



HAL
open science

Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées : un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation

Marion Pitorre

► To cite this version:

Marion Pitorre. Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées : un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0074 . tel-02188202

HAL Id: tel-02188202

<https://theses.hal.science/tel-02188202>

Submitted on 18 Jul 2019

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.

Thèse de Doctorat

Marion Pitorre

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Sciences pharmaceutiques

Spécialité : Pharmacologie expérimentale et clinique

Unité de recherche : INSERM U1066 / CNRS 6021

Soutenue le 9 juin 2017

Thèse N° : 177955

Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées : un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation.

JURY

Rapporteurs :	Aurélie MALZERT-FREON , Professeur, Université de Caen Véronique SCHMITT , Directeur de recherche, Centre de Recherche Paul Pascal
Examineurs :	Emilie ALLARD-VANNIER , Maître de conférences, Université de Tours
Directeur de Thèse :	Jean-Pierre BENOIT , Professeur, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	Guillaume BASTIAT , Maître de conférences, Université d'Angers

"La science est surtout une prise de conscience de plus en plus complète de ce qui peut et doit être découvert."

Boris Vian

Remerciements

Trois ans et quelques mois supplémentaires se sont écoulés depuis mon arrivée au sein de l'équipe Mint (INSERM U1066 – CNRS 6021). Cette période de thèse est autant de travail, de vie, d'aléas et de belles rencontres. Au travers de ces quelques lignes, je souhaite saluer toutes les personnes qui ont croisé de près ou de loin ma thèse. Il est toujours difficile dans ce type d'exercice d'être complètement exhaustif ; merci à ceux que j'oublie au moment où j'écris ces mots de ne pas m'en tenir une trop grande rigueur.

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse le Pr Jean-Pierre Benoit. Etre accueilli au sein du laboratoire Mint fut une grande chance. Votre œil avisé, votre expérience et vos conseils m'ont été extrêmement précieux. Veuillez trouver ici l'expression de ma très sincère reconnaissance.

Je tiens à adresser un remerciement sincère et tout particulier au Dr Guillaume Bastiat qui m'a encadrée. Tu as su voir en moi le potentiel pour ce travail avant que je ne le soupçonne moi-même. Tu m'as accordé ta confiance tout au long de ces trois ans. Nos échanges ont été aussi riches scientifiquement qu'humainement. Tu as su améliorer mes connaissances, ma réflexion et mon travail tout en m'accordant une très grande liberté. Merci pour ton soutien, ton dévouement sans faille et pour cette expérience unique, dont je me souviendrai longtemps.

Je remercie Mme Aurélie Malzern-Fréon, Professeur à l'Université de Caen, et Mme Véronique Schmitt, Directrice de recherche au Centre de Recherche Paul Pascal, d'avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie également Mme Emilie Allard-Vannier, Maître de conférences à l'Université de Tours, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineur.

Merci à chacune d'entre-elles pour leur collaboration respective, pour le temps et les efforts consacrés.

Je souhaite également saluer toutes les personnes qui ont été associées à ce travail et qui m'ont permis de mener à bien mon projet.

Tout d'abord, l'ensemble des membres du projets NICHE qui m'ont tous beaucoup apporté par leurs expériences et leurs échanges toujours enrichissants.

Je remercie particulièrement Giovanna pour ton énergie, tes conseils et ton délicieux accent qui m'a souvent rebaptisé. Notre escapade écossaise, nous a permis d'assouvir largement notre goût prononcé et commun pour le shopping.

Je tiens également à adresser une pensée à Thomas Perrier qui s'est toujours révélé être un agréable camarade de voyages. Merci pour tes conseils « d'ancien du labo ».

Je souhaite également saluer les nombreuses petites mains qui se sont relayées en stage tout au long du projet. Merci à Marie, Martina, Margaux, Giuseppe, Joaquim et Kevin pour leur grand investissement et leur bonne humeur. Kevin, mon seul « compatriote toulousain » ici, je te remercie pour ton aide (particulièrement en cette fin de thèse), ta gentillesse. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours au sein de MINT.

Je n'aurais pu mener ce travail seule et je souhaite témoigner de sincères remerciements aux différentes personnes qui m'ont aidée :

Laurence Dubreil (ONIRIS) et Rodolphe Perrot (SCIAM) pour leur grande expertise en microscopie, Benjamin Siegler (Moltech) pour sa sympathie et sa réactivité en RMN, Magali Allain (Moltech) qui s'est toujours révélé optimiste malgré nos résultats décevants en cristallographie.

Merci au Pr Marc Zandecki, au Pr Marie-Christine Rousselet-Chapeau et au Dr Valérie Moal pour leur assistance dans les analyses de mes prélèvements biologiques. Merci également à Jean-Luc Grandpierre pour sa chaleureuse aide dans le traitement des images de mes coupes histologiques.

Je tiens à adresser un immense merci à Pierre et Jérôme de l'animalerie (SCAHU). Vous m'avez formée, guidée et épaulée dans le monde de l'expérimentation animale et ce dès le début de ma thèse. Votre bonne humeur et votre compréhension m'ont permis d'apprécier le travail parmi les rongeurs (ce qui n'était pas gagné). Merci à Elodie Marie Dit Chatel, dont le travail de stage a permis l'avancement rapide d'une partie des essais in vivo.

Ensuite, je remercie tout particulièrement Jérôme Béjaud. Sous tes allures d'ours grognon, je sais que tu as un cœur tout mou. Tu t'es toujours montré disponible et patient face à mes nombreuses requêtes et interrogations. Tu m'as facilement fait une place avec toi sous ta hotte de chimiste, merci. Et surtout, grâce à toi je sais monter en « délicatesse » une colonne de chromatographie.

Il m'est impossible d'oublier Nolwenn Lautram. Un immense merci pour ta générosité et ta disponibilité. Tu es la pièce indispensable pour faire fonctionner la chromatographie, tout dépanner en toute circonstance, et surtout, pour gagner à coup sûr un concours de vitesse de marche dans les couloirs.

Je tiens à adresser un très grand remerciement à Jérémie Riou pour son expertise et son aide sans faille pour aborder les plans de mélange, les problèmes statistiques et la fin de thèse.

J'ai été élève au sein du Master 2 TIF et Brice Calvignac m'as permis d'y enseigner à mon tour. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée et pour cette formidable expérience que représente le monitorat.

Merci à Annie Vimond, Jean-Pierre Jandot et Jean-Luc Courthaudon de m'avoir permis de participer à l'organisation de la Nuit Européenne des Chercheurs 2015. Ce fut une expérience très enrichissante et forte de multiples rencontres.

J'ai particulièrement apprécié les échanges efficaces et constructifs que nous avons pu avoir avec Joël Eyer, ainsi qu'avec Claire et Kristell. Ceux-ci nous permettent d'espérer une belle continuité à cette thèse.

Merci à Chiara qui fournit entre Bruxelles et Angers un colossal travail. Ta détermination et ta gentillesse vont te mener loin j'en suis certaine. Bonne chance pour la fin de ta thèse !

Merci également à Fabienne, qui a été une amie avant d'être une collègue et que j'apprécie autant pour ses qualités professionnelles qu'humaines. Je te souhaite beaucoup de réussite et surtout de bonheur pour les nouvelles aventures qui t'attendent très prochainement.

Je souhaite témoigner toute ma gratitude à mon adorable stagiaire Le Thuy Trang Pham. Tu as fait preuve de beaucoup d'efficacité et de persévérance. Ton important travail a largement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je t'en remercie, je suis très heureuse de t'avoir côtoyé et je te souhaite le meilleur.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'équipe MINT : Laurent pour ton humour, ton goût sûr pour la pâtisserie et ton envie d'organiser des concours, Edith sans qui le fonctionnement du laboratoire serait bien plus difficile qu'il ne le semble, Florian pour ton aide toujours souriante aussi bien au laboratoire qu'à la faculté de pharmacie, Anne pour tes généreux conseils et ton immense connaissance de la culture cellulaire, Emilie R. avec qui j'ai pu partager un mariage bruxellois et l'organisation des séances de ménage de la salle de formulation (toujours nécessaires), Olivier avec qui j'ai partagé de nombreuses heures en salle de formulation, Patrick, Elise, Catherine, Marie-Claire, Johan, Jean-Christophe, Laurence, Natacha, Chantal, Hélène, Vincent, Alison, Sai Krishna, Shubaash, Rosemonde, Bathabile, Chithdavone, Florence, Minh Quan, Léna, Samuel, Assia, Anita, Janske.

Merci à mes collègues de bureau : Thomas, Guillaume, Swann, Milad et Carl. Vous avez su insuffler une ambiance agréable et studieuse parfaite pour travailler. Guillaume merci pour tes encouragements répétés tout au long de la rédaction !! Thomas, tu as été mon binôme de bureau à la fois au deuxième et au troisième étage mais également dans la coanimation du « service animation et jeunesse » (un vaste projet). Je retiendrai nos multiples blagues, nos blocs de tiroirs verts et les bières partagés. Je te souhaite pleins de succès pour la suite. « Et si tu ne sais pas quoi faire, écris une revue !!! »

Merci à mes copains de courses Aurélien et Thomas C. Les plus bavards ne sont pas toujours ceux que l'on croit !!

Merci à Fabien pour sa bienveillance, sa gentillesse et tous ses bons conseils !

Une pensée affectueuse pour Claire qui sait associer douceur et efficacité comme personne. Je suis très admirative de la façon dont tu arrives à mener de front une vie professionnelle palpitante et une vie personnelle bien remplie. J'ai hâte de rencontrer le dernier membre de ta famille !

Angélique, merci pour ta bonne humeur communicative, ton énergie inaltérable et ton grand cœur. Malgré les « mots interdits », j'adore ton franc -parler et toutes tes histoires mouvementées. Je garde pleins de bons souvenirs partagés avec toi et le beau Mathéo... du baroque à la Charentes !!

A Anne-Claire, ma copine normande d'adoption, merci pour ton sérieux, ton esprit scientifique et surtout pour ton entrain éternel pour papoter et boire des verres en terrasse. J'espère partager encore pleins d'aventures avec toi que ce soit en France ou plus loin. Je compte bien faire une tradition annuelle du : « Vous-êtes là Beauregard ? ».

Merci à Emilie qui a accompagné une grande partie de ma thèse. Merci pour tous les bons moments partagés autour d'un thé ou d'un mojito. Merci pour ton écoute, ton humour, ton dynamisme !! Tu m'as plus d'une fois prouvé à quel point je peux compter sur toi et j'espère pouvoir être une aussi bonne amie que tu l'as été pour moi.

Nada, nous sommes arrivées à Angers au même moment et nous avons débuté nos thèses en même temps. Tu finis quelques semaines plus tôt que moi et je suis très fière de te compter parmi mes amis. Je suis impressionnée par l'organisation, le sang-froid et la détermination avec lesquels tu as mené tes projets aussi bien professionnels que personnels. Je suis ravie d'avoir pu suivre leurs évolutions et leurs concrétisations. Garde ta joie de vivre, ton sourire et ta générosité... tu es définitivement mon « soleil » du labo ! Merci également pour ton implication dans le « club courses », les kilomètres parcourus m'ont semblé bien plus rapides en ta compagnie. Même loin, je serai disponible pour chanter « bialando, bailando, bailando oh oh oh ... » !

Vie professionnelle et personnelle ne sont jamais totalement dissociées, c'est pourquoi je me dois d'ajouter une note quelque peu plus personnelle.

Tout d'abord, merci à mes parents, Thérèse et Jean-Marc, qui m'ont toujours beaucoup encouragée et soutenue. Merci pour votre générosité, votre amour et votre ouverture d'esprit. Merci d'avoir nourri, dès mon plus jeune âge, ma gourmandise de vivre et ma curiosité du monde.

Merci à ma petite sœur, Agathe, pour ta complicité. Je crois que tu es la seule à avoir réclamé ce manuscrit et j'espère que sa lecture n'a pas été trop assommante. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et beaucoup de bonheur.

Une grande pensée affectueuse pour mes grands-parents, Hélène et Jacques. Merci pour votre indéfectible soutien, votre sourire, votre jeunesse d'esprit et votre tendresse.

Merci à mes cousines et cousins : Dorothée, Amandine, Audrey, Cédric, Romain, Mickaël, Chamil, Louis et Alban ; à mes tantes et oncles. Quelle chance d'avoir une grande famille qui continue à s'agrandir.

Merci à mes beaux-parents, Joëlle et Philippe, pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre famille et votre entrain très apprécié lors de nos multiples déménagements.

Pleins de love pour mes amis : Sophie, Marc et Frédéric, Valentin et Angélique, Adrien et Demian. Merci, d'être, même à distance, toujours présents dans ma vie. Vous êtes les amis les plus beaux, intelligents et éclectiques que l'on puisse rêver.

Merci à Karine pour nos multiples papotages, discussions futiles ou philosophiques ! Merci d'être toujours disponible. Tu me manques ma pétillante brunette !

Enfin, je remercie tout particulièrement Benoit. Merci pour ta confiance et ton soutien. Tu n'as pas hésité à me rejoindre à Angers et je ne t'en serai jamais assez reconnaissante. Garde encore longtemps intact ta décontraction, ta curiosité, ta gentillesse et ta tolérance. Merci de rendre ma vie bien plus joyeuse, tendre et colorée !

Sommaire

Introduction générale	1
I. NANOSYSTEMES	2
II. HYDROGELS	3
III. ASSOCIATION DES FORMES NANOSYSTEMES ET HYDROGELS	5
IV. CONTEXTE DE CE TRAVAIL DE THESE	10
IV.1. Hydrogels de nanosystèmes sans utilisation de réseau polymère	10
IV.2. Organogels	13
V. OBJECTIFS DE LA THESE	16
VI. BIBLIOGRAPHIE	17
Chapitre I :	22
Etat de l'art – Association de deux technologies pharmaceutiques : les nanosystèmes et les hydrogels	
I. AVANT-PROPOS	23
II. REVUE :	24
Recent advances in nanoparticle-loaded gels: which drug delivery technologies against which diseases?	
II.1. Abstract	24
II.2. Introduction	26
II.3. Liposomes-loaded gel...	27
II.4. Gels-loaded with micelles...	37
II.5. Gels loaded with liquid or solid lipid nanocapsules and polymeric nanoparticles...	40
II.6. Gels loaded with dendrimers	47
II.7. Gel-loaded with fullerene	49
II.8. Conclusion	50
II.9. Acknowledgments	50
III. BIBLIOGRAPHIE	51
Chapitre II :	56
Développement et caractérisation de deux plateformes gélifiées innovantes	
I. INTRODUCTION	57
II. MATERIEL	58
III. NANOCAPSULES LIPIDIQUES MODELES	59
III.1. Formulation et caractérisation des nanocapsules lipidiques	59
III.2. Notion de plan de mélange	64
III.3. Construction du plan de mélange	65
III.4. Modélisation de la taille des nanocapsules lipidiques	68
III.5. Choix de quatre formules	70
IV. SYNTHÈSE DES AGENTS DE RETICULATION ET CARACTERISATION	73
IV.1. Protocole de synthèse des agents de réticulation	73
IV.2. Résultats	74
V. DEVELOPPEMENT D'UN HYDROGEL DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES	78
V.1. Formulation des NCLs chargées en molécules lipophiles	78
V.2. Expériences préliminaires	79
V.3. Tensiométrie de goutte	79
V.4. Nanocapsules lipidiques chargées en Cyt-C16	81
V.5. Dosage de la Cytidine-C16 dans les formulations	83
V.6. Observation en microscopie confocale	84
V.7. Etude en rhéologie des hydrogels de NCLs	86
VI. DEVELOPPEMENT D'UN ORGANOGEL	97
VII. CONCLUSION	100
VIII. BIBLIOGRAPHIE	102

Chapitre III :	103
Evaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des plateformes gélifiées développées en vue de leur utilisation en tant que forme injectable	
I. INTRODUCTION	104
II. MATERIEL	105
III. STABILITE DES HYDROGELS DE NCLS	106
IV. EXTRUSION DES GELS AU TRAVERS D'UNE AIGUILLE	107
V. ETUDE DE LA LIBERATION DES NCLS A PARTIR DE L'HYDROGEL	109
V.1. Protocole de l'étude de libération des NCLS à partir de l'hydrogel	110
V.2. Résultats	112
VI. TOXICITE CELLULAIRE	113
VI.1. Protocole des études de cytotoxicité	114
VI.1.1. Lignée cellulaire THP1	116
VI.1.2. Lignée cellulaire B6-KPC3	116
VI.2. Résultats	117
VII. ETUDE DE TOLERANCE <i>IN VIVO</i>	119
VII.1. Méthode	119
VII.1.1. Bilan hématologique	120
VII.1.2. Bilan biochimique	120
VII.1.3. Analyse histologique	121
VII.2. Résultats	122
VIII. CONCLUSION	132
IX. BIBLIOGRAPHIE	134
Chapitre IV :	135
Devenir des nanocapsules lipidiques après leur injection sous-cutanée.	
I. AVANT-PROPOS	136
II. PUBLICATION: passive and specific targeting of lymph nodes: the influence of the administration route	138
III. BIBLIOGRAPHIE	146
Chapitre V :	147
Application des hydrogels de nanocapsules lipidiques au traitement du glioblastome	
I. INTRODUCTION	148
II. GLIOBLASTOME ET TRAITEMENTS ACTUELS	149
III. HYDROGEL DE NCLS A BASE DE GEM-C12	151
III.1. Formulation d'un hydrogel de NCLS-Gem-C12	151
III.2. Cinétique de libération <i>in vitro</i> des NCLS	152
III.3. Cytotoxicité <i>in vitro</i> des NCLS-Gem-C12	154
III.4. Efficacité anti-tumorale <i>in vivo</i> (modèle de glioblastome sous-cutané)	155
III.5. Tolérance dans le tissu cérébral à court terme	156
III.6. Conclusion	158
IV. HYDROGEL DE NCLS A BASE DE CYT-C16	158
V. CONCLUSION	161
VI. BIBLIOGRAPHIE	162
Discussion générale, conclusion et perspectives	165
I. DISCUSSION GENERALE	166
I.1. Contexte de ce travail	166
I.2. Interactions des molécules de Cyt-C16 entre-elles	167
I.3. Comportement des NCLS au sein des hydrogels	173
I.3. Particularités des formes hydrogels de NCLS	176
II. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	178
III. BIBLIOGRAPHIE	182

Abréviations

A		K	
AH	Acide hyaluronique	Kolliphor	Kolliphor® HS15
ALAT	Alanine aminotransférase	L	
ANOVA	Analysis of variance	Labrafac	Labrafac® WL 1349
ANSM	Agence Nationale de Santé et du Médicament	LCST	Lower Critical Solubility Temperature
ASAT	Aspartate aminotransférase	M	
B		m/m	Masse/masse
β-GP	β-glycerophosphate	MEB	Microscopie électronique à balayage
BHE	Barrière hémato-encéphalique	MET	Microscopie électronique en transmission
BSA	Albumine de sérum bovin	mPEG	Mono-methoxy poly(éthylène glycol)
C		MTS	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulphophényl)-2H-tétrazolium
CAT	Catalase	N	
CCM	Chromatographie sur couche mince	NaCl	Chlorure de sodium
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine	NCL	Nanocapsule lipidique
CH	Chitosan	NCLs-	NCLs réticulées avec la Gem-C12
CHOL	Cholesterol	Gem-C12	
CMC	Carboxymethylcellulose	NFL	Peptide NFL-TBS.40-63
Cyt	Cytidine	NP	Nanoparticule
Cyt-C12	4-(N)-lauroyl cytidine	NR	Rouge de Nile
Cyt-C14	4-(N)-myristoyl cytidine	NS	Nanosystème
Cyt-C16	4-(N)-palmitoyl cytidine	P	
Cyt-C18	4-(N)-stéaroyl cytidine	PA	Principe actif
Cyt-C18:1	4-(N)-oléoyl cytidine	PC	Phosphatidylcholine
D		PCL	Poly(ε-caprolactone)
DiD	1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate	PdI	Indice de polydispersité
DiO	Perchlorate de 3,3'-dioctadécylloxycarbocyanine	PE	Phosphatidyléthanolamine
DLS	Dynamic light scattering	PEG	Polyéthylène glycol
DMSO	Diméthylsulfoxyde deutéré	PEMA	poly(éthylène-co-acide maléique)
DSPE-	1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-	PES	Phénazine éthosulfate
mPEG2000	phosphoéthanolamine-N-[méthoxy-(polyéthylène glycol)2000]	PLGA	poly(D,L-acide lactique-co-acide glycolique)
E		PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
E/H	Eau dans huile	POA	Poly(anhydride octadécanoïque)
F		PTX	Paclitaxel
FBS	Sérum de veau fœtal	PVAm	Polyvinylamine
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment	PZ	Potentiel zêta
G		Q	
G'	Module élastique	Qsp.	Quantité suffisante pour
G''	Module visqueux	R	
Gem-C12	4-N-lauroyl gemcitabine	RMN	Résonance magnétique nucléaire
GOx	Glucose oxydase	RMN ¹ H	Spectre proton en résonance magnétique nucléaire
H		S	
H/E	Huile dans eau	SC	Sous-cutanée
HA	Hyaluronic acid	SNC	Système nerveux central
HEC	Hydroxyethyl cellulose	Span 80	Span® 80
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance	T	
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose	TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
HS	Huile de sésame	U	
I		UV	Ultraviolet
IRM	Imagerie par résonance magnétique	V	
IV	Intraveineux	v/v	Volume/volume
		VGM	Volume globulaire moyen
		VPM	Volume plaquette moyen
		Z	
		ZIP	Zone d'inversion de phases
		ZP	Zêta potential

Introduction générale

SOMMAIRE

I. NANOSYSTEMES	2
II. HYDROGELS	3
III. ASSOCIATION DES FORMES NANOSYSTEMES ET HYDROGELS	5
IV. CONTEXTE DE CE TRAVAIL DE THESE	10
IV.1. Hydrogels de nanosystèmes sans utilisation de réseau polymère	10
IV.2. Organogels.....	13
V. OBJECTIFS DE LA THESE	16
VI. BIBLIOGRAPHIE	17

I. Nanosystèmes

La Médecine possède un très large arsenal de molécules thérapeutiques disponibles pour de nombreuses pathologies. Cependant, le potentiel d'un grand nombre de ces molécules est encore sous exploité à cause de leurs propriétés, en particulier leur faible hydro-solubilité et leur faible biodisponibilité.

Les nanomédecines consistent en l'application des nanotechnologies à des visées médicales. Elles sont de plus en plus utilisées pour proposer des systèmes innovants de libération afin d'améliorer la pharmacocinétique et l'efficacité des principes actifs (PAs) existants.

Ces systèmes de libération peuvent être désignés par le terme généraliste de nanosystèmes (NSs). Les NSs sont caractérisées par une taille variant de quelques à plusieurs centaines nanomètres. En revanche, leurs compositions et leurs procédés de fabrication peuvent être très différents. Pour illustrer la variété des NSs, nous pouvons citer à titre d'exemple : les nanocapsules, les liposomes, les micelles, les nanoparticules polymères, les nanoparticules métalliques ou les dendrimères (Figure 1).

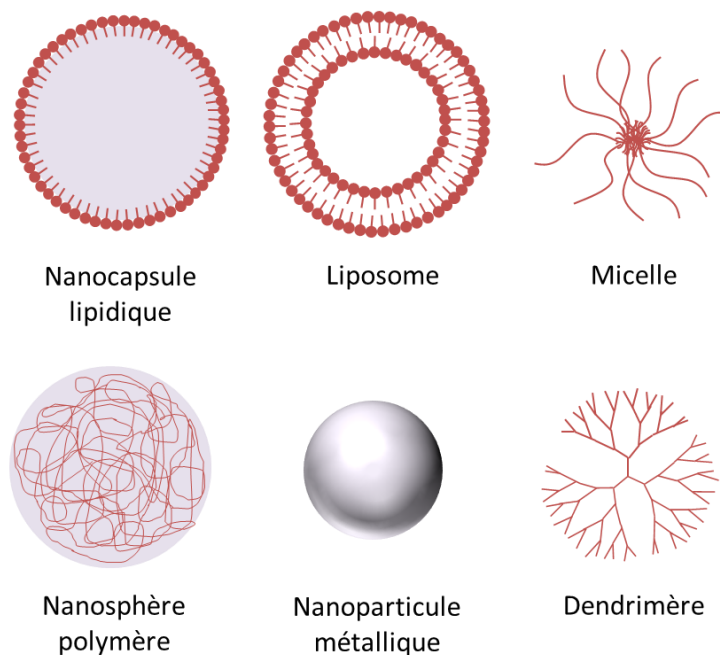


Figure 1 : Représentation schématisques de différents types de nanosystèmes.

Ces nano-objets offrent de nombreux avantages. Ils présentent une capacité de charge importante en PA et permettent de protéger les molécules sensibles à la dégradation. Les NSs peuvent également combiner plusieurs substances actives de nature identique ou différente. Elles permettent de mettre en œuvre des PAs lipophiles ce qui résout le problème de leur administration intraveineuse (IV). La structure des objets

peut donner la possibilité de moduler la libération du PA afin de contrôler et/ou de cibler son action pharmacologique. En général, le temps de circulation du PA dans l'organisme est prolongé.

De plus, les NSs modifient le profil pharmacocinétique et la biodistribution des PAs, ce qui permet d'améliorer leur action, de réduire les doses nécessaires et/ou de réduire les effets indésirables associés. Enfin, les petites tailles de ces objets facilitent leurs passages des différentes barrières biologiques (épithélium intestinal, milieu extracellulaire et membrane cellulaire, etc) et cette propriété peut être encore améliorée en modifiant leurs surfaces [1-6].

Grâce à ces différentes propriétés, de nombreuses nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les nanomédecines sont développées afin d'améliorer l'efficacité des traitements actuels. Les nanomédecines sont également utilisées pour des applications de diagnostic et d'ingénierie tissulaire [7-11].

Actuellement, les NSs ont principalement été développés pour des applications nécessitant des injections IV [12]. Lorsque la pathologie nécessite des injections répétées, la voie IV s'avère contraignante et pénible pour le patient tout en nécessitant l'intervention de personnel soignant qualifié. Le développement de forme à libération prolongée de NSs pourrait être une proposition judicieuse pour améliorer l'observance du patient et son confort en diminuant le nombre d'injections nécessaires.

Lorsqu'une forme suspension de NSs est injectée en sous-cutanée (SC), ceux-ci vont très rapidement être dispersés. Afin de prolonger leur libération, ils doivent être retenus sur leur site d'injection. Un moyen simple d'arriver à ce résultat serait d'associer des NSs avec un hydrogel [13].

II. Hydrogels

Les hydrogels peuvent être définis comme étant des matériaux composés d'un réseau tridimensionnel de molécules, souvent polymère, immergé dans une phase aqueuse. Les molécules qui composent la structure sont naturelles ou synthétiques et réticulées entre elles par des liaisons pouvant être physiques ou chimiques. Ces formes ont la capacité d'absorber et de retenir de grande quantité d'eau dans leur structure [14,15].

Les hydrogels peuvent être composés d'une grande variété de polymères, ce qui leur confère diverses propriétés physicochimiques. Ces formes sont largement utilisées en clinique en particulier pour des administrations locales à visée locale ou systémique, telles que les voies oculaires [16,17], nasales [18], vaginales [19] et cutanées [20], car elles sont facilement retenues sur des surfaces verticales et/ou humides.

Les gels constituent des plateformes de choix pour administrer des PAs hydrophiles. En effet leurs propriétés physiques peuvent être modulées par les choix du polymère et du degré de réticulation utilisés.

Un PA peut ainsi facilement être chargé dans la matrice aqueuse du gel et sa libération dépendra de son coefficient de diffusion au travers du réseau formé.

Les gels peuvent également être utilisés comme forme « dépôt ». Une fois injecté, le dépôt va se dégrader très progressivement sur son site d'injection afin de prolonger la période de présence du PA au niveau local ou systémique. La pharmacocinétique de la molécule active est ainsi modifiée [21,22].

De plus, les gels, grâce à leur forte teneur en eau et leur structure en réseau, ressemblent aux matrices extracellulaires des tissus vivants ce qui leur confère en général une bonne biocompatibilité. Ainsi, les gels sont de plus en plus considérés pour des applications d'ingénierie tissulaire ou de médecine régénérative [23]. Un hydrogel peut, par exemple, permettre de mimer une matrice extracellulaire dans laquelle des cellules vont venir proliférer et ainsi permettre l'accélération de la cicatrisation d'une plaie par exemple [24].

Les gels sont des formes en constante évolution. De nombreux travaux ont permis de moduler leur gélification notamment pour qu'elle intervienne en réponse à un stimuli, tel que la température ou le pH [25,26]. La libération du PA peut également être modulée par exemple en liant la molécule active aux polymères par une liaison covalente qui sera rompue en présence d'une enzyme ou d'un changement de pH [27].

Cependant, si de nombreuses avancées sont faites dans le domaine des hydrogels dits « intelligents », les formes plus classiques présentent plusieurs limites. Leur forte teneur en eau s'avère une contrainte car elle entraîne une libération complète et rapide des PAs hydrophiles (quelques heures à quelques jours maximums). La déformabilité des gels n'est pas toujours suffisante pour permettre leur administration avec une seringue, ce qui nécessite alors une implantation chirurgicale et limite considérablement leur utilisation pratique en clinique [28]. Même si les hydrogels conventionnels peuvent permettre d'améliorer le confort des patients en prolongeant la libération d'un PA et en limitant donc le nombre d'injections nécessaires, ils ne permettent pas de mettre facilement en œuvre des PAs lipophiles. L'association de gels avec des nanosystèmes pourrait s'avérer être une stratégie intéressante pour développer de nouvelles formes thérapeutiques qui combindraient les avantages de ces deux formes.

III. Association des formes nanosystèmes et hydrogels

Les nanosystèmes et les hydrogels présentent séparément de nombreux avantages. La stratégie d'associer ces deux formes pour combiner leur propriété est de plus en plus explorée [13,29–31].

En effets, les nanosystèmes peuvent facilement être dispersées en les ajoutant avant [13] ou après [32] la réticulation de gel (Figure 2A). Dans le second cas, le réseau composant l'hydrogel doit être suffisamment lâche pour permettre une dispersion homogène des objets. Une autre technique développée par l'équipe de Murali [33] consiste à former directement des nanoparticules d'argent dans un gel existant grâce à la réduction de molécules précurseurs dispersées dans le milieu.

L'association des NSs et des hydrogels permet d'obtenir un matériau hybride aux propriétés structurales inédites. En effet, les propriétés physicochimiques obtenues n'auraient pu être atteintes avec ni l'une ni l'autre des formes seules. Le réseau réticulé du gel permet de protéger la structure des nano-objets et de prolonger leurs fonctionnalités. Ces systèmes ont également montré une capacité à moduler les pharmacocinétiques des PAs différemment des NSs seuls, notamment en prolongeant le temps de résidence de ces nano-vecteurs sur le site d'injection.

Nous avons réalisé un travail de revue bibliographique sur les recherches combinant NSs et hydrogels pour des applications médicales. Nous avons considéré tous les travaux ayant conduit à une évaluation *in vivo* du système développé au cours des dix dernières années. Nous avons retenu six formes différentes de nano-objets : les liposomes, les micelles, les dendrimères, les nanocapsules lipidiques, les nanoparticules polymères et les fullerènes. La revue est présentée dans le chapitre I de ce présent document.

Si la stratégie d'associer NSs et hydrogels est très prometteuse, elle peut également présenter un facteur limitant. En effet, elle multiplie le nombre d'excipients utilisés, ce qui risque d'augmenter la toxicité de la formulation. Les polymères se dégradent relativement lentement, ce qui entraîne la présence *in vivo* de produits polymères résiduels (monomères, dimères, trimères...) sur une longue période. Les hydrogels, lorsqu'ils sont injectés seuls en SC, provoquent une réaction inflammatoire dite à corps étrangers. Au cours de celle-ci, un grand nombre de granulocytes et de fibroblastes sont recrutés autour de la forme implantée, ce qui crée en une dizaine de jours une capsule fibreuse, composée de fibroblastes et de dépôts de collagène. Cette capsule modifie l'environnement direct de l'hydrogel et peut en altérer les performances. L'association supplémentaire des NSs pourrait risquer d'augmenter ce phénomène [34,35].

Une autre technique permettant d'obtenir des matériaux similaires émerge. Celle-ci permet de se passer de polymères gélifiants. Le réseau tridimensionnel est alors formé directement par l'association de NSs entre eux (figure 2B) [30,13]. Les NSs utilisés peuvent être de nature différente (polymère, métallique) et

sont associés par des liaisons pouvant être de faible énergie (interactions hydrophobes, électrostatiques ou hydrogène) [36] ou covalentes [37].

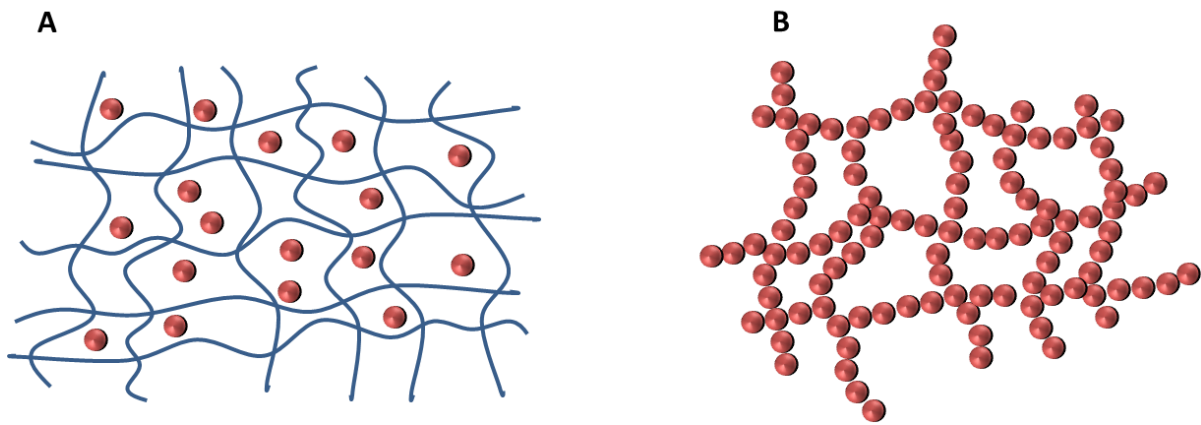


Figure 2 : Illustration des deux stratégies possibles pour associer nanosystèmes et hydrogels. A) Les NSs sont dispersés dans un hydrogel formé classiquement par un polymère. B) L'hydrogel est formé par l'association des NSs entre eux sans utiliser de molécule gélifiante conventionnelle.

Les sciences des matériaux se sont intéressées les premières à ces structures innovantes, en particulier pour obtenir de nouvelles propriétés photoniques [38–41]. Plus récemment, l'ingénierie tissulaire s'est également emparée de cette idée.

Plusieurs équipes ont développé des hydrogels dont la structure est permise par l'association de nanoparticules (NPs) présentant des charges opposées par le biais de liaisons électrostatiques.

Wang *et al.* [36] ont développé des NPs de poly(D,L-acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) qui sont recouvertes au choix de polyvinylamine (PVA_m) ou de poly(éthylène-co-acide maléique) (PEMA) qui leur confèrent respectivement une charge positive (potentiel zêta (PZ) = 32 mV) ou négative (PZ = -20 mV). La structure de l'hydrogel obtenu en mélangeant ces deux types de NPs sera plus ou moins dense suivant les proportions de chacune des NPs (Figure 3). Les essais *in vitro* ont prouvé que ces hydrogels peuvent être injectés avec une seringue munie d'une aiguille 20 G. Leur absence de toxicité et leur capacité à être infiltrés par des cellules a également pu être montrées. Ces différentes propriétés en font des plateformes de choix pour des applications de régénération tissulaire. Les auteurs de cette étude proposent en perspective de leur travail la possibilité de charger les NPs avec une molécule active (hormone de croissance) pour améliorer les performances de l'hydrogel. Cette suggestion ouvre également la voie vers d'éventuelles applications de ces hydrogels de NPs en tant que dispositif de délivrance de PAs.

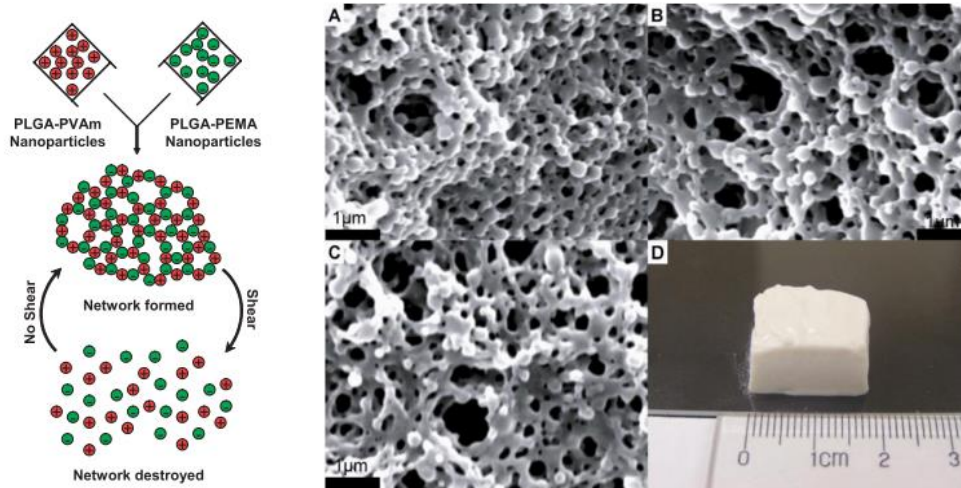


Figure 3 : Représentation schématique et images obtenues en microscopie électronique à balayage des hydrogels de NPs polymère de PLGA recouvertes de PVAm ou de PEMA et liées par des liaisons électrostatiques (adapté des références [30] et [36]).

Par la suite, la même équipe a testé un hydrogel de NPs chargées avec de la dexaméthasone pour améliorer la cicatrisation du tissu osseux [42]. La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse, principalement utilisé pour son action anti-inflammatoire et immunosuppressive. Cette molécule a également montré des propriétés d'amélioration de la synthèse de tissus osseux. Dans cette publication, les NPs utilisées sont les mêmes que précédemment, elles contiennent des quantités de dexaméthasone comprises entre 5 et 20%. Quelle que soit la concentration en dexaméthasone, les formes ont montré *in vitro* une libération régulière d'ordre zéro prolongée sur une période de 2 mois. En comparaison, lorsque la dexaméthasone est simplement mélangée au gel (non encapsulée), sa libération est plus rapide et s'arrête au-delà d'un mois. Les gels de NPs présentent une diminution de leur viscosité lorsqu'ils sont soumis à des forces de cisaillement. Cependant dès l'arrêt de ces forces, ils récupèrent leurs propriétés initiales. Ainsi, leur structure se rigidifie après administration ce qui est particulièrement intéressant pour le traitement d'une zone de défaut osseux. Enfin, les essais *in vivo* réalisés sur la boîte crânienne de rats ont prouvé la facilité d'application de la forme et leur action positive sur la cicatrisation du tissu osseux.

Sur le même principe, Gu *et al.* proposent un hydrogel de NPs permettant de libérer de l'insuline en réponse à la présence de glucose [43]. Les NPs utilisées sont composées de dextrane et sont recouvertes de chitosane ($PZ = 10,6 \text{ mV}$) ou d'alginate ($PZ = -11,5 \text{ mV}$). Les NPs sont chargées avec 14,6% *m/m* d'insuline et 1,46% *m/m* d'enzyme spécifique au glucose. Les enzymes utilisées sont un mélange de glucose-oxydase et de catalase dans un rapport massique de 4 pour 1. Lorsque les deux suspensions de NPs de charges opposées sont mélangées, un hydrogel se forme par le biais de liaisons électrostatiques entre les NPs. En présence de glucose, la glucose-oxydase catalyse la conversion de cette molécule en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène ce qui contribue à l'acidification du milieu. Grâce à cette acidification, les NPs de dextrane s'hydrolysent et libèrent l'insuline qu'elles contiennent (Figure 4). L'enzyme catalase assiste l'action de la glucose-oxydase en lui fournissant de l'oxygène et consomme les molécules de peroxyde

d'hydrogène en excès qui pourraient s'avérer toxiques. La capacité de cette forme à libérer de l'insuline de manière pulsatile en réponse à la concentration en glucose a d'abord été prouvée *in vitro* en présence de PBS contenant différentes concentrations de glucose. Par la suite, cette même forme a été injectée en SC chez des souris présentant un modèle de diabète de type I. Une seule injection a permis de stabiliser la glycémie de ces souris à un niveau normal ($<200 \text{ mg.dL}^{-1}$) pendant plus de 10 jours. Les différents contrôles testés : tampon phosphate, solution d'insuline, hydrogel de NPs chargées seulement en insuline, et hydrogel de NPs chargées seulement en enzymes, présentaient une action efficace seulement sur une période inférieure à 24 heures. Cette forme est particulièrement prometteuse pour permettre une libération pulsatile d'insuline, à la manière du pancréas, pour une période prolongée.

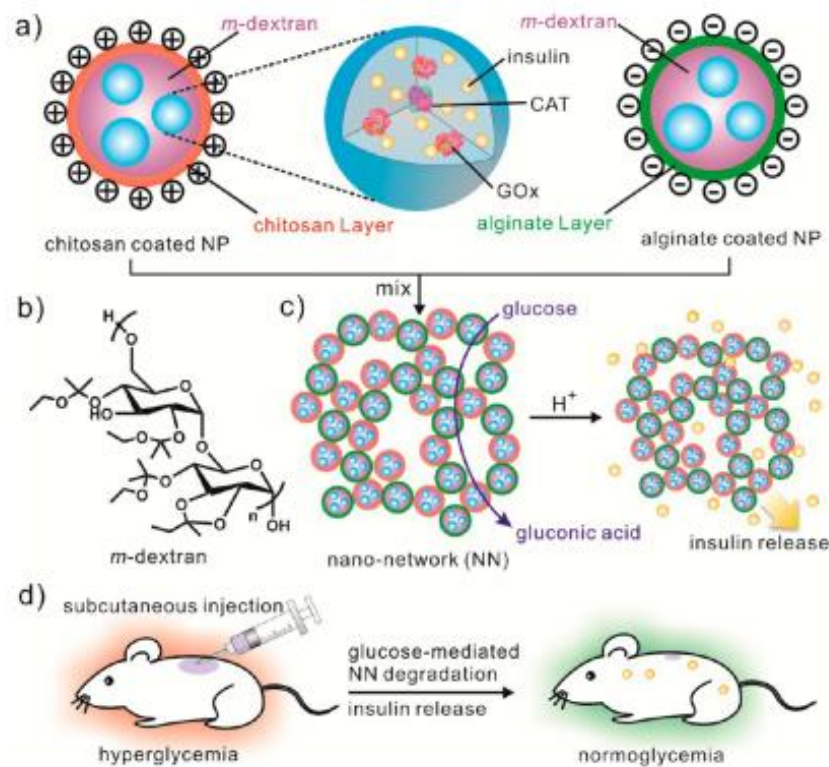


Figure 4 : Représentation schématique de : (a et b) NPs de dextrane chargées en insuline et en enzymes spécifiques au glucose (GOx : glucose oxydase et CAT : catalase), recouvertes de chitosane ou d'alginate. (c) Formation d'un réseau grâce à l'association des NPs. En présence de glucose, les enzymes catalysent la production d'acide gluconique qui provoque la dégradation des NPs et la libération de l'insuline. (d) Essais de cette forme *in vivo* chez des souris présentant un modèle de diabète de type I (induite par la streptozotocine) (adapté de la référence [43]).

Une autre approche pour former un gel de NPs consiste à utiliser des NPs capables de former des interactions hydrophobes entre elles. Dans cette approche, les NPs sont classiquement constituées d'un noyau de polymères hydrophobes et d'une enveloppe de polymères thermosensibles qui subissent une transition hydrophile-hydrophobe en réponse à un changement de température (propriété LCST : *Lower Critical Solubility Temperature*) [44,45]. Lorsque la température est inférieure à un seuil critique, la coque de polymère est hydrosoluble et stabilise la NP. Lorsque la température est supérieure à cette valeur critique, la coque de polymère devient hydrophobe ce qui permet l'association des NPs entre elles et la formation de l'hydrogel.

Basé sur ce principe, Liang *et al.* ont développés un hydrogel de NPs chargées en paclitaxel [46]. Les NPs sont composées de mPEG-b-POA-b-mPEG qui est synthétisé à partir de mono-methoxy poly(éthylène glycol) (mPEG) et de poly(anhydride octadécanoïque) (POA). Les suspensions de ces NPs ont la propriété de se changer en hydrogel lorsqu'elles sont placées à température corporelle. Afin d'étudier la libération d'un PA à partir de cette forme, les NPs ont été chargées avec du paclitaxel ou de l'albumine de sérum bovin (BSA). La libération *in vitro* de ces molécules est soutenue et prolongée jusqu'à 7 jours et aucun effet de libération rapide (*burst effect*) n'est observé en début d'étude. La libération présente un ordre proche de zéro et est fortement influencée par la composition des NPs ainsi que par la nature du PA. Les essais de toxicité cellulaire réalisés *in vitro* montre une absence de toxicité des NPs sur les fibroblastes pulmonaires de souris (lignée cellulaire L929). Enfin, les hydrogels de NPs ont été injectés *in vivo* chez la souris, et les résultats prouvent la bonne biocompatibilité de ces formes.

L'ensemble des plateformes développées utilise des NPs polymères dont les procédés de fabrication requièrent très souvent l'utilisation de solvants organiques (nanoprécipitation, diffusion de solvant, double émulsion et évaporation-extraction du solvant). Ces techniques sont d'une part néfaste pour l'environnement et d'autre part peuvent poser des soucis de sûreté lors de leurs utilisations en clinique. De plus, l'utilisation des polymères peut également poser des problèmes de tolérance, notamment avec les PLGA qui, lors de leur dégradation, acidifient le milieu qui les environnent. Ainsi, l'utilisation de NPs différentes par leur composition ou leur procédé de fabrication, pourrait s'avérer intéressante.

IV. Contexte de ce travail de thèse

IV.1. Hydrogels de nanosystèmes sans utilisation de réseau polymère

Les nanocapsules lipidiques (NCLs) sont développées depuis plus d'une quinzaine d'années par l'Unité MINT INSERM U1066 / CNRS 6021 (Université d'Angers). Ces vecteurs sont composés d'un cœur lipidique liquide à base de triglycérides de chaînes moyennes et d'une enveloppe de tensioactifs. Leurs structures se rapprochent de celle d'une lipoprotéine, ce qui leur confère une bonne biocompatibilité. Les formules se présentent sous la forme d'une suspension de NCLs dans une phase continue aqueuse. Leurs tailles sont monodisperses et peuvent être choisies entre 20 et 100 nm. Les NCLs démontrent une très bonne stabilité au cours du temps lorsqu'elles sont conservées à 4°C.

Les NCLs sont produites grâce à un procédé simple d'inversion de phase, qui a été décrit pour la première fois par Heurtault *et al.* [47–49]. Un mélange d'huile, d'eau, de sel et de tensioactifs adaptés est chauffé puis refroidi à des températures précises trois fois de suite. Au cours de ces cycles d'alternance de chauffage et refroidissement, le mélange prend la forme d'une émulsion huile dans eau (H/E) aux températures les plus faibles et se transforme en une émulsion de type eau dans huile (E/H) lorsqu'il est chauffé. L'inversion de phase se réalise dans un intervalle de température spécifique appelé zone de transition de phase (ZIP). Lors de la ZIP, le mélange passe transitoirement sous la forme d'une microémulsion. Durant le dernier refroidissement, l'ajout rapide d'un volume d'eau pure, appelé « volume de trempage », pendant l'inversion de phase va détruire de manière irréversible la microémulsion et conduire à la formation définitive des NCLs. Ce procédé est rapide et ne requiert pas de solvant organique.

