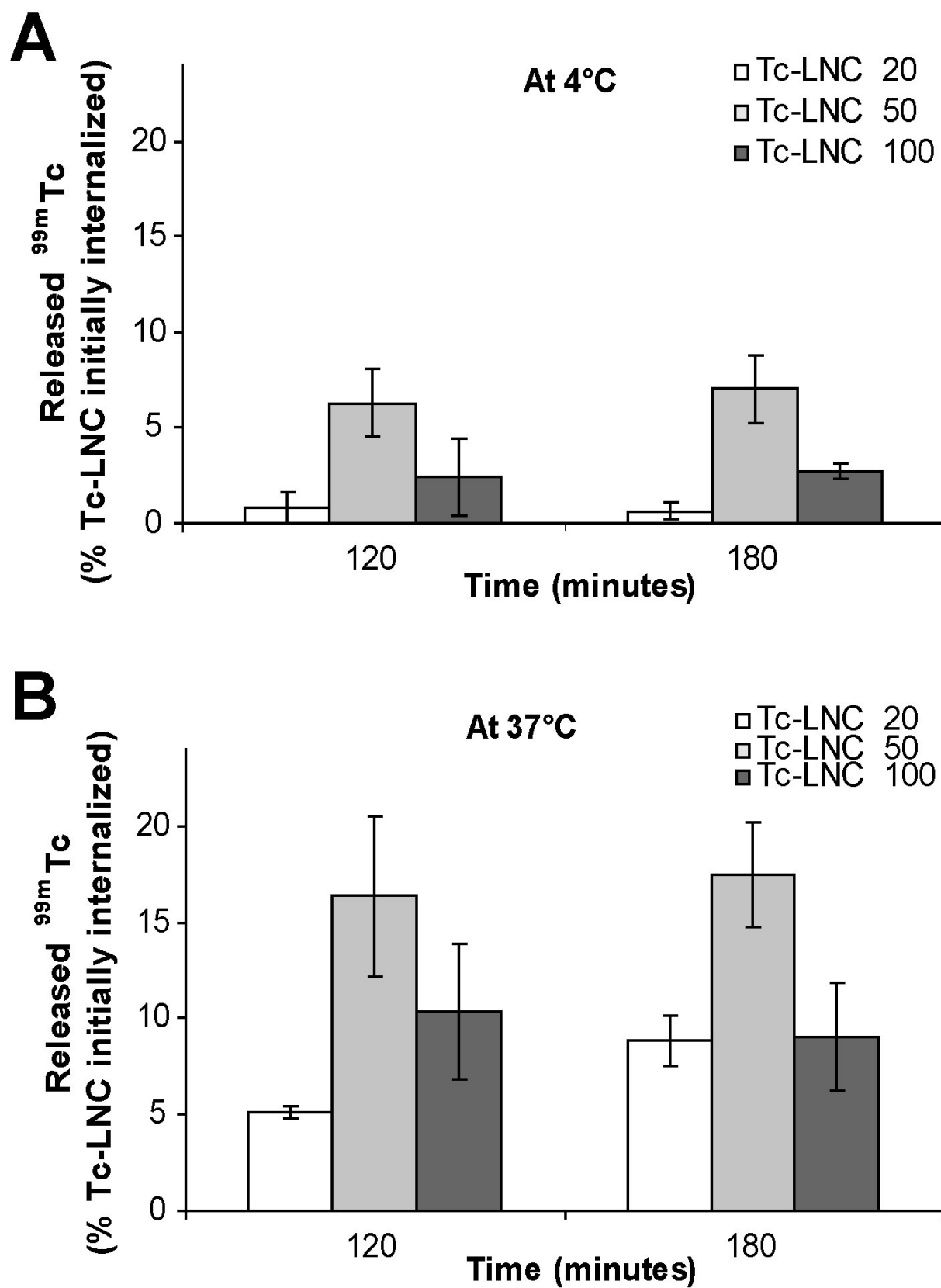


Figure 2

Release of LNC or LNC derivatives from F98 cells was assessed by ^{99m}Tc release in culture supernatant after initial pre-incubation of F98 cells with Tc-LNC for 2 hours at 37°C and washes in HBSS and subsequent incubation in Tc-LNC-free medium for 120 and 180 minutes at either 4°C or 37°C. Data are expressed in % Tc-LNC initially internalized within F98 cells during the pre-incubation step.

e) **Size-dependent LNC potential for intracellular accumulation of excipients**

In order to reflect more closely LNC potential as intracellular drug carrier, the figure 3.A presents the percentage of internalized Tc-LNC after 2 hours of incubation at 37°C and calculations took into account the initial amount added. Through this representation no significant differences were observed between LNC sizes for their capability to transport ^{99m}Tc (Figure 3A). However, the number of LNC required to transport a given ^{99m}Tc amount is inversely proportional to LNC size (Figure 3B). The number of nanoparticles internalized by cells was determined through relative proportions of such excipients (23), density and volume of one single nanocapsule (Figure 3B). In line with this, Figure 3C represented the calculated respective amounts of LNC excipients that are internalized within F98 cells for each LNC sizes. As expected, different LNC sizes presented a definite potential to load one single cell with a definite amount of each excipient. Those data are important : while being biocompatible and pharmaceutically accepted, excipients may exert intrinsic cellular effect or modulate nanoparticle and drug outcome.

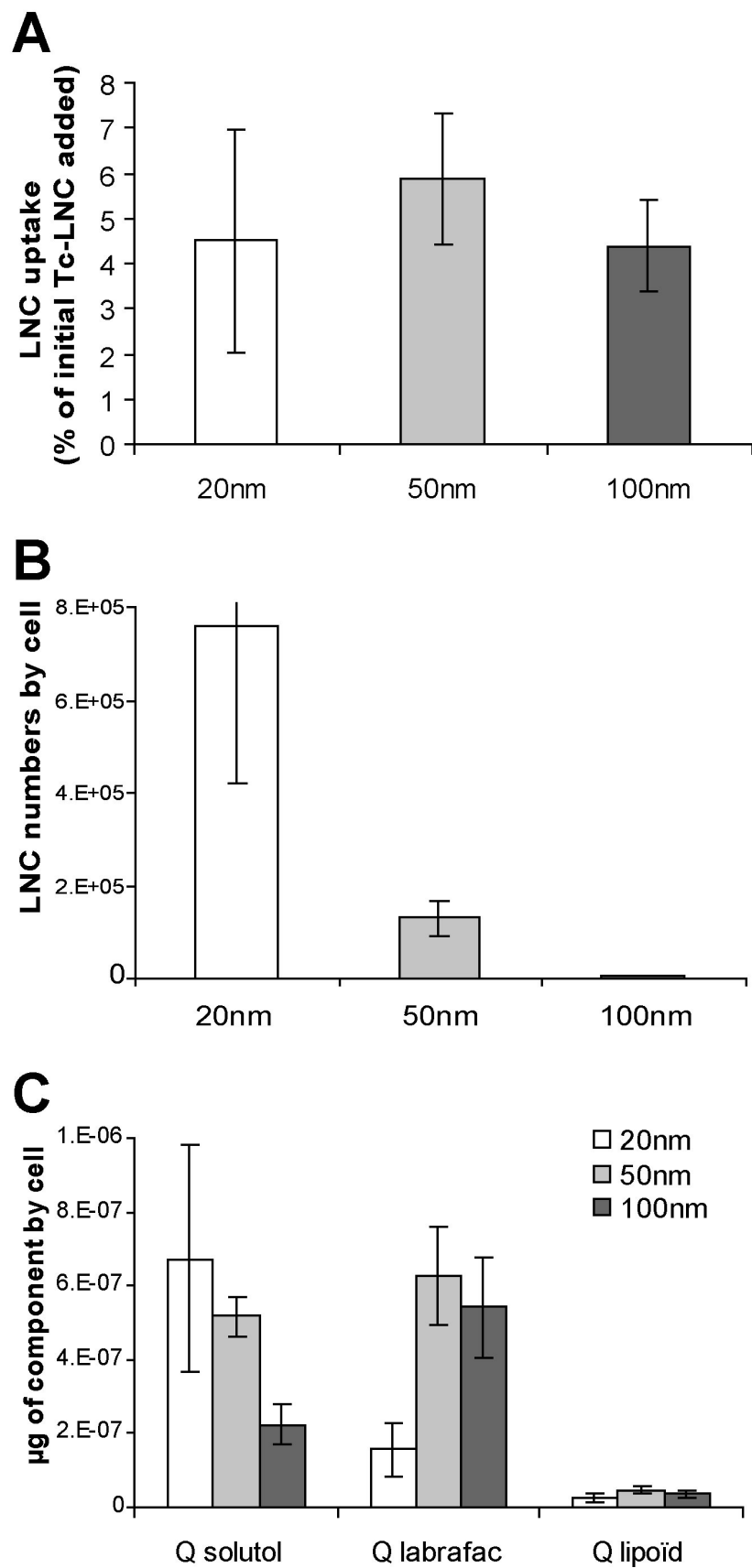


Figure 3

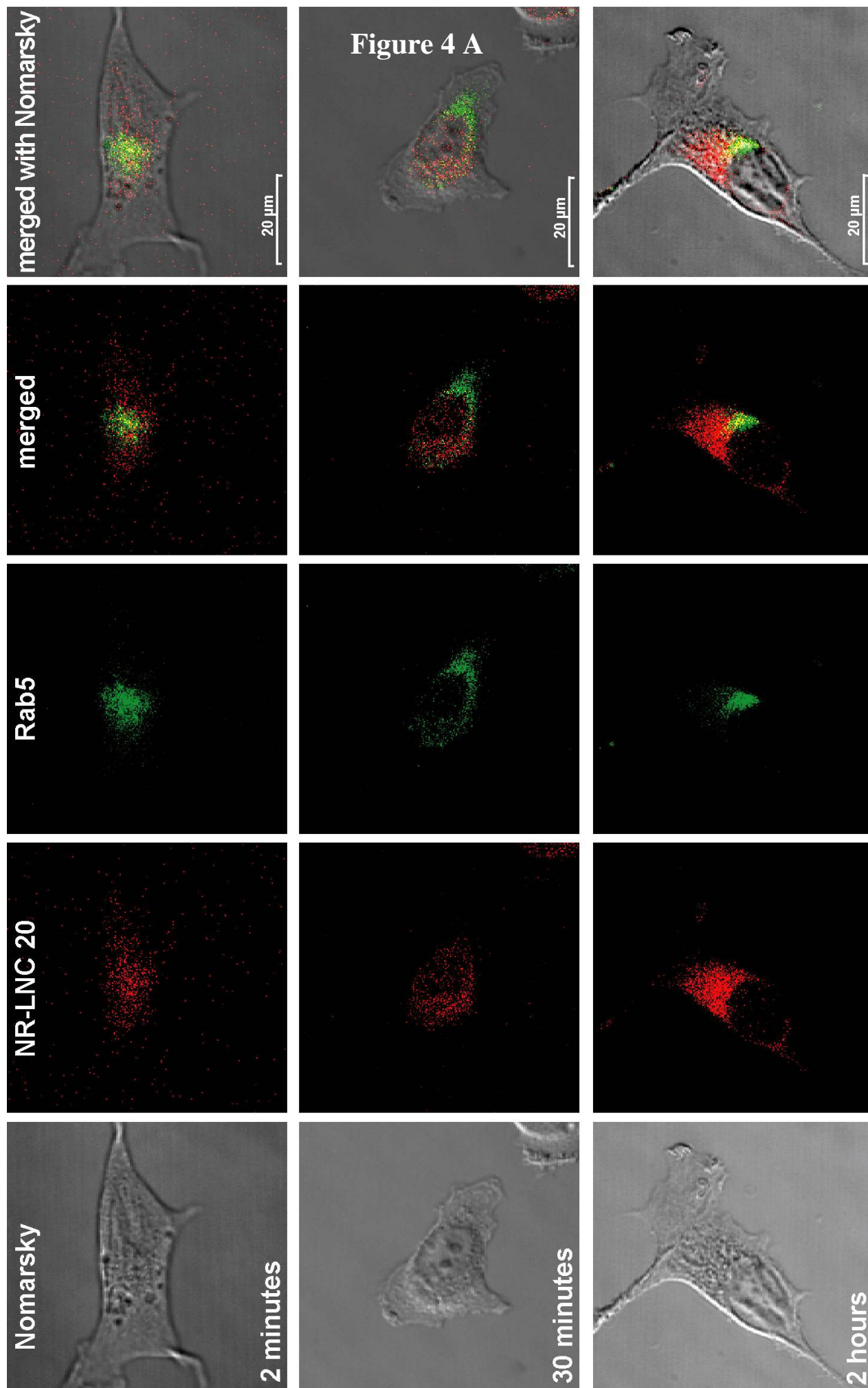
LNC potential for intracellular accumulation of excipients is fonction of their size. **(A)** Tc-LNC uptake within F98 cells after 2h at 37°C were expressed in % of initial added Tc-LNC. **(B)** Resulting calculated LNC numbers incorporated per F98 cell. **(C)** Resulting quantity (Q) expressed in μg of each LNC constituent incorporated per F98 cell for each LNC size.

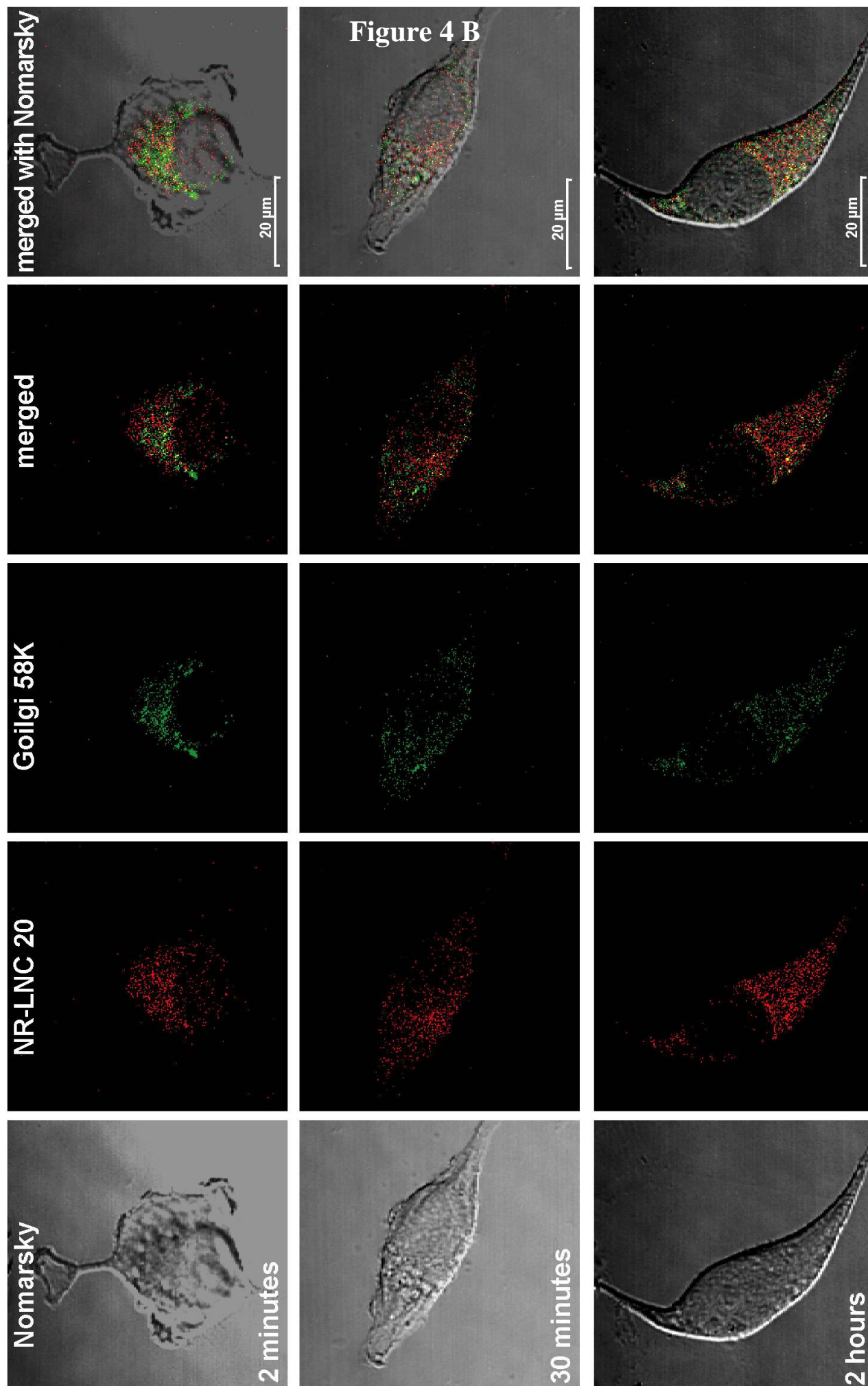
2) Subcellular behaviour of LNC

a) Confocal analysis of LNC localisation in specific subcellular compartments

Having established that LNC of different sizes are capable of entering within F98 cells with size-dependent modalities, we then wanted to better apprehend their subcellular trafficking. For this purpose co-localization of NR-LNC and immunostaining of proteins of specific cell compartments (Rab5: early endosome ; Golgi 58K: golgi network ; cathepsin D: lysosome) were tested at 2 minutes, 30 minutes and 2 hours LNC incubation at 37°C with cells. As data obtained with LNC20, LNC50 and LNC100 were very similar, only those with LNC20 are presented on Figure 4. Confocal microscopy observations proved that NR-LNC entered rapidly (already after 2 minutes) inside F98 cells (Figure 4A-C). Interestingly, at this short time, co-localization of NR-LNC with Rab5 was marked (Figure 4A). It was accompanied by a faint co-localization of NR-LNC with Golgi 58K (Figure 4B) and with Cathepsin D (Figure 4C). This observation emphasized the fact that LNC reached the early endosome. At 30 and 120 minutes, co-localization of NR-LNC with Rab5 was strongly reduced (Figure 4A) and accompanied by increased NR-LNC co-localization with the Golgi network (Figure 4B) and with lysosomes (Figure 4C). These observations suggest that NR-LNC follow a subcellular trafficking or maturation pathway within F98 cells. The reduction of NR-LNC staining within the Rab5 compartment does not necessarily point to a reduction

of LNC endocytosis with time. It might also reflect a relative reduction of NR-LNC numbers in this organelle in comparison with other subcellular spaces than can be detected by confocal microscopy. Importantly, after 30 minutes and 2 hours NR-LNC were mostly localized inside non-identified intracellular compartments, scattered inside the cytoplasm and outside the nucleus (Figure 4A-C).





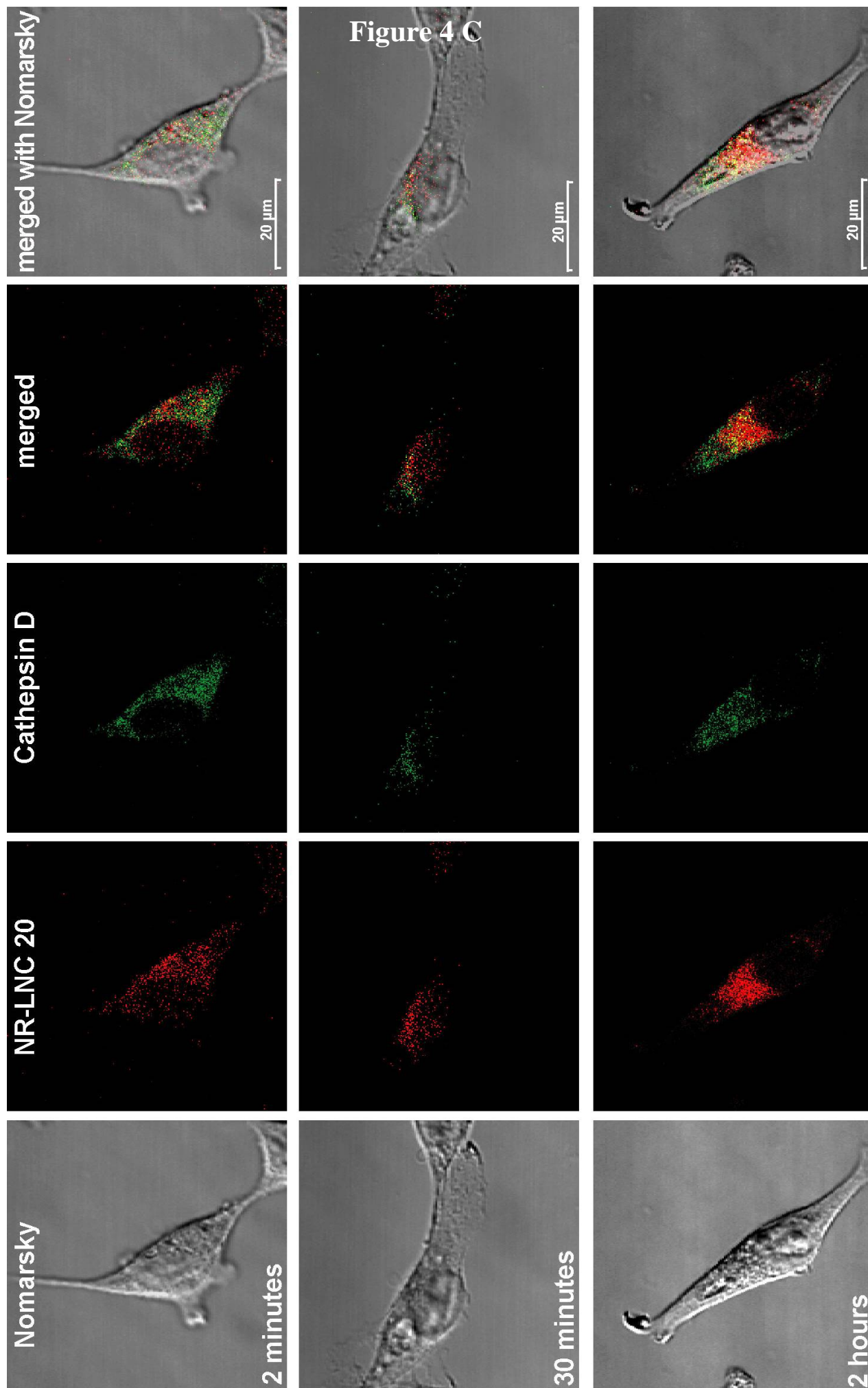


Figure 4

Confocal analysis of LNC localization in specific subcellular compartments analyzed by double-fluorescent staining. NR-LNC20 uptake (red) was followed within F98 cells after 2, 30 or 120 minutes of incubation at 37°C in parallel of immunofluorescent detection of various proteins (green), namely Rab 5 (early endosome) (**A**), 58 kDa protein (golgi network) (**B**) and Cathepsin D (lysosome) (**C**). Note the rapid redistribution of LNC from early endosome between 2 and 30 minutes. Note also the non-exclusive association with golgi network and lysosome at all time studied. Bar: 20 μ m.

b) Accumulation of LNC within lysosome

Among organelles that may affect drug bioavailability and activity, lysosomes are important to consider. Our confocal analysis indicated a constant co-localization of LNC with the cathepsin D lysosomal tracer. A quantitative analysis of LNC accumulation in lysosome was performed to support this qualitative information. Thus, after incubation of Tc-LNC with F98 cells for 2 hours at 37°C, lysosome subcellular fractions were isolated as previously described. Noticeably, lysosome enzymatic activities (acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase) were identical for cells incubated with LNC and control cells (data not shown). This suggested that isolated lysosomal fractions from untreated and LNC-treated F98 cells present a similar constitution. Quantification of accumulated Tc-LNC material within cell lysosomal fractions was equivalent for all LNC sizes with values between 10 and 15% of the internalized material (figure 5A). These results confirmed the weak accumulation of LNC inside lysosomes and point to either LNC avoiding routing or escape from lysosome.

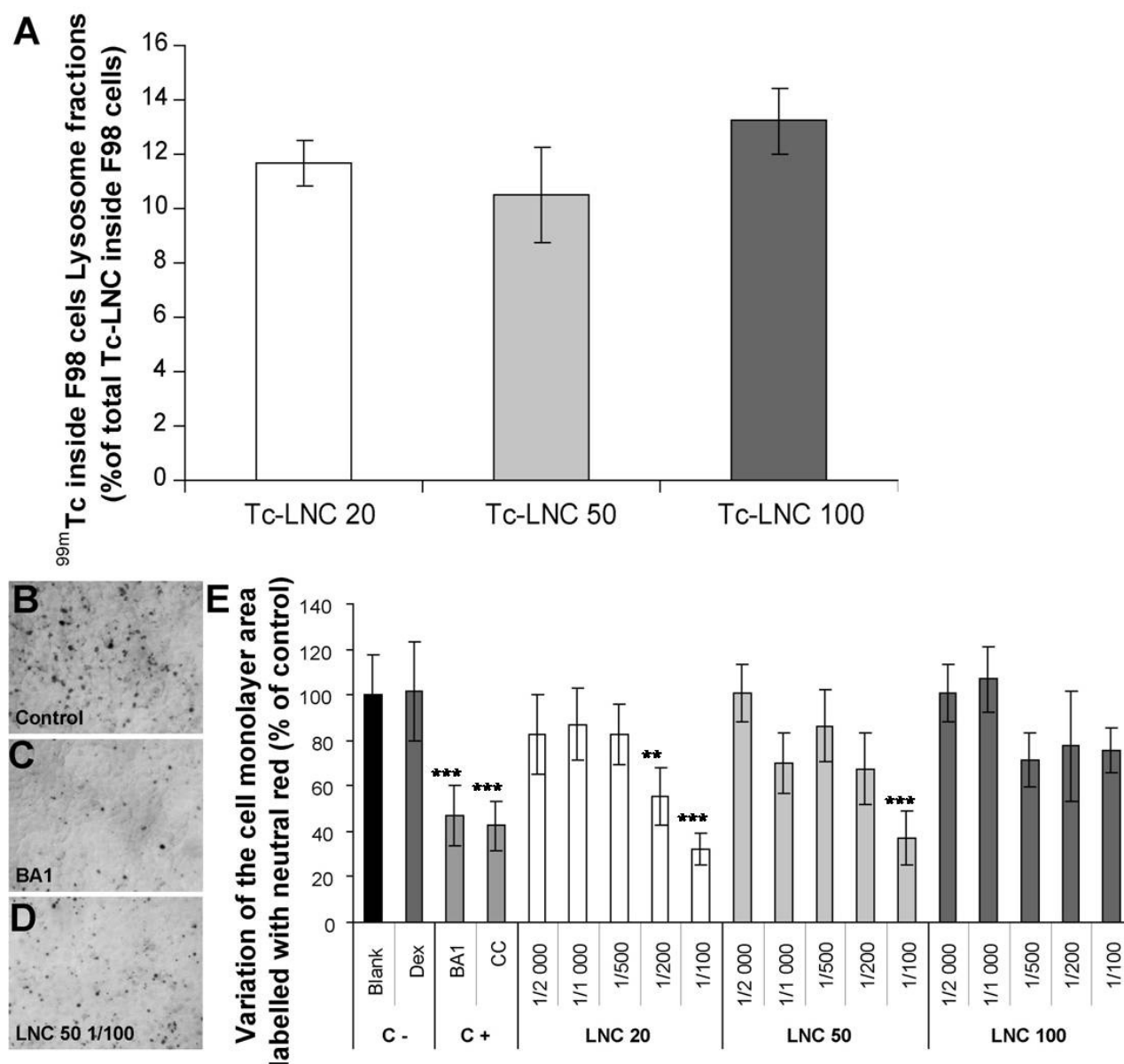


Figure 5

LNC accumulation within lysosome and effect on lysosome integrity. **(A)** After incubation of F98 cells with Tc-LNC for 2 hours at 37°C, lysosomes were isolated by cell fractionation. ^{99m}Tc amounts were counted inside isolated lysosome fraction and expressed in % of total Tc-LNC internalized within cells. **(B-E)** Lysosome integrity was assessed by the neutral red assay. Labelled patches representing lysosome can be observed on F98 monolayers for control untreated cells **(B)**, bafilomycin A1 [BA1] treated cells **(C)** and LNC50 treated cells **(D)**. Variation of the neutral red-labelled cell surface area for the different treatments (C-:

negative control, C+: positive control, LNCs) was expressed in % of untreated control (**E**). Note that in contrast to dextran [Dex] but similarly to V-ATPase inhibitors (bafilomycine A1 [BA1] or concanamycin-C [CC]) LNCs induced a reduction in the integrity of F98 lysosomes. Note also that lower LNC sizes were more potent than higher sizes for this effect. Dunnett's test: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

c) Effect of cellular LNC accumulation on lysosome integrity

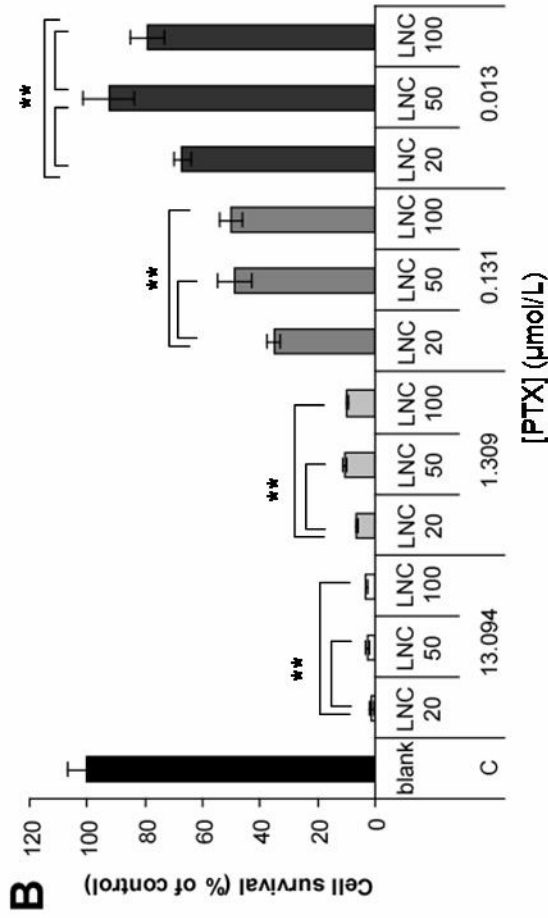
Confocal analysis and organelle fractionation experiments demonstrated that NR-LNC poorly co-localized with cathepsin D and that Tc-LNC were weakly found in lysosome respectively. Thus, either LNC have a limited access to this organelle or they can escape from it or finally these two options are combined. Hence, we evaluated the LNC ability to destabilise the lysosome membrane integrity. For this purpose, the neutral red dye was used. Neutral red readily penetrates cell membranes of viable cells by diffusion and appeared red essentially in lysosomes, and to a lesser extent in the trans-Golgi network and acidic endosomes (33, 34). By measuring the intracellular surface of red patches formed by the dye (Figure 5B), it is possible to assess the integrity of acidic organelles. As shown on Figure 5C and E, bafilomycin A1 and concanamycin C (V-ATPase inhibitors (38)) were able to revert the pH of initially acid organelles. In contrast, dextran, that has been shown to target the lysosome compartment (11), has no effect on pH reversion (Figure 5E). In isolation, LNC were found to reduce the intracellular surface labelled with neutral red, thus, indicating a loss of lysosome membrane integrity (Figure 5D and E). Interestingly, for a given dose this effect was more obvious when decreasing the LNC size (Figure 5E). Thus, cellular accumulation of LNC has a size-dependent impact on the membrane integrity of acidic vesicular

compartments that might support lysosome escape and LNC accumulation inside the cytoplasm.

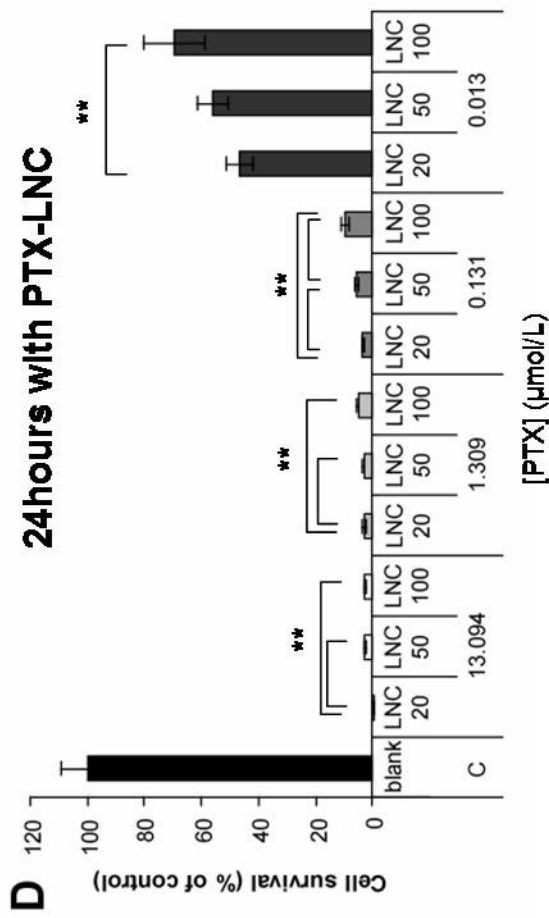
3) Efficiency of paclitaxel-loaded LNC (PTX-LNC) on F98 cell survival

Since modalities of accumulation of LNC within F98 cells as well as their subcellular behaviour were size-dependent, one might expect that LNC-carried drug efficiency may depend on LNC size. To validate this assertion, PTX was used : it is an anticancer drug acting on tubulin polymerisation and that can be loaded within LNC (26). Thus, F98 cells were firstly treated with blank or PTX-loaded LNC for 2 or 24 hours at 37°C. After removal of treatment medium, F98 cells were incubated for 72 hours at 37°C before survival evaluation. Figure 6A (2 hours exposure) and Figure 6B (24 hours exposure) indicate that as except for LNC20 at 13µM (24 hours), blank LNC do not induce a reduction in F98 cell survival. Consequently, for all times and concentrations tested, efficiency of PTX-LNC seems to be related to PTX efficiency and not to blank-LNC intrinsic cellular toxicity, excepted for LNC20 at 13µM (24 hours). Hence, Figure 6C shows that after 2 hours of exposure LNC sizes have an impact on PTX efficiency with a strongest reduction of cell numbers with LNC20 than with LNC50 or LNC100. Interestingly, this size-dependent effect was preserved after increasing exposure time to 24 hours with improved overall PTX efficiency (Figure 6D). These observations on PTX pharmacological activity are reminiscent of the size-dependent effects of LNC on their cellular accumulation and on lysosome integrity. Therefore, they supported the possibility to provide a rationale between LNC subcellular behaviour and drug efficiency.

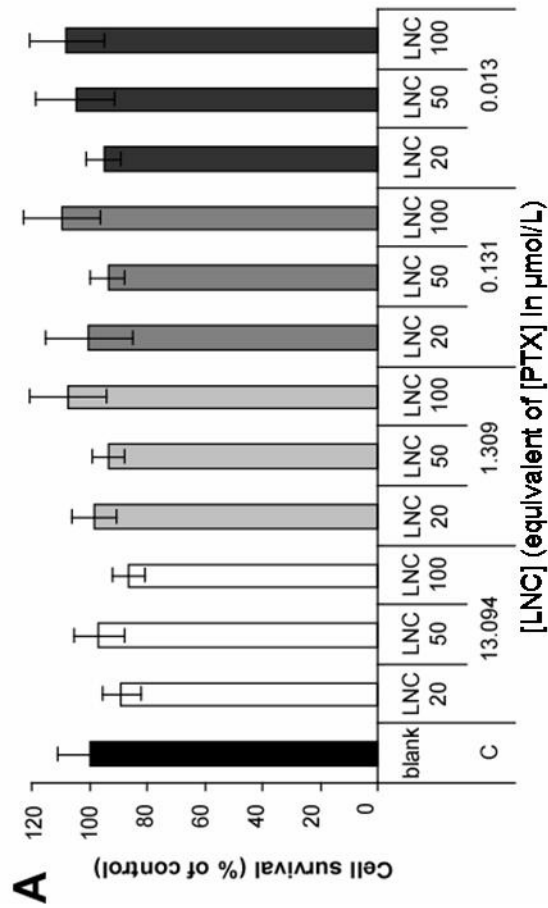
2hours with PTX-LNC



24hours with PTX-LNC



2hours with Blank-LNC



24hours with Blank-LNC

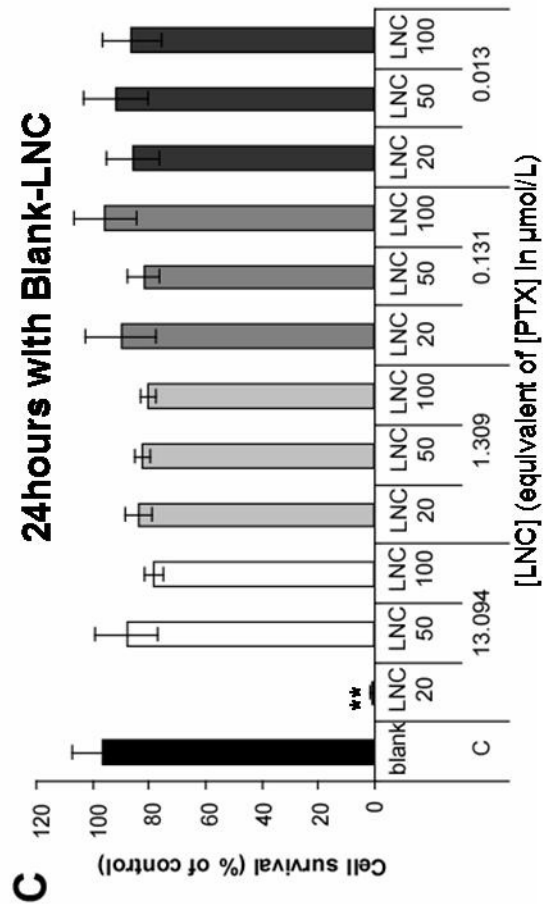


Figure 6

Treatment of F98 cells with paclitaxel-loaded LNC (PTX-LNC) revealed LNC size-dependent pharmacological activity. F98 cell survival was assessed by MTT assay after 2 hours treatment (**A-B**) or 24 hours treatment (**C-D**) with blank-LNCs (A, C) or PTX-LNCs (B, D). Data were expressed as % of untreated cells (blank C) in function of paclitaxel concentrations for PTX-LNC or equivalent LNC concentrations for blank-LNC. Dunnett's test: ** $p < 0.01$.

Discussion

By focusing on cancer cells exemplified by F98 cells, the present study provided for the first time an extensive knowledge of LNCs cellular behaviour. Four major points of their biological characteristics were highlighted. Firstly, LNCs cell internalization was a rapid, active and saturable process, mediated predominantly through a cholesterol-dependent and clathrin/caveolae-independent pathway, indicative of an endocytosis. Secondly, LNCs cellular accumulation lasted long enough to extend drug intracellular bioavailability and was not restricted to proliferative cancer cells. Thirdly, LNCs were weakly found in lysosome and displayed specific skills for lysosome escape. Fourthly, LNCs capabilities, among which their ability to cross subcellular barrier and the pharmacological efficiency of transported drug, were dependent on their size. Regarding new nanomedicines development, this work emphasizes the importance to establish rationale between biological behaviour of nanocarriers and their therapeutic relevance.

1) Cellular uptake of LNC is rapid, size-dependent and not restricted to cancer cells

Although several reports demonstrated that nanoparticle cell membrane penetration could be related to passive processes (39, 40), our observations supported the fact that LNCs were internalized in glioma cells through a rapid, active and saturable process and consequently used endocytosis to penetrate within cells. Thus, cell radiolabelling after incubation with Tc-LNC at 4°C accounted probably for cytoadhesion of LNCs without

internalization (35). Besides comparative uptake studies between astrocytes and glioma cells suggested that cell internalization of LNCs was not restricted to cancer and/or dividing cells and supported the importance of the plasma membrane surface area. In contrast to targeted nanoparticles that interact with specific molecular determinant on chosen cells (41), LNCs represented, therefore, a non-selective trans-plasma membrane cargo.

By applying chemical inhibitors ascribed to specific endocytic pathways, we proved that LNC internalization was mediated mainly through a clathrin/caveolae-independent endocytosis. Although the general cholesterol-dependence supported the idea that LNCs excipients (triglycerides, phospholipids, hydroxystearate of polyethylene glycol (HS-PEG)) influenced their uptake, LNCs size also had some importance. Indeed with larger LNCs (100nm) endocytosis became less exclusive. Thus, LNCs presented their own endocytic properties. It has been shown that 24nm polystyrene nanoparticles used a clathrin/caveolae-independent endocytosis which was, unlike LNCs endocytosis, cholesterol-independent (42). Moreover, uptake of 100nm particles was generally accompanied by an exclusive contribution of clathrin-dependent pathway. Although this was true for latex (11), poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (16, 17) and neutral liposomes (43), 90nm poly-L-lysine/polyethylene glycol nanoparticles used, instead, caveolae-mediated endocytosis (44).

Beyond the involved mechanism, endocytosed LNCs were rapidly seen (after 2 minutes exposure) in Rab5-positive early endosomes. Regarding either clathrin/caveolae-independent endocytosis of viruses (5, 45) or LDL and transferrin receptor-mediated endocytosis (46) this rapid localisation was expected. It implies that intrinsic properties of LNCs within endocytic vesicles would control subcellular traffic of the carried drug.

2) Subcellular distribution of LNC and lysosome escape

Rab5-positive compartment is also called sorting endosome (47) and it is the Rab5 GTPase which contributes to early endosome mobility and ability to direct endocytosis vesicle content to different organelles (48). LNC could be directed from this compartment toward recycling endosome and then to Golgi network or to late endosome which could mature in lysosome or fuse with it (15, 46, 49). As exemplified by PLGA-PEG nanoparticles (17), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes (43) or polystyrene nanoparticles (found at 80 % inside lysosomes) (11, 42), the nanoparticle traffic usually ended within the late endosomal/lysosomal compartment. In the present study, neither confocal nor radiotracking analysis after cell fractionation indicated a large accumulation of LNC within late endosomes or lysosomes.

The non-orientation toward those organelles was generally the sign of an exocytosis (16, 49) or the Golgi network reorientation (46) through recycling endosomes. Our observations, which includes a weak co-localisation of LNC with the Golgi 58K protein and a poor exocytosis (less than 20% in three hours), do not support this possibility when compared with PLGA nanoparticles which undergo 70% exocytosis in only 30 minutes (50). Alternatively, a non-maturation of early endosomes or a redirection toward this organelle does not accord with reduced NR-LNCs co-localisation with Rab5 after 30 or 120 minutes incubation.

Besides, Tc-LNCs were scarcely found in lysosomes (10 to 15% after 2 hours) which might recall the 20% of chitosan nanoparticles accumulated inside lysosomes after 30 minutes (51). Thus, LNCs might be present in vesicular compartments that we have not identified ourselves yet. Considering their ability to disrupt the lysosome membrane integrity (neutral red assay), they might have escape from the late endosome/lysosomal compartment and colonized other subcellular compartments such as the cytosol or the mitochondria while avoiding the nucleus.

Various approaches, inspired from virus aptitudes (18), have been developed to allow synthetic nanoparticles to escape from lysosomes. As negative nanoparticle surfaces were known to trigger lysosome orientation (11, 16, 42), strategies including the grafting of cationic groups (17) or the use of pH-sensitive components (16, 18) were developed. In these cases, nanoparticle surface becomes cationic inside acidic compartment and interacts directly with the negative charges of the endosomal membrane, leading to its physical disruption (18). Otherwise cationic compounds, containing a large number of secondary and tertiary amines, act as a "proton sponge" and can buffer the pH which might lead to ended in an osmotic rupture of the lysosomal membrane (20). Cationic lipids such as N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA) or 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) which fuse electrostatically with endo-lysosomal membrane could also be included in the nanoparticle structure (19, 52). Otherwise, the neutral lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE) helps to blow up the endosomal membrane (52, 53).

However, none of these excipients composed the LNCs. Moreover, zeta potential analysis proved that LNCs presented independently from their size a low negative surface charge (54). Thus, LNCs disruption of lysosome membrane occurred through another type of mechanism.

HS-PEG which constitutes the most external phase of LNC might have a lysosomotropic property as described for many surfactant (55) and therefore might destabilize lysosome membrane and might lead the lysosome pH neutralization. This assertion might be supported by the influence of the LNC size on this effect. Indeed, higher amounts of surfactant were provided with smaller LNCs. They also displayed the prevalent effect on the loss of lysosomal membrane integrity. Given the inhibitory effects of Solutol[®] and LNC on the plasma membrane multidrug resistance pump (26), HS-PEG might also affect the

biological activity of lysosomal pumps, as such the V-ATPases which are responsible of the acidic pH of this organelle. Indeed, it has been shown that the inhibition of pH decrease inside endosomes can lead to their vesicular disruption (20). Interestingly, reduction of organelle acidification has also been linked to the reduction of the activity of multidrug-resistance proteins (56).

3) Consequences on drug bioavailability and pharmacological efficiency

Our data supported the fact that LNCs can not only help drugs crossing through plasma membrane but can also avoid acidic subcellular compartments. Considering intracellular drug targets, those combined effects accentuate the interest of using LNC to increase drug bioavailability or to decrease drug inactivation.

As possible collateral effects of LNC excipients may affect drug efficiency in addition to cell behaviour, it is important to consider that LNC formulations of different sizes (Figure 3C) accumulated different amounts of LNC excipients within cells. Therefore, by considering that Solutol[®] is mostly responsible of LNC escape from lysosomes, the choice of LNC20 (against LNC50 or LNC100) would be of interest for the intracellular administration of drug susceptible to be degraded by acid hydrolases or that should reach a cytosolic target. On the biological level, a different meaning could be ascribed to lysosome escape as this organelle has been involved, for instance, either in the induction of cell death (55) or in a block against autophagic death (57). However, other parameters need to be considered for LNCs size relevance, such as drug solubility within the different LNC excipients, encapsulation rate or drug release. As such PTX release was slightly quicker from 25nm LNC than from LNC50 or LNC100 (58).

By consideration of PTX, which is required during the G2/M phase of the cell division in order to inhibit cytosolic tubulin polymerisation (59), the fact that LNC of all sizes accumulated for a long time period within cancer cells supports their interest. However, PTX-loaded LNC20 were more potent than LNC50 or LNC100 on cancer cell death. This observation could have been predicted for at least three reasons: i) LNC20 provided more Solutol[®] able to inhibit PTX expulsion by the multidrug resistance proteins, ii) LNC20 provided more Solutol[®] to increase lysosome escape and increase cytosolic access of PTX, iii) Greater destabilisation of lysosome membrane which might potentiate cancer cell death signalling.

In conclusion, the present work has demonstrated new potentialities of LNCs regarding biological membrane crossing. The size-dependent abilities of native LNC, that include accumulation within cells and escape from lysosomes, should be taken into account when defining relevant associations between one LNC size, one given drug and one expected target. They are also important to consider when modifying the surface of native LNC (e.g. for active targeting purposes). Finally, this work has emphasized the interest of developing comparative studies on the behaviour of different nanocarriers in well-identified biological situations.

Acknowledgments

We are grateful to Myriam Moreau, Hélène Derveaux and Anne Pauly (Institut National de la Santé et de la recherch e Médicale, Inserm U646), to Robert Filmon and Romain Mallet (Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques, SCIAM, Angers, France) and Catherine Guillet (Service Commun de Cytométrie et d'Analyse

Nucléotidique, SCCAN, Angers, France) for skillful technical support. This work was also supported by *La Ligue Contre le Cancer* <<Equipe Labellisée 2007>> and by the *Cancéropôle Grand-Ouest*. Archibald Paillard was financially supported by the *Comité Départemental de Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer*.

References

1. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C. (2005) Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* **19**, 311-330
2. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., and Langer, R. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* **2**, 751-760
3. Panyam, J., and Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 329-347
4. Torchilin, V. P. (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* **8**, 343-375
5. Pelkmans, L., and Helenius, A. (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 414-422
6. Johannes, L., and Lamaze, C. (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* **3**, 443-451
7. Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44
8. Mercer, J., and Helenius, A. (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 510-520
9. Nabi, I. R., and Le, P. U. (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* **161**, 673-677
10. Glebov, O. O., Bright, N. A., and Nichols, B. J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 46-54
11. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., and Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* **377**, 159-169
12. Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., and Labhasetwar, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* **244**, 105-115
13. Zauner, W., Farrow, N. A., and Haines, A. M. (2001) In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* **71**, 39-51
14. Nichols, B. (2003) Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* **116**, 4707-4714
15. Dunn, K. W., and Maxfield, F. R. (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol* **117**, 301-310

16. Panyam, J., Zhou, W. Z., Prabha, S., Sahoo, S. K., and Labhasetwar, V. (2002) Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb J* **16**, 1217-1226
17. Harush-Frenkel, O., Rozentur, E., Benita, S., and Altschuler, Y. (2008) Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* **9**, 435-443
18. Sasaki, K., Kogure, K., Chaki, S., Nakamura, Y., Moriguchi, R., Hamada, H., Danev, R., Nagayama, K., Futaki, S., and Harashima, H. (2008) An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem* **391**, 2717-2727
19. Zelphati, O., and Szoka, F. C., Jr. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11493-11498
20. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., and Langer, R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* **7**, 657-663
21. Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., Bertin, S. L., Reppen, T. W., Chu, Q., Blokhin, A. V., Hagstrom, J. E., and Wolff, J. A. (2007) Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12982-12987
22. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., and Benoit, J. P. (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* **19**, 875-880
23. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M. C., Proust, J. E., Phan-Tan-Luu, R., and Benoit, J. P. (2003) The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* **18**, 55-61
24. Beduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindre, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N., and Benoit, J. P. (2006) Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. *Pharm Res* **23**, 2190-2199
25. Ballot, S., Noiret, N., Hindre, F., Denizot, B., Garin, E., Rajerison, H., and Benoit, J. P. (2006) ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33**, 602-607
26. Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., and Benoit, J. P. (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* **5**, 1710-1722
27. Allard, E., Passirani, C., Garcion, E., Pigeon, P., Vessieres, A., Jaouen, G., and Benoit, J. P. (2008) Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* **130**, 146-153
28. Mevellec, F., Tisato, F., Refosco, F., Roucoux, A., Noiret, N., Patin, H., and Bandoli, G. (2002) Synthesis and characterization of the "sulfur-rich" bis(perthiobenzoato)(dithiobenzoato)technetium(III) heterocomplex. *Inorg Chem* **41**, 598-601
29. McCarthy, K. D., and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* **85**, 890-902
30. Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 961-974

31. Larkin, J. M., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Anderson, R. G. (1983) Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* **33**, 273-285
32. Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M., and Fiala, M. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* **76**, 6689-6700
33. Zang, Y., Beard, R. L., Chandraratna, R. A., and Kang, J. X. (2001) Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell Death Differ* **8**, 477-485
34. LaManna, J. C. (1987) Intracellular pH determination by absorption spectrophotometry of neutral red. *Metab Brain Dis* **2**, 167-182
35. Tomoda, H., Kishimoto, Y., and Lee, Y. C. (1989) Temperature effect on endocytosis and exocytosis by rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* **264**, 15445-15450
36. Hed, J., Hallden, G., Johansson, S. G., and Larsson, P. (1987) The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* **101**, 119-125
37. Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M. A., Keen, J. H., and McGraw, T. E. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6775-6780
38. Huss, M., Ingenhorst, G., Konig, S., Gassel, M., Drose, S., Zeeck, A., Altendorf, K., and Wiczorek, H. (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem* **277**, 40544-40548
39. Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., Chen, S., Irvine, D. J., and Stellacci, F. (2008) Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater* **7**, 588-595
40. Kunisawa, J., Masuda, T., Katayama, K., Yoshikawa, T., Tsutsumi, Y., Akashi, M., Mayumi, T., and Nakagawa, S. (2005) Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release* **105**, 344-353
41. Huwyler, J., Wu, D., and Pardridge, W. M. (1996) Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14164-14169
42. Lai, S. K., Hida, K., Man, S. T., Chen, C., Machamer, C., Schroer, T. A., and Hanes, J. (2007) Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials* **28**, 2876-2884
43. Ruckert, P., Bates, S. R., and Fisher, A. B. (2003) Role of clathrin- and actin-dependent endocytotic pathways in lung phospholipid uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L981-989
44. Luhmann, T., Rimann, M., Bittermann, A. G., and Hall, H. (2008) Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles. *Bioconjug Chem* **19**, 1907-1916
45. Joo, K. I., Lei, Y., Lee, C. L., Lo, J., Xie, J., Hamm-Alvarez, S. F., and Wang, P. (2008) Site-specific labeling of enveloped viruses with quantum dots for single virus tracking. *ACS Nano* **2**, 1553-1562
46. Ghosh, R. N., Gelman, D. L., and Maxfield, F. R. (1994) Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting HEp2 cells using confocal microscopy. *J Cell Sci* **107** (Pt 8), 2177-2189

47. Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M., and Miller, K. (1990) Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* **346**, 335-339
48. Zerial, M., and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 107-117
49. Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., and Cohn, Z. A. (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **96**, 1-27
50. Panyam, J., and Labhassetwar, V. (2003) Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* **20**, 212-220
51. Nam, H. Y., Kwon, S. M., Chung, H., Lee, S. Y., Kwon, S. H., Jeon, H., Kim, Y., Park, J. H., Kim, J., Her, S., Oh, Y. K., Kwon, I. C., Kim, K., and Jeong, S. Y. (2009) Cellular Uptake Mechanism and Intracellular Fate of Hydrophobically Modified Glycol Chitosan Nanoparticles. *J Control Release*
52. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P. L. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* **269**, 2550-2561
53. Ng, C. P., Goodman, T. T., Park, I. K., and Pun, S. H. (2009) Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility. *Biomaterials* **30**, 951-958
54. Vonarbourg, A., Saulnier, P., Passirani, C., and Benoit, J. P. (2005) Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* **26**, 2066-2075
55. Dubowchik, G. M., Gawlak, S. L., and Firestone, R. A. (1995) The in vitro effects of three lysosomotropic detergents against three human tumor cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **5**, 893-898
56. Ouar, Z., Bens, M., Vignes, C., Paulais, M., Pringel, C., Fleury, J., Cluzeaud, F., Lacave, R., and Vandewalle, A. (2003) Inhibitors of vacuolar H⁺-ATPase impair the preferential accumulation of daunomycin in lysosomes and reverse the resistance to anthracyclines in drug-resistant renal epithelial cells. *Biochem J* **370**, 185-193
57. Ostenfeld, M. S., Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Fehrenbacher, N., Olsen, O. D., Groth-Pedersen, L., Puustinen, P., Kirkegaard-Sorensen, T., Nylandsted, J., Farkas, T., and Jaattela, M. (2008) Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* **4**, 487-499
58. Lacoeyille, F., Garcion, E., Benoit, J. P., and Lamprecht, A. (2007) Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* **7**, 4612-4617
59. Schiff, P. B., and Horwitz, S. B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1561-1565

A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats

Emmanuel Garcion,¹ Alf Lamprecht,¹
Béatrice Heurtault,¹ Archibald Paillard,¹
Anne Aubert-Pouessel,¹ Benoît Denizot,¹
Philippe Menei,^{1,2} and Jean-Pierre Benoît¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 646 and ²Département de Neurochirurgie, Unité de Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

Abstract

By focusing on rat glioma, we elucidated whether new lipid nanocapsules (LNC) were able to improve anticancer hydrophobic drug bioavailability while also overcoming multidrug resistance. Blank LNCs and LNCs loaded with the antineoplastic agent paclitaxel were formulated by an emulsion inversion phase process. Expression of efflux pumps by rat glioma cells was assessed by reverse transcription-PCR, Western blot, and immunohistochemistry, and their activity was followed using the tracer ⁹⁹Tc^m-methoxyisobutylisonitrile. Modalities of LNC action were addressed by using confocal microscopy detection of fluorescently labeled LNCs, fluorescence-activated cell sorting, high-performance liquid chromatography measurement of paclitaxel release, and analysis of tumor cell growth. This revealed an interaction between LNCs and efflux pumps that resulted in an inhibition of multidrug resistance in glioma cells, both in culture and in cell implants in animals. LNCs were able to target the intracellular compartment of glioma cells, a mechanism that was abrogated by using intracellular cholesterol inhibitors but not by clathrin-coated pit or caveolae uptake inhibitors. This result can be correlated to the LNC inhibitory effects on efflux pump activity that is itself

known to be stimulated by intracellular cholesterol. In parallel, we showed that paclitaxel-loaded LNCs were active reservoirs from which paclitaxel could be released. Finally, we established that paclitaxel-loaded LNCs were more efficient than the commercially available paclitaxel formulation (Taxol) for clinical use, thus reducing tumor expansion *in vitro* and *in vivo*. Considering the physiologically compatible nature of LNC excipients, these data may represent an important step towards the development of new clinical therapeutic strategies against cancers. [Mol Cancer Ther 2006;5(7):1710–22]

Introduction

A pivotal issue in cancer chemotherapy is the development of drug delivery systems capable of optimizing the biotargeting of anticancer drugs in the body, at the same time as overcoming drug resistance mechanisms at the tissue and cellular levels.

One promising manner of addressing biotargeting is the employment of convenient submicronic colloidal systems that increase drug stability and improve drug distribution profiles, thus ameliorating the therapeutic index (1, 2). Although the recent expansion of nanotechnology has led to the emergence of different strategies, such as the use of drug-loaded liposomes (3–5), stealth liposomes (6, 7), polymeric nanospheres with equivalent stealth properties (8), polymeric nanocapsules (9), and solid lipid nanoparticles (10), a major obstacle to the success of chemotherapy in many cancers remains to be multidrug resistance (MDR).

Originally seen in cultured tumor cells, this phenomenon is likely to be multifactorial (e.g., the activation of detoxifying systems, DNA repair, and defective apoptotic pathways; ref. 11). However, it often results from the increased expression of ATP-dependent transporter proteins that drive the efflux of hydrophobic drugs from the cancer cells, thus lowering their intracellular concentration (11). In many MDR cell lines, the prototypic transporter responsible for this event has been identified as P-glycoprotein (MDR1; ref. 12). P-glycoprotein is a 170- to 180-kDa broad-spectrum multidrug efflux pump that belongs to a family of ATP-binding cassette transporters (11). Drugs that are affected by classic MDR include the *Vinca* alkaloids (vinblastine and vincristine), anthracyclines (doxorubicin and daunorubicin), the RNA transcription inhibitor actinomycin D, and the microtubule-stabilizing drug paclitaxel (11). As not all MDR cells express P-glycoprotein, a search for other efflux pumps was initiated, leading to the discovery of multiple MDR-associated proteins (11).

Because of the crucial implication of MDR in cancer chemotherapy, extensive efforts were made to design new

Received 5/17/06; accepted 5/23/06.

Grant support: Cancéropôle Grand-Ouest, Axe Vectorisation Tumorale d'agents diagnostiques et thérapeutiques, European Commission research grant QLK3-CT-2001-02226 for "Biodegradable Controlled Drug Delivery Systems for the Treatment of Brain Diseases" (E. Garcion and A. Aubert-Pouessel), Conseil Général du Maine et Loire (B. Heurtault), Eglise grant 316721F of the Région des Pays de Loire (A. Lamprecht), and Comité Départemental de Maine et Loire de la Ligue Contre le Cancer (A. Paillard).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Emmanuel Garcion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 646, 10 rue André Boquet, 49100 Angers, France. Phone: 33-2-41-73-58-85; Fax: 33-2-41-73-58-53. E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Copyright © 2006 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0289

P-glycoprotein inhibitors and novel drug delivery systems that can overcome MDR. As P-glycoprotein binds many different hydrophobic compounds, a large number of treatments have been described, which inhibit P-glycoprotein activity either by blocking drug binding, by interfering with ATP hydrolysis, or by altering the integrity of cell membrane lipids (13). In parallel, fatty acid ester surfactants, including Cremophor-EL, Triton X-100, and Tween 80, have been shown to interact with P-glycoprotein and to revert MDR (13). However, the use of most of these compounds is limited by their toxicity due to the high serum concentration that is required to inhibit P-glycoprotein. Moreover, as the majority of chemosensitizers are membrane-permeable molecules, minimal progress was made in the development of liposome formulations of MDR-reversing agents (14). Thus, synthetic block copolymer micelles [e.g., poly(D,L-lactide)-block-methoxy polyethylene glycol (PEG) or poly-(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly-(ethylene oxide); refs. 15–18] and poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles (19–21) represent to date the most potent sensitizers of drug-resistant cancer cells. The inhibition of MDR by block copolymer micelles was attributed to the rapid incorporation to the cell membranes, spreading throughout the cells, and combined effects resulting in energy depletion and membrane fluidization (22). Reversal of MDR by poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles was linked to simultaneous adhesion and degradation of the colloid to the cell surface. By taking advantage of the finding that Solutol HS15, which is a mixture of free PEG 660 and PEG 660 hydrostearate, reverts MDR and is biocompatible (23, 24), we here investigated the hypothesis that the new Solutol HS15-based formulation of lipid nanocapsules (LNC) developed in our laboratory (25–27) was able to improve anticancer drug delivery while also overcoming MDR. As malignant brain tumors represent a difficult therapeutic challenge in which MDR mechanisms play essential roles (28), the present study focused on rat glioma paradigms *in vitro* and *in vivo*.

Materials and Methods

Materials

The lipophilic Labrafac WL 1349 (caprylic-capric acid triglycerides, European Pharmacopeia, IVth, 2002) was provided by Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). Lipoïd S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) and Solutol HS 15 were gifts from Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Injectable solutions of verapamil at 5 mg/mL (Isoptine) and paclitaxel at 6 mg/mL (Taxol) were from Abbott France (Rungis, France) and Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France), respectively. Paclitaxel powder was from Indena (Milan, Italy). Injectable $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -methoxyisobutylisonitrile ($^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI, Schering, Gif-sur-Yvette, France) was a kind gift from the Nuclear Medicine Unit of the University Hospital of Angers.

Formulation of LNCs and Preparation of Paclitaxel and Solutol HS15 Solutions

The overall study was made on 50-nm-diameter LNCs that were prepared according to the previously described original process (25). Briefly, Solutol HS15, Lipoïd, Labrafac, NaCl, and water (846, 75, 1,029, 89, and 2,975 mg, respectively) were mixed and heated under magnetic stirring up to 85°C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85°C and 60°C were then realized and followed by an irreversible shock induced by dilution with 12.5 mL of 0°C deionized water added to the mixture at 70°C. For the formulation of paclitaxel-loaded LNCs, 10 or 20 mg paclitaxel were first solubilized in a solution of 206 mg ethanol, 206 mg dichloromethane, and 10 mg cholesterol. Solutol HS15, Lipoïd, Labrafac, NaCl, and water were then added to this solution, and formulation of paclitaxel-loaded LNCs was done according to the above procedure with evaporation of dichloromethane and ethanol during the process. Photon correlation spectroscopy using a Malvern Autosizer 4700 (Malvern Instruments S.A., Worcester, United Kingdom) confirmed that all nanocapsules, loaded or not with paclitaxel, had a monomodal particle size distribution around 50.8 ± 0.1 nm and 53.9 ± 0.6 nm (mean \pm SD), respectively, with a narrow distribution (polydispersity index <0.3). Solutions of Solutol HS15 (50 mg/mL), Taxol (containing 0.625 or 1.25 mg/mL paclitaxel), and Solutol HS15 plus Taxol were prepared in PBS.

Paclitaxel Stability

Paclitaxel was solubilized in the triglycerides usually forming the lipid material of the LNCs. This preparation underwent the heating and cooling cycles reported from the preparation procedure. Stability of the drug was obtained by comparing the results with nontreated paclitaxel-triglyceride solutions by high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (29). Experiments were repeated in triplicate.

Determination of Drug Loading

For determination of paclitaxel encapsulation rate, LNCs were separated from supernatant using Centrisart C30 microcentrifuge filters (Sartorius, Goettingen, Germany). Paclitaxel concentration was measured in supernatant by HPLC in triplicate experiments, and the degree of encapsulation was calculated by consideration of initial amount of drug added.

In vitro Release Kinetics and Dissolution Study of Paclitaxel

In vitro release kinetic studies were done by dialysis; 2 mL of paclitaxel-loaded LNC suspension were filled into a dialysis tube (cutoff is 100 kDa) and inserted in a 100-mL flask containing 0.1 mol/L phosphate buffer saline added with 0.1% Tween 80 (PBST, pH 7.4) in a shaking water bath at 37°C at 75 rpm. At appropriate intervals, 0.5-mL samples were withdrawn, assayed for drug release, and replaced by 0.5 mL of fresh buffer. The amount of drug in the release medium was determined by HPLC as described above. To validate the release assay used, dissolution study of paclitaxel was conducted in PBST; 2 mL PBST were added to 2 mg paclitaxel powder in a 5-mL glass tube and

incubated at 37°C for 24 hours under gentle agitation with a SB1 Stuart Scientific tube rotator at 33 rpm (VWR International Merck Eurolab S.A., Fontenay-sous-Bois, France). Saturating solutions of paclitaxel were then collected and filtered on 0.2- μ m Minisart syringe filters (VWR International) so as to remove non-soluble paclitaxel. Quantifications of paclitaxel were then made by HPLC coupled with tandem mass spectrometry as previously described (30). Experiments were made in triplicate. The saturating concentration for paclitaxel in PBST was observed to be 15.42 ± 2.37 μ g/mL (mean \pm SD). As it is higher than the maximum concentration that could have been obtained with 100% release of paclitaxel from LNCs (10.63 μ g/mL), we here confirm paclitaxel solubility in PBST and validate the dialysis assay used.

P-glycoprotein LNC Interaction Assay

In vitro testing for LNC interaction with P-glycoprotein was made using a P-glycoprotein drug interaction assay kit according to the manufacturer's instructions (SpiBio, Massy, France).

Glioma and Newborn Rat Primary Astrocytes Cultures

Gliosarcoma 9L (9L) and glioma (F98) Fischer rat-derived cell lines were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, United Kingdom) and the American Type Culture Collection (Manassas, VA), respectively. Purified newborn rat primary astrocytes were obtained by the mechanical dissociation method from cultures of cerebral cortex as originally described (31). The cells were grown at 37°C/5% CO₂ in DMEM with glucose and L-glutamine (Bio Whittaker, Verviers, Belgium) containing 10% FCS (Bio Whittaker) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

Fluorescent Labeling of LNCs

The fluorescent compound Nile red (Sigma) was used as described previously (32). Briefly, Nile red was dissolved in acetone at 1‰ (w/w), and the resulting Nile red solution was incorporated in the triglyceride phase (Labrafac) at 1:10 (w/w). LNCs were then prepared as above. A BD FACSAria fluorescent-activated particle sorter and the BD FACSDiva software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were used to determine the efficiency of the LNC labeling (cf. Results). To exclude potential interferences of free Nile red with Nile red-loaded LNCs during uptake experiments, PD10 Sephadex-G25 exclusion columns (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) were used to separate fluorescently labeled LNCs from possible free Nile red. As initial results with native fluorescent LNCs and purified fluorescent LNCs were found to be fully identical during the time experiments were made (data not shown), indicating complete encapsulation and retention of the fluorescent compound, all following work was made on native fluorescent LNCs.

Size Characterization of Nile Red – Loaded LNCs and Evaluation of Remaining Nile Red during Experimental Procedure

Photon correlation spectroscopy using a Malvern Autosizer 4700 confirmed that Nile red-loaded LNCs

(LNC-NR) were similar to classic unloaded LNCs in size (51.17 ± 2.9 nm, mean \pm SD) and in distribution (polydispersity index < 0.06). As LNC-NR were further used for characterization of LNC uptake by glioma cells, quantification of Nile red that remains loaded during experimental procedure was made after dialysis of LNC-NR in PBS (pH 7.4) at 37°C. For this purpose, 3 mL of a stock suspension of LNC-NR were filled into a dialysis tube (cutoff is 15 kDa) and inserted in a 50-mL beaker containing PBS (pH 7.4) maintained at 37°C under magnetic stirring at 75 rpm. After a 48-hour dialysis made in sink conditions (buffer solution withdrawn and replaced by fresh buffer at appropriate intervals), Nile red was extracted from LNCs by mixing 100- μ L aliquots of the LNC-NR suspensions contained in the dialysis bag to 900 μ L methanol. To remove LNC debris, samples were then centrifuged at $17,000 \times g$ for 10 minutes, and Nile red concentrations (post-dialysis loading) were measured in supernatant by HPLC as previously described (33). The degree of remaining Nile red in LNCs was calculated by consideration of experimental determination of Nile red amount that was encapsulated for preparing LNC-NR stock suspension (pre-dialysis loading, considered as the 100% loading). Experiments were realized in triplicate.

Cellular Analysis of LNC Uptake by Flow Cytometry

A BD FACSCalibur fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest software (BD Biosciences) were used to perform flow cytometry analysis. Blank LNCs (LNC-BI, 1:1,000), Nile red-loaded LNCs (LNC-NR, 1:1,000), or solutions of free Nile red prepared in water (from stock solutions in acetone) were incubated with glioma cells in serum-free medium containing 50% DMEM, 50% Ham's F12 (Bio Whittaker), and N1 complement (Sigma) at final concentrations of Nile red varying from 5.88 ng/mL (NRL-100 and LNC-NR, 1:1,000) to 0.588 pg/mL (NRL-0.01). After 2 hours of incubation, removal of attached LNCs was accomplished by washing the cells thrice (10 minutes) with 0.2 mol/L acetic acid/0.5 mol/L NaCl. Cells were then detached by trypsinization. After centrifugation, they were resuspended in a 0.4% (w/v) trypan blue solution in HBSS (Bio Whittaker) to quench the extracellular fluorescence (34), thus enabling determination of the fraction that was actually internalized. The treated samples were subsequently washed twice and analyzed by flow cytometry in at least triplicate experiments, with 3,000 to 10,000 cells measured in each sample.

Cellular Analysis of LNC Uptake by Confocal Laser Scanning Microscopy

F98 cells were plated at 10^4 /mL in eight-well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc, Roskilde, Denmark). After 24 hours of culture, they were washed with HBSS and incubated for 10 minutes to 2 hours (similar results obtained) in serum-free medium containing 50% DMEM, 50% Ham's F12, and N1 complement with LNC-BI, LNC-NR, NRL-100, and NRL-100 with LNC-BI. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), washed with HBSS

and finally mounted under coverslip in glycerol/PBS (1:1). Confocal microscope images were obtained by using an Olympus Fluoview FU 300 confocal laser scanning microscopy imaging system (Paris, France).

Cytoskeletal Disruption

The cells were preincubated with 10 mg/mL nocodazole (Sigma) for 60 minutes at 37°C to disrupt microtubules (35). Consecutively, LNCs were added and incubated in serum-free cell culture medium in the presence of the drug.

Cholesterol Depletion

Cholesterol depletion was carried out essentially as described previously (36). Accordingly, cells were treated with 10 mmol/L methyl- β -cyclodextrin (37, 38), in the presence of 1 mg/mL lovastatin (Sigma) for 1 hour at 37°C.

Potassium Depletion

Glioma cells were washed once with potassium-free buffer (pH 7.4) as described previously (39), containing 140 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mg/mL D-glucose, followed by a wash with hypotonic buffer (potassium-free buffer diluted with water, 1:1). Then, the cells were washed again thrice with potassium-free buffer. Control cells were treated with buffer (pH 7.4) containing 140 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mg/mL D-glucose, and 10 mmol/L KCl. LNCs were incubated with the cells in potassium-free or potassium-containing buffer, as indicated. Subsequently, the cells were analyzed by flow cytometry.

Treatment with Other Drugs/Inhibitors

Glioma cells were treated with chlorpromazine (10 mg/mL; ref. 40), nystatin (10 or 25 μ g/mL; ref. 41), phorbol 12-myristate 13-acetate (1 or 10 μ g/mL; ref. 41), or 5-(*N,N*-dimethyl)amiloride hydrochloride (10 mmol/L; ref. 42; all from Sigma), in serum-free culture medium for 1 hour at 37°C. Subsequently, LNCs were added, and the incubation was continued for another 2 hours, after which the cells were analyzed by flow cytometry.

Cell Survival Assay *In vitro*

Cells were first plated at 10⁴/mL on plastic for 24 hours and then treated either with drug solution, blank, or drug containing LNCs of equivalent drug or excipient concentrations as assessed by paclitaxel stability and encapsulation rate in LNC. After 96 hours of incubation at 37°C/5% CO₂ and three washes in PBS (pH 7.4), cell survival (expressed as percentage of control untreated cells) was assessed by using the tetrazolium-based colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Absorbance measured at 570 nm is a function of the concentration of the converted dye, and the viable cell number is directly proportional to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction (43).

Reverse Transcription-PCR

RNA from 9L or F98 cells was isolated using the Rneasy Mini kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences Europe). Oligonucleotides (10 pmol/L) were used for PCR reactions with a 5-minute denaturation

step followed by 35 cycles of 1 minute at 95°C, 2 minutes at 58°C, and 2 minutes at 72°C and a final extension step at 72°C for 10 minutes. The primers used for amplification were designed based on Genbank sequences of the rat MDR1a, 5'-GGCCAGATGATCAAGACG-3' (sense) and 5'-AACAAGTTGCTGTTCTGCC-3' (antisense); rat MDR1b, 5'-AGTGACACTGGTGCCTCT-3' (sense) and 5'-GTTAC-AATTCCGTTGTTTGG-3' (antisense); rat MDR2, 5'-TGGC-TGGAAAGCACGCAT-3' (sense) and 5'-GCTTTA-CTGTGTCATCCC-3' (antisense); and rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5'-TGAATGACATCAA-GAAGGTGGTGGAG-3' (sense) and 5'-TCCTTGGAGGC-CATGTAGGCCAT-3' (antisense).