Les NCLs permettent d'encapsuler des PAs lipophiles, ce qui permet de résoudre le problème posé par leurs injections IV. Différents actifs de chimiothérapie ont notamment été testés avec les NCLs, tels que le paclitaxel [50,51], les dérivés du tamoxifène [52,53], la camptothécine [54] ou l'étoposide [55]. L'encapsulation du fondaparinux [56], de l'ivermectine [57] et de l'albendazole [58] a aussi été réalisée. De plus, ces vecteurs ont également été associés à des molécules biologiques, telles que des peptides [59–61] ou du matériel génétique (ADN, siRNA) [62–65]. Enfin, l'addition d'un fluorochrome à l'interface des NCLs permet de suivre de façon sûre leur devenir *in vitro* et *in vivo* [66,67].

L'ensemble de ce travail de thèse repose sur les recherches initiées par Elodie Moysan au sein de l'Unité MINT. Son travail a consisté à associer la gemcitabine et les NCLs afin de proposer une thérapeutique innovante pour le cancer bronchique non à petites cellules [68–70].

La gemcitabine est un antimétabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire. En s'intercalant au sein des chaînes d'ADN d'une cellule en cours de réplication, elle bloque la synthèse et provoque la mort de la cellule. Ce principe actif est actuellement utilisé en clinique pour le traitement de différents cancers,

dont les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, les cancers de l'ovaire, les cancers de la vessie, les cancers du pancréas et les cancers du sein.

La gemcitabine est hydrophile et ne peut pas être solubilisée en l'état dans les NCLs [71] sauf en utilisant des stratégies d'encapsulation complexes (micelles inverses [72,73] et nanocapsules à cœur aqueux [74,75]) qui n'ont pas encore fait leurs preuves *in vivo*. Pour encapsuler la molécule, la stratégie adoptée fut de modifier sa lipophilie. Pour ce faire, une chaîne carbonée (lauroyl) a été greffée sur la fonction amine libre de la molécule. La molécule obtenue est la 4-N-lauroyl gemcitabine (Gem-C12) (Figure 5).

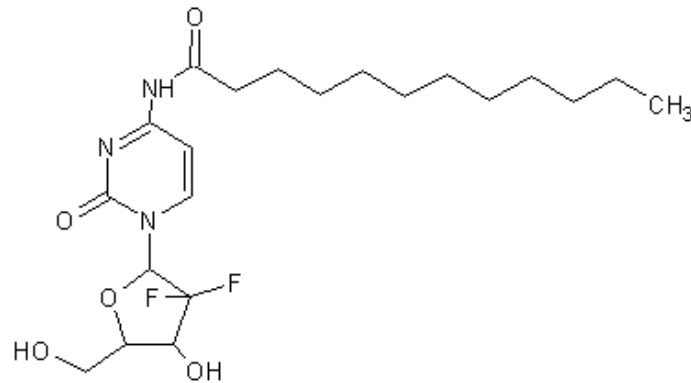


Figure 5 : Formule de la Gemcitabine modifiée (Gem-C12)

Cette molécule inédite présente des propriétés amphiphiles qui lui ont permis d'être intégrée dans les NCLs préférentiellement au niveau de leurs interfaces.

De façon inattendue, les formules de NCLs chargées en Gem-C12 gélifient spontanément après refroidissement de la formule. Les molécules de Gem-C12 présentes à l'interface huile/eau de NCLs semblent pouvoir interagir entre elles par le biais de liaisons hydrogène établies entre les fonctions alcools du cycle ribose. Ainsi, les NCLs s'associent à la manière d'un collier de perle pour former des chaînes. Ces chaînes, en s'associant partiellement et en s'entremêlant, forment un réseau tridimensionnel qui immobilise la phase aqueuse continue.

La dispersion du gel dans de l'eau permet de réobtenir des NCLs libres qui présentent les mêmes propriétés physicochimiques que les NCLs non chargées en Gem-C12, avec en particulier une distribution de taille identique.

L'injection de ces gels à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille est possible et ne dénature pas leur structure. Des essais *in vivo* ont été menés avec une injection SC de la formule chez la souris porteuse d'un modèle orthotopique de cancer du poumon non à petites cellules métastasant dans le médiastin (lignée cellulaire Ma44-3). Les résultats ont montré un ciblage important des ganglions lymphatiques et un retard significatif de la mort des animaux par rapport à la gemcitabine administrée seule. Néanmoins, le profil de survie des animaux est comparable à celle obtenue en administrant par voie IV des NCLs

chargées en Gem-C12. L'avantage de la voie SC est de pouvoir réduire la fréquence des injections, tout en diminuant de manière significative la toxicité systémique.

Les NCLs utilisées dans ces formes hydrogels utilisent le procédé classique d'inversion de phases mais leurs formules ont été adaptées.

Classiquement, le cœur des NCLs est composé d'un mélange de triglycérides capriques et capryliques, dont le nom commercial est Labrafac® WL 1349. Les tensioactifs utilisés pour former la coque des capsules sont d'une part de l'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660 (Kolliphor® HS15) et d'autre part de la lécithine de soja contenant 69% de phosphatidylcholine (Lipoid® S75-3). Enfin, l'eau est toujours de qualité dé-ionisée. Afin de solubiliser plus facilement la Gem-C12, la lécithine de soja a été remplacée par du monooléate de sorbitanne (Span® 80).

Au début de la formulation, la Gem-C12 est solubilisée dans un mélange de Labrafac® WL 1349 et de Span® 80 additionné d'un petit volume d'acétone qui est ensuite évaporé. Tous les autres composés sont ajoutés au précédent mélange, puis placés sous agitation magnétique (environ 500 rpm). Le procédé d'inversion de phases est ensuite réalisé entre les températures de 45 et 75°C. Le volume de trempé est ajouté lors de la ZIP qui se produit aux alentours de 60°C.

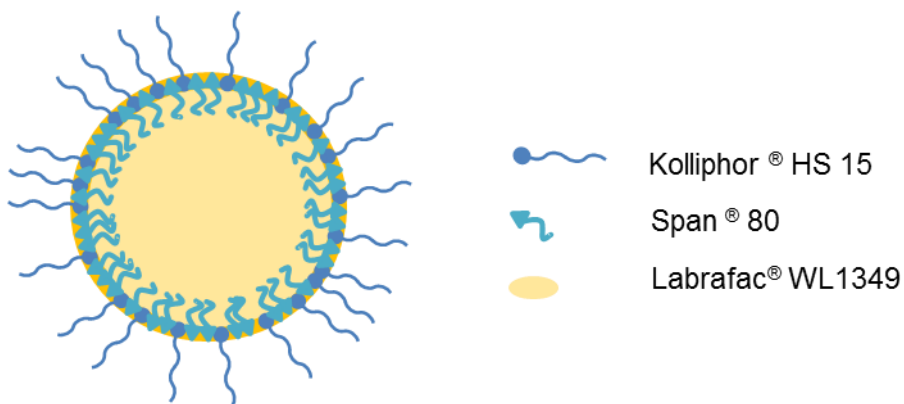


Figure 6 : Représentation schématique d'une nanocapsules lipidique.

Deux types de NCLs (Figure 6) présentant des tailles de 30 et 55 nm ont été employés. Leurs compositions ont été déterminées de manière empirique et sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quantités (mg) d'excipients utilisés pour la formulation des NCLs (30 et 55 nm) [68].

Quantité d'excipient (mg)	Diamètre des NCLs	
	30 nm	55 nm
<i>Labrafac</i> [®] WL1349	750	1240
<i>Kolliphor</i> [®] HS 15	1250	967
<i>Span</i> [®] 80	250	250
<i>Eau dé-ionisée</i>	1020	1020
<i>Sel (NaCl)</i>	45	45
<i>Eau dé-ionisée (trempe)</i>	2120	2120

Tous les excipients qui composent les formules sont approuvés par la Pharmacopée Européenne et/ou Américaine. Ils font également tous partis de la composition de médicament approuvé par l'Agence Nationale de Santé et du Médicament (ANSM). Le Labrafac[®] WL1349 est retrouvé dans la vitamine D3 Bon 200000 UI/mL (solution injectable intramusculaire), le Kolliphor[®] HS 15 dans le Spasfon[®] lyoc 160 mg (lyophilisat oral) et le Span[®] 80 dans le Trinipatch[®] 10 mg/24h (dispositif transdermique) ou la Cefpodoxime Zen[®] 8 mg/mL (solution buvable en flacon).

Enfin, le procédé de formulation des NCLs est facile à mettre en place car il ne demande pas de matériel complexe ; il est rapide et peu coûteux en énergie.

IV.2. Organogels

Les organogels sont des systèmes semi-solides dans lesquels une phase organique est immobilisée au moyen d'un réseau tridimensionnel composé de molécules gélifiantes auto-assemblées.

A partir du début des années 2000, ces systèmes ont été envisagés comme de possibles plateformes de libération de médicament. Les recherches se sont particulièrement penchées sur leur utilisation pour des applications topiques ou pour une utilisation en administration transdermique.

Les formes organogels permettent en effet d'apporter des concentrations élevées en PA sur leur site d'administration en évitant les effets indésirables pouvant être induits par une administration orale de ces PAs. Les organogels à base de Pluronic[®] F-127 et de lécithine ont particulièrement été étudiés. En effet, ils permettent de facilement améliorer la diffusion des PAs au travers de la peau, certainement grâce à la modification des barrières cutanées [76,77].

Les organogels peuvent également être envisagés pour permettre la libération prolongée d'un actif après une injection SC. Dans ce cas, le PA doit être de nature hydrophile et est dispersé sous sa forme solide dans la matrice de l'organogel. Après son administration, la forme est progressivement dégradée par les enzymes des tissus environnants et libère de manière continue le PA [78]. Ces formes n'ont cependant été que peu exploitées pour des applications nécessitant leurs injections.

L'équipe de Jean-Christophe Leroux (Chaire de Recherche en Libération Contrôlées de Médicaments, ex Université de Montréal, QC, Canada) a précédemment développé des huiles gélifiées à base d'acides aminés modifiés [78–81]. Une chaîne aliphatique a été ajoutée sur la fonction amine libre de plusieurs acides aminés, dont la tyrosine, le tryptophane, la phénylalanine et l'alanine. Ces molécules innovantes peuvent, au sein d'une phase organique (huile de tournesol), s'auto-organiser à l'aide d'interactions de faible énergie (liaisons de Van der Waals et liaisons hydrogène). Ainsi, elles peuvent former un réseau tridimensionnel qui immobilise la phase organique et forme donc un oléogel.

Ces systèmes ont été testés pour permettre la libération prolongée de PAs après une injection SC. Dans une première étude, l'acide aminé modifié choisi est l'alanine (*N*-stéaroyl L-alanine méthyl ester). Le PA hydrophile, le leuprolide (utilisé en castration chimique en réduisant la synthèse de la testostérone), est simplement dispersé dans la forme semi-solide. Après administration de l'organogel, le leuprolide est libéré de manière continue. Dans un modèle murin, l'état de castration chimique (testostéronémie $<0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$) est prolongé jusqu'à 45 jours sans avoir besoin d'administration supplémentaire. L'injection de leuprolide en solution a un effet limité (1 à 2 jours) qui nécessiterait une fréquence d'injections importante [81].

La formulation peut être additionnée de *N*-méthyl-2-pyrrolidone qui la fluidifie pour faciliter son injection à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Au contact avec le tissu sous-cutané, la *N*-méthyl-2-pyrrolidone est libérée rapidement, ce qui permet une gélification *in situ* rapide.

Une seconde étude a testé *in vivo* avec la rivastigmine qui est indiquée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cette molécule requiert des administrations répétées qui ne sont pas adaptées aux patients atteints de démence, elle peut également présenter un risque important de toxicité. *In vivo*, l'administration SC de l'organogel permet une prolongation de la libération de la rivastigmine durant 11 jours. La concentration plasmatique reste toujours inférieure à la valeur seuil induisant une toxicité et l'implant ne provoque qu'une inflammation locale modérée. Finalement, une inhibition significative de l'acétylcholinestérase (cible de la rivastigmine) dans l'hippocampe est permise durant 15 jours en utilisation cet implant, tandis qu'une administration répétée de rivastigmine en solution ne montre aucune inhibition [79].

En 2014, des travaux ont été menés par Wang D *et al.* sur des organogels thermosensibles formés par l'auto assemblage d'acide gras à chaînes longues [82]. Quatre acides gras différents ont été testés : les acides palmitique, stéarique, myristique et arachidique. Chacun de ces acides gras est solubilisé dans de l'huile de soja (de qualité injectable) à chaud. Lorsque la solution est encore chaude (50°C) et liquide, le PA hydrophile est dispersé à l'intérieur. Le PA se présente sous la forme d'une poudre dont la taille des particules est d'environ 100 nm. La gélification des formules est thermoréversible et dépend de la nature et de la quantité d'acide gras employé. La formule optimisée retenue est à base d'acide arachidique. Elle a été chargée avec de la palipéridone, une molécule utilisée dans la prise en charge de la schizophrénie. Cette formule a été injectée chez le rat en SC pour en étudier la pharmacocinétique. Les résultats montrent une libération du PA durant une semaine sans libération rapide (*burst effect*). La libération de la palipéridone est permise par l'érosion de la matrice de l'organogel. Des images des animaux ayant reçu le

même organogel chargé avec de la coumarine montrent que le gel est graduellement absorbé jusqu'à sa complète disparition en environ 9 jours. Enfin, l'étude d'histopathologie menée sur les tissus environnant le site d'injection a montré une bonne biocompatibilité de la forme organogel pour la période de temps considérée.

La même année, un organogel chargé en drospirénone a été développé [83]. Cette hormone stéroïdienne, dont l'action est similaire à celle de la progestérone, peut être utilisée comme contraceptif ou comme traitement hormonal de substitution pour la ménopause. Les organogels sont préparés en solubilisant à chaud des dérivés de stéarate d'aluminium, de silice, de méthyl-cholate et de stéarate de cholesteryl dans une huile composée de triglycérides (Myritol® 318 PH). La drospirénone, sous forme de microcristaux, est mélangée aux molécules organogélitrices avant l'ajout de l'huile. L'organogel obtenu permet une amélioration de la conservation de la drospirénone par rapport à sa forme classique de suspension. En effet, les particules se retrouvent piégées dans la matrice gélifiée ce qui empêche leurs mouvements et leur sédimentation. L'injection de la forme est possible avec une aiguille 23 G et l'organogel a montré *in vitro* une libération du PA très significativement prolongée.

Enfin, une équipe chinoise a étudié la dégradation *in vitro* et *in vivo* d'organogel à base d'acides aminés modifiés [84]. Les molécules gélifiantes utilisées sont la N-myristoyl-L-alanine méthyl ester, la N-arachidonoyl-L-lysine méthyl ester et la méthyl (S)-2,5-ditétradécanamidopentanoate. Elles sont solubilisées séparément dans différentes huiles de qualité injectable. La dégradation des organogels est relative à leur composition et concentration en molécules gélifiantes. Plus les acides aminés modifiés sont concentrés plus la dégradation de la forme sera lente. Par ailleurs, les longueurs des chaînes alkyles composant l'huile jouent également un rôle. Plus elles seront longues et plus la gélification sera favorisée, la stabilité thermique et mécanique du gel en seront prolongées. Les organogels ont également été implantés en SC chez la souris. La dégradation est plus rapide *in vivo*, car les gels sont soumis à un environnement plus complexe avec davantage de contraintes. Cependant, les observations sont cohérentes avec les expérimentations menées *in vitro*. Les organogels restent intacts dans le tissu SC durant une période allant de 2 à 8 semaines, ce qui en fait des formes de choix pour obtenir une libération prolongée de PA.

Bien que peu nombreuses, les études menées sur l'utilisation d'organogel pour la libération prolongée d'un PA après injection SC sont prometteuses. En effet, ces formes permettent une libération prolongée et très progressive des molécules testées. Elles ne provoquent pas de pics plasmatiques brutaux qui peuvent entraîner une toxicité et des effets indésirables pour le patient. Elles présentent donc un fort potentiel pour améliorer la qualité de vie des patients en diminuant le nombre d'injections nécessaires lors d'un traitement. Elles pourraient également être envisagées pour les patients ne pouvant pas contrôler par eux-mêmes leur traitement, notamment dans le cas de pathologie psychiatrique ou de démence.

V. Objectifs de la thèse

La sérendipité a permis le développement d'une nouvelle forme d'hydrogels composés de NCLs. Ce travail de thèse souhaite proposer un hydrogel basé sur le même principe sans toutefois avoir recours à la Gem-C12 qui reste une molécule cytotoxique. Ainsi, cette nouvelle forme utilisera une molécule non-toxique pour permettre la réticulation des NCLs et pourra être utilisée comme plateforme de libération pour encapsuler d'autres PAs. Le nouvel hydrogel devra présenter des propriétés physicochimiques similaires à celles obtenues précédemment, tout en présentant une toxicité limitée.

Comme précédemment évoqué, une revue bibliographique sera présentée dans le premier chapitre. Cet état de l'art abordera les recherches menées sur des formes associant NSs et hydrogels au cours des 10 dernières années. L'ensemble des travaux retenus ont abouti à des expérimentations *in vivo*.

Le second chapitre sera consacré à la conception, l'optimisation et la caractérisation du nouvel hydrogel de NCLs. La formule des NCLs utilisées sera également optimisée grâce à un plan de mélange. Une nouvelle molécule permettant la gélification des NCLs sera sélectionnée. Celle-ci sera formée à partir de la cytidine qui est une molécule endogène à l'organisme. Enfin, les propriétés physicochimiques des hydrogels de NCLs seront largement caractérisées. Parallèlement, la possibilité de développer un organogel avec la même molécule sélectionnée sera abordée.

La capacité de ces plateformes gélifiées à être injectées et utilisées *in vivo* sera ensuite explorée dans le troisième chapitre. Dans ce but, l'impact d'une injection, la libération et la toxicité des NCLs seront testés *in vitro*. Enfin, nous testerons la tolérance des hydrogels et des organogels *in vivo* chez le rat.

Les quatrième et cinquième chapitres envisageront différents axes d'application pour les hydrogels de NCLs. D'une part, nous aborderons le devenir des NCLs après leur injection sous cutanée et leur potentiel pour cibler les ganglions lymphatiques. D'autre part, nous présenterons le développement de deux stratégies innovantes pour le traitement du glioblastome grâce aux hydrogels de NCLs.

VI. Bibliographie

- [1] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat Rev Cancer*. 17(1) (2017) 20–37.
- [2] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat Biotechnol*. 33(9) (2015) 941–951.
- [3] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat Rev Drug Discov*. 9(8) (2010) 615–627.
- [4] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu Rev Med*. 63 (2012) 185–198.
- [5] M.E. Lobatto, V. Fuster, Z.A. Fayad, W.J.M. Mulder, Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis, *Nat Rev Drug Discov*. 10(11) (2011) 835–852.
- [6] O. Veisoh, B.C. Tang, K.A. Whitehead, D.G. Anderson, R. Langer, Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities, *Nat Rev Drug Discov*. 14(1) (2015) 45–57.
- [7] O.C. Farokhzad, R. Langer, Impact of Nanotechnology on Drug Delivery, *ACS Nano*. 3(1) (2009) 16–20.
- [8] *Advances in Drug Delivery*, *Annu Rev Mater Res*. 41(1) (2011) 1–20.
- [9] Q. Sun, Z. Zhou, N. Qiu, Y. Shen, Rational Design of Cancer Nanomedicine: Nanoproperty Integration and Synchronization, *Adv Mater*. (2017).
- [10] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications, *Nano Lett*. 10(9) (2010) 3223–3230.
- [11] P.P. Adisheshaiah, R.M. Crist, S.S. Hook, S.E. McNeil, Nanomedicine strategies to overcome the pathophysiological barriers of pancreatic cancer, *Nat Rev Clin Oncol*. 13(12) (2016) 750–765.
- [12] M. Wacker, Nanocarriers for intravenous injection-the long hard road to the market, *Int J Pharm*. 457(1) (2013) 50–62.
- [13] W. Gao, Y. Zhang, Q. Zhang, L. Zhang, Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery, *Ann Biomed Eng*. 44(6) (2016) 2049–2061.
- [14] N.A. Peppas, K.M. Wood, J.O. Blanchette, Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins, *Expert Opin Biol Ther*. 4(6) (2004) 881–887.
- [15] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer*. 49(8) (2008) 1993–2007.
- [16] J.J. Kang-Mieler, W.F. Mieler, Thermo-Responsive Hydrogels for Ocular Drug Delivery, *Dev Ophthalmol*. 55 (2016) 104–111.
- [17] R. Sheshala, Y.Y. Kok, J.M. Ng, R.R.S. Thakur, K. Dua, In Situ Gelling Ophthalmic Drug Delivery System: An Overview and Its Applications, *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 9(3) (2015) 237–248.
- [18] C. Karavasili, D.G. Fatouros, Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery, *Drug Discov Today*. 21(1) (2016) 157–166.
- [19] C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, G. Sandri, Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*. 92 (2015) 39–52.
- [20] S.R. Feldman, Principles of topical treatment: advancement in gel vehicle technology, *J Drugs Dermatol JDD*. 13(4) (2014) 423–427.
- [21] M. Cully, Inflammatory diseases: Hydrogel drug delivery for inflammatory bowel disease, *Nat Rev Drug Discov*. 14(10) (2015) 678–679.
- [22] R. Vaishya, V. Khurana, S. Patel, A.K. Mitra, Long-Term Delivery of Protein Therapeutics, *Expert Opin Drug Deliv*. 12(3) (2015) 415–440.
- [23] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering, *Chem Rev*. 101(7) (2001) 1869–1879.
- [24] F.M. Chen, X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Prog Polym Sci*. 53 (2016) 86–168.

- [25] N.K. Singh, D.S. Lee, In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery, *J Control Release*. 193 (2014) 214-227.
- [26] A. Fakhari, J.A. Subramony, Engineered in-situ depot-forming hydrogels for intratumoral drug delivery, *J Control Release*. 220(Pt A) (2015) 465-475.
- [27] R.A. Siegel, Stimuli sensitive polymers and self-regulated drug delivery systems: a very partial review, *J Control Release*. 190 (2014) 337-351.
- [28] A. Vashist, Y.K. Gupta, S. Ahmad, Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body, *J Mater Chem B*. 2(2) (2013) 147-166.
- [29] S. Merino, C. Martín, K. Kostarelos, M. Prato, E. Vázquez, Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer-Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery, *ACS Nano*. 9(5) (2015) 4686-4697.
- [30] R. Roux, C. Ladavière, A. Montebault, T. Delair, Particle assemblies: Toward new tools for regenerative medicine, *Mater Sci Eng C*. 33(3) (2013) 997-1007.
- [31] P. Schexnaider, G. Schmidt, Nanocomposite polymer hydrogels, *Colloid Polym Sci*. 287(1) (2009) 1-11.
- [32] V. Thomas, M.M. Yallapu, B. Sreedhar, S.K. Bajpai, Breathing-in/breathing-out approach to preparing nanosilver-loaded hydrogels: Highly efficient antibacterial nanocomposites, *J Appl Polym Sci*. 111(2) (2009) 934-944.
- [33] Y. Murali Mohan, K. Lee, T. Premkumar, K.E. Geckeler, Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications, *Polymer*. 48(1) (2007) 158-164.
- [34] R. Langer, Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine, *Adv Mater*. 21(32-33) (2009) 3235-3236.
- [35] B.D. Ratner, Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems, *J Control Release*. 78(1-3) (2002) 211-218.
- [36] Q. Wang, L. Wang, M.S. Detamore, C. Berkland, Biodegradable Colloidal Gels as Moldable Tissue Engineering Scaffolds, *Adv Mater*. 20(2) (2008) 236-239.
- [37] R. Fuhrer, E.K. Athanassiou, N.A. Luechinger, W.J. Stark, Crosslinking metal nanoparticles into the polymer backbone of hydrogels enables preparation of soft, magnetic field-driven actuators with muscle-like flexibility, *Small*. 5(3) (2009) 383-388.
- [38] F. Li, D.P. Josephson, A. Stein, Colloidal assembly: the road from particles to colloidal molecules and crystals, *Angew Chem Int Ed Engl*. 50(2) (2011) 360-88.
- [39] J. Zhang, Y. Li, X. Zhang, B. Yang, Colloidal Self-Assembly Meets Nanofabrication: From Two-Dimensional Colloidal Crystals to Nanostructure Arrays, *Adv Mater*. 22(38) (2010) 4249-4269.
- [40] M. Grzelczak, J. Vermant, E.M. Furst, L.M. Liz-Marzán, Directed self-assembly of nanoparticles, *ACS Nano*. 4(7) (2010) 3591-3605.
- [41] K.J.M. Bishop, C.E. Wilmer, S. Soh, B.A. Grzybowski, Nanoscale forces and their uses in self-assembly, *Small*. 5(14) (2009) 1600-1630.
- [42] Q. Wang, J. Wang, Q. Lu, M.S. Detamore, C. Berkland, Injectable PLGA based colloidal gels for zero-order dexamethasone release in cranial defects, *Biomaterials*. 31(18) (2010) 4980-4986.
- [43] Z. Gu, A.A. Aimetti, Q. Wang, T.T. Dang, Y. Zhang, O. Veiseh, H. Cheng, R.S. Langer, D.G. Anderson, Injectable Nano-Network for Glucose-Mediated Insulin Delivery, *ACS Nano*. 7(5) (2013) 4194-4201.
- [44] R.C.A. Ghanami, B.R. Saunders, C. Bosquillon, K.M. Shakesheff, C. Alexander, Responsive particulate dispersions for reversible building and deconstruction of 3D cell environments, *Soft Matter*. 6(20) (2010) 5037-5044.
- [45] M.R. Fraylich, R. Liu, S.M. Richardson, P. Baird, J. Hoyland, A.J. Freemont, C. Alexander, K. Shakesheff, F. Cellesi, B.R. Saunders, Thermally-triggered gelation of PLGA dispersions: towards an injectable colloidal cell delivery system, *J Colloid Interface Sci*. 344(1) (2010) 61-69.
- [46] Y. Liang, Y. Qiao, S. Guo, L. Wang, Y. Zhai, C. Xie, R. Hu, L. Deng, A. Dong, Investigation on injectable, thermally and physically gelable poly(ethylene glycol)/poly(octadecanedioic anhydride) amphiphilic triblock co-polymer nanoparticles, *J Biomater Sci Polym Ed*. 23(1-4) (2012) 465-482.

- [47] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm Res.* 19(6) (2002) 875–880.
- [48] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoît, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *Eur J Pharm Sci.* 18(1) (2003) 55–61.
- [49] B. Heurtault, P. Saulnier, J.P. Benoit, J.E. Proust, B. Pech, J. Richard, Lipid nanocapsules, preparation process and use as medicine. US20090238865 A1 (2009)
- [50] A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarce, *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomed.* 10(4) (2015) 589–601.
- [51] A.C. Groo, P. Saulnier, J.C. Gimel, J. Gravier, C. Ailhas, J.P. Benoit, F. Lagarce, Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery, *Int J Nanomedicine.* 8 (2013) 4291–4302.
- [52] A.L. Lainé, E. Adriaenssens, A. Vessières, G. Jaouen, C. Corbet, E. Desruelles, P. Pigeon, R.A. Toillon, C. Passirani, The *in vivo* performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer, *Biomaterials.* 34(28) (2013) 6949–6956.
- [53] E. Allard, C. Passirani, E. Garcion, P. Pigeon, A. Vessières, G. Jaouen, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas, *J Control Release.* 130(2) (2008) 146–153.
- [54] Y. Cirpanlı, E. Allard, C. Passirani, E. Bilensoy, L. Lemaire, S. Calış, J.P. Benoit, Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model, *Int J Pharm.* 403(1–2) (2011) 201–206.
- [55] B. Saliou, O. Thomas, N. Lautram, A. Clavreul, J. Hureaux, T. Urban, J.P. Benoit, F. Lagarce, Development and *in vitro* evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide, *Eur J Pharm Sci.* 50(2) (2013) 172–180.
- [56] A. Ramadan, F. Lagarce, A. Tessier-Marteau, O. Thomas, P. Legras, L. Macchi, P. Saulnier, J.P. Benoit, Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and *in vivo* pharmacokinetic study, *Int J Nanomedicine.* 6 (2011) 2941–2951.
- [57] G.V.U. Gamboa, S.D. Palma, A. Lifschitz, M. Ballent, C. Lanusse, C. Passirani, J.P. Benoit, D.A. Allemandi, Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications, *Parasitol Res.* 115(5) (2016) 1945–1953.
- [58] P.E. Pensel, G. Ullio Gamboa, J. Fabbri, L. Ceballos, S. Sanchez Bruni, L.I. Alvarez, D. Allemandi, J.P. Benoit, S.D. Palma, M.C. Elissondo, Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice, *Acta Trop.* 152 (2015) 185–194.
- [59] D. Carradori, P. Saulnier, V. Pr at, A. des Rieux, J. Eyer, NFL-lipid nanocapsules for brain neural stem cell targeting *in vitro* and *in vivo*, *J Controlled Release.* 238 (2016) 253–262.
- [60] J. Balzeau, M. Pinier, R. Berges, P. Saulnier, J.P. Benoit, J. Eyer, The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells, *Biomaterials.* 34(13) (2013) 3381–3389.
- [61] A. Umerska, N. Matougui, A.C. Groo, P. Saulnier, Understanding the adsorption of salmon calcitonin, antimicrobial peptide AP114 and polymyxin B onto lipid nanocapsules, *Int J Pharm.* 506(1–2) (2016) 191–200.
- [62] P. Resnier, N. Galopin, Y. Sibiril, A. Clavreul, J. Cayon, A. Briganti, P. Legras, A. Vessières, T. Montier, G. Jaouen, J.P. Benoit, C. Passirani, Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse, *Pharmacol Res.* (2017).
- [63] F. Lagarce, C. Passirani, Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules, *Curr Pharm Biotechnol.* 17(8) (2016) 723–727.
- [64] F. Danhier, K. Messaoudi, L. Lemaire, J.P. Benoit, F. Lagarce, Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: *in vivo* evaluation, *Int J Pharm.* 481(1–2) (2015) 154–161.

- [65] P. Resnier, S. David, N. Lautram, G.J. Delcroix, A. Clavreul, J.P. Benoit, C. Passirani, EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells *in vitro*, *Int J Pharm.* 454(2) (2013) 748–755.
- [66] C. Simonsson, G. Bastiat, M. Pitorre, A.S. Klymchenko, J. Béjaud, Y. Mély, J.P. Benoit, Inter-nanocarrier and nanocarrier-to-cell transfer assays demonstrate the risk of an immediate unloading of dye from labeled lipid nanocapsules, *Eur J Pharm Biopharm.* 98 (2016) 47–56.
- [67] G. Bastiat, C.O. Pritz, C. Roider, F. Fouchet, E. Lignières, A. Jesacher, R. Glueckert, M. Ritsch-Marte, A. Schrott-Fischer, P. Saulnier, J.P. Benoit, A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging, *J Control Release.* 170(3) (2013) 334–342.
- [68] E. Moysan, Y. González-Fernández, N. Lautram, J. Béjaud, G. Bastiat, J.P. Benoit, An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure, *Soft Matter.* 10(11) (2014) 1767–1777.
- [69] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousselet, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 11(5) (2015) 1237–1245.
- [70] M.S. Sasso, G. Lollo, M. Pitorre, S. Solito, L. Pinton, S. Valpione, G. Bastiat, S. Mandruzzato, V. Bronte, I. Marigo, J.P. Benoit, Low dose gemcitabine-loaded lipid nanocapsules target monocytic myeloid-derived suppressor cells and potentiate cancer immunotherapy, *Biomaterials.* 96 (2016) 47–62.
- [71] E. Moysan, G. Bastiat, J.P. Benoit, Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: a review of several promising chemical modifications, *Mol Pharm.* 10(2) (2013) 430–444.
- [72] S. Vrignaud, J. Hureauux, S. Wack, J.P. Benoit, P. Saulnier, Design, optimization and *in vitro* evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride, *Int J Pharm.* 436(1–2) (2012) 194–200.
- [73] S. Vrignaud, N. Anton, P. Gayet, J.P. Benoit, P. Saulnier, Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride, *Eur J Pharm Biopharm.* 79(1) (2011) 197–204.
- [74] S. Vrignaud, N. Anton, C. Passirani, J.P. Benoit, P. Saulnier, Aqueous core nanocapsules: a new solution for encapsulating doxorubicin hydrochloride, *Drug Dev Ind Pharm.* 39(11) (2013) 1706–1711.
- [75] N. Anton, P. Saulnier, C. Gaillard, E. Porcher, S. Vrignaud, J.P. Benoit, Aqueous-core lipid nanocapsules for encapsulating fragile hydrophilic and/or lipophilic molecules, *Langmuir.* 25(19) (2009) 11413–11419.
- [76] H. Almeida, M.H. Amaral, P. Lobão, J.M.S. Lobo, Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs, *J Pharm Pharm Sci.* 15(4) (2012) 592–605.
- [77] R. Kumar, O.P. Katare, Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review, *AAPS PharmSciTech.* 6(2) (2005) 298–310.
- [78] A. Vintiloiu, M. Lafleur, G. Bastiat, J.C. Leroux, In situ-forming oleogel implant for rivastigmine delivery, *Pharm Res.* 25(4) (2008) 845–852.
- [79] G. Bastiat, F. Plourde, A. Motulsky, A. Furtos, Y. Dumont, R. Quirion, G. Fuhrmann, J.C. Leroux, Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer’s disease, *Biomaterials.* 31(23) (2010) 6031–6038.
- [80] G. Bastiat, J.C. Leroux, Pharmaceutical organogels prepared from aromatic amino acid derivatives, *J Mater Chem.* 19(23) (2009) 3867–3877.
- [81] F. Plourde, A. Motulsky, A.C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, H. Ong, J.C. Leroux, First report on the efficacy of l-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J Control Release.* 108(2–3) (2005) 433–441.
- [82] D. Wang, J. Zhao, X. Liu, F. Sun, Y. Zhou, L. Teng, Y. Li, Parenteral thermo-sensitive organogel for schizophrenia therapy, *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Eur J Pharm Sci.* 60 (2014) 40–48.

- [83] S. Nippe, S. General, Investigation of injectable drospirenone organogels with regard to their rheology and comparison to non-stabilized oil-based drospirenone suspensions, *Drug Dev Ind Pharm.* 41(4) (2015) 681-691.
- [84] Z. Li, J. Cao, B. Hu, H. Li, H. Liu, F. Han, Z. Liu, C. Tong, S. Li, Studies on the *in vitro* and *in vivo* degradation behavior of amino acid derivative-based organogels, *Drug Dev Ind Pharm.* 42(11) (2016) 1732-1741.

Chapitre I :

Etat de l'art – Association de deux technologies pharmaceutiques : les nanosystèmes et les hydrogels

SOMMAIRE

I.	AVANT-PROPOS	23
II.	REVUE :	24
II.1.	Abstract	24
II.2.	Introduction.....	26
II.3.	Liposomes-loaded gels... ..	27
II.3.1.	... for cancer therapy	27
II.3.2.	... against cutaneous diseases	31
II.3.3.	... for anesthesia / analgesia.....	34
II.3.4.	... against infectious diseases	35
II.3.5.	... against other diseases.....	36
II.4.	Micelle-based gels	37
II.4.1.	Gels loaded with micelles for cancer therapy	37
II.4.2.	Gelling micelles (against cancer and cutaneous diseases)	39
II.5.	Gels loaded with liquid or solid lipid nanocapsules and polymeric nanoparticles... ..	40
II.5.1.	... for cancer therapy	40
II.5.2.	... against inflammatory diseases	42
II.5.3.	... against other pathologies	43
II.5.4.	... without the gel matrix.....	45
II.6.	Gels loaded with dendrimers	47
II.7.	Gels-loaded with fullerene.....	49
II.8.	Conclusion	50
II.9.	Acknowledgments.....	50
III.	BIBLIOGRAPHIE	51

I. Avant-propos

L'association de nanosystèmes (NSs) et d'hydrogels permet de combiner les avantages de ces deux technologies et d'aboutir à de nouvelles propositions thérapeutiques, par la synergie de leurs propriétés intrinsèques.

Les NSs se présentent généralement sous la forme d'une suspension, de faible viscosité. Leur association avec un hydrogel permet de les retenir sur leur site d'administration et de prolonger ainsi leur libération. L'utilisation de voies d'administration inédites ou peu employées avec les NSs, notamment les applications topiques (dermale, nasale, buccale...) sont également permises. De plus, associés aux hydrogels, les pharmacocinétiques et biodistributions des NSs libérés sont modifiées, ce qui améliore leur efficacité thérapeutique tout en limitant le nombre d'administrations nécessaire et/ou les effets indésirables associés. D'autre part, l'emploi des NSs autorise la mise en œuvre de principes actifs (PAs) qui n'auraient pu être utilisés seuls dans les hydrogels (PAs lipophiles par exemple).

Les recherches menées sur l'association des NSs et des hydrogels sont foisonnantes, elles s'intéressent à de nombreux types de NSs, contre de multiples pathologies. Nous avons mené un travail de revue bibliographique sur ces travaux. Dans un but de concision, nous n'avons retenu que les travaux les plus aboutis ayant conduit au cours des 10 précédentes années à une évaluation *in vivo* du gel de NSs développé. La revue finale considère six catégories de NSs : les liposomes, les micelles, les nanocapsules lipidiques (à cœur solide ou liquide), les nanoparticules polymères, les dendrimères et les fullerènes. Le champ des applications thérapeutiques est extrêmement vaste et s'intéresse tout aussi bien à la cancérologie qu'à la dermatologie, ou aux problématiques d'analgésie.

Cette revue est en cours de soumission dans « *Journal of Controlled Release* ».

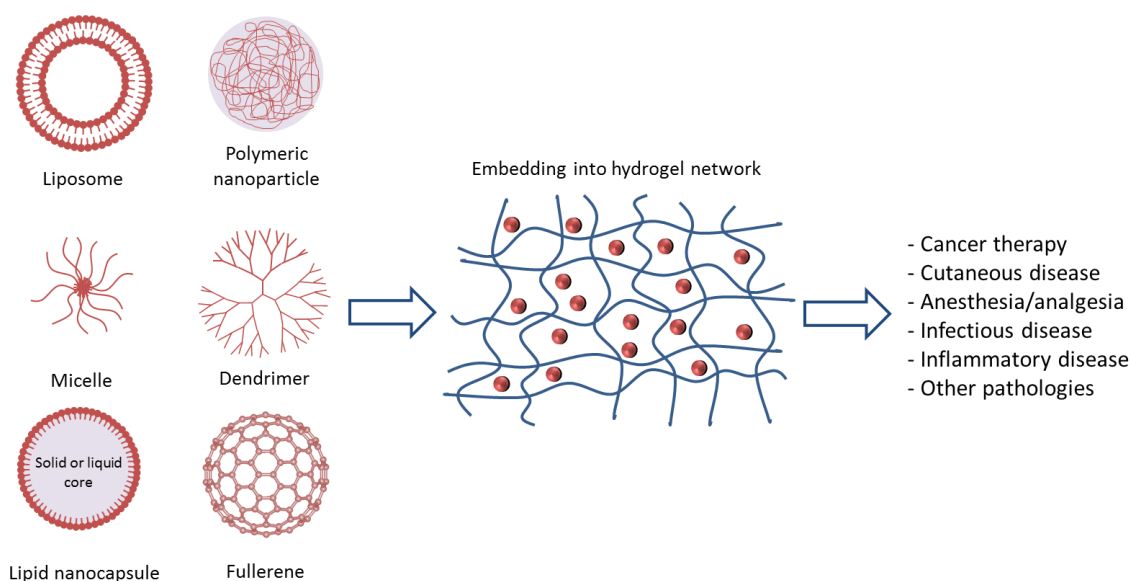


Figure 1.1: Résumé graphique de la revue bibliographique.

II. Revue :

Recent advances in nanocarrier-loaded gels: which drug delivery technologies against which diseases?

Marion Pitorre^{a,b}, Henri Gondé^{b,†}, Clotilde Haury^{b,†}, Marwa Messous^{b,†}, Jérémie Poilane^{b,†}, David Boudaud^{b,†}, Erdem Kanber^{b,†}, Glenn Alexis Rossemond Ndombina^{b,†}, Jean-Pierre Benoit^{a,b}, Guillaume Bastiat^{a,b,*}

^a MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Université Bretagne Loire, Angers, France

^b Master 2 Nanomédecines et R&D Pharmaceutique, Pharmacy Department, UFR Santé, Université Bretagne Loire, Angers

† These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Guillaume Bastiat

Tel.: +33 244 688531

Fax: +33 244 688546

E-mail: guillaume.bastiat@univ-angers.fr

Postal address: MINT (INSERM 1066 / CNRS 6021), Institut de Biologie en Santé – CHU, 4 rue Larrey, 49933 ANGERS Cedex 9, France

II.1. Abstract

The combination of pharmaceutical technologies can be a wise choice for developing innovative therapeutic strategies. The association of nanocarriers and gels provides new therapeutic possibilities due to the combined properties of the two technologies. Gels support the nanocarriers, localize their administration to the target tissue, and sustain their release. In addition to the properties afforded by the gel, nanocarriers can provide additional drug sustained release or different pharmacokinetic and biodistribution profiles than those from nanocarriers administered by the conventional route to improve the drug therapeutic index. This review focuses on recent (over the last ten years) *in vivo* data showing the advances and advantages of using nanocarrier-loaded gels. Liposomes, micelles, liquid and solid lipid nanocapsules, polymeric nanoparticles, dendrimers, and fullerenes are all nanotechnologies which have been recently assessed for medical applications, such as cancer therapy, the treatment of cutaneous and infectious diseases, anesthesia, the administration of antidepressants, and the treatment of unexpected diseases, such as alopecia.

Keywords

Gel; liposome; micelle; dendrimer; lipid nanocapsules, solid nanocapsules; polymeric nanocapsules; fullerene; health application; *in vivo*

Abbreviations

CH	Chitosan
β -GP	β -glycerophosphate
PC	Phosphatidylcholine
CHOL	Cholesterol
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyethyleneglycol
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
CMC	Carboxymethylcellulose
HEC	Hydroxyethyl cellulose
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose
HA	Hyaluronic acid

II.2. Introduction

Nanomedicine has been an exceptionally successful in therapeutic strategies for diseases such as cancer [1]. Nanotechnologies confer new pharmacological properties to drugs, which largely depend on the nanocarriers used, increasing their efficacy. Advantages, such as prolonged systemic circulation, passive or active targeting, high drug-loading yield, and the possibility of drug combination, lead to improved pharmacokinetic and biodistribution profiles for a better drug therapeutic index [2-4]. First used for cancer therapy [1,5], nanomedicines have now been developed for other diseases, such as atherosclerosis and diabetes [6,7], and other medical applications, such as *in vivo* imaging and tissue engineering [8].

Nanomedicines are generally used in suspension for therapeutic strategies by the intravenous route and are administered alone (repeated or not depending on the therapeutic scheme). When used in suspension, this pharmaceutical technology is of little interest for medical applications requiring localized administration or sustained release of the drugs. However, gel-based technologies can be used to confer the pharmacological properties necessary for these applications. Gels are by far the oldest technology used in the healthcare field, but are still the ideal topical vehicle for ocular [9,10], nasal [11], vaginal [12], intestinal [13], and dermal drug delivery [14]. Indeed, gels are drug-delivery platforms. The three-dimensional polymer network of the gel offers an ideal opportunity for prolonged release of therapeutic molecules, such as proteins [15], and gel-based techniques are being developed to improve their administration using stimuli-responsive *in situ* gelation [16]. Patient compliance and convenience is generally improved because of the non-painful and limited repeated administration. An important innovation has been the development of hybrid materials: bio-synthetic scaffolds with cell-loaded gels. They are of interest for *in vivo* tissue engineering and regeneration [17], as well as *ex vivo* applications. The gel mimics extracellular media and influences and guides cell development or differentiation. Studies have also been performed to define new immunological therapies, such as vaccine development [18].

Nanocarriers-loaded gels provide promising avenues to develop new therapeutic strategies, combining the advantages of both nano- and gel technologies. Clinical trials are currently on-going (<https://clinicaltrials.gov/>, accessed February 21, 2017). Fourteen clinical trials are reported with the status from "not yet open for participant recruitment", "currently recruiting participants", "terminated", to "completed". There are nine clinical trials on liposome- and five on nanoparticle-loaded gels from Phase I to Phase IV. They focus on a wide range of medical applications, such as antibacterial and antimicrobial treatments (with silver nanoparticles); the development of local anesthetics (with ropivacaine and lidocaine), tooth bleaching agents (with peroxide hydrogen/titanium oxide nanoparticles), and therapeutic treatments against periodontal intrabony defects (with hydroxyapatite silica nanocrystals), painful diabetic neuropathy (with capsaicin), and sub-acute soft tissue injuries (with ibuprofen). Cutaneous diseases are also included, given the obvious topical application, including acne (with povidone iodine), cutaneous leishmaniasis (with amphotericin-B), moderate atopic dermatitis (with HL-009), and the prevention of

radiation-induced dermatitis (after breast cancer) (with APN-201, a recombinant human superoxide dismutase). Finally, three clinical trials are focused on oncology, with the development of treatments against diffuse large B-cell lymphoma/follicular lymphoma grade IIIb (with rituximab/Myocet[®]/cyclophosphamide/vincristine/prednisone), hepatocellular carcinoma (chemoembolization with doxorubicin), and HIV/AIDS Kaposi's sarcoma (with Triomune[®]: stavudine/lamivudine/nevirapine).

The combination of nanotechnologies with gels is increasingly being considered for medical applications. In this review, we report on the technical advances in nanocarriers-loaded gels during the last ten years, focusing only on *in vivo* results. The nanocarriers reported in the literature are liposomes, micelles, liquid and solid lipid nanocapsules, polymeric nanoparticles, dendrimers, and fullerenes. When loaded in a gel matrix, these therapeutic strategies have given promising results for medical applications, such as cancer therapy, the treatment of infectious, cutaneous or inflammatory diseases, anesthesia/analgesia, and ocular application.

II.3. Liposomes-loaded gels...

There are many reports on liposome-loaded gels in the literature. This is mainly because of the longstanding application of this nanotechnology in nanomedicine. Several liposomal nanomedicines are already commercialized: Visudyne[®] (Novartis Europharm Ltd), Ambisome[®] (Gilead Sciences), Caelyx[®] (Janssen Cilag Internat Nv), Myocet[®] (Cephalon Europe), and Daunoxome[®] (Galen Limited). Often phospholipid-based, the vesicles are easy to formulate, biocompatible, and easily adaptable carriers, and have the remarkable ability to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic compounds.

II.3.1. ... for cancer therapy

A recurring problem in cancerology is the low bioavailability of drugs such as cytarabine, 5-fluorouracil, doxorubicin, bleomycin A6, etc., at the tumoral site after intravenous injection. Drug-loaded liposomes, dispersed in a gel, modify the pharmacokinetics of the drugs. Chemotherapeutic agents have a low plasma half-life and require a high dosing frequency. Sustained release of the drugs is a potentially good strategy to avoid repeated administration.

Mulik *et al.* developed a thermosensitive hydrogel (chitosan (CH) and β -glycerophosphate (β -GP)) containing cytarabine-loaded liposomes (egg phosphatidylcholine (egg-PC)/cholesterol (CHOL) 60/40 *mol/mol* - Diameter = 220 ± 4 nm - Polydispersity index (PdI) = 0.21 ± 0.1). The liposomal gel sustained the release of cytarabine after intramuscular administration to albino rats. Indeed, its $t_{1/2}$ was 29 h, compared to 20 h and 3 h for a cytarabine-loaded liposomal suspension and cytarabine-loaded gel, respectively. Moreover, the liposomal gel showed the lowest elimination rate constant, indicating that the drug release rate was slow and that the drug remained in the body for longer period [19].

Bleomycin A6 is an anticancer drug for esophageal cancer, hepatocellular carcinoma, colon cancer, hepatic metastasis, and colorectal cancer. Ding *et al.* proposed encapsulating bleomycin A6 in anionic liposomes (Diameter = 230 ± 3 nm - PdI = 0.23 ± 0.05 - Zeta potential (ZP) = -61 ± 2 mV), and then dispersing them in an *in situ* gelling system based on a poloxamer mixture (Pluronic® F127 and F68). They evaluated the gel retention properties *in vivo* in mice after subcutaneous injection. Bleomycin A6 in the liposomal gel was retained in the subcutaneous tissue for more than five days, whereas the drug in solution was no longer present after 24 h, demonstrating its rapid elimination [20].