Western Blots

Cells were washed twice with PBS and scrapped, and cell pellets were lysed in lysis buffer [50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL pepstatin A, 2 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin (pH 7.4)] on ice for 30 minutes. Extracts were collected by centrifugation at 14,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The amount of total soluble protein in the extracts was determined with the Bio-Rad detergent-compatible protein assay with bovine serum albumin as standard. For Western blotting, 20 μ g of total proteins for each sample were then separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Hybond-P, Amersham Biosciences Europe). Membranes were blocked in 4% bovine serum albumin in TBS for 1 hour at room temperature. Blots were incubated with primary antibody overnight (C219 at 1:80 dilution; Clinisciences, Montrouge, France) at 4°C in 4% bovine serum albumin in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) followed by a 2-hour incubation with the appropriate anti-mouse secondary peroxidase-conjugated antibody (Amersham Biosciences Europe) in TBS-T. The immunoreactive proteins were visualized using 3,3'-diaminobenzidine in TBS added with 0.03% H₂O₂.

Animals and Glioma Models *In vivo*

Syngeneic Fischer F344 male rats weighing 180 to 200g were obtained from Iffa Credo (L'arbresle, France). Animal care was given in strict accordance to European regulations. A cultured tumor monolayer was detached with trypsin-EDTA, washed twice with DMEM without FCS or antibiotics, counted, and resuspended to the final concentration desired. For both ⁹⁹Tc^m-MIBI tumor uptake and tumor growth analysis, 100 μ L of cell suspensions containing either 10⁶ 9L or F98 cells were injected s.c. into the left thigh of the rat. For i.c. implantations, 10³ 9L or 5 \times 10² F98 cells were injected in the striatum of Fischer rats by stereotaxy at the following coordinates: 0.2 mm posterior from Bregma, 3.0 mm lateral from the sagittal suture, and 5.0 mm below dura as previously described (44).

Immunohistochemistry

Animals were killed on post-operative days 23 to 27 when they had severe clinical symptoms due to tumor evolution and were close from natural death. Brains were removed, frozen in isopentane at -30°C, and stored at -80°C; 14- μ m frontal sections throughout the tumor were

made with a cryostat (Leica, Nussloch, Germany). Slices were then processed for immunohistochemical staining with washes in PBS (pH 7.4) between each step. They were dried for 30 minutes at room temperature, fixed with paraformaldehyde for 10 minutes at 4°C, and post-fixed with ethanol 95%/acetic acid 5% (v/v) for 5 minutes at -20°C. Sections were blocked in PBS/4% bovine serum albumin containing 10% normal goat serum and 0.1% Triton X-100 for 1 hour at room temperature and incubated overnight at 4°C with C219 or IgG2A isotype (BD Biosciences) primary antibodies at the concentration of 5.46 µg/mL in PBS/4% bovine serum albumin containing 0.1% Triton X-100. Slides were then incubated for 1 hour at room temperature with a rat-adsorbed biotinylated anti-mouse antibody (Vector, Burlingame, CA). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections with 0.3% H₂O₂ for 15 minutes at room temperature, and color reaction was made using avidin-biotin complex kit (Vector) and incubation in PBS containing 3,3'-diaminobenzidine added with 0.03% H₂O₂. Finally, slides were slightly counterstained with toluidine blue and mounted with epoxide resin before optical microscope observation.

⁹⁹Tc^m-MIBI Cell Incorporation Assay

For *in vitro* assays, 9L or F98 cells were plated at 2×10^5 per 9-cm² well in 2 mL DMEM containing 10% FCS. After 24 hours of incubation at 37°C/5% CO₂, cells were treated with either verapamil, Solutol HS15, or LNC suspensions for 30 minutes at 37°C. ⁹⁹Tc^m-MIBI (20 µCi) was then added to each well for 30 additional minutes at 37°C. Hence, cells were scrapped and separated from the supernatant by two centrifugations at 6,000 rpm in HBSS and finally resuspended 1 mL HBSS for gamma-counting at the energy window of 140 keV ± 20% (Cobra II, Packard Bioscience, Rungis, France). For *in vivo* ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake, 14 days after 9L or F98 cell implantation, animals were injected in the tumor mass with 100 µL of the different samples (PBS control, 2.5 mg/mL verapamil, 50 mg/mL Solutol HS15 solution, or 100 mg/mL LNCs containing 50 mg/mL Solutol HS15). Twenty-four hours later, 100 µCi of ⁹⁹Tc^m-MIBI were injected i.v., and after 30 minutes, the rats were sacrificed. The tumor was removed and weighed, and the radioactivity content was measured by gamma-counting. As the mean verapamil elimination half-life in single-dose studies ranged from 2.8 to 7.4 hours, for verapamil groups, a second i.t. injection was made 1 hour before ⁹⁹Tc^m-MIBI injection.

Analysis of F98 Tumor Progression *In vivo* and Statistical Analysis

F98-derived tumors formed a particularly even ellipsoid mass in the region of the injection site. Animals implanted s.c. with F98 cells were treated i.t. at day 5 after cell injection. For this purpose, F98-implanted animals were injected with PBS (control, *n* = 7), blank LNCs (*n* = 7), paclitaxel-loaded LNCs (Px-LNC, at the dose of 2.5 mg/kg body weight paclitaxel, *n* = 9), Taxol (paclitaxel, at the dose of 2.5 mg/kg body weight paclitaxel, *n* = 8), and Taxol with Solutol HS15 solution (paclitaxel + PEG-HS, at the dose of 2.5 mg/kg body weight paclitaxel and same amount of

Solutol HS15 as the one contained in LNC, *n* = 7) in 400 µL. After killing the animals, F98-derived tumors were dissected and weighed. The length and width of each tumor were regularly measured using a digital caliper, and tumor volume was estimated with the mathematical ellipsoid formula (volume = $\pi/6 \times \text{width}^2 \times \text{length}$). Statistical significance in comparing tumor volume or tumor mass between groups for each experiment was determined by a Dunnett's test and by a Fisher's test.

Results

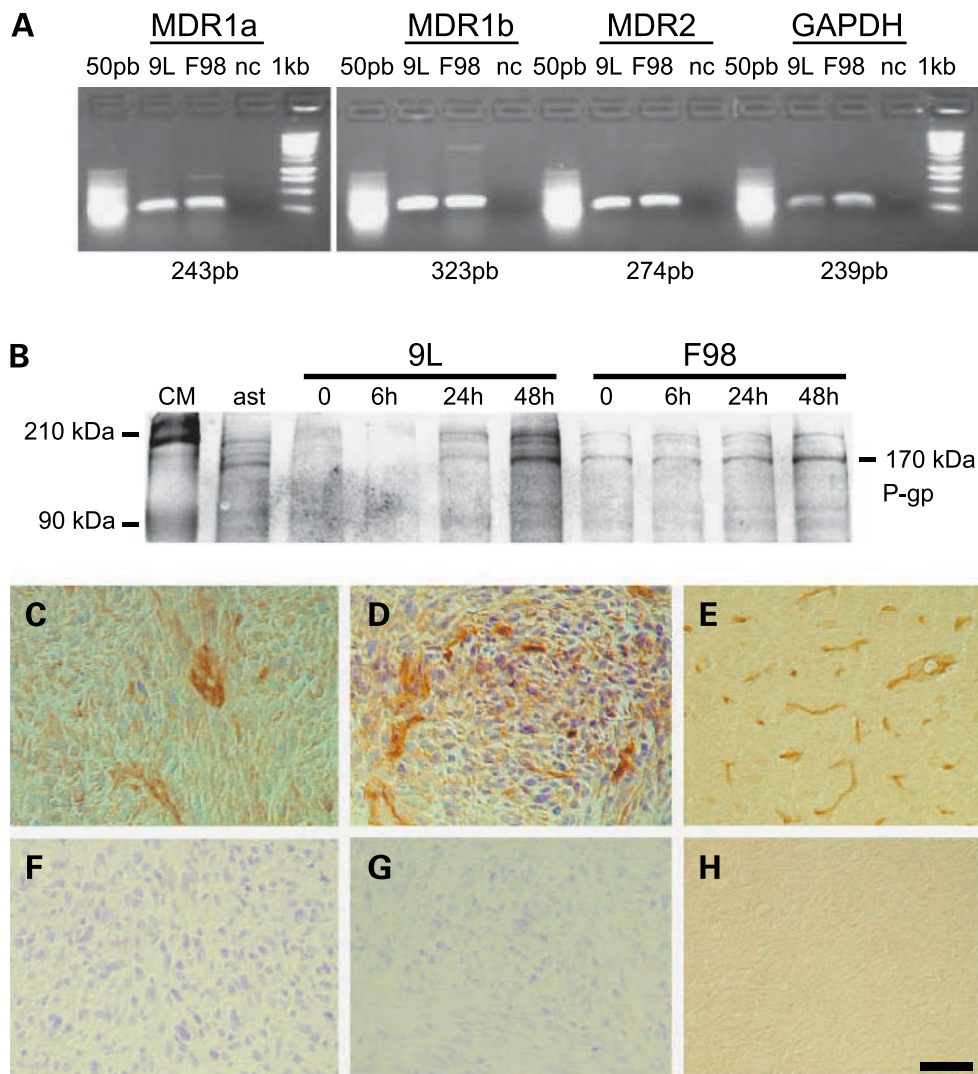
Expression of MDR Transporters by Glioma Cells *In vitro* and *In vivo* and Regulation of MDR by LNCs

To investigate MDR transport expression in our glioma cell models, reverse transcription-PCR analysis was used to detect the mRNA expression of P-glycoprotein members in 9L and F98 cells (Fig. 1A). Using gene-specific primers for MDR1a, MDR1b, and MDR2, MDR gene expression was detected in both 9L and F98 cells (Fig. 1A). To determine whether this gene expression of MDR transporters coincided with protein expression, a Western blot analysis was done using the monoclonal antibody C219, which recognizes a conserved COOH-terminal cytoplasmic sequence of P-glycoprotein isoforms. Our data showed that a 170-kDa band corresponding to P-glycoprotein isoforms is expressed at low level in primary rat astrocytes and increased with time in culture in both 9L and F98 rat glioma cells (Fig. 1B). By carrying out immunohistochemistry and using the C219 antibody in comparison to the isotype IgG2A, we also explored MDR transporters expression in intracranial tumors (Fig. 1C-H). We observed specific C219 immunolabeling in both 9L (Fig. 1C compared with Fig. 1F) and F98 (Fig. 1D compared with Fig. 1G) tumors. Such expression involved both the newly formed capillaries and the glioma cells themselves. In parallel, the C219 was able to stain specifically normal brain microvessels (Fig. 1E compared with Fig. 1H).

As MDR transporters were expressed *in vitro* and *in vivo* in our glioma models, we wanted to know whether our nanoparticulate systems could interact directly with these transporters and reverse MDR mechanisms. To address this issue, a P-glycoprotein drug interaction assay was carried out. This assay allows an *in vitro* screening for testing drug interaction with P-glycoprotein based on the modulation of ATPase activity from enriched P-glycoprotein inside-out membrane vesicle preparations (with P-glycoprotein intracellular domain facing the external compartment). As shown in Fig. 2A, we proved an interaction between LNCs with P-glycoprotein, which resulted in the negative regulation of ATPase activity and was comparable with the one observed with the known P-glycoprotein inhibitor vinblastin, whereas verapamil, another P-glycoprotein inhibitor, had a positive interaction on ATP hydrolysis.

Having established a direct interaction between LNCs and P-glycoprotein, examinations were carried out to see whether or not this finding resulted in some changes in the uptake of ⁹⁹Tc^m-MIBI, a lipophilic cationic tracer that is also

Figure 1. *In vitro* and *in vivo* expression of MDR transporters by glioma cells. **A**, reverse transcription-PCR analysis showing gene expression of *MDR1a*, *MDR1b*, and *MDR2* genes compared with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) control in 9L and F98 cells 24 h after plating, with respective fragment sizes of 243, 323, 274, and 239 pair base (pb). 50 pb and 1 kb, size markers; *nc*, negative PCR control (no cDNA loaded during the amplification step). **B**, Western blot analysis with C219 antibody showing P-glycoprotein (*P-gp*) expression (size band of 170 kDa) in newborn rat primary astrocytes (*ast*), 9L, and F98 cells. Note the increased expression over time (0–48 h) after plating in both the cell line. **C** to **H**, immunohistochemical detection of P-glycoprotein (brown labeling) with slight toluidine blue counterstaining, in i.c. 9L (**C**, C219 antibody; **F**, IgG2A isotype) and F98 (**D**, C219 antibody; **G**, IgG2A isotype) rat glioma and in normal rat cortex microvasculature (**E**, C219 antibody; **H**, IgG2A isotype). Representative of three independent experiments.



a specific P-glycoprotein substrate, by 9L and F98 cells (45). Our data showed that after short exposure (30 minutes) to LNCs, at low dilution (1:1,000 and 1:100), the ability of cells to retain $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI was significantly improved in both 9L (Fig. 2B, significance at 1:100 only) and F98 (Fig. 2C) glioma cells. Although the inhibitory effect was reduced in comparison with the one induced by verapamil at concentrations of 10 $\mu\text{mol/L}$, it was very similar to the one generated by Solutol HS15 at the respective concentration found in LNCs (1:1,000 and 1:100; Fig. 2B and C). This later result also attests that if Solutol HS15 is the main candidate involved in the inhibition of MDR by LNCs, its bioavailability is preserved in the drug delivery system under study. A similar investigation was then made *in vivo* 14 days after the implantation of tumor cells in rat thighs. Rats were treated i.t. with verapamil, Solutol HS15, or LNCs and, 24 hours later, received an i.v. injection of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI (100 $\mu\text{Ci}/200\mu\text{L}$). Thirty minutes after this last injection, the animals were sacrificed; their tumor was removed; and their $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI tumor incorporation was

assessed by gamma-counting. As shown in Fig. 2D (9L glioma model) and Fig. 2E (F98 glioma model), treatment with LNCs significantly improved the uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI *in vivo*. Although in the 9L glioma model both verapamil and Solutol HS15 had inhibitory effects (Fig. 2D), this was not the case in the F98 glioma model (Fig. 2E). This result emphasizes the fact that the modalities of MDR inhibition and its expression in glioma may differ from one cell type to another, and that LNCs represent useful MDR inhibitory objects.

Characterization of LNC Internalization/Endocytosis by Glioma Cells *In vitro*

To further investigate LNC-glioma cell interactions and better understand LNC effects on MDR, uptake of LNCs by 9L and F98 cells was investigated. For this purpose, LNCs were first labeled with Nile red as described in Materials and Methods. Fluorescent-activated particle sorting at 488 nm showed that 50-nm unlabeled LNCs displayed a low basal fluorescence (Fig. 3A). After Nile red incorporation, fluorescent-activated particle sorting at 488 nm showed

efficient LNC labeling with a Gaussian distribution of LNC numbers around a high-fluorescence intensity median (Fig. 3A). Thus, clusters of Nile red-stained LNCs can be visualized by fluorescent microscopy (Fig. 3B). To evaluate the amount of Nile red that remains loaded in LNC-NR during the experimental procedure, dialysis of LNC-NR in PBS (pH 7.4) at 37°C was completed for 48 hours in sink conditions. HPLC measurements in the dialysis bag showed that $96.20 \pm 1.78\%$ (mean \pm SD) of the initially loaded Nile red remained encapsulated (Fig. 3C). Subsequently, mechanisms at the onset of LNC internalization by glioma cells were studied by incubating fluorescent LNCs for 2 hours with 9L or F98 cells. Evidence of LNC uptake was obtained by fluorescent-activated flow cytometry. To discriminate between cell association and actual internalization, extracellular fluorescence was quenched by addition of trypan blue, the non-quenched fraction thus representing internalized LNCs (34). As similar results were obtained with 9L and F98 cells, only data with F98

cells are presented. Examination of cells before (Fig. 3D, control) and after (Fig. 3D, LNC-NR) incubation with Nile red-stained LNCs revealed a marked increase in cell fluorescence intensity, thus showing rapid LNC uptake. As a consequence, mean cell fluorescence intensity before incubation with Nile red-stained LNCs was considered as 0% uptake and mean cell fluorescence intensity after 2 hours incubation as 100% uptake (Fig. 3D, histogram). To avoid any misinterpretation of the data, variation of Nile red uptake through cell fluorescence intensity was also investigated after glioma cell incubation for 2 hours with LNC-BI or NRL solutions (from NRL-100 to NRL-0.01; cf. Materials and Methods). As expected, incubation of F98 glioma cells with LNC-BI resulted in no increase of fluorescence intensity (Fig. 3D). More interestingly, although a slight Nile red uptake was seen when using NRL solution at 5.88 ng/mL (NRL-100), none was observed when using NRL solution at 0.294 ng/mL (NRL-5; Fig. 3D). Because this last concentration is yet higher than the maximum Nile red that can be released after 48 hours from LNC-NR in saline media (Fig. 3C), it can be asserted that the dye used cannot be transferred on its own to the cells during the 2-hour incubation with LNC-NR. This last point was also confirmed by confocal laser scanning microscopy experiments. As shown on Fig. 3E, Nile red staining of F98 glioma cells was only observed when using LNC-NR (note that the fluorescence pattern is more pronounced in a perinuclear area but avoiding the nucleus) and not when using NRL-100. Additionally, the use of LNC-BI when treating the cells with NRL-100 did not result in any staining (Fig. 3E), thus showing that LNCs themselves cannot facilitate free Nile red to enter glioma cells. Therefore, when using LNC-NR, Nile red uptake by glioma cells can accurately be considered as LNC uptake. Investigation of energy-dependent cell uptake processes was made by using previously identified inhibitors of known endocytic pathways (cf. Materials and Methods). Variation of the basal mean fluorescence intensity after treatment with inhibitors was determined by flow cytometry at the 2-hour incubation time point. Our data, presented in Fig. 3F, revealed that microtubule disruption (nocodazole) did not affect LNC uptake. In contrast, cholesterol depletion (methyl- β -cyclodextrin and lovastatin), which has been shown to alter both clathrin-dependent and clathrin-independent cell uptake mechanisms (46–49), had a strong effect on LNC uptake by F98 glioma cells (about 75% reduction; Fig. 3F). To determine the relative participation of clathrin-dependent uptake mechanisms, chlorpromazine treatment (40) and potassium depletion (39) were used to specifically inhibit clathrin-coated pit formation and clathrin-dependent endocytosis. As shown on Fig. 3F, whereas a slight but nonsignificant decrease in LNC internalization was observed after chlorpromazine treatments (reduction of about 25%), no effects were seen with potassium depletion, indicating a relatively low implication of clathrin-coated pit formation in the uptake of LNCs by glioma cells. It was assumed that LNC endocytosis would be mediated through a clathrin-independent

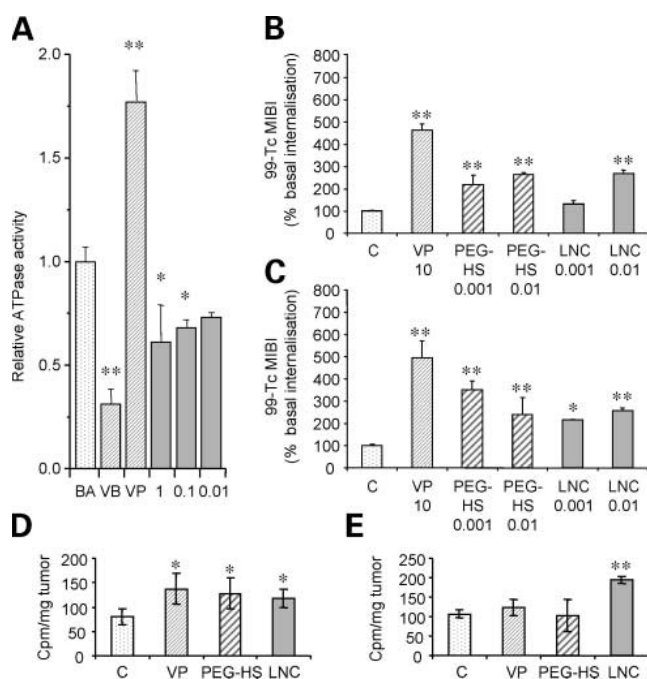


Figure 2. Interaction of LNCs with efflux transporters. **A**, *in vitro* screening of LNC interaction with P-glycoprotein-dependent ATPase activity using enriched P-glycoprotein inside-out membrane vesicle preparations. Note that as with vinblastine (VB) and verapamil (VP), LNCs modulate the basal relative ATPase activity (BA) at all dilutions tested [from pure (1) to 1:100 (0.01)]. **B** and **C**, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI uptake by 9L (**B**) and F98 (**C**) cells *in vitro*. Note that LNC, Solutol HS15 (PEG-HS), and verapamil at all concentrations tested improve intracellular retention of the surrogate tracer of MDR inhibition. **D** and **E**, modulation of MDR by LNC *in vivo*. 9L (**D**) and F98 (**E**) cells were implanted s.c. in Fischer rats and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI later injected i.v. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI tumor uptake was then assessed after tumor dissection and gamma-counting (cpm/weight of tumor). Note that i.t. treatment with both LNCs, Solutol HS15 (PEG-HS) and verapamil improve the intracellular retention of the surrogate tracer of MDR inhibition in the 9L model, whereas Solutol HS15 and verapamil are inefficient in reversing MDR in the F98 model. Columns, mean; bars, SD. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ (Dunnett's test).

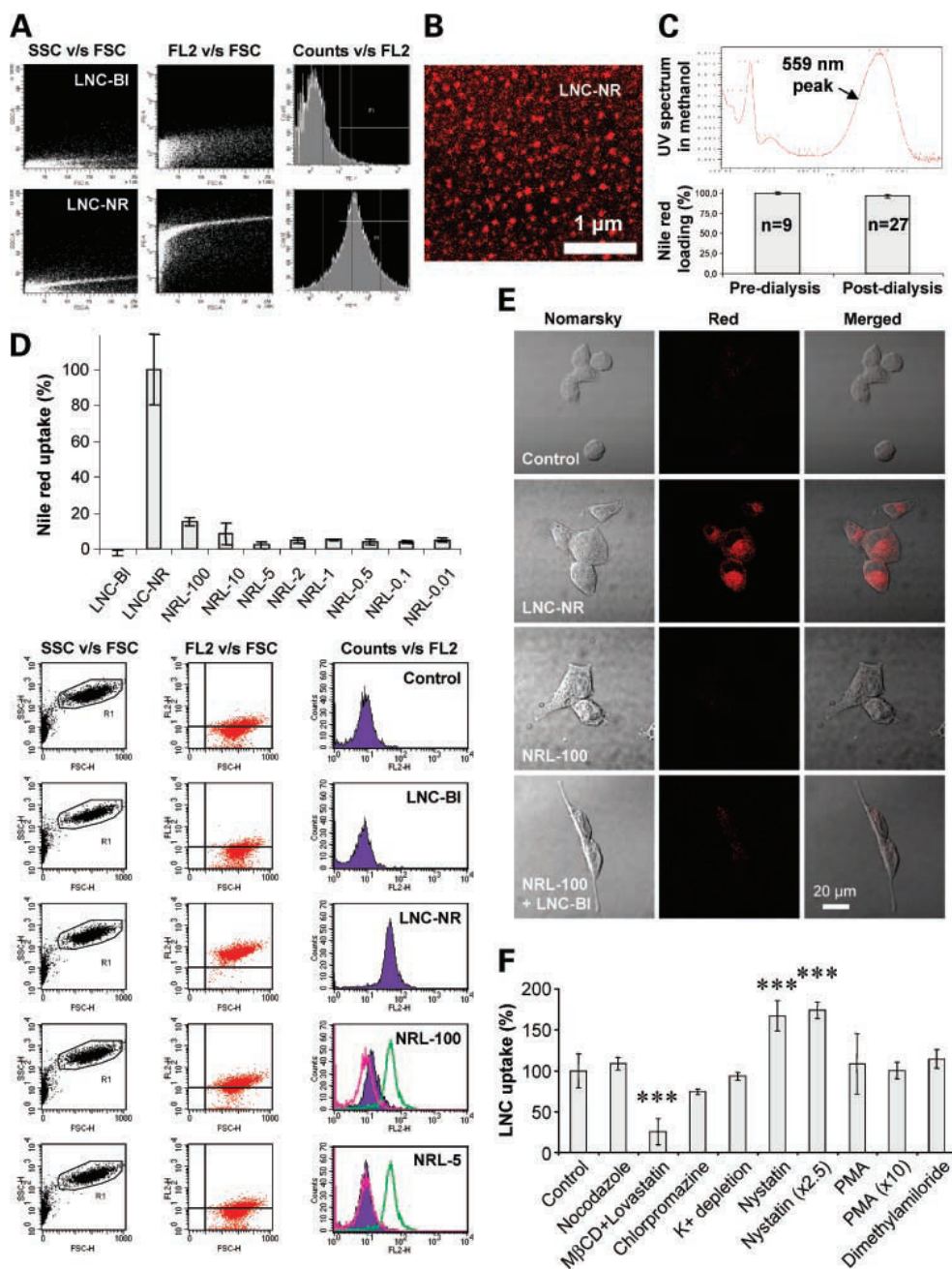


Figure 3. *In vitro* characterization of the internalization of Nile red-stained LNCs in F98 glioma cells. **A**, fluorescent-activated particle sorting of classical blank LNCs (LNC-BI) and Nile red-stained LNCs (LNC-NR): analysis for granularity (side scatter) versus size (forward scatter; *SSC v/s FSC*), fluorescence intensity versus size (*FL2 v/s FSC*), and numbers versus fluorescence intensity (*Counts v/s FL2*). Note the dramatic increase in fluorescence intensity between LNC-BI and LNC-NR and consecutive LNC number distribution. **B**, clusters of Nile red-stained LNCs are visualized by fluorescence microscopy. **C**, typical paclitaxel UV spectrum in methanol presenting an absorbance peak at 559 nm and HPLC quantification at 559 nm of remaining Nile red in the LNCs after 48 h of dialysis at 37°C in PBS (pH 7.4; post-dialysis) by comparison with initial loading (pre-dialysis). **D**, flow cytometry analysis of Nile red uptake by F98 cells after 2 h of incubation. For quantifications represented on the histogram, no treatment (*control*) and incubation with Nile red-loaded LNC (*LNC-NR*) were considered as to represent the 0% and 100% uptake of Nile red, respectively. For comparison, blank LNC (*LNC-BI*) and solutions of free Nile red at final concentration varying from 5.88 ng/mL (*NRL-100*) to 0.588 pg/mL (*NRL-0.01*) that correspond to 100% and to 0.01% of the Nile red provided by LNC-NR, respectively, were incubated with F98 cells. Cell analysis was made for granularity versus size (*SSC v/s FSC*), fluorescence intensity versus size (*FL2 v/s FSC*), and numbers versus fluorescence intensity (*Counts v/s FL2*). Counts for control (*pink*) and LNC-NR (*green*) were included on panels representing those for *NRL-100* and *NRL-5*. **E**, confocal laser scanning microscopy images (*Nomarsky*, *red*, and *merged*) after 10-min incubation of control (no treatment), LNC-NR, *NRL-100*, *NRL-100*, and LNC-BI with F98 cells. Note (both in **D** and **E**) that only Nile red provided from LNC-NR was significantly internalized by F98 cells. **F**, variation of the basal mean fluorescence intensity of F98 cells after 2 h of incubation with Nile red-stained LNCs and treatment with known inhibitors of endocytosis. Note the strong inhibitory effect of methyl- β -cyclodextrin (*M β CD*) and lovastatin. ***, $P < 0.01$ (Dunnett's test).

mechanism that involve one or both of the two known cholesterol enriched membrane microdomains: lipid rafts and caveolae (referred to as a specialized form of invaginated lipid raft that contains caveolin-1; ref. 50). Hence, nystatin, which is a membrane-permeable cholesterol-binding drug that has been shown to selectively disrupt lipid rafts, caveolae structures, and block caveolae function while not affecting clathrin-coated pits, was used to sequester cholesterol (51–53). Surprisingly, treatment of F98 cells with nystatin (10 or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resulted in an increase of LNC uptake (Fig. 3F). In parallel, treatment of F98 cells with phorbol 12-myristate 13-acetate (1 and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), which are activators of protein kinase C known to disrupt caveolae and block their invaginations (54), did not result in any reduction of LNC uptake by glioma cells, indicating no apparent direct role for caveolae-dependent mechanisms (Fig. 3F). Finally, treatment with dimethylamiloride, which is known to affect macropinocytosis (42), a mechanism that mainly contribute to antigen uptake by professional antigen-presenting cells, resulted in no effect as expected (Fig. 3F).

Characterization of Paclitaxel-Loaded LNCs and Their Effects on *In vitro* and *In vivo* Glioma Cell Growth

To further investigate the potential interest of the LNCs presented here, we aimed to prepare LNCs loaded with the MDR-sensitive substrate antineoplastic agent paclitaxel.

Paclitaxel was incorporated in LNCs with a high encapsulation rate ($93.0 \pm 3.1\%$, mean \pm SD). Because, its stability was also confirmed through the heat cycles required to produce paclitaxel-loaded LNCs with 97.3% remaining intact drug, the initial amount of drug added during formulation was considered to be equal to final amount contained in paclitaxel-loaded LNC suspensions. Although the release profile of PEG-HS was primarily characterized by a burst effect, paclitaxel was released in a sustained fashion over a long time period (Fig. 4A). These data suggest the entrapment of paclitaxel inside the hydrophobic core of LNCs and support the fact that all lipophilic components are mainly hidden by the PEG steric barrier of the PEG-HS at the LNC interface (Fig. 4B).

To determine the potential interest of these nanocarriers in the treatment of cancer, LNCs were used in an *in vitro* glioma cell survival assay. After being applied on glioma cells, paclitaxel-loaded LNCs were shown to dramatically reduce cancer cell survival in comparison with paclitaxel alone (Taxol solution) with >100 times efficiency on 9L cells (Fig. 5A) and >1,000 times efficiency on F98 cells (Fig. 5B). Interestingly, Solutol on its own was not able to improve the effects of paclitaxel (Fig. 5A and B). To examine whether nontransformed cells were less sensitive to cell death induced by paclitaxel-loaded LNCs, the same assay was repeated on newborn rat astrocyte primary cultures. As shown on Fig. 5C, our data illustrate that such slowly dividing or nondividing cells are fairly insensitive to cell death induced by either paclitaxel solution or paclitaxel-loaded LNCs with no difference between these two treatments.

We further wanted to determine whether or not this cytotoxic effect resulted in significant improvement in

tumor evolution *in vivo* by using an F98 s.c. glioma model that represented a straightforward way to evaluate the LNC influence on an MDR-expressing tumor. Whereas Taxol treatment showed no significant effect, paclitaxel-loaded LNC treatment was able to significantly lower both tumor mass (Fig. 5D) and tumor volume evolution (Fig. 5E). Interestingly, in a similar fashion to what was found *in vitro* in the F98 model, the addition of Solutol HS15 at the same concentration to the one contained in LNCs did not result in any improvement in tumor evolution. This proves the importance of the nanocarrier itself for the association of an antitumor effect to MDR reversion. We conclude, therefore, that paclitaxel-loaded LNCs may represent a potent tool in the treatment of glioma *in vivo*.

Discussion

This study showed that the overall effect of LNCs is to substantially optimize the bioavailability of anticancer drug while at the same time overcoming MDR mechanisms. Relating to the parenteral delivery of paclitaxel, one of the most promising drugs currently available for cancer

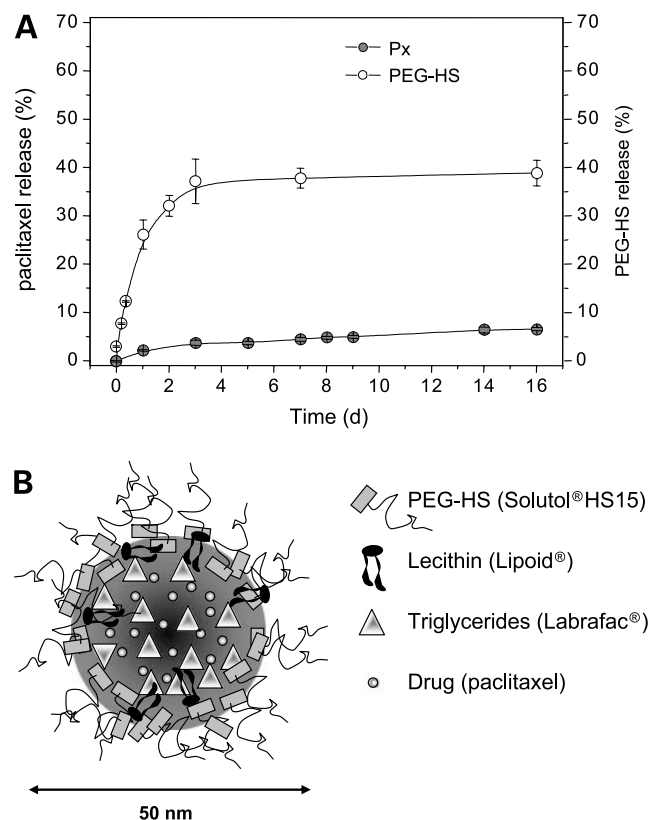


Figure 4. Characterization of paclitaxel-loaded LNCs. **A**, *in vitro* drug and surfactant release profiles from LNCs in phosphate buffer (0.625 mg/mL paclitaxel loading). **B**, schematic representation of paclitaxel-loaded LNCs showing a topographic distribution of the hydrophobic drug in the internal lipid core and nonionic PEG-HS chains (Solutol HS 15) at the interface. Px, paclitaxel; PEG-HS, Solutol HS15.

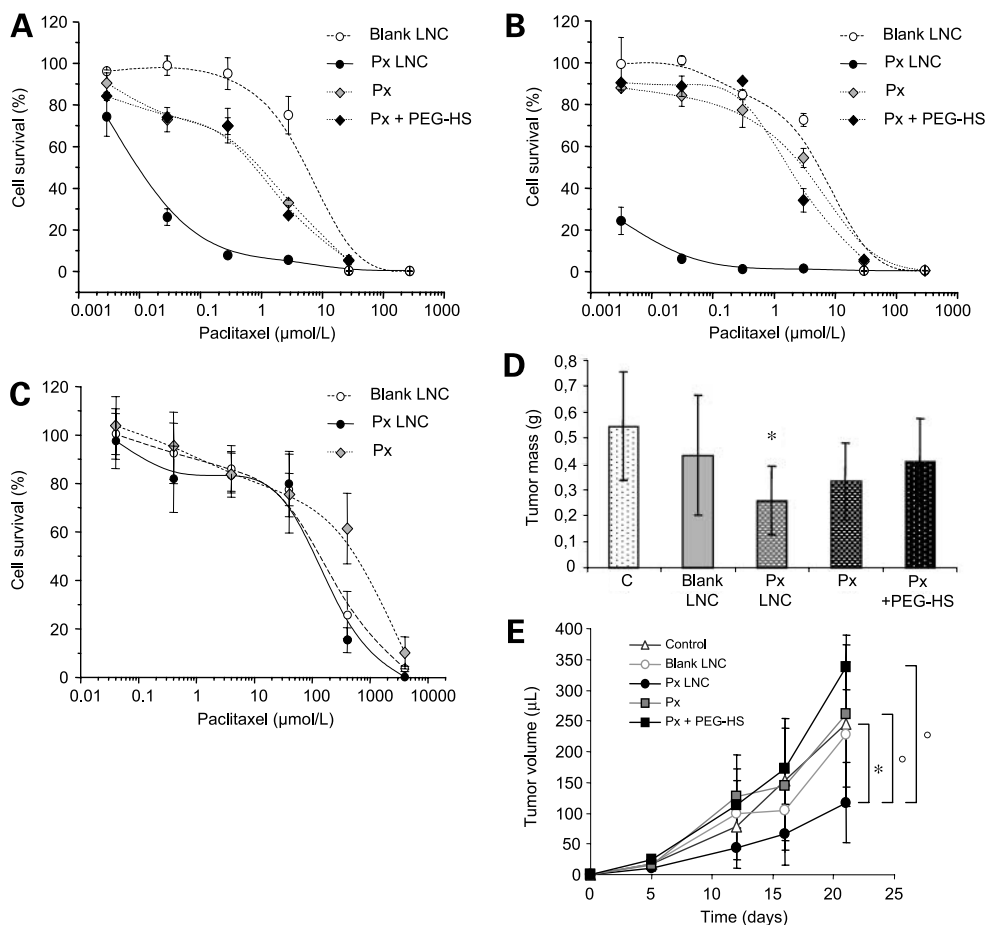


Figure 5. Effects of paclitaxel-loaded LNCs on glioma cell growth. **A to C**, *in vitro* effects of paclitaxel-loaded LNCs on the survival of 9L (**A**), F98 (**B**), and newborn rat primary astrocytes (**C**). *Px LNC*, paclitaxel-loaded LNCs; *Px*, Taxol alone; *Px + PEG-HS*, Taxol and Solutol HS15; *blank LNC*, unloaded LNCs. Total paclitaxel concentration per well was the same for paclitaxel, paclitaxel LNC, and paclitaxel + PEG-HS as confirmed by HPLC measurements (cf. paclitaxel stability and drug loading). Note the weak efficacy of Taxol formulation for reducing cell growth in both 9L (**A**) and F98 (**B**) model when compared with paclitaxel-loaded nanocapsules. In parallel, paclitaxel-loaded LNCs showed no significant effect on cell survival when applied to slowly dividing nontransformed cells (**C**). **D and E**, *in vivo* effects of paclitaxel-loaded LNC treatment on the growth of F98 glioma cells implanted s.c. Total paclitaxel dose (2.5 mg/kg body weight) was the same for C, paclitaxel LNC, and paclitaxel + PEG-HS. Note that tumor growth assessed by tumor mass in (**D**) and tumor size measurements in (**E**), with statistics on day 21, was significantly reduced by paclitaxel-loaded LNCs, whereas the commercially available Taxol formulation had smaller effects. C, control; *Px-LNC*, paclitaxel-loaded LNC; *Px*, Taxol only; *Px + PEG-HS*, Taxol with Solutol HS15 solution. Points, mean; bars, SD. *, $P < 0.05$ (Dunnett's test). Statistical analysis by pairs also show significant differences in **E** on day 21 between paclitaxel LNC and paclitaxel as well as paclitaxel LNC and paclitaxel + PEG-HS. °, $P < 0.05$ (Fisher's test).

therapy (55–57), the nanocarrier system described here presents three main advantages. First, it allows a drug sustained release, a point of major importance because it has been reported that cancer cell sensitivity to paclitaxel concentration increases significantly with the increasing duration of exposure to the drug *in vitro* due to an increased probability of arresting the cell cycle during the late G_2 or M phase (56, 57). Second, LNCs are obtained without the use of Cremophor-EL, the nonionic surfactant in the Taxol formulation that displays a wide variety of intrinsic toxic side effects that limit the amount of drug that can be safely given (58). Third, LNCs target the intracellular compartment in which they likely represent stable drug reservoirs (27). Indeed, whereas hydrophobic compounds may diffuse into interstitial spaces, they showed little

accumulation in tumor cells. Thus, the presence of LNCs in the glioma cytosolic spaces would allow paclitaxel to be released in the close vicinity of the microtubule network on which it is acting.

In parallel to improving hydrophobic drug bioavailability through the optimization of drug formulation and targeting, the dual interest of LNCs is to reduce MDR phenomena, thus decreasing paclitaxel clearance. The reversion of multidrug resistance in tumor cells has already been observed with antitumoral drugs encapsulated in colloidal carriers, such as liposomes, polymer nanoparticles, or block copolymer micelles. Thus, several mechanisms of reversion have been proposed (2, 15–21). The local delivery of the drug in high concentration close to the cell membrane would affect the local microconcentration of the

drug and is supposed to be able to saturate MDR efflux pumps. Simultaneous drug release and polymer degradation, with a particular attention being paid to the nature of the wall polymer used proved to be of prime importance. The formation of an ion pair between polycyanoacrylic acid, resulting from the degradation of the wall material, and doxorubicin was shown to improve drug diffusion across the plasma membrane and to reduce drug recognition as P-glycoprotein substrate. However, such a system raises the problem of the integrity of the drug and the persistence of its cytotoxic activity (2). In addition, it was shown that block copolymer micelles decrease intracellular ATP levels together with reducing ATPase activity of P-glycoprotein (22, 59). In all cases, a physical interaction between the structure of the nanocarrier and the efflux transporter itself has been excluded. Alternatively, it has been shown that the coencapsulation of a reversing agent (cyclosporine A) with doxorubicin inhibits MDR (2). However, one has to be careful with the use of compounds, termed chemosensitizers or reversing agents (e.g., verapamil, quinidine, and amiodarone) because *in vivo* application of most of these compounds is precluded by side effects (13).

Concerning the LNCs presented here, experiments using P-glycoprotein-enriched inside-out vesicles and confocal laser scanning microscopy imaging studies support an intracellular interaction of the LNCs with P-glycoprotein-related efflux pumps. Although this observation does not exclude external MDR inhibition, it suggests that LNCs allow not only a genuine intracellular release of paclitaxel but also an intracellular-driven MDR inhibition. As intrinsic MDR-blocking activity of Solutol HS15 turned out to be inefficient after 24 hours on F98 cells *in vivo*, most of the "long-term" MDR reversion we observed must be directly attributed to the LNC carrier system itself. In parallel, our flow cytometric studies showed, collectively, a major sensitivity of the LNC uptake process to cholesterol perturbation in glioma cells. However, cholesterol depletion (methyl- β -cyclodextrin and lovastatin) and cholesterol sequestration (nystatin) seemed to have opposite effects (Fig. 3F). This assumption must be ascribed to convoluted roles of nystatin that not only can bind nonesterified cholesterol but also create transmembrane pores and alter cell membrane permeability (60). Consequently, even with a major role for cholesterol, nystatin may influence positively LNC internalization in glioma cells. As clathrin-dependent endocytosis seemed to be weakly involved in LNC internalization, cholesterol-rich microdomains unresponsive to protein kinase C activation (e.g., a subpopulation of lipid rafts) were suspected to play the key role. It is interesting to note that for the same particle size (50 nm), LNC intracellular internalization differed from the one of fluorescent polystyrene spheres that involved clathrin-coated pits (61). Assuming that uptake mechanisms are likely to be cell specific, not only the size but also the nature of the internalized particles must be equally important. Thus, we here propose a mechanism by which LNC uptake together with consecutive intracellular

cholesterol movements would constitute the core of the LNC inhibitory effects on MDR (Fig. 6). It has indeed recently been shown that cholesterol itself modulates positively P-glycoprotein activity (62) and that caveolins, which are highly concentrated in nondisrupted caveolae, negatively (63). According to this, LNC inhibitory effects on efflux pumps would be partially direct, through the progressive release of intracellular free PEG-HS that interacts with MDR efflux pumps and reduce their activity, and mainly indirect, through redistribution of intracellular cholesterol (Fig. 6). The resulting increase in cytosolic paclitaxel concentrations would itself lead to cell death (Fig. 6).

In conclusion, LNCs combined the specific advantages of block copolymer micelles, with an unprecedented *in vitro* toxicity up to 1,000-fold higher than that of the free drug that must be linked to rapid cell internalization (15–18), and those of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles, with the possibility to graft a molecular recognition moiety to their surface to achieve tissue and even subcellular targeting (19–21). As different efflux pumps are frequently coexpressed by cancer cells and often induced by the treatment itself with many derivations from the original transformed cell, the use of LNCs as a new MDR-inhibiting system present the other particularity of probably not being highly selective to a specific efflux

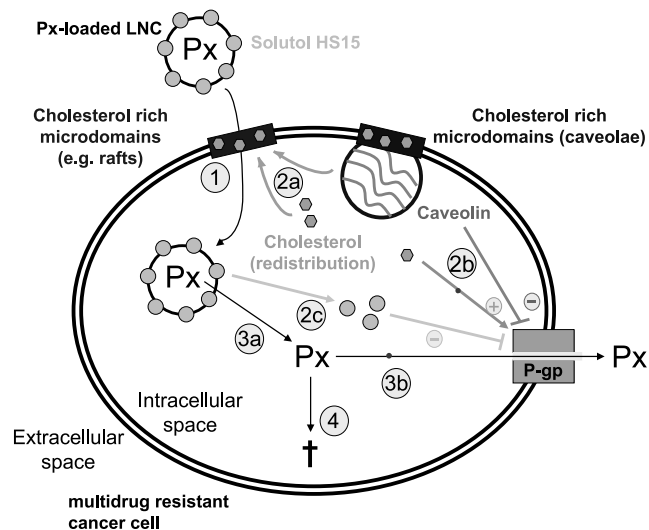


Figure 6. Model explaining the effects of paclitaxel-loaded LNCs on MDR and cancer cell growth. Uptake of paclitaxel-loaded LNCs in the intracellular space of cancer cells seems to involve cholesterol-rich microdomains, among which subpopulations of lipid rafts are potential candidates (7). Consecutive intracellular cholesterol redistribution (2a) may interfere with other cholesterol-rich microdomains resulting in a down-regulation of P-glycoprotein activity (2b; e.g., positive effects of cholesterol blocked and negative effects of caveolin accentuated). Alternatively, inhibition of MDR can result from Solutol HS15 effects after release from LNCs in the intracellular space (2c). Paclitaxel itself would be released in a close vicinity to the microtubule network on which it is active (3a), with reduction of its efflux as a consequence of the inhibition of the P-glycoprotein activity (3b). Thus, the overall adjuvant effect of LNCs would result in an improvement of paclitaxel intracellular bioavailability (4) and in an increase of tumor cell death (+).

pump but being able to act on the overall classic MDR mechanism. The development of such nanocarrier systems, therefore, requires attention and further investigations toward the application of new therapeutic protocols in humans, including mini-invasive stereotaxic treatments of deep cerebral tumors.

Acknowledgments

We thank Dr. Richard Milner (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for critical reading of the article. We are also grateful to Drs. Franck Lacoëuille and Jean-Michel Oger (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 646, Angers, France), Pierre Legras and Jérôme Roux (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire, Angers, France), Robert Filmon and Romain Mallet (Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques, Angers, France), and Dr. Catherine Guillet (Service Commun de Cytométrie et d'Analyse Nucléotidique, Angers, France) for skillful technical support.

References

- Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47:65–81.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:631–51.
- Sells RA, Owen RR, New RR, Gilmore IT. Reduction in toxicity of doxorubicin by liposomal entrapment. *Lancet* 1987;2:624–5.
- Rahman A, Treat J, Roh JK, et al. A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin. *J Clin Oncol* 1990;8:1093–100.
- Cowens JW, Creaven PJ, Greco WR, et al. Initial clinical (phase I) trial of TLC D-99 (doxorubicin encapsulated in liposomes). *Cancer Res* 1993;53:2796–802.
- Gabizon A, Catane R, Uziely B, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 1994;54:987–92.
- Storm G, ten Kate MT, Working PK, Bakker-Woudenberg IA. Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes: effects on bacterial blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system. *Clin Cancer Res* 1998;4:111–5.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskov V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994;263:1600–3.
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002;19:99–134.
- Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs: a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol* 2004;113:151–70.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48–58.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152–62.
- Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* 2003;48:347–59.
- Mayer LD, Shabbits JA. The role for liposomal drug delivery in molecular and pharmacological strategies to overcome multidrug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20:87–93.
- Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Elmquist WF, Miller DW, Kabanov AV. Sensitization of cells overexpressing multidrug-resistant proteins by pluronic P85. *Pharm Res* 2003;20:1581–90.
- Batrakova EV, Zhang Y, Li Y, et al. Effects of pluronic P85 on GLUT1 and MCT1 transporters in the blood-brain barrier. *Pharm Res* 2004;21:1993–2000.
- Batrakova E, Lee S, Li S, Venne A, Alakhov V, Kabanov A. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm Res* 1999;16:1373–9.
- Ramaswamy M, Zhang X, Burt HM, Wasan KM. Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers. *J Pharm Sci* 1997;86:460–4.
- Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release* 2003;93:151–60.
- Soma CE, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 2000;21:1–7.
- Hu YP, Jarillon S, Dubernet C, Couvreur P, Robert J. On the mechanism of action of doxorubicin encapsulation in nanospheres for the reversal of multidrug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;37:556–60.
- Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:483–93.
- Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res* 1991;51:897–902.
- Buckingham LE, Balasubramanian M, Emanuele RM, Clodfelter KE, Coon JS. Comparison of Solutol HS 15, Cremophor EL and novel ethoxylated fatty acid surfactants as multidrug resistance modification agents. *Int J Cancer* 1995;62:436–42.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002;19:875–80.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. *Int J Pharm* 2002;242:167–70.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003;24:4283–300.
- Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF. Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:83–105.
- Coudore F, Authier N, Guillaume D, Beal A, Duroux E, Fialip J. High-performance liquid chromatographic determination of paclitaxel in rat serum: application to a toxicokinetic study. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;721:317–20.
- Peltier S, Oger J, Lagarce F, Couet W, Benoit J. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res*. In press.
- McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890–902.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1985;100:965–73.
- Lamprecht A, Benoit JP. Simple liquid-chromatographic method for Nile Red quantification in cell culture in spite of photobleaching. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;787:415–9.
- Hed J, Hallden G, Johansson SG, Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 1987;101:119–25.
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol Cell* 1997;8:973–85.
- Zuhorn IS, Visser WH, Bakowsky U, Engberts JB, Hoekstra D. Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochim Biophys Acta* 2002;1560:25–36.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 1999;10:961–74.
- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 1989;186:17–22.
- Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 1983;33:273–85.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 1993;123:1107–17.

41. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825–34.
42. Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, et al. Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 2002;76:6689–700.
43. Jordan JP, Hand CM, Markowitz RS, Black P. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay. *J Neurooncol* 1992;14:19–35.
44. Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C, et al. Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats. *Cancer* 2003;97:2822–9.
45. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977–84.
46. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003;161:673–7.
47. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 2003;116:4707–14.
48. Pichler H, Riezman H. Where sterols are required for endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1666:51–61.
49. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 2002;3:443–51.
50. Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:237–50.
51. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68:673–82.
52. Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol* 1993;123:595–604.
53. Ros-Baro A, Lopez-Iglesias C, Peiro S, et al. Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12050–5.
54. Smart EJ, Foster DC, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1994;124:307–13.
55. Brandes AA, Pasetto LM, Monfardini S. New drugs in recurrent high grade gliomas. *Anticancer Res* 2000;20:1913–20.
56. Cahan MA, Walter KA, Colvin OM, Brem H. Cytotoxicity of taxol *in vitro* against human and rat malignant brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33:441–4.
57. Horwitz SB. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol* 1994;5 Suppl 6:S3–6.
58. Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann Pharmacother* 1994;28:S11–4.
59. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: selective energy depletion. *Br J Cancer* 2001;85:1987–97.
60. Coutinho A, Silva L, Fedorov A, Prieto M. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys J* 2004;87:3264–76.
61. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2003;377:159–69.
62. Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol* 2004;66:1332–9.
63. Jodoin J, Demeule M, Fenart L, et al. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem* 2003;87:1010–23.

Chapitre 3 :

L'intégrité des nanovecteurs dans les cellules cibles

Les travaux présentés ici ont été réalisés en collaboration avec M. le Pr Igor Chourpa, de l'EA 4244 – IFR 135 de Tours. Ils concernent le suivi de l'intégrité des nanovecteurs dans les cellules F98. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les nanovecteurs peuvent avoir des effets sur les cellules. Cependant, si les interactions entre les nanovecteurs et les cellules cibles engendrent des effets sur le comportement et l'intégrité de ces dernières, ces interactions peuvent également avoir des répercussions sur les nanovecteurs, notamment sur leur intégrité. De plus, la caractérisation du devenir d'un nanovecteur et de ses composants, plus particulièrement par l'étude de son intégrité, nous permettra de connaître la localisation et l'environnement subcellulaire d'où seront libérés les principes actifs vectorisés et dont dépend leur efficacité.

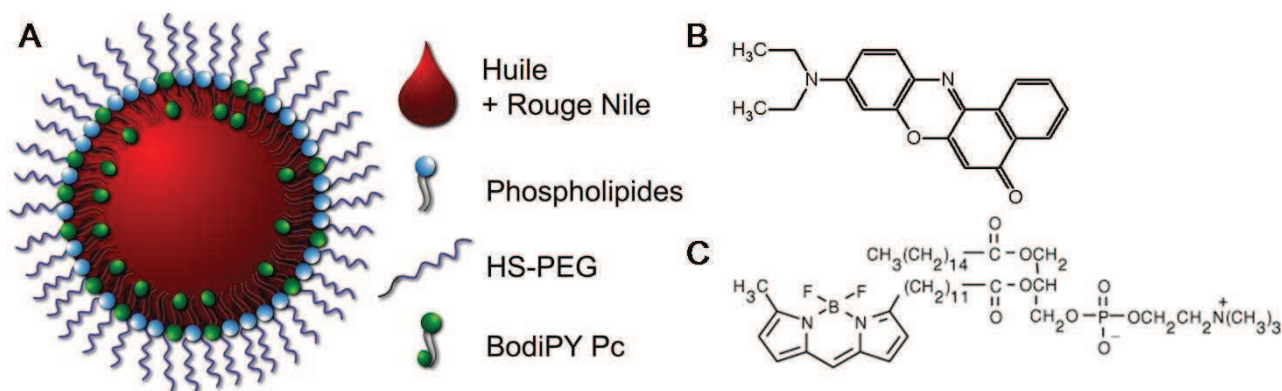


Figure 1. Illustration de la localisation du Nile red et du BodiPy PC dans les LNCs (A), le Nile Red (B) et le « 2 - (4,4 - difluoro -5 - methyl - 4 - bora - 3a, 4a - diaza -s -indacene - 3 - dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine » (BodiPy PC) (C).

Afin de suivre l'effet des interactions cellules/nanovecteurs sur l'intégrité du nanovecteur, nous avons commencé l'étude du devenir cellulaire du Rouge Nile et du BodiPy PC incorporées dans les LNCs (figure 1). En effet, nous avons réussi à intégrer dans les LNCs deux types de molécules fluorescentes. D'abord le Rouge Nile, un fluorochrome très lipophile qui va s'intégrer dans le cœur de triglycéride des LNCs (figure 1). Ainsi le Rouge Nile, représente un marqueur du devenir du cœur lipophile de la LNC. Nous avons également réussi à intégrer dans des LNCs du BodiPy PC qui étant une phosphatidyl choline fluorescente, nous

permettra de suivre le devenir des surfactants ioniques des LNCs (majoritairement des phosphatidyls cholines) (figure 1). Il a été possible d'inclure ces marqueurs fluorescents dans des LNCs différentes, mais incubées ensemble avec les cellules F98 (figure 2). Nous avons ensuite également réussi à préparer des LNCs ayant incorporés les deux fluorochromes. Ce double marquage des LNCs nous a permis de les étudier en imagerie spectrale.

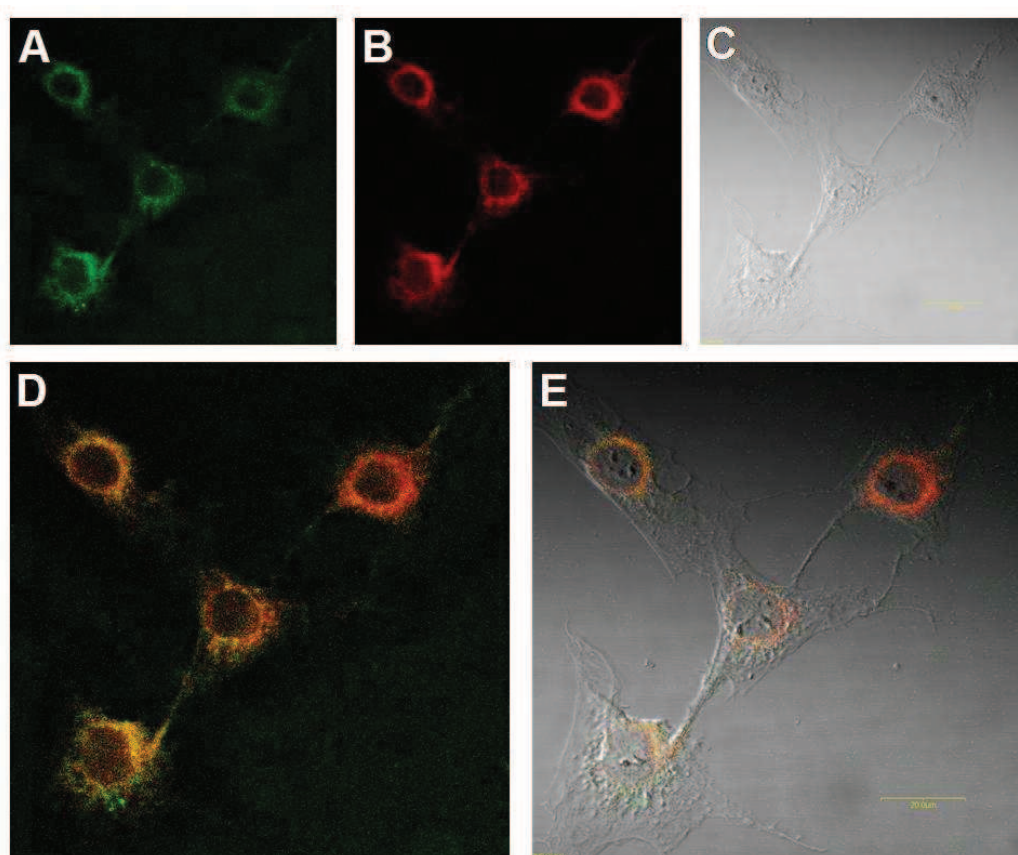


Figure 2. Images de microscopie confocale des cellules F98 incubation de 2 heures à 37°C avec des LNCs Bodipy PC et des LNCs Rouge Nile. (A) détection du Bodipy PC, (B) détection du Rouge Nile, (C) image en contraste de phase de cellules F98, (D) superposition des images A et B, C et (E) est la superposition des images C et D.

Les études en imagerie spectrale, ont permis de détecter les modifications des spectres d'émission de fluorescence du Nile red et du Bodipy PC. Ainsi ces modifications vont nous permettre d'évaluer les changements d'environnements moléculaires que subiront le Rouge Nile et de Bodipy PC, donc les modifications d'intégrités des LNCs dans une cellule. Pour

cela les cellules F98 sont incubées à 37°C avec une solution de LNCs de 50nm contenant du BodiPy PC et du Rouge Nile et diluée au 1/1000 de leur solution stock. Après cette incubation de 5 minutes (figure 2.G) ou 30 minutes (figure 2.H), les cellules sont rincées, pour éliminer du milieu les LNCs non internalisées. Ces cellules sont alors visualisées en microscopie optique, puis une zone (cadre bleu) de la cellule est définie pour être étudiée. Dans cette zone seront cartographiés tous les spectres d'émissions du BodiPy PC et du Rouge Nile.

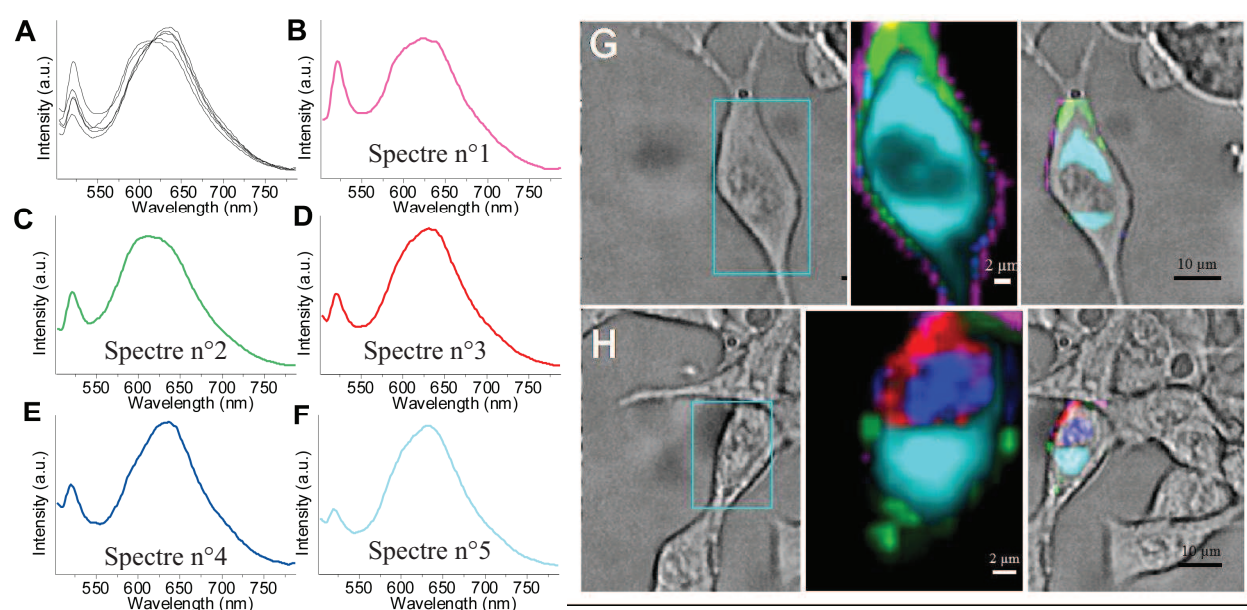


Figure 3. Détection de 5 spectres d'émission de fluorescence dans la zone cellulaire étudiée (A) ; isolement de chacun des spectres et attribution d'une pseudo couleur (B à F) ; Image de microscopie optique des cellules F98, ainsi que la cartographie des différents spectres d'émission de fluorescence détectés, après 5 minutes (G) ou 30 minutes (H) d'incubation avec les LNCs, montrant la distribution subcellulaire du Rouge Nile et du BodiPyPC.

Comme l'illustre la figure 3.A, plusieurs spectres d'émission de fluorescence sont détectés dans la cellule, chacun correspondant à une situation environnementale différente du Rouge Nile et du BodiPy PC. Chaque spectre est alors isolé, et une pseudo couleur lui est attribuée, comme le rose pour le spectre n°1 (figure 3.B à 2.F). Ensuite ces pseudo couleurs sont appliquées à la cartographie spectrale de la cellule, permettant de visualiser la répartition des différents spectres dans la cellule et leur intensité (figure 3.G et 2.H).

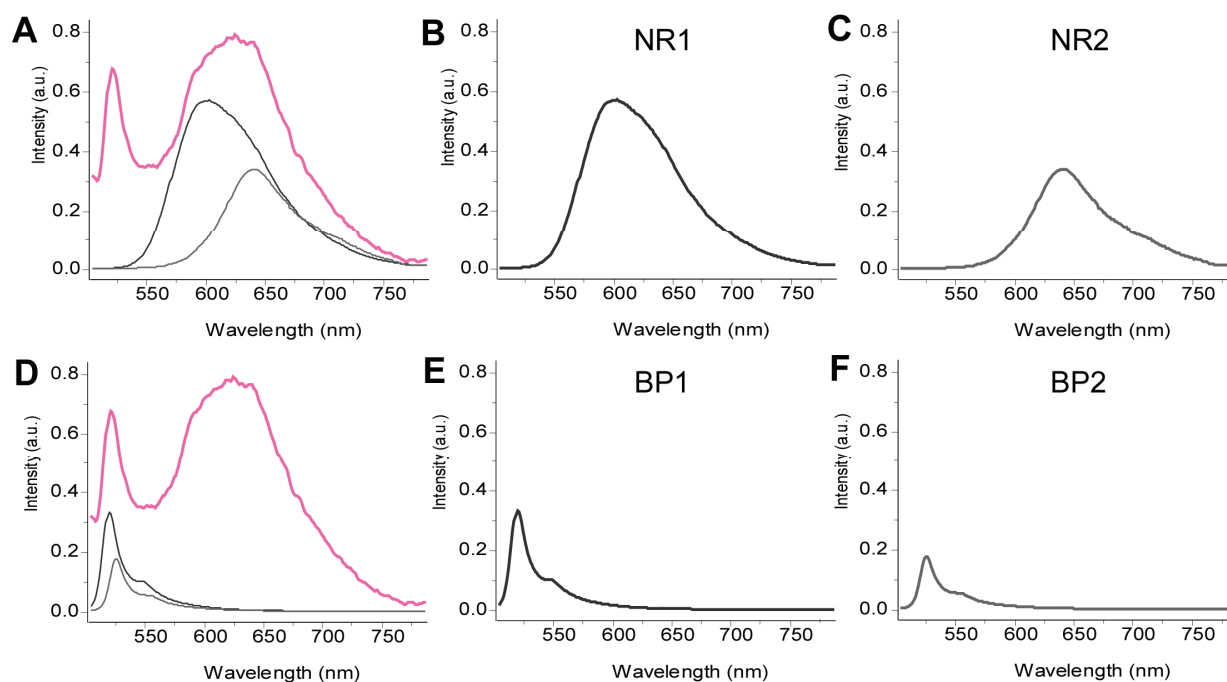


Figure 4. Détail des contributions des différents spectres d'émission de fluorescence du Rouge Nile, NR1 et NR2, et du BodiPy PC, BP1 et BP2, au spectre n°1.

Chaque spectre est également décomposé afin d'identifier la contribution des différentes molécules fluorescentes participant à ce spectre. Ainsi comme le montre la figure 4, dans le spectre n°1, il a été possible de déterminer que ce spectre était une combinaison d'au moins 4 spectres différents : deux correspondant à des spectres d'émission de fluorescence du Rouge Nile (la composante spectrale NR1 et NR2) (figure 4.A, B, C) et deux au BodiPy PC (la composante spectrale BP1 et BP2) (figure 4.D, E, F). La composante NR1 a été identifiée comme étant le spectre d'émission de fluorescence du Nile Red dans un environnement de triglycérides, alors que la composante NR2 a été identifiée comme le spectre d'émission de fluorescence du Nile Red dans un environnement de phospholipides. La contribution de chacune des composantes spectrales pour chacun des spectres intracellulaires isolés a alors été calculée. Le résultat des rapports entre les différentes composantes est consigné dans le tableau 1.

Environnements	Rapports NR1/NR2	Rapports BP1/BP2	Rapports (NR1+NR2) / (BP1+BP2)
Spectre n°1 (Rose)	2,00	1,93	5,79
Spectre n°2 (Vert)	3,39	1,51	8,83
Spectre n°3 (Rouge)	1,34	1,78	12,92
Spectre n°4 (Bleu)	1	3,00	14,46
Spectre n°5 (Cyan)	1,24	2,36	22,00

Tableau 1. Rapport entre chacune des différentes composantes spectrales identifiées pour chaque spectre intracellulaire.

Ces premiers résultats nous permettent déjà quelques conclusions intéressantes. D'abord aux temps testés, nous n'avons pas détecté de spectre d'émission de fluorescence de BodiPY PC ou de Rouge Nile isolé. Par conséquent, ces molécules qui arrivent ensemble dans une LNC pour interagir avec les cellules F98, restent ensemble dans cette cellule. Il est donc fortement probable que les molécules de Rouge Nile et de BodiPY PC véhiculées par les LNCs ne sont pas libérées l'une de l'autre dans la cellule par les différentes interactions LNC/cellule. En revanche l'évolution des rapports entre les composantes spectrales attribuées au Rouge Nile et au BodiPY prouve que l'environnement de ces molécules est modifié dans la cellule. Ainsi nous pouvons conclure également que les interactions entre les nanovecteurs et les cellules, qui engendrent des effets sur la cellule, modifient l'intégrité des LNCs. Cependant ces modifications ne semblent pas déstabiliser complètement les LNCs puisque nous avons vu ici qu'au moins certains de leurs constituants, triglycérides et phospholipides, resteraient ensemble dans la cellule. La cartographie des différents spectres intracellulaires, nous indique par ailleurs que plus les LNCs s'éloignent de la membrane cellulaire, plus rapport Rouge Nile /BodiPY PC est en faveur du Rouge Nile. Il nous est alors possible de formuler l'hypothèse suivante : les LNCs seraient modifiées par ajout progressif dans la cellule de phospholipides

cellulaires, conduisant à une réduction progressive de la taille du cœur de triglycéride. Ainsi le cœur de triglyceride pourrait être répartie dans plusieurs petites particules ayant un cœur de triglycéride avec du Rouge Nile stabilisés par beaucoup de phospholipides, expliquant l'augmentation de la contribution NR2, représentant le Rouge Nile dans un environnement de phospholipide.

Discussion générale

Ce travail de thèse, nous a permis d'évaluer plusieurs paramètres influençant le franchissement des barrières biologiques par trois types différents de nanovecteurs (PLGA-NPs, NPSs, LNCs). Il nous a également permis de mettre en place et de valider plusieurs outils et méthodes pour l'évaluation du comportement cellulaire des nanovecteurs. Bien que les trois types de nanovecteurs n'aient pas encore été testés sur l'ensemble des différentes barrières biologiques présentées, il est malgré tout déjà possible de dégager quelques enseignements.

A. L'accès aux cellules cibles dans le système nerveux central

Concernant le franchissement des barrières biologiques liées à une administration intraveineuse des nanovecteurs, pris dans leur ensemble, les travaux présentés dans le chapitre n°1, ainsi que ceux sur les LNCs effectués par A.Vonarbourg *et. al* et A.Beduneau *et. al*, ont permis de tester l'influence de trois méthodes sur l'inhibition de l'activation des protéines du complément (Beduneau et al. 2006, Vonarbourg et al. 2006b).

Premièrement, les études précédentes sur les LNCs avaient montré qu'elles pouvaient empêcher grâce à leurs PEG, l'adsorption des protéines du complément, par répulsion stérique. A.Vonarbourg *et. al* avaient également montré que plus la taille des LNCs augmentait plus elles étaient activatrices des protéines du complément (20<50<100nm) (Vonarbourg et al. 2006b) et A.Beduneau *et. al.* que cette activation pouvait être encore plus inhibée par l'utilisation à la surface des LNCs de surfactant non ionique ayant une longueur de PEG plus grande (stéarate de PEG 1500) (Beduneau et al. 2006).

Deuxièmement, nos études sur les PLGA-NPs ont montré que l'adsorption de protéines à leur surface pouvait également diminuer cette activation dans le cas de la BSA, alors que la Transferrine augmentait cette activation.

Troisièmement, nos travaux sur les NPSs ont montré que le chargement interne de BSA ou de DPPG diminue aussi cette activation, mais sans changer la surface des NPSs.

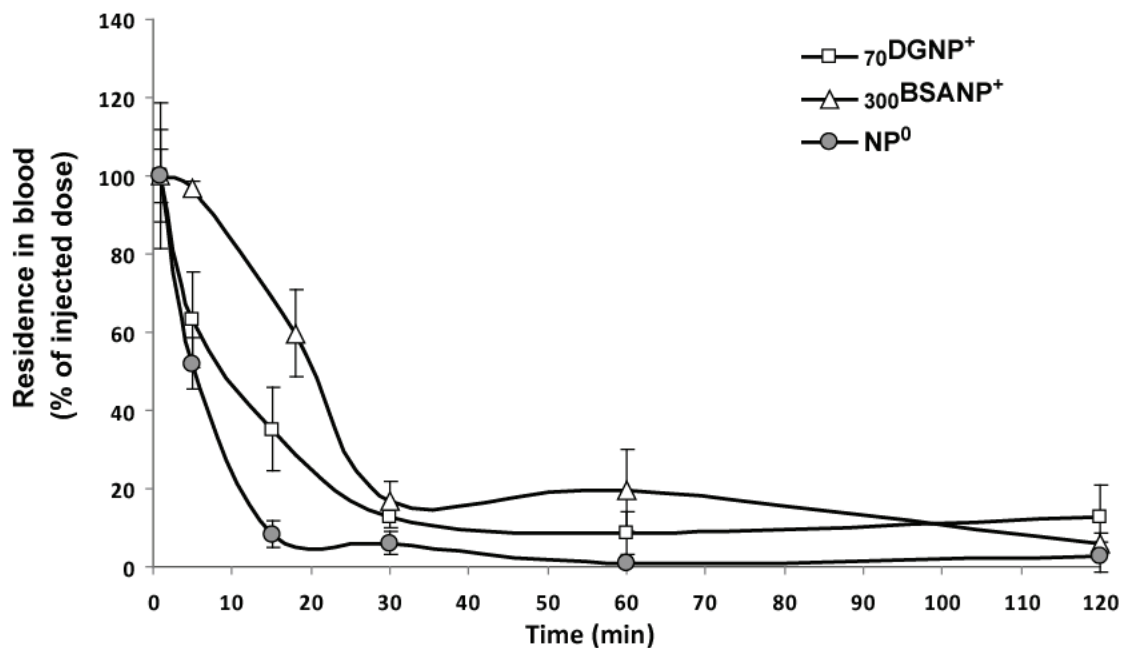


Figure 1. Résidence plasmatique des NP⁰ (●) (n=5), 70DGNP⁺ (□) (n=6), 300BSANP⁺ (Δ) (n=6), marquées à la fluorescéine, chez la souris après injection intraveineuse dans la queue. Les résultats sont exprimés en % de la dose injectée.

La résidence plasmatique de ces trois types de nanovecteurs a également été évaluée, par Ballot *et al.* pour les LNCs de 50nm (Ballot *et al.* 2006), dans le chapitre 1 pour les PLGA-NPs et Figure 1 pour les NPSs. En raison du niveau élevé de l'activation des protéines du complément observé pour les NPSs cationiques et de la toxicité reconnue des nanovecteurs cationiques administrés par voie intraveineuse (Tousignant *et al.* 2000), les NPSs cationiques n'ont pas été testées *in vivo*. Alors que les NPSs chargées en BSA ou en phospholipides anioniques, qui gardent leurs charges de surface cationiques, ont été testées car elles n'activaient plus les protéines du complément. Ces trois méthodes, diminuant l'activation du

complément, ont également montré *in vivo* leur efficacité en prolongeant le temps de résidence plasmatique de ces nanovecteurs.