Cutaneous administration of liposomal gels has also been tested. Hussain *et al.* developed a topical form of 5-fluorouracil (5-FU) to manage several skin problems (skin cancer, actinic or solar keratoses) and avoid oral-associated side effects. They developed elastic liposomes (PC/Span® 60 or Span® 80 or Tween® 80, from 70/30 to 95/5 mol/mol - Diameter = $130-250 \pm 10-20$ nm), which are ultra-deformable and can pass through small pores of the skin. The liposomes loaded with 5-FU were dispersed in a Carbopol® 980 gel to support the nanocarriers and to facilitate topical application. An *in vitro* skin permeation study showed a significantly higher drug permeation flux for elastic liposome (90 ± 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), than for the free drug solution (9 ± 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Moreover, the liposomal gel did not irritate the skin (erythema and edema), even after repeated applications of a toxic dose [21].

Guan *et al.* developed a liposomal (phosphatidylethanolamine (PE)/CHOL - Diameter = $240 \pm <1$ nm - PdI = 0.23 ± 0.01 - ZP = $-27 \pm <1$ mV) gel (Carbopol® 934) for transdermal delivery of propranolol to obtain an antiproliferative effect on severe infantile hemangioma. They observed no erythema or edema on rabbit skin after 24 h or 7 days of repeated application. The propranolol-loaded liposomal gel increased drug content in skin relative to propranolol-gel (without liposome) (123 vs. 76 $\mu\text{g}/\text{g}$) when applied to mice. They compared the plasma and tissue concentrations after topical application of propranolol-loaded liposomal gel and oral administration of propranolol suspension to mice. The drug concentration in plasma was the highest four hours following topical administration. In addition, the drug distribution in tissues was modified which could reduce side effects (in particular, in the heart). These promising results need complementary studies to evaluate the therapeutic efficacy of such strategies [22,23].

Proof of concept for *in vivo* efficacy of liposomal gels has also been established for intratumoral administration. Drugs in solution can rapidly leak outside the tumor, whereas liposomal gels can avoid the loss of the drug, increasing the time that the formulation remains at the administration site and its local action. Wang *et al.* developed a thermosensitive hydrogel (N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl]-CH and β -PG) containing doxorubicin-loaded liposomes (PC/CHOL 2/1 mol/mol - Diameter = 110 nm - PdI = 0.38 - ZP = -3 mV) to prolong doxorubicin release. They evaluated *in vivo* antitumor activity by the length of survival of intraperitoneal hepatocarcinoma xenograft-bearing mice (H22 cell line) treated with various intraperitoneally injected doxorubicin formulations. Mice receiving free doxorubicin showed

substantial weight loss due to toxic side effects. The liposomal gel avoided the side effects and increased the mean survival time (20% of the mice were still alive after 60 days) [24].

Arai *et al.* used commercial doxorubicin-loaded liposomes (Doxil® from Alza Pharmaceuticals, Inc., Foster City, CA, USA, this form is similar to Caelyx®) dispersed in a thermosensitive hydrogel (poly(N-isopropylamide-co-*n*-butyl methacrylate) and polyethyleneglycol (PEG)) to develop a continuous local drug delivery system for malignant glioma. They administered the liposomal gel and other doxorubicin formulations to the tumors of subcutaneous glioma xenograft-bearing mice (U87-MG cell line). The inhibition of tumor growth lasted longer for mice treated with liposomal doxorubicin-loaded gel (38 days) than those treated with free doxorubicin-loaded gel (14 days) [25].

Peng *et al.* combined a doxorubicin-loaded liposomal gel with local cancer radiotherapy. Commercial doxorubicin liposomes (Lipo-Dox purchased from TTY BioPharm Co., Ltd., Taipei, Taiwan) and therapeutic radionuclides (¹⁸⁸Re-Tin) were dispersed in a thermosensitive hydrogel of poly(ε-caprolactone)-PEG-poly(ε-caprolactone) (PCL-PEG-PCL). They performed intratumoral administration in subcutaneous liver tumor xenograft-bearing mice (BNL-Luc cell line). The synergic association of doxorubicin-loaded liposomes and ¹⁸⁸Re-Tin-loaded hydrogel inhibited tumor growth (99.8%) better than treatment with either ¹⁸⁸Re-Tin-loaded gel (94.4%) or doxorubicin-loaded liposomal gel (69.8%) alone (Figure 1.2) [26].

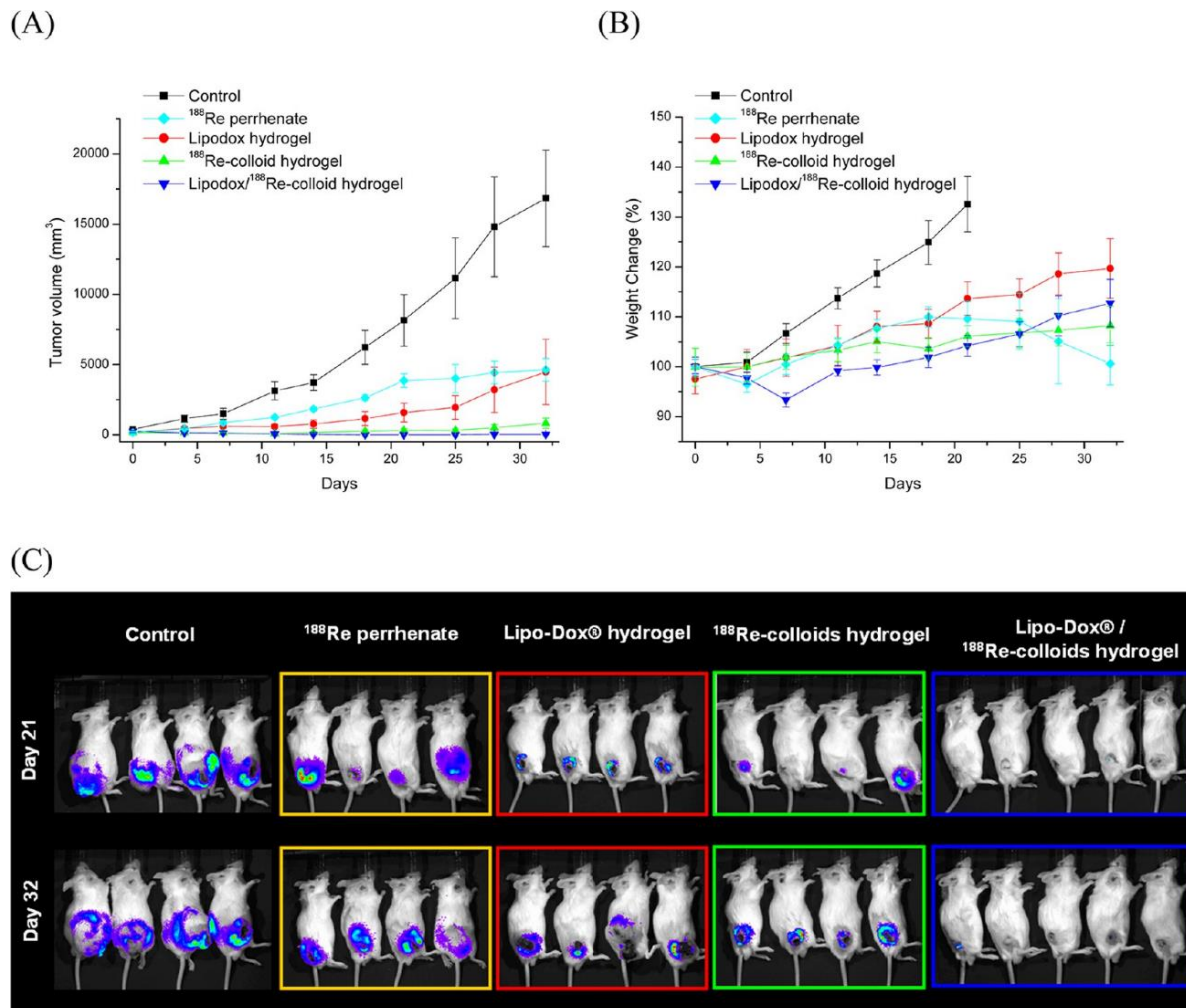


Figure 1.2: The antitumor effects of Lipo-Dox/ ^{188}Re -Tin hydrogel. (A) Tumor growth volume (mm^3) and (B) weight change (%) of control (■), ^{188}Re perrhenate (◆), Lipo-Dox hydrogel (●), ^{188}Re -Tin hydrogel (▲), or Lipo-Dox/ ^{188}Re -Tin hydrogel (▼) were determined in BNL/luc tumor-bearing mice. (C) *In vivo* bioluminescence imaging of BNL/luc tumor-bearing mice after the different treatments on day 21 and day 32 (adapted from ref [26]).

Other drugs were tested using the liposomal gel strategy for intratumoral administration. Xing *et al.* combined topotecan-loaded liposomes (Soybean phospholipid/CHOL 4/1 mol/mol - Diameter = 140 ± 12 nm) and injectable thermosensitive *in situ* hydrogel (CH and β -GP) for the treatment of hepatic tumors. Administration to subcutaneous hepatocarcinoma xenograft-bearing mice (H22 cell line), delayed tumor growth, resulting in a maximal survival period of 44 days, versus less than 30 days for controls and other topotecan formulations [27]. Fang *et al.* evaluated the use of alginate hydrogels containing cisplatin-loaded liposomes (PE/CHOL 4/1 w/w). Cisplatin accumulation in tumors was 4.4-fold higher, following intratumoral administration to subcutaneous melanoma xenograft-bearing mice, than for mice treated with cisplatin solution, cisplatin-loaded liposomes, or cisplatin-loaded gel [28].

Finally, two studies focused on the use of liposomal gels to develop anticancer treatments without using conventional chemotherapy agents. The first approach is based on gadolinium neutron capture therapy (Gd-NCT). The success of Gd-NCT depends on the ability to deliver and maintain a sufficient amount of Gd inside tumors. Upon neutron irradiation, the emission of γ -rays and Auger electrons from the Gd kills the tumor cells. Le *et al.* encapsulated Gd in liposomes (Soy PC/CHOL/PEG2000 50/35/5 molar ratio) and then dispersed them inside a thermo-sensitive polymeric gel (commercial BD Matrigel™ matrix, purchased from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to improve the retention time of Gd in tumors. They tested the formulation in three animal models: subcutaneous prostate, lung, or lymphoma xenograft-bearing mice (PC-3, TC1 or EL4/PSA cell lines, respectively). There was less Gd leakage from the tumors following intratumoral administration of the liposomal gel than in mice treated with Gd-loaded liposomes in suspension. At the same time, higher Gd levels were observed in the blood, liver, and spleen following intratumoral administration of Gd-loaded liposomes in suspension than in mice receiving the liposomal gel. Thus, the liposomal gel limited Gd leakage from the tumor into circulation [29]. The second study examined photodynamic therapy (PDT) using hydroxy-aluminum phthalocyanine. Exposure of this photosensitizer to specific wavelengths of light produces cytotoxic singlet oxygens that can kill tumor cells. Sutoris *et al.* entrapped the photosensitizer in liposomes (lecithin) and then mixed them with a commercial carboxymethylcellulose (CMC) gel (Pharmgest, Ltd., Pribram, Czech Republic). They observed good antitumor activity for two tumor types: aggressive (PC3 cell line) and less aggressive (LNCaP cell line) prostate carcinoma, after intratumoral administration to subcutaneous prostate xenograft-bearing mice, followed by PDT irradiation (635 nm peak). However, a higher dose of hydroxy-aluminum phthalocyanine was required to kill the PC3 tumor [30].

II.3.2. ... against cutaneous diseases

Drug-loaded liposomal gels are suitable for the treatment of skin diseases. Gels maintain the liposomes at the skin surface and the liposomes can cross the *stratum corneum* barrier, delivering the drug close to the lesion. Therapeutic strategies reported during the past 10 years have focused on skin diseases involving immune dysfunction, including allergic, autoimmune, and inflammatory mechanisms.

Li *et al.* proposed an alternative treatment for chronic allergic dermatitis: a liposomal (PC/Tween® 80/tocopherol acetate - Diameter = $120-170 \pm 6-16$ nm - PdI = $0.01-0.03 \pm < 0.01$ - ZP = $0-6 \pm 1$ mV) gel (Carbomer® 971) loaded with 18β -glycyrrhetic acid. They tested the liposomal gel on a murine 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis model (on the ear), 1 h before and 12 h after the application of 2,4-dinitrofluorobenzene. The liposomal gel decreased the resulting edema and erythema better than the two controls: free drug-loaded gel and commercial cream (triamcinolone acetonide and econazole nitrate, from Janssen Pharmaceutical Co. Ltd, Xi-An, China) [31]. Eroğlu *et al.* also developed a liposomal (Phospholipon® 90G/CHOL - Diameter = $220-330 \pm 1-6$ nm - PdI = $0.48-0.55 \pm 0.02-0.09$ - ZP = $-27-29 \pm < 1$ mV) gel (CH) using liposomes containing betamethasone valerate or diflucortolone valerate to treat atopic dermatitis. They compared both to commercial products (Betnovate® cream, Brentford, UK

or Temetex® cream, Istanbul, Turkey) using rat edema or atopic dermatitis models (induced by carrageenan or 2,4-dinitrofluorobenzene applications, respectively). All treatments were applied twice a day for up to 12 days. The liposomal gels had the highest anti-inflammatory activity, reducing the erythema and restoring the tissue to normal. Vasodilation, edema, the non-uniform appearance of epithelial cells, and lymphocyte infiltration completely disappeared [32].

The anti-inflammatory activity of liposomal gels has been assessed on cutaneous inflammation. C-Phycocyanin-loaded liposomes (PC/CHOL 1/1 mol/mol - Diameter = 591 ± 73 - PdI = 0.22 - ZP = -58 ± 9 mV) dispersed in a gel (Carbopol® 940 and glycerin) were evaluated on arachidonic acid- or croton oil-induced ear edema in rat models. C-Phycocyanin accumulation in the skin was better with the liposomal gel than the free drug-loaded gel, showing anti-inflammatory activity with the inhibition of edema (60-70%). Myeloperoxidase activity, directly proportional to the neutrophil concentration in the inflamed tissue, was also reduced (60%) [33]. The anti-inflammatory activity of indomethacin-loaded liposomes (PC/CHOL 9/1 mol/mol - Diameter = 200 ± 12 nm - PdI = 0.03) dispersed in xanthan gum-based gel was evaluated in a clinical trial involving 12 healthy human volunteers (aged between 25 and 35 years). Six hours after topical application of indomethacin-loaded liposomal gel, non-loaded liposomal gel, or an indomethacin water solution, the skin of the volunteers was washed and dried, exposed to UVB for 1, 3, or 6 h, and the induced erythema monitored for 52 h. The indomethacin solution was more effective than the indomethacin-loaded liposomal gel in preventing UVB-induced erythema induced by one hour of UVB exposure (48% vs 32% inhibition, respectively). However, after 3 or 6 h exposure, the liposomal formulation provided better protection (44% and 50% inhibition, respectively), due to a higher drug concentration in the tissue. Moreover, the anti-inflammatory effect was more prolonged when indomethacin was encapsulated in liposomes [34].

Liposomal gels have also been investigated for the treatment of one of the most common and well-known skin diseases: acne. An approach to treat mild to moderate acne is the use of photodynamic treatment using a photosensitizer to improve treatment efficacy. A CMC gel containing methylene blue (photosensitizer)-loaded liposomes (PC/CHOL 1/0.2 mol/mol) was developed and used in a clinical trial. A randomized, controlled, blind study involving 13 human volunteers was conducted. For two periods of two weeks each, patients received a daily application of gel for 15 min on half of the face (the other half used as a control), the gel was removed, and their face illuminated with red light $80\text{J}/\text{cm}^2$. Twelve weeks after treatment, 90% of patients had moderate to strong improvement (reduced count of lesions) proving the efficacy of the treatment. Moreover, after the first treatment, 60% of patients felt no pain, rising to 85% after the second treatment. Methylene blue-loaded liposomal gels appear to be more effective and trigger less side effects than the drug used in the clinic: aminolaevulinic acid [35]. Fadel *et al.* performed a clinical trial based on the same therapeutic strategy to treat hidradenitis suppurativa lesions: a photodynamic treatment using methylene blue-loaded liposome (Span® 60/CHOL 1/0.2 mol/mol) dispersed in a carboxy methyl cellulose gel. Eleven patients were involved. They received the liposomal gel, on one side of their

body, and free methylene blue gel on the other, followed by irradiation of the affected sites with intense pulsed light (630 nm filter). The liposomal gel reduced the size of the lesions (77%) more than the free methylene blue-loaded gel (44%), without pain, erythema, or hyperpigmentation [36]. Finally, Pornpattananangkul *et al.* developed antimicrobial lauric acid-loaded liposomes (Egg PC/CHOL/lauric acid 5/1/4 weight ratio - Diameter = $120 \pm < 1$ nm - PdI = 0.12 - ZP = -44 ± 2 mV) to treat *Propionibacterium* acne infections. Liposomes were dispersed in hydroxyethyl cellulose, glycerin, and PEG400 gel, and the formulation compared to the standard treatment: commercial benzoyl peroxide and salicylic acid creams (Clean & Clear®). The liposomal gel showed the same efficacy as the two commercial creams on a mouse model (ear inoculated with the bacteria), but did not induce the major side effects of the commercial treatment: erythema, edema, and apparent irritation (Figure 1.3) [37].

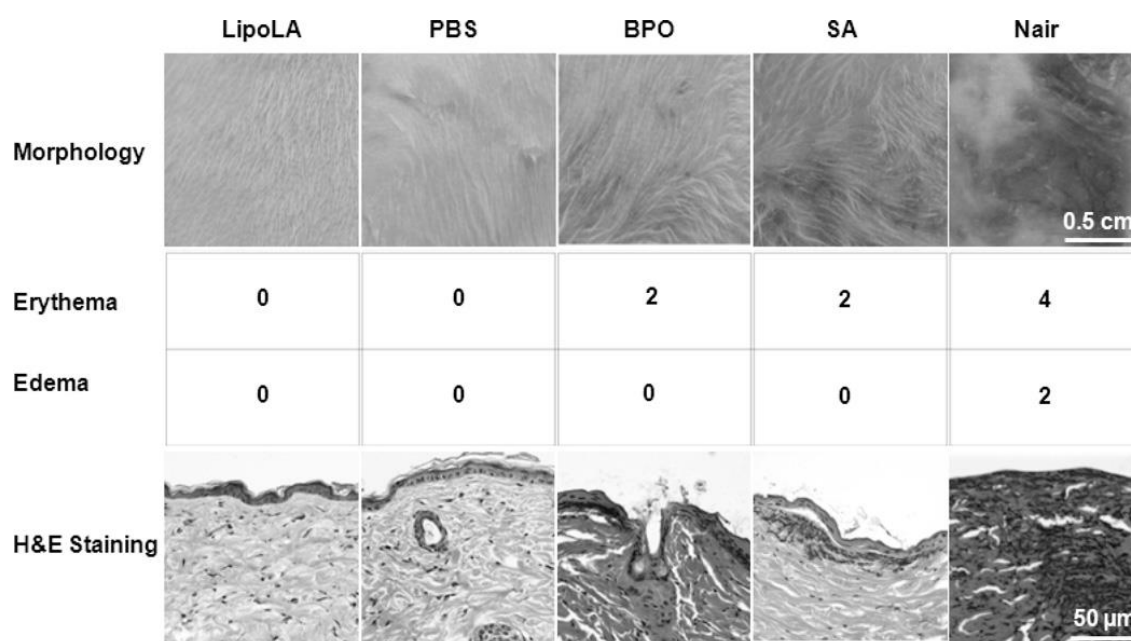


Figure 1.3: Toxicity study of lauric acid-loaded liposomes hydrogel (LipoLA) on shaved mouse back skin, compared to non-loaded hydrogel (PBS), benzoyl peroxide cream (BPO), salicylic acid cream (SA), Nair® cream (Nair) (n=6 per group): morphology of the skin after treatment, erythema (Draize's irritation scores), edema scores, histological tissue evaluation (hematoxylin and eosin, H&E Staining) (adapted from ref [37]).

Finally, this application has been used for the development of a hair loss treatment, stimulating the follicles with vascular endothelial growth factor (VEGF). Gnann *et al.* tested a VEGF-loaded liposomal gel. They conducted the *in vivo* study on 18 hamsters which received Aristoflex® gel (commercial product) alone or supplemented with 1 or 3% VEGF-loaded liposomes, applied twice daily to their shaved backs, for 15 days. VEGF-liposomes increased the speed and thickness in hair growth. However, several hematological parameters were altered and additional studies are necessary to confirm this potential toxicity [38].

II.3.3. ... for anesthesia / analgesia

Gels loaded with liposomes are useful for topical application, rapidly achieving a high localized drug concentration in tissues close to the administration site by crossing the *stratum corneum*. These properties are particularly relevant for the development of localized delivery of anesthetic drugs. Three common anesthetic drugs: benzocaine, lidocaine, and ropivacaine, have been tested over the past 10 years.

Franz-Montan *et al.* have focused their clinical research on the local anesthesia of oral mucosa, using locally administered liposomal gels. First, ropivacaine was encapsulated in liposomes (Egg PC/CHOL/ α -tocopherol 4/3/0.07 molar ratio - Diameter = 370 ± 8 nm - PdI = 0.12-0.17) and dispersed in a gel (based mainly on Carbopol®). They compared the liposomal gel to a commercial benzocaine gel (Benzotop®, DFL Ind Com, Rio de Janeiro, Brazil) containing a 10-fold higher concentration of the active molecule. After application to the maxillary buccal fold of the lateral incisor region, the two gels showed a similar decrease in pain response to needle insertion in 40 healthy volunteers, proving the efficacy of the less concentrated ropivacaine liposomal formulation. Nevertheless, none of the formulations were able to induce pulpal anesthesia [39]. The same formulation was later compared to the standard commercial lidocaine/prilocaine topical formulation (EMLA®, Astra-Zeneca, Cotia, Brazil) (30 healthy volunteers). The ropivacaine-loaded liposomal gel, although effective on the buccal mucosa, was not effective in reducing the pain induced by insertion of a needle into the palatal mucosa; EMLA® was the only effective topical anesthetic [40]. Franz-Montan *et al.* encapsulated benzocaine in the previously defined liposomal gel to improve palatal mucosal anesthesia. They compared the formulation to a free benzocaine-loaded gel (same benzocaine concentration) and commercial Benzotop® (benzocaine 2-fold more concentrated) on 40 healthy volunteers. They observed the longest duration of anesthesia with the liposomal gel for soft tissue, although it did not induce pulpal anesthesia [41]. Finally, they developed a lidocaine-loaded liposomal gel, using the same platform already described. The addition of liposomes to encapsulate the lidocaine reduced the pain induced by needle insertion more than a commercial free lidocaine-loaded gel (Xylocaina® ointment, AstraZeneca, Cotia, Brazil). The liposomal gel had similar *in vivo* clinical performance as the standard commercial formulation EMLA® (40 healthy volunteers), and could be used as a topical anesthetic agent for dentistry [42].

Mura *et al.* also developed a benzocaine-loaded liposomal (PC/CHOL 50/50 w/w - Diameter = 395-560 nm - PdI = 0.05-0.18 - ZP = -42-45 mV) gel (Carbopol® 940). They assessed the anesthetic activity of free benzocaine-loaded gel and the liposomal gel *in vivo* in rabbits using the conjunctival reflex test after application of the formulations. They counted the number of stimulations with a cat whisker required to provoke the reflex (palpebral closure) (Table 1.1). Liposomal encapsulation significantly improved both the intensity and duration of the anesthetic effect of benzocaine [43].

Table 1.1: Effect induced by some benzocaine (BZC)-loaded liposomal gels on the rabbit conjunctival reflex test compared to controls (4–6 rabbits per group), * P < 0.01 in comparison with Non-loaded liposomal gels, † P < 0.01 in comparison with BZC-loaded gels (adapted from ref [43]).

Ocular treatment	Eye	Number of stimuli to induce conjunctival reflex			
		Time after treatment			
		10 min	20 min	30 min	40 min
Gel	Left	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0
Gel	Right	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Non-loaded liposomal gel	Left	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Non-loaded liposomal gel	Right	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Gel	Left	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
BZC-loaded gel	Right	21.4 ± 3.3*	17.8 ± 2.5*	14.1 ± 1.6*	2.3 ± 0.2
Non-loaded liposomal gel	Left	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
BZC-loaded liposomal gel	Right	35.2 ± 4.6*†	28.8 ± 4.5*†	23.5 ± 5.2*†	11.7 ± 4.9*†

Finally, Ahmed *et al.* focused on the development of a transdermal formulation of tramadol to manage mild to moderate chronic pain using a tramadol-loaded liposomal (Phospholipon® 90G and ethanol - Diameter = 133 ± 3 nm) gel (Carbopol® 934). They tested this formulation *in vivo* on Wistar rats to explore its irritancy index, pharmacokinetics, and efficacy, comparing it to orally administered tramadol (the current therapeutic scheme, requiring repeated dosing). The liposomal gel appeared to be non-irritating and safe. Moreover, bioavailability was significantly higher (7.5-fold) for the transdermal than oral route and the hot plate method showed a significantly prolonged analgesic effect (48 h) versus that of the oral solution (4.5 h) [44].

II.3.4. ... against infectious diseases

The combination of liposomes and gels permits local and long-lasting application of drugs and could be used to prevent infections. Caron *et al.* studied the prevention of HIV infection during sexual intercourse. A liposomal (egg PC/CHOL 2/1 mol/mol) gel (Natrosol® 250, Carbopol® 974 and glycerol), containing MC1220, a non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitor, was developed for intravaginal administration. MC1220-loaded liposomal gel was tested by single and repeated applications in adult female rhesus macaques challenged with RT-SHIV, a chimeric simian immunodeficiency virus which expresses envelope markers of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The liposomal gel provided moderate protection: seven of 14 treated animals were not infected after challenge, whereas only one of 10 control animals were

protected. In addition, repeated application resulted in a significant decrease of viral RNA in infected animals [45]. Liposomes associated with a gel were also used for conventional treatment of infection. Yang *et al.* developed a liposomal (transfersomes based on a complex mixture of phospholipids, Tween® 80, and various surfactants - Diameter = 70 ± 1 nm) gel (HMC) to improve skin penetration of terbinafine hydrochloride (antifungal drug) used for the treatment of onychomycosis (fungal infection of nail). All pharmacokinetic parameters improved after topical application of the liposomal gel to the skin of rats relative to the commercial formulation of terbinafine: Lamisil® AT cream. The T_{max} , C_{max} , and AUC were two-, and three-fold higher, respectively, demonstrating better bioavailability [46].

II.3.5. ... against other diseases

Ibuprofen is a common non-steroidal anti-inflammatory drug used for general inflammation and rheumatic symptoms. Gaur *et al.* developed ibuprofen-loaded liposomes (PC/CHOL/dicetyl phosphate 7/3/1 molar ratio - Diameter = 159-174 nm - PdI = 0.33-0.46) dispersed in a gel (Carbopol® 934). They compared the *in vivo* efficacy of the liposomal gel to a free ibuprofen-loaded gel and standard oral anti-inflammatory treatment. Gel formulations were applied before inducing paw edema in a rat model using carrageenan. The liposomal gel provided maximum inhibition of edema (protection against carrageenan insult). Although standard *per-os* treatment (up to 3 h application) provided comparable inhibition, the liposomal gel could result in better patient compliance as oral administration of ibuprofen can cause gastrointestinal troubles [47].

Ocular topical administration of conventional drug formulations is convenient, but requires high drug doses and/or frequent administration to provide sufficient drug bioavailability. Liposomal gels could improve ocular drug delivery. Vitamin A palmitate is used for the treatment of dry eye disorder. This drug was loaded in liposomes (lecithin/CHOL/vitamin E 3/1/0.05 weight ratio - Diameter < 100 nm - ZP < 0), coated with N-trimethylchitosan, and mixed into a thermosensitive gel (Poloxamer® 407). The pharmacokinetics in aqueous humor and ocular irritation caused by the liposomal gel were assessed in healthy albino rabbits. The liposomal gel allowed long corneal retention time of the drug, did not show significant local irritation, and resulted in sustained release of the drug and a 17-fold increase in ocular vitamin A bioavailability over that of the standard commercial Oculotect® gel (Excelvion AG, Hettlingen, Switzerland) [48].

Meng *et al.* proposed an innovative transdermal delivery approach to improve the compliance and comfort of patients undergoing testosterone deficiency therapy. This hormonal disorder can lead to cardiovascular disease, osteoporosis, diabetes, sexual dysfunction, sarcopenia, and emotional troubles. Testosterone propionate was loaded into liposomes (PC/ethanol/CTAB/Cremophor® EL-35 3/40/0.5/0.5 weight ratio - Diameter = 150 ± 14 nm - PdI < 0.2 - ZP = 14 ± 3 mV) and then dispersed in a gel (Carbopol® 941). The liposomal gel was the most efficient of the testosterone propionate delivery systems tested at enhancing *in vivo* transdermal flux across rat skin [49].

El-Nabarawi *et al.* optimized a liposomal transdermal formulation to improve paroxetine bioavailability and reduce side effects of this antidepressant. The drug was loaded into liposomes (PC/CHOL 2/1 mol/mol - Diameter = 265 ± 1 nm - ZP = $-7 \pm < 1$ mV) and then dispersed in a gel (HMC). The final product was placed in transdermal patch reservoirs. Healthy New Zealand rabbits were used to measure induced skin irritation and bioavailability of the formulation. The liposomal gel did not cause noticeable irritation or inflammation on or around the patch area. The bioavailability of paroxetine by the transdermal route was 2.8-fold higher than by the oral route and the paroxetine blood concentration reached its maximal levels after 12 h and 6 h for the transdermal and oral routes, respectively [50].

The main limitation of ischemia treatment (surgical revascularization, angioplasty, stenting, and catheter based atherectomy) is that the atherosclerotic disease process is continuous. One potential therapeutic strategy is the induction of angiogenesis using growth factors to restore blood flow to the tissue. Das *et al.* combined FGF-2 growth factor and syndecan-4 (a co-receptor in the signaling pathway) in liposomes (PC/PE/CHOL/sphingomyelin 4/2/2/2 weight ratio), dispersed them in an alginate gel, and molded it to obtain a subcutaneous implant. This treatment significantly enhanced the formation of new blood vessels in Ob/Ob mice: 6-fold greater thickness of the vascular layer than when using FGF-2 alone [51].

II.4. Micelle-based gels

Gels loaded with micelles have also been reported in the literature. The most commonly used for medical applications are polymeric micelles: self-assembled structures composed of amphiphilic block co-polymers with distinct hydrophobic and hydrophilic domains. Polymeric micelles are more stable and biocompatible than micelles with low molecular weight surfactants. Their hydrophobic core is particularly suitable for lipophilic drugs, although good strategies have been reported for hydrophilic drugs, particularly biological molecules.

II.4.1. Gels loaded with micelles for cancer therapy

Wu *et al.* developed a micelle-loaded gel for lung cancer treatment using a dual drug delivery system. Paclitaxel was loaded into PEG-PCL micelles and dispersed in a cisplatin-containing thermosensitive hydrogel (PEG-PCL-PEG). The median survival time was 53 days after intratumoral administration of the formulation in subcutaneous lung cancer xenograft-bearing mice (A549 cell line). This was significantly longer than for the controls (paclitaxel and cisplatin in solution, non-loaded gel, and saline). Fewer microvessels and lower proliferative activity were observed in tumors of the micellar gel-treated mice than those of the control groups by immunohistochemical analysis [52].

Kim *et al.* combined Pluronic[®] F127 micelles and a thermoreversible HMC gel for local and sustained docetaxel delivery. They evaluated the intratumoral efficacy of the docetaxel-loaded micellar gel in subcutaneous melanoma xenograft-bearing mice (B16-F10-luc cell line). The sustained release of docetaxel

in the tumor resulted in an improved anticancer effect and a prolonged survival: the relative tumor volumes were reduced by half compared to free drug administration (Figure 1.4) [53].

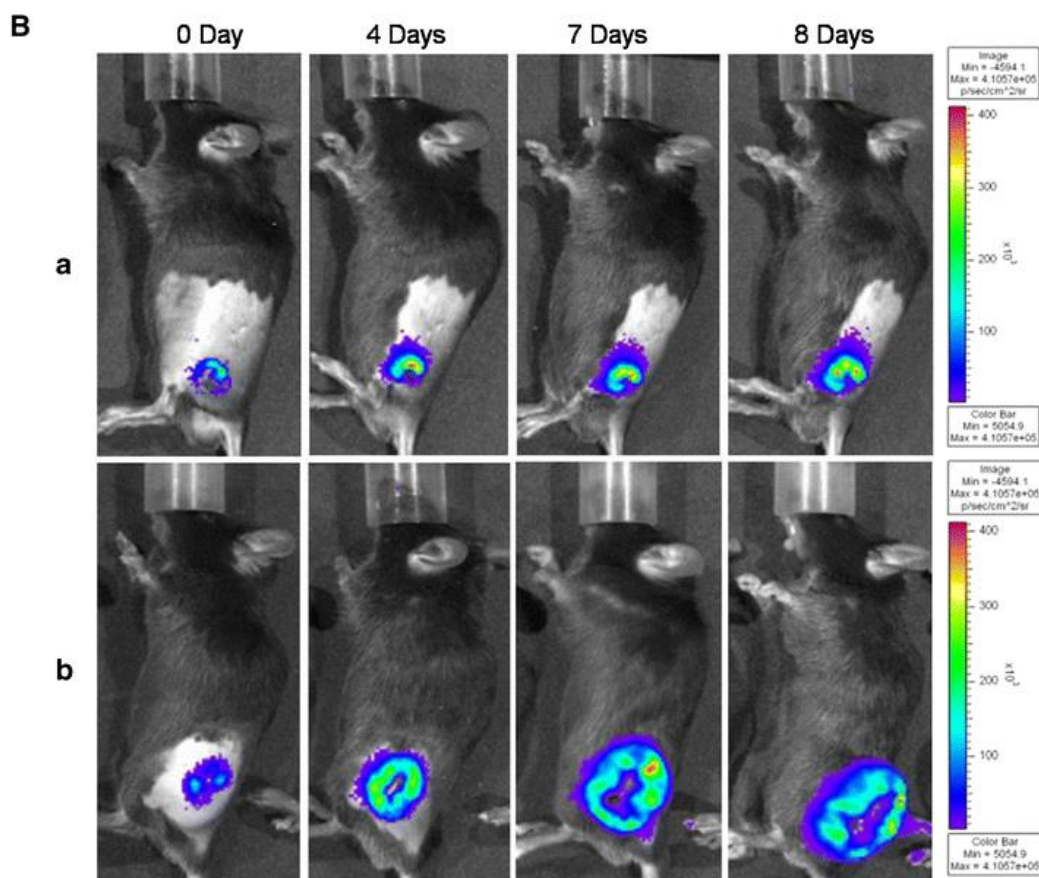


Figure 1.4: *In vivo* anticancer activity (luciferase activity) in B16-F10-luc melanoma tumor-bearing mice for (a) docetaxel-loaded micellar gel (30 mg/kg) and (b) non-loaded micellar gel (adapted from ref [53]).

Finally, Sheu *et al.* developed a thermosensitive hydrogel system for co-delivery of docetaxel and doxorubicin to improve localized cancer therapy of colorectal cancer. Docetaxel was loaded into mixed micelles (Pluronic® F127 and L121) and dispersed in a hyaluronic acid (HA) thermosensitive gel loaded with doxorubicin. Intratumoral or peritumoral injections of the formulation in subcutaneous colorectal tumor-bearing mice (CT-26 cell line) resulted in the best growth inhibition of tumors (92%) relative to the free drug solution or micelles or hydrogel alone (from 50 to 86%). Moreover, the concentration of both drugs in the blood and organs (heart, lung, liver and kidneys) was lower after subcutaneous and intratumoral administration of the formulation than after intravenous injection of both drugs in solution (pharmacokinetic and biodistribution studies). The persistence of the drugs in tumors three days after administration was also significantly better for the formulation than the controls [54].

II.4.2. Gelling micelles (against cancer and cutaneous diseases)

Many studies have examined the use of *in situ* gelling polymeric micelles. They consist of a suspension of polymeric micelles that form a gel at body temperature due to the lower temperature of critical solubility of the block copolymers.

De Graaf *et al.* sought to improve carcinoma treatment by encapsulating paclitaxel in a thermo-sensitive block copolymer: poly (N-isopropylacrylamide) - PEG - poly(N-isopropylacrylamide) micelles, leading to a hydrogel at body temperature. The formulation was intraperitoneally administered to intraperitoneal human squamous cell carcinoma xenograft-bearing mice (14C cell line). The gel was well-tolerated, with no signs of side effects, and tumor growth was completely inhibited for at least three weeks following a single administration. The release kinetics of paclitaxel are controlled by the dissolution rate of the gel. Pharmacokinetic studies confirmed the sustained release of the drug with a bioavailability of 100% and the possibility to administer paclitaxel doses higher than the maximal intravenously tolerated dose [55].

Yang *et al.* incorporated docetaxel into an injectable thermo-sensitive mixed micelle (Pluronic® F127 and Tween® 80) gel to develop a regional chemotherapy for gynecological solid cancer. Various administration routes (intratumoral, peritumoral, and subcutaneous) were tested in subcutaneous ovarian tumor xenograft-bearing mice (SKOV-3 cell line). Intratumoral administration of the formulation resulted in the greatest decrease of tumor growth. Administration of the micellar gel also resulted in greater inhibition of tumor growth than administration of docetaxel loaded in a gel (without micelles) (Figure 1.5) [56].

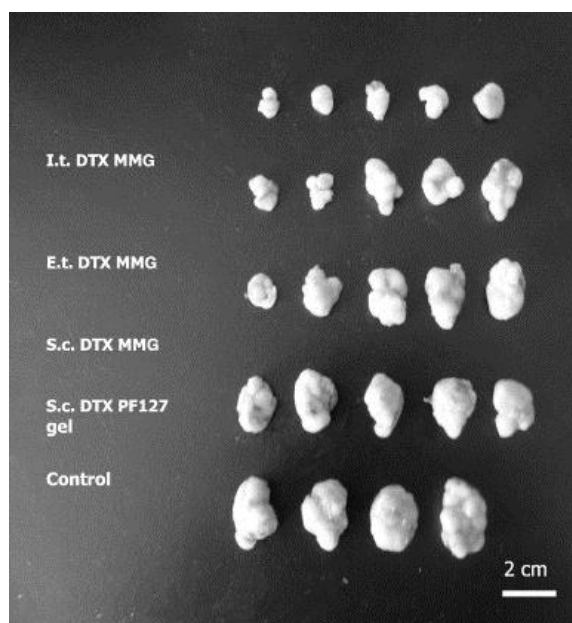


Figure 1.5: Inhibitory effects of a single dose of intratumoral (I.t.), peritumoral (E.t.) and subcutaneous (S.c.) injections of docetaxel (DTX)-loaded micellar gel (MMG) and DTX-loaded gel (PF127 gel): image of SKOV-3 carcinoma xenografts excised from tumor-bearing mice after 18 days post treatment (adapted from ref [56]).

Small interfering RNA (siRNA) can provide potentially promising therapies by inhibiting the level of specific proteins. However, they are unable to pass through the cell membrane, which requires their encapsulation. Kim *et al.* developed a biodegradable folate-polyethyleneimine-co-poly(organophosphazene) polymer. siRNA and folate-polyethyleneimine(PEI)-conjugated poly(organophosphazene) enabled the formation of amphiphilic polymers which form thermosensitive micelles, becoming a gel once administered *in vivo*. siRNA was used in the study to decrease the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF levels in tumors decreased after only one subcutaneous administration of the formulation in subcutaneous human prostate tumor xenograft-bearing mice (PC-3 cell line), resulting in an anti-tumor effect that lasted 14 days [57].

Gong *et al.* proposed a strategy consisting of curcumin loaded micelles (PEG-PCL biodegradable copolymer) that forms a gel *in situ* for cutaneous wound repair. Hydrogels are suitable for cutaneous wound healing, preventing dehydration of the wound while delivering drugs. They evaluated *in vivo* wound healing activity using linear incision and full-thickness excision wound models in rats. The curcumin-loaded micellar gel was compared to various controls, consisting of curcumin-loaded micelles and a non-loaded micellar gel. The micellar gel improved wound closure and increased re-epithelialization in the excision model. In the incision model, use of the micellar gel resulted in higher tensile strength and thicker epidermis than use of the control formulations. Tissue granulation was better organized in both models, with good fibroblastic deposition, increased total collagen content, and higher wound maturity. Furthermore, the formulation showed antioxidant activity [58].

II.5. Gels loaded with liquid or solid lipid nanocapsules and polymeric nanoparticles...

The concept of using polymeric nanoparticles or solid and liquid lipid nanocapsules as drug delivery carriers is relatively new. The use of gels loaded with these nanoparticles for medical applications has only been studied over the last three years.

II.5.1. ... for cancer therapy

Shen *et al.* dispersed paclitaxel-loaded polymeric (PEG-poly(d,l-lactide-co-glycolide)-poly(l-lysine)-cyclic peptide (arginine-glycine-aspartic-glutamic-valine acid)) nanoparticles (Diameter = 130 ± 28 nm) in a thermosensitive gel (Pluronic® F127, Pluronic® F68, HPMC, HMC and sodium alginate). They studied the sustained release and antitumor effect of paclitaxel *in vivo* in subcutaneous and orthotopic pancreas tumor xenograft-bearing mice (Aspc-1/PTX cell line) after intratumoral administration of the gel loaded with nanoparticles and various controls. The gel formulation was retained in the tumor for over 50 days vs several days for paclitaxel in solution. The gel loaded with nanoparticles exhibited higher inhibition of tumor growth than paclitaxel in solution, paclitaxel-loaded nanoparticles, or the non-loaded gel, irrespective of the tumor model. Furthermore, the toxicity for critical organs (heart, liver, spleen, lung, kidney) after

administration of the gel loaded with nanoparticles was low, and lower than that due to systemic administration of paclitaxel (Figure 1.6) [59].

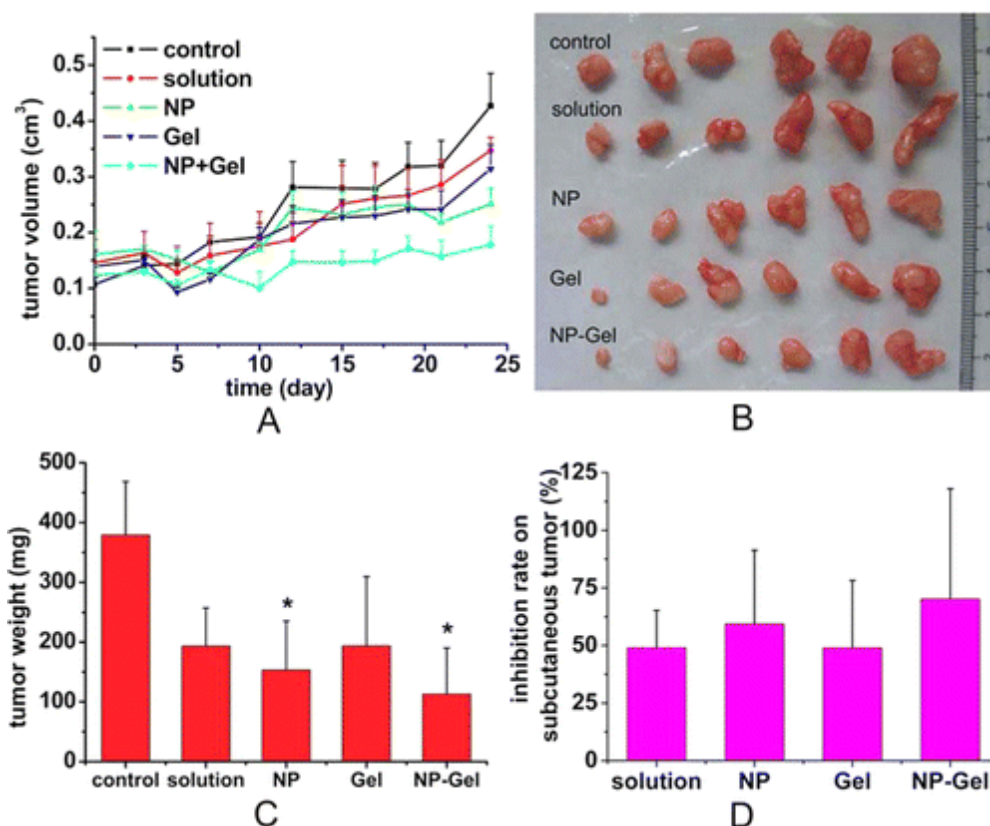


Figure 1.6: Tumor inhibition of paclitaxel-loaded nanoparticular gel (NP+gel), paclitaxel-loaded gel (Gel), paclitaxel-loaded nanoparticles (NP), free paclitaxel (solution) and saline (control) on subcutaneous Aspc-1/PTX xenograft tumor-bearing mice. (A) Tumor growth curves; (B) Photos of the tumors; (C) Tumor weight and (D) Tumor inhibition rate. $n=6$, mean \pm SD, * $p < 0.05$ (adapted from ref [59]).

Cho *et al.* assessed local therapy of ovarian cancer by intraperitoneal injection of platinum formulations. Polymeric nanoparticles (Diameter = 270 ± 33 nm - PZ < 0 mV) were obtained by associating HA and the drug cisplatin. The nanoparticles were then dispersed in an *in-situ* cross-linkable HA gel. They performed antitumor efficacy studies using intraperitoneal ovarian tumor xenograft-bearing mice (SKOV3-luc cell line). Cisplatin was localized and retained in the peritoneal cavity for over four weeks after intraperitoneal administration of the gel loaded with nanoparticles. However, the nanoparticle-loaded gel or the nanoparticles alone did not show higher antitumor activity than cisplatin in solution. Indeed, the size of the tumor increased slightly, suggesting a nanoparticle release rate that was too low and hence cisplatin levels, or the release of empty nanoparticles [60].

II.5.2. ... against inflammatory diseases

Contri *et al.* studied the use of nanoencapsulation to decrease skin irritation induced by capsaicinoids, known for their irritant properties that frequently lead to the interruption of treatment against chronic inflammatory diseases. The drug was loaded into lipid (capric/caprylic triglycerides stabilized by Eudragit RS 100® - poly(ethyl acrylate, methyl-methacrylate) - Polysorbate® 80 association) nanocapsules (Diameter = 140 nm - ZP = 9 mV), and dispersed in a CH solution to form a hydrogel. They performed *in vivo* skin irritation studies by double-blind evaluation of skin erythema formation on 13 enrolled volunteers (males and females aged from 18 to 45 years). Capsaicinoid-loaded lipid nanocapsule gels did not cause erythema for up to 180 min after application to the skin, whereas the formulation without gel and/or nanocapsules did. The efficacy of this formulation needs to be confirmed by additional preclinical/clinical trials [61].

Meloxicam is a non-steroidal anti-inflammatory drug used orally to alleviate the symptoms of various inflammatory diseases, and is often responsible for gastrointestinal side effects and other undesirable events. Khurana *et al.* tested solid lipid nanoparticles (Diameter = 240 nm - PdI = 0.27) dispersed in a gel (Carbopol® 940) for transdermal application of meloxicam. This formulation showed excellent anti-inflammatory activity and skin tolerability. No signs of *in vivo* irritation (erythema and edema) were observed on normal mice skin. The nanocapsule gel suppressed edema in a rat model of carrageenan-induced paw edema and showed sustained anti-inflammatory action (approximately 75% inhibition) after 24 h [62]. This drug is also used against post-cataract endophthalmitis: a specific complication (severe inflammation of both the anterior and posterior segments of the eye) of cataract surgery. Zhang *et al.* developed meloxicam nanoaggregates (nanocrystals coated with bovine serum albumin) (Diameter = 100 nm), dispersed in contact lenses composed of poly(hydroxy-ethyl methacrylate) gels. Twenty-five rabbits received the nanoaggregate-loaded contact lenses for 12 h and *in vivo* ocular irritancy was evaluated every day for five days after application. The device containing and releasing meloxicam was significantly less irritating to ocular tissues than the standard treatment, meloxicam in solution (Figure 1.7) [63].