Concernant l'accès au parenchyme cérébral, les études des LNCs ont déjà montré que leurs surfaces greffées d'anticorps dirigés contre le récepteur de la transferrine augmentaient leur distribution dans le cerveau lors d'une administration intraveineuse (Beduneau et al. 2007). Cependant les LNCs n'ont pas encore été évaluées quant à leur capacité de franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE), contrairement aux NPSs et aux PLGA-NPs. En effet J.Chang *et al.* et J.Jallouli *et al.* ont montré que ces nanovecteurs pouvaient être internalisées par les cellules endothéliales de la BHE (Chang et al. 2009, Jallouli et al. 2007). J.Chang *et al.* ont même montré que l'adsorption de Tf à la surface des PLGA-NPs augmentait d'un facteur 20 l'endocytose de ces nanovecteurs. Ces résultats ainsi que ceux sur la résidence plasmatique de ces nanovecteurs montrent bien l'intérêt d'utiliser la Tf à la surface de ces nanoparticules, puisqu'elle permet d'augmenter leur temps de résidence plasmatique et devrait permettre en même temps un ciblage actif des cellules endothéliales de la BHE. En revanche, seules les LNCs ont été évaluées pour la voie locorégionale utilisant la CED. En effet S.Vinchon-Petit *et al.* ont testé cette administration pour les LNCs et ont montré que le recourt à la CED permettait une augmentation significative du volume de distribution des LNCs (Vinchon-Petit et al. 2009). Cette administration a déjà permis d'administrer des molécules radio-pharmaceutiquement actives chargées dans les LNCs pour une radiothérapie interne des glioblastomes, dans un modèle de tumeur 9L chez le rat. Les premiers résultats de cette stratégie ont d'ailleurs été très encourageants, valorisant encore plus cette méthode d'administration. De fait, si le ciblage passif peut devenir une réalité dans le SNC, la possibilité de le combiner à une infusion locale par CED demeure intéressante. Il est alors possible d'imaginer un traitement du glioblastome en deux phases, commençant par

une implantation locale de nanovecteurs d'agents anticancéreux au cours de l'exérèse chirurgicale, puis par injection périphérique post-opératoire.

B. L'accès au site d'action moléculaire dans les cellules F98

Concernant le franchissement des barrières biologiques érigées par les cellules F98, prises dans leur ensemble, les travaux présentés dans le chapitre 1 et 2 ont permis d'évaluer les NPSs, les PLGA-NPs, les LNCs, ainsi que leurs modifications présentées précédemment, sur leur interactions avec les cellules F98 et l'effet de leurs modifications sur ces interactions.

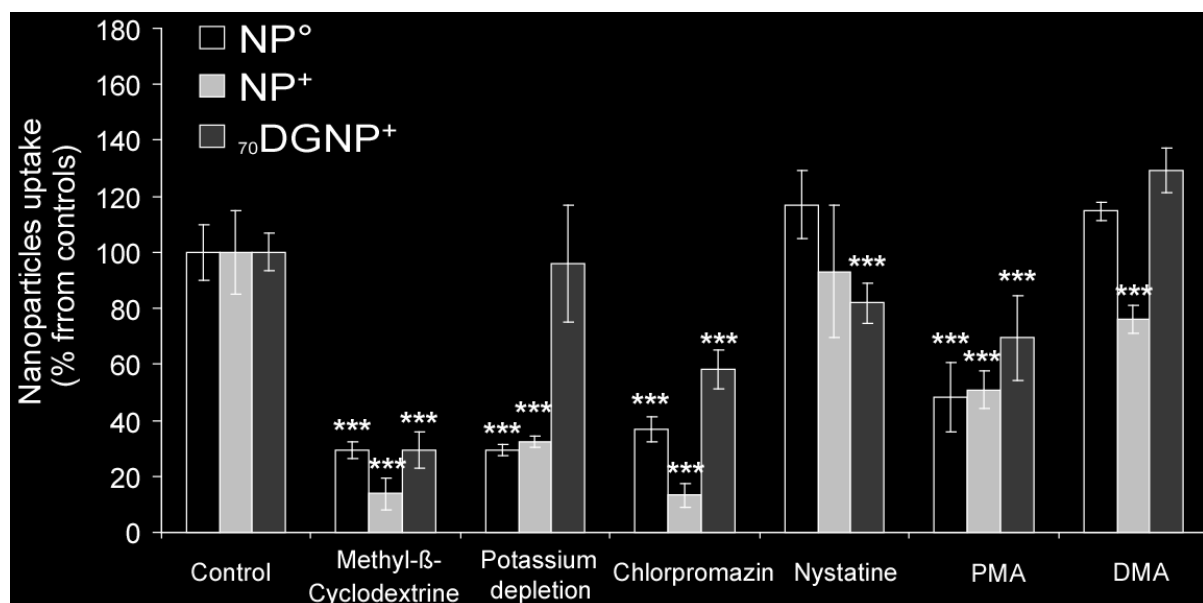


Figure 2. Identification des mécanismes d'endocytose impliqués dans l'internalisation des NPSs par les cellules F98, après deux heures d'incubation à 37°C ; *p < 0.05, ***p < 0.001.

Ces trois types de nanovecteurs rentrent dans les cellules F98 en utilisant des voies d'endocytoses toutes dépendantes du cholestérol. Les LNCs sont internalisés majoritairement par une voie clathrine- et caveoline-indépendante, mais on a également montré que le paramètre de taille influençait fortement leur internalisation. Ainsi pour une même

composition, ce sont les plus petites LNCs (20nm) qui entrent en plus grand nombre. Les NPSs ont montré qu'elles entraient majoritairement par une voie clathrine dépendante (figure 2), comme les PLGA-NPs. Il semble que ce soit la composition native des nanovecteurs qui influence majoritairement le choix de la voie d'endocytose utilisée pour entrer, puisque les modifications présentées ici de ces nanovecteurs ne semblent modifier que faiblement leur mode d'internalisation. En revanche ces modifications changent quantitativement cette internalisation, comme le montre l'entrée plus forte des Blank-NPs de PLGA, démontrant un comportement cellulaire influencé par ces modifications. Dans le mesure où les nanovecteurs utilisés (Tf mise à part), n'ont pas de site de reconnaissance connu à la surface des cellules et qu'il utilisent pourtant des voies d'endocytoses spécifiques, souvent associées à des récepteurs, il est probable que leur association à des éléments matriciels ou membranaires existe. La caractérisation de l'affinité (interactions électrostatiques ou hydrophobes) entre ces vecteurs et par exemple des protéines de la matrice extracellulaire ou des héparanes sulfates protéoglycanes peut s'avérer pertinente (Vasir and Labhasetwar 2008). Inversement le fait que les endocytoses spécifiques puissent, comme par exemple la voie des clathrine (Saffarian et al. 2009), impliquer des plaques et non des vésicules, peut également expliquer une endocytose non spécifique de particules de tailles variées.

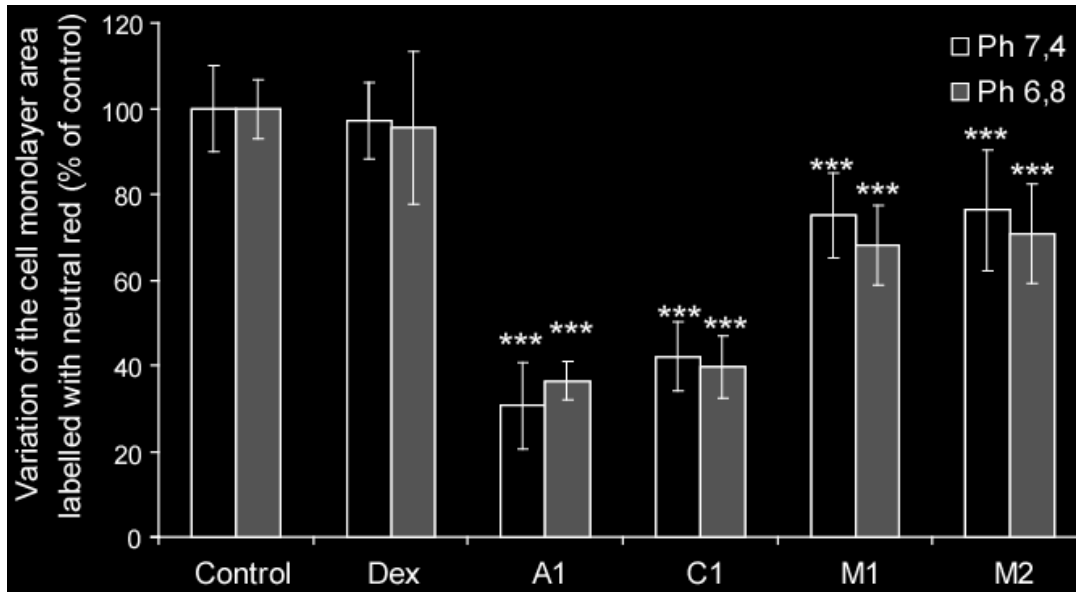


Figure 3. Etude de l'intégrité des lysosomes par test du rouge neutre. La variation du marquage rouge neutre d'une monocouche de cellule F98 selon les différents traitements, exprimée en % des témoins non traités. Control : milieu sans nanovecteur, Dex : milieu avec du dextran de 70kDa, A1 : Bafilomycine, CC : concanamycin-C, M1 : micelles pH sensibles de type 1 ; M2 : micelles pH sensibles de type 2 ; Dunnett: *** p < 0,001.

Pour l'instant seul le comportement intracellulaire des LNCs a été étudié laissant apparaître plusieurs propriétés intrinsèques des LNCs. Il a ainsi été montré que les LNCs passaient dans l'endosome précoce, mais qu'elles n'étaient orientées que très faiblement vers les lysosomes. E.Garcion *et. al.* ont également montré que les LNCs étaient capables d'inhiber l'efflux de molécules provoqué par des pompes d'efflux (Garcion et al. 2006). Il a également été démontré que les LNCs modifiaient l'intégrité des lysosomes et que cette propriété était influencée par la taille des LNCs. Cette capacité a d'ailleurs été retrouvée chez des micelles pH sensibles testées en collaboration avec Mme la Pr Christine Jérôme et M. Sébastien Cajot de l'Université de Liège (Figure 3). Ces observations soulignent la pertinence de tels vecteurs pour administrer des molécules sensibles à la dégradation lysosomale. Ils soulignent l'importance de préserver la surface de ces vecteurs et notamment les taux de surfactant apportés par les LNCs.

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis de commencer une évaluation globale des différents nanovecteurs synthétisés et des facteurs influençant leurs modifications. Nous avons cherché à évaluer l'impact de ces modifications sur leurs aptitudes à franchir les différentes barrières biologiques. Une meilleure compréhension de ces interactions permettra en effet d'améliorer le potentiel thérapeutique et de fixer leurs limites d'utilisation. Ainsi les nanovecteurs pourront accroître l'efficacité, la spécificité et la sécurité biologique des principes actifs qu'ils véhiculent ; notamment dans le cadre d'une thérapie contre le glioblastome sur lequel nous avons centré plus particulièrement notre recherche expérimentale. Mais des études comparatives pour un même principe actif administré au travers de ces différents nanovecteurs dans un contexte donné, incluant la biodisponibilité de la drogue et son efficacité, seront nécessaires pour parfaire le rationnel entre le choix du nanovecteur et l'application recherchée.

Annexes

Publication annexe n°1 :

« Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro »



Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro

Jallouli Youssef, Paillard Archibald, Chang Jiang, Sevin Emmanuel, Betbeder Didier*

Blood Brain Barrier Laboratory, EA 2465, IMPRT, IFR 114, Faculté des Sciences Jean Perrin, Université d'Artois, 62307 Lens, France

Received 15 February 2007; received in revised form 15 May 2007; accepted 6 June 2007

Abstract

The aim of these studies was to evaluate the binding, uptake and transcytosis of 60 nm porous nanoparticles (NPs) that differed in their surface charge and inner composition on the blood–brain barrier (BBB). They were prepared from maltodextrins derived with or without a cationic ligand. In the cationic NPs an anionic lipid was inserted in their core to give DPPG-NPs. The data showed that at 4 °C the three NPs bind in different areas on endothelial cells: cationic NPs were found mainly around the paracellular area, while neutral NPs were mainly on the cell surface and DPPG-NPs binding was found at both paracellular areas and on the surface of the cells. At 37 °C neutral and cationic NPs had similar degrees of binding and uptake and were transcytosed. Filipin treatment increased their binding and uptake suggesting that sterols are implied in their efflux. Neutral NPs transcytosis was also inhibited by filipin. This inhibition shows that neutral NPs, like LDL in this model, use the caveolae pathway. Neutral and cationic 60 nm porous NPs are potential candidates for drug delivery to the brain.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nanoparticles; Blood–brain barrier; Binding and uptake; Transcytosis

1. Introduction

Drug delivery to the central nervous system (CNS) is one of the most challenging fields of research and development for pharmaceutical and biotechnology industries. Most of hydrophilic therapeutic agents, such as antibiotics, anticancer agents, and almost all newly developed neuropeptides do not cross the blood–brain barrier (BBB) after systemic administration (Pardridge, 2003). The blood–brain barrier (BBB) is composed of specific structures created by brain capillary endothelial cells and sheathing by astrocytic endfeet through the basement membrane, which maintains homeostasis of central nervous system by its specific properties. BBB differs from peripheral capillaries because it is influenced by surrounding

neurons and astrocytes (Rubbin and Staddon, 1999). As a result brain capillary endothelial cells are characterized by narrow tight junctions, low pinocytotic activity and high metabolic activity, little paracellular and no transcellular transport of high molecular compounds. Therefore research of CNS delivery of candidate drugs must be placed more emphasis on with BBB drug targeting technology. The use of nanocarriers, such as liposomes or polymeric nanoparticles may be advantageous over the current strategies (Tiwari and Amiji, 2006). These nanocarriers not only mask BBB limiting characteristics of therapeutic drugs molecule, but may also protect drugs from chemical/enzymatic degradation. Reduction of toxicity to peripheral organs can also be achieved with these nanocarriers. However when these nanoparticles are injected in the blood, they are quickly covered by opsonins which allows macrophages of the mononuclear phagocytic system (MPS) to easily recognize and remove these drug delivery devices before they can perform their designed therapeutic function. To avoid opsonisation nanoparticles can be covered by hydrophilic polymers such as PEG and specific ligands can be attached for brain targeting (Owens and Peppas, 2006).

Promising brain delivery results were obtained with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and it was shown that

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; BCECs, brain capillary endothelial cells; DiI, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanate perchlorate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DPPG, dipalmitoyl phosphatidyl glycerol; FITC, fluorescein iso thiocyanate; NPs, nanoparticles; Pe, endothelial permeability coefficient; PBS-CMF, phosphate buffered saline calcium magnesium free; RH, Ringer–Hepes

* Corresponding author. Tel.: +33 3 21 79 17 08; fax: +33 3 21 79 17 36.

E-mail address: dbetbeder@aol.com (B. Didier).

these nanoparticles cross the BBB both in vitro and in vivo. Their ability to cross the BBB was linked to apolipoprotein binding of nanoparticles after i.v. administration and not to toxicity induced-tight junction aperture (Alyaudtin et al., 2001; Kreuter et al., 2002; Kim et al., 2007; Petri et al., 2007;). To investigate the mechanisms of BBB transport we developed an in vitro model that closely mimics in vivo conditions (Dehouck et al., 1990). It consists of a co-culture of brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. In this model and other models made of brain capillary endothelial cells the transcytosis of natural nanoparticles, such as LDL, HDL and macromolecules such as transferrin and lactoferrin, was found occurs through a caveolin-dependent pathway (Dehouck et al., 1997; Fenart et al., 2003; Balazs et al., 2004). To develop rational targeting strategies using NPs It is important to fully understand the binding and uptake mechanisms inducing their endocytosis and potential transcytosis. In a previous study we showed that NPs surface modification could strongly modify their transcytosis (Fenart et al., 1999).

In this study we evaluated the binding and uptake of neutral and cationic porous 60 nm NPs as potential drug carriers to cross the BBB. In particular the influence of the charge (cationic or neutral) and of the insertion of phospholipids in the core of cationic NPs was examined.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Maltodextrin purchased from Roquette (France), [^{14}C]sucrose (677 mCi/mmol) was obtained from Amersham Laboratories (Les Ulis, France), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG) from lipoid (Germany), 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl]amino) fluorescein, 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl]amino) rhodamin, filipin, Albumin (bovine serum albumin) and 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanate perchlorate (DiI) from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO), 1-chloro-2,3-epoxypropan (epichlorhydrin) and glycidyltrimethylammonium chloride (hydroxycholine) from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). Nanosep 30K omega filters were obtained from Pall Corporation.

Bovine brain capillary endothelial cells (BCECs) were isolated and characterized as described by Meresse et al. (1989).

Rat astrocytes. Primary cultures of mixed astrocytes were obtained as described (Booher and Sensenbrenner, 1972).

2.2. Preparation, labeling and characterization of nanoparticles

Polysaccharide particles were prepared from US Pharmacopoeia maltodextrin as described previously (Major et al., 1997; Loiseau et al., 2002). Briefly, 100 g of maltodextrin was dissolved in 2 N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Addition to the crude mixture of 1-chloro-2,3-epoxypropane (epichlorhydrin), or of a mixture of epichlorhydrin and glycidyltrimethylammonium chloride (hydroxycholine, cationic ligand) yielded neutral and cationic

polysaccharide gels, respectively. The gels were then neutralised with acetic acid and sheared under high pressure in a Minilab homogenizer (Rannie; APV Baker, Evreux, France). The 60 nm neutral and cationic polysaccharide nanoparticles obtained were ultra-filtered on an SGI Hi-flow system (hollow fiber module: 30 UFIB/1 S.6/40 kDa; Setric Génie Industriel, Toulouse, France) to remove low-molecular weight reagents and salts.

Covalent labeling of the polysaccharidic core with fluorescein or rhodamin was achieved by covalently binding either fluorescein isothiocyanate or rhodamin isothiocyanate to the polysaccharidic core (Prieur et al., 1996). These labeled particles were washed and purified by ultrafiltration on an SGI Hi-flow system (30UFIB/1S.6/40 kDa) with 1 M NaCl and with demineralized water until no free marker was detected in the ultra-filtrate. The labeled polysaccharidic particles (1 mg/ml) were stored in sterile tubes after filtration through a 0.2 μm filter. Due to poor fluorescence stability rhodamin labeling was used for neutral NPs for fluorescence imaging only. Fluorescein labeled NPs were used for quantitative analysis. The binding of fluorescein to the NPs was covalent and no release was observed at 37 °C after 4 h incubation in cellular medium.

Cationic nanoparticles in which anionic phospholipids were incorporated in their core (DPPG-NPs), were prepared by mixing polysaccharide nanoparticles (Loiseau et al., 2002), DPPG and DiI at a temperature above the gel-to-liquid phase transition temperature of the phospholipid (Woodle and Papahadjopoulos, 1989). Polysaccharide and phospholipid concentrations were 10 and 7 mg/ml, respectively. The mean diameter of NPs was determined by laser light scattering with the N4 MD Coulter nanoparticle analyzer (Coultronics, Margency, France). The zeta-potential of nanoparticles were determined by photon correlation spectroscopy (ZetaSizer II, Malvern Instruments) in 15 mM NaCl.

2.3. Cell culture

2.3.1. Preparation of filters for coculture

Culture plate inserts (Millicell PC 3 μm , 30 mm diameter; Millipore, SAS, Molsheim, France) were coated on the upper side with 150 μl of a 2 mg/ml solution of rat tail collagen containing 10-fold concentrated DMEM plus 0.3 M NaOH. The coated inserts were dried for 1 h at 37 °C and were rinsed twice with water and once with PBS-CMF before being placed in complete medium.

2.3.2. Brain capillaries endothelial cells

The cell culture was performed according to (Dehouck et al., 1992), briefly bovine BCECs were isolated and characterized as described by Meresse et al. (1989). The endothelial cells were cultured in the presence of DMEM supplemented with 10% (v/v) heat inactivated calf serum and 10% (v/v) horse serum (Invitrogen), 2 mM glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin, and basic fibroblast growth factor (1 ng/ml, added every other day).

2.3.3. Coculture of BCECs and glial cells

Primary cultures of mixed glial cells composed of 60% astrocytes, 20% oligodendrocytes, and 20% microglia were pre-

pared from newborn rat cerebral cortex. After removing the meninges, the brain tissue was forced gently through a nylon sieve, as described by Booher and Sensenbrenner (1972). Glial cells were plated on six multiwell dishes at a concentration of 1.2×10^5 cells/ml in 2 ml of DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Invitrogen), and the medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of glial cells were stabilized and used for coculture. Coated filters were set in six multiwell dishes containing glial cells. Endothelial cells were plated on their upper side in 1.5 ml of medium at a concentration of 4×10^5 cells/ml. The coculture medium was the same as that for BCECs. Under these conditions, BCECs formed a confluent monolayer after 7 days. Experiments were performed 5 days after confluence.

2.4. Evaluation of the ability of the nanoparticles to cross collagen-coated filters

The experiments were performed at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. The coated inserts were rinsed twice with RH solution and were transferred into six-well plate containing RH solution (2,5 ml in abluminal side). RH solution (1.5 ml) containing 120 µg of NPs labeled with FITC, rhodamine or DiI was placed, at time 0, in the upper compartment (luminal side). At different interval times, inserts were transferred to other wells to minimize the possibility of passage from the lower compartment. For each condition, three inserts without cells were assayed. The quantity of nanoparticles was determined by quantitative fluorescence analysis.

2.5. Binding studies at 4 °C

Prior to binding studies, the luminal and abluminal side of the coculture were washed twice with cold RH solution. Once filters containing endothelial cells were transferred into six-well plate containing RH solution (2.5 ml in abluminal side), RH solution (1.5 ml) containing 120 µg of NPs was placed, at time 0, in the upper compartment (luminal side). The incubations were performed at 4 °C. After 45 min, the cells were washed twice with RH solution followed with twice washing with BSA 2% solution and finally with RH solution twice time at 4 °C. BCECs were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS-CMF at room temperature. The filters and their attached monolayers were mounted on glass microscope slides with Mowiol mountant (Hoechst, Frankfurt, Germany), and the specimens were visualized and photographed with fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

2.6. Binding, uptake and transcytosis of NPs

The binding, uptake and transcytosis experiments were performed at 37 °C in RH buffer. At different intervals times: 120, 180 and 240 min, inserts were transferred to other wells. For each condition, three inserts with BCECs monolayer were assayed. Amounts of NPs fixed and internalized by the endothelial cells were indirectly evaluated by quantitative analysis of fluorescence in the upper compartment. Nanoparticle integrity

in the lower compartment was checked using nanosep filtration. The transcytosis studies were evaluated by quantification of fluorescence in lower compartment. These analysis were performed using a Fluoroskan. Fluorescein or DiI fluorescence excitation and emission spectra wavelengths λ_{ex} and λ_{em} was 485 and 538 nm or 540 and 584 nm, respectively. For each test compound, quantification was obtained from a standard curve. Experiments were performed in triplicate and the data are represented as means \pm S.E.

2.7. Integrity of the BCECs monolayer

Using the same procedure, the integrity of BCECs monolayers was checked by adding [¹⁴C] sucrose in the upper compartment containing the different test nanoparticles. Amounts of radiotracers in the lower compartment were measured in a liquid scintillation counter (Wallac 14110; Pharmacia, Piscataway, NJ). The endothelial permeability coefficient (Pe in cm/min) was calculated as previously described (Dehouck et al., 1992). Only experiment values where Pe of sucrose was $< 1 \times 10^{-3}$ cm/min was taken into account.

2.8. Treatment with filipin

The BCECs monolayers were pretreated or not with 10 µg/ml of filipin for 15 min at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. They were washed with RH and 120 µg of nanoparticles was added to the cells and the transport studies analysed as described above. As control transferrin-FITC transcytosis was evaluated in presence or not of filipin in order to check the cellular differentiation (Boveri et al., 2005).

2.9. Statistical analysis

The means and standard errors for all values were calculated. For simple comparisons a one-way analysis of variance (ANOVA). The difference was considered as significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of nanoparticles

Three types of porous NPs constructed from a maltodextrin backbone were prepared. The average size and polydispersity of these NPs was similar (Table 1). There were no differences in

Table 1
Particle size and zeta potential of NPs (n = 3)

Nanoparticles	Mean size (mean \pm S.D., nm)	p.i.	Zeta potential (mV)
Cationics NPs	60 \pm 13.1	0.21	+25 \pm 1.5
Cationics DPPP-G-NPs	61 \pm 12.3	0.25	+24 \pm 1.1
Neutrals NPs	59 \pm 22.7	0.28	0 \pm 1

Zeta potential was measured in NaCl solution (15 mM). p.i.: polydispersity index.

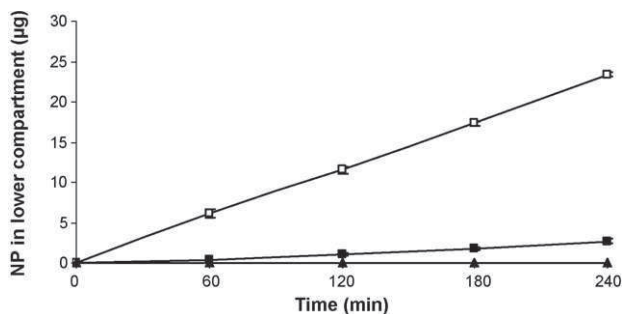


Fig. 1. Evaluation of the ability of NPs to cross collagen-coated filters. Neutral NPs (square and open symbols), cationic NPs (square and closed symbols) or DPPG-NPs (triangular closed symbols). Each point was performed in triplicate and the data are represented as means \pm S.E. ($n = 3$).

particle size and zeta potential between cationic NPs and cationic DPPG-NPs which suggest that DPPG incorporates into the core of cationic NPs. The porosity of these NPs allows the insertion of macromolecules within the core without modifying their surface before reaching saturation. DPPG-NPs can be used as reservoir for lipophilic drugs (Loiseau et al., 2002). These colloids are highly hydrophilic and very stable in solution in terms of size and chemical composition (>12 months).

3.2. Ability of NPs to cross collagen-coated filters

In order to evaluate the transcytosis of the NPs we tested whether they can cross collagen-coated filters without cells. Fig. 1 shows that neutral nanoparticles diffuse from the upper to the lower compartment faster than cationic NPs, suggesting that neutral NPs have a lower affinity to collagen-coated filters. DPPG-NPs do not diffuse through the collagen-coated filters. These results show that the ability of the NPs to cross collagen-coated filters is dependent on the surface charge and inner composition of each type of nanoparticles.

3.3. Integrity of the BCECs monolayer in the presence of NPs

The integrity of BCECs endothelial cells was evaluated using ^{14}C -labelled sucrose as a paracellular marker. The Pe of sucrose, in the presence of neutral, cationic or DPPG-NPs, was $< 1 \times 10^{-3}$ cm/min, for each experimental conditions (Fig. 2). These results show that the integrity of the BBB was preserved during the experiments. In these studies only experiments where the sucrose Pe was $< 1 \times 10^{-3}$ cm/min were taken into account.

3.4. Binding of NPs to BCECs

The binding of NPs to endothelial cells was evaluated at 4°C using fluorescence microscopy (Fig. 3). Neutral NPs were mainly observed on the cell surface (Fig. 3A), while cationic NPs were mainly found in the paracellular area (Fig. 3B). DPPG-NPs had an intermediate behavior as they associated with both the surface and the paracellular area of endothelial cells (Fig. 3C). These results suggest that inner composition

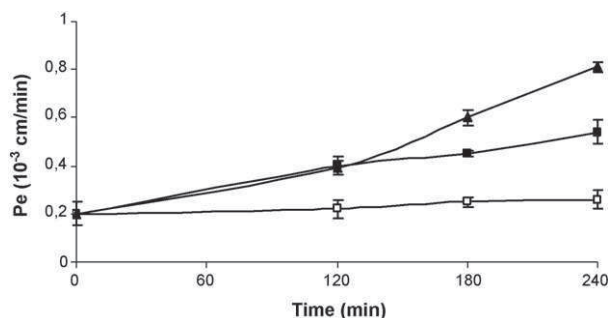


Fig. 2. BBB permeability studies of ^{14}C -labelled sucrose in vitro in the presence of neutral NPs (square open symbols), cationic NPs (square closed symbols) or DPPG-NPs (triangular closed symbols); $n = 3$. The mean scores were statistically significant when evaluated using one-way ANOVA ($p < 0.001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control ($n = 3$ BCECs monolayers/treatment; Dunnett test).

and surface charge of these porous NPs play a key role in their binding.

3.5. Binding and uptake of NPs

Binding and uptake was evaluated from 120 min to 240 min at 37°C using quantitative fluorescence (Fig. 4). We observed that the kinetics of binding and uptake of cationic and neutral NPs slightly decreased, while DPPG-NPs binding and uptake increased (Fig. 4). The decrease of binding and uptake of cationic and neutral NPs could be explained by their efflux to the luminal side (Zhang et al., 2006). To elucidate whether the uptake was caveolae-dependent we treated the cells with filipin, a sterol-binding agent, known to interfere with the caveolae-dependent pathway (Schnitzer et al., 1994). The increase in the binding and uptake of neutral and cationic NPs observed could suggest that their efflux is sterol-dependent (Fig. 5).

3.6. Evaluation of transcytosis of neutral and cationic NPs

To investigate if NPs cross the BBB the experiments were performed at 37°C on cells adsorbed on collagen-coated filters. The kinetics of arrival of NPs in the abluminal chamber were analysed. Due to high collagen binding of DPPG-NPs only neutral and cationic NPs were evaluated. Fig. 6 shows the transcytosis of the NPs in presence or absence of filipin (Schnitzer et al., 1994). Nanosep filtration of the transcytosed NPs confirmed that they were not degraded. Neutral and cationic NPs cross the BBB using transcytosis as no paracellular aperture was observed (Fig. 2). Transcytosis of the neutral NPs (Fig. 6A) was higher than cationic NPs (Fig. 6B). Filipin inhibits neutral NPs transcytosis (Fig. 6A) but not cationic NPs (Fig. 6B). As a control, we verified that the transcytosis of transferrin was inhibited by filipin (Fenart and Cecchelli, 2003).

4. Discussion

To evaluate transport through the BBB we developed an in vitro model based on a coculture of brain endothelial and glial cells. This coculture retains all endothelial cell markers and the

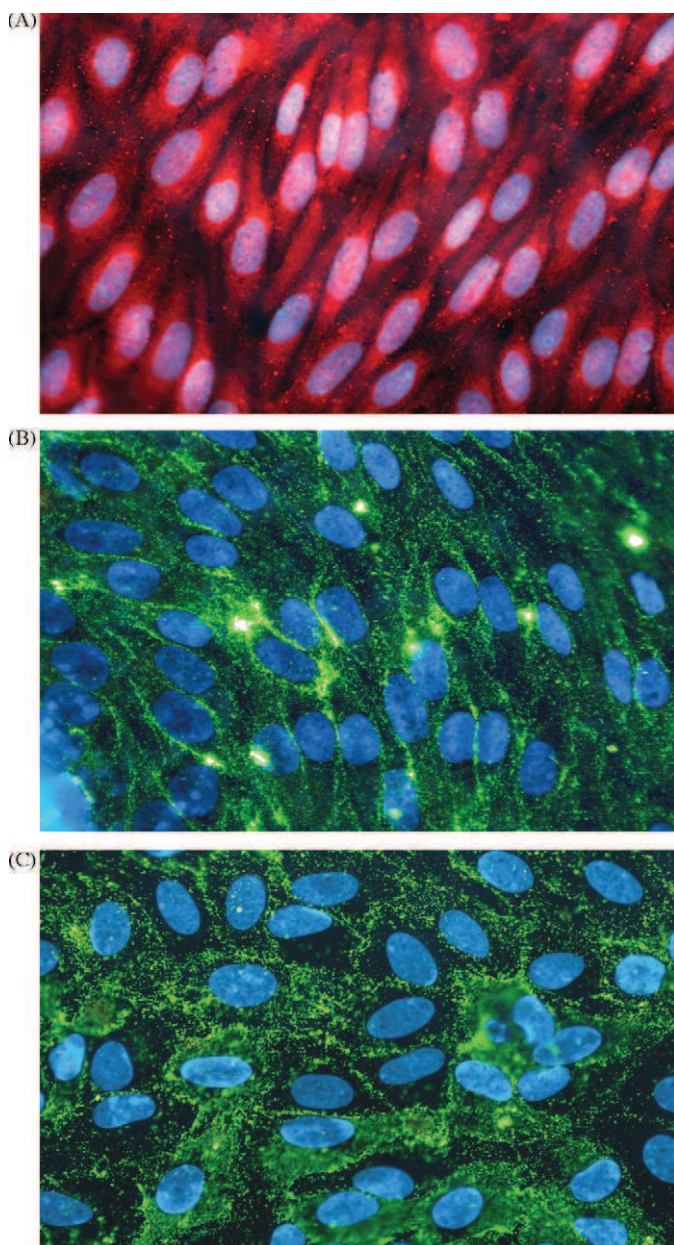


Fig. 3. Evaluation of NPs binding on BBB at 4°C using fluorescence microscopy. Neutral NPs were labelled with rhodamine (A), and cationic NPs (B) and DPPG-NPs (C) were labelled with FITC. The nucleus were labelled with Hoechst.

characteristics of the blood–brain barrier, including tight junctions and gamma-glutamyl transpeptidase activity (Dehouck et al., 1990). A good *in vitro*–*in vivo* correlation of a set of compounds having a wide range of lipid solubility was obtained suggesting that this model is relevant (Dehouck et al., 1992). The coculture of BCECs and glial cells induced low sucrose Pe and reflected the high degree of differentiation of the co-cultured cells (Boveri et al., 2005). One of the major problems of *in vitro* model studies is the loss of tight junction properties and differentiation due to cellular culture conditions or potential toxicities of the compounds tested. This tight junction rupture can happen within minutes after incubation with compounds and this was the reason why we followed the paracellular pathways of every co-

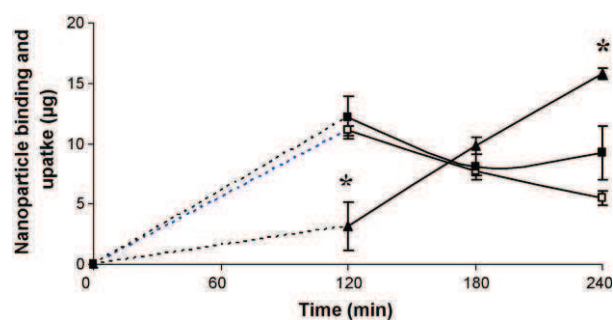


Fig. 4. Kinetics of binding and uptake of neutral NPs (square open symbols), cationic NPs (square closed symbols) or DPPG-NPs (triangular closed symbols) at 37°C. The mean scores were statistically significant when evaluated using one-way ANOVA ($p < 0.001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control ($n = 3$ BCECs monolayers/treatment; Dunnett test).

culture during our studies using sucrose as a paracellular marker (Fig. 2).

Transcytosis of nanoparticles through the blood–brain barrier is a challenge for developing new drug delivery systems to target the brain. The results of the studies presented herein demonstrate that binding, uptake and transcytosis of 60 nm porous

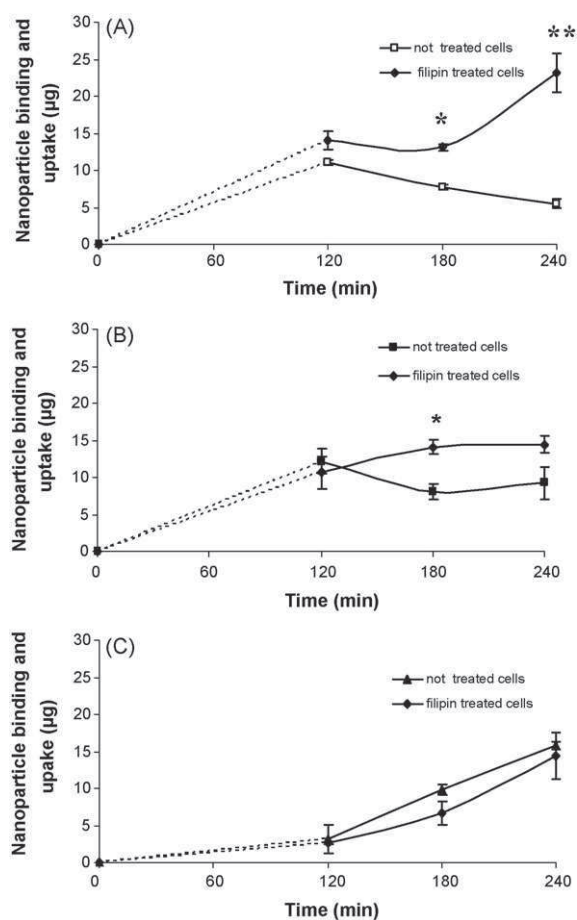


Fig. 5. Filipin's effect on the kinetics of binding and uptake of neutral NPs (Fig. 6A), cationic NPs (Fig. 6B) or DPPG-NPs (Fig. 6C) by BBB at 37°C. The mean scores were statistically significant when evaluated using one-way ANOVA ($p < 0.001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control ($n = 3$ BCECs monolayers/treatment; Dunnett test).