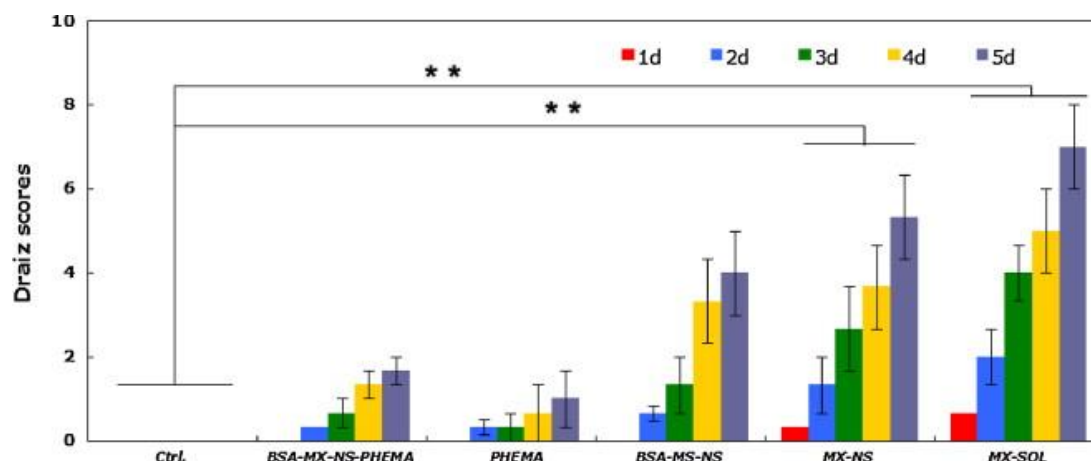


Figure 1.7: Comparison of mean scores observed in the Draize test for ocular irritancy of meloxicam (MX) nanocrystals coated with bovine serum albumin (BSA) in contact lenses (BSA-MX-NS-PHEMA), contact lenses alone (PHEMA), MX nanocrystals coated with BSA solution (BSA-MX-NS), MX nanocrystals solution (MX-NS), MX solution (MX-SOL) and saline (Ctrl), within 5 days. N=3, mean \pm SD (adapted from ref [63]).

The anti-inflammatory drugs indomethacin, ketoprofen, and tranilast were tested in rheumatoid arthritis. The three drugs were independently studied by Nagai *et al.*, using gel ointments containing solid drug nanoparticles. Drug-loaded polymeric nanoparticles (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and HMC) (Diameter = 170 ± 90 nm, 70 ± 50 nm and 70 ± 25 nm for indomethacin, ketoprofen and tranilast, respectively) were dispersed in Carbopol[®] 934 gel. The nanoparticle-loaded gels showed higher *in vivo* accumulation of the drugs in the skin, irrespective of the drug. Furthermore, the gels reduced inflammation (paw edema) in an adjuvant-induced arthritis rat model, better than the control formulations [64-66].

The non-steroidal anti-inflammatory drug zaltoprofen is used to treat inflammatory diseases. It is administered via the oral route, but has limited bioavailability due to a large first-pass effect and its use can be limited by its side effects. Shah *et al.* studied a gel (Carbopol[®] 934) formulation containing zaltoprofen-loaded polymeric nanoparticles (CH/alginate 1/1.8 w/w) (Diameter = 160 ± 1 nm - PdI = 0.32 - ZP = 25 mV) for topical application. They demonstrated a prolonged period of anti-inflammatory activity for the formulation using the carrageenan-induced rat paw edema model [67].

II.5.3. ... against other pathologies

The management of wound healing is still an important public health problem. Any disturbance of the healing process can lead to infection and chronic non-healing wounds. Li *et al.* tested an innovative solution combining a thermosensitive hydrogel with antimicrobial peptide (AP-57)-loaded polymeric nanoparticles (Diameter = 125 ± 7 nm - PdI = 0.09 ± 0.03). A biodegradable polymer was synthesized: poly(L-lactic acid) - Pluronic[®] L35 - poly(L-lactic acid) and used for both polymeric nanoparticles and a thermosensitive hydrogel. They studied *in vivo* wound healing activity using the rat full-thickness dermal excision model.

There was no significant difference in wound closure between the formulation and normal saline, the non-loaded nanoparticle hydrogel, or AP-57-loaded polymeric nanoparticles three days after surgery. From day 7, the formulation promoted accelerated wound healing and nearly complete wound closure of 97% (14-days-post operation). For comparison, the equivalent values for normal saline, non-loaded nanoparticle hydrogel, and AP-57-loaded polymeric nanoparticles were approximately 69%, 82%, and 88%, respectively (Figure 1.8). Histopathological results suggested that the formulation developed by Li *et al.* promoted cutaneous wound healing by inducing a higher degree of re-epithelialization, increased collagen deposition, and higher vascular density than the control treatments [68].

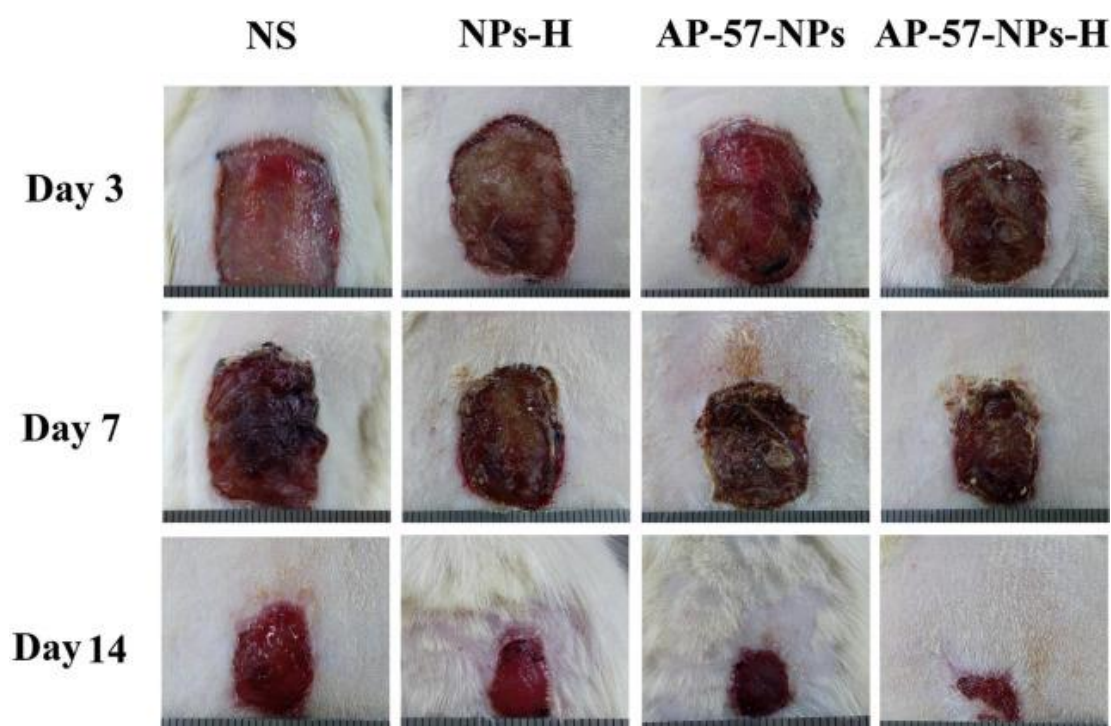


Figure 1.8: Representative images of wounds treated with antimicrobial peptide (AP-57)-loaded polymeric nanoparticle (NP) gel (AP-57-NPs-H), AP-57-loaded NP solution (AP-57-NPs), non-loaded NP gel (NPs-H), saline (NS) at day 3, 7 and 14 post wounding. Ruler units in mm (adapted from ref [68]).

Kaur *et al.* developed an intranasal *in situ* mucoadhesive gel (Pluronic F127 and (hydroxypropyl)methylcellulose) (HPMC)) containing tramadol-loaded polymeric (CH) nanoparticles (Diameter = $120 \pm < 1$ nm - PdI = $0.14 \pm < 0.01$) to treat depression via nasal delivery. Depression is the most common mental disorder worldwide, caused by a deficiency of nor-epinephrine and serotonin. The main limitation of treatment is the ability of the drugs to reach the brain from systemic circulation. Nasal delivery may provide a viable alternative. They tested the formulation using the rat forced-swim-induced-depression model, consisting of a forced swim test for 6 -15 minutes each day for 14 days. Various behavioral and biochemical parameters were evaluated. Rats received the tramadol-loaded nanoparticle gel or other tramadol formulations between the 7th and 14th days. The intranasal tramadol-loaded nanoparticle gel significantly attenuated forced swim-induced depression (longer period of immobility in

the water bath) relative to the other tramadol treatments. Furthermore, locomotor activity, sucrose consumption, and body weight significantly increased. The levels of endogenous antioxidant enzymes (glutathione and catalase) increased, decreasing lipid peroxidation and nitrite levels [69].

Pandurangan *et al.* investigated an *in-situ* gel (Carbopol® 940 and HPMC) of solid lipid nanoparticles (lecithin and CHOL) as a new ocular form of voriconazole (antifungal drug) to reduce the major limitation of ocular delivery suspension systems of poor residence time and hence poor bioavailability. The application of 0.5 mL voriconazole-loaded solid lipid nanoparticle gel did not provoke ocular damage or abnormal clinical signs in the cornea, conjunctiva, or iris, over one-week period, in rabbits. Further *in vivo* efficacy studies need to be carried out [70].

Mostafa *et al.* focused on amorphous ibuprofen-loaded calcium phosphate nanoparticles (Diameter = 200 nm – PdI < 0.1) dispersed in a thermosensitive gel (Poloxamer® 407) for the treatment of periapical lesions. Periapical lesions result from necrotic dental pulp after trauma or bacterial infection and require surgery or tooth extraction. The combination of amorphous calcium phosphate nanoparticles and gel, with or without ibuprofen, resulted in a significant improvement of bone deposition and bone resorption after three months in a dog model. There was no significant difference between the ibuprofen-loaded calcium phosphate nanoparticle gel and ibuprofen-loaded gel in decreasing periapical inflammatory infiltration during the first month [71].

II.5.4. ... without the gel matrix

Gels supporting nanoparticles must be biocompatible and biodegradable. This is an important condition for parenteral administration and must be considered from the moment of conceptualization of a nanoparticle-loaded gel. Recent studies have demonstrated the possibility to obtain gel of nanoparticles without the use of a polymer matrix to support the nanoparticles.

Gemcitabine was modified (lauroyl derivatives) and loaded into lipid nanocapsules (Labrafac® WL-1349, Span® 80 and Kolliphor® HS-15). The lipid nanocapsule suspension expected by the authors was not obtained at the end of the formulation process, but a gel was achieved. The amphiphilic lauroyl-modified gemcitabine is loaded at the oil/water interface of lipid nanocapsules. Gemcitabine moieties at the nanocapsule surface can interact with each other via hydrogen bonding, leading to inter-nanocapsule associations and forming a tridimensional network in the formulation, and thus a gel. Wauthoz *et al.* used this gel of lipid nanocapsules to develop a sustained release treatment for lung cancer. The formulation was administered subcutaneously to the orthotopic mediastinal metastasis of non-small-cell lung tumor xenograft-bearing mice (Ma44-3 cell line, implanted first in lung). Analysis of the biodistribution showed that the lipid nanocapsules were released from the administration site and targeted the lymph nodes, particularly mediastinal lymph nodes, without reaching the systemic circulation. The formulation significantly delayed the death of mice relative to that without gemcitabine, but the antitumor effect was

similar to the administration of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules in suspension after intravenous administration. The primary advantage of the gel relative to the suspension was the lower administration frequency and lower administration volume, and a significant decrease in systemic toxicity, including myelosuppression [72]. Bastiancich *et al.* tested the same gel formulation for local and sustained delivery of gemcitabine for the treatment of glioblastoma. They compared modified-gemcitabine loaded into the gel of lipid nanocapsules to modified or non-modified gemcitabine in suspension after intratumoral administration to subcutaneous glioblastoma xenograft-bearing mice (U87-MG cell line). The drug loaded in the gel formulation significantly reduced tumor size whereas the free drug did not modify tumor growth. Furthermore, short-term tolerability studies showed that the gel formulation was suitable for local treatment in the brain (healthy mice) [73].

Another approach was developed by Liang *et al.* based on the thermo-association of nanoparticles in suspension, forming a gel. A biodegradable and thermosensitive co-polymer: (PEG-poly(octadecanedioic anhydride)-PEG) was synthesized and formed polymeric nanoparticles (Diameter of approximately 180 nm) in suspension at room temperature. When subcutaneously injected in mice, the polymeric nanoparticle suspension turned into a gel and persisted at the administration site for more than 12 days. In addition, the *in vivo* biocompatibility of the polymeric nanoparticle gel was validated in mice and satisfied the regulations of the International Organization of Standardization. Histopathological analysis of tissues surrounding the gel showed an inflammatory response similar to that produced by a foreign body [74].

The association of oppositely charged nanoparticles can also lead to a gel. Wang *et al.* developed poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with various coatings: poly(ethylene-co-maleic acid) (Diameter = 180 ± 15 nm - ZP = -20 ± 1 mV) and polyvinylamine (Diameter = 145 ± 10 nm - ZP = -30 ± 1 mV), both loaded with dexamethasone, to promote osteogenesis in bone repair. When the polymeric nanoparticles were mixed, a gel was obtained through electrostatic interactions. These polymeric nanoparticle gels can be injected using needles without modification of the viscoelastic properties. Osteoconductive bone formation was stimulated by dexamethasone release after the application of drug-loaded polymeric nanoparticle gels in a model of rat cranial bone defects whereas the non-loaded gel had no effect [75]. Gu *et al.* also proposed the use of dextran nanoparticles with various coatings: CH (Diameter = 340 nm - ZP = 11 ± 2 mV) and alginate (Diameter = 290 nm - ZP = -12 ± 2 mV), both loaded with insulin and glucose-specific enzymes (glucose oxidase and catalase), to develop a smart insulin delivery implant mediated by glucose for the treatment of diabetes mellitus. A gel was formed due to electrostatic interactions after mixing the two polymeric nanoparticles formulations.

They observed abnormal high blood glucose levels in an induced-diabetes mouse model following subcutaneous administration of an insulin solution, insulin-loaded polymeric nanoparticle gel, or glucose-specific enzyme-loaded polymeric nanoparticle gel. The subcutaneous administration of both insulin and the glucose-specific enzyme-loaded polymeric nanoparticle gel was able to maintain a normal glucose

concentration in blood (< 200 mg/dL) for up to 10 days, proving that the release of insulin was triggered by high blood glucose levels (Figure 1.9) [76].

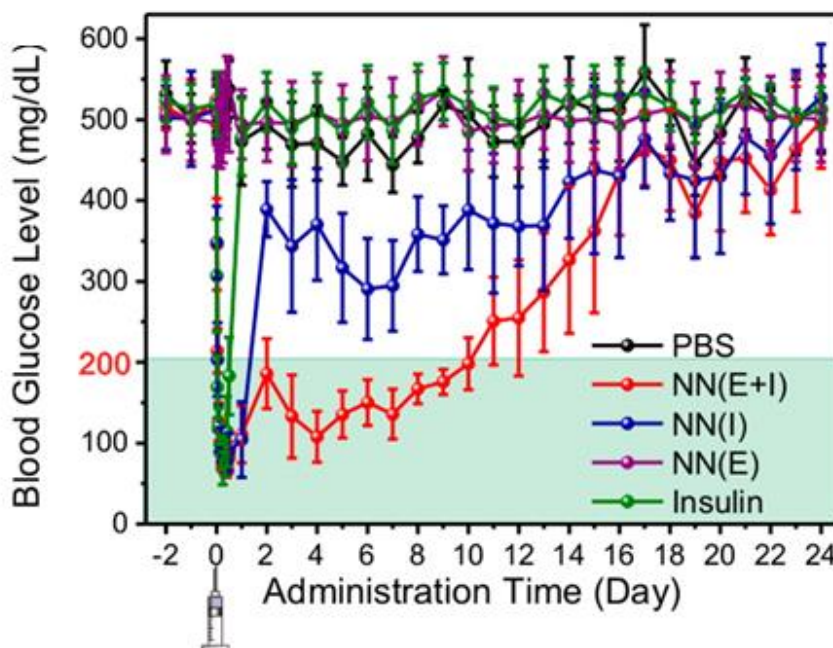


Figure 1.9: *In vivo* studies of the nano-network for type I diabetes treatment. Blood glucose levels in induced diabetic mice after subcutaneous injection with PBS, insulin and enzymes-loaded polymeric nanoparticle gel (NN(E+I)), insulin-loaded polymeric nanoparticle gel (NN(I)), enzymes-loaded polymeric nanoparticle gel (NN(E)), or pure insulin solution (Insulin). $n=8$, mean \pm SD (adapted from ref [76]).

II.6. Gels loaded with dendrimers

Dendrimers are a class of macromolecules characterized by highly branched three-dimensional structures. They are constructed through the sequential addition of branching units radiating out from an initiating point.

Dendrimers have been used as to conjugate drugs to polymers. Kojima *et al.* synthesized various polymer prodrugs prepared with dendrimers (polyamidoamine) and doxorubicin, *via* hydrozone linkage. This conjugation is cleaved and allows the release of doxorubicin under acidic conditions. Doxorubicin-modified dendrimers, supported in a collagen gel, were degraded by metastatic cancer cells, resulting in the extended release doxorubicin. A metastatic model for colon tumor (SLA cell line, expressing Green Fluorescent Protein (GFP)) was surgically implanted in the cecum of mice, followed by application of the gel to the tumor. The tumor was detected six days after implantation in control mice (without the gel), whereas there were no observable primary or metastatic tumor lesions after 27 days in mice treated with the doxorubicin-modified dendrimer gel (Figure 1.10) [77].

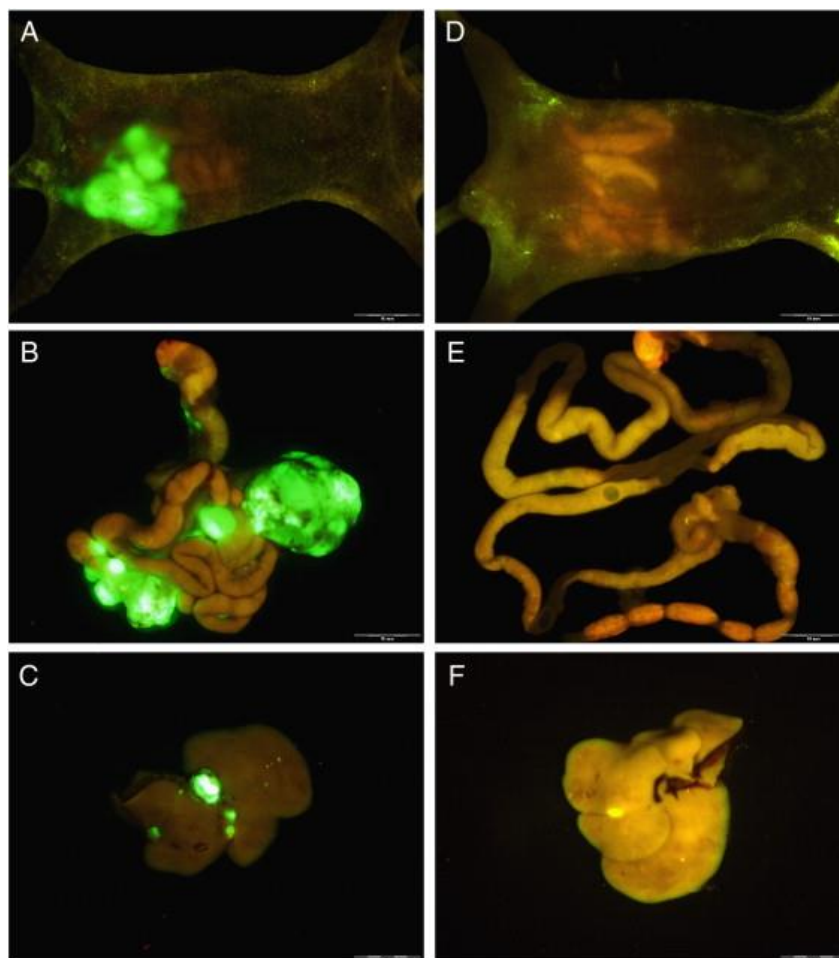


Figure 1.10: Fluorescence imaging of the whole body (A, D), bowel (B, E) and liver (C, F) for mice treated with doxorubicin-modified dendrimer gel (D-F) and doxorubicin-modified dendrimer solution (A-C). Colon tumor metastases are visible with GFP (green fluorescence protein) (adapted from Ref [77]).

Dendrimers themselves have been used as a drug due to their microbicide properties. A dendrimer, called SPL7013 (developed by Starpharma Pty Ltd., Melbourne, Australia), with a specific polyanionic surface, can bind to viruses, inhibiting viral recognition of the CD4 receptor on cells, thus preventing infection. This dendrimer dispersed in a Carbopol® gel (trade name VivaGel™) has good antiviral activities against both HIV and herpesvirus, and physical properties appropriate for microbicide applications [78]. Numerous Phase 1 clinical trials have been conducted to evaluate the safety of the formulation. It was safe and well tolerated (no evidence of systemic absorption or toxicity) when applied daily for seven days to the penis (both circumcised and uncircumcised) [79] and vaginally (healthy, sexually abstinent women) [80]. It was generally well-tolerated when applied vaginally by sexually active young women twice daily during 14 days, with the presence of genitourinary adverse events and reversible, mild epithelial irritation and inflammation by colposcopy, compared to placebo [81-83]. From a purely psychological point of view, men (Australian sample) agree to use a microbicide if the formulation is safe and effective [84], and a sensorial study reported women's preference (ethnically diverse, sexually active young women) in terms of contentment, sexual behavior, and sexual satisfaction [85]. These findings helped to elaborate the information materials

and the anticipatory guidance. In terms of efficacy, a clinical study was conducted to determine the duration of antiviral activity. Cervicovaginal fluid samples were collected at various times after vaginal administration of VivaGel™ to 11 healthy women. There was good antiviral activity against HIV-1 and HSV-2 immediately after vaginal administration, which was maintained for three hours post-administration [86].

II.7. Gels-loaded with fullerene.

Fullerene is defined as a nanoparticle by the scientific community. Instead of using fullerene as a nanocarrier, it has been considered for its therapeutic properties, such as an antioxidant agent, for dermatological applications.

Inui *et al.* applied fullerene, dispersed in a commercial gel matrix (I.T.O. gel base from I.T.O. Co. Ltd., Tokyo, Japan) to the entire face of 11 patients with mild to moderate acne vulgaris (from 1 to 20 facial papulars or pustular lesions on half of the face) twice a day for 8 weeks (Figure 1.11). The number of inflammatory lesions significantly decreased in nine of the 11 patients (37.8% reduction rate) due to the reduction of oxidative stress. Despite the small decrease of inflammatory lesions relative to other topical applications (a gel loaded with adapalene led to a reduction rate of 63.7%), a higher proportion of patients responded to this treatment. In addition, fullerene significantly increased the water content in the skin, improving the barrier function. No apparent side effects were observed and skin-related parameters were not significantly affected [87].

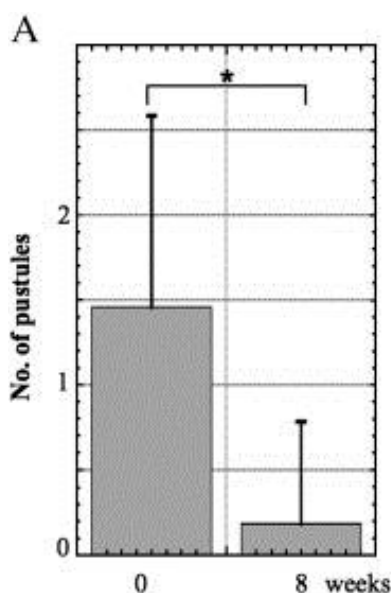


Figure 1.11: Evaluation of fullerene-loaded gel in suppressing pustules (neutrophil infiltration) (number of pustules at 0 and 8 weeks) in an open trial. $n=11$, mean \pm SD, * $p < 0.05$ (adapted from ref [87]).

A similar approach was also developed by Fujimoto *et al.* to decrease the severe side effects (erythema) of laser therapy in dermatology. Application of a hydroquinone (2%) cream, containing fullerene, to mice twice daily for five days, resulted in better recovery from erythema after laser irradiation than the non-loaded hydroquinone cream. In addition, application of the fullerene-containing cream before the laser treatment prevented hyperpigmentation and other forms of oxidative skin damage, with a reduction of COX-2 mRNA expression and reactive oxygen species induced by laser irradiation [88].

II.8. Conclusion

The association of gels with nanocarriers is a promising strategy in medicine due to its many advantages including protection of the drugs, enhanced stability, targeting, stealthiness, decreased toxicity, and controlled release. Furthermore, the structure of gels facilitates local application and sustained release of drugs. Therapeutic strategies using gels loaded with nanoparticles can be considered for pathologies for which nanoparticles or gels alone are likely to be ineffective. However, they also provide advantages to treating diseases such as cancer and cutaneous diseases, which have been extensively studied during the past 10 years. In these cases, the combination of gels and nanoparticles mainly provide more continuous drug release, altering the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles to improve therapeutic efficacy. In this review, we have described many examples of *in vivo* proof of concept, as well as clinical trials, showing the great promise of using nanoparticles associated with gels for medical applications.

II.9. Acknowledgments

This work has been carried out within the research program of NICHE, financially supported by EuroNanoMed2 ERA-NET. The authors also thank the « Fondation ARC pour le Recherche sur le Cancer » and the « Ligue Contre le Cancer (Comité du Maine et Loire) » for their financial support. The authors H. Gondé, C. Haury, M. Messous, J. Poilane, D. Boudaud, E. Kanber, and G.A. Rossemond Ndombina thank Mme Marie-Claire Venier and Mme Emilie Roger, who co-lead the training program M2 Nanomédecines et R&D Pharmaceutique, for being accepted into the program.

III. Bibliographie

- [1] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat. Rev. Cancer*. 17(1) (2017) 20-37.
- [2] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov*. 9 (2010) 615-627.
- [3] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol*. 33 (2015) 941-951.
- [4] J. Shi, Z. Xiao, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Self-assembled targeted nanoparticles: Evolution of technologies and bench to bedside translation, *Acc. Chem. Res*. 44 (2011) 1123-1134.
- [5] P.P. Adisheshaiah, R.M. Crist, S.S. Hook, S.E. McNeil, Nanomedicine strategies to overcome the pathophysiological barriers of pancreatic cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 13(12) (2016) 750-765.
- [6] M.E. Lobatto, V. Fuster, Z.A. Fayad, W.J. Mulder, Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis, *Nat. Rev. Drug. Discov*. 10(11) (2011) 835-52.
- [7] O. Veisesh, B.C. Tang, K.A. Whitehead, D.G. Anderson, R. Langer, Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities, *Nat. Rev. Drug. Discov*. 14(1) (2015) 45-57.
- [8] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications, *Nano Lett*. 10 (2010) 3223-3230.
- [9] J.J. Kang-Mieler, W.F. Mieler, Thermo-Responsive Hydrogels for Ocular Drug Delivery, *Dev. Ophthalmol*. 55 (2016) 104-111.
- [10] R. Sheshala, Y.Y. Kok, J.M. Ng, R.R. Thakur RR, K. Dua, In Situ Gelling Ophthalmic Drug Delivery System: An Overview and Its Applications, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul*. 9(3) (2015) 237-248.
- [11] C. Karavasili, D.G. Fatouros, Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery, *Drug Discov. Today* 21(1) (2016) 157-166.
- [12] C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, G. Sandri, Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 92 (2015) 39-52.
- [13] M. Cully, Inflammatory diseases: Hydrogel drug delivery for inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Drug Discov*. 14(10) (2015) 678-679.
- [14] S.R. Feldman, Principles of topical treatment: advancement in gel vehicle technology, *J. Drugs Dermatol*. 13(4) (2014) 423-427.
- [15] R. Vaishya, V. Khurana, S. Patel, A.K. Mitra, Long-term delivery of protein therapeutics, *Expert Opin. Drug Deliv*. 12(3) (2015) 415-440.
- [16] N.K. Singh, D.S. Lee, In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery, *J. Control. Release* 193 (2014) 214-227.
- [17] F.M. Chen, X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Prog. Polym. Sci*. 53 (2016) 86-168.
- [18] L. Gu, D.J. Mooney, Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment, *Nat. Rev. Cancer*. 16(1) (2016) 56-66.
- [19] R. Mulik, V. Kulkarni, R.S.R. Murthy, Chitosan-based thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained delivery of cytarabine, *Drug Dev. Ind. Pharm*. 35(1) (2009) 49-56.
- [20] W. Ding, Y. Li, X. Hou, G. Li G, Bleomycin A6-loaded anionic liposomes with in situ gel as a new antitumoral drug delivery system, *Drug Deliv*. 23(1) (2014) 88-94.
- [21] A. Hussain, A. Samad, M. Ramzan, M.N. Ahsan, Z. Ur Rehman, F.J. Ahmad, Elastic liposome-based gel for topical delivery of 5-fluorouracil: *in vitro* and *in vivo* investigation, *Drug Deliv*. 23(4) (2015) 1115-1129.
- [22] Y. Guan, G. Lin, W. Shao, Preparation and evaluation of propranolol hydrochloride liposomal gel, *Chin. J. Pharm. Biotechnol*. 21 (2014) 525-529.

- [23] Y. Guan, T. Zuo, M. Chang, F. Zhang, T. Wei, W. Shao, G. Lin, Propranolol hydrochloride-loaded liposomal gel for transdermal delivery: Characterization and *in vivo* evaluation, *Int. J. Pharm.* 487(1-2) (2015) 135-141.
- [24] W. Wang, P. Zhang, W. Shan, J. Gao, W. Liang, A novel chitosan-based thermosensitive hydrogel containing doxorubicin liposomes for topical cancer therapy, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24(14) (2013) 1649-1659.
- [25] T. Arai, O. Benny, T. Joki, L.G. Menon, M. Machluf, T. Abe, R.S. Carroll, P.M. Black, Novel local drug delivery system using thermoreversible gel in combination with polymeric microspheres or liposomes, *Anticancer Res.* 30(4) (2010) 1057-1064.
- [26] C.L. Peng, Y.H. Shih, K.S. Liang, P.F. Chiang, C.H. Yeh, I.C. Tang, C.-J. Yao, S.-Y. Lee, T.-Y. Luo, M.J. Shieh, Development of *in situ* forming thermosensitive hydrogel for radiotherapy combined with chemotherapy in a mouse model of hepatocellular carcinoma, *Mol. Pharm.* 10(5) (2013) 1854-1864.
- [27] J. Xing, X. Qi, Y. Jiang, X. Zhu, Z. Zhang, X. Qin, Z. Wu, Topotecan hydrochloride liposomes incorporated into thermosensitive hydrogel for sustained and efficient *in situ* therapy of H22 tumor in Kunming mice, *Pharm. Dev. Technol.* 20(7) (2015) 1-8.
- [28] J.Y. Fang, S.H. Hsu, Y.L. Leu, J.W. Hu, Delivery of cisplatin from Pluronic co-polymer systems: liposome inclusion and alginate coupling, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20(7-8) (2009) 1031-1047.
- [29] U.M. Le, D.S. Shaker, B.R. Sloat, Z. Cui, A thermo-sensitive polymeric gel containing a gadolinium (Gd) compound encapsulated into liposomes significantly extended the retention of the Gd in tumors, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34(4) (2008) 413-418.
- [30] K. Sutoris, J. Rakusan, M. Karaskova, J. Mattova, J. Benes, M. Nekvasil, P. Jezek, M. Zadinova, P. Pouckova, D. Vetvicka, Novel topical photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes, *Anticancer Res.* 33(4) (2013) 1563-1568.
- [31] S. Li, Y.Q. Qiu, S.H. Zhang, Y.H. Gao, A novel transdermal formulation of 18 β -glycyrrhetic acid with lysine for improving bioavailability and efficacy, *Skin Pharmacol. Physiol.* 25(5) (2012) 257-268.
- [32] I. Erođlu, E. Azizođlu, M. Ozyazıcı, M. Nenni, H. Güreer Orhan, S. Ozbal, I. Tekmen, I. Ertam, I. Ünal, Ö. Özer, Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations, *Drug Deliv.* 23(5) (2016) 1502-1513.
- [33] M. Manconia, J. Pendás, N. Ledón, T. Moreira, C. Sinico, L. Saso, A.M. Fadda, Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: *in-vitro in-vivo* studies, *J. Pharm. Pharmacol.* 61(4) (2009) 423-430.
- [34] C. Puglia, D. Trombetta, V. Venuti, A. Saija, F. Bonina, Evaluation of *in-vivo* topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles, *J. Pharm. Pharmacol.* 56(10) (2004) 1225-1232.
- [35] M. Fadel, M. Salah, N. Samy, S. Mona, Liposomal methylene blue hydrogel for selective photodynamic therapy of acne vulgaris, *J. Drugs Dermatol.* 8(11) (2009) 983-990.
- [36] M.A. Fadel, A.A. Tawfik, New topical photodynamic therapy for treatment of hidradenitis suppurativa using methylene blue niosomal gel: a single-blind, randomized, comparative study, *Clin. Exp. Dermatol.* 40(2) (2015) 116-122.
- [37] D. Pornpattananangkul, V. Fu, S. Thamphiwatana, L. Zhang, M. Chen, J. Vecchio, W. Gao, C.M. Huang, L. Zhang, *In vivo* treatment of Propionibacterium acnes infection with liposomal lauric acids, *Adv. Healthc. Mater.* 2(10) (2013) 1322-1328.
- [38] L.A. Gnann, R.F. Castro, L.A. Azzalis, D. Feder, F.F. Perazzo, E.C. Pereira, P.C. Rosa, V.B. Junqueira, K.C. Rocha, C.D. Machado, F.C. Paschoal, L.C. de Abreu, V.E. Valenti, F.L. Fonseca, Hematological and hepatic effects of vascular epidermal growth factor (VEGF) used to stimulate hair growth in an animal model, *BMC Dermatol.* 13 (2013) 15.
- [39] M. Franz-Montan, E. de Paula, F.C. Groppo, A.L.R. Silva, J. Ranali, M.C. Volpato, Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 110(6) (2010) 800-804.

- [40] M. Franz-Montan, E. de Paula, F.C. Groppo, A.L.R. Silva, J. Ranali, M.C. Volpato, Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 50(1) (2012) 60-64.
- [41] M. Franz-Montan, A.L.R. Silva, L.F. Fraceto, M.C. Volpato, E. de Paula, J. Ranali, F.C. Groppo, Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia, *J. Clin. Anesth.* 22(5) (2010) 313-317.
- [42] M. Franz-Montan, D. Baroni, G. Brunetto, V.R.V. Sobral, C.M.G. da Silva, P. Venâncio, P.W. Zago, C.M. Cereda, M.C. Volpato, D.R. de Araújo, E. de Paula, F.C. Groppo, Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, *in vitro* assays and *in vivo* anesthetic efficacy in humans, *J. Liposome Res.* 25(1) (2015) 11-19.
- [43] P. Mura, F. Maestrelli, M.L. González-Rodríguez, I. Michelacci, C. Ghelardini, A.M. Rabasco, Development, characterization and *in vivo* evaluation of benzocaine-loaded liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67(1) (2007) 86-95.
- [44] S. Ahmed, S.S. Imam, A. Zafar, A. Ali, M. Aqil, A. Gull A, *In vitro* and preclinical assessment of factorial design based nanoethosomes transgel formulation of an opioid analgesic, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44(8) (2016) 1793-1802.
- [45] M. Caron, G. Besson, S.L. Etenna, A. Mintsá-Ndong, S. Mourtas, A. Radaelli, Cde.G. Morghen, R. Loddo, P. La Colla, S.G. Antimisariis, M. Kazanji, Protective properties of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (MC1220) incorporated into liposome against intravaginal challenge of Rhesus macaques with RT-SHIV, *Virology* 405(1) (2010) 225-233.
- [46] Y. Yang, R. Ou, S. Guan, X. Ye, B. Hu, Y. Zhang, S. Lu, Y. Zhou, Z. Yuan, J. Zhang, Q.G. Li, A novel drug delivery gel of terbinafine hydrochloride with high penetration for external use, *Drug Deliv.* 22(8) (2015) 1086-1093.
- [47] P.K. Gaur, M. Bajpai, S. Mishra, A. Verma, Development of ibuprofen nanoliposome for transdermal delivery: Physical characterization, *in vitro/in vivo* studies, and anti-inflammatory activity, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44(1) (2016) 370-375.
- [48] W. He, X. Guo, M. Feng, N. Mao, *In vitro* and *in vivo* studies on ocular vitamin A palmitate cationic liposomal in-situ gels, *Int. J. Pharm.* 458(2) (2013) 305-314.
- [49] S. Meng, Z. Chen, L. Yang, X. Zhang, J. Guo, M. Li, J. Li, High-efficient nano-carrier gel systems for testosterone propionate skin delivery, *Pharm. Dev. Technol.* 20(6) (2015) 724-729.
- [50] M.A. El-Nabarawi, E.R. Bendas, R.T.A. El Rehem, M.Y.S. Abary, Transdermal drug delivery of paroxetine through lipid-vesicular formulation to augment its bioavailability, *Int. J. Pharm.* 443(1-2) (2013) 307-317.
- [51] S. Das, G. Singh, A.B. Baker, Overcoming disease-induced growth factor resistance in therapeutic angiogenesis using recombinant co-receptors delivered by a liposomal system, *Biomaterials* 35(1) (2014) 196-205.
- [52] Z. Wu, X. Zou, L. Yang, S. Lin, J. Fan, B. Yang, X. Sun, Q. Wan, Y. Chen, S. Fu, Thermosensitive hydrogel used in dual drug delivery system with paclitaxel-loaded micelles for in situ treatment of lung cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 122 (2014) 90-98.
- [53] J.K. Kim, Y.W. Won, K.S. Lim, Y.H. Kim, Low-molecular-weight methylcellulose-based thermo-reversible gel/pluronic micelle combination system for local and sustained docetaxel delivery, *Pharm. Res.* 29(2) (2012) 525-534.
- [54] M.T. Sheu, H.J. Jhan, C.Y. Su, L.C. Chen, C.E. Chang, D.Z. Liu, H.O. Ho, Codelivery of doxorubicin-containing thermosensitive hydrogels incorporated with docetaxel-loaded mixed micelles enhances local cancer therapy, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 143 (2016) 260-270.
- [55] A.J. de Graaf, I.I. Azevedo Próspero dos Santos, E.H.E. Pieters, D.T.S. Rijkers, C.F. van Nostrum, T. Vermonden, R.J. Kok, W.E. Hennink, E. Mastrobattista, A micelle-shedding thermosensitive hydrogel as sustained release formulation, *J. Control. Release* 162(3) (2012) 582-590.
- [56] Y. Yang, J. Wang, X. Zhang, W. Lu, Q. Zhang, A novel mixed micelle gel with thermo-sensitive property for the local delivery of docetaxel, *J. Control. Release* 135(2) (2009) 175-182.

- [57] Y.M. Kim, S.C. Song S-C, Targetable micelleplex hydrogel for long-term, effective, and systemic siRNA delivery, *Biomaterials* 35(27) (2014) 7970-7977.
- [58] C. Gong, Q. Wu, Y. Wang, D. Zhang, F. Luo, X. Zhao, Y. Wei, Z. Qian, A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing, *Biomaterials* 34(27) (2013) 6377-6387.
- [59] M. Shen, Y.Y. Xu, Y. Sun, B.S. Han, Y.R. Duan, Preparation of a Thermosensitive Gel Composed of a mPEG-PLGA-PLL-cRGD Nanodrug Delivery System for Pancreatic Tumor Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7(37) (2015) 20530-20537.
- [60] E.J. Cho, B. Sun, K.O. Doh, E.M. Wilson, S. Torregrosa-Allen, B.D. Elzey, Y. Yeo, Intraperitoneal delivery of platinum with in-situ crosslinkable hyaluronic acid gel for local therapy of ovarian cancer, *Biomaterials* 37 (2015) 312-319.
- [61] R.V. Contri, L.A. Frank, M. Kaiser, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids, *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 951-962.
- [62] S. Khurana, P.M.S. Bedi, N.K. Jain, Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam, *Chem. Phys. Lipids* 175-176 (2013) 65-72.
- [63] W. Zhang, D. Zu, J. Chen, J. Peng, Y. Liu, H. Zhang, S. Li, W. Pan, Bovine serum albumin-meloxicam nanoaggregates laden contact lenses for ophthalmic drug delivery in treatment of postcataract endophthalmitis, *Int. J. Pharm.* 475(1-2) 25-34.
- [64] N. Nagai, Y. Ito, Therapeutic effects of gel ointments containing tranilast nanoparticles on paw edema in adjuvant-induced arthritis rats, *Biol. Pharm. Bull.* 37(1) (2014) 96-104.
- [65] N. Nagai, C. Yoshioka, Y. Ito, Topical therapies for rheumatoid arthritis by gel ointments containing indomethacin nanoparticles in adjuvant-induced arthritis rat, *J. Oleo Sci.* 64(3) 337-346.
- [66] N. Nagai, A. Iwamae, S. Tanimoto, C. Yoshioka, Y. Ito, Pharmacokinetics and Antiinflammatory Effect of a Novel Gel System Containing Ketoprofen Solid Nanoparticles, *Biol. Pharm. Bull.* 38(12) (2015) 1918-1924.
- [67] H.A. Shah, R.P. Patel, Statistical modeling of zaltoprofen loaded biopolymeric nanoparticles: Characterization and anti-inflammatory activity of nanoparticles loaded gel, *Int. J. Pharm. Investig.* 5(1) (2015) 20-27.
- [68] X. Li, R. Fan, A. Tong, M. Yang, J. Deng, L. Zhou, X. Zhang, G. Guo, In situ gel-forming AP-57 peptide delivery system for cutaneous wound healing, *Int. J. Pharm.* 495(1) (2015) 560-571.
- [69] P. Kaur, T. Garg, B. Vaidya, A. Prakash, G. Rath, A.K. Goyal AK, Brain delivery of intranasal in situ gel of nanoparticulated polymeric carriers containing antidepressant drug: behavioral and biochemical assessment, *J. Drug Target.* 23(3) (2015) 275-286.
- [70] D.K. Pandurangan, P. Bodagala, V.K. Palanirajan, S. Govindaraj, Formulation and evaluation of voriconazole ophthalmic solid lipid nanoparticles in situ gel, *Int. J. Pharm. Investig.* 6(1) (2016) 56-62.
- [71] A.A. Mostafa, M.H. Zaazou, L.C. Chow, A.A. Mahmoud, D.Y. Zaki, M. Basha, M.A. Abdel Hamid, M.E. Khallaf, N.F. Sharaf, T.M. Hamdy, Injectable nanoamorphous calcium phosphate based in situ gel systems for the treatment of periapical lesions, *Biomed. Mater. Bristol. Engl.* 10(6) (2015) 65006.
- [72] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousset, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine* 11(5) (2015) 1237-1245.
- [73] C. Bastiancich, K. Vanvarenberg, B. Ucar, M. Pitorre, G. Bastiat, F. Lagarce, V. Pr eat, F. Danhier, Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma, *J. Control. Release* 225 (2016) 283-293.
- [74] Y. Liang, Y. Qiao, S. Guo, L. Wang, Y. Zhai, C. Xie, R. Huc, L. Deng, A. Dong, Investigation on injectable, thermally and physically gelable poly(ethylene glycol)/poly(octadecanedioic anhydride) amphiphilic triblock co-polymer nanoparticles, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23(1-4) (2012) 465-482.

- [75] Q. Wang, J. Wang, Q. Lu, M.S. Detamore, C. Berkland, Injectable PLGA based colloidal gels for zero-order dexamethasone release in cranial defects, *Biomaterials* 31(18) (2010) 4980-4986.
- [76] Z. Gu, A.A. Aimetti, Q. Wang, T.T. Dang, Y. Zhang, O. Veiseh, H. Cheng, R.S. Langer, D.G. Anderson, Injectable nano-network for glucose-mediated insulin delivery, *ACS Nano* 7(5) (2013) 4194-4201.
- [77] C. Kojima, E. Nishisaka, T. Suehiro, K. Watanabe, A. Harada, T. Goto, Y. Magata, K. Kono, The synthesis and evaluation of polymer prodrug/collagen hybrid gels for delivery into metastatic cancer cells, *Nanomedicine* 9(6) (2013) 767-775.
- [78] R. Rupp, S.L. Rosenthal, L.R. Stanberry, VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection, *Int. J. Nanomedicine* 2(4) (2007) 561-566.
- [79] M.Y. Chen, I.Y. Millwood, H. Wand, M. Poynten, M. Law, J.M. Kaldor, S. Wesselingh, C.F. Price, L.J. Clark, J.R. Paull, C.K. Fairley, A randomized controlled trial of the safety of candidate microbicide SPL7013 gel when applied to the penis, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 50(4) (2009) 375-380.
- [80] J. O'Loughlin, I.Y. Millwood, H.M. McDonald, C.F. Price, J.M. Kaldor, J.R. Paull, Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SPL7013 gel (VivaGel): a dose ranging, phase I study, *Sex Transm. Dis.* 37(2) (2010) 100-104.
- [81] I. McGowan, K. Gomez, K. Bruder, I. Febo, B.A. Chen, B.A. Richardson, M. Husnik, E. Livant, C. Price, C. Jacobson C, MTN-004 Protocol Team, Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel (VivaGel) in sexually active young women (MTN-004), *AIDS* 25(8) (2011) 1057-1064.
- [82] C.R. Cohen, J. Brown, A.B. Moscicki, E.A. Bukusi, J.R. Paull, C.F. Price, S. Shiboski S, A phase I randomized placebo controlled trial of the safety of 3% SPL7013 Gel (VivaGel®) in healthy young women administered twice daily for 14 days, *PLoS One* 6(1) (2011) e16258.
- [83] A.B. Moscicki, R. Kaul, Y. Ma, M.E. Scott, I.I. Daud, E.A. Bukusi, S. Shiboski, A. Rebbapragada, S. Huibner, C.R. Cohen, Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% StarPharma LTD 7013 gel (VivaGel) to assess expanded safety, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59(2) (2012) 134-140.
- [84] W.R. Holmes, L. Maher, S.L. Rosenthal, Attitudes of men in an Australian male tolerance study towards microbicide use, *Sex. Health* 5(3) (2008) 273-278.
- [85] A. Carballo-Diéguez, R. Giguere, C. Dolezal, B.A. Chen, J. Kahn, G. Zimet, M. Mabragaña, C.S. Leu, I. McGowan, "Tell Juliana": acceptability of the candidate microbicide VivaGel® and two placebo gels among ethnically diverse, sexually active young women participating in a phase 1 microbicide study, *AIDS Behav.* 16(7) (2012) 1761-1774.
- [86] C.F. Price, D. Tyssen, S. Sonza, A. Davie, S. Evans, G.R. Lewis, S. Xia, T. Spelman, P. Hodsman, T.R. Moench, A. Humberstone, J.R. Paull, G. Tachedjian, SPL7013 Gel (VivaGel®) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans, *PLoS One* 6(9) (2011) e24095.
- [87] S. Inui, H. Aoshima, A. Nishiyama, S. Itami, Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: unique impact on skin care, *Nanomedicine* 7(2) (2011) 238-241.
- [88] T. Fujimoto, S. Ito, M. Ito, H. Kanazawa, S. Yamaguchi, Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene, *Lasers Surg. Med.* 44(8) (2012) 685-694.