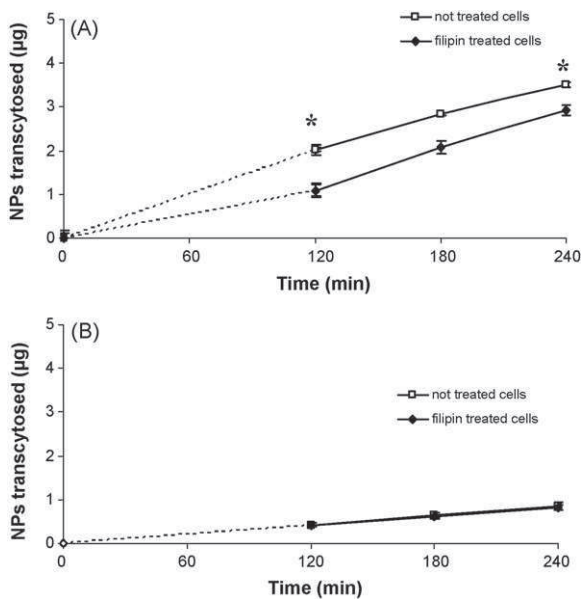


Fig. 6. Transport of 60 nm porous nanoparticles across BCECs monolayer. Untreated or BCECs pretreated or not with 10 µg/ml filipin were incubated with neutral NPs (A) or cationic NPs (B) at 37 °C for different times, respectively; $n=3$. The mean scores were significant using one-way ANOVA ($p<0.001$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. control ($n=3$ BCEC monolayers/treatment; Dunnett test).

nanoparticles is dependent on their charge and inner composition. Neutral nanoparticles cross the cells using the caveolae pathway which is used by natural nanoparticles such as LDL and HDL in porcine and bovine models of BBB (Dehouck et al., 1997; Balazs et al., 2004). We also observed that the binding at 4 °C of these nanoparticles was homogenous on the surface of cells (Fig. 3A). The mechanisms allowing these particles to use the caveolae pathway is not understood. As these NPs are made of glucose we propose that glucose could allow their targeting to the brain as was observed in vivo for niosomes (Dufes et al., 2004). Glucose NPs are theoretically good candidates for targeting the brain. Indeed, glucose is the main source of energy in the brain and corresponds to almost 30% of the total glucose consumption in the body (Dick et al., 1984). This suggests that the glucose transportor (GLUT-1) might be an efficient target for the binding of NPs to the luminal side of endothelial cells (Cornford and Hyman, 2005). Then particles are endocytosed and taken through the caveolae pathway by an unknown mechanism (adsorptive endocytosis?). There is also a wide variety of membrane bound lectins that recognize sugars present on different glycoconjugates. These lectins might also be implicated in the adsorption and endocytosis of neutral NPs (Banks and Kastin, 1989; Weigel and Yik, 2002). Filipin increased the binding and uptake of neutral NPs suggesting that cholesterol rich rafts are implicated in their efflux. Further studies are necessary to fully understand the mechanisms implied.

Cationic NPs were found to bind at 4 °C to the paracellular area (Fig. 3A), which is an area that might be rich in anionic sites (Nagy et al., 1983). Anionic sites located on the luminal surface of the plasmalemma of the ECs mainly exist due to sialic acid residues of acidic glycoproteins (Vorbrod, 1989). The binding

of these nanoparticles is partially followed by their transcytosis via a process independent of the sterol-dependent pathway (Fig. 6B). Finally the insertion of DPPG in the core of cationic nanoparticles dramatically changed their behaviour in terms of collagen and cellular binding and uptake (Table 1, Figs. 1 and 4). These particles contrary to cationic NPs were also found not to activate complement activation (manuscript under preparation) and these results clearly show that the lipids inside their cores modify the properties of these porous NPs. However their strong affinity for collagen may limit the use of these particles in targeting the brain endothelial cell basement membrane from where drugs could diffuse to the brain.

5. Conclusion

We evaluated three porous NPs having the same internal backbone and size but differing by their surface an/or inner composition to cross BBB. We observed that even small modifications of these NPs such as inner composition dramatically change their behaviour in the presence of brain endothelial cells. DPPG-NPs transcytosis could not be evaluated due to high binding to collagen-coated filters. Neutral and cationic NPs are transcytosed and are potential candidates to deliver drugs to the brain.

Acknowledgements

We wish to thank Ceva santé animale and la region du Nord-Pas de Calais for financial support. We also wish to thank Pr R. Cecchelli and all the members of the laboratory for their help during the cell culture and for scientific advice, in particular Pr L. Fenart and Pr M.P. Dehouck.

References

- Alyaudin, R.N., Reichel, A., Lobenberg, R., Ramge, P., Kreuter, J., Begley, D.J., 2001. Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood–brain barrier in vivo and in vitro. *J. Drug Target* 9, 209–221.
- Balazs, Z., Panzenboeck, U., Hammer, A., Sovic, A., Quehenberger, O., Malle, E., Sattler, W., 2004. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL associated alpha-tocopherol by an in vitro blood–brain barrier model. *J. Neurochem.* 89, 939–950.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., 1989. Characterization of lectin-mediated brain uptake of HIV-1 GP120. *J. Neurosci. Res.* 54, 522–529.
- Booher, J., Sensenbrenner, M., 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2, 97–105.
- Boveri, M., Berezowski, V., Price, A., Slupek, S., Lenfant, A.M., Benaud, C., Hartung, T., Cecchelli, R., Prieto, P., Dehouck, M.P., 2005. Induction of blood–brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia* 51, 187–198.
- Cornford, E.M., Hyman, S., 2005. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx* 2, 27–43.
- Dehouck, M.P., Joliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Tillement, J.P., 1992. Drug transfer across the blood–brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J. Neurochem.* 58, 1790–1797.
- Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood–brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 54, 1798–1801.

- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R., 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* 138, 877–889.
- Dick, A.P., Harik, S.I., Klip, A., Walker, D.M., 1984. Identification and characterization of the glucose transporter of the blood–brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7233–7237.
- Dufes, C., Gaillard, F., Uchegbu, I.F., Schatzlein, A.G., Olivier, J.C., Muller, J.M., 2004. Glucose-targeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int. J. Pharm.* 285, 77–85.
- Fenart, L., Casanova, A., Dehouck, B., Duhem, C., Slupek, S., Cecchelli, R., Betbeder, D., 1999. Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood–brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 1017–1022.
- Fenart, L., Cecchelli, R., 2003. Protein transport in cerebral endothelium. In *in vitro* transcytosis of transferrin. *Methods Mol. Med.* 89, 277–290.
- Kim, H.R., Gil, S., Andrieux, K., Nicolas, V., Appel, V., Chacun, H., Desmaele, D., Taran, F., Georin, D., Couvreur, P., 2007. Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of Pegylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* (Epub ahead of print).
- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ränge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R., 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood–brain barrier. *J. Drug Target* 10, 317–325.
- Loiseau, P.M., Imbertie, L., Bories, C., Betbeder, D., De Miguel, I., 2002. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1597–1601.
- Major, M., Prieur, E., Tocanne, J.F., Betbeder, D., Sautereau, A.M., 1997. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta* 1327, 32–40.
- Meresse, S., Dehouck, M.P., Delorme, P., Bensaid, M., Tauber, J.P., Delbart, C., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., 1989. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.* 53, 1363–1371.
- Nagy, Z., Peters, H., Huttner, I., 1983. Charge-related alterations of the cerebral endothelium. *Lab. Invest.* 49, 662–671.
- Owens 3rd., D.E., Peppas, N.A., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- Pardridge, W.M., 2003. Blood–brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol. Interv.* 3, 90–105.
- Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Muller, R., Uhl, R., Kreuter, J., Gelperina, S., 2007. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *Contr. Rel.* 117, 51–58.
- Prieur, E., Betbeder, D., Niedergang, F., Major, M., Alcover, A., Davignon, J.L., Davrinche, C., 1996. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4⁺ T-cell clones in vitro. *Vaccine* 14, 511–520.
- Rubbin, L.L., Staddon, J.M., 1999. The cell biology of the blood–brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11–28 (Review).
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J., 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127, 1217–1232.
- Tiwari, S.B., Amiji, M.M., 2006. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 3, 219–232.
- Vorbrodt, A.W., 1989. Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *Neurocytology* 18, 359–368.
- Weigel, P.H., Yik, J.H., 2002. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 341–363.
- Woodle, M.C., Papahadjopoulos, D., 1989. Liposome preparation and size characterization. *Methods Enzymol.* 171, 193–217.
- Zhang, Y., Hu, Z., Ye, M., Pan, Y., Chen, J., Luo, Y., Zhang, Y., He, L., Wang, J., 2006. Effect of poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide) nanoparticles on hepatic cells of mouse: low cytotoxicity, but efflux of the nanoparticles by ATP-binding cassette transporters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 15 (ahead of print).

Publication annexe n°2 :

« In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers
infused into intracranial tumours by convection-
enhanced delivery: distribution and radiosensitisation
efficacy »

In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy

Sandrine Vinchon-Petit · Delphine Jarnet ·
Archibald Paillard · Jean-Pierre Benoit ·
Emmanuel Garcion · Philippe Menei

Received: 26 May 2009 / Accepted: 14 September 2009
© Springer Science+Business Media, LLC. 2009

Abstract The objective of the present study was to investigate the interest of convection-enhanced delivery (CED) for the administration of a nanocarrier-based radiosensitizing chemotherapy in the rat brain. Pursuing on newly developed lipid nanocapsules (LNC) that can be internalised within brain tumour cells, we studied their intracerebral distribution when labelled with fluorescent Nile red (NR). As paclitaxel (Px) represents an interesting radiosensitiser, we also evaluated the potential radiosensitising effects of Px-loaded LNC administered through CED in the 9L intracranial rat glioblastoma model. The distribution study demonstrated that CED injection of NR-loaded LNC (NR-LNC) improved significantly the volume of distribution of NR when matched with simple injection (by about 150 fold). It also reveals that the LNC perfusion of a whole tumour forming area inside the CNS (6 days after implantation of 10^3 9L cells) is achievable through CED injection, whilst preserving the ability of LNC to reach the intracellular space of encountered tumour cells. Having established an animal model of encephalic irradiation close to the clinic (18 Gray in three fractions of six Gray at days 8, 11 and 14 after 9L cell implantation) we proved the

feasibility of the combination of CED for the administration of drug-loaded LNC with external beam therapy. Although a single CED injection of Px-LNC at low Px dose (375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of bodyweight) gave the best median survival (twice that of untreated controls), it underlines the need for optimisation. Hence, the possibility of grafting recognition moieties onto the LNC surface combined to their biocompatibility must be beneficial.

Keywords Nanotechnology · Nanomedicine · Nanoparticle uptake · Brain drug delivery · Paclitaxel bioavailability · Radiochemotherapy

Introduction

The treatment of glioblastoma, a primary malignant tumour of the brain, remains one of the most challenging cancer problems, as no curative treatment has yet been found [1]. Conventional therapeutic procedures focus on surgical resection combined with adjuvant radiochemotherapy. However, despite constant refinements in these techniques, tumour recurrences are common and patients continue to die. So far, the best survival results have been obtained by the use of temozolomide combined with external beam radiotherapy [2]. Hence, most currently-available antiglioma therapies have less-than-optimal usefulness, mainly owing to delivery problems to the tumour, including systemic toxicity and crossing the blood-brain barrier (BBB) [3]. Although curing glioblastoma will likely depend on the discovery of an anticancer entity that will destroy all cancer cells or make them sensitive to destruction, new therapy will also require innovative methods of drug delivery to reach effective doses on infiltrative cancer cells

S. Vinchon-Petit · A. Paillard · J.-P. Benoit · E. Garcion (✉) ·
P. Menei
Inserm U646, Université d'Angers, 10 rue André Boquel,
49100 Angers, France
e-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

P. Menei
Département de Neurochirurgie, CHU, 4 rue Larrey,
49033 Angers, France

D. Jarnet
Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, Centre Paul Papin,
2 rue Moll, 49933 Angers, France

and to reduce side effects. Thus, direct administration into the brain parenchyma of locally implanted drug delivery systems emerges as an interesting alternative to overcome these concerns [4]. It may also present the advantage of preventing drug degradation before it would have reached its expected molecular target in the brain.

Among innovative domains, nanotechnology may provide the opportunity to shape new brain-implantable nano-objects for improved efficacy, specificity and biological safety [5–7]. As such, we have recently developed lipid nanocapsules (LNC) that were shown to increase anticancer hydrophobic drug efficacy while also targeting glioma cell intracellular compartments and improving drug bio-availability through inhibition of multidrug resistance phenomena [8, 9].

Pursuing this work and by considering drug bioavailability issues together with conventional treatments of human brain tumours that systematically involve a radiotherapeutic procedure, the objective of the present study was to evaluate the interest of the intratumoural administration of a new nanomedicine-based radiosensitising chemotherapy. Firstly, since convection-enhanced delivery (CED), which is a novel regional method that allows the distribution of substances throughout the interstitium via positive-pressure infusion, has been shown to enhance the volume of distribution (Vd) of administered compounds [10], we investigated its benefit and relevance for the administration of LNC in the rat brain. Secondly, as Paclitaxel (Px) represents a remarkable radiosensitiser, acting on the G2-M phase of cell division [11], we evaluated the potential radiosensitising effects of Px-loaded LNC administered through CED in the 9L intracranial Fischer rat glioblastoma model.

Materials and methods

Animals

Seventy-four syngeneic F344 Fischer female rats (Charles River, Cléon, France) weighing 150–200 g were used for this study. They were kept in standard animal facilities with free access to food and water. All experiments were conducted under good experimental practices according to the European Commission and to the French Ministry of Agriculture regulations.

Tumour model

9L glioma cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were grown at 5% CO₂ and 37°C in

Dulbecco modified Eagle medium containing glucose, L-glutamine, 10% foetal bovine serum (Biowhittaker, Verviers, Belgium) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). For tumour induction, 9L cells were trypsinised by trypsin/EDTA (Sigma), washed and resuspended at 10³ cells in 10 µl Eagle minimum essential medium (Biowhittaker) before surgical stereotaxic implantation.

Formulation and characterization of the nanocarriers

Fifty nm-diameter LNC (Fig. 1A) were synthesized by using a previously described phase inversion-based process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily fatty phase (triglycerides: Labrafac[®]), a non-ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol[®] HS15) and a lipophilic surfactant (lecithins: Lipoid[®]) [9]. Briefly, Solutol[®] HS15 (external shell), Lipoid[®] (internal shell), Labrafac[®] (lipid core), NaCl and water (846, 75, 1029, 89, 2975 mg, respectively) were mixed and heated under magnetic stirring up to 85°C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85 and 60°C were then carried out and followed by an irreversible shock induced by dilution with 12.5 ml of 0°C deionised water added to the mixture at 70°C.

For fluorescent labelling of LNC, Nile red (NR, Sigma) was used as described previously [12]. Briefly, NR was dissolved in acetone at 1‰ (w/w) and resulting solution incorporated in the triglyceride phase (Labrafac[®]) at 1/10 (w/w) before formulation. A BD FACSAria[™] fluorescent-activated particle sorter and the BD FACSDiva[™] software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were used to determine the efficiency of the LNC labelling.

For the formulation of Px-loaded LNC, 20 mg of Px was first solubilised in a solution of 206 mg ethanol, 206 mg dichloromethane and 10 mg cholesterol. Solutol[®] HS15, Lipoid[®], Labrafac[®], NaCl and water were then added to this solution and the formulation of Px-loaded LNC performed according to the above procedure with the evaporation of dichloromethane and ethanol during the process. The Px encapsulation rate was determined after the separation of LNC from the supernatant using Centrisart C30 microcentrifuge filters (Sartorius, Goettingen, Germany). The measurement of the concentration was carried out in triplicate in the supernatant by HPLC and led to an encapsulation rate of 93.0 ± 3.1% according to the initial amount of drug added.

LNC were analysed for size and charge distribution using a Malvern Zetasizer[®] Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, U.K.). They were diluted 1/100 (v/v) in deionised water in order to assure a convenient scatter intensity on the detector. All

Fig. 1 In vitro characterisation of the uptake of NR-stained LNC by 9L glioma cells. **A** Schematic representation of drug-loaded LNC. **B** Molecular structure of NR. **C** Fluorescent-activated particle sorting of classical blank LNC (2.8% in P1) and NR-stained LNC (69.8% in P1). **D** Flow cytometry analysis of NR uptake by 9L cells after 2 h of incubation (LNC (-), control without LNC; LNC (+), cell treated with NR-LNC)

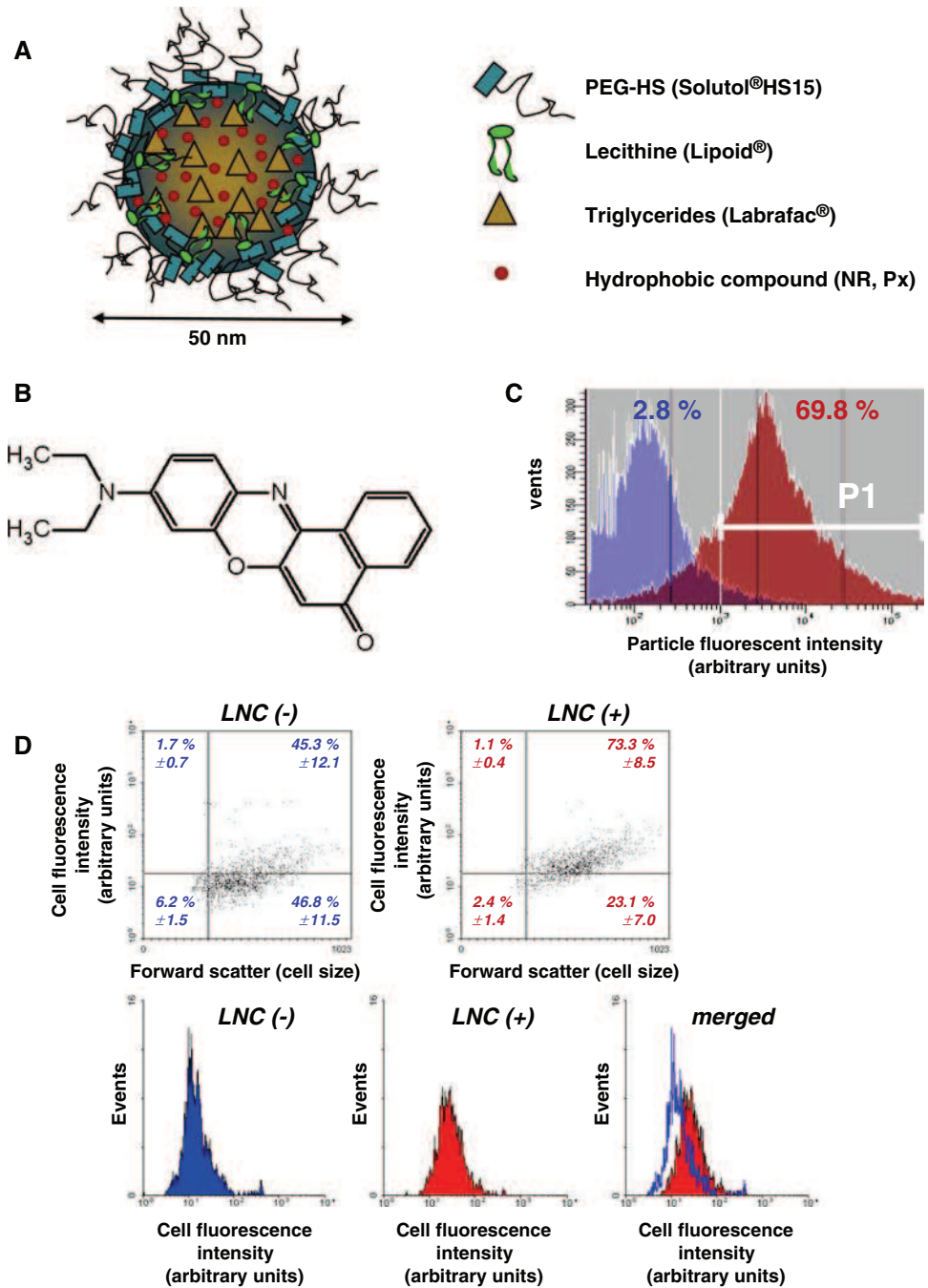


Table 1 LNC physicochemical characteristics

LNC type	Size (nm)	Zeta potential (mV)
Blank-LNC	50.8 ± 0.1	-4.02 ± 0.71
NR-LNC	51.2 ± 2.9	-2.51 ± 0.48
Px-LNC	53.9 ± 0.6	-3.95 ± 0.51

nanocarriers (loaded or not) presented a monomodal particle size distribution around 50 nm with a narrow distribution (polydispersity index < 0.3) (Table 1).

Cellular analysis of Nile red-loaded LNC (NR-LNC) uptake by flow cytometry

A BD FACSCalibur fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest software (BD biosciences) were used as previously described [12]. To discriminate between cell-association and actual internalisation, the removal of attached LNC was carried out by using a solution of acetic acid and NaCl. Extracellular fluorescence was quenched by the addition of Trypan Blue, the non-quenched fraction thus representing internalised NR-LNC [13].

Confocal laser scanning microscopy

Confocal microscopy was performed as previously described [12] and images acquired by using an Olympus Fluoview FU 300 confocal microscope imaging system (Paris, France).

Preparation of Px solutions

Free Px solutions were prepared from a commercial 6 mg/ml solution (Taxol[®], Bristol-board Myers Squibb) to obtain a final concentration of 1.25 mg/ml (identical to the one in Px-LNC).

Surgical procedures

Rats were anaesthetised IP with 10 mg/kg xylazine (Rompun) and 50 mg/kg ketamine (Clorketam) before being placed in a Kopf stereotaxic frame (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). After shaving, disinfection and sagittal incision of the cranial skin, a burr hole was made in the skull at 0.5 mm anterior and 3 mm lateral from the Bregma using a small drill. Suspensions were then injected at 5 mm below the dura in the right striatum according to the Paxinos atlas. The needle was afterwards removed cautiously before the wound was sutured.

CED

CED was carried out using a final volume of 60 μ l. Briefly, the system consisted of a 10 μ l—32 gauges (32G) Hamilton[®] syringe (Harvard Apparatus) or a 500 μ l—29G Omnican[®] 50 syringe (Braun, Boulogne, France) connected by a polyethylene Co-Ex[™] PEPVC tube to a Hamilton[®] syringe of 100 μ l mounted onto a PHD 2000 programmable infusion pump (all from Harvard Apparatus). Connections were secured with 2-hydroxyethylmethacrylate and the system was checked for leak before use. A 0.5 μ l/min constant infusion rate was applied.

Study design

LNC distribution study

One of the major advantages of CED on simple injection resides in improving volumes of distribution, as a result of which it is also possible to increase the volume of infusion without affecting the integrity of brain parenchyma and the efficacy of infusion. Thus, considering the theoretical maximum volume that can be infused through each technique the final volumes of infusion used in the present study were different between the bolus- [14] and CED-injected animals [15]. Although most of a rat striatum can be perfuse

with CED with 20 μ l macromolecules in solution such as albumin [16], convection, diffusion and distribution of larger nanoparticle entities in suspension are expected to differ [17]. Hence, several CED studies have used higher infusion volumes for liposomes [18] or prolonged CED with dextran [19]. Thus, together with consideration of the drug dose that can be reached in the efficacy study, a volume of infusion of 60 μ l on 2 h was chosen for CED injection of 50 nm LNC. Rats were randomly assigned to four groups with five to six rats per group. Two groups received a simple intracranial stereotaxic injection (SI) of fluorescent LNC (10 μ l) with either a 26G needle (SI-26G) or a 32G needle (SI-29G); two groups received a CED injection of 60 μ l of fluorescent LNC with either a 29G needle (CED-29G) or a 32G needle (CED-32G). All rats were killed by CO₂ inhalation on Day 1. The brains were surgically removed, snap-frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane and stored at -80°C . Frontal cryosections (14 μ m) throughout the whole injection site were performed using a Cryocut 3000 (Leica, Rueil-Malmaison, France). The resulting slides were kept at -20°C before processing. They were then allowed to dry for 30 min at room temperature, fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 1/1000 DAPI (Sigma) in PBS for 10 min. Finally, they were washed 3 times with PBS before mounting in 1/1 (v/v) PBS/Dako Cytomation fluorescent mounting medium (Trappes, France). All slides were examined under an Axioskop-2 Zeiss fluorescence microscope (Le Peck, France). Images were acquired through a Photometrics CoolSNAP ES camera equipped with a QImaging CRI Micro Color 2 RGB Liquid Crystal filter and by using the MetaVue[™] imaging system (all from Roper Scientific, Evry, France). The images were then analysed using the Image J software (NIH, USA). The apparent volume of distribution (Vd) for each rat according to the type of injection was calculated after extrapolation of the maximum surface area labelled by NR on overall brain tissue slices. The length (L) and the width (l) of the fluorescent zone were automatically measured after manual contouring and the Vd was estimated according to the mathematical ellipsoid formula: $\pi/6 \times L \times l^2$. The statistical significance between groups was determined by ANOVA and Kruskal–Wallis tests for mean comparison by pairs.

Efficacy study

Rats were randomly assigned to five groups and implanted with 9L tumour cells. Group A was the untreated group. Group B was the ‘radiotherapy only’ group. Groups C, D and E were the ‘radio-chemotherapy’ groups in which 60 μ l of chemotherapy was delivered by CED on day 6 after tumour cell implantation. Rats from Group C received free Px at the dose of 375 μ g/kg of bodyweight; rats from Group D received Px-loaded LNC (same Px dose) and rats

from Group E received blank LNC. Anaesthesia was maintained in each group. Rats were irradiated in the Radiotherapy Department using a Saturn 41 linear accelerator. Under deep anaesthesia by using 4.5% isoflurane for 2 min, then at 2% combined with 3 l/min O₂, the rats were installed in ventral decubitus with head and body lined up for the lasers. The brain irradiation was delivered by two photon beams, parallel and opposed, at 6MV-energy, with DSP 100 and a flow of 4 Gy/min. The size of the field was 15 × 15 cm. The posterior limit of the field corresponded to the line passing between the posterior part of the two ears. A bolus of 1.5 cm was laid out on the surface of the rat's head in order to homogenise the amount received on the brain surface. 18 Gy in three fractions of 6 Gy were delivered. The irradiation began in the absence of scarring trouble (e.g. abscess, contusion) and fine general health. After irradiation, the animals were replaced in their cage under the same conditions. They were examined daily. Rats too weak to feed and to stand, thus presenting clinical signs of tumour progression, were killed and their brain removed for analysis. Medians survival rates were calculated from the day of the tumour implantation. The survival curves were obtained by the Kaplan–Meier method. The comparison of these curves used the Log-rank or Mantel–Cox test. Rats that survived up to 106 days were regarded as long-term survivors.

Results

LNC monitoring in 9L glioma cells

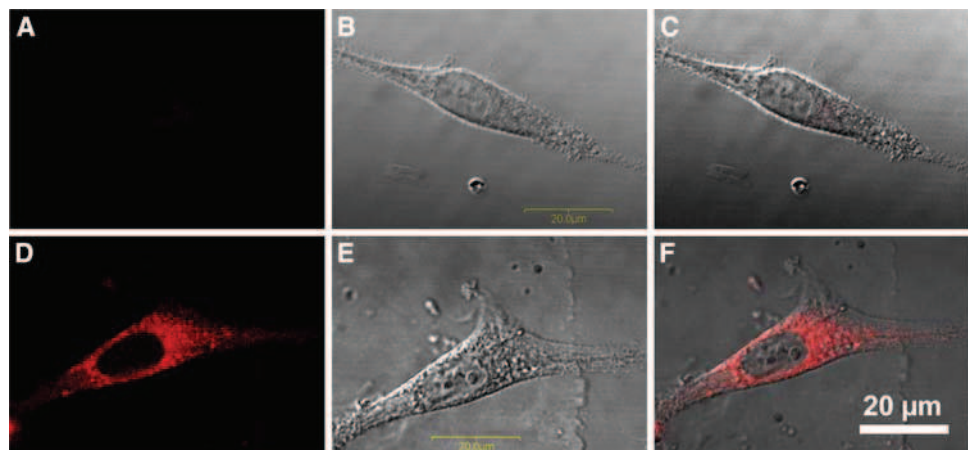
Among drug delivery systems, nanocarriers may offer the opportunity to be internalised in non-phagocytic eukaryotic cells as a result of their small size. To explore such behaviour on 9L rat glioma cells, LNC (Fig. 1A) were loaded with the fluorescent hydrophobic compound NR (Fig. 1B). Fluorescent-activated particle sorting at 488 nm

showed a noticeable increase in the Gaussian distribution of LNC numbers around a high fluorescent intensity median after NR incorporation, thus demonstrating an efficient LNC labelling (Fig. 1C). NR-LNC uptake by 9L glioma cells was then followed by fluorescent-activated flow cytometry (Fig. 1D). As size exclusion followed by HPLC quantification demonstrated that 96% of the NR used was encapsulated within the LNC and since free NR cannot be transferred on its own to the 9L cells during the 2 h incubation period [12], NR uptake by 9L glioma cells, when using NR-LNC, can be quoted as actual LNC uptake. An examination of cells before [LNC (–)] and after 2 h incubation with NR-LNC [LNC (+)] revealed a marked increase in cell fluorescence intensity, thus demonstrating LNC uptake (Fig. 1D). These data were confirmed by confocal experiments showing strong NR labelling in 9L cell perinuclear and cytoplasmic areas which avoided the nucleus (Fig. 2).

On the use of CED for the administration of LNC within the CNS

Classical stereotaxic injections of drugs within the brain are often limited by the volume injected as well as by a poor tissue penetration, thus resulting in small Vd and weak local doses [20]. As CED has been shown to improve the delivery of agents in the CNS to large volumes of tissue [10], we evaluated the interest of this minimally invasive surgical technique for the intracerebral administration of LNC. Dealing with the possibility to increase infusion volumes, we compared in healthy animals [normal brain tissue] the use of classical simple injection (SI) with 10 µl injected in 5 min to that of CED with 60 µl injected in 2 h. We also put side by side the use of two distinct needles: 26G and 32G for SI and 29G and 32G for CED. On the basis of our work on cell culture demonstrating that the hydrophobic dye NR can be considered as a witness of LNC distribution, we used NR-LNC for intracerebral

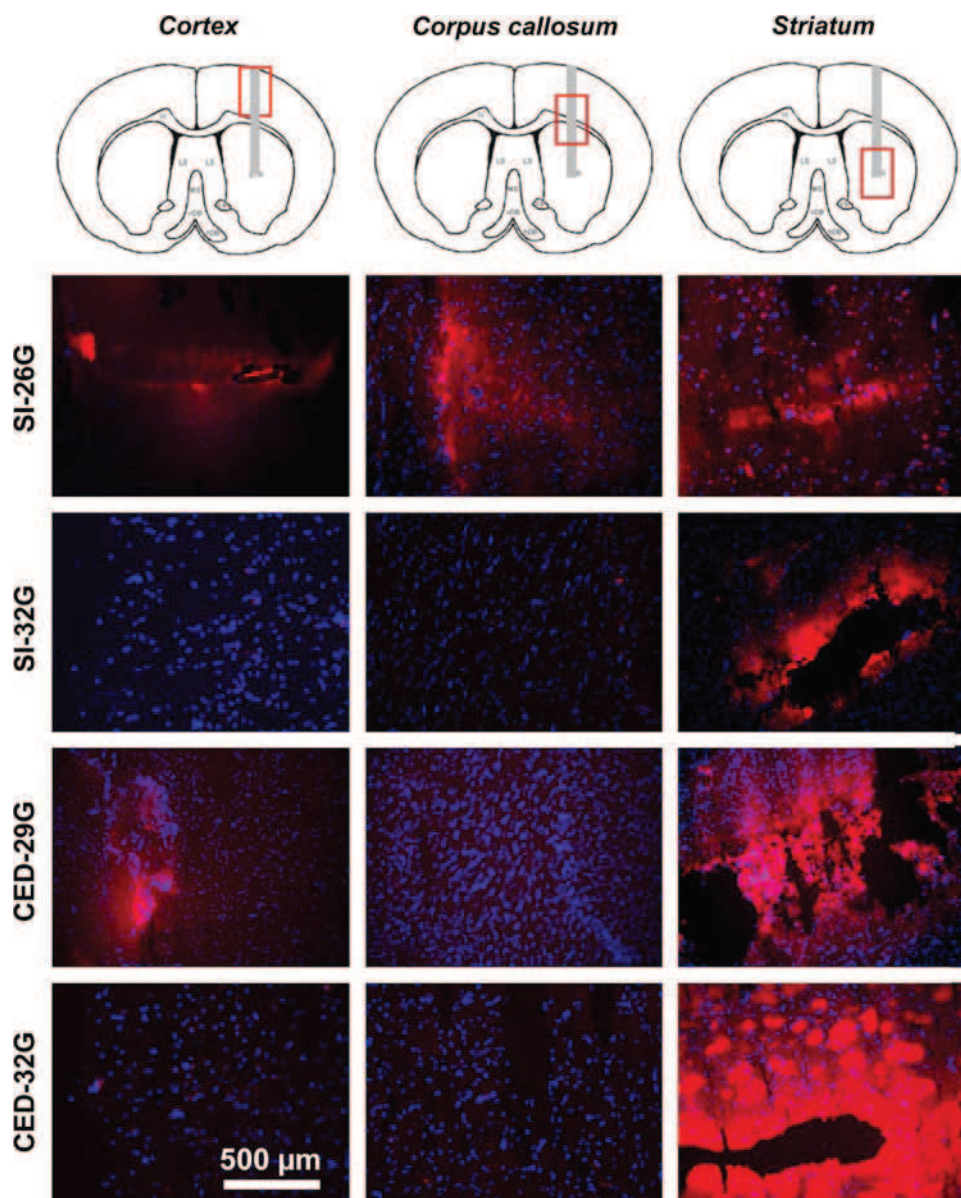
Fig. 2 Confocal laser scanning microscopy images of 9L cells after 2 h incubation with NR-LNC (A–C control cell; D–F treated cell; A, D Nile red fluorescence; B, E Nomarsky; C, F merged pictures)



implantation and NR fluorescence as a proportional indicator of areas occupied by LNC in brain slices. For consistency, analyses were carried out 24 h after the injection of NR-LNC (a time sufficient for potential interactions of LNC with CNS cells and short enough to give a representative idea of the infusion). With SI-26G, fluorescence microscopy analysis revealed a back leakage in the cortex and the corpus callosum along the needle path (Fig. 3). Of the five rats tested, two presented a small NR-labelled area around the injection site whereas no fluorescence was detected in the striata of the three others. Interestingly, with SI-32G the outflow was prevented (Fig. 3). In rats that were injected with CED-29G or CED-32G a satisfactory tolerance was proven with no post-injection neurological deficit or deterioration of the general health. Microscope

slide analysis demonstrated that CED significantly improved the dispersal of NR throughout the brain parenchyma in comparison to classical stereotaxic injection (Fig. 3). Brain slices from CED injected rats also presented the characteristic gradients of convection and diffusion and a better NR homogeneity around the injection site (Fig. 3). No major differences were found between CED-29G or CED-32G, except for the presence of a weak fluorescence at the cortex surface when using a 29G needle, which was not however combined with any staining along the needle path (Fig. 3). To quantify NR-LNC distribution within the brain parenchyma, computer slide analysis was performed. Our data presented on Fig. 4 demonstrated a strong improvement of the Vd when using CED versus classical direct administration. On average, CED enhanced the Vd

Fig. 3 Representative brain sections seen under fluorescence microscopy to detect the distribution of NR within the rat brain parenchyma at 24 h after intrastriatal stereotaxic implantation of NR-LNC through classical simple injection (SI-26G and SI-32G) or CED (CED-29G and CED-32G). Conventional direct injections of 50 nm-LNC resulted in limited distribution with a high backflow level to the cortical surface (SI-26G). CED-32G significantly enhanced LNC distribution with no back leakage and good homogeneity



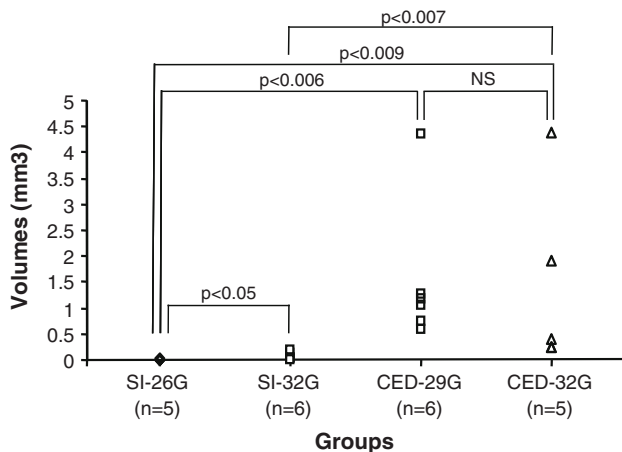


Fig. 4 Calculated NR Vd by measurement of NR-fluorescent surfaces at 24 h after NR-LNC injection. Statistics: *P* indicate the *P*-value obtained from Kruskal–Wallis ANOVA; *NS*, non-significant

from 0.01 ± 0.02 and $0.065 \pm 0.07 \text{ mm}^3$ with SI-26G and SI-32G, respectively, to 1.53 ± 1.41 and $1.44 \pm 1.79 \text{ mm}^3$ with CED-29G and CED-32G, respectively. This represented a 153-fold improvement with CED-29G ($P < 0.006$) and 144-fold improvement with CED-32G ($P < 0.009$) on the standard stereotaxic injection that we initially used (SI-26G). By eliminating apparent outliers that may create a bias (one from the CED-29G group and two from the CED 32G group, Fig. 4), differences on standard injection were reduced to 115-fold and 36-fold respectively. They were, however, still found significant ($P < 0.009$ and $P < 0.03$ respectively) confirming that the enhanced distribution cannot be attributed only to apparent outliers.