Chapitre II :

Développement et caractérisation de deux plateformes gélifiées innovantes

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	57
II.	MATERIEL	58
III.	NANOCAPSULES LIPIDIQUES MODELES	59
III.1.	Formulation et caractérisation des nanocapsules lipidiques	59
III.1.1.	Formulations	59
III.1.2.	Diamètre hydrodynamique, polydispersité et potentiel zêta des nanocapsules lipidiques	60
III.2.	Notion de plan de mélange	64
III.3.	Construction du plan de mélange	65
III.4.	Modélisation de la taille des nanocapsules lipidiques	68
III.5.	Choix de quatre formules	70
IV.	SYNTHESE DES AGENTS DE RETICULATION ET CARACTERISATION	73
IV.1.	Protocole de synthèse des agents de réticulation	73
IV.2.	Résultats	74
V.	DEVELOPPEMENT D'UN HYDROGEL DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES	78
V.1.	Formulation des NCLs chargées en molécules lipophiles	78
V.2.	Expériences préliminaires	79
V.3.	Tensiométrie de goutte	79
V.3.1.	Méthode	79
V.3.2.	Résultats	80
V.4.	Nanocapsules lipidiques chargées en Cyt-C16	81
V.5.	Dosage de la Cyt-C16 dans les formulations	83
V.5.1.	Méthode de dosage en LC-MS/MS	83
V.5.2.	Préparation des échantillons	83
V.5.3.	Résultats des dosages	83
V.6.	Observation en microscopie confocale	84
V.7.	Etude en rhéologie des hydrogels de NCLs	86
V.7.1.	Notions préalables en rhéologie.....	86
V.7.2.	Méthode de mesure	90
V.7.3.	Propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs	91
VI.	DEVELOPPEMENT D'UN ORGANOGEL	97
VII.	CONCLUSION	100
VIII.	BIBLIOGRAPHIE :	102

I. Introduction

Une nouvelle génération d'hydrogels de NCLs, décrite par Elodie Moysan, est permise grâce à l'encapsulation de gemcitabine modifiée. Celle-ci se localise aux interfaces huile/eau des NCLs et leur confère des propriétés d'auto-association. La gemcitabine est une molécule utilisée en chimiothérapie (notamment dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules [1-3]) et elle est à l'origine d'une importante toxicité des formulations. Cette dernière propriété a été utilisée dans l'étude de Wauthoz *et al.* pour combattre des métastases médiastinales dans un modèle murin de cancer du poumon [4].

Ce second chapitre s'intéresse au développement d'une plateforme hydrogel basée sur le même principe d'association des NCLs entre elles. Afin de limiter la toxicité de la plateforme, la Gem-C12 devra être remplacée par un agent de réticulation similaire et pouvant être considéré comme un excipient inerte.

Remplacer la Gem-C12 présente d'autres intérêts que le seul enjeu de toxicité. D'une part, la plateforme pourra être utilisée avec différents PAs (encapsulés dans les NCLs ou non) pour proposer des applications variées et non cantonnées à la cancérologie. D'autre part, les caractéristiques viscoélastiques de l'hydrogel ne seront plus dépendantes de la molécule active. Ainsi, les propriétés de l'hydrogel pourront être modifiées indépendamment de la dose de PAs dans la formulation.

Dans un premier temps, nous avons souhaité optimiser les formulations de NCLs. Pour ce faire, l'influence de quatre composants a été déterminée grâce à un plan de mélange. Nous avons ainsi choisi quatre formules présentant des tailles différentes, mono-disperses et reproductibles. Ces formules sélectionnées seront utilisées pour l'ensemble des travaux menés par la suite.

Différentes molécules mimant l'action de la Gem-C12 ont été synthétisées et caractérisées. Parmi ces candidates, la molécule la plus prometteuse pour permettre la gélification des NCLs a été sélectionnée.

Grâce aux formules de NCLs et à la molécule d'intérêt sélectionnées, différents gels ont pu être fabriqués. Le taux d'encapsulation de l'agent réticulant ainsi que son action dans la formation du réseau de l'hydrogel ont été étudiés. Les propriétés viscoélastiques des hydrogels ont ensuite été largement décrites et corrélées aux variables des formulations.

Enfin, la possibilité de créer un organogel avec le même agent réticulant que pour les hydrogels de NCLs a été abordée.

III. Nanocapsules lipidiques modèles

Le premier objectif de ce travail de thèse a été l'optimisation des formules des nanocapsules lipidiques pour obtenir 4 formules de NCLs aux diamètres bien définis de 25, 50, 75 et 100 nm. Ces formulations doivent présenter un PdI inférieur à 0,1 témoignant d'une distribution monomodale et mono-disperse.

Pour ce faire, un outil apparenté aux plans d'expériences, le plan de mélange, a été utilisé. Ainsi, l'influence des proportions des constituants des NCLs sur leur taille a été étudiée en un nombre limité d'expérimentations.

III.1. Formulation et caractérisation des nanocapsules lipidiques

III.1.1. Formulations

Les mêmes excipients et le même procédé de formulation ont été utilisés que pour les NCLs chargées en Gem-C12 [5]. Brièvement, l'ensemble des composés sont pesés précisément et le mélange est chauffé jusqu'à 75°C sous agitation magnétique (environ 500 rpm). Puis toujours sous agitation, l'émulsion formée est refroidie jusqu'à atteindre une température de 45°C. Cette alternance de chauffage et refroidissement est répétée trois fois. Lors du dernier refroidissement, dans la zone d'inversion de phases (ZIP) qui se produit aux alentours de 60°C, le volume de trempé (eau dé-ionisée) est ajouté (Figure 2.1). Les NCLs en suspension sont ainsi obtenues et sont conservées à 4°C ou à température ambiante.

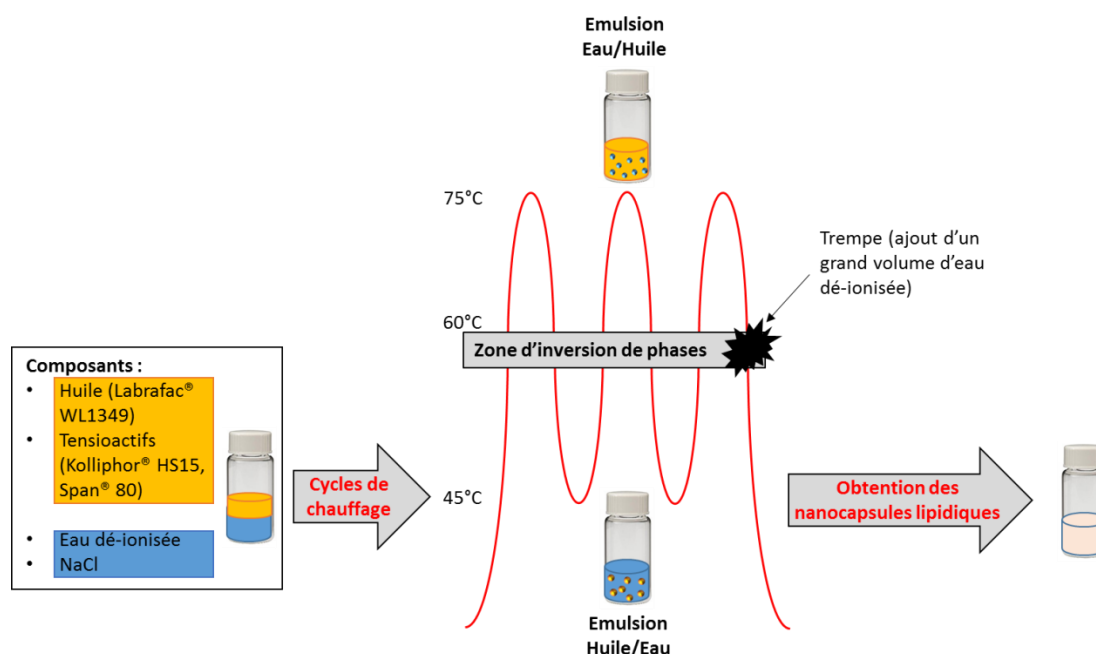


Figure 2.1 : Représentation du procédé de formulation des NCLs par inversion de phases.

III.1.2. Diamètre hydrodynamique, polydispersité et potentiel zêta des nanocapsules lipidiques

La caractérisation des NCLs consiste en la mesure de la distribution de la taille des NCLs ainsi que l'évaluation de leur charge de surface. Pour ces trois mesures, un seul et même appareil a été utilisé, le Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni) dont le principe repose sur la diffusion dynamique de la lumière.

III.1.2.1. Notions générales sur la mesure de la distribution de taille de particules par diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (ou DLS pour « *dynamic light scattering* ») est une méthode qui permet de mesurer la taille d'objets submicroniques. Elle repose sur l'interaction entre une onde lumineuse monochromatique et l'objet étudié.

Les particules étudiées ne doivent être soumises qu'au seul mouvement brownien et non à un mouvement orienté (circulation ou sédimentation par exemple). Le mouvement brownien est un mouvement aléatoire qui est engendré par les impacts des molécules de la phase continue, qui disperse les particules, sur la surface de ces dernières. Ainsi, un échantillon de particules en suspension doit être dilué dans des conditions adéquates pour que le mouvement d'une particule ne soit pas influencé par la présence d'une autre particule à proximité. La vitesse du mouvement brownien est dépendante de la taille de l'objet, mais également de la viscosité de la phase continue qui le contient. Pour une viscosité donnée, plus l'objet sera petit et plus la vitesse du mouvement brownien sera importante. Pour une même taille d'objet, plus la viscosité de la phase continue sera faible et plus la vitesse du mouvement brownien sera importante. La viscosité de la phase continue étant directement liée à sa température, le mouvement brownien des particules le sera aussi.

Lors d'une mesure de taille, un faisceau laser dont la longueur d'onde est connue est pointé sur une suspension de particules (faisceau incident). Un détecteur (photo-multiplieur), situé à un angle précis par rapport au faisceau incident, mesure le taux de fluctuation de la lumière diffusée. Cette fluctuation est directement corrélée à la vitesse à laquelle les objets se déplacent dans le milieu. Plus la vitesse du mouvement brownien est importante et plus l'intensité lumineuse diffusée fluctue rapidement. La fonction d'autocorrélation $G(\Delta t)$ du signal (fluctuation d'intensité) est calculée, elle correspond au degré de cohérence trouvé aux instants t et $t+\Delta t$ pour une particule au même endroit. Plus la particule est petite, plus son mouvement brownien est important et plus ce degré de cohérence va décroître rapidement dans le temps. (Figure 2.2).

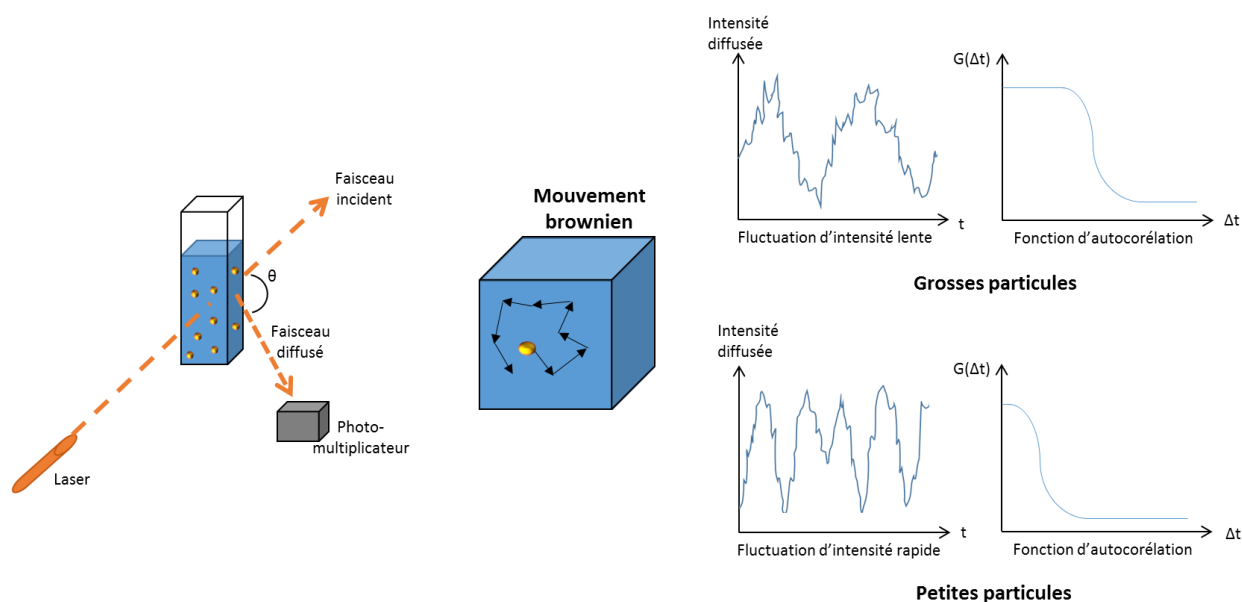


Figure 2.2 : Illustration du principe de la diffusion dynamique de la lumière.

Différentes modélisations sont possibles pour le traitement de la fonction d'autocorrélation $G(\Delta t)$ afin de déterminer la distribution de taille des particules. L'une d'elle est le modèle des Cumulants [6,7] qui a été validé par l'Organisation Internationale de Normalisation avec la norme ISO 22412:2017 « *Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS)* ».

Quand la distribution de taille des NCLs mesurée est monomodale, la fonction d'autocorrélation $G(\Delta t)$ prend la forme d'une exponentielle décroissante du temps (Δt). La fonction $y(\Delta t)$, calculée à partir de $G(\Delta t)$, est alors un développement limité :

$$y(\Delta t) = \frac{1}{2} \ln[G(\Delta t) - \text{cste}] = a_0 - a_1 \Delta t + a_2 \Delta t^2 \dots$$

Le premier cumulant (a_1) permet de calculer le Z-average. Celui-ci est le diamètre hydrodynamique moyen d'une sphère présentant le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Le second cumulant (a_2) est utilisé pour calculer l'indice de polydispersité (PdI).

$$\text{Z - average} = \frac{1}{a_1} \frac{k_B T}{3\pi\eta} \left[\frac{4\pi\tilde{n}}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right]^2 \quad \text{PdI} = \frac{2a_2}{a_1^2}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, η est la viscosité du milieu, \tilde{n} est l'indice de réfraction de milieu, λ est la longueur d'onde du laser et θ est l'angle de diffusion. Le troisième cumulant et les suivants peuvent être utilisés dans le cas d'une distribution de taille non monomodale et non mono-disperse, mais ne sera pas abordée.

Remarque : le premier cumulant (a_1) est lié au coefficient de diffusion de la particule en suspension dans le milieu dispersant et le calcul de Z-average repose sur la loi de Stokes-Einstein qui relie le coefficient de diffusion D au diamètre hydrodynamique d_H de la particule :

$$a_1 = Dq^2 \text{ avec } D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_H} \text{ et } q = \frac{4\pi\tilde{n}}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

III.1.2.2. Notions générales sur la mesure de Potentiel zêta

Lorsqu'une particule est en suspension, les électrolytes présents dans la phase continue vont interagir avec la surface de la particule en fonction de leurs charges et ce jusqu'à atteindre un équilibre thermodynamique.

L'interface entre la particule et la solution peut être décrite par un modèle à deux couches (Figure 2.3). La particule est entourée d'une première couche dans laquelle les ions sont fortement liés à elle (couche de Stern). La couche de Stern est englobée par une seconde couche dont la limite est appelée plan de cisaillement. A l'intérieur les ions y sont organisés de façon plus diffuse. Lors du mouvement d'une particule, la double couche d'ions et de molécules de solvant associée l'accompagne et reste inchangée. Le potentiel zêta (PZ) est la valeur du potentiel de part et d'autre du plan de cisaillement, c'est un bon indicateur de la charge de la particule.

Lors de la mesure de PZ, un champ électrique est appliqué entre 2 électrodes dans une solution, les particules chargées vont se mettre en mouvement vers l'électrode de charge opposée. La vitesse de déplacement peut être mesurée par effet doppler. Lorsqu'une particule est immobile, les fréquences de l'onde électromagnétique du rayonnement laser sont identiques pour le faisceau incident et le faisceau diffusé. Par contre, lorsque la particule est en mouvement, les 2 fréquences sont différentes, cette différence de fréquence Δf permet de mesurer la vitesse de déplacement v de la particule :

$$\Delta f = \frac{2v \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

où λ est la longueur d'onde du laser et θ est l'angle de diffusion.

La vitesse de déplacement de la particule est proportionnelle au champ électrique appliqué et le coefficient de proportionnalité correspond à la mobilité électrophorétique μ_{ep} . Différentes approximations sont utilisées pour déterminer la valeur PZ, dont l'approximation de Smoluchowski qui détermine la valeur de PZ à partir de la mobilité électrophorétique μ_{ep} grâce à l'équation suivante :

$$PZ = \frac{\mu_{ep}\eta}{\varepsilon}$$

avec ε et η la constante diélectrique et la viscosité de la phase continue dispersante [8].

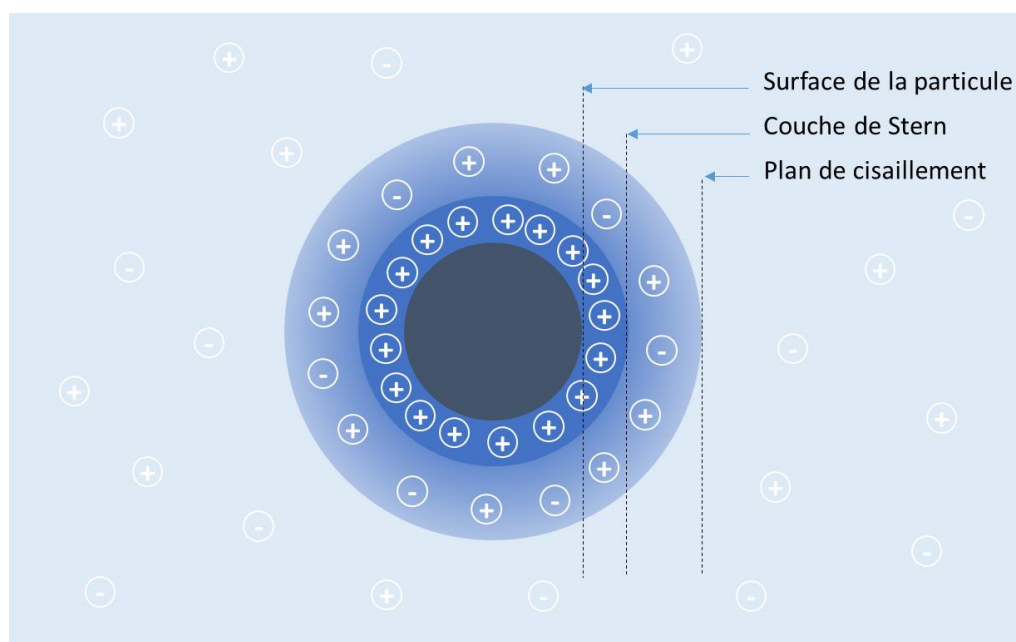


Figure 2.3 : Représentation de la double couche ionique associée à une particule négative en suspension.

La valeur de PZ est utilisée pour prévoir la stabilité des particules colloïdales en suspension et leur comportement dans des milieux biologiques. Elle est influencée par la particule elle-même, mais également par la nature et la concentration des ions présents dans la solution. Enfin, elle sera utilisée en tant qu'indication de la charge de surface de la particule, mais en aucun cas comme sa valeur réelle. Un potentiel zêta positif indique des particules cationiques, tandis qu'un potentiel zêta négatif signera pour des particules anioniques. Un potentiel zêta compris entre -10 et +10 mV est représentatif de particules non chargées.

III.1.2.3. Caractérisation des nanocapsules lipidiques

Les suspensions de NCLs ont été diluées par un facteur 60 (v/v) avant de procéder aux mesures. Les distributions de taille et les PZ sont respectivement réalisés dans des cuves DTS0012 et DTS1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni) à la température de 25°C.

Le Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni) utilise un laser hélium-néon (4 mW) à la longueur d'onde (λ) de 633 nm. Le photomultiplicateur est placé à un angle θ de 173° par rapport au faisceau de lumière incident. La fonction d'autocorrélation est ajustée avec le modèle des Cumulants afin d'obtenir les valeurs de Z-average et PdI qui caractérisent les tailles des NCLs en suspension et leur distribution. La mobilité électrophorétique a été calculée par l'approximation de Smoluchowski afin d'obtenir la valeur de PZ des NCLs en suspension.

III.2. Notion de plan de mélange

Les plans d'expériences permettent d'optimiser l'organisation d'expérimentations. En effet, leur objectif est d'apporter le maximum d'informations précises en un minimum d'essais. Ils permettent d'étudier le lien qui existe entre une grandeur Y (appelée réponse) et des variables X_i (appelées facteurs) qui peuvent modifier Y selon la fonction : $Y = f(X_i)$. Un grand nombre de plans d'expériences existent, parmi lesquels nous avons utilisé le plan de mélange.

Dans un plan de mélange, les facteurs sont les proportions de chaque ingrédient d'une formule. Ces constituants ne sont pas indépendants les uns des autres. En effet, la somme des différentes proportions est toujours égale à 100%, ainsi la proportion du dernier constituant est imposée par les autres. Cette relation est appelée contrainte fondamentale des mélanges. De plus, le choix des proportions de chaque composant peut être influencé par de nombreuses contraintes, telles que :

- Des basses teneurs interdites : l'une ou plusieurs des proportions des constituants ne peut(peuvent) être inférieure(s) à une(des) valeur(s) donnée(s) ;
- Des hautes teneurs interdites : l'une ou plusieurs des proportions des constituants ne peut(peuvent) pas être supérieure(s) à une(des) valeur(s) donnée(s) ;
- Des hautes et basses teneurs interdites : l'une ou plusieurs des proportions des constituants est(sont) comprise(s) entre des valeurs minimale(s) et maximale(s) données ;
- Des contraintes relationnelles : qui imposent soit de conserver un rapport constant entre les proportions de deux constituants, soit de respecter une relation d'addition entre différents constituants.

La représentation des mélanges à quatre constituants est un tétraèdre régulier, dans lequel les sommets, les arêtes et les faces correspondent respectivement aux produits purs, aux mélanges binaires et mélanges ternaires (Figure 2.4).

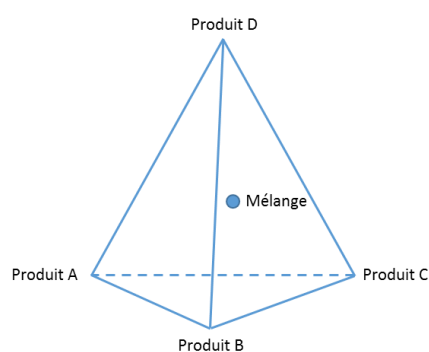


Figure 2.4 : Représentation d'un plan de mélange constitué de quatre constituants sous la forme d'un tétraèdre régulier.

Le modèle décrivant la réponse Y en fonction des différents facteurs peut être quadratique, cubique ou d'ordre supérieur, complet ou incomplet. Le choix du modèle dépendra de la complexité des surfaces de réponses souhaitées. Néanmoins, plus le degré du modèle est élevé et plus il faudra réaliser de points d'expériences pour pouvoir déterminer tous les coefficients de ce modèle.

III.3. Construction du plan de mélange

Nous souhaitons étudier l'influence de la proportion de chacun des quatre constituants des NCLs sur leur valeur de Z-average. Chacune des variables choisies correspond au ratio de l'un des constituants par rapport à la masse totale de formule : Labrafac (X_1), Kolliphor (X_2), Span 80 (X_3) et eau (X_4).

Le procédé de formulation reste identique à celui précédemment décrit. Les contraintes hautes et basses (teneurs interdites) de chaque variable ont été choisies en fonction des formulations déjà réalisées par Moysan *et al.* [5] (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Contraintes hautes et basses teneurs interdites pour chaque variable. Les variables sont présentées comme étant le pourcentage de la masse du composé par rapport à la masse totale des quatre variables (soit la somme des masses de Labrafac, de Kolliphor, de Span 80 et d'eau).

Variable	Composant	Borne minimale (% m/m_{totale})	Borne maximale (% m/m_{totale})
X_1	Labrafac	15	45
X_2	Kolliphor	15	45
X_3	Span 80	0	15
X_4	Eau	15	45
Contrainte fondamentale		$X_1 + X_2 + X_3 + X_4 = 100\%$	

Par ailleurs, nous avons décidé que les formulations doivent répondre à d'autres contraintes qui ne rentrent pas directement dans la construction du plan de mélange. Premièrement, la masse totale de la formulation sera toujours égale à 6 g et sa concentration finale en sel de 0,9% (m/m_{totale}) (soit une masse constante de 54 mg pour chaque formulation). Deuxièmement, le volume d'eau de trempe est maintenu constant à 2 mL, ce qui impose qu'au départ de la formulation la somme des masses de Labrafac, Kolliphor, Span 80 et eau soit toujours égale à 4 g.

Tous les points expérimentaux composant le plan de mélange ont été choisis à l'aide du logiciel Nemrodw[®] (LPRAI, Marseille, France). Ainsi, pour explorer l'ensemble des quatre variables, 51 essais ont été déterminés. Afin d'éviter les erreurs systématiques, les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire proposé par le logiciel Nemrodw[®]. De plus, parmi ce plan, trois points différents ont été répétés une fois. Ces répétitions nous permettent de déterminer la variabilité des résultats expérimentaux.

Pour l'ensemble des 51 essais, les distributions de taille des NCLs (Z-average et PdI) ont été déterminées et toutes les NCLs présentant une valeur de PdI supérieure à 0,1 ont été exclues du domaine expérimental. Seules 6 formulations ont été rejetées du plan de mélange. Celles-ci ont toutes en commun l'utilisation de quantités de tensioactifs proches de leurs niveaux les plus faibles. En effet, les variables X_3 (Span 80) et X_2 (Kolliphor) sont comprises entre 0 et 0,075 et entre 0,15 et 0,3 (m/m_{totale}), respectivement.

Par la suite, le Z-average est la seule réponse étudiée. Les mesures obtenues permettent d'établir un modèle mathématique prédictif de la taille des objets. Tous les tests et calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel libre R [9]. La modélisation mathématique du Z-average des NCLs en fonction des 4 variables (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) a finalement utilisé 45 points expérimentaux différents et 3 répétitions, soit 48 points totaux.

Du fait des contraintes hautes et basses teneurs interdites, le volume expérimental testé est compris dans un hyper-polyèdre. Ce dernier est un prisme irrégulier, composé de différentes bases hexagonales irrégulières et non empilables. La figure 1.5 présente 5 coupes de ce volume afin de présenter l'ensemble des points testés. Chaque coupe est organisée à la manière d'un diagramme ternaire dont les sommets représentent les proportions de Labrafac, Kolliphor et eau. Enfin, chacun des plans est associé à une valeur de Span 80 testée : 0 ; 3,75 ; 7,5 ; 11,25 et 15% (m/m_{totale}).

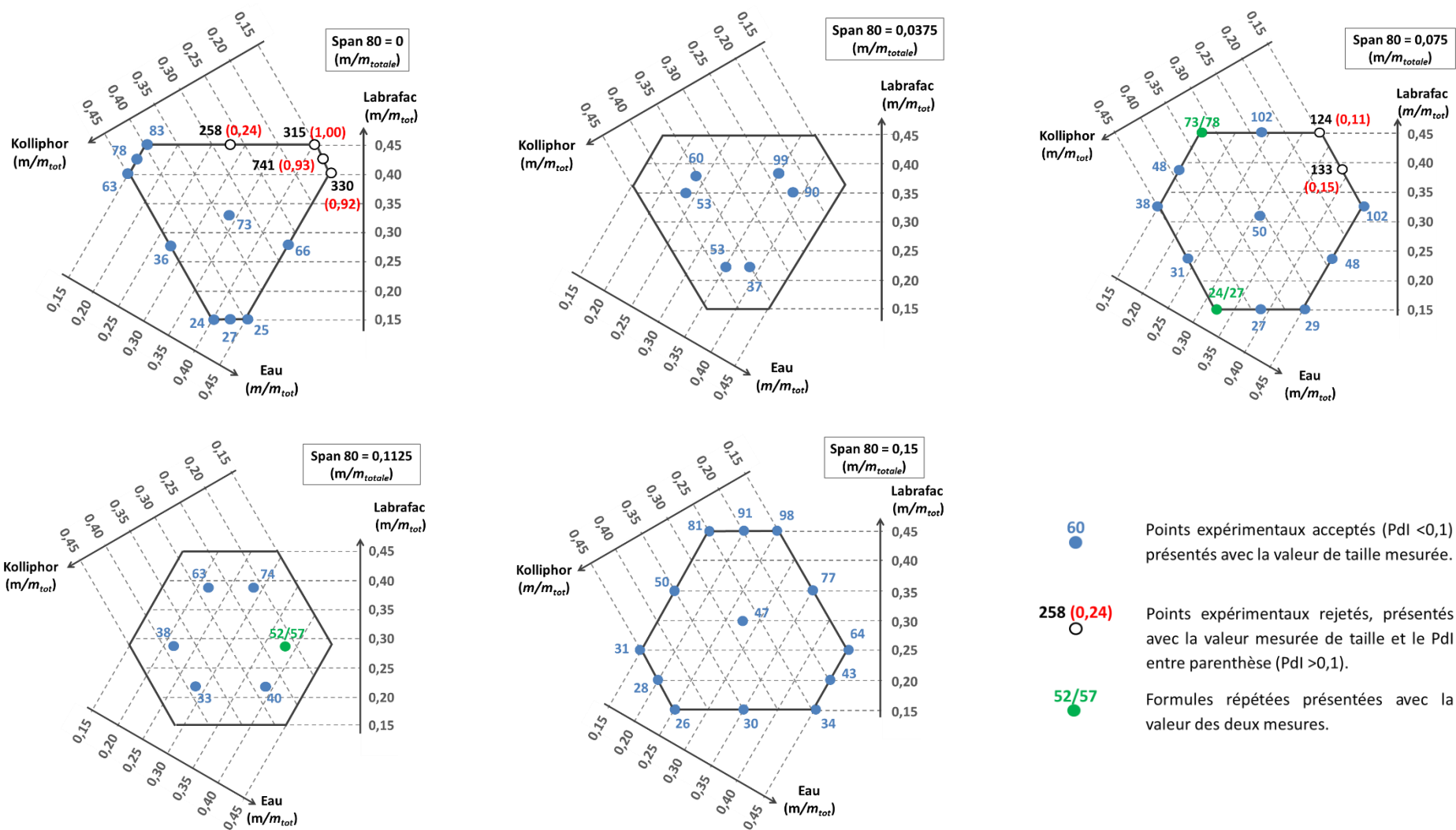


Figure 2.5 : Représentation du volume expérimental du plan de mélange étudié. Le volume a été découpé en 5 plans correspondant aux 5 niveaux de Span 80 testés : 0 ; 3,75 ; 7,5 ; 11,25 et 15% (m/m_{totale}). Chaque plan est un diagramme ternaire (proportion massique de Labrafac, de Kolliphor et d'eau) et permet de représenter l'ensemble des points testés et la valeur de Z-average mesurée des NCLs en suspension correspondantes.

III.4. Modélisation de la taille des nanocapsules lipidiques

La réponse Y , soit la valeur de Z -average, a été modélisée. Pour ce faire, nous supposons que Y suit un modèle quadratique incomplet, d'équation suivante :

$$Y = \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{14} \cdot X_1 \cdot X_4 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + \beta_{24} \cdot X_2 \cdot X_4 + \beta_{34} \cdot X_3 \cdot X_4 + \epsilon$$

Tout d'abord, nous souhaitons savoir si l'un au moins des facteurs proposés est associé à Y . Ainsi, l'hypothèse nulle (H_0) suivante : aucune des variables explicatives n'apporte d'information utile pour la prédiction de Y ($\beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{34} = 0$), peut être posée.

Ce test d'hypothèse suit sous l'hypothèse nulle une loi de Fischer à 10 et 38 degrés de liberté. Pour faire ce test, nous avons utilisé la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel R. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 2.2 et 2.3 suivants.

Tableau 2.2 : Valeurs estimées et écart-types des coefficients β_i (méthode du maximum de vraisemblance).

	Coefficient	Valeur estimée	Ecart type
β_1	Labrafac	513,17	41,59
β_2	Kolliphor	133,41	38,83
β_3	Span 80	468,90	235,84
β_4	Eau	78,93	37,39
β_{12}	Labrafac : Kolliphor	-995,47	121,53
β_{13}	Labrafac : Span 80	-1546,73	319,36
β_{14}	Labrafac : Eau	-184,92	95,82
β_{23}	Kolliphor : Span 80	-334,78	269,45
β_{24}	Kolliphor : Eau	-362,86	113,54
β_{34}	Span 80 : Eau	-660,41	295,03

Tableau 2.3 : Résultat du test statistique.

	Valeur	Degré de liberté	Test F	Probabilité de F
Erreur résiduelle	4,492	38	828,5	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$
Coefficient de détermination multiple (r^2)	0,9954	38		
Coefficient de détermination ajusté (R^2)	0,9942	10		

La probabilité de F est égale à $2,2 \cdot 10^{-16}$, ce qui est largement inférieure au risque alpha de 5%. Nous pouvons donc rejeter l'hypothèse nulle (H_0). Ainsi, l'un au moins des coefficients β_i étudiés est significativement différent de zéro et est associé à la réponse Y .

Les valeurs des coefficients ont été calculées par la même occasion (cf. tableau 2.2), et permettent de prédire la valeur de Z -average des NCLs en fonction de leurs compositions. La distribution des résidus suit une loi normale centrée en 0 dont les valeurs minimale et maximale sont respectivement -6,062 et 16,045, ce qui témoigne de la bonne homogénéité de la variabilité des résidus.

La valeur du coefficient de détermination ajusté R^2 est très proche de 1 (Tableau 2.3). Il représente le pourcentage de la variation qui est expliquée par la régression. Ainsi, le modèle quadratique incomplet explique 99,42% des valeur de Z-average expérimentales (réponse Y), ce modèle mathématique est donc très prédictif.

Trois points différents du modèle ont été répétés une fois chacun. Ces 3 répétitions nous permettent de réduire notre erreur résiduelle. L'erreur résiduelle correspond à la partie aléatoire du modèle, elle est séparée en une partie d'erreur pure et une partie de manque d'ajustement (ou « *lack of fit* »). Dans le second test statistique, nous nous intéressons à la variabilité « intra-expérience », ainsi la variabilité associée à notre expérience est comparée à la variabilité de l'erreur pure. Si la différence est trop importante, le modèle manque alors d'ajustement et sa validité n'est pas vérifiée.

La nouvelle hypothèse nulle (H_0) consiste en l'absence d'un manque d'ajustement du modèle. Si elle est vérifiée, le modèle est juste et fidèle. La méthode de l'analyse de la variance (ou ANOVA pour « *analysis of variance* ») est utilisée et ses résultats sont présentés dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Résultats de l'analyse de la variance.

	Coefficients	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Probabilité de F	Degré de significativité
β_1	Labrafac	1	160156	160156	16685,02	1,023.10 ⁻⁶	***
β_2	Kolliphor	1	1578	1578	164,43	0,0010	**
β_3	Span 80	1	14	14	1,47	0,3117	•
β_4	Eau	1	3441	3441	358,48	0,0003	***
β_{12}	Labrafac : Kolliphor	1	464	464	48,29	0,0061	**
β_{13}	Labrafac : Span 80	1	1181	1181	123,08	0,0016	**
β_{14}	Labrafac : Eau	1	2	2	0,19	0,6914	•
β_{23}	Kolliphor : Span 80	1	5	5	0,49	0,5344	•
β_{24}	Kolliphor : Eau	1	213	213	22,23	0,0181	*
β_{34}	Span 80 : Eau	1	101	101	10,53	0,0477	*
	Résidus	38	767	20			
	Manque d'ajustement	35	738	21	2,20	0,2848	
	Erreur pure	3	29	10			

p : 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < • < 1

Tous les facteurs sont significatifs à l'exception du Span 80 (coefficient β_3), du Labrafac : Eau (coefficient β_{14}) et du Kolliphor : Span 80 (coefficient β_{23}). Le Span 80 n'est pas significatif seul, mais associé au Kolliphor et à l'eau, il influence tout de même la valeur de Z-average des NCLs de manière significative.

Heurtault *et al.* [10] ont précédemment montré que l'influence de l'eau est négligeable par rapport à celle des tensioactifs et de l'huile pour des NCLs composées de Kolliphor, Labrafac et Lipoïd® S75-3 (lécithine de soja composée à 69% de phosphatidylcholine). Cependant, ici, la proportion d'eau dans la formule semble présenter un effet aussi important que celui de l'huile et des tensioactifs.

D'après les résultats obtenus, l'hypothèse nulle (H_0) peut être rejetée avec une valeur de risque alpha supérieure à 0,2848. Ce seuil de significativité étant très élevé, l'hypothèse nulle (H_0) est considérée comme validée en fonction du risque beta. Ce dernier correspond au risque pris d'accepter une hypothèse nulle alors que dans la réalité celle-ci est fautive. La valeur du risque beta n'est pas calculable, mais peut être estimée faible grâce au nombre de degrés de liberté élevé de notre modèle : 48. Ce risque beta faible permet d'avoir une puissance de test (1 - beta) élevée. En conséquence, nous pouvons conclure qu'il n'existe pas de manque d'ajustement de

notre modèle. Celui-ci est donc fiable pour décrire la variation de la valeur du Z-average en fonction des proportions des différents constituants de la formulation.

Heurtault *et al.* [10] avait également validé un modèle prédisant les tailles de NCLs à base de Lipoid® S75-3, en montrant l'absence de manque d'ajustement avec un seuil de significativité de 0,286, comparable au nôtre, et un nombre de degrés de liberté seulement égal à 14 (13 points d'expérience et 2 répétitions) [10].

Finalement, la figure 2.6 représente les valeurs estimées du Z-average des NCLs par le modèle mathématique en fonction des valeurs expérimentales mesurées. Nous pouvons constater que les points expérimentaux sont dispersés uniformément tout au long de la droite « idéale ».

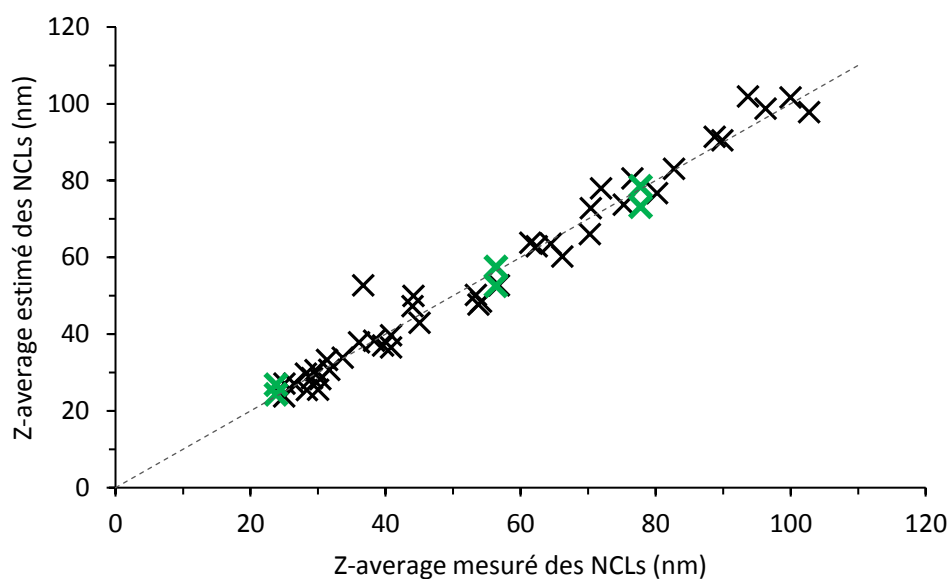


Figure 2.6 : Valeurs estimées du Z-average en fonction des valeurs de Z-average mesurées expérimentalement, pour les NCLs en suspension. La droite en pointillé représente le cas idéal où la valeur expérimentale est toujours égale à celle prédite. Les croix vertes correspondent aux points répétés.

III.5. Choix de quatre formules

Notre objectif en débutant ce travail de plan de mélange était de sélectionner de façon optimale quatre formules afin d'obtenir des NCLs présentant des distributions de taille distinctes et définies de : 25, 50, 75 et 100 nm.

Grâce à la modélisation du plan de mélange, nous avons sélectionné quatre formules. Les quantités de chaque excipient sont détaillées dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Composition des formules sélectionnées.

Quantité de chaque excipient (mg)	25 nm	50 nm	75 nm	100 nm
Labrafac	600	1116,8	1800	1800
Kolliphor	1800	916,8	1300	950
Span 80	300	450	300	300
Eau dé-ionisée	1300	1516,8	600	950
NaCl	54	54	54	54
Eau dé-ionisée (trempe)	2000	2000	2000	2000

Ces quatre formulations ont été répétées 7 fois afin de vérifier la robustesse de nos protocoles.

Tableau 2.6 : Caractérisation des NCLs en suspension avec les quatre protocoles sélectionnés (n=7, moyenne \pm écart-type).

	25 nm	50 nm	75 nm	100 nm
Z-average (nm)	25 \pm <1	56 \pm 2	76 \pm 2	107 \pm 4
PdI	0,08 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02
Potentiel zêta (mV)	-2 \pm 2	-4 \pm 2	-3 \pm 1	-4 \pm 1

Ces quatre formules ont prouvé leur bonne répétabilité (Tableau 2.6). En effet, les écart-types des valeurs de Z-average sont très faibles (<4 nm). De plus, ces répétitions ont été effectuées par deux opérateurs différents, ce qui prouve également la très bonne reproductibilité du procédé.

Enfin, la stabilité des formulations a été étudiée sur une période de 10 semaines. Les distributions de taille (Z-average et PdI) des NCLs en suspension ont été contrôlées sur des formulations réalisées en triplicata et conservées à température ambiante ou à 4°C (Figure 2.7).

Les NCLs conservées en suspension montrent une très bonne stabilité lorsqu'elles sont conservées à +4°C et à température ambiante. Les valeurs de Z-average restent constantes et celles de PdI sont toujours inférieures ou légèrement supérieures à 0,1.

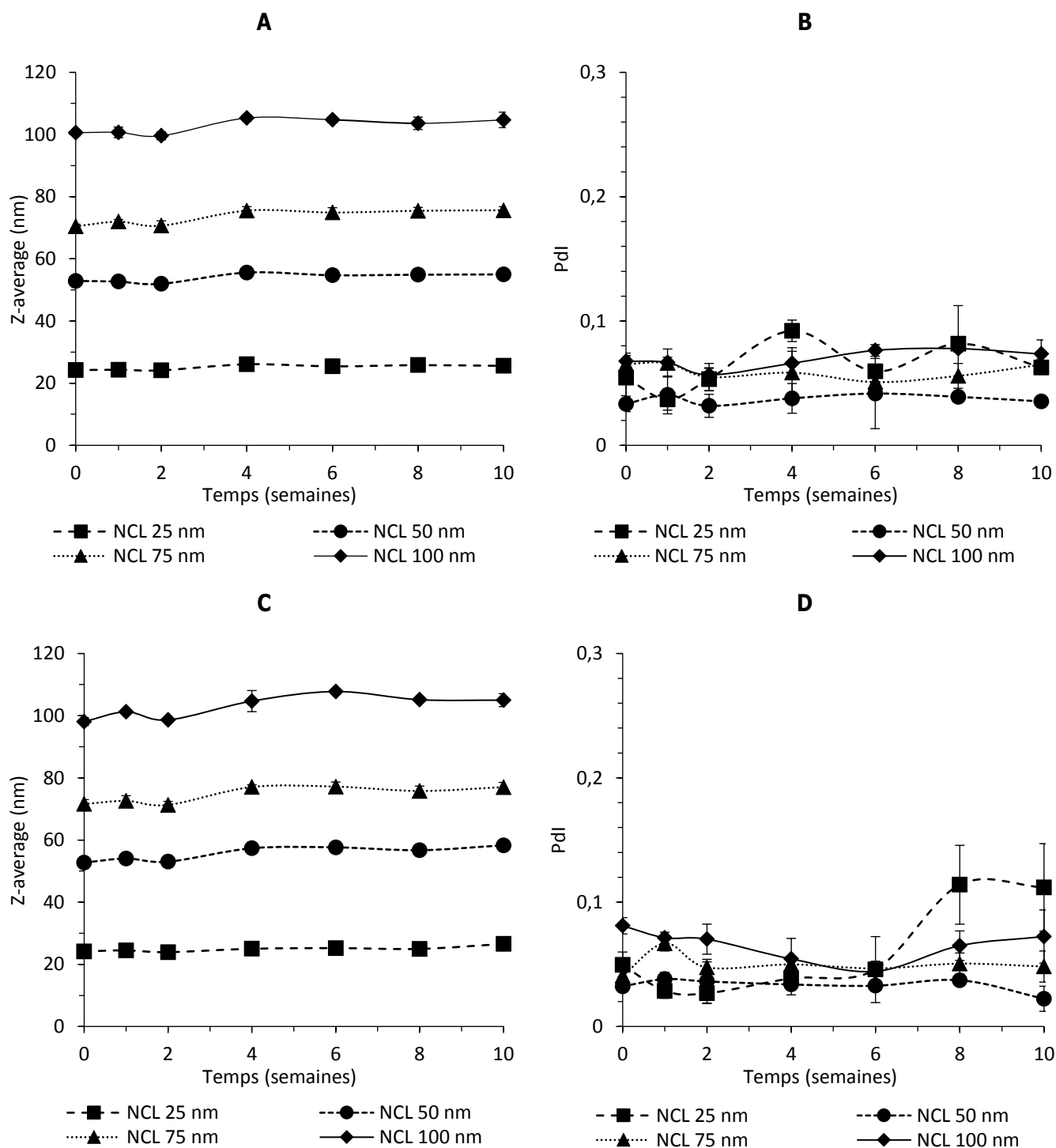


Figure 2.7 : Evolution des valeurs de Z-average (A, C) et celles de PdI (B, D) des NCLs en suspension (diamètre de 25, 50, 75 et 100 nm) durant 10 semaines à 4°C (A, B) et à température ambiante (C, D) (n=3, moyenne \pm écart-type).

Ainsi, nos formules de départ ont pu être optimisées afin d'obtenir des NCLs aux distributions de taille monomodales et mono-disperses (PdI < 0,1) et des valeurs de Z-average de 25, 50, 75 et 100 nm. Les formules sont à la fois répétables, reproductibles et stables. Toutes ces propriétés en font des vecteurs particulièrement intéressants pour nos futures applications.

IV. Synthèse des agents de réticulation et caractérisation

Nous souhaitons reproduire l'action de la gemcitabine modifiée (Gem-C12) dans la structure des hydrogels de NCLs avec une molécule non cytotoxique.

Notre choix s'est tourné vers la cytidine. En effet, ce nucléoside pyrimidique est endogène à l'organisme et son utilisation est donc plus sûre. De plus, sa structure est extrêmement proche de celle de la gemcitabine, car cette dernière est une molécule de cytidine dont la fonction hydroxyle en 2' du ribose est remplacée par deux atomes de fluor (Figure 2.8).

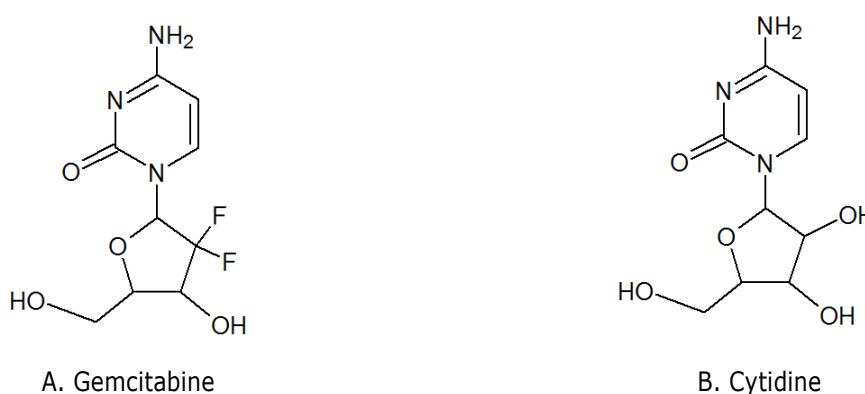


Figure 2.8 : Formules développées des molécules de gemcitabine (A) et de cytidine (B).

Nous avons donc sélectionné pour nos travaux la molécule de cytidine. Elle a ensuite été modifiée avec différentes longueurs de chaîne aliphatique, greffées sur la fonction amine libre de la base pyrimidique. Finalement, la meilleure molécule candidate pour remplacer la Gem-C12 a été sélectionnées.

IV.1. Protocole de synthèse des agents de réticulation

Le protocole de synthèse des différentes molécules testées a été largement inspiré de celui de la Gem-C12, décrit dans la littérature [5].

Tout d'abord, dans un ballon, deux équivalents molaires d'anhydride d'acide gras sont solubilisés dans du dioxane à la concentration de 50 mg.mL⁻¹. La solution est maintenue sous agitation magnétique dans un bain marie à 50°C. En parallèle, un équivalent molaire de cytidine est solubilisé dans de l'eau dé-ionisée à la concentration finale de 50 mg.mL⁻¹. Cette seconde solution est ajoutée goutte à goutte à la première. Le mélange est agité toute une nuit à la température constante de 50°C. Après cette étape, la modification de la cytidine est vérifiée grâce à une chromatographie sur couche mince (CCM). Une goutte de mélange réactionnel est déposée sur une plaque de silice (*Silica gel on TLC Alu foils*, Sigma - Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Les constituants déposés sont élués par un mélange de dichlorométhane/méthanol 85/15 (v/v) et révélés sous une lumière ultraviolette (UV) de longueur d'onde 254 nm (Lampe UV VL-6.C, 6 W - 254 nm ; Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Puis, le mélange est évaporé sous vide à 40°C grâce à un évaporateur rotatif. Le résidu est ensuite purifié par une chromatographie sur colonne de silice (la phase stationnaire est composée de Silica gel (Sigma - Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)) en utilisant un gradient d'éluion composé de dichlorométhane pur, remplacé progressivement par un mélange de dichlorométhane/méthanol 95/5 (v/v) et finalement par un mélange dichlorométhane/méthanol 85/15 (v/v). Tout au long de l'éluion, un dépôt de quelques gouttes de chaque fraction est réalisé sur une plaque de silice. Les fractions contenant le produit synthétisé majoritaire sont ainsi détectées sous lumière UV. Toutes les fractions contenant la cytidine modifiée sont collectées, rassemblées puis évaporées grâce à un évaporateur rotatif.

La pureté de tous les produits obtenus est vérifiée par un spectre proton en résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H) en utilisant un appareil Avance DRX 500 MHz (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne). Pour cela, la molécule est simplement solubilisée dans du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d₆).

IV.2. Résultats

Différentes longueurs de chaînes aliphatiques ont été testées lors de la modification de la cytidine. Les anhydrides d'acide gras mis en œuvre lors des synthèses sont les suivants :

- L'anhydride laurique (C12)
- L'anhydride myristique (C14)
- L'anhydride palmitique (C16)
- L'anhydride oléique (C18:1)
- L'anhydride stéarique (C18).

La réaction produite correspond à la condensation de la fonction amine (NH₂) de la base pyrimidique de la cytidine avec un anhydride d'acide gras. Ainsi, un groupement amide monosubstitué est obtenu (Figure 2.9).

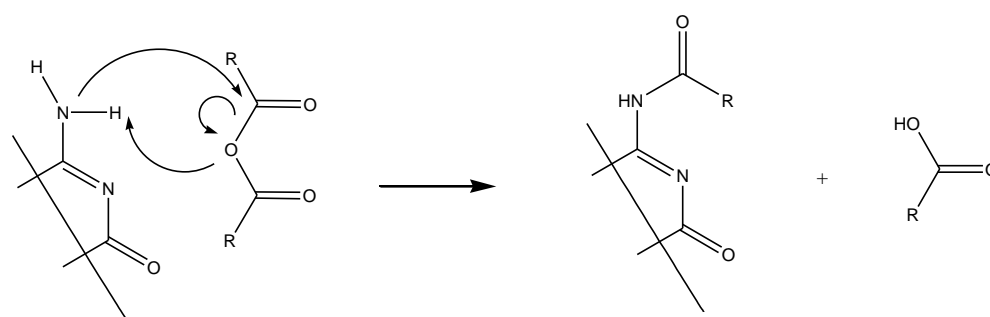
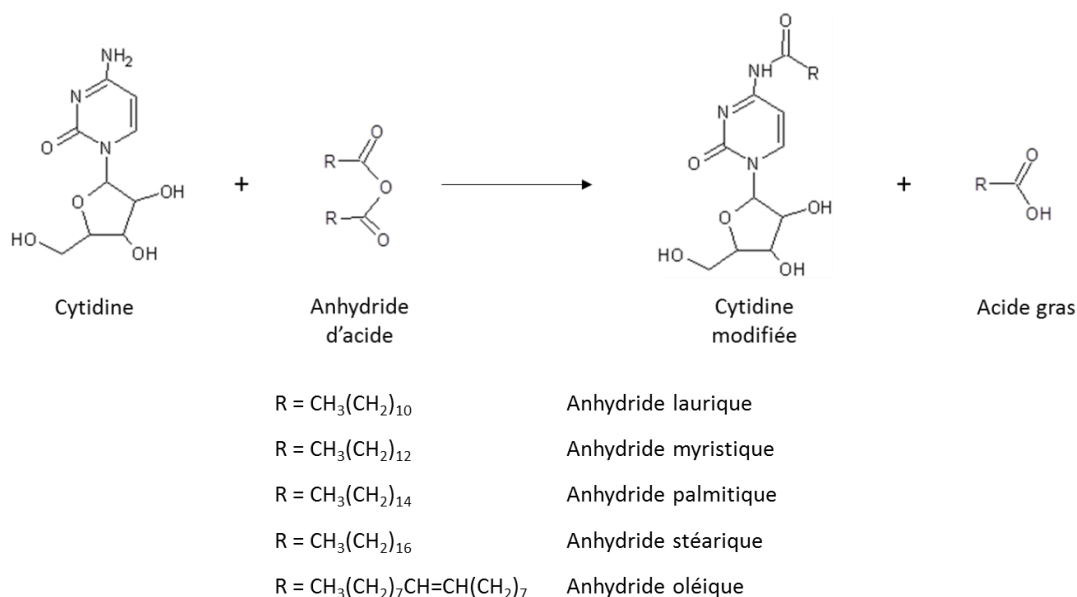


Figure 2.9 : Détail de la synthèse des différentes molécules de cytidine modifiée et mécanisme réactionnel.

Lors des CCM, pour observer l'avancée de la réaction, plusieurs tâches sont révélées sous lumière UV. Cette technique est utilisée pour visualiser l'hétérocycle aromatique de la cytidine native et des diverses cytidines modifiées. Une première tâche observée ne migre pas lors de l'élution et reste au même endroit que la goutte déposée. Il s'agit de cytidine native (non modifiée) qui est polaire et qui n'est pas éluée. La cytidine modifiée (tâche majoritaire) est moins polaire (ajout d'une seule chaîne aliphatique) et migre donc plus loin. Plusieurs produits secondaires (minoritaires) sont observés plus proches du front de migration. Leurs présences peuvent être expliquées par la fixation de chaînes aliphatiques supplémentaires sur les fonctions hydroxyles du ribose de la cytidine. Enfin, les chaînes d'acides gras n'ayant pas réagi ne sont pas détectables en UV, mais du fait de leur très faible polarité, elles migrent certainement au plus près du front de migration.

Nous avons ainsi pu obtenir cinq molécules :

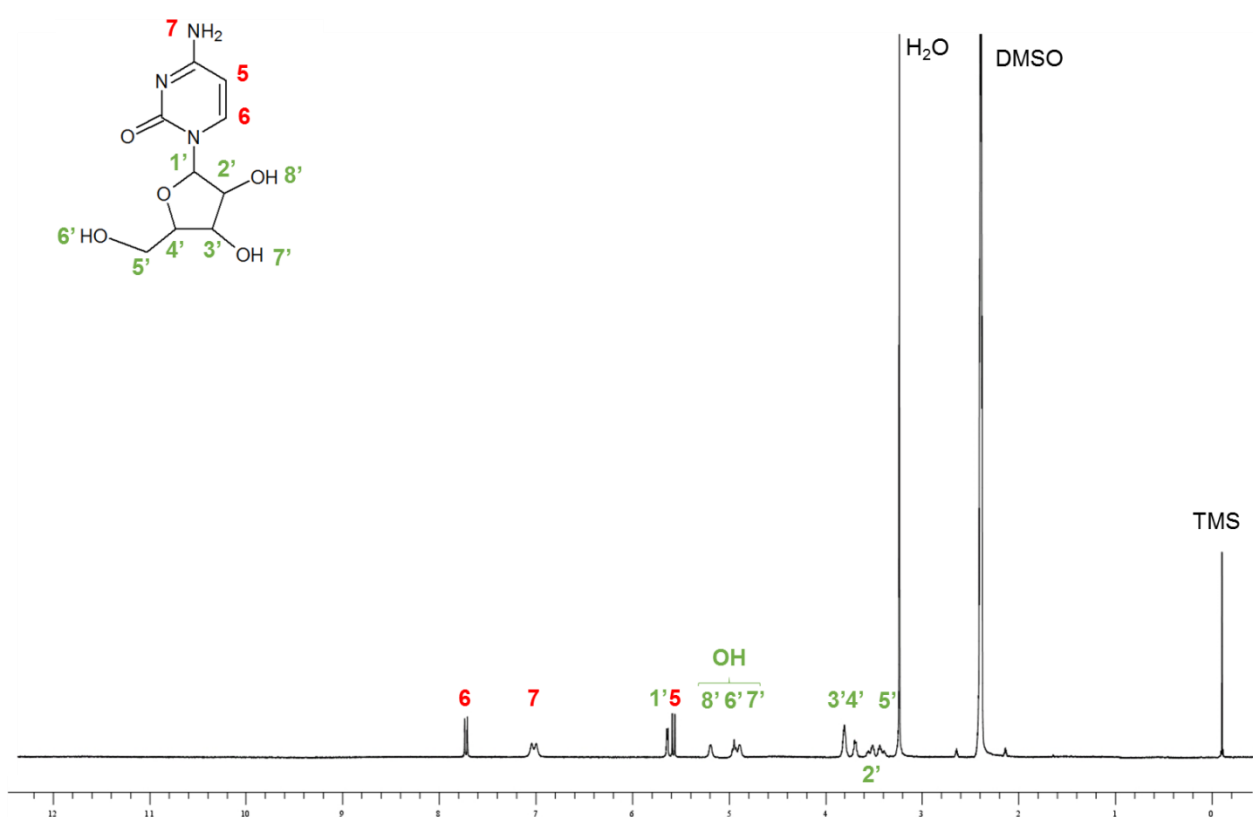
- 4-(N)-lauroyl cytidine (Cyt-C12) ;
- 4-(N)-myristoyl cytidine (Cyt-C14) ;
- 4-(N)-palmitoyl cytidine (Cyt-C16) ;
- 4-(N)-oléoyl cytidine (Cyt-C18:1) ;
- 4-(N)-stéaroyl cytidine (Cyt-C18).

Ces molécules présentent des rendements de synthèse différents (Tableau 2.7).

Tableau 2.7: Formules brutes, masses molaires et rendement de synthèse des cinq molécules synthétisées

Nom de la molécule	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Rendement molaire de synthèse (%)
Cyt-C12	C ₂₁ H ₃₅ N ₃ O ₆	425,5	35-40
Cyt-C14	C ₂₃ H ₃₉ N ₃ O ₆	453,6	35-40
Cyt-C16	C ₂₅ H ₄₃ N ₃ O ₆	481,6	30-35
Cyt-C18:1	C ₂₇ H ₄₅ N ₃ O ₆	507,7	5-10
Cyt-C18	C ₂₇ H ₄₇ N ₃ O ₆	509,7	25-30

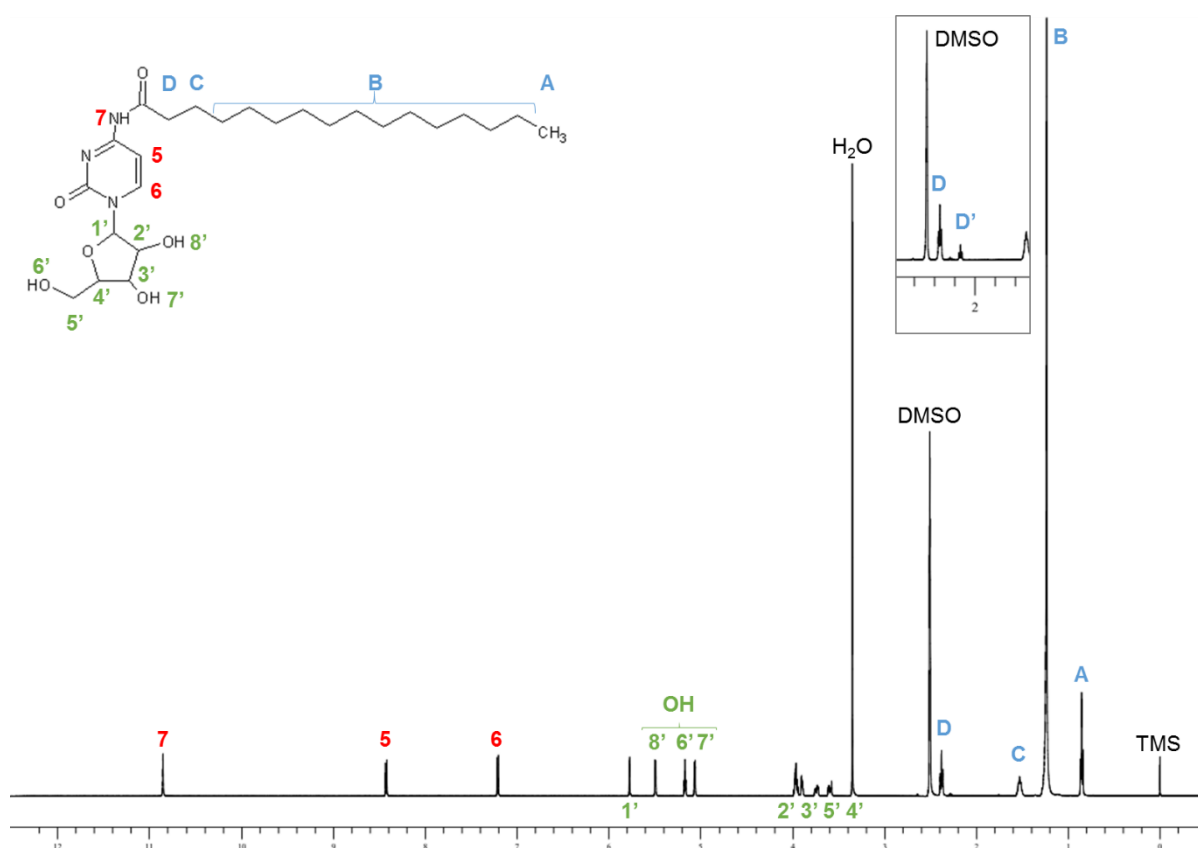
Toutes les molécules synthétisées ont été caractérisées en RMN (spectre proton). Les figures 2.10 et 2.11 présentent les spectres RMN ¹H de la cytidine avant et après modification (exemple donné pour la Cyt-C16).



Caractérisation RMN ¹H de la cytidine :

¹H-NMR ((CD₃)₂SO): 7,84 (1H, d, 6-CH), 7,14 (2H, d, NH₂), 5,74 (1H, d, 1'-CH), 5,67 (1H, d, 5-CH), 5,29 (1H, d, 8'-OH), 5,05 (1H, t, 6'-OH), 4,99 (1H, d, 7'-OH), 3,91 (2H, m, 3'-CH et 4'-CH), , 3,85 (1H, m, 2'-CH), 3,61 - 3,54 (1H, m, 5'-CH).

Figure 2.10 : Spectre RMN ¹H de la cytidine et attributions.



Caractérisation RMN ^1H de la 4-(N)-palmitoyl cytidine (Cyt-C16) :

$^1\text{H-NMR}$ ((CD_3) 2SO): 10,85 (1H, s, NHCO), 8,43 (1H, d, 5-CH), 7,20 (1H, d, 6-CH), 5,77 (1H, m, 1'-CH), 5,50 (1H, d, 8'-OH), 5,18 (1H, t, 6'-OH), 5,07 (1H, d, 7'-OH) 3,96 (1H, m, 2'-CH), 3,90 (1H, m, 3'-CH), 3,76-3,72 (2H, m, 5'-CH), 3,61-3,57 (1H, m, 4'-CH), 2,36 (2H, t, CO-CH $_2$), 1,53 (2H, t, CO-CH $_2$ -CH $_2$), 1,23 (24H, m, CH $_2$ (CH $_2$) $_{12}$ CH $_3$), 0,85 (3H, t, CH $_3$).

Figure 2.11 : Spectre RMN ^1H de la 4-(N)-palmitoyl cytidine et attributions (Encart : Spectre RMN ^1H de la 4-(N)-palmitoyl cytidine incorrectement purifiée).

Le profil du spectre RMN ^1H obtenu pour la cytidine est conforme à celui déjà référencé dans la littérature [11]. La modification de la cytidine par une chaîne aliphatique via une fonction amide fait apparaître 4 nouveaux pics de faibles déplacements chimiques sur le spectre RMN ^1H de la cytidine (Figure 2.11 comparée à la figure 2.10). Il s'agit du triplet à 2,36 ppm (CH $_2$ en position α de la fonction amide), quintuplet à 1,53 ppm (CH $_2$ en position β de la fonction amide), multiplet à 1,23 ppm (CH $_2$ suivants de la chaîne aliphatique) et triplet à 0,85 ppm (CH $_3$ terminal de la chaîne aliphatique). Les rapports des intégrations des différents pics de la chaîne aliphatique et de la cytidine permettent de s'assurer que la cytidine est modifiée par une seule chaîne aliphatique. D'éventuelles molécules de cytidines di-, tri- ou quadri-modifiées (fonctions OH du ribose) ont bien été séparées de la cytidine mono-modifiée lors de la chromatographie sur gel de silice. Ces rapports d'intégration permettent également de vérifier l'absence de cytidine non-modifiée ou de chaîne aliphatique sous la forme d'acide gras.

La qualité de la purification peut également être observée sur le spectre RMN ^1H par la présence d'un seul pic en position α de la fonction amide. Les échantillons non purifiés présentent 2 triplets compris entre 2 et 2,5 ppm (encart de la figure 2.11). Le premier correspond au groupement CH $_2$ en position α de la fonction amide de la

cytidine mono-modifiée et le second correspond à des groupements CH_2 en position α de la fonction acide de l'acide gras ou de la fonction ester sur des cytidines di-, tri- ou quadri-modifiées.

Les figures 2.10 et 2.11 présentent l'exemple de la Cyt-C16, mais les mêmes conclusions ont pu être tirées au sujet des autres molécules synthétisées.

V. Développement d'un hydrogel de nanocapsules lipidiques

Précédemment, quatre formules de NCLs ont été développées. Parallèlement, différentes molécules à base de cytidine et candidates comme agent de réticulation des NCLs ont été synthétisées.

La capacité de ces molécules à être incorporées dans les NCLs a ensuite été testée grâce à des formulations préliminaires. Puis, la molécule la plus prometteuse a été choisie en fonction de son pouvoir à abaisser la tension de surface d'une interface huile/eau.

Par la suite, différents nouveaux hydrogels de NCLs ont pu être formulés en modulant les diamètres et la concentration des NCLs ainsi que la quantité de cytidine modifiée. L'encapsulation de la molécule gélifiante dans les NCLs a ensuite été dosée. Les structures des hydrogels ont également été observées en microscopie confocale afin de mieux comprendre leur architecture. Enfin, nous avons largement évalué l'influence des paramètres de formulation sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels.

V.1. Formulation des NCLs chargées en molécules lipophiles

Toutes les formulations de NCLs réalisées utilisent le même procédé de fabrication basé sur une inversion de phases (Partie I.1.1). La seule variation possible consiste en l'adjonction ou non d'un agent de réticulation dans les NCLs.

Les agents de réticulation qui permettent la gélification des NCLs sont tout d'abord solubilisés dans un mélange de Labrafac et de Span 80 en présence d'acétone. L'ensemble est agité dans un bain marie à 60°C pendant une heure minimum. Lorsque la solubilisation est complète, l'acétone est évaporée dans les mêmes conditions. Les autres composants des NCLs (Koliphor, NaCl et eau) sont additionnés et la formulation est poursuivie par les trois cycles de température successifs et l'ajout de l'eau de trempe. La gélification est considérée comme complète quand l'hydrogel est stocké une nuit complète au réfrigérateur (4°C). Lorsque les hydrogels ont besoin d'être prélevés ou mis en seringue, leur gélification peut être ralentie en utilisant une eau de trempe chaude (50°C).

Une molécule fluorescente : le perchlorate de 3,3'-dioctadécylloxycarbocyanine (DiO), a pu être encapsulée dans les NCLs, afin qu'elles soient détectables dans différents essais. Le DiO est solubilisé dans l'acétone avant son utilisation. Un volume adapté est prélevé et évaporé dans un bain marie à 60°C , avant de peser les constituants de la formulation.

V.2. Expériences préliminaires

Tous les agents de réticulation ont été mis en œuvre dans une formulation de NCLs de diamètre 50 nm. La solubilisation dans le Labrafac de la Cyt-C12 s'est avérée impossible. La molécule doit présenter un caractère trop hydrophile et ne peut pas être dissoute dans la phase lipophile de la formulation. L'ajout de co-solvant, tels que l'acétone ou l'éthanol, n'a pas permis de résoudre ce problème. La Cyt-C18, quant à elle, a pu facilement être solubilisée au sein de la formule. Cependant, si la gélification des NCLs intervient, les distributions de la taille des NCLs sont très altérées. La formule semble débiter sa gélification à une température supérieure à la température d'inversion de phases. Ainsi, la formule commence à gélifier avant même l'ajout du volume d'eau de trempe, ce qui pourrait expliquer les modifications de la distribution de taille des NCLs.

Les trois autres molécules ont pu facilement être solubilisées dans le mélange de Labrafac et Span 80 pour ensuite permettre la gélification des NCLs après formulation. La gélification ne débute qu'après la fin de la formulation. Après re-suspension du gel, les distributions de taille mesurées des NCLs ne sont pas modifiées par rapport aux NCLs sans agent de réticulation.

V.3. Tensiométrie de goutte

V.3.1. Méthode

Les influences des 3 molécules d'intérêt : Cyt-C14, Cyt-C16 et Cyt-C18:1, sur la tension de surface de l'interface d'une goutte d'huile (Labrafac) dans de l'eau ont été comparées grâce à un tensiomètre à goutte (Tracker Teclis, Longessaigne, France). Pour cela, les différentes cytidines modifiées ont été solubilisées dans le Labrafac à des concentrations allant de 0 à 6 mg.g⁻¹. Les solutions obtenues sont ensuite placées dans des micro-seringues Exmire (Prolabo, Paris, France), puis insérées dans le tensiomètre à goutte. Une goutte montante de 5 µL de Labrafac est formée à l'intérieur d'une cuve en verre (Hellma, Paris, France) contenant de l'eau dé-ionisée. Le mouvement du piston de la seringue est actionné par un moteur, contrôlé par ordinateur, afin de maintenir le volume et la surface de la goutte constants tout au long de l'analyse. La forme de la goutte est observée au moyen d'une caméra vidéo, reliée au logiciel, qui permet d'obtenir une image numérique.

Une forme de l'équation de Young-Laplace est utilisée pour décrire l'équilibre des forces qui s'applique sur la goutte de Labrafac. La densité du Labrafac (0,945) comparée à celle de l'eau (1) permet à la goutte montante de s'allonger (jusqu'à perler et remonter), tandis qu'en parallèle la pression de Laplace s'oppose à cette déformation et maintient la goutte sous une forme sphérique. Ainsi, les valeurs connues de la densité et le rayon mesuré de la goutte, permettent de calculer la valeur de tension de surface de l'interface Labrafac/eau. Le logiciel enregistre en temps réel (une mesure toutes les 5 secondes) les variations de volume et de surface de la goutte. Ensuite, grâce à l'équation de Laplace, la tension de surface est déduite.

Les molécules amphiphiles solubilisées dans le Labrafac diffusent progressivement du cœur de la goutte vers l'interface pour former une monocouche selon une cinétique d'adsorption. La formation de la monocouche est atteinte expérimentalement lorsque la tension de surface reste stable. Ainsi, toutes les mesures ont été réalisées

sur une période de 24 heures, afin d'être certain que la stabilité de la tension de surface est atteinte. Pour chaque concentration en cytidine modifiée, les analyses ont été répétées trois fois.

V.3.2. Résultats

Les résultats de la variation de tension de surface de l'interface Labrafac/eau en fonction de la concentration en Cyt-C14, Cyt-C16 et Cyt-C18:1 dans le Labrafac sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur obtenue pour la Labrafac pur. Ainsi, les capacités de chaque molécule à abaisser cette valeur de référence ont été comparées (Figure 2.12).

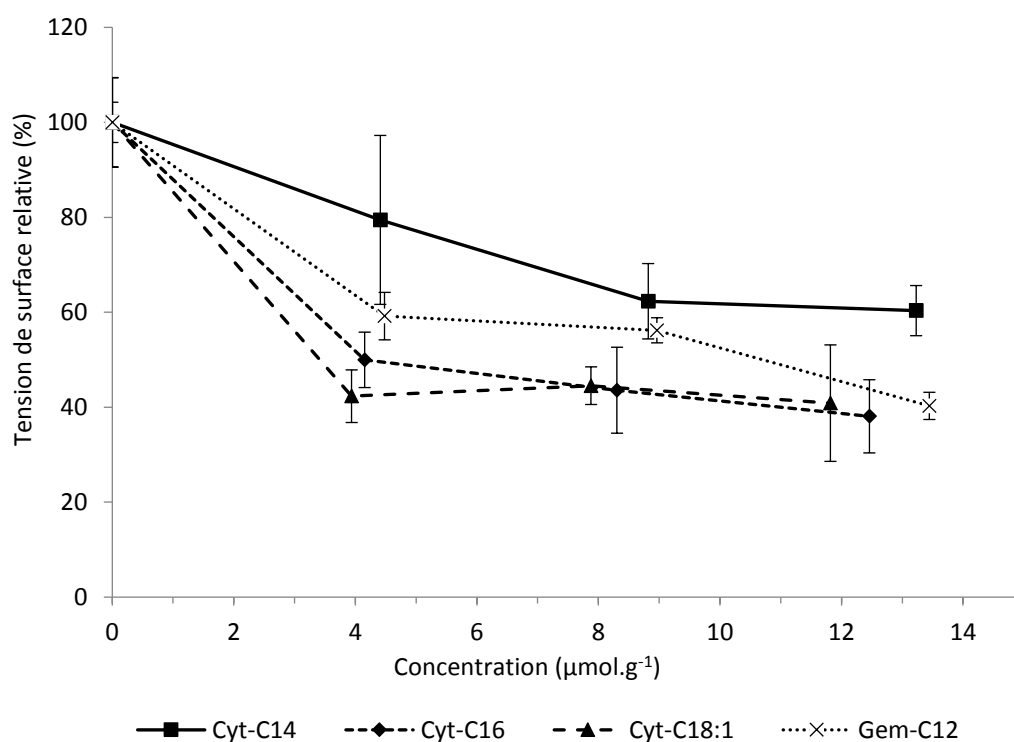


Figure 2.12 : Variation de la tension de surface à l'interface Labrafac/eau d'une goutte de 5 µL de Labrafac en fonction de la concentration de différentes cytidines modifiées : Cyt-C14, Cyt-C16 et Cyt-C18:1 (µmol.g⁻¹ de Labrafac). Les résultats obtenus pour la Gem-C12 (issues de [5]) sont également présentés dans la figure. (n=3 ; moyenne ± écart-type).

Les molécules testées permettent d'abaisser la tension de surface de l'interface de la goutte de Labrafac dans de l'eau. La Cyt-C14 à concentration équivalente semble présenter une moins bonne capacité comparativement aux trois autres molécules. Les molécules de Cyt-C16 et de Cyt-C18:1 présentent des propriétés similaires, en abaissant d'environ 60% la tension de surface initiale pour une concentration de 4 mg.g⁻¹ (m/m_{Labrafac}) (ou respectivement 8,3 et 7,9 µg.g⁻¹). Cette diminution est comparable à celle obtenue par la Gem-C12 à la concentration de 6 mg.g⁻¹ (m/m_{Labrafac}), ou 13,5 µg.g⁻¹ [5]. Cette information est prometteuse, car l'action de la Gem-C12 dans la gélification des NCLs était permise par les propriétés amphiphile de la molécule. Si les molécules nouvellement développées présentent des propriétés amphiphiles équivalentes, nous pouvons en espérer une action de réticulation.

Afin de distinguer un candidat entre la Cyt-C16 et la Cyt-C18:1, nous avons comparé les rendements de leurs synthèses (tableau 2.7). La Cyt-C18:1 présente un rendement très faible, compris entre 5 et 10%. Bien que prometteuse, cette molécule pourrait s'avérer trop onéreuse à produire. C'est pourquoi, la Cyt-C16 a été retenue comme étant le meilleur candidat et a été utilisée pour le reste des travaux de cette thèse.

V.4. Nanocapsules lipidiques chargées en Cyt-C16

La Cyt-C16 a donc été choisie pour remplacer la Gem-C12. Nous avons ensuite voulu montrer son impact sur les formules de NCLs. Pour cela, 2,5% (m/m_{Labrafac}) de Cyt-C16 ont été ajoutées aux quatre formules précédemment développées (diamètre de 25, 50, 75 et 100 nm).

Dès l'ajout de la trempe (à 50°C), 50 μL de chaque formulation sont prélevés et dilués avant l'initiation de la gélification pour mesurer le Z-average, le PdI et le PZ des NCLs. Les formules gélifient ensuite rapidement.

Tableau 2.8 : Comparaison de la distribution de taille (Z-average et PdI) et des valeurs de PZ des NCLs, en présence ou non de 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) (moyenne \pm écart-type).

	2,5% de Cyt-C16				0% de Cyt-C16			
	25 nm	50 nm	75 nm	100 nm	25 nm	50 nm	75 nm	100 nm
Z-average (nm)	25 \pm <1	51 \pm 3	71 \pm 10	88 \pm 6	25 \pm <1	56 \pm 2	76 \pm 2	107 \pm 4
PdI	0,04 \pm	0,06 \pm	0,06 \pm	0,08 \pm	0,08 \pm	0,06 \pm	0,07 \pm	0,09 \pm
	0,01	0,04	0,01	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02
PZ (mV)	- 2 \pm 1	- 4 \pm 2	- 4 \pm 2	-3 \pm 2	-2 \pm 2	-4 \pm 2	-3 \pm 1	-4 \pm 1
Répétitions (n=)	3	12	3	12	7	7	7	7

L'ajout de la Cyt-C16 dans les formules n'affecte pas la polydispersité des objets : les valeurs de PdI des quatre formules sont toujours inférieures à 0,1. Par ailleurs, les valeurs de Z-average sont légèrement diminuées par rapport aux formules sans Cyt-C16. Cette diminution peut s'expliquer par le caractère amphiphile de la Cyt-C16. En effet, celle-ci va venir se placer de façon privilégiée à l'interface Labrafac/eau des NCLs et participer à la stabilisation de ces objets. D'autant plus que les travaux de Heurtault *et al.*, ainsi que notre propre plan de mélange ont montré que plus la quantité de tensioactif est importante et plus la taille des NCLs obtenues est réduite [10]. Enfin, la charge de surface des NCLs semble rester inchangée, elle est proche de la neutralité, les valeurs de PZ étant légèrement négatives (Tableau 2.8).

D'un point de vue macroscopique, les formulations avec de la Cyt-C16 ont l'apparence d'un gel très épais et légèrement cireux (Figure 2.13).

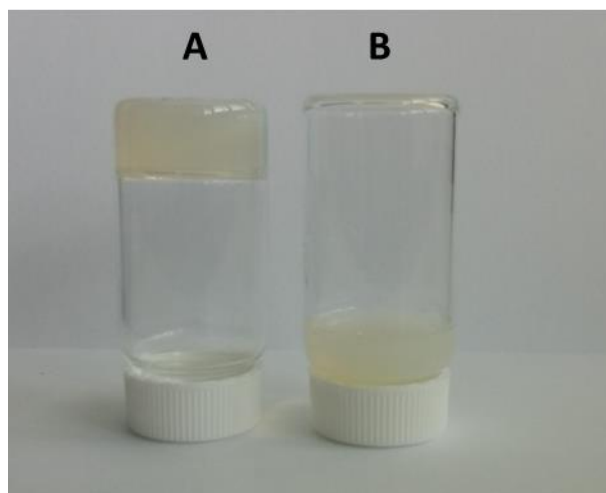


Figure 2.13 : Photographie d'un hydrogel de NCLs (diamètre de 50 nm), réticulé avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) (A) et d'une suspension de NCLs (diamètre de 50 nm) (B).

Les gels formés avec des tailles plus élevées de NCLs (diamètres de 75 et 100 nm) semblent plus épais, tandis que les formulations utilisant des NCLs de diamètre 25 nm ressemblent davantage à des solutions liquides très visqueuses.

Toutes les formules ne contenant pas de Cyt-C16, quel que soit le diamètre des NCLs, sont liquides. Ces solutions présentent une couleur bleutée-orangée, caractéristique de l'effet Tyndall qui signe la présence d'objets de taille nanométrique. Lorsque les hydrogels sont fortement dilués, ils deviennent liquides et prennent le même aspect que les suspensions de NCLs sans Cyt-C16.

V.5. Dosage de la Cyt-C16 dans les formulations

La quantité de Cyt-C16 présente dans les hydrogels de NCLs a été dosée. Pour ce faire, une méthode de dosage par LC-MS/MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) a été développée.

V.5.1. Méthode de dosage en LC-MS/MS

La méthode LC-MS/MS combine une partie chromatographie qui sépare les molécules entre elles et une seconde partie de spectrométrie de masse qui les détecte et les quantifie.

La partie chromatographie a été réalisée grâce à un appareil Alliance 295 (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) équipé d'une colonne Zorbax – Eclipse XDB-C18, 3,5 μm , 4,6 \times 150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis). La colonne est maintenue à 25°C et l'élution est réalisée en condition isocratique. La phase mobile est composée d'un mélange de méthanol et d'acide formique (0,1% v/v) dont le débit est fixé à 0,8 mL.min⁻¹. Le volume d'injection est fixé à 10 μL .

La totalité des produits élués sont dirigés vers un spectromètre de masse quadripolaire haute performance Quattro Micro® (Waters Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les analyses spectrales de masse ont été effectuées en mode ion positif. Les paramètres de réglage ont été optimisés individuellement pour la Cyt-C16 afin d'obtenir la meilleure spécificité et un rapport signal sur bruit optimal. Les transitions spectrales de masse étudiées sont 482 > 112 et 482 > 350.

Pour la calibration, une première gamme étalon de Cyt-C16 dans du méthanol a été réalisée entre 1,25 et 200 ng.mL⁻¹. Pour observer l'effet des composants des NCLs, des NCLs (sans Cyt-C16) ont été ajoutées dans une seconde gamme étalon, similaire en concentration de Cyt-C16.

V.5.2. Préparation des échantillons

Les quantités de Cyt-C16 présentes dans les hydrogels de NCLs de diamètre 50 et 100 nm, formulés avec 1 et 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) ont été dosées.

Un volume de 50 μL de chaque hydrogel a été dilué au 1:4000 (v/v) avec de l'eau dé-ionisée, ce qui permet leur complète re-suspension. Puis 100 μL de la suspension ont été prélevés et additionnés de 900 μL de méthanol. La solution a ensuite été filtrée (0,22 μm) avant son dosage.

La Cyt-C16 n'est pas stable dans le méthanol. Les échantillons sont conservés à 8°C dans l'appareil et tous les dosages sont réalisés dans les 12 h suivant leur préparation.

V.5.3. Résultats des dosages

En premier lieu, l'ajout de NCLs aux solutions de Cyt-C16 n'a pas modifié la courbe étalon comparativement à celle obtenue avec la Cyt-C16 seule. Son temps de rétention lors de l'élution chromatographique est resté le même (4,5 min) et les aires des pics sont similaires.

Les résultats des dosages de la Cyt-C16 sont présentés dans le tableau 2.9.

Tableau 2.9 : Concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et pourcentage de Cyt-C16 mesurée en LC-MS/MS ($n=3$; moyenne \pm écart-type).

Diamètre des NCLs	Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})	Concentration théorique	Concentration mesurée	%
50 nm	2,5%	$4,78 \pm 0,08$	$4,88 \pm 0,39$	$102,04 \pm 8,82$
	1%	$1,90 \pm 0,01$	$2,03 \pm 0,11$	$106,57 \pm 5,23$
100 nm	2,5%	$7,68 \pm 0,08$	$7,58 \pm 0,34$	$98,64 \pm 3,36$
	1%	$3,15 \pm 0,04$	$3,03 \pm 0,05$	$96,02 \pm 1,38$

Pour les quatre hydrogels testés, 100% de la quantité initiale de Cyt-C16 ajoutée aux formules ont été retrouvés. En plus de confirmer que la totalité de Cyt-C16 est retrouvée, ce résultat indique que le procédé de formulation ne dégrade pas la molécule. En effet, une modification de la Cyt-C16 (ouverture du cycle ou cassure) aurait entraîné une variation de la masse molaire de la molécule. Les molécules dégradées n'auraient alors plus été dosées comme de la Cyt-C16 en LC-MS/MS.

V.6. Observation en microscopie confocale

Afin de mieux comprendre la façon dont sont organisés les hydrogels, nous avons souhaité obtenir une image de leur structure.

La microscopie électronique en transmission (MET) ou à balayage (MEB) permet les meilleures résolutions possibles à ce jour (<1 nm). La technique du MET permet d'observer l'intérieur d'un objet tandis que la technique du MEB ne permet d'en observer que l'extérieur (en l'absence de cryofracture).

Afin d'obtenir des informations sur la façon dont s'associent les NCLs entre elles, nous devons privilégier la MEB qui permet d'observer les surfaces des objets. Cette technique nécessite la dessiccation des échantillons. En déshydratant les hydrogels, les NCLs ne sont pas conservées intactes (variation de la distribution de taille) ce qui enlève tout intérêt à l'utilisation de cette technique.

Malgré la résolution plus faible de la microscopie confocale (quelques centaines de nanomètre), nous avons essayé d'observer nos hydrogels avec cette technique. Pour cela, deux formulations de NCLs de diamètre 50 et 100 nm ont été formulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) et 0,1% d'une molécule fluorescente : DiO (m/m_{Labrafac}). Le DiO présente des longueurs d'onde d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) de 485 nm et 518 nm, respectivement. Cette molécule a des propriétés amphiphiles et s'intercale dans la coque des NCLs. Ainsi, le DiO nous permet de marquer de façon spécifique les NCLs, sans aucun risque de fuite dans la phase aqueuse [12,13]. Afin de pouvoir comparer la structure des hydrogels, deux formulations contrôles ont été réalisées. Celles-ci correspondent aux suspensions de NCLs de mêmes diamètres (50 et 100 nm) sans utilisation de Cyt-C16 et contenant la même concentration de DiO.

Les différentes formules obtenues sont simplement déposées sur des lamelles en verre (24x36 mm), elles-mêmes directement posées sur l'objectif du microscope. Le microscope confocal utilisé est un modèle Leica TSC SP8 (LEICA, Mannheim, Allemagne). Les échantillons sont observés à fort grossissement avec un objectif x63 (à immersion d'huile) ainsi qu'un zoom supplémentaire (x3). Afin d'exciter le fluorochrome, le laser (Argon) est utilisé avec une longueur d'onde de 488 nm. Enfin, la fluorescence émise est analysée entre 492 et 600 nm grâce à un détecteur hybride.

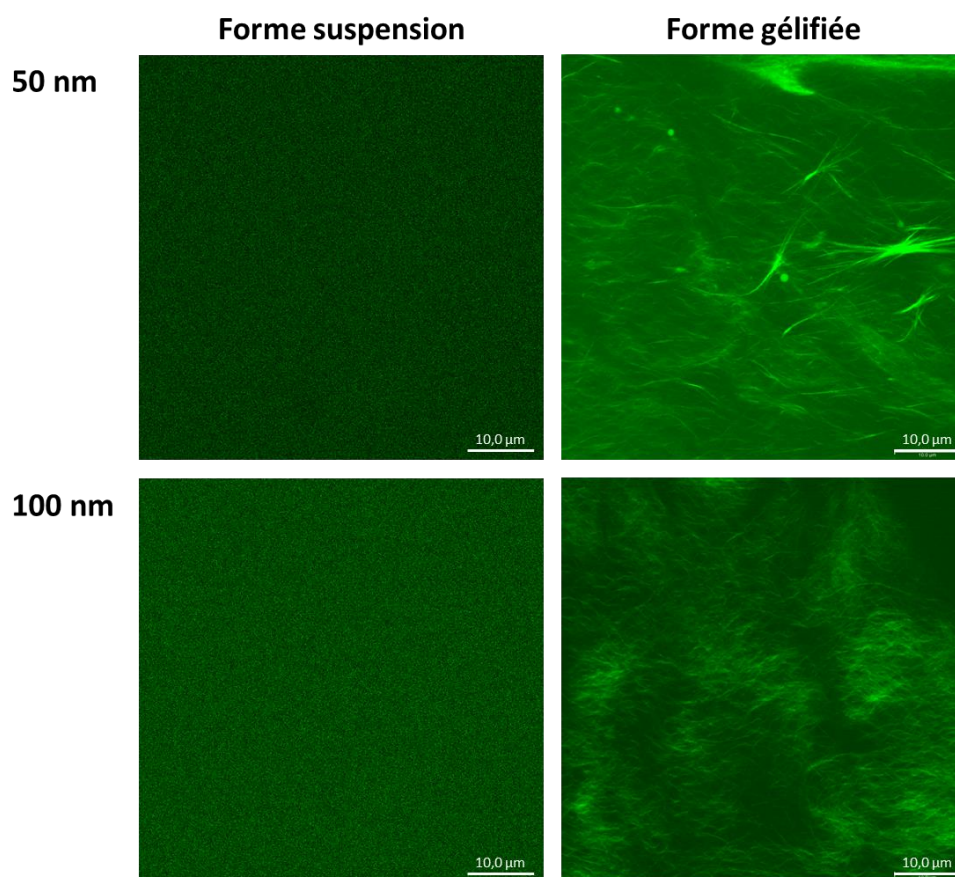


Figure 2.14 : Images de microscopie confocale de NCLs formulées avec du DiO (0,1% m/m_{Labrafac}). NCLs de diamètre 50 et 100 nm, réticulées ou non avec 2,5% de Cyt-C16 à la concentration de 410,2 et 503,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Les NCLs ne contenant pas de Cyt-C16 se présentent sous la forme d'une suspension. Chaque objet est indépendant des autres et peut circuler librement. En microscopie confocale, les NCLs sont trop petites pour que l'on puisse les distinguer, leur diamètre est inférieur à la limite de résolution de l'appareil. Sur les images, seul un fond vert peut être observé (Figure 2.14). Il témoigne de la présence du DiO dans les NCLs, mais n'apporte aucune information sur la taille ou la morphologie de ces dernières.

Les NCLs contenant de la Cyt-C16 se présentent sous la forme d'un hydrogel. Sur les images, une multitude de filaments peut être observée (Figure 2.14). Ces filaments résultent de l'association des NCLs entre elles. Ainsi, ces structures organisées sont suffisamment grandes pour être visibles en microscopie confocale. Le diamètre estimé de ces fibres est compris entre 120 et 150 nm.

Les mêmes gels ont été observés avec un système de microscopie confocale de super-résolution (CODIM, BioAxial) dans des conditions similaires. Cette technique nous a permis d'obtenir une mesure plus précise. Le diamètre des fibres composant le gel est compris entre 100 et 120 nm (Figure 2.15).

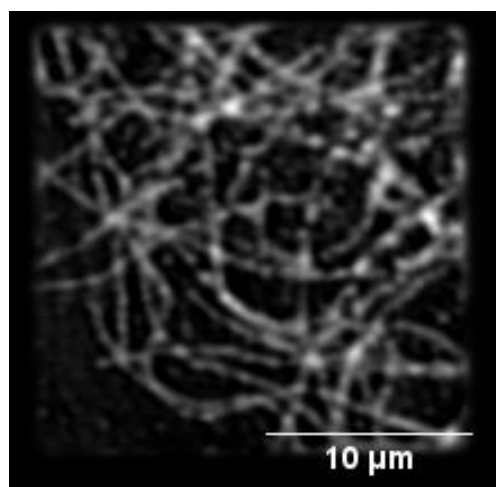


Figure 2.15 : Image de l'hydrogel de NCLs réalisée en microscopie de super-résolution. NCLs de diamètre 100 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 à la concentration de 503,8 mg.mL⁻¹.

Si la microscopie confocale ne nous permet pas d'expliquer précisément comment les NCLs s'associent entre elles, elle nous prouve qu'il existe bien un réseau tridimensionnel à l'intérieur des hydrogels. Ce réseau est formé de nombreuses fibres, dues à l'association des NCLs et cette association semble être complètement aléatoire.

V.7. Etude en rhéologie des hydrogels de NCLs

L'utilisation de la Cyt-C16 permet d'obtenir une forme gélifiée des NCLs. L'impact de différentes variables, telles que le diamètre et la concentration des NCLs ou la quantité de Cyt-C16 sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels a été étudié. Ainsi, les caractéristiques viscoélastiques des hydrogels pourront être modulés pour s'adapter au mieux à l'application visée.

V.7.1. Notions préalables en rhéologie

Lorsqu'un matériau est soumis à des forces, il se déforme et cette déformation dépend de la nature (chimique et physique) du matériau. La rhéologie est la discipline qui étudie la déformation (souvent une déformation de cisaillement ϵ) en fonction de la contrainte (contrainte de cisaillement τ) appliquée sur le matériau.

Tous les instruments de mesure de rhéologie (rhéomètres ou viscosimètres) utilisent une force appliquée parallèlement à la surface de l'échantillon ce qui crée un mouvement laminaire de cisaillement. Lors de ce genre de mouvement, le matériau déformé présente une structure lamellaire sous forme de couches, d'épaisseurs infiniment minces, empilées les unes sur les autres. Ainsi, les couches adjacentes vont glisser les unes par rapport aux autres, sans transfert de matière, pour permettre la déformation du matériau.

Lorsque les propriétés rhéologiques d'un échantillon sont étudiées, deux couches limites parallèles sont définies :

- la couche mobile, solidaire à la partie de la géométrie en mouvement ;
- la couche immobile, au contact direct avec le support (partie fixe) (Figure 2.16).

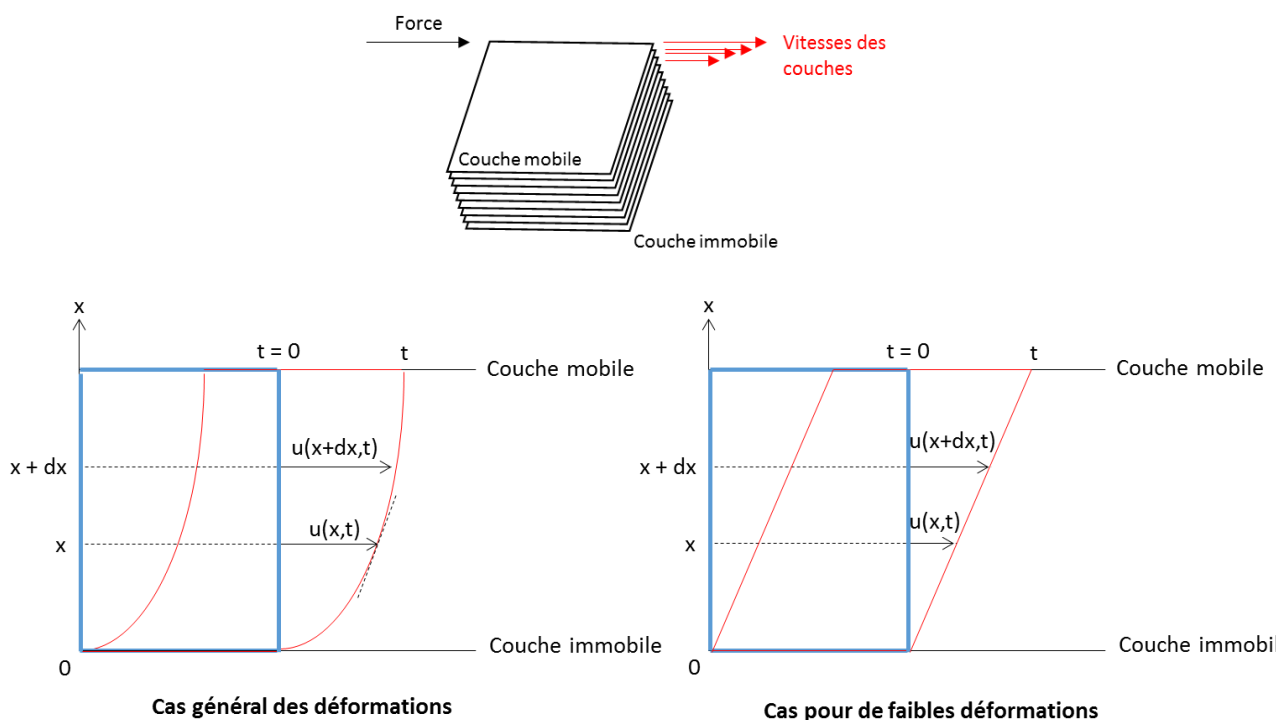


Figure 2.16 : Représentation d'un mouvement laminaire de cisaillement entre deux plans parallèles.