To further study the interest of CED for the intracranial administration of LNC in the case of glioma treatment (tumour-bearing rats), NR distribution from NR-LNC was also followed on a discernible brain tumour. Thus, 6 days after implantation of 10^3 9L cells within the striata of Fischer rats, NR-LNC were injected through CED-32G at the same stereotaxic coordinates. Our data showed that, at 24 h after injection, NR distribution (in red) fully overlapped with the area of tumour progression (cell nucleus/DAPI in blue) (Fig. 5A–D). Interestingly, at higher magnification, NR was found to be associated with a cytoplasmic area avoiding the nucleus of 9L cells in a similar fashion to that of isolated cultured cells (Fig. 5E).

Efficacy of Px-loaded LNC administered intratumourally by CED in the intracranial 9L Fischer rat glioma model

Considering the major significance of radiotherapeutic protocols in the treatment of human glioblastoma [2] and the two main sets of data reported above: firstly, that LNC

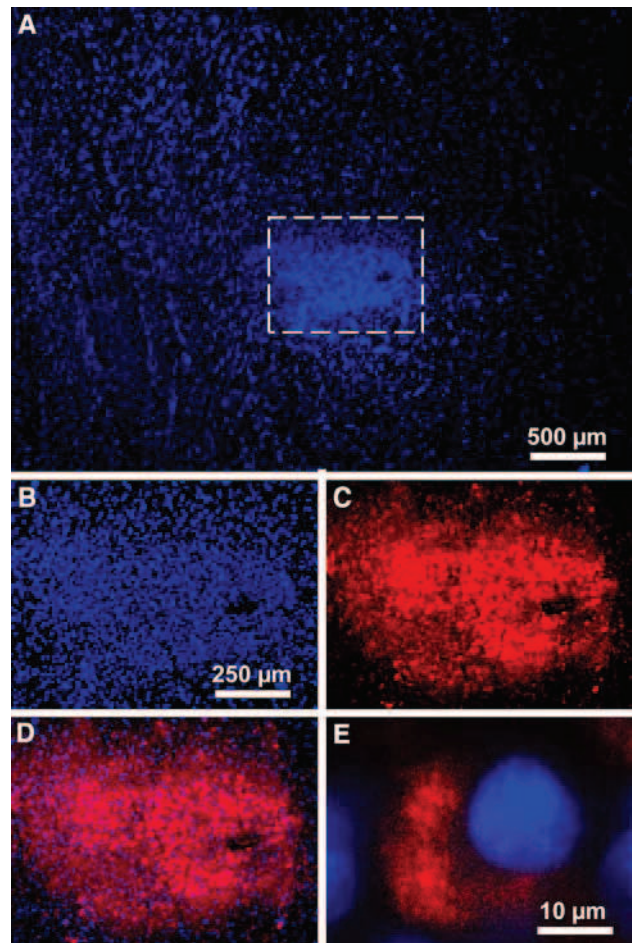


Fig. 5 NR diffusion exemplified on representative section of the rat striatum at 24 h after an intra-tumoural implantation of NR-LNC. **A** DAPI staining illustrating the shape of a 6 day old 9L tumour (initial implantation of 10^3 cells). **B** Higher magnification of the DAPI staining corresponding to the squared area in **A**. **C** Corresponding NR staining. **D** Merged images. Note the NR fluorescence covering the whole tumour forming area and, at higher magnification, its particular localisation within the cytoplasm of single cells (**E**)

reach the intracellular space of 9L glioma cells and secondly, that CED dramatically improved LNC distribution within the brain parenchyma, we sought to evaluate the impact of an LNC-based radiosensitising chemotherapy administered through CED for the treatment of the 9L intracranial rat glioma model.

For chemotherapy, the hydrophobic compound Px emerged as a good candidate (Fig. 6A). Px is a good radiosensitiser [11] that induces mitotic block at the metaphase/anaphase transition and induces apoptosis [21]. It is poorly soluble in aqueous solution and it weakly crosses the BBB [22, 23]. Its action is concentration and time-dependent [24] and it constitutes the substrate of the MDR-1 efflux pumps which prevent its cytotoxic action [25]. As we previously demonstrated a role for LNC in the augmentation of Px efficacy through improvement of its

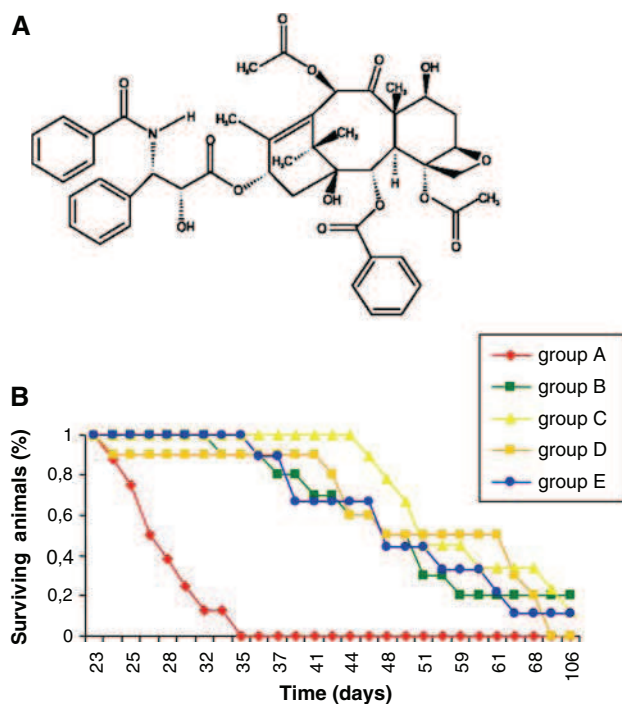


Fig. 6 Efficacy of a nanotechnology-based radiosensitising chemotherapy. **A** Molecular structure of Px. **B** Kaplan–Meier survival curves. Animals with tumours were randomly divided into five groups: **A** untreated, **B** radiotherapy only, **C** CED with Px and radiotherapy, **D** CED with Px-loaded LNC and radiotherapy and **E** CED with unloaded LNC and radiotherapy. Survival curves were established by the Kaplan–Meier method and statistically compared using the Log-rank or Mantel–Cox test (see Table 2)

cellular bioavailability, notably ascribed to the inhibition of the multidrug resistance phenomena [8], Px was selected.

For the different animal groups a systematic clinical follow up was performed. No clinical toxicity symptoms, including skin necrosis, and no neurological or general changes were observed after treatment, especially after the CED injection of Px-loaded LNC. Radiotherapy started for all the rats on day 8, thus 2 days after CED injection. Not scar disorder delayed the radiotherapy schedule. All rats lost weight just after the end of the radiotherapy schedule but they all recovered their initial weight after a few days. In all cases animals died from their tumour except one rat from group C (free Px) who suffered from neurological deficit and died precociously by day 23 with no evidence of macroscopic tumour in the brain tissue. In all other cases, in which animals were killed after presenting clinical signs of tumour progression, analysis of brain tissue showed no evidence of necrosis within the tumour or within the CNS, notably for the rats receiving the CED of Px-loaded LNC.

Data from the efficacy study are summarised on Kaplan–Meier curves (Fig. 6B). The median survival and long-term survivors (>106 days) of the different groups are indicated in Table 2. Although a significant benefit of radiotherapy

Table 2 Median survival and long-term survivors for each studied group

Groups (n)	Median survival (days)	Long survivors (>106 days)
Group A (8)	26 ± 3.8	0/8
Group B (10)	44 ± 8.2*	2/10
Group C (10)	50 ± 19.3*	0/10
Group D (10)	54 ± 14.8*	1/10
Group E (9)	47 ± 22.8*	1/9

A, untreated; B, radiotherapy only; C, CED with Px and radiotherapy; D, CED with Px-loaded LNC and radiotherapy and E, CED with unloaded LNC and radiotherapy

Statistics: * $P < 0.05$ (Log Rank or Mantel–Cox test)

was observed, only small effects of the different concomitant radiosensitising chemotherapies were superposed. Rats from the control group (group A) presented a median survival of 26 ± 3.8 days. When radiotherapy was given alone (group B), the median survival was 44 ± 8.2 days. When CED with Px-loaded LNC was applied (group D) the median survival reached 54 ± 14.8 days, representing a two-fold increase when compared to the untreated group ($P < 0.01$) that was, however, not statistically different from radiotherapy alone ($P > 0.05$). At last, long-term survivors were observed in three groups only: radiotherapy alone (group B), radiotherapy combined with Px-loaded LNC (group D) and radiotherapy combined with blank LNC (group E).

Discussion

The present study demonstrates for the first time that LNC can be efficiently infused into large volumes of rat brain by CED. It also reveals that LNC perfusion of a whole tumour-forming area inside the CNS is achievable through CED injection whilst preserving the ability of LNC to reach the intracellular space of encountered cells. Although our data attest to the feasibility of the combination of external beam therapy with CED, for the administration of drug-loaded LNC, the use of Px within the nanocarriers emphasises, however, the need for optimisation.

Efficacy of CED technique for LNC injection

While CED proved to be useful for the administration of small molecules or macromolecules in solution within the brain of animals or humans [10, 26], records relating its convenience for the administration of colloidal suspensions are barely emerging. Thus, the CED injection of liposomes was studied for therapeutic or imaging purposes with some success as exemplified by irinotecan [27], pegylated doxorubicin [28], topotecan [29], DNA [30],

adenovirus [31] and gadolinium [17, 32]. However, apart from those liposome focused efforts and a study using a model of polystyrene nanospheres [33], our current investigation represents a primary examination of the diffusion behaviour of nanosystem-based suspensions in solid tissues following CED and at least the first CED brain diffusion study using LNC. The poor distribution of lipophilic drugs could be partly explained by characteristics of the drug itself. In contrast, lipophilic drug distribution became strongly dependent on the characteristics of the carrier when loaded in LNC. Thus, while numerous preclinical studies have demonstrated the efficacy of CED-based local chemotherapy without monitoring the drug distribution [34, 35], our work emphasises the importance of verifying the diffusion of nanoparticle encapsulated drugs within the targeted tissue even when a very promising delivery system is used. At flow rates greater than 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, backflow of CED-infused solutions up the outside of the needle shaft has been reported [15]. Backflow reduces control over drug delivery because infused solutions can flow out of the brain or into highly permeable white matter tracts surrounding the infusion site. The separation between tissue and needle that allows backflow can be controlled by adjusting the flow rate and the size of the needle [36]. Although it is conceivable that pressure increases with a reduction of the needle size, our data reveal, however, that the smallest needles (32G) are likely to be less harmful to the tissue and give the best intracranial injection results. This was observed not only for CED-injected LNC suspensions (which fully avoid back leakage) but also with classical stereotaxic injections. Such findings could be ascribed to the nature of the colloidal suspensions that appear to be subjected to pressure constraints distinct from those affecting small molecules or macromolecules in solution [18]. As we learned from liposomes that charge and surface pegylation rather than size affect Vd following CED [29], it is tempting to speculate that the weak charge surface of LNC as well as their embedment by a soft layer form of PEG 660 chains result in a sufficiently low affinity for extracellular matrix components as well as cell surfaces, compatible with a good and homogeneous diffusion. However, LNC diffusion through CED would have to be re-evaluated each time they are modified (e.g. after peptide or antibody grafting) but also each time the incorporated drug would have changed the surface properties of the nanocarrier. In line with this, we previously indicated that all lipophilic components of LNC were mainly hidden by the PEG steric barrier of the PEG-HS at the LNC interface [37]. The fact that the zeta potential for blank-, NR- and Px-LNC remains slightly negative (Table 1) is in favour of similar diffusion behaviours in the brain parenchyma for all those particles. Thus, when encapsulated in LNC, the

topographic distribution of Px (not easily detectable *per se*) must be comparable to the one observed for NR.

Our diffusion work proved that CED allows the injection of large volumes of LNC suspension (60 μl) with minimal tissue change beyond the site of injection and a satisfactory tolerance. In comparison to classical stereotaxic administration, it significantly improves the Vd with no back leakage and good homogeneity. Apparent volumes of distribution are not only multiplied by a factor 6 as expected due to the improvement of the volume injected, but rather by a factor 144. As we previously demonstrated that NR could not penetrate glioma cells on its own [8], the fact that it was incorporated inside most of the cells from the discernible tumour mass supports the notion that LNC preserve their uptake characteristics after CED injection. This also indicated that all tumour tissue was infused with LNC at the beginning of the radiochemotherapeutic treatment investigated. Hence, the administration of LNC through CED within the brain may overcome limitations of traditional treatment for brain tumours caused by the large tumour size and the difficulty of delivering therapeutics into their often dense and heterogeneous tissue [38].

Efficacy and safety of local chemotherapy combined to radiotherapy

The delivery of efficient therapeutic agents to the brain is a major challenge and CED constitutes for this purpose an attractive weapon. Thus, many molecules, usually used systematically in clinical oncology have already been introduced locally by CED injection within the brain: temozolomide [34], topotecan [39], cisplatin [40]. Px has also been combined to CED for investigation in patients but those studies were also largely correlated with a lack of convection, poor tumour response, leakage of the convected drug and treatment-associated complications [41, 42]. As clinical investigations are not performed until there is evidence of efficacy without inordinate toxicity, the poor results of those previous CED trials using Px may have dampened enthusiasm for its use in the upfront setting despite its obvious utility as a radiosensitizing agent. Hence, although the interest of a combination of local chemotherapy with radiotherapy seems undeniable for glioblastoma to enhance effectiveness without increasing total radiation exposure, no study excepted the present preclinical one relates the possible combination of the use of CED for Px injection to external beam therapy.

The advantages of a brain implantation of Px-loaded nanoparticles include bypassing the blood–brain barrier, minimising systemic toxicity, protecting encapsulated Px from surrounding media and obtaining high and sustained concentrations of the drug at the tumour site with only one injection during the whole duration of the radiation

treatment. Our present *in vivo* work demonstrates that Px-loaded LNC could be safely and effectively used at initial presentation in combination with external beam radiation therapy. However, no benefit of ‘radio-chemotherapy’ on ‘radiotherapy only’ is observed. These data contrast with recent *in vitro* work using Px-loaded PLGA-nanoparticles for radiosensitisation of tumour cells distinct from glioma [43]. They are, however, reminiscent of radio-chemotherapeutic clinical experiments on human glioma in which Px was infused intravenously and did not significantly improve survival rates obtained with radiotherapy alone [44–46]. Thus, although the feasibility and the interest of the new technology used in our study are confirmed, there is a need for optimisation. While the biological activity of Px was improved by a factor of 100 on 9L cells *in vitro* with the LNC formulation [8], the dose of Px administered in the present work remains weak (0.375 mg/kg of bodyweight). This contrasts with doses used with microspheres or implants usually close to 2 mg/kg of bodyweight [47]. Moreover, as LNC have been found to inhibit in the short term the biological activity of efflux pumps interacting with Px [8], possible long-term feedback-up regulation of those transporters may occur *in vivo*, as recently proven when chemotherapy was combined with radiotherapy [48]. Finally, it should be stressed that clinical protocols have to be strongly inspired from the current advances made in the comprehension of what brain cancer really is. The recent hypothesis that tumorigenicity is conferred by a rare subpopulation of cancer cells, the ‘brain tumour stem cells’ [49] and the fact that hypoxia inhibits Px-induced apoptosis [50] should all be taken into account for more specific and reliable strategies. To address these concerns, one has to consider that LNC are not inert entities but real interactive ‘nano-cargo’. Thus, for CED optimisation, the possibility of grafting molecular recognition moieties (e.g. antibodies, peptides, aptamers) onto their surface to reach specific cells or biomolecular components [51] combined to their biocompatible nature (no use of organic solvents) is of considerable interest.

Acknowledgments This work was supported by funding from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, from the *Cancéropôle Grand Ouest*, from the *Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2007)* and from the *Comité Départemental de Maine et Loire de la Ligue Contre le Cancer* through a PhD fellowship to Archibald Paillard. We are also grateful to Pierre Legras and Jérôme Roux from the *Service Commun d’Animalerie Hospitalo-Universitaire* (SCAHU, Angers, France) for skilful technical support.

References

- De Angelis LM (2001) Brain tumors. *N Engl J Med* 344:114–123
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
- Pardridge WM (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1:131–139
- Wang PP, Frazier J, Brem H (2002) Local drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* 54:987–1013
- Kreuter J (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47:65–81
- Tiwari SB, Amiji MM (2006) A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr Drug Deliv* 3:219–232
- Jain KK (2007) Use of nanoparticles for drug delivery in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Neurother* 7:363–372
- Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoit JP (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 5:1710–1722
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 19:875–880
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH (1994) Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2076–2080
- Tishler RB, Geard CR, Hall EJ, Schiff PB (1992) Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res* 52:3495–3497
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965–973
- Hed J, Hallden G, Johansson SG, Larsson P (1987) The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 101:119–125
- Saini M, Bellinzona M, Meyer F, Cali G, Samii M (1999) Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rats. *J Neurooncol* 42:59–67
- Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, Governale LS, Oldfield EH (1999) Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 90:315–320
- Lieberman DM, Laske DW, Morrison PF, Bankiewicz KS, Oldfield EH (1995) Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* 82:1021–1029
- Mamot C, Nguyen JB, Pourdehnad M, Hadaczek P, Saito R, Bringas JR, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, McKnight T, Berger MS, Park JW, Bankiewicz KS (2004) Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *J Neurooncol* 68:1–9
- MacKay JA, Deen DF, Szoka FC Jr (2005) Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Res* 1035:139–153
- Occhiogrosso G, Edgar MA, Sandberg DI, Souweidane MM (2003) Prolonged convection-enhanced delivery into the rat brainstem. *Neurosurgery* 52:388–393 (discussion 393–384)
- Fleming AB, Saltzman WM (2002) Pharmacokinetics of the carmustine implant. *Clin Pharmacokinet* 41:403–419
- Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L (1993) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9552–9556

22. Glantz MJ, Choy H, Kearns CM, Mills PC, Wahlberg LU, Zuhowski EG, Calabresi P, Egorin MJ (1995) Paclitaxel disposition in plasma and central nervous systems of humans and rats with brain tumors. *J Natl Cancer Inst* 87:1077–1081
23. Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, Bernhardt G, Graeff C, Farber L, Gschaidmeier H, Buschauer A, Fricker G (2002) Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood–brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 110:1309–1318
24. Cahan MA, Walter KA, Colvin OM, Brem H (1994) Cytotoxicity of taxol in vitro against human and rat malignant brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 33:441–444
25. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48–58
26. Lidar Z, Mardor Y, Jonas T, Pfeffer R, Faibel M, Nass D, Hadani M, Ram Z (2004) Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *J Neurosurg* 100:472–479
27. Noble CO, Krauze MT, Drummond DC, Yamashita Y, Saito R, Berger MS, Kirpotin DB, Bankiewicz KS, Park JW (2006) Novel nanoliposomal CPT-11 infused by convection-enhanced delivery in intracranial tumors: pharmacology and efficacy. *Cancer Res* 66:2801–2806
28. Yamashita Y, Krauze MT, Kawaguchi T, Noble CO, Drummond DC, Park JW, Bankiewicz KS (2007) Convection-enhanced delivery of a topoisomerase I inhibitor (nanoliposomal topotecan) and a topoisomerase II inhibitor (pegylated liposomal doxorubicin) in intracranial brain tumor xenografts. *Neuro Oncol* 9:20–28
29. Saito R, Krauze MT, Noble CO, Drummond DC, Kirpotin DB, Berger MS, Park JW, Bankiewicz KS (2006) Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model. *Neuro Oncol* 8:205–214
30. Voges J, Reszka R, Gossmann A, Dittmar C, Richter R, Garlip G, Kracht L, Coenen HH, Sturm V, Wienhard K, Heiss WD, Jacobs AH (2003) Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol* 54:479–487
31. Hadaczek P, Kohutnicka M, Krauze MT, Bringas J, Pivrotto P, Cunningham J, Bankiewicz K (2006) Convection-enhanced delivery of adeno-associated virus type 2 (AAV2) into the striatum and transport of AAV2 within monkey brain. *Hum Gene Ther* 17:291–302
32. Saito R, Bringas JR, McKnight TR, Wendland MF, Mamot C, Drummond DC, Kirpotin DB, Park JW, Berger MS, Bankiewicz KS (2004) Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 64:2572–2579
33. Neeves KB, Sawyer AJ, Foley CP, Saltzman WM, Olbricht WL (2007) Dilution and degradation of the brain extracellular matrix enhances penetration of infused polymer nanoparticles. *Brain Res* 1180:121–132
34. Heimberger AB, Archer GE, McLendon RE, Hulette C, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Sampson JH (2000) Temozolomide delivered by intracerebral microinfusion is safe and efficacious against malignant gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 6:4148–4153
35. Bruce JN, Falavigna A, Johnson JP, Hall JS, Birch BD, Yoon JT, Wu EX, Fine RL, Parsa AT (2000) Intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 46:683–691
36. Morrison PF, Lonser RR, Oldfield EH (2007) Convective delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human putamen. *J Neurosurg* 107:74–83
37. Lacoueille F, Garcion E, Benoit JP, Lamprecht A (2007) Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* 7:4612–4617
38. Vogelbaum MA (2005) Convection enhanced delivery for the treatment of malignant gliomas: symposium review. *J Neurooncol* 73:57–69
39. Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, Hall JS, Chakrabarti I, Bruce JN (2000) Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 47:1391–1398 (discussion 1398–1399)
40. Kroin JS, Penn RD (1982) Intracerebral chemotherapy: chronic microinfusion of cisplatin. *Neurosurgery* 10:349–354
41. Mardor Y, Roth Y, Lidar Z, Jonas T, Pfeffer R, Maier SE, Faibel M, Nass D, Hadani M, Orenstein A, Cohen JS, Ram Z (2001) Monitoring response to convection-enhanced taxol delivery in brain tumor patients using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 61:4971–4973
42. Popperl G, Goldbrunner R, Gildehaus FJ, Kreth FW, Tanner P, Holtmannspotter M, Tonn JC, Tatsch K (2005) O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for monitoring the effects of convection-enhanced delivery of paclitaxel in patients with recurrent glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:1018–1025
43. Jin C, Bai L, Wu H, Tian F, Guo G (2007) Radiosensitization of paclitaxel, etanidazole and paclitaxel + etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro. *Biomaterials* 28:3724–3730
44. Fountzilas G, Karavelis A, Capizzello A, Kalogera-Fountzila A, Karkavelas G, Zamboglou N, Selviaridis P, Foroglou G, Tourkantonis A (1999) Radiation and concomitant weekly administration of paclitaxel in patients with glioblastoma multiforme. A phase II study. *J Neurooncol* 45:159–165
45. Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M (2003) Radiochemotherapy of malignant glioma in adults. Clinical experiences. *Strahlenther Onkol* 179:219–232
46. Langer CJ, Ruffer J, Rhodes H, Paulus R, Murray K, Movsas B, Curran W (2001) Phase II radiation therapy oncology group trial of weekly paclitaxel and conventional external beam radiation therapy for supratentorial glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:113–119
47. Walter KA, Cahan MA, Gur A, Tyler B, Hilton J, Colvin OM, Burger PC, Domb A, Brem H (1994) Interstitial taxol delivered from a biodegradable polymer implant against experimental malignant glioma. *Cancer Res* 54:2207–2212
48. Korystov YN, Shaposhnikova VV, Korystova AF, Emel'yanov MO, Kublik LN (2008) Modification of multidrug resistance of tumor cells by ionizing radiation. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:15–21
49. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756–760
50. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG, Borea PA (2007) Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells. *Mol Pharmacol* 72:162–172
51. Beduneau A, Saulnier P, Hindre F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP (2007) Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 28:4978–4990

Références

- Abbott, N. J., L. Ronnback, and E. Hansson. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 41-53.
- Ainger, K., D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, and J. H. Carson. 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123: 431-41.
- Akinc, A., M. Thomas, A. M. Klivanov, and R. Langer. 2005. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* 7: 657-63.
- Akita, H., A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguti, I. A. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure, and H. Harashima. 2009. Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* 30: 2940-9.
- Allard, E., F. Hindre, C. Passirani, L. Lemaire, N. Lepareur, N. Noiret, P. Menei, and J. P. Benoit. 2008. (188)Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*.
- Allen, T. M., and A. Chonn. 1987. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 223: 42-6.
- Allen, T. M., C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, and A. Yau-Young. 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066: 29-36.
- Anton, N., J. P. Benoit, and P. Saulnier. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. *J Control Release* 128: 185-99.
- Ataman-Onal, Y., S. Munier, A. Ganee, C. Terrat, P. Y. Durand, N. Battail, F. Martinon, R. Le Grand, M. H. Charles, T. Delair, and B. Verrier. 2006. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J Control Release* 112: 175-85.
- Bala, I., S. Hariharan, and M. N. Kumar. 2004. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 21: 387-422.
- Ballot, S., N. Noiret, F. Hindre, B. Denizot, E. Garin, H. Rajerison, and J. P. Benoit. 2006. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33: 602-7.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-60.
- Barichello, J. M., M. Morishita, K. Takayama, and T. Nagai. 1999. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 25: 471-6.
- Barth, R. F. 1998. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 36: 91-102.
- Baudner, B. C., O. Balland, M. M. Giuliani, P. Von Hoegen, R. Rappuoli, D. Betbeder, and G. Del Giudice. 2002. Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. *Infect Immun* 70: 4785-90.
- Beduneau, A., P. Saulnier, N. Anton, F. Hindre, C. Passirani, H. Rajerison, N. Noiret, and J. P. Benoit. 2006. Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. *Pharm Res* 23: 2190-9.
- Beduneau, A., P. Saulnier, F. Hindre, A. Clavreul, J. C. Leroux, and J. P. Benoit. 2007. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 28: 4978-90.

- Behin, A., K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier, and J. Y. Delattre. 2003. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361: 323-31.
- Bencokova, Z., L. Pauron, C. Devic, A. Joubert, J. Gastaldo, C. Massart, J. Balosso, and N. Foray. 2008. Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. *J Neurooncol* 86: 13-21.
- Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, and D. Hanahan. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111: 1287-95.
- Betbeder, D., S. Sperandio, J. P. Latapie, J. de Nadai, A. Etienne, J. M. Zajac, and B. Frances. 2000. Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm Res* 17: 743-8.
- Betz, A. L., J. A. Firth, and G. W. Goldstein. 1980. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 192: 17-28.
- Bickel, U., T. Yoshikawa, and W. M. Pardridge. 2001. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 247-79.
- Bobo, R. H., D. W. Laske, A. Akbasak, P. F. Morrison, R. L. Dedrick, and E. H. Oldfield. 1994. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2076-80.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool, and J. Wijnholds. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347-57.
- Boya, P., and G. Kroemer. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27: 6434-51.
- Bradbury, M. W. B. 1997. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *Journal of Neurochemistry* 69: 443-454.
- Brady, J. M., D. E. Cutright, R. A. Miller, and G. C. Barristone. 1973. Resorption rate, route, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *J Biomed Mater Res* 7: 155-66.
- Brandenburg, B., L. Y. Lee, M. Lakadamyali, M. J. Rust, X. Zhuang, and J. M. Hogle. 2007. Imaging Poliovirus Entry in Live Cells. *PLoS Biol* 5: e183.
- Brightman, M. W., and T. S. Reese. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40: 648-77.
- Bronich, T. K., S. Bontha, L. S. Shlyakhtenko, L. Bromberg, T. A. Hatton, and A. V. Kabanov. 2006. Template-assisted synthesis of nanogels from Pluronic-modified poly(acrylic acid). *J Drug Target* 14: 357-66.
- Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, and M. A. Farrar. 2007. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology Letters* 114: 1-8.
- Carter, D. C., and J. X. Ho. 1994. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153-203.
- Castignolles, N., S. Morgeaux, C. Gontier-Jallet, D. Samain, D. Betbeder, and P. Perrin. 1996. A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine* 14: 1353-60.
- Chaloin, L., P. Vidal, P. Lory, J. Mery, N. Lautredou, G. Divita, and F. Heitz. 1998. Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 601-8.
- Chang, J., Y. Jallouli, M. Kroubi, X. B. Yuan, W. Feng, C. S. Kang, P. Y. Pu, and D. Betbeder. 2009. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 379: 285-92.
- Chrai, S. S., R. Murari, and I. Ahmad. 2001. Liposomes (a review), part one: Manufacturing issues. *BioPharm* 14: 10-14.

- Cohen, H., R. J. Levy, J. Gao, I. Fishbein, V. Kousaev, S. Sosnowski, S. Slomkowski, and G. Golomb. 2000. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther* 7: 1896-905.
- Conner, S. D., and S. L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
- Cornelis, S., M. Vandenbranden, J. M. Ruyschaert, and A. Elouahabi. 2002. Role of intracellular cationic liposome-DNA complex dissociation in transfection mediated by cationic lipids. *DNA Cell Biol* 21: 91-7.
- Costantino, L., F. Gandolfi, L. Bossy-Nobs, G. Tosi, R. Gurny, F. Rivasi, M. A. Vandelli, and F. Forni. 2006. Nanoparticulate drug carriers based on hybrid poly(D,L-lactide-co-glycolide)-dendron structures. *Biomaterials* 27: 4635-45.
- De Arriba Zerpa, G. A., M.-C. Saleh, P. M. Fernández, F. Guillou, A. E. L. De Monteros, J. De Vellis, M. M. Zakin, and B. Baron. 2000. Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line. *Journal of Neuroscience Research* 61: 388-395.
- De Camilli, P., K. Takei, and P. S. McPherson. 1995. The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 5: 559-65.
- de Torquat, S., J. P. Demarez, J. Paillard, J. Baillet, and J. Passelecq. 1976. [Value of radionuclide imaging for the emergency diagnosis of pulmonary embolism. 27 cases]. *Nouv Presse Med* 5: 2307-9.
- Debin, A., R. Kravtsoff, J. V. Santiago, L. Cazales, S. Sperandio, K. Melber, Z. Janowicz, D. Betbeder, and M. Moynier. 2002. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine* 20: 2752-63.
- Dehouck, M. P., P. Jolliet-Riant, F. Bree, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, and J. P. Tillement. 1992. Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* 58: 1790-7.
- Dehouck, M. P., S. Meresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54: 1798-801.
- del Amo, E. M., A. Urtti, and M. Yliperttula. 2008. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* 35: 161-74.
- del Pozo-Rodriguez, A., S. Pujals, D. Delgado, M. A. Solinis, A. R. Gascon, E. Giralt, and J. L. Pedraz. 2009. A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *J Control Release* 133: 52-9.
- Demaurex, N. 2002. pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci* 17: 1-5.
- Deniger, D. C., A. A. Kolokoltsov, A. C. Moore, T. B. Albrecht, and R. A. Davey. 2006. Targeting and penetration of virus receptor bearing cells by nanoparticles coated with envelope proteins of Moloney murine leukemia virus. *Nano Lett* 6: 2414-21.
- Descamps, L., R. Cecchelli, and G. Torpier. 1997. Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J Neuroimmunol* 74: 173-84.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, A. F. Goodfellow, and J. L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5: 410-21.
- Donini, C., D. N. Robinson, P. Colombo, F. Giordano, and N. A. Peppas. 2002. Preparation of poly(methacrylic acid-g-poly(ethylene glycol)) nanospheres from methacrylic monomers for pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 245: 83-91.
- Doumas, B. T., and T. Peters, Jr. 1997. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clin Chim Acta* 258: 3-20.

- Dowty, M. E., P. Williams, G. Zhang, J. E. Hagstrom, and J. A. Wolff. 1995. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4572-6.
- Dubowchik, G. M., S. L. Gawlak, and R. A. Firestone. 1995. The in vitro effects of three lysosomotropic detergents against three human tumor cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 5: 893-898.
- Dunn, K. W., and F. R. Maxfield. 1992. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol* 117: 301-10.
- Dunn, K. W., T. E. McGraw, and F. R. Maxfield. 1989. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* 109: 3303-14.
- El mir, S., A. Casanova, D. Betbeder, and F. Triebel. 2001. A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. *Eur J Cancer* 37: 1053-60.
- Enns, C. A., and H. H. Sussman. 1981. Physical characterization of the transferrin receptor in human placentae. *J Biol Chem* 256: 9820-3.
- Faraji, A. H., and P. Wipf. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950-62.
- Fasbender, A., J. Marshall, T. O. Moninger, T. Grunst, S. Cheng, and M. J. Welsh. 1997. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther* 4: 716-25.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7.
- Fleming, M. D., M. A. Romano, M. A. Su, L. M. Garrick, M. D. Garrick, and N. C. Andrews. 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1148-53.
- Fournier, E., C. Passirani, C. N. Montero-Menei, and J. P. Benoit. 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* 24: 3311-31.
- Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189-93.
- Freitas, C., and R. H. Muller. 1999a. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm* 47: 125-32.
- . 1999b. Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J Microencapsul* 16: 59-71.
- Frick, M., N. A. Bright, K. Riento, A. Bray, C. Merrified, and B. J. Nichols. 2007. Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* 17: 1151-6.
- Friman, S., B. Egestad, J. Sjøvall, and J. Svanvik. 1993. Hepatic excretion and metabolism of polyethylene glycols and mannitol in the cat. *J Hepatol* 17: 48-55.
- Gabizon, A., R. Isacson, E. Libson, B. Kaufman, B. Uziely, R. Catane, C. G. Ben-Dor, E. Rabello, Y. Cass, T. Peretz, A. Sulkes, R. Chisin, and Y. Barenholz. 1994. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncologica* 33: 779-786.
- Gabizon, A., and D. Papahadjopoulos. 1988. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 6949-6953.

- Gabizon, A. A., Y. Barenholz, and B. M. 1993. Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharm Res* 10: 703-8.
- Gabrielson, N. P., and D. W. Pack. 2009. Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J Control Release* 136: 54-61.
- Garcion, E., A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, and J. P. Benoit. 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 5: 1710-22.
- Ghosh, R. N., and F. R. Maxfield. 1995. Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEp2 cells. *J Cell Biol* 128: 549-61.
- Giteau, A., M. C. Venier-Julienne, S. Marchal, J. L. Courthaudon, M. Sergent, C. Montero-Menei, J. M. Verdier, and J. P. Benoit. 2008. Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 127-36.
- Goldberg, I. J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 37: 693-707.
- Gomes, P., and P. Soares-da-Silva. 1999. L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain Res* 829: 143-50.
- Gottesman, M. M., T. Fojo, and S. E. Bates. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58.
- Gratton, S. E., P. D. Pohlhaus, J. Lee, J. Guo, M. J. Cho, and J. M. Desimone. 2007. Nanofabricated particles for engineered drug therapies: a preliminary biodistribution study of PRINT nanoparticles. *J Control Release* 121: 10-8.
- Gratton, S. E., P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, and J. M. DeSimone. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11613-8.
- Green, M., and P. M. Loewenstein. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179-88.
- Gref, R., Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer. 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-3.
- Gregoriadis, G. 1978. Liposomes in the therapy of lysosomal storage diseases. *Nature* 275: 695-6.
- Gregoriadis, G., and M. F. Dean. 1979. Enzyme therapy in genetic diseases. *Nature* 278: 603-4.
- Gruenberg, J., and F. R. Maxfield. 1995. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 552-63.
- Guzman, L. A., V. Labhasetwar, C. Song, Y. Jang, A. M. Lincoff, R. Levy, and E. J. Topol. 1996. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* 94: 1441-8.
- Hamidi, M., A. Azadi, and P. Rafiei. 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1638-49.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hardebo, J. E., and J. Kahrstrom. 1985. Endothelial negative surface charge areas and blood-brain barrier function. *Acta Physiol Scand* 125: 495-9.
- Hariharan, S., V. Bhardwaj, I. Bala, J. Sitterberg, U. Bakowsky, and M. N. Ravi Kumar. 2006. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res* 23: 184-95.