Pour un temps t égal à 0, les couches de matière sont représentées sous la forme schématique d'un empilement régulier de couche (rectangle bleu sur la figure 2.16). Au temps t , après que la couche mobile se soit déplacée (forme rouge sur la figure 2.16), la couche située à l'abscisse x aura parcourue une distance $u(x,t)$, tandis que celle située à l'abscisse $x+dx$ aura parcourue une distance $u(x+dx,t)$. Il n'y a aucune relation de proportionnalité entre la distance de déplacement u et la hauteur du matériau x . La déformation de cisaillement ε , qui est la grandeur cinématique fondamentale en rhéologie, est définie par la relation suivante :

$$\varepsilon(x, t) = \frac{du(x, t)}{dx}$$

Sous l'effet de petites déformations, il y a une relation de proportionnalité entre la distance de déplacement u et la hauteur du matériau x (Figure 2.16). La déformation de cisaillement ε peut être simplifiée par la relation suivante :

$$\varepsilon(t) = \frac{u(x, t)}{x}$$

Lorsque deux couches adjacentes d'un échantillon se déplacent l'une par rapport à l'autre à des vitesses constantes différentes ($v_1 > v_2$), des forces de frottement apparaissent, correspondant aux forces de cisaillement (Figure 2.17).

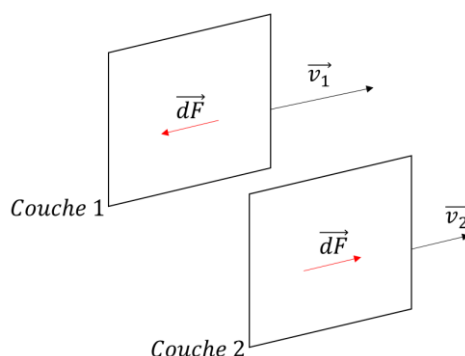


Figure 2.17 : Forces présentes au cours d'un mouvement de cisaillement pour 2 couches adjacentes où $v_1 > v_2$.

La couche 1 exerce sur la couche 2 une force de cisaillement (\vec{dF}) parallèle à son mouvement qui tend à accélérer le mouvement de la couche 2, tandis qu'au contraire la couche 2 exerce sur la couche 1 une force (\vec{dF}) parallèle qui tend à freiner la couche 1. La contrainte de cisaillement (τ) est la grandeur dynamique fondamentale en rhéologie, qui est définie comme une force appliquée par unité de surface (surface de la couche) :

$$\tau = \frac{dF}{dS}$$

où dF est la force de cisaillement et dS est une unité de surface.

La relation entre la contrainte de cisaillement et la déformation de cisaillement peut être établie grâce à l'équation rhéologique d'état du matériau :

$$\varepsilon = f(\tau)$$

Cette équation est unique à chaque substance, elle dépend de sa nature (chimique), de ses propriétés (physique), ainsi que de la température et de la pression.

Deux types de matériau peuvent être considérés. Le premier est un liquide « parfait » ou fluide visqueux newtonien. Le liquide s'écoule durant tout le temps où il est soumis à une contrainte de cisaillement et à l'arrêt de ce dernier, le matériau conserve sa déformation qui est perdue ou irréversible. Le second est un solide « parfait » ou solide élastique parfait. Lors d'une déformation de cisaillement, un solide parfait stocke l'énergie jusqu'à arriver à un équilibre de déformation qui dépend de la contrainte de cisaillement appliquée.

Dès l'arrêt de la contrainte de cisaillement, la déformation est restituée totalement, le matériau reprend sa forme initiale. Très peu de matériaux présentent l'un de ces deux types de comportement, la très grande majorité combinent les deux. Pour ces matériaux, nous parlerons de propriétés viscoélastiques, la partie « visqueuse » et la partie « élastique » correspondant respectivement aux propriétés liquide et solide du matériau.

Pour déterminer les propriétés viscoélastiques d'un matériau, l'échantillon est soumis à une contrainte ou une déformation en mode dynamique, de fréquence connue. La sollicitation et sa réponse résultante peuvent être représentées sous la forme de deux ondes sinusoïdales, avec une pulsation ω (Figure 2.18). Afin d'étudier les propriétés viscoélastiques d'un matériau, nous nous intéresserons particulièrement à la fréquence, au déphasage et au rapport d'amplitude entre les deux ondes. Pour un solide élastique parfait, la contrainte résultante est directement en phase avec la déformation de cisaillement imposée. Pour un liquide visqueux newtonien, la

contrainte résultante est déphasée de 90° avec la déformation de cisaillement imposée. Enfin, pour un matériau viscoélastique, la contrainte résultante est déphasée d'un angle compris entre 0 et 90° avec la déformation de cisaillement imposée. Le déphasage δ , mais aussi les amplitudes maximales de déformation ε_0 et de contrainte de cisaillement τ_0 permettront de caractériser la viscoélasticité des matériaux.

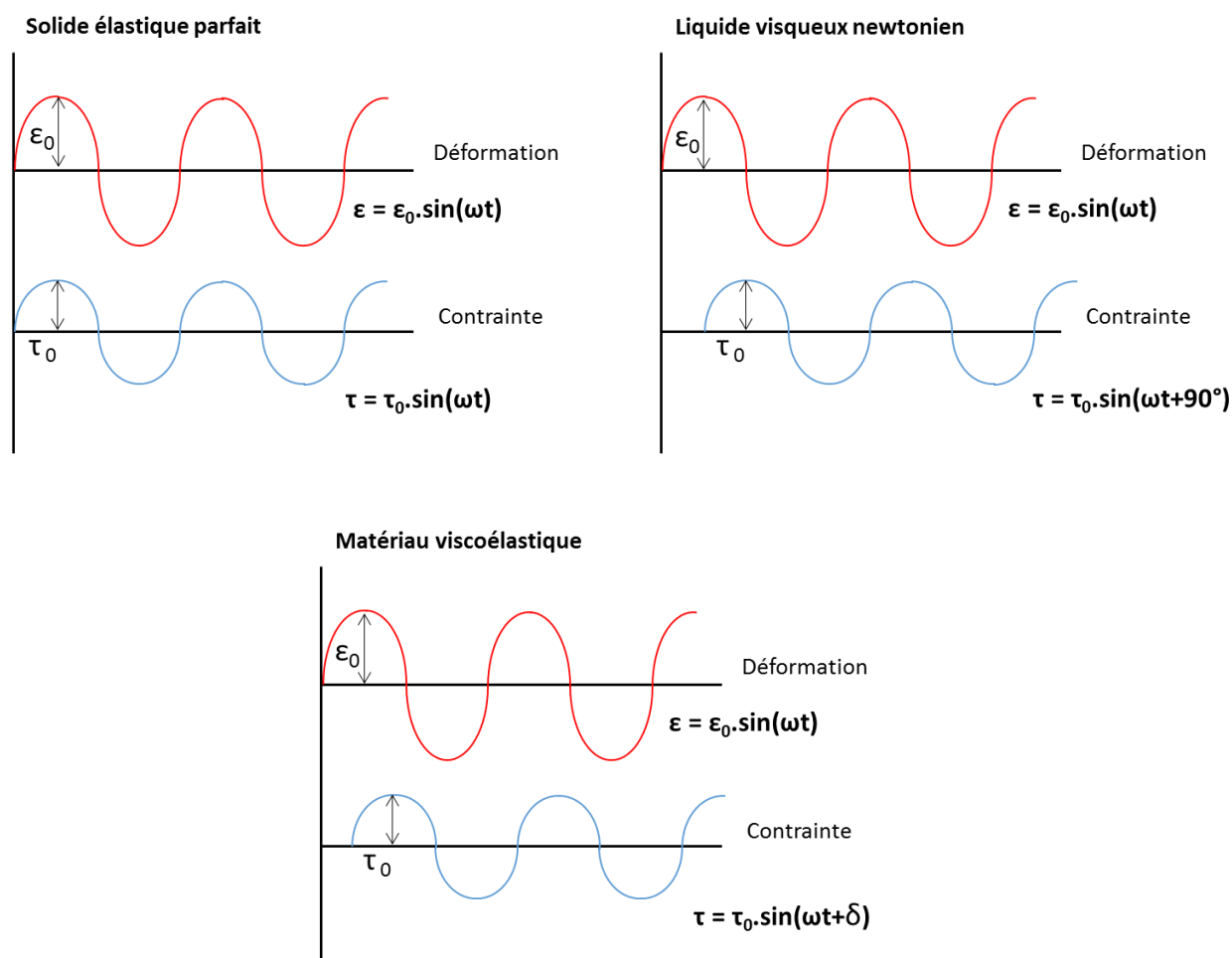


Figure 2.18 : Représentation sinusoïdale des déformations (sollicitations) et des contraintes (réponses) de cisaillement pour un solide élastique parfait, un liquide visqueux newtonien et un matériau viscoélastique.

La contrainte et la déformation sinusoïdale, exprimées en mode complexe, τ^* et ε^* , respectivement, sont liées par l'équation de viscoélasticité suivante :

$$\tau^* = G^* \varepsilon^* \text{ avec } \varepsilon^* = \varepsilon_0 e^{i\omega t} \text{ et } \tau^* = \tau_0 e^{i(\omega t + \delta)} \text{ avec } G^* \text{ le module de rigidité complexe.}$$

Le module de rigidité complexe peut être représenté sur un cercle trigonométrique (Figure 2.19).

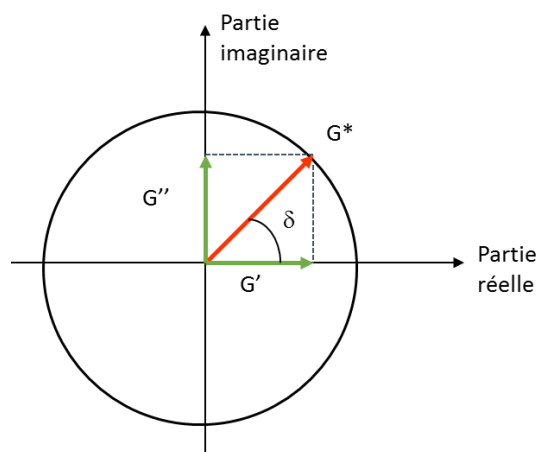


Figure 2.19 : Représentation trigonométrique du module de rigidité complexe (G^*).

Ainsi, G^* peut être décomposé en une partie réelle G' et une partie imaginaire G'' selon : $G^* = G' + i G''$.

G' est le module de conservation, il correspond à la part élastique (solide) du comportement de l'échantillon. G'' est le module de perte qui représente la partie visqueuse (liquide) du comportement du matériau. δ est l'angle de déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement. G' et G'' seront déterminés par le système d'équation suivant :

$$\begin{cases} \sqrt{G'^2 + G''^2} = \frac{\tau_0}{\varepsilon_0} \\ \frac{G''}{G'} = \tan \delta \end{cases}$$

V.7.2. Méthode de mesure

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels obtenus ont été étudiées afin de déterminer l'influence de différents paramètres sur l'hydrogel. Les paramètres étudiés ont été le diamètre des NCLs, la quantité de Cyt-C16 et la concentration en NCLs. Les quatre tailles précédemment développées (diamètres de 25, 50, 75 et 100 nm) ont été comparées. La concentration en Cyt-C16 a été testée à 1 et 2,5% (m/m_{Labrafac}). Enfin, la concentration en NCLs a varié de 12,5 à 410 mg.mL^{-1} .

L'ensemble des mesures de rhéologie a été réalisé grâce à un rhéomètre Kinexus® (Malvern Instruments S.A, Royaume-Uni) avec une géométrie de type cône-plan (diamètre 40 mm et angle 2°). L'échantillon a été déposé sur le plateau fixe du rhéomètre et la partie mobile (cône) est venue se placer au contact de l'échantillon.

Les échantillons ont été soumis à un balayage en amplitude de déformation de cisaillement allant de 0,1 à 10%, avec une fréquence d'oscillation constante de 1 Hz à la température de 25°C. Ce premier essai permet de déterminer le régime linéaire du comportement rhéologique. Pour ce faire, les réponses de contrainte de cisaillement doivent varier de manière proportionnelle avec les sollicitations de déformation de cisaillement.

Pour déterminer les propriétés viscoélastiques (modules G' et G''), un balayage en fréquence d'oscillation de 0,1 à 10 Hz a été réalisé, avec une amplitude de déformation de cisaillement dans le régime linéaire (0,1%) à la température de 25°C.

Enfin, la température de transition de phase solide-liquide de certains échantillons a été déterminée afin de montrer l'existence d'une température de transition gel-solution. Pour cela, l'échantillon était soumis à une amplitude de déformation de cisaillement constante (0,01%) et à une fréquence d'oscillation également constante (1 Hz) tandis que la température variait de 25 à 70°C avec une cinétique de chauffage de 2°C.min⁻¹. L'ensemble de ces expériences a été répété au moins trois fois.

V.7.3. Propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs

Tout d'abord, nous avons étudié le comportement des échantillons lorsqu'ils sont soumis à une amplitude de déformation de cisaillement croissante avec une fréquence d'oscillation constante de 1 Hz. A titre d'exemple, le rhéogramme obtenu pour l'hydrogel composé de NCLs de diamètre 50 nm à la concentration maximale (410,2 mg.mL⁻¹) et contenant 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) est présenté dans la Figure 2.20.

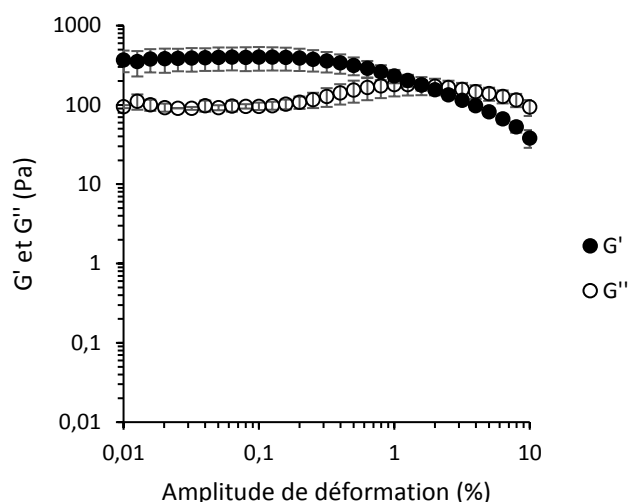


Figure 2.20 : Modules élastique G' et visqueux G'' d'un hydrogel de NCLs. Balayage en amplitude de déformation de cisaillement de 0,01 à 10%, fréquence d'oscillation fixe à 1 Hz. NCLs de diamètre 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹. (n=3, moyenne \pm écart-type).

Nous pouvons observer qu'en-dessous de la valeur critique de 0,6% d'amplitude de déformation de cisaillement, les modules élastique et visqueux du gel restent constants. Sur ce domaine, G' reste supérieur à G'' ce qui est caractéristique d'un gel. Au-delà de 0,6%, les deux courbes se croisent, puis leurs valeurs chutent progressivement. Cette mesure a été répétée sur tous les hydrogels préparés et les résultats sont similaires. Le régime linéaire des propriétés viscoélastiques des matériaux étudiés se situe en-dessous d'une amplitude de déformation de cisaillement de 0,6%.

Pour la suite des essais, toutes les mesures de propriétés viscoélastiques seront réalisées avec une valeur d'amplitude de déformation de cisaillement égale à 0,1% et pour une variation de fréquence d'oscillation allant de 0,1 à 10 Hz. Toujours à titre d'exemple le rhéogramme obtenu pour le même hydrogel est présenté dans la figure 2.21.

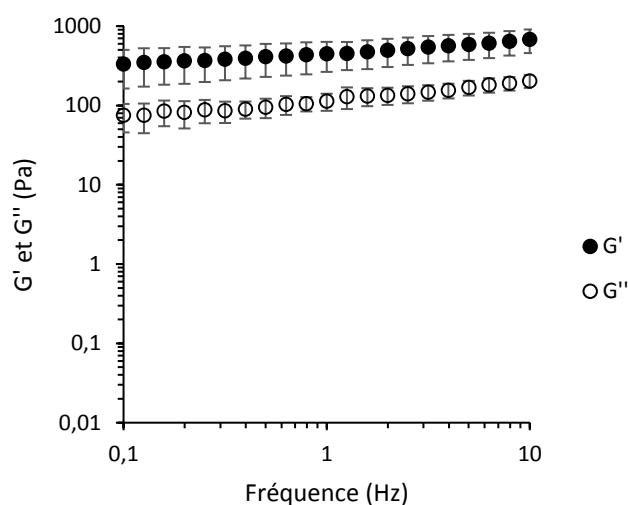


Figure 2.21 : Modules élastique G' et visqueux G'' d'un hydrogel de NCLs. Balayage en fréquence d'oscillation de 0,1 à 10 Hz, amplitude de déformation de cisaillement fixe à 0,1%. NCLs de diamètre 50 nm réticulé avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) à la concentration de 410,2 $mg.mL^{-1}$. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

Le rhéogramme obtenu est typique d'un matériau gélifié. La valeur de G' est toujours supérieure à celle de G'' et elles restent relativement constantes quelle que soit la fréquence d'oscillation. Le rapport G''/G' est toujours compris entre 0,2 et 0,33, ce qui correspond à de faibles déphasages (11 à 18°) entre la sollicitation de déformation et la réponse de contrainte de cisaillement. Ces valeurs témoignent de bonnes propriétés élastiques de la part du matériau.

Lorsque les NCLs ne contiennent pas de Cyt-C16, le matériau obtenu ne gélifie pas et ne présente pas de caractère élastique. Les modules viscoélastiques obtenus présentent des valeurs très faibles en comparaison avec ceux obtenus pour les hydrogels de NCLs (Figure 2.22). L'amplitude de déformation utilisée pour la mesure n'est pas adaptée aux formes suspension. Elle ne donne pas une réponse de contrainte de cisaillement fiable, car les valeurs sont trop faibles et inférieures à la limite de détection du capteur de couple du rhéomètre. Néanmoins, pour pouvoir comparer les 2 matériaux (hydrogel et suspension), nous avons privilégié les paramètres utilisés pour analyser les hydrogels qui permettent d'obtenir des valeurs de contraintes de cisaillement fiables. Ainsi, concernant les NCLs en suspension, il est normal de retrouver des profils de variation de G' et G'' très bruités avec des valeurs de modules faibles. Ils ne serviront qu'à titre de comparaison avec les hydrogels. Pour avoir des profils parfaitement exploitables des suspensions, il aurait fallu travailler à des amplitudes de déformation plus importantes, mais situées en dehors du régime linéaire des hydrogels.

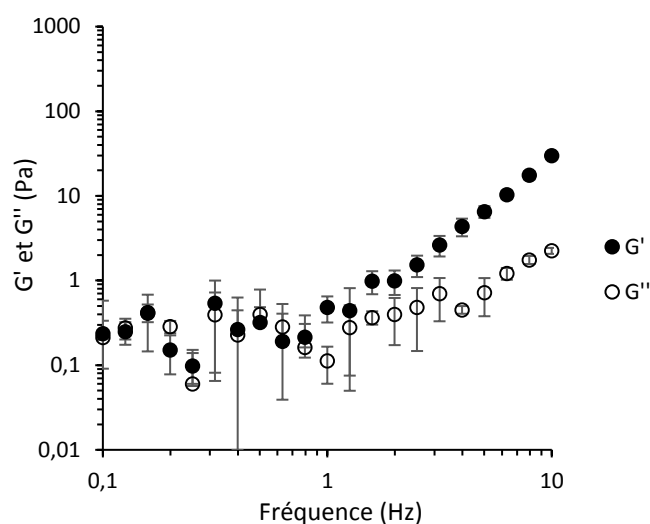


Figure 2.22 : Modules élastique G' et visqueux G'' d'une suspension de NCLs Balayage en fréquence d'oscillation de 0,1 et 10 Hz, amplitude de déformation de cisaillement fixe à 0,1%. NCLs de diamètre 50 nm (sans Cyt-C16) à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹. (n=3, moyenne \pm écart-type).

V.7.3.1. Influence de la taille des NCLs

Le premier paramètre étudié est l'impact de la taille des NCLs sur la formation des hydrogels. Dans la figure 2.23, sont comparés les résultats obtenus pour les quatre diamètres de NCLs avec les mêmes concentrations en Cyt-C16 (2,5% $m/m_{Labrafac}$) et en NCLs (300 mg.mL⁻¹).

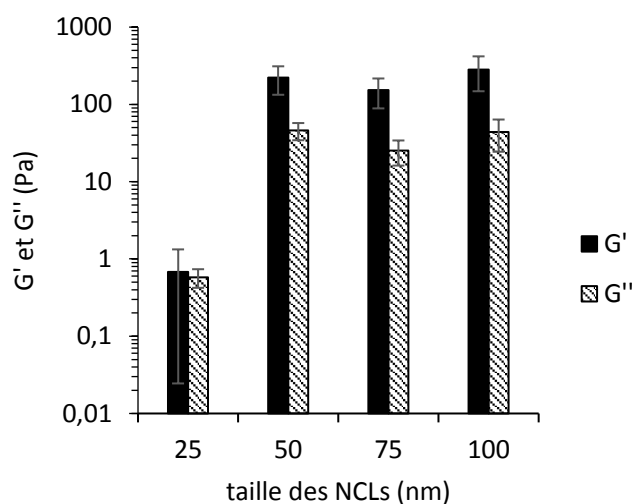


Figure 2.23 : Modules élastiques G' et visqueux G'' des hydrogels en fonction de la taille des NCLs : diamètres de 25, 50, 75 et 100 nm. Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. Concentration en NCLs de 300 mg.mL⁻¹, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$). (n=3, moyenne \pm écart-type).

Les NCLs de diamètres 50, 75 et 100 nm donnent des hydrogels aux propriétés similaires. Les valeurs de leurs modules G' et G'' sont proches de 200 et 40 Pa, respectivement. En comparaison, les NCLs de diamètre 25 nm

ont des valeurs G' et G'' beaucoup plus faibles (respectivement 300 et 60 fois plus petites), ce qui confirme l'observation macroscopique d'une forme non gélifiée pouvant s'écouler.

V.7.3.2. Influence de la concentration en Cyt-C16

L'influence de la concentration en Cyt-C16 a ensuite été observée. La figure 2.24 compare trois hydrogels contenant différentes concentrations en Cyt-C16 pour des NCLs de diamètre 50 nm à la concentration de 300 mg.mL⁻¹.

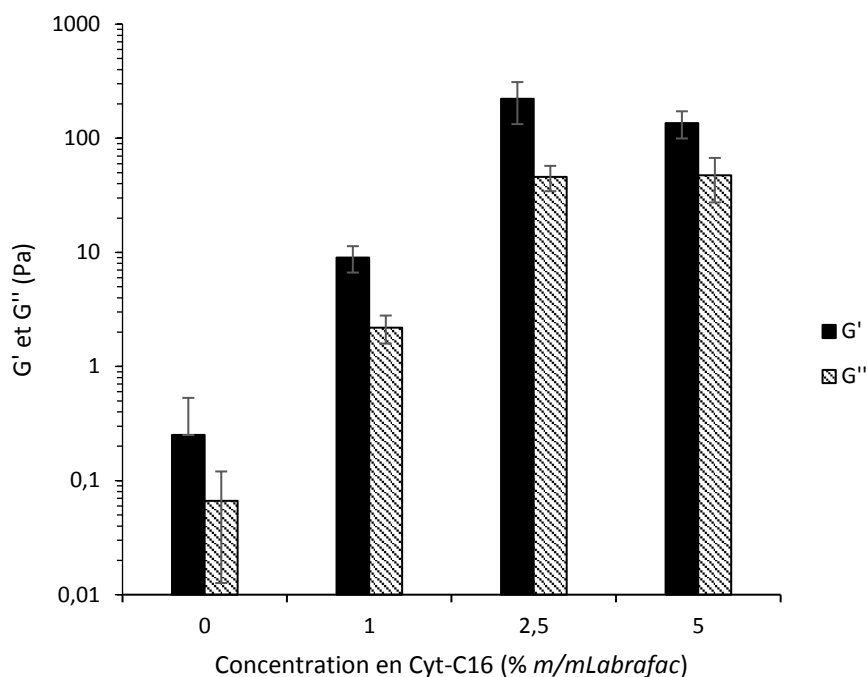


Figure 2.24 : Modules élastiques G' et visqueux G'' des hydrogels en fonction de la concentration en Cyt-C16 (0, 1, 2,5 et 5% $m/m_{Labrafac}$). Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. NCLs de diamètre 50 nm à la concentration de 300 mg.mL⁻¹. (n=3, moyenne \pm écart-type).

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs sont directement liées à la concentration en Cyt-C16 utilisée lors des formulations. Plus celle-ci sera élevée et plus les valeurs des modules G' et G'' seront importantes (gels très « rigides »). L'utilisation de 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) permet d'obtenir des valeurs de modules G' et G'' 20 fois supérieures à celles obtenues avec 1% ($m/m_{Labrafac}$). Les rapports G''/G' sont toujours compris entre 0,2 et 0,33 quelle que soit la concentration en Cyt-C16, ce qui prouve que les propriétés élastiques du matériau sont conservées.

V.7.3.3. Influence de la concentration en NCLs

La variable qui a ensuite été modifiée est la concentration en NCLs. La figure 2.25 présente les propriétés viscoélastiques des hydrogels en fonction de la concentration en NCLs pour chaque diamètre de NCLs.

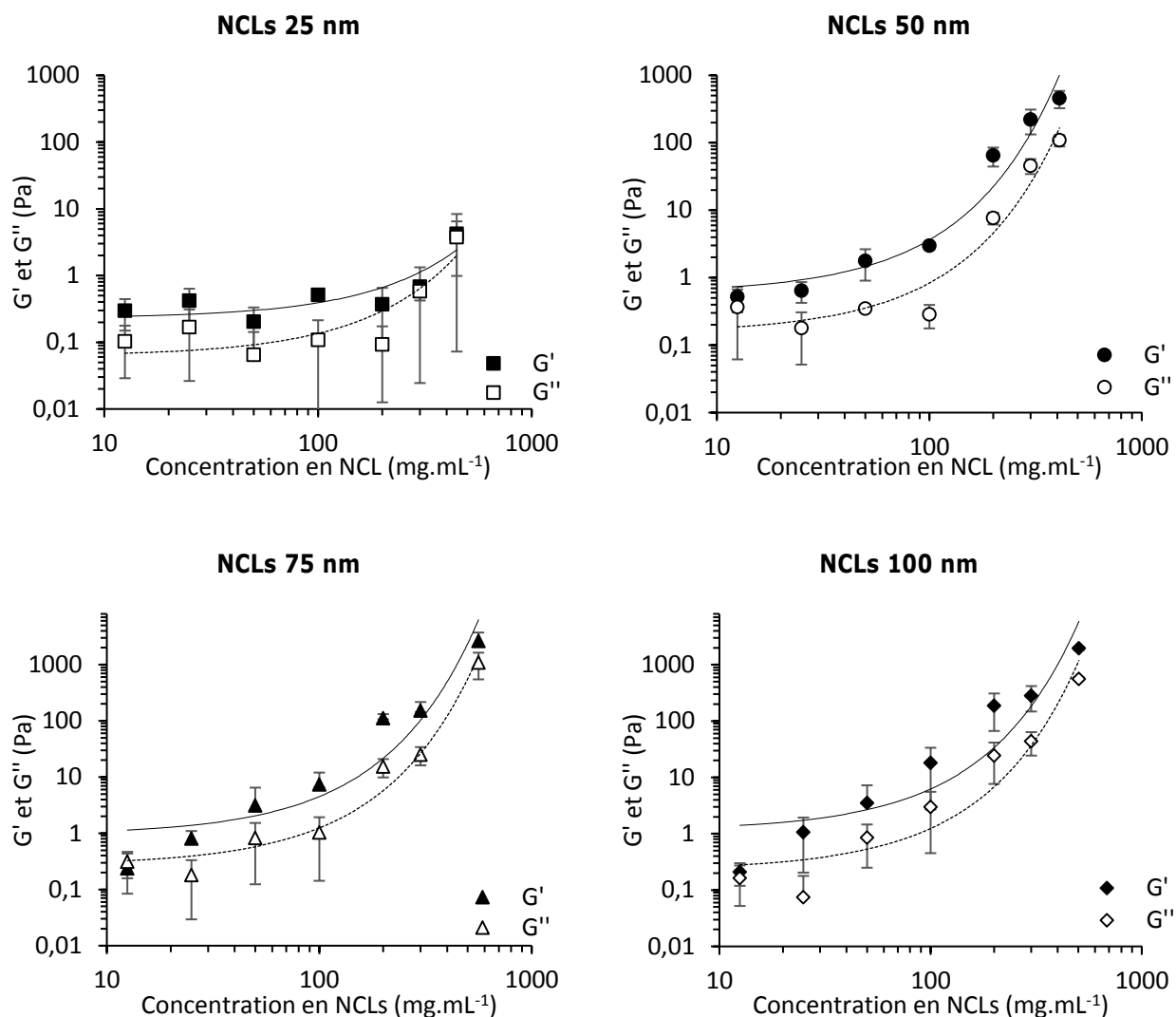


Figure 2.25 : Modules élastiques G' (symboles pleins et lignes continues) et visqueux G'' (symboles vides et lignes pointillées) en fonction de la concentration en NCLs. Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. NCLs de diamètres 25 (■□), 50 (●○), 75 (▲△) et 100 nm (◆◇), avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}). ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

Comme évoqué précédemment, les NCLs de diamètre 25 nm ne permettent pas la formation d'un hydrogel aussi « rigide » que les autres. A la plus forte concentration en NCLs étudiée, les valeurs des modules G' et G'' sont faibles (respectivement 4,2 et 3,7 Pa), ce qui correspond à un hydrogel macroscopique très peu « rigide ». Dès la première dilution, la formule devient liquide, les valeurs de G' et G'' rejoignent les valeurs obtenues pour des NCLs sans Cyt-C16. Etant donné l'absence de gélification satisfaisante, les propriétés viscoélastiques des NCLs de diamètre 25 nm n'ont été testées que pour la charge de 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}). Ces tailles de NCLs ne seront plus utilisées pour la suite de ces travaux.

Pour les autres diamètres, aux concentrations maximales de NCLs, des hydrogels « rigides » avec des propriétés similaires sont obtenus. Lorsque les hydrogels sont dilués, ils vont progressivement se fluidifier. En-dessous d'une concentration de 50 mg.mL^{-1} de NCLs, les valeurs de G' et G'' rejoignent les valeurs des NCLs sans Cyt-C16.

La caractérisation des propriétés viscoélastiques des dilutions d'hydrogels contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) (diamètres de 50, 75 et 100 nm) a également été réalisée (résultats non présentés). Nous observons le même phénomène de diminution des modules élastiques G' et visqueux G'' avec la dilution progressive des matériaux. Cependant les valeurs de départ étant plus faibles (G' et G'' égales à 20 et 10 Pa), un facteur de dilution plus faible permet d'obtenir les formes suspensions de NCLs (liquide en rhéologie). En effet, la forme suspension est obtenue pour une concentration en NCLs en-dessous de 200 mg.mL^{-1} .

Nous retiendrons donc comme valeur critique la concentration de 200 mg.mL^{-1} de NCLs, qui en présence de Cyt-C16 assurera l'obtention d'une forme hydrogel.

V.7.3.4. Synthèse de l'influence des trois paramètres testés

Les principaux résultats de rhéologie obtenus pour les hydrogels de NCLs avec l'agent de réticulation Cyt-C16 sont synthétisés dans la figure 2.26.

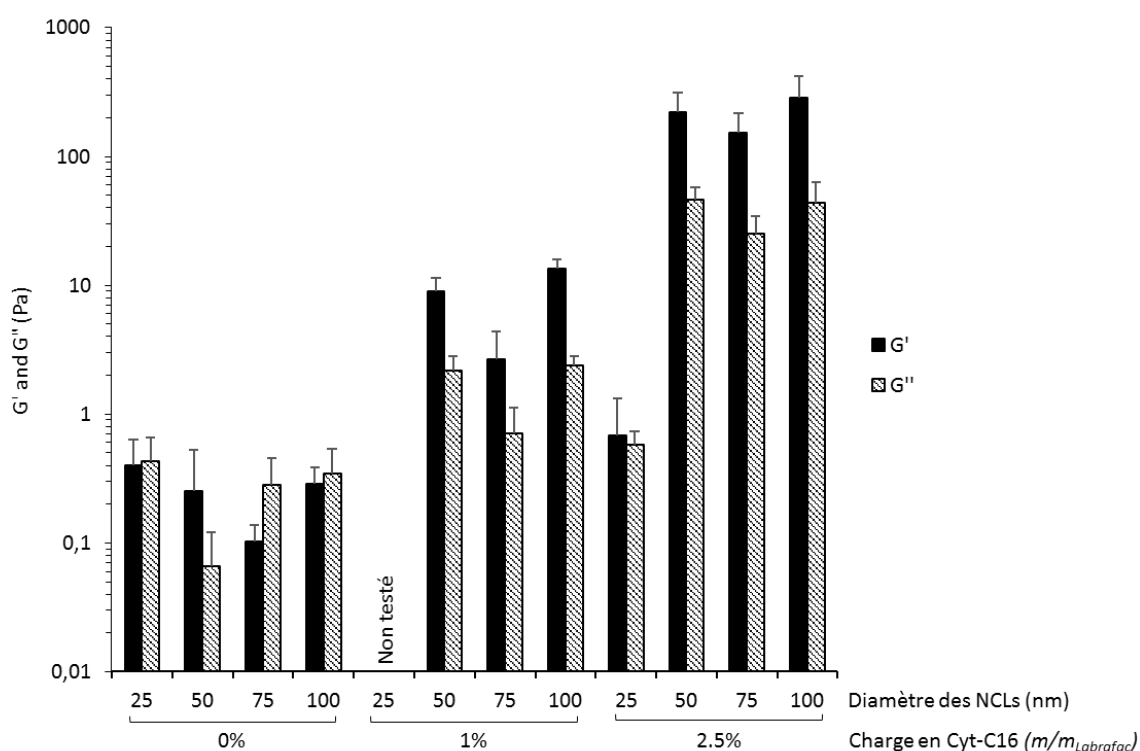


Figure 2.26 : Modules élastiques G' et visqueux G'' de tous les hydrogels testés. Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. Concentration maximale en NCLs, de diamètres 25, 50, 75 et 100 nm, avec 0, 1 ou 2,5% (m/m_{Labrafac}) de Cyt-C16. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

V.7.3.5. Influence de la température

Enfin, l'influence de la température sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels a été étudiée. Ainsi, une température de transition de phase solide-liquide a pu être déterminée, représentant le passage de l'état hydrogel à un état visqueux. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.10.

Tableau 2.10 : Température de transition solide-liquide des hydrogels étudiés. (n=3, moyenne \pm écart-type).

	NCL 50 nm	NCL 75 nm	NCL 100 nm
Concentration en NCLs (mg.mL ⁻¹)	410,2	516,6	503,8
1% Cyt-C16 (<i>m/m_{Labrafac}</i>)	38°C \pm 6	> 70°C	> 70°C
2,5% Cyt-C16 (<i>m/m_{Labrafac}</i>)	51°C \pm 6	> 70°C	> 70°C

Le domaine de température testé va de 25 à 70°C. Nous avons fait le choix de ne pas dépasser cette température, car au-delà, les nanocapsules risquent d'être dégradées de façon irrémédiable. La taille des nanocapsules a un impact sur la température de transition de phases. En effet, pour les NCLs de diamètres 75 et 100 nm, la température maximale de 70°C n'a pas permis d'observer de transition de phases. Tandis que pour les NCLs de diamètre 50 nm, les températures de transition sont de 38 et 51°C pour des concentrations respectivement de 1 et 2,5% de Cyt-C16 (*m/m_{Labrafac}*).

Pour tous les hydrogels testés, la température de transition est supérieure à 37°C, ce qui en fait de très bons candidats pour une utilisation comme système de libération de médicament. En effet, l'état de gel sera conservé malgré la température corporelle.

L'existence d'une température de transition de phases solide-liquide semble corroborer l'hypothèse d'un gel associé par des liaisons hydrogène entre NCLs. En effet, lorsque la température augmente, les liaisons hydrogène ont la possibilité de se rompre. Ainsi, au-delà d'une certaine température, le gel devient un liquide rhéologique, car les liaisons hydrogène ne sont plus suffisamment nombreuses pour assurer son maintien.

VI. Développement d'un organogel

Un organogel est un système semi-solide dans lequel une phase organique est immobilisée au moyen d'un réseau tridimensionnel composé d'agents de réticulation auto-assemblés.

Lors de la formulation des hydrogels de NCLs, la Cyt-C16 est préalablement solubilisée dans un mélange de Labrafac et de Span 80 à 60°C. Après refroidissement, nous avons pu constater que le mélange prend un aspect très visqueux.

Nous avons donc voulu étudier la capacité de la Cyt-C16 à gélifier une huile dans le but de développer un organogel. Pour cela, la molécule est solubilisée dans le Labrafac sous agitation et chauffée à 70°C au bain marie. Après solubilisation, la formule est refroidie à température ambiante puis à 4°C, un gel se forme alors

spontanément. La gélification est certainement permise par un réseau, résultant de l'association des molécules de Cyt-C16 par le biais de liaisons hydrogène.

Plusieurs organogels ont été réalisés en faisant varier la concentration en Cyt-C16 de 0,25 à 9,95% (m/m_{Labrafac}) ce qui correspond à des concentrations de 0,005 à 0,2 mmol.g⁻¹ de Labrafac. Chaque formule a été répétée trois fois. Les propriétés viscoélastiques des organogels obtenus ont ensuite été étudiées avec le même rhéomètre que précédemment, mais en utilisant une géométrie plan-plan de diamètre 20 mm et un entrefer de 800 μm. Environ 250 μL d'organogel sont déposés sur le plateau du rhéomètre dont la température est fixée à 25°C, puis le plan supérieur est placé au contact avec l'échantillon.

Un premier échantillon de chaque concentration est d'abord soumis à un balayage en amplitude de déformation de cisaillement allant de 0,005 à 50% avec une fréquence d'oscillation constante de 1 Hz.

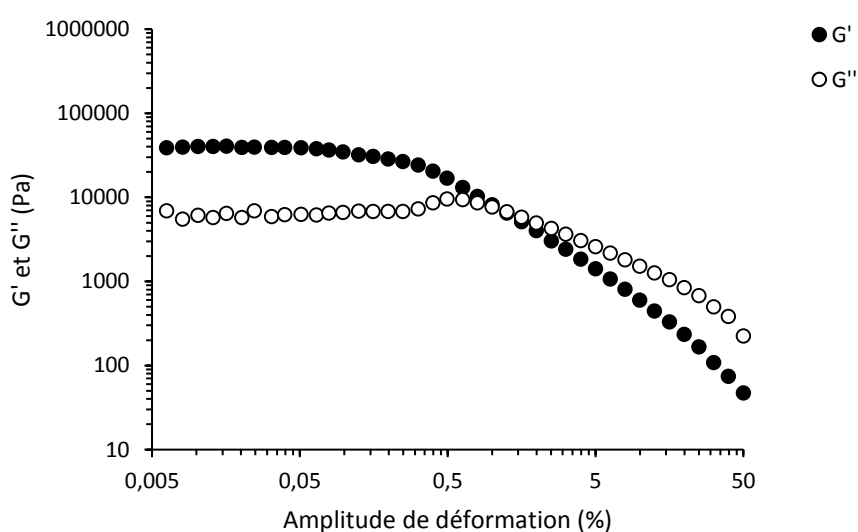


Figure 2.27 : Modules élastiques G' et visqueux G'' d'un organogel contenant 5,6% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}). Balayage en amplitude de déformation de cisaillement de 0,005 à 50% et fréquence d'oscillation fixe à 1 Hz.

Quelle que soit la concentration en Cyt-C16 dans l'organogel, le régime linéaire est limité par des valeurs d'amplitude de déformation de cisaillement inférieures à 0,05%. La Figure 2.27 est donnée en exemple pour une concentration de 5,6% (m/m_{Labrafac}) en Cyt-C16 dans l'organogel.

Les mesures des propriétés viscoélastiques des organogels ont toutes été réalisées avec une amplitude de déformation de 0,01%, en utilisant un balayage en fréquence d'oscillation allant de 0,1 à 10 Hz. La figure 2.28 représente la variation des valeurs des modules élastiques G' et visqueux G'' (à une fréquence d'oscillation de 1 Hz) en fonction de la concentration en Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}).

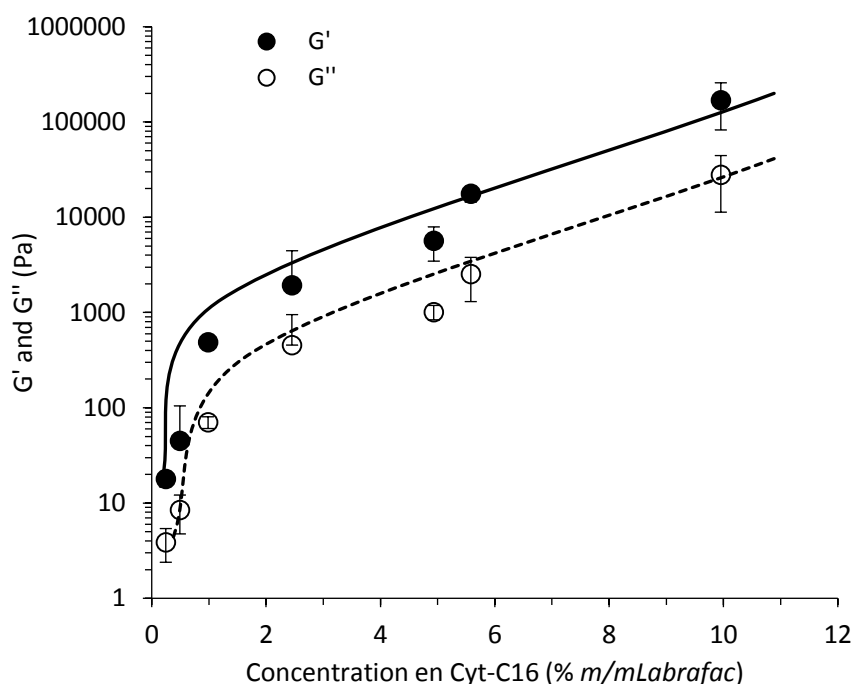


Figure 2.28 : Modules élastiques G' et visqueux G'' des organogels obtenus en fonction de la concentration en Cyt-C16 (% $m/m_{Labrafac}$). Les droites représentent les tendances des modules G' et G'' . Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,01% ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

Les valeurs des modules G' et G'' sont dépendantes de la concentration en Cyt-C16. Plus la quantité d'agent de réticulation présent est importante et plus les gels obtenus présentent des valeurs de modules élevées.

Enfin, la température de transition de phases solide-liquide a été déterminée. Pour cela, les organogels sont soumis à une amplitude de déformation de cisaillement constante de 0,01% et à une fréquence d'oscillation également constante de 1 Hz. La température est, en parallèle, augmentée de 25 à 70°C (cinétique de chauffage de 2°C.min⁻¹). Pour une concentration supérieure ou égale à 1% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$), la température de transition solide-liquide est toujours supérieure à 70°C (résultats non présentés).

Cette nouvelle plateforme organogel est très prometteuse. En effet, nous pouvons ajuster les propriétés viscoélastiques en faisant varier la concentration de Cyt-C16. De plus, nous savons que la température corporelle n'altérera pas la structure du gel.

Pour la suite de ces travaux, nous retiendrons la concentration de 1% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$). Cette concentration permet d'obtenir des propriétés rhéologiques intéressantes (G' et G'' sont égales à respectivement 490 \pm 5 et 71 \pm 10 Pa) tout en limitant la quantité de molécules gélifiantes nécessaires.

VII. Conclusion

La synthèse d'une nouvelle molécule nommée 4-(N)-palmitoyl cytidine (Cyt-C16) a permis le développement de deux nouvelles plateformes gélifiées.

Les hydrogels de NCLs sont des formes qui combinent les propriétés des nanocapsules et celles des hydrogels. Au sein des NCLs, les molécules de Cyt-C16 se placent préférentiellement au niveau de leur coque. Elles interagissent supposément entre-elles par le biais de liaisons hydrogène entre leurs fonctions alcool pour associer les NCLs.

Cette nouvelle molécule reproduit l'action de la Gem-C12. En comparaison, nous obtenons avec 2,5% (m/m_{Labrafac}) de Cyt-C16 des gels aux caractéristiques viscoélastiques équivalentes à celles obtenues avec 5% (m/m_{Labrafac}) de Gem-C12 (Tableau 2.11).

Tableau 2.11 : Comparaison des hydrogels de NCLs obtenus avec de la Cyt-C16 ou de la Gem-C12.

	Cyt-C16	Gem-C12
Concentration en agent de réticulation (% m/m_{Labrafac})	2,5	5
Concentration en agent de réticulation ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ de Labrafac)	5,19	9,85
Z-average des NCLs (nm)	51 \pm 3	55 \pm 2
Concentration en NCLs (mg.mL^{-1})	410	445
G' (Pa)	460 \pm 130	410 \pm 40
G'' (Pa)	110 \pm 20	90 \pm 10
Température de transition ($^{\circ}\text{C}$)	51	28

Cette différence peut s'expliquer par la présence d'une fonction alcool supplémentaire sur le ribose de la cytidine. En effet, elle pourrait participer à la formation de liaison hydrogène et ainsi augmenter la réticulation de l'hydrogel. De plus, cette observation semble confirmer notre hypothèse de formation du réseau tridimensionnel de NCLs par le biais de liaisons hydrogène.

En plus de sa présumé non-toxicité, la molécule de Cyt-C16 permet également de diminuer la quantité nécessaire d'agent de réticulation ce qui contribuera également à limiter la toxicité de la plateforme.

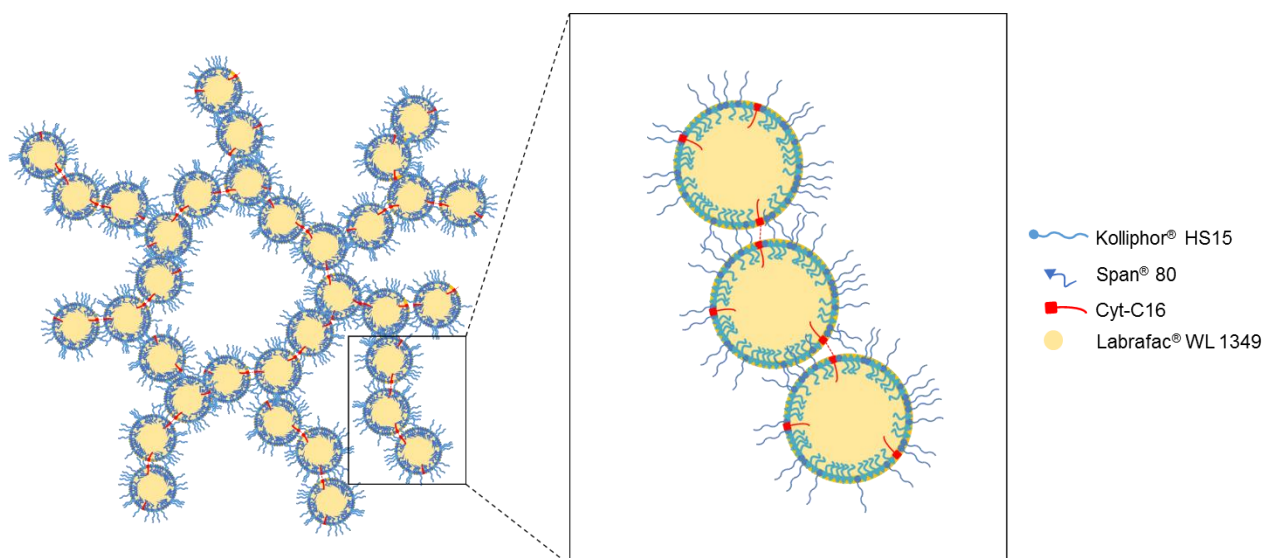


Figure 2.29 : Représentation schématique de l'association des NCLs dans les hydrogels grâce à des liaisons hydrogène entre molécules de Cyt-C16.

La seconde forme développée est un organogel. La gélification est permise par l'auto-assemblage des molécules de Cyt-C16. Celles-ci s'associent certainement également au moyen de liaisons hydrogène formées entre les fonctions alcools du ribose. Ainsi, elles créent des fibres qui en s'accumulant vont permettre la construction d'un réseau tridimensionnel qui immobilise l'huile (Figure 2.30).

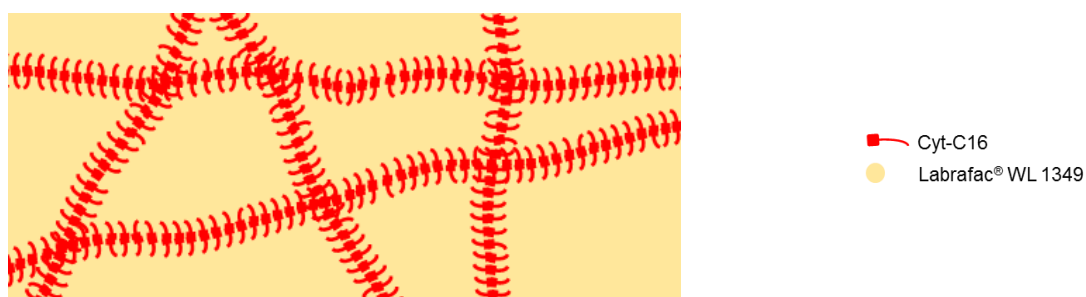


Figure 2.30 : Représentation schématique de l'organogel. La phase lipidique de Labrafac est immobilisée par l'auto-assemblage des molécules de Cyt-C16 au moyen de liaisons hydrogène.

Si ces deux formes ont montré leurs intérêts sur le plan physicochimique, elles doivent encore nous prouver leur innocuité et leurs capacités à être utilisées *in vivo*. Nous nous intéresserons à ces aspects dans le troisième chapitre.

VIII. Bibliographie :

- [1] U. Gatzemeier, F.A. Shepherd, T. Le Chevalier, P. Weynants, B. Cottier, H.J. Groen, R. Rosso, K. Mattson, H. Cortes-Funes, M. Tonato, R.L. Burkes, M. Gottfried, M. Voi, Activity of gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer: a multicentre, extended phase II study, *Eur J Cancer*. 32A (1996) 243–248.
- [2] A.L. Thomas, G. Cox, R.A. Sharma, W.P. Steward, F. Shields, K. Jeyapalan K, S. Muller, K.J. O'Byrne, Gemcitabine and paclitaxel associated pneumonitis in non-small cell lung cancer: report of a phase I/II dose-escalating study, *Eur J Cancer*. 36 (2000) 2329–2334.
- [3] E. Kontopodis, A. Kotsakis, N. Kentepozidis, K. Syrigos, N. Ziras, M. Moutsos, G. Filippa, A. Mala, L. Vamvakas, D. Mavroudis, V. Georgoulas, S. Agelaki, A phase II, open-label trial of bortezomib (VELCADE®) in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*. 77 (2016) 949–956.
- [4] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousselet, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine*. 11 (2015) 1237–1245.
- [5] E. Moysan, Y. González-Fernández, N. Lautram, J. Béjaud, G. Bastiat, J.P. Benoit, An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure, *Soft Matter*. 10 (2014) 1767–1777.
- [6] D.E. Koppel, Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants, *J Chem Phys*. 57 (1972) 4814–4820.
- [7] B.J. Frisken, Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data, *Appl Opt*. 40 (2001) 4087–4091.
- [8] M. Smoluchowski, Contribution à la théorie de l'endosmose électrique et de quelques phénomènes corrélatifs, *Bulletin de l'Académie des sciences de Cracovie*. (1903) 182–200.
- [9] R. Ihaka, R. Gentleman, R: A Language for Data Analysis and Graphics, *J Comput Graph Stat*. 5 (1996) 299–314.
- [10] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *Eur J Pharm Sci*. 18 (2003) 55–61.
- [11] L. Kozerski, H. Sierzputowska-Gracz, W. Krzyzosiak, M. Bratek-Wiewiórowska, M. Jaskólski, M. Wiewiórowski, Comparative structural analysis of cytidine, ethenocytidine and their protonated salts III. ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR studies at natural isotope abundance, *Nucleic Acids Res*. 12 (1984) 2205–2223.
- [12] G. Bastiat, C.O. Pritz, C. Roider, F. Fouchet, E. Lignières, A. Jesacher, R. Glueckert, M. Ritsch-Marte, A. Schrott-Fischer, P. Saulnier, J.P. Benoit, A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging, *J Control Release*. 170 (2013) 334–342.
- [13] C. Simonsson, G. Bastiat, M. Pitorre, A.S. Klymchenko, J. Béjaud, Y. Mély, J.P. Benoit, Inter-nanocarrier and nanocarrier-to-cell transfer assays demonstrate the risk of an immediate unloading of dye from labeled lipid nanocapsules, *Eur J Pharm Biopharm*. 98 (2016) 47–56.

Chapitre III :

Evaluation *in vitro* et *in vivo* des plateformes gélifiées développées en vue de leur utilisation en tant que forme injectable

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	104
II.	MATERIEL	105
III.	STABILITE DES HYDROGELS DE NCLS	106
IV.	EXTRUSION DES GELS AU TRAVERS D'UNE AIGUILLE	107
V.	ETUDE DE LA LIBERATION DES NCLS A PARTIR DE L'HYDROGEL.....	109
V.1.	Protocole de l'étude de libération des NCLs à partir de l'hydrogel.	110
V.2.	Résultats.....	112
VI.	TOXICITE CELLULAIRE.....	113
VI.1.	Protocole des études de cytotoxicité	114
VI.1.1.	Lignée cellulaire THP1	116
VI.1.2.	Lignée cellulaire B6-KPC3	116
VI.2.	Résultats.....	117
VII.	ETUDE DE TOLERANCE IN VIVO	119
VII.1.	Méthode	119
VII.1.1.	Bilan hématologique.....	120
VII.1.2.	Bilan biochimique.....	120
VII.1.3.	Analyse histologique	121
VII.2.	Résultats.....	122
VIII.	CONCLUSION	132
IX.	BIBLIOGRAPHIE	134

I. Introduction

Dans le précédent chapitre, deux nouvelles plateformes gélifiées utilisant la Cyt-C16 comme agent de réticulation ont été développées. Les propriétés physicochimiques de l'hydrogel de NCLs ont largement été caractérisées.

Nous souhaitons utiliser ces formes gels pour libérer de façon prolongée des principes actifs (PAs). Elles se destinent à être administrées par une injection (sous-cutanée (SC), locale ou intra-tumorale). Dans ce but, leur capacité à être utilisée comme plateforme de libération prolongée et leur innocuité sont étudiées dans ce troisième chapitre.

Tout d'abord, la stabilité des hydrogels conservés à 4°C a été suivie durant 6 mois. L'impact de l'injection de l'hydrogel avec une seringue munie de différentes tailles d'aiguille sur ses propriétés viscoélastiques a été étudié. La cinétique de libération des NCLs à partir de l'hydrogel a été suivie dans un milieu simulé de fluide interstitiel. Puis, les toxicités des NCLs encapsulant la Cyt-C16 ont été comparées sur deux lignées cellulaires différentes avec les NCLs sans Cyt-C16. Enfin, une étude de tolérance du gel injecté par voie SC a été menée chez le rat.

III. Stabilité des hydrogels de NCLs

La stabilité des hydrogels a été analysée durant une période de 6 mois. Chaque mois, les propriétés viscoélastiques des gels, ainsi que la distribution de taille des NCLs ont été mesurées.

Ces essais ont été réalisés sur des hydrogels de NCLs de diamètres 50 et 100 nm, réticulés avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}).

Ces deux formulations ont été fabriquées sous la forme de trois lots d'hydrogel de 12 mL chacun. Avant leur gélification, chaque lot est séparé en 6 groupes de 1,5 mL. Ces derniers sont placés dans une seringue en plastique de 5 mL (SOFT-JECT®, HSW, Tuttlingen, Allemagne). Les formulations ont été stockées à 4°C durant des périodes allant de une nuit à six mois dans ces seringues bouchées avec un film plastique (Parafilm M®, Bemis®, Neenah, États-Unis). Pour les mesures de propriétés viscoélastiques, les hydrogels ont été déposés directement (sans aiguille) sur la partie fixe du rhéomètre et la partie mobile de la géométrie a été placée au contact de l'échantillon. Les mesures ont été réalisées à 25°C dans les mêmes conditions que celles présentées dans le chapitre II (Partie V.7.).

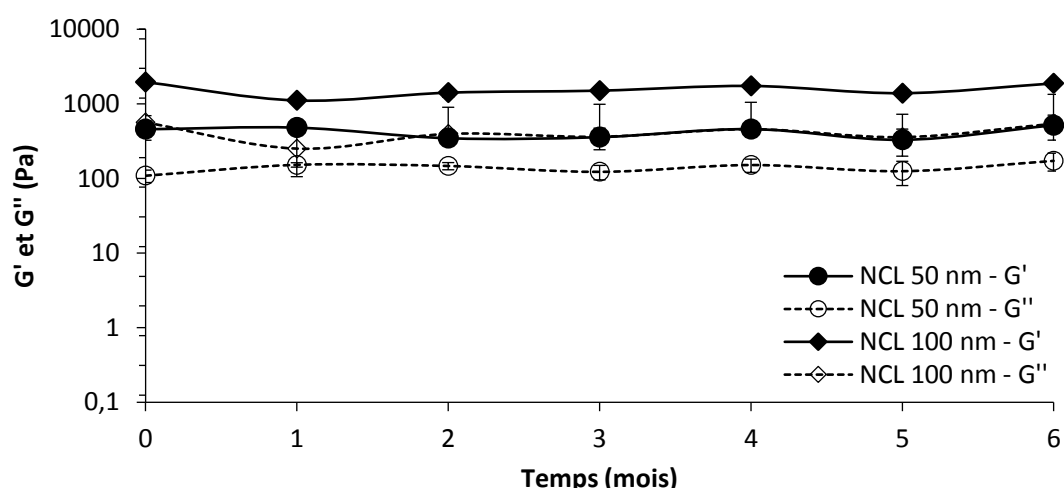


Figure 3.1 : Modules élastique G' (symbole plein, trait plein) et visqueux G'' (symbole vide, trait pointillé) des hydrogels en fonction du temps de conservation à 4°C. Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. NCLs de diamètres 50 (●○) et 100 nm (◆◇), réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) et aux concentrations respectives de 410,2 et 503,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

Au cours des 6 mois de l'étude, l'observation macroscopique ne montre aucune modification notable sur l'aspect des hydrogels. Les valeurs des modules élastiques et visqueux restent constantes quels que soient les diamètres des NCLs (Figure 3.1). Pour tous les temps de conservation testés, les rapports G''/G' sont restés compris entre 0,23 et 0,43. Les valeurs d'angle de déphasage δ entre la sollicitation de déformation

de cisaillement et la réponse de contrainte de cisaillement sont faibles et comprises entre 13 et 23°. Ce qui prouve une élasticité conservée des matériaux.

Après ces mesures rhéologiques, les échantillons ont été récupérés pour réaliser une mesure des valeurs de Z-average et de PdI des NCLs en DLS (avec le même protocole que présenté dans le chapitre précédent). Les résultats sont présentés dans la figure 3.2.

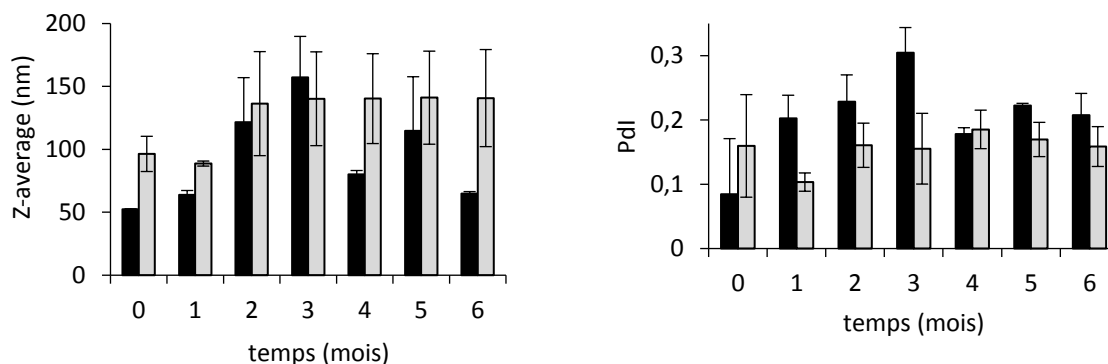


Figure 3.2 : Z-average et PdI des NCLs dans les deux hydrogels en fonction du temps de conservation à 4°C. NCLs de diamètres 50 (barre noire) et 100 nm (barre grise), réticulées avec 2,5 % de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) et aux concentrations respectives de 410,2 et 503,8 $mg.mL^{-1}$. (n=3, moyenne \pm écart-type).

Les valeurs de Z-average et de PdI des NCLs présentent d'importantes augmentations et ce dès le premier mois. Ces variations peuvent être dues à une modification des NCLs par la voie d'un procédé classique de déstabilisation des émulsions (coalescence ou floculation par exemple), ou à un problème lors de la re-suspension des NCLs lors de la dilution de l'hydrogel (présence d'agrégats de NCLs). Le diamètre des NCLs est quantifié avec le Z-average qui est une moyenne pondérée du diamètre. Avec ce seul paramètre, il est impossible de savoir s'il s'agit réellement d'agrégats de NCLs ou de NCLs dénaturées. L'observation de la structure des nanocapsules étant impossible (chapitre II, partie V.6. Observation en microscopie confocale), il est très difficile d'objectiver une déstabilisation des NCLs. A ce jour, cette question n'a pas été résolue mais des pistes seront données en discussion générale.

IV. Extrusion des gels au travers d'une aiguille

Les hydrogels de NCLs développés constituent des candidats innovants pour la libération prolongée de différents PAs. Dans ce but, ils devront être administrés chez un patient. Le moyen le plus simple et le moins invasif est une injection locale au moyen d'une seringue munie d'une aiguille.

Lors de cette extrusion, le matériau placé dans une seringue est soumis à de nombreuses forces de cisaillement qui risquent de modifier ses propriétés viscoélastiques.

Des gels composés de NCLs de diamètres 50, 75 et 100 nm, réticulés avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) ont été de nouveau formulés. Avant que la gélification ne débute, 2 mL de chaque formule ont été placés dans des seringues de 5 mL (Soft-Ject®, HSW, Tuttlingen, Allemagne). Les seringues sont ensuite conservées horizontalement une nuit à 4°C pour permettre une gélification complète. Différentes tailles d'aiguilles (Terumo Europe, Leuven, Belgique) associées aux seringues ont été testées : 18, 21 et 26 gauges (G), correspondant respectivement à des diamètres internes de l'aiguille de 1,2 ; 0,8 et 0,45 mm.

Les hydrogels sont simplement déposés par extrusion au travers des aiguilles entre les parties fixe et mobile du rhéomètre pour étudier leurs propriétés viscoélastiques à 25°C. Les modules G' et G'' sont ensuite mesurés dans des conditions similaires aux précédents essais (Figure 3.3).

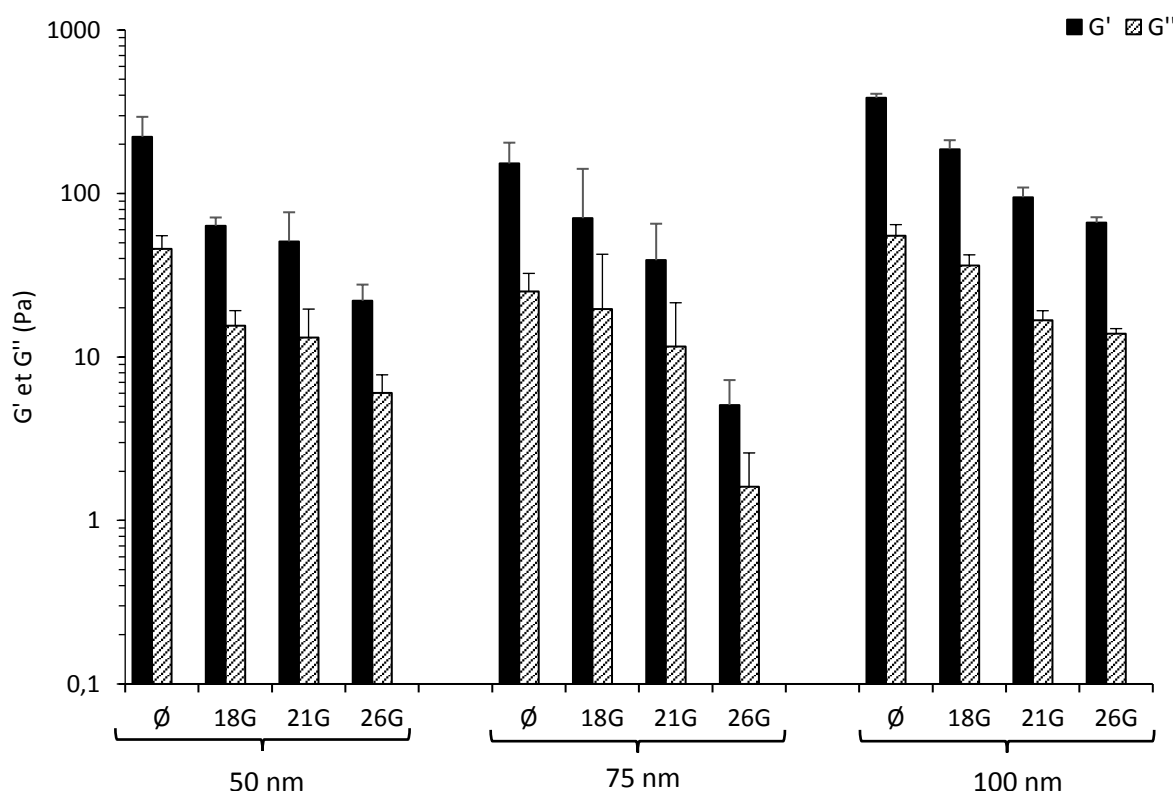


Figure 3.3: Modules élastique G' (barre noire) et visqueux G'' (barre rayée) des hydrogels de NCLs après leur extrusion au travers d'une aiguille (18, 21 et 26 G) comparés aux mêmes hydrogels sans extrusion (Ø). Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. NCLs de diamètres 50, 75 et 100 nm, réticulées avec 2,5 % de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) et aux concentrations respectives de 410,2, 561,6 et 503,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

L'utilisation d'une seringue munie d'une aiguille diminue les valeurs de G' et G'' , cependant les propriétés élastiques sont toujours conservées. En effet, les rapports G''/G' après extrusion sont restés compris entre 0,18 et 0,32, ce qui correspond à de faibles valeurs d'angle de déphasage δ (entre 10 et 18°). Sans extrusion, les rapports G''/G' sont compris entre 0,14 et 0,20, ce qui correspond à une valeur d'angle de déphasage δ comparable (entre 8 et 12°). Les formules restent donc dans un état de gel après leur

extrusion au travers de l'aiguille et l'état liquide rhéologique n'est jamais atteint. Plus l'aiguille est étroite (haut numéro de gauge) et plus les valeurs des modules viscoélastiques sont diminuées. En effet, le gel est soumis à plus de cisaillement avec une aiguille plus fine. Afin de conserver au mieux les propriétés des gels, l'utilisation d'aiguilles de grands diamètres internes devra être privilégiée lorsque cela est possible. Ces conclusions sont similaires à celles qui avaient été observées avec des hydrogels de NCLs réticulés par la Gem-C12 [1].

V. Etude de la libération des NCLs à partir de l'hydrogel

Afin d'être utilisé comme des formes à libération prolongée, les hydrogels doivent prouver leur capacité à libérer progressivement les NCLs.

Nous destinons ces formes à des applications nécessitant une injection SC ou locale. Les Pharmacopées Européenne et Américaine décrivent précisément des tests de libération (ou de dissolution) pour les nombreuses formes destinées à la voie orale [2]. Cependant, pour les médicaments destinés à la voie SC, aucun consensus réglementaire n'existe actuellement. Ce flou entourant les études *in vitro* des formes SC est lié d'une part à leur faible nombre par rapport aux formes destinées à la voie orale ou intraveineuse. D'autre part, le fonctionnement du tissu SC est encore mal connu ce qui rend difficile la création d'un test *in vitro* prédictif. Par exemple, un des facteurs clés dans la libération est le drainage du tissu SC, or si la composition de la matrice extracellulaire est connue, son volume disponible et sa cinétique de renouvellement ne sont pas spécifiés [3,4].

En 2015, Kinnunen *et al.* ont proposé un nouveau dispositif permettant de simuler le devenir d'une injection SC [5]. Ce dispositif nommé Scissor (pour « *subcutaneous injection site simulator* ») est composé de deux compartiments. Le premier compartiment reproduit le site d'injection. Il contient la forme pharmaceutique étudiée ainsi qu'une matrice extracellulaire artificielle. La température et la pression sont maintenues constantes à l'intérieur. Il est placé à l'intérieur du second compartiment dont il est séparé au moyen d'une membrane de dialyse. Ce second compartiment contient un grand volume de tampon, mimant le reste de l'organisme accessible par le biais des circulations sanguine et lymphatique. Les PAs étudiés devront d'abord diffuser au sein du premier compartiment, comme ils le feraient dans le tissu SC, pour ensuite rejoindre la circulation systémique ou lymphatique.

Dans le cadre de ce travail, ce dispositif est trop complexe à mettre en place. Cependant, plusieurs points clés ont été retenus pour créer le protocole de notre étude de libération.

V.1. Protocole de l'étude de libération des NCLs à partir de l'hydrogel.

La même matrice extracellulaire artificielle que celle présentée par Kinnunen *et al.* a été utilisée comme milieu de dispersion des NCLs. Celle-ci est inspiré des travaux de Fogh-Anderson *et al.* qui ont déterminé la composition des fluides interstitiels [6]. Cette matrice est composée d'une solution d'électrolytes tamponnée au pH de 7,4 et additionnée d'acide hyaluronique (AH). L'AH est présent dans tous les tissus des vertébrés et est retrouvé massivement dans le derme et le tissu SC. La concentration en AH dans le derme est estimée à $0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ chez l'homme mais aucune valeur précise n'est disponible pour le tissu SC [7]. Kinunnen *et al.* utilisent dans leur publication une concentration en AH comprise entre 1 et 10 mg.mL^{-1} , dans notre étude nous l'avons fixé à 1 mg.mL^{-1} .

L'hydrogel de NCLs a été mis en contact direct avec le milieu de libération mais aucun second compartiment n'a été utilisé. En effet, à ce stade l'objectif est de montrer la capacité des hydrogels à libérer des NCLs dans le milieu extracellulaire autour du site d'injection et non de prédire le devenir des NCLs dans l'organisme.

Enfin, l'étude est réalisée sans agitation et à la température constante de 37°C pour reproduire au mieux les conditions réelles. Par ailleurs, le volume de libération doit être suffisant pour permettre la re-suspension complète des NCLs après leur libération totale à partir des hydrogels.

Les quantités nécessaires de chaque constituant formant la matrice extracellulaire artificielle sont présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Composition de la matrice extracellulaire artificielle

Composé	Quantité (mg)
Acide hyaluronique (<i>Streptococcus equi</i> , $1,5\text{-}1,8 \cdot 10^6 \text{ Da}$)	400
Chlorure de sodium (NaCl)	2560
Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	36
Chlorure de potassium (KCl)	160
Chlorure de calcium (CaCl_2)	40
Bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	840
Eau dé-ionisée (H_2O)	qsp. 400 mL
Ajout de soude (NaOH 1M)	qsp. pH=7,4

L'étude de libération a été menée sur deux hydrogels avec des NCLs de diamètre 50 et 100 nm, réticulés avec 2,5 % de Cyt-C16 (*m/m_{Labrafac}*). Afin de pouvoir suivre la libération des NCLs, ces dernières sont

marquées avec une molécule fluorescente lipophile : le rouge de Nile (NR), qui sera solubilisée au cœur des NCLs. Cette sonde fluorescente a pu par le passé poser des problèmes, car elle peut fuir des NCLs en présence d'un autre compartiment lipidique (huile, nanocapsules lipidiques, membranes cellulaires par exemple) [8,9]. En présence d'un milieu purement aqueux, tel que la matrice extracellulaire utilisée, le NR reste encapsulé dans les NCLs et peut être utilisé pour quantifier la présence des NCLs. Lors de la formulation des hydrogels, le NR est préalablement solubilisé dans du Labrafac à la concentration de 0,1% (m/m_{Labrafac}), avant de réaliser la méthode d'inversion de phases (chapitre II).

Dès la fin de la formulation, 300 μL de chaque gel sont précautionneusement déposés dans le fond d'un tube à hémolyse en verre (bord droit, fond rond, 6 mL, NAFVSM, Andeville, France). Ce volume est suffisant pour remplir le fond du tube et ainsi former une surface de contact de taille toujours identique. L'utilisation d'un tube en verre a été privilégiée, car des essais préalables ont montré que les gels de NCLs n'adhèrent pas suffisamment aux parois d'une cuve en plastique (cuve en polystyrène, DTS0012, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni). Avec cette cuve, au cours de l'essai, le gel se détache des parois, ce qui fait varier la surface de contact entre le gel et le milieu de libération et fausse les résultats obtenus. Les formulations sont préparées en triplica et chacune d'entre elle permet de préparer 4 tubes tests.

Les hydrogels sont conservés une nuit à 4°C pour garantir leur gélification complète. Puis un volume de 5,7 mL de matrice extracellulaire artificielle (à 37°C) est précautionneusement ajouté sur le dessus des hydrogels, sans modifier la forme des hydrogels. Les tubes sont alors bouchés de façon hermétique et conservés à 37°C à l'abri de la lumière. A chaque intervalle de temps considérés, 200 μL de surnageant sont prélevés et remplacés par un même volume de matrice initiale. Les prélèvements sont placés dans une plaque 96 puits (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Allemagne). La fluorescence est mesurée avec un lecteur de plaque Fluoroscan Ascent® (Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France) dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont fixées respectivement à 515 et 590 nm. La libération des NCLs est suivie sur une période de 13 jours avec des prélèvements plus soutenus durant les premières 48 heures. Les profils de libération cumulée des NCLs sont obtenus en considérant que le 100% de libération correspond à la valeur obtenue pour la dispersion complète de l'hydrogel de NCLs. L'intensité de fluorescence du NR est proportionnelle à la concentration en NR (encapsulé dans les NCLs) pour toute la gamme de concentrations considérée dans l'étude. Ainsi, la fluorescence des prélèvements a été mesurée sans dilution supplémentaire. Ce protocole est résumé sur la figure 3.4.

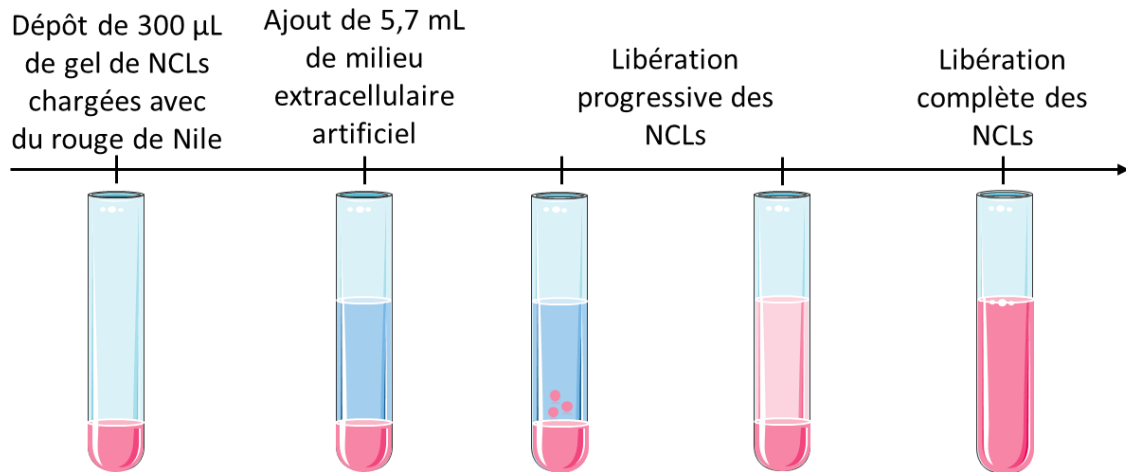


Figure 3.4 : Protocole de libération des NCLs à partir des hydrogels.

V.2. Résultats

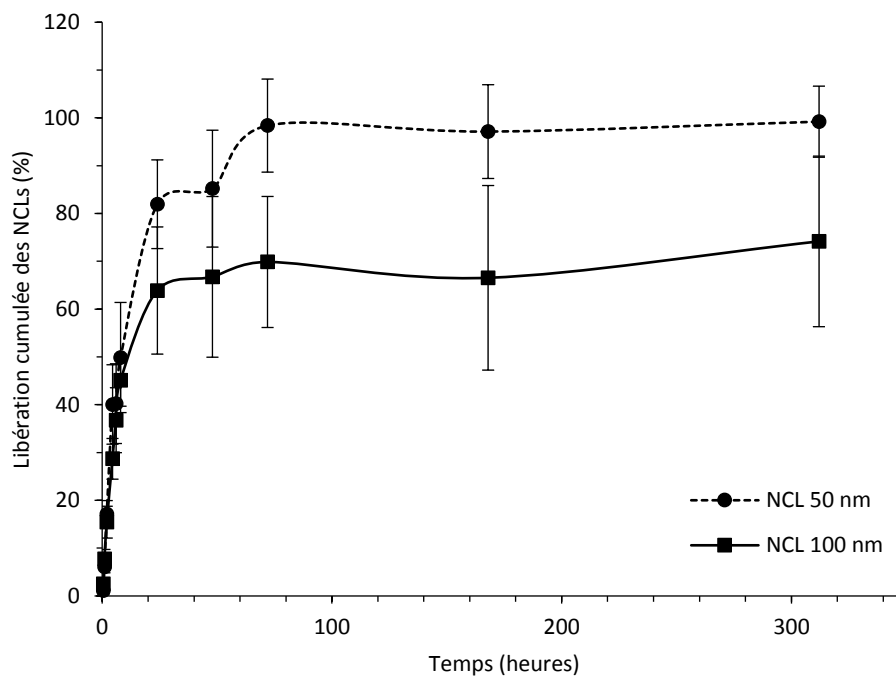


Figure 3.5 : Libération cumulée des NCLs à partir d'un hydrogel vers une matrice extracellulaire artificielle (pH = 7,4) à 37°C. NCLs de diamètres 50 et 100 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) et marquées avec 0,1% de rouge de Nile (m/m_{Labrafac}), aux concentrations respectives de 410,2 et 503,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

La dispersion complète de l'hydrogel dans le milieu donne une concentration en NCLs proche de 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cette concentration est dix fois inférieure à la valeur seuil qui sépare les formes gélifiées des formes

suspensions (200 mg.mL⁻¹). Ainsi, l'étude est réalisée dans des conditions qui permettent la libération complète des NCLs.

Durant les premières 24 heures, les NCLs sont libérées rapidement jusqu'à atteindre des valeurs de 80 et 60% de libération respectivement pour les diamètres 50 et 100 nm. Durant les trois jours suivants, la libération va progressivement augmenter jusqu'à atteindre les valeurs maximales de 95 et 85%. Ces valeurs restent ensuite constantes durant les 10 jours suivants (Figure 3.5). Les NCLs de diamètre 100 nm semblent avoir une libération légèrement ralentie par rapport aux NCLs de 50 nm. Un contrôle a parallèlement été réalisé avec les formes de NCLs en suspension (sans Cyt-C16). Dès la première heure, la libération des NCLs atteint une valeur de 100% (résultats non montrés). Les formes gélifiées de NCLs permettent donc bien de prolonger la libération des NCLs.

Des conclusions similaires avaient pu être tirées de l'étude de libération des hydrogels de NCLs réticulés par la Gem-C12 [1]. Néanmoins, si les profils de libération prolongées étaient identiques, ils étaient obtenus avec des concentrations de 5% en Gem-C12 (m/m_{Labrafac}). Cette comparaison appuie nos conclusions du chapitre II qui montraient des propriétés viscoélastiques équivalentes entre les hydrogels de NCLs réticulés avec 2,5% de Cyt-C16 ou 5% de Gem-C12 (m/m_{Labrafac}) (Tableau 2.11). Ainsi, un intérêt supplémentaire de la Cyt-C16 est sa capacité à former à une concentration moindre que la Gem-C12 des hydrogels de NCLs dont les profils de libération ne sont pas modifiés.

VI. Toxicité cellulaire

Afin d'étudier l'impact de la Cyt-C16, les toxicités des NCLs avec et sans Cyt-C16 sont comparées. Pour ce faire, un test de toxicité cellulaire a été réalisé *in vitro* sur deux lignées cellulaires différentes.

Différentes concentrations de NCLs avec ou sans Cyt-C16 ont été mises en contact avec les cellules durant 48h. La quantité de cellules toujours vivantes a ensuite été mesurée grâce au réactif 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS). Le MTS est associé à un réactif de couplage, phénazine éthylsulfate (PES).

Le principe du test est basé sur la conversion du sel de tétrazolium en un composé formazan coloré et soluble dans l'eau. Cette conversion est permise par l'activité mitochondriale des cellules viables. Plus précisément, la catalyse de la réaction est effectuée par la NADH déshydrogénase, qui est une enzyme de la chaîne respiratoire présente dans la membrane mitochondriale interne (Figure 3.6). La quantité de formazan produit est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture et ce composé peut être détecté par absorbance à 492 nm.

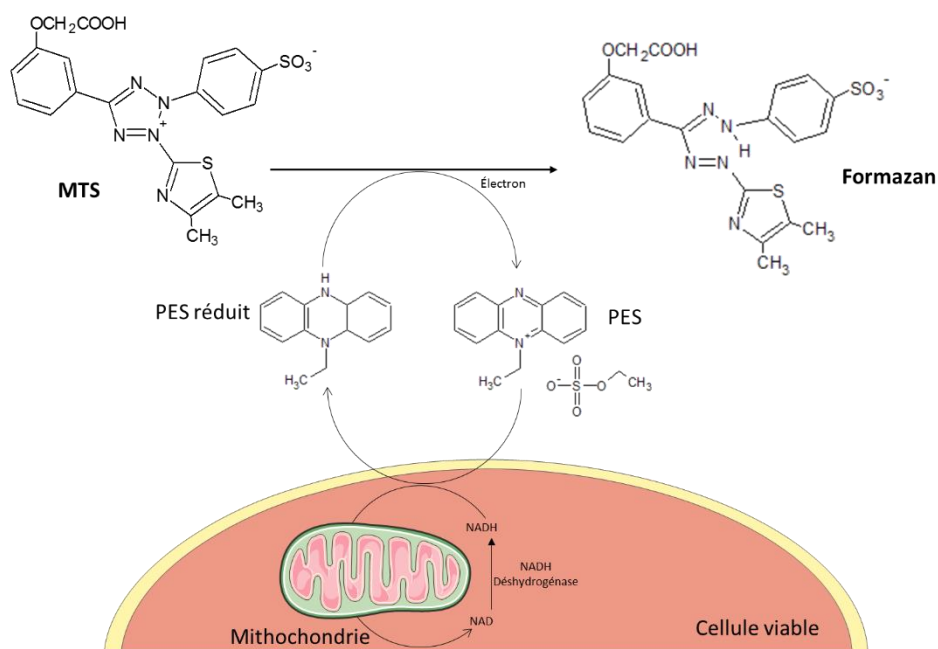


Figure 3.6 : Conversion du MTS en formazan grâce à la NADH déshydrogénase.

VI.1. Protocole des études de cytotoxicité

En pratique, les cellules ont étéensemencées avec 200 μL de milieu de culture dans une plaque 96 puits stérile (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Danemark) à une densité choisie. Les cultures ont ensuite été stabilisées pendant 48 h pour permettre aux cellules de se multiplier et d'adhérer à la surface du puit. Une fois vidés, les puits reçoivent 200 μL d'une dilution de NCLs dans le milieu de culture des cellules. Les concentrations en NCLs testées variaient de 0 à 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les cellules ont été incubées en présence des NCLs pendant 48 h. A l'issue de ce délai, 20 μL de réactif CellTiter 96® (*Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, Madison, Etats-Unis) ont été ajoutés dans chaque puit. Après 4 h d'attente, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 492 nm grâce à un lecteur de plaque de type Multiskan Ascent® (Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France) (Figure 3.7).

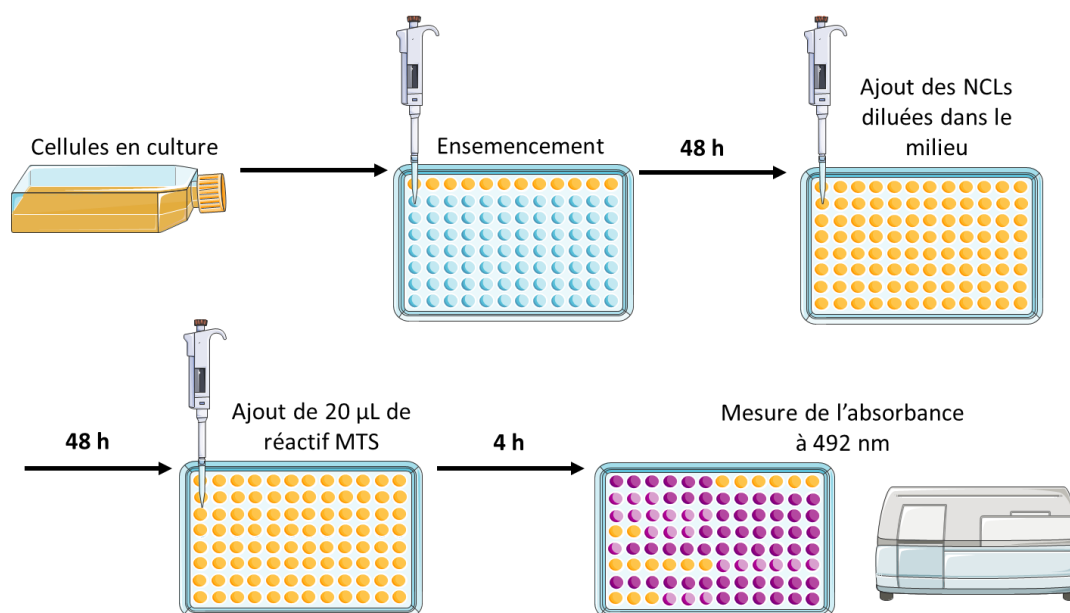


Figure 3.7 : Protocole des essais de toxicité cellulaire réalisés avec un réactif MTS.

La quantité optimale de cellules par puit a préalablement été établie grâce à une gamme de concentrations en cellules. Ainsi, les valeurs mesurées sont comprises entre les limites de détection et de saturation de l'appareil.

Un contrôle positif a été réalisé avec des cellules ne recevant pas de NCLs et la valeur d'absorbance moyenne de ces puits correspond au 100% de survie cellulaire. Un contrôle négatif est également réalisé sans cellules pour vérifier que les NCLs dans le milieu de culture n'absorbent pas à 492 nm. Les valeurs d'absorbance des contrôles négatifs sont très faibles et donc négligeables par rapport à celles obtenues en présence de cellules.

Le pourcentage de cellules vivantes est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Cellules vivantes (\%)} = \frac{\text{Absorbance des cellules traitées}}{\text{Absorbance moyenne des cellules non traitées}} \times 100$$

A partir de ces résultats, la courbe de survie cellulaire en fonction de la concentration en NCLs a été tracée. La concentration inhibitrice médiane (CI50), qui est la concentration permettant de réduire de moitié la viabilité cellulaire a été estimée.

Ces études de toxicité cellulaire ont été conduites sur une lignée cellulaire de macrophages (THP1) et une lignée cellulaire de tumeur pancréatique (B6KPC3). Elles ont été menées avec des NCLs de diamètres 50 et 100 nm, contenant 0 ou 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}). Pour chaque type de formule, trois lots différents ont été testés.

VI.1.1. Lignée cellulaire THP1

Les premiers essais ont été réalisés sur des macrophages, car ces cellules sont présentes dans les tissus conjonctifs et notamment les tissus SC. La lignée cellulaire THP1 est une lignée de monocytes humains qui se développent en suspension dans leur milieu de culture (non-adhérentes). Dans un premier temps, il faudra différencier ces cellules en macrophages. Pour ce faire, les cellules sont ensemencées avec une densité de 15 000 cellules par puit. Puis une solution de Phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) est ajoutée à la concentration finale de 100 nM. Après 48 h d'incubation, les cellules se différencient en macrophages et adhèrent à la surface du fond du puit. Elles sont alors prêtes à être incubées avec les différentes concentrations de NCLs.

La composition du milieu de culture est décrite dans le tableau 3.2. Les cellules sont toujours incubées à 37°C dans une atmosphère humide contrôlée contenant 5% de CO₂.

Tableau 3.2 : Composition du milieu de culture des cellules THP1

Composants	Quantités (%)
HEPES 10 mM	1%
Sodium pyruvate 100 mM	1%
Antibiotique	1%
Sérum de veau fœtal (FBS) décomplémenté	10%
β-mercaptoéthanol 20 μM	2 μL
Milieu RPMI 1640	Qsp. 500 mL

VI.1.2. Lignée cellulaire B6-KPC3

Les cellules B6KPC3 sont des cellules murines de tumeur de pancréas. Ces cellules adhérentes ont été isolées chez des souris transgéniques KPC, qui développent spontanément des adénocarcinomes canauxaires du pancréas [10,11]. Elles ont été gracieusement fournies par l'Université de Padoue (*Department of Oncology and Surgical Sciences of Padova*, groupe du Pr Vincenzo Bronte).

Les cellules B6-KPC3 sont incubées avec une densité de 3500 cellules par puit dispersées dans 200 μL de milieu. Les conditions d'incubation sont identiques à celles des THP1 (37°C et atmosphère humide contenant 5% de CO₂).

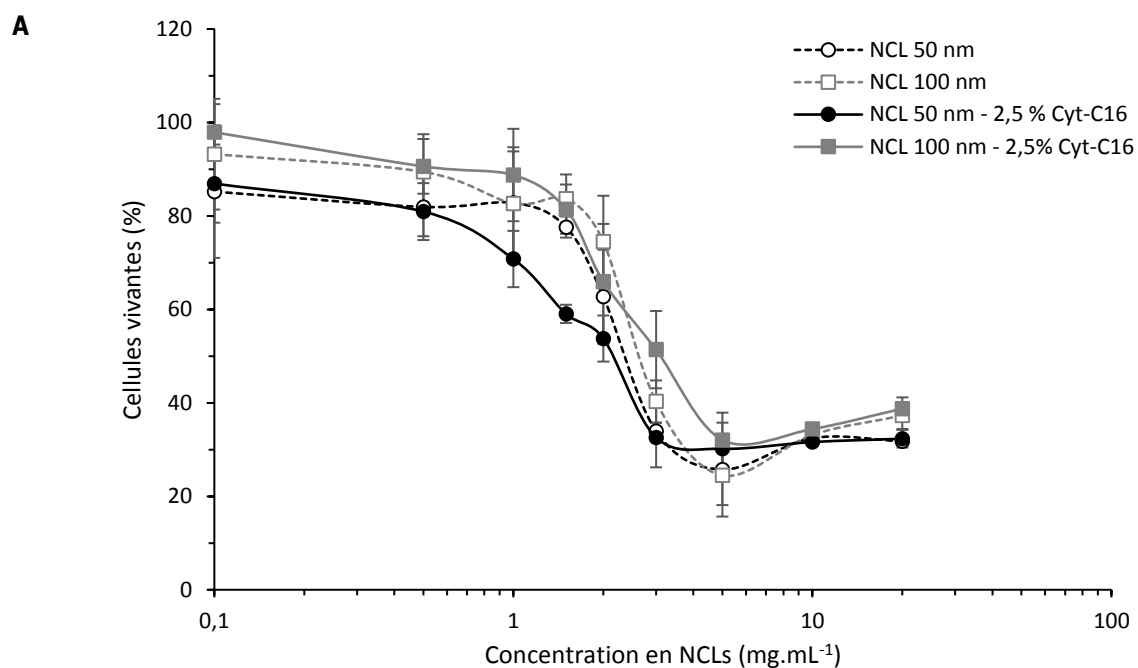
Le milieu de culture de la lignée B6-KPC3 est décrit dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Composition du milieu de culture des cellules B6-KPC3

Composants	Quantités (%)
L-glutamine 2 mM	1%
HEPES 10 mM	1%
Antibiotiques	1 %
Sérum de veau fœtal (FBS) décomplémenté	10%
β -mercaptoéthanol 20 μ M	14 μ L
Milieu DMEM	Qsp. 500 mL

VI.2. Résultats

Les résultats obtenus pour les deux tests de toxicité cellulaires sont présentés dans la figure 3.8.



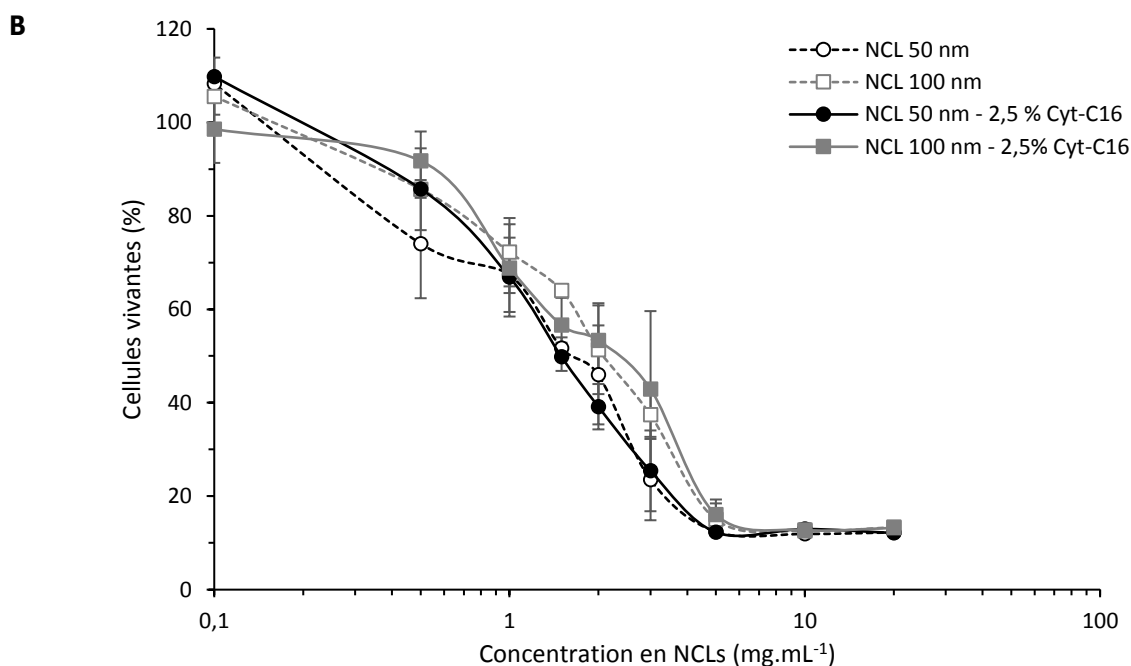


Figure 3.8 : Proportion de cellules vivantes : lignées cellulaires THP1 (A) et B6-KPC3 (B) en fonction de la concentration en NCLs après 48 h d'incubation à 37°C. NCLs de diamètres 50 (○●) et 100 nm (□■), contenant 0 (○□) ou 2,5% (●■) de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$). (n=3, moyenne \pm écart-type).

Les NCLs ont une action cytotoxique sur les deux lignées cellulaires dépendamment de leurs concentrations. Pour les NCLs de diamètre 50 nm