- Harris, J. M., and R. B. Chess. 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2: 214-21.
- Hawley, A. E., L. Illum, and S. S. Davis. 1997. Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. *Pharm Res* 14: 657-61.
- Hennink, W. E., and C. F. Van Nostrum. 2002. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 13-36.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, and N. C. Andrews. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-97.
- Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust, and J. P. Benoit. 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 19: 875-80.
- Hogset, A., L. Prasmickaite, T. E. Tjelle, and K. Berg. 2000. Photochemical transfection: a new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Hum Gene Ther* 11: 869-80.
- Hopkins, C. R., A. Gibson, M. Shipman, and K. Miller. 1990. Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* 346: 335-9.
- Howe, P. E. 1921. THE USE OF SODIUM SULFATE AS THE GLOBULIN PRECIPITANT IN THE DETERMINATION OF PROTEINS IN BLOOD. *Journal of Biological Chemistry* 49: 93.
- Huh, K. M., W. C. Cho, and K. Park. 2003. PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations. *Drug Delivery Technology* 3.
- Huss, M., and H. Wiczorek. 2009. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* 212: 341-6.
- Hutchinson, D. S., R. J. Summers, and M. E. Gibbs. 2008. Energy metabolism and memory processing: role of glucose transport and glycogen in responses to adrenoceptor activation in the chicken. *Brain Res Bull* 76: 224-34.
- Huwyler, J., D. Wu, and W. M. Pardridge. 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14164-14169.
- Huynh, N. T., C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit. 2009. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 379: 201-9.
- Jain, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475-90.
- Jallouli, Y., A. Paillard, J. Chang, E. Sevin, and D. Betbeder. 2007. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. *Int J Pharm* 344: 103-9.
- Joliot, A., and A. Prochiantz. 2004. Transduction peptides: From technology to physiology. *Nature Cell Biology* 6: 189-196.
- Juliano, R. L., and V. Ling. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-62.
- Kabanov, A. V., and S. V. Vinogradov. 2009. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 5418-29.
- Kato, N., U. Hasegawa, N. Morimoto, Y. Saita, K. Nakashima, Y. Ezura, H. Kurosawa, K. Akiyoshi, and M. Noda. 2007. Nanogel-based delivery system enhances PGE2 effects on bone formation. *J Cell Biochem* 101: 1063-70.
- Kazatchkine, M., G. Hauptmann, and U. Nydegger. 1986. Techniques du Complement. *Livre ed.INSERM collection technique en immunologie*: 22-33.

- Kerbel, R. S., and B. A. Kamen. 2004. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4: 423-36.
- Klibanov, A. L., K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang. 1990. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268: 235-7.
- Kunisawa, J., T. Masuda, K. Katayama, T. Yoshikawa, Y. Tsutsumi, M. Akashi, T. Mayumi, and S. Nakagawa. 2005. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release* 105: 344-53.
- Labarre, D., B. Montdargent, M. Carreno, and F. Maillat. 1993. Strategy for in vitro evaluation of the interactions between biomaterials and complement system. *Journal of Applied Biomaterials* 4: 231-240.
- Lacoeuille, F., F. Hindre, F. Moal, J. Roux, C. Passirani, O. Couturier, P. Cales, J. J. Le Jeune, A. Lamprecht, and J. P. Benoit. 2007. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 344: 143-9.
- Lai, S. K., K. Hida, S. T. Man, C. Chen, C. Machamer, T. A. Schroer, and J. Hanes. 2007. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials* 28: 2876-84.
- Le, P. U., and I. R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 116: 1059-71.
- Lechardeur, D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich, and G. L. Lukacs. 1999. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 6: 482-97.
- Legendre, J. Y., and F. C. Szoka, Jr. 1992. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm Res* 9: 1235-42.
- Legler, J. M., L. A. Gloeckler Ries, M. A. Smith, J. L. Warren, E. F. Heineman, R. S. Kaplan, and M. S. Linet. 1999. RESPONSE: Re: Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality. *J Natl Cancer Inst* 91: 2050A-22051.
- Legrand, P., J.-P. Benoit, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, and C. Passirani. 2007. SPHEROIDES ET FORMES VECTORISEES in Maloine, ed. *Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique*.
- Leroux, J. C., P. Gravel, L. Balant, B. Volet, B. M. Anner, E. Allemann, E. Doelker, and R. Gurny. 1994. Internalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by isolated human leukocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles. *J Biomed Mater Res* 28: 471-81.
- Liang, B. C., A. F. Thornton, Jr., H. M. Sandler, and H. S. Greenberg. 1991. Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *J Neurosurg* 75: 559-63.
- Lin, M. T., L. Pulkkinen, J. Uitto, and K. Yoon. 2000. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol* 39: 161-70.
- Liu, L., K. Xu, H. Wang, P. K. Tan, W. Fan, S. S. Venkatraman, L. Li, and Y. Y. Yang. 2009. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nat Nanotechnol* 4: 457-63.
- Liu, Z., Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang. 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1650-1662.
- Loiseau, P. M., L. Imbertie, C. Bories, D. Betbeder, and I. De Miguel. 2002. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1597-601.

- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.
- Lu, W., Y. Zhang, Y.-Z. Tan, K.-L. Hu, X.-G. Jiang, and S.-K. Fu. 2005. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *Journal of Controlled Release* 107: 428-448.
- Lukes, A., S. Mun-Bryce, M. Lukes, and G. A. Rosenberg. 1999. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 19: 267-84.
- Luo, D., and W. M. Saltzman. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18: 33-7.
- MacKay, J. A., D. F. Deen, and F. C. Szoka, Jr. 2005. Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Res* 1035: 139-53.
- Matsumura, Y., and H. Maeda. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46: 6387-92.
- Maxfield, F. R., and T. E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 121-32.
- Mayer, M. 1961. Complement and Complement fixation. In Kabat EA, Mayer MM, eds. *Experimental immunochemistry*; 2nd edn. Springfield, IL, USA: Thomas. 133-156.
- McDannold, N., N. Vykhodtseva, S. Raymond, F. A. Jolesz, and K. Hynynen. 2005. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol* 31: 1527-37.
- Menei, P., A. Croue, V. Daniel, A. Pouplard-Barthelaix, and J. P. Benoit. 1994. Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain. *J Biomed Mater Res* 28: 1079-85.
- Meresse, S., C. Delbart, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1989. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 53: 340-5.
- Messai, I., S. Munier, Y. Ataman-Ä-nal, B. Verrier, and T. Delair. 2003. Elaboration of poly(ethyleneimine) coated poly(D,L-lactic acid) particles. Effect of ionic strength on the surface properties and DNA binding capabilities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32: 293-305.
- Mitchell, P., D. W. Ellison, and A. D. Mendelow. 2005. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurol* 4: 413-22.
- Mitzner, S., S. Klammt, J. Stange, and R. Schmidt. 2006. Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods. *Ther Apher Dial* 10: 108-17.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, and J. C. Murray. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53: 283-318.
- Moingeon, P. 2001. Cancer vaccines. *Vaccine* 19: 1305-26.
- Moos, T., T. Rosengren Nielsen, T. Skjorringe, and E. H. Morgan. 2007. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 103: 1730-40.
- Moreau, E., M. Domurado, P. Chapon, M. Vert, and D. Domurad. 2002. Biocompatibility of polycations: in vitro agglutination and lysis of red blood cells and in vivo toxicity. *J Drug Target* 10: 161-73.
- Morris, M. C., P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25: 2730-6.

- Mosqueira, V. C., P. Legrand, R. Gref, B. Heurtault, M. Appel, and G. Barratt. 1999. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *J Drug Target* 7: 65-78.
- Mudhakir, D., H. Akita, E. Tan, and H. Harashima. 2008. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Control Release* 125: 164-73.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, and F. R. Maxfield. 1997. Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803.
- Muldoon, L. L., C. Soussain, K. Jahnke, C. Johanson, T. Siegal, Q. R. Smith, W. A. Hall, K. Hynnen, P. D. Senter, D. M. Peereboom, and E. A. Neuwelt. 2007. Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol* 25: 2295-305.
- Muller, R. H., M. Radtke, and S. A. Wissing. 2002a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242: 121-8.
- . 2002b. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 54 Suppl 1: S131-55.
- Muller, R. H., and K. H. Wallis. 1993. Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908. *International Journal of Pharmaceutics* 89: 25-31.
- Muller-Eberhard, H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annual Review of Biochemistry* 57: 321-347.
- Murthy, N., M. Xu, S. Schuck, J. Kunisawa, N. Shastri, and J. M. Frechet. 2003. A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: acid-degradable protein-loaded microgels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4995-5000.
- Nabi, I. R., and P. U. Le. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161: 673-7.
- Neves, C., V. Escriou, G. Byk, D. Scherman, and P. Wils. 1999. Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 15: 193-202.
- Newman, C. M., and T. Bettinger. 2007. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther* 14: 465-75.
- Ng, C. P., T. T. Goodman, I. K. Park, and S. H. Pun. 2009. Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility. *Biomaterials* 30: 951-8.
- Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 153: 529-41.
- Niidome, T., and L. Huang. 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 9: 1647-52.
- Nishiyama, N., A. Iriyama, W. D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, and K. Kataoka. 2005. Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat Mater* 4: 934-41.
- Nobs, L., F. Buchegger, R. Gurny, and E. Allemann. 2003. Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. *Int J Pharm* 250: 327-37.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster, and A. J. Lange. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19: 379-406.
- Paillard, A., C. Passirani, P. Saulnier, M. Kroubi, E. Garcion, J. P. Benoit, and D. Betbeder. 2009. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. *Pharm Res*.
- Panyam, J., and V. Labhasetwar. 2003a. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 329-47.

- . 2003b. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 20: 212-20.
- Panyam, J., W. Z. Zhou, S. Prabha, S. K. Sahoo, and V. Labhasetwar. 2002. Rapid endolysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb J* 16: 1217-26.
- Pardridge, W. M. 2003. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 3: 90-105, 51.
- Pardridge, W. M., and G. Fierer. 1990. Transport of tryptophan into brain from the circulating, albumin-bound pool in rats and in rabbits. *J Neurochem* 54: 971-6.
- Passirani, C., and J. P. Benoit. 2005. Complement activation by injectable colloidal drug carriers. Pages 187-230 in R. I. Mahato, ed. *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*. New York: CRC.
- Pearse, B. M., and M. S. Robinson. 1984. Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *Embo J* 3: 1951-7.
- Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2: 751-60.
- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118: 767-80.
- Pelkmans, L., and A. Helenius. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15: 414-22.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: 473-83.
- Pereira, M. A., V. C. Mosqueira, J. M. Vilela, M. S. Andrade, G. A. Ramaldes, and V. N. Cardoso. 2008. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc-HMPAO: release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *Eur J Pharm Sci* 33: 42-51.
- Peters Jr., T. 1977. Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clinical Chemistry* 23: 5-12.
- Peters, T., Jr., B. Fleischer, and S. Fleischer. 1971. The biosynthesis of rat serum albumin. IV. Apparent passage of albumin through the Golgi apparatus during secretion. *J Biol Chem* 246: 240-4.
- Pinnaduwege, P., L. Schmitt, and L. Huang. 1989. Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim Biophys Acta* 985: 33-7.
- Pinto Reis, C., R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2: 8-21.
- Pizzagalli, F., B. Hagenbuch, B. Stieger, U. Klenk, G. Folkers, and P. J. Meier. 2002. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 16: 2283-96.
- Pollard, H., J. S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J. P. Behr, and D. Escande. 1998. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 7507-11.
- Prabha, S., W. Z. Zhou, J. Panyam, and V. Labhasetwar. 2002. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* 244: 105-15.
- Prieur, E., D. Betbeder, F. Niedergang, M. Major, A. Alcover, J. L. Davignon, and C. Davrinche. 1996. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-

- early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T-cell clones in vitro. *Vaccine* 14: 511-20.
- Quinlan, G. J., G. S. Martin, and T. W. Evans. 2005. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41: 1211-9.
- Quintanar-Guerrero, D., E. Allemann, H. Fessi, and E. Doelker. 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 24: 1113-28.
- Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5: 85-7.
- Rahman, A., G. White, N. More, and P. S. Schein. 1985. Pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation in mice of doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Research* 45: 796-803.
- Ram, Z., K. W. Culver, E. M. Oshiro, J. J. Viola, H. L. DeVroom, E. Otto, Z. Long, Y. Chiang, G. J. McGarrity, L. M. Muul, D. Katz, R. M. Blaese, and E. H. Oldfield. 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3: 1354-61.
- Ramachandra, M., S. V. Ambudkar, D. Chen, C. A. Hrycyna, S. Dey, M. M. Gottesman, and I. Pastan. 1998. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* 37: 5010-9.
- Rameez, S., H. Alost, and A. F. Palmer. 2008. Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconjug Chem* 19: 1025-32.
- Rao, V. V., J. L. Dahlheimer, M. E. Bardgett, A. Z. Snyder, R. A. Finch, A. C. Sartorelli, and D. Piwnica-Worms. 1999. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3900-5.
- Razafindratsita, A., N. Saint-Lu, L. Mascarell, N. Berjont, T. Bardon, D. Betbeder, L. Van Overtvelt, and P. Moingeon. 2007. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J Allergy Clin Immunol* 120: 278-85.
- Razani, B., X. L. Zhang, M. Bitzer, G. von Gersdorff, E. P. Bottinger, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 276: 6727-38.
- Recht, L., C. O. Torres, T. W. Smith, V. Raso, and T. W. Griffin. 1990. Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for brain-tumor immunotherapy. *J Neurosurg* 72: 941-5.
- Redhead, H. M., S. S. Davis, and L. Illum. 2001. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release* 70: 353-63.
- Reese, T. S., and M. J. Karnovsky. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207-17.
- Rejman, J., V. Oberle, I. S. Zuhorn, and D. Hoekstra. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 377: 159-69.
- Ricka, J., and T. Tanaka. 1984. Swelling of ionic gels: Quantitative performance of the Donnan theory. *Macromolecules* 17: 2916-2921.
- Rodriguez-Baeza, A., F. Reina-de la Torre, A. Poca, M. Marti, and A. Garnacho. 2003. Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 273: 583-93.

- Roger, E., F. Lagarce, and J. P. Benoit. 2009. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 379: 260-5.
- Rolland, J. P., B. W. Maynor, L. E. Euliss, A. E. Exner, G. M. Denison, and J. M. DeSimone. 2005. Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials. *J Am Chem Soc* 127: 10096-100.
- Rols, M. P., and J. Teissie. 1998. Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* 75: 1415-23.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-82.
- Roullin, V.-G., J.-R. Deverre, L. Lemaire, F. Hindré, M.-C. Venier-Julienne, R. Vienet, and J.-P. Benoit. 2002. Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: An experimental study using [3H](6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53: 293-299.
- Rozema, D. B., D. L. Lewis, D. H. Wakefield, S. C. Wong, J. J. Klein, P. L. Roesch, S. L. Bertin, T. W. Reppen, Q. Chu, A. V. Blokhin, J. E. Hagstrom, and J. A. Wolff. 2007. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12982-7.
- Rubin, L. L., and J. M. Staddon. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22: 11-28.
- Rust, M. J., M. Lakadamyali, F. Zhang, and X. Zhuang. 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11: 567-73.
- Saffarian, S., E. Cocucci, and T. Kirchhausen. 2009. Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol* 7: e1000191.
- Sahiner, N., W. T. Godbey, G. L. McPherson, and V. T. John. 2006. Microgel, nanogel and hydrogel-hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: Synthesis and characterization. *Colloid and Polymer Science* 284: 1121-1129.
- Sahoo, S. K., J. Panyam, S. Prabha, and V. Labhasetwar. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release* 82: 105-14.
- Saito, R., M. T. Krauze, C. O. Noble, D. C. Drummond, D. B. Kirpotin, M. S. Berger, J. W. Park, and K. S. Bankiewicz. 2006. Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model. *Neuro Oncol* 8: 205-14.
- Sampath, P., E. Amundson, M. E. Wall, B. M. Tyler, M. C. Wani, L. M. Alderson, M. Colvin, H. Brem, and J. D. Weingart. 2003. Camptothecin analogs in malignant gliomas: comparative analysis and characterization. *J Neurosurg* 98: 570-7.
- Santos, N. C., A. M. A. Sousa, D. Betbeder, M. Prieto, and M. A. R. B. Castanho. 1997. Structural characterization of organized systems of polysaccharides and phospholipids by light scattering spectroscopy and electron microscopy. *Carbohydrate Research* 300: 31-40.
- Sasaki, K., K. Kogure, S. Chaki, Y. Nakamura, R. Moriguchi, H. Hamada, R. Danev, K. Nagayama, S. Futaki, and H. Harashima. 2008. An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem* 391: 2717-27.
- Sato, K., and N. Garti. 1988. Crystallisation of fats and fatty acids in K. Sato and N. Garti, eds. *Crystallisation and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*. Marcel Dekker Inc.
- Saupe, A., K. C. Gordon, and T. Rades. 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int J Pharm* 314: 56-62.

- Scheule, R. K., J. A. St George, R. G. Bagley, J. Marshall, J. M. Kaplan, G. Y. Akita, K. X. Wang, E. R. Lee, D. J. Harris, C. Jiang, N. S. Yew, A. E. Smith, and S. H. Cheng. 1997. Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. *Hum Gene Ther* 8: 689-707.
- Schinkel, A. H., U. Mayer, E. Wagenaar, C. A. Mol, L. van Deemter, J. J. Smit, M. A. van der Valk, A. C. Voordouw, H. Spits, O. van Tellingen, J. M. Zijlmans, W. E. Fibbe, and P. Borst. 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4028-33.
- Seematter, G., R. Chioloro, and L. Tappy. 2009. [Glucose metabolism in physiological situation]. *Ann Fr Anesth Reanim* 28: e175-80.
- Shive, M. S., and J. M. Anderson. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 28: 5-24.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324.
- Sonawane, N. D., F. C. Szoka, Jr., and A. S. Verkman. 2003. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* 278: 44826-31.
- Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70: 1-20.
- Soussan, E., S. Cassel, M. Blanzat, and I. Rico-Lattes. 2009. Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 274-88.
- Steinman, R. M., I. S. Mellman, W. A. Muller, and Z. A. Cohn. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology* 96: 1-27.
- Stolnik, S., M. C. Davies, L. Illum, S. S. Davis, M. Boustta, and M. Vert. 1994a. The preparation of sub-200 nm biodegradable colloidal particles from poly (β -malic acid-co-benzyl malate) copolymers and their surface modification with Poloxamer and Poloxamine surfactants. *Journal of Controlled Release* 30: 57-67.
- Stolnik, S., S. E. Dunn, M. C. Garnett, M. C. Davies, A. G. Coombes, D. C. Taylor, M. P. Irving, S. C. Purkiss, T. F. Tadros, S. S. Davis, and et al. 1994b. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm Res* 11: 1800-8.
- Strebhardt, K., and A. Ullrich. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8: 473-80.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-96.
- Sukhorukov, B. I., R. L. Kazapian, A. I. Petrov, and G. B. Sukhorukov. 1998. [The dual stabilizing and destabilizing effect of decylamine on DNA structure and stability]. *Biofizika* 43: 427-32.
- Tamai, I., J. Nezu, H. Uchino, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji. 2000. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 251-60.
- Tanaka, H., and K. Mizojiri. 1999. Drug-protein binding and blood-brain barrier permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 912-8.
- Tatard, V. M., L. Sindji, J. G. Branton, A. Aubert-Pouessel, J. Colleau, J. P. Benoit, and C. N. Montero-Menei. 2007. Pharmacologically active microcarriers releasing glial cell line

- derived neurotrophic factor: Survival and differentiation of embryonic dopaminergic neurons after grafting in hemiparkinsonian rats. *Biomaterials* 28: 1978-88.
- Torchilin, V. P. 2006. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 343-75.
- Tousignant, J. D., A. L. Gates, L. A. Ingram, C. L. Johnson, J. B. Nietupski, S. H. Cheng, S. J. Eastman, and R. K. Scheule. 2000. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther* 11: 2493-513.
- Uchegbu, I. F., A. G. Schatzlein, L. Tetley, A. I. Gray, J. Sludden, S. Siddique, and E. Moshá. 1998. Polymeric chitosan-based vesicles for drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 50: 453-8.
- Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-80.
- Van Butsele, K., R. Jā@rā́me, and C. Jā@rā́me. 2007. Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *Polymer* 48: 7431-7443.
- Van Butsele, K., P. Sibret, C. A. Fustin, J. F. Gohy, C. Passirani, J. P. Benoit, R. Jerome, and C. Jerome. 2009. Synthesis and pH-dependent micellization of diblock copolymer mixtures. *J Colloid Interface Sci* 329: 235-43.
- Vasir, J. K., and V. Labhasetwar. 2007. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 718-28.
- . 2008. Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* 29: 4244-52.
- Vavra, M., M. J. Ali, E. W. Kang, Y. Navalitloha, A. Ebert, C. V. Allen, and D. R. Groothuis. 2004. Comparative pharmacokinetics of ¹⁴C-sucrose in RG-2 rat gliomas after intravenous and convection-enhanced delivery. *Neuro Oncol* 6: 104-12.
- Verma, A., O. Uzun, Y. Hu, H. S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine, and F. Stellacci. 2008. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater* 7: 588-95.
- Veronese, F. M., and G. Pasut. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10: 1451-8.
- Vescovi, A. L., R. Galli, and B. A. Reynolds. 2006. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6: 425-36.
- Veziers, J., M. Lesourd, C. Jollivet, C. Montero-Menei, J. P. Benoit, and P. Menei. 2001. Analysis of brain biocompatibility of drug-releasing biodegradable microspheres by scanning and transmission electron microscopy. *J Neurosurg* 95: 489-94.
- Vinchon-Petit, S., D. Jarnet, A. Paillard, J. P. Benoit, E. Garcion, and P. Menei. 2009. In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy. *J Neurooncol*.
- Vinogradov, S., E. Batrakova, S. Li, and A. Kabanov. 1999. Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells. *Bioconjug Chem* 10: 851-60.
- Vinogradov, S. V., E. V. Batrakova, and A. V. Kabanov. 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem* 15: 50-60.
- Visscher, G. E., R. L. Robison, H. V. Maulding, J. W. Fong, J. E. Pearson, and G. J. Argenterii. 1986. Biodegradation of and tissue reaction to poly(DL-lactide) microcapsules. *J Biomed Mater Res* 20: 667-76.
- Voigt, A., and F. Zintl. 1999. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *Journal of Biotechnology* 68: 213-226.

- Vonarbourg, A., C. Passirani, L. Desigaux, E. Allard, P. Saulnier, O. Lambert, J. P. Benoit, and B. Pitard. 2009. The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* 30: 3197-204.
- Vonarbourg, A., C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit. 2006a. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27: 4356-73.
- Vonarbourg, A., C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, and J. P. Benoit. 2006b. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 78: 620-8.
- Vonarbourg, A., P. Saulnier, C. Passirani, and J. P. Benoit. 2005. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* 26: 2066-75.
- Wallner, K. E., J. H. Galicich, G. Krol, E. Arbit, and M. G. Malkin. 1989. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 1405-9.
- Ward, C. M., M. L. Read, and L. W. Seymour. 2001. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood* 97: 2221-9.
- Wasungu, L., and D. Hoekstra. 2006. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 116: 255-64.
- Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15: 821-50.
- Westphal, M., K. Lamszus, and D. Hilt. 2003. Intracavitary chemotherapy for glioblastoma: present status and future directions. *Acta Neurochir Suppl* 88: 61-7.
- Working, P. K., M. S. Newman, J. Johnson, and J. B. Cornacoff. 1997. *Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives*.
- Wrobel, I., and D. Collins. 1995. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1235: 296-304.
- Xu, Y., and F. C. Szoka, Jr. 1996. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35: 5616-23.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, and Y. Ikada. 1994. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 83: 601-6.
- Yew, N. S., K. X. Wang, M. Przybylska, R. G. Bagley, M. Stedman, J. Marshall, R. K. Scheule, and S. H. Cheng. 1999. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 10: 223-34.
- Yew, N. S., H. Zhao, I. H. Wu, A. Song, J. D. Tousignant, M. Przybylska, and S. H. Cheng. 2000. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* 1: 255-62.
- Yu, S., P. Yao, M. Jiang, and G. Zhang. 2006. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. *Biopolymers* 83: 148-158.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, and M. J. Welsh. 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270: 18997-9007.
- Zelphati, O., and F. C. Szoka, Jr. 1996. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11493-8.
- Zemel, A., D. R. Fattal, and A. Ben-Shaul. 2003. Energetics and self-assembly of amphipathic peptide pores in lipid membranes. *Biophysical Journal* 84: 2242-2255.

- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 107-117.
- Zorko, M., and U. Langel. 2005. Cell-penetrating peptides: Mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 529-545.

Curriculum Vitae

PAILLARD Archibald

81 Boulevard Albert Camus

49100 ANGERS

archibald.paillard@etud.univ-angers.fr

Portable : 06 62 04 84 47.

Laboratoire : Unité INSERM 646 « Ingénierie de la vectorisation particulière »

10 rue André Bocquel

49100 ANGERS

Tel : 02 41 73 58 70.

Né le 17 février 1981 à Paris.

Nationalité Française.

Expérience professionnelle :

Janvier 2006-Décembre 2009.

- Stage de Doctorat sous la direction du Docteur Emmanuel Garcion, dans le laboratoire Inserm U646 "Ingénierie de la vectorisation particulière" d'Angers dirigé par le Professeur Jean-Pierre Benoit.

Juillet 2004-Octobre 2005.

- Stage de Master 2 sous la direction du Professeur Didier Betbeder, dans le Laboratoire EA2465 "Physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique" de Lens dirigé par Le Professeur Roméo Cecchelli.

Domaine de compétences :

Biologie.

- Culture cellulaire : Culture primaire, Lignées, Modèle de gliome (F98, 9L).
Modèle de Barrière Hémato Encéphalique (BHE),
- Cytométrie en flux, Immunohistochimie, Western blot, siRNA.
- Microscopie photonique, Microscopie confocale, Fluorescence, FRET.
- Endocytose, Trafic vésiculaire, Fractionnement cellulaire, Intégrité lysosomale.
- Test CH50, pour la consommation des protéines du complément
- Perméabilité transcellulaire (C14).

Nano-Biosciences du médicament.

- Synthèse de Nanocapsules lipidiques.
- Synthèse de Nanoparticules polysaccharidiques.
- Encapsulation d'agents anticancéreux et de traceurs fluorescents.
- Granulométrie laser, Zétamétrie, Test haemolytique du CH50 (activation du complément).
- Dialyse, Exclusion.
- Radiotraçage : Incorporation de complexes lipophiles (Technétium, Rhénium).

Formation – Diplômes :

- **Doctorat** en cours **Débuté en janvier 2006**
Allocation de 4 ans du Comité Départemental de Maine-et-Loire de la Ligue Nationale Contre le Cancer.
- **Master 2^{ème} année recherche** : Biologie-Santé à l'Université de Lille 2 **2005**

- **Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie** à l'Université de Lille 1 **2004**
Option Physiologie animale
 - **Licence de Biologie cellulaire et Physiologie** à l'Université de Lille 1 **2003**
 - **DEUG Sciences et Technologies,** **2002**
Option Sciences de la vie à l'Université de Lille 1
 - **Baccalauréat général série scientifique** (mention Bien) **1999**
-

Co-encadrement :

- 2008** - Suivi d'un stagiaire de DUT Génie Biologique (IUT d'Angers)
 - **Pascal Gabard** – *"Etude par interférence ARN des modes d'entrée de nanovecteurs d'agents anticancéreux dans les cellules de gliomes"*.
 - 2007** - Suivi d'une stagiaire Erasmus de l'Université de Regensburg (Allemagne)
 - **Anne Pauly** - *"Etude de l'action de nanovecteurs endocytosés sur l'intégrité lysosomale"*.
 - 2006** - Suivi d'une stagiaire de Master I en Biologie Cellulaire (Le Mans)
 - **Hélène Dervaux** - *"Etude de la localisation subcellulaire de nanocapsules lipidiques et d'agents anticancéreux dans les cellules de gliomes"*.
-

Collaborations :

Collaboration avec le Pr Didier Betbéder et la doctorante J. Chang de l'EA 2689 Laboratoire de Physiologie de Lens.

Collaborations avec le Pr. Igor Chourpa du Laboratoire de Chimie Analytique de Tours.

Articles :

- 1 – Y. Jallouli, **A. Paillard**, J. Chang, E. Sevin, D. Betbeder. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro [International Journal of Pharmaceutics](#), **344** (1-2) **2007** : 103-109.
- 2 – E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, **A. Paillard**, A. Aubert-Pouëssel, B. Denizot, P. Menei, JP. Benoit. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumour progression in rats. **Molecular Cancer Therapeutics**, **5** (7) **2006** : 1710-1722.
- 3 – S. Vinchon-Petit, D. Jarnet, **A. Paillard**, JP. Benoit, E. Garcion, P. Menei. In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused in intracranial tumours by convection-enhanced delivery: diffusion and radiosensitization efficacy. **Journal of Neuro-Oncology**, accepted, X(X) **2009** : XXX-XXX

- 4 – **A. Paillard**, C. Passirani, P. Saulnier, M. Kroubi, E. Garcion, J-P. Benoît, D. Betbeder
Positively-charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic
Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. **Pharmaceutical Research**,
accepted, X (X) **2009** : XXX - XXX
-

Communications Scientifiques orales :

1 – Adressage intracellulaire et mécanisme d'action de nanovecteurs pour la thérapie des gliomes

A. Paillard, E. Garcion.

Sur invitation au 9^{ème} Colloque sur la politique de recherche de la Ligue Contre le Cancer à Rennes du **26 et 27 janvier 2007**.

2 - Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood brain barrier.

Y.Jallouli, **A.Paillard**, J.Chang, E.Sevin, D.Betbeder.

Aux XXI^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V. Paris **13 - 15 Décembre 2006**

3 - Insertion of lipids in cationic nanoparticles cancels complement activation.

C. Passirani, M. Moreau, **A. Paillard**, J.P. Benoît, D. Betbeder.

Aux 15th Symposium International de la Microencapsulation à Parme, Italy, **18-21 Septembre 2005**.

4 - L'analyse du comportement des Nanocapsules Lipidiques dans les cellules cancéreuses révèle leur aptitude pour l'échappement lysosomal et une activité pharmacologique taille dépendante.

A. Paillard, M. Moreau, F. Hindré, JP. Benoit, E. Garcion

Aux 3èmes Journées de IFR132, **29 mai 2009**. =>**Lauréat de la meilleure communication orale**

Communications Scientifiques affichées :

1 - Biological crosstalk between lipid nanocapsules and cancer cells reveals new links to endocytosis, lysosome status and pharmacological activity.

A. Paillard, JP. Benoit, E. Garcion

2nd International Symposium "Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules, Cardiff, UK, **Sunday June 22nd - Wednesday June 25th 2008**

2 - Systematic study of biological interactions between lipid nanocarriers and cancer cells reveals new links to endocytosis and lysosome integrity.

A. Paillard, M. Moreau, F. Hindré, JP. Benoit, E. Garcion

6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, **Barcelona, Spain, 7th to 10th April 2008**

3 - Combined effects of radiotherapy and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules infused by convection-enhanced delivery in the 9L intracranial rat glioma model.

S. Vinchon-Petit, D.Jarnet, **A. Paillard**, JP. Benoit, E. Garcion, P. Menei

XXI^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.
Paris, 13-15 Décembre 2006

4 - Nanovectorisation and subcellular targeted administration of pro-apoptotic molecules for glioma therapy : combination of the molecule HA14-1 and etoposide

F. Manero, **A. Paillard**, D. Grée, R. Grée, P. Coursaget, JP. Benoit, P. Menei, E. Garcion
XXI^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.

Paris, 13-15 Décembre 2006

5 - Characterization of the mechanisms involved in the uptake of biomimetic lipid nanocarriers by rat glioma cells reveals a rapid size-dependent internalization and a major contribution for endogenous cholesterol.

A. Paillard, F. Manero, M. Moreau, F. Hindré, P. Menei, JP. Benoit, E. Garcion
XXI^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.

Paris, 13-15 Décembre 2006

6 - Evaluation of neutral or cationic 60 nm nanoparticles as delivery systems of proteins on an in vitro model of blood brain barrier.

A. Paillard, Y. Jallouli, J. Chang, R. Cecchelli, D. Betbeder
XX^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.

Montpellier, 1 - 2 Décembre 2005

=> **Lauréat du Prix Debio R.P.**

7 - Complement activation by porous cationic nanoparticles.

C., Passirani, M., Moreau, A., Paillard, J-P, Benoît, D. Betbeder

XX^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.

Montpellier, 1 - 2 Décembre 2005

8 - Characterisation of the different steps allowing neutral and cationic polysaccharidic nanoparticles to cross Blood-Brain Barrier.

D. Betbeder, **A. Paillard**, Y. Jallouli, V. Landry, F. Miller, C. Landry, R.Cecchelli
7^{ème} colloque des Neurosciences.

Lille, 20 au 21 mai 2005.

9- Caractérisation des mécanismes de passage de nanoparticules à travers la barrière hémato-encéphalique

A. Paillard, V. Landry, V. Monnaert, F. Miller, C. Landry, R. Cecchelli, V. Buée, D. Betbeder.
XIX^{èmes} Journées Scientifiques du G.T.R.V.

Paris, 16-17 décembre 2004.

Articles en cours de rédaction :

1- Analysis of the subcellular behaviour of lipid nanocapsules in cancer cells reveals specific skills for lysosome escape and size-dependent pharmacological activity.

A. Paillard, F. Hindré, JP. Benoit, E. Garcion

2- Protein adsorption onto the surface of PLGA nanoparticles governs their interactions with biological systems from blood to brain cancer cells

A. Paillard[#], J.Chang[#], C. Passirani, M. Morille, J.P. Benoît, D. Betbeder, E. Garcion

[#] = contribution équivalente

Résumé

En se focalisant sur l'administration de médicaments dans et vers le système nerveux central et notamment pour le traitement du glioblastome, ce travail de thèse a eu pour but la mise en place d'outils expérimentaux et l'évaluation du comportement de nanovecteurs au cours du franchissement de barrières biologiques. Trois types de nanovecteurs de taille variant entre 20 et 100nm ont été appréhendés : des nanoparticules de polysaccharide, de PLGA et des nanocapsules lipidiques (LNC). Le comportement de ces objets vis-à-vis des éléments du sang a permis de définir que le revêtement par la transferrine de nanoparticules de PLGA et l'insertion de phospholipides ou de BSA dans des nanoparticules polysaccharidiques diminuait leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial et améliorait leur temps de résidence plasmatique. Ces modifications de surface sont également associées à une possibilité d'internalisation dans les cellules cibles F98 de gliomes influencée essentiellement par la nature lipidique ou polymérique du vecteur. L'évaluation précise du comportement cellulaire et subcellulaire des LNC dans les cellules F98 a permis de démontrer que si la nature du vecteur est impliquée notamment en ce qui concerne le recrutement de voies d'endocytoses cholestérol-dépendantes, la taille, corrélée au taux de surfactant véhiculé, est également impliquée. Les LNC de 20nm sont ainsi les plus aptes à permettre l'échappement lysosomal des principes actifs véhiculés et démontrent des activités pharmacologiques renforcées notamment pour ce qui concerne la mort cellulaire induite par le paclitaxel. Ces résultats établissent donc un lien original entre le comportement subcellulaire des vecteurs et la biodisponibilité des agents anticancéreux. De nouvelles potentialités de franchissement de barrières ligand- ou taille-dépendants ont été soulignées. Ces observations renforcent donc l'intérêt d'études comparatives permettant de rationaliser l'utilisation d'un vecteur donné pour un médicament et une cible donnés. Elles démontrent également tout l'intérêt d'établir des justifications entre le comportement biologique et la pertinence thérapeutique des nanovecteurs.

Mots clés : glioblastome, cancer, nanocapsule lipidique, nanoparticule polysaccharidique, nanoparticule de PLGA, barrière hémato-encéphalique, monocytes-macrophages, endocytose, trafic intracellulaire, échappement lysosomal.

Abstract

By focusing on drug administration within and to the central nervous system and notably on glioblastoma, the aim of the present PhD thesis work was to develop tools and evaluate the behavior of particulate nanocarriers as regards to biological barrier crossing. Three types of nanocarriers with sizes varying from 20 to 100 nm were evaluated: polysaccharide nanoparticles, PLGA nanoparticles, and lipid nanocapsules. The behavior of those objects concerning blood constituents allowed to define that coating with transferrine of PLGA nanoparticles or insertion of phospholipids or BSA within polysaccharide nanoparticles reduce their recognition by the reticulo-endothelial system and improve their plasma-resident time. Those surface modifications are also associated with a possibility of internalization in F98 glioma target cells essentially influenced by the lipid or polymeric nature or the carrier. Clear-cut evaluation of the cellular and subcellular behavior of LNC within F98 cells allowed to demonstrate that if the nature of the carrier is involved, notably considering the recruitment of cholesterol-dependant endocytic pathways, the size, correlated to amounts of surfactant provided, had also its significance. 20nm LNC are consequently the more apt to allow lysosome escape of transported drug and demonstrated higher pharmacological activities in inducing cell death through paclitaxel loading. Those results provide, therefore, original links between the subcellular behavior of nanocarrier and the bioavailability anticancer drugs. New potentialities of biological barrier crossing and size-dependent abilities were demonstrated. Those observations emphasize the interest of developing comparative studies in order to rationalize the use of a define nanocarrier for a given drug on a given target. Regarding new nanomedicines development, it demonstrates the importance to establish justification between biological behavior of nanocarriers and their therapeutic relevance.

Keywords : glioblastoma, cancer, lipid nanocapsules, polysaccharide nanoparticules, PLGA nanoparticules, blood-brain barrier, monocytes-macrophages, endocytosis, intracellular trafficking, lysosome escape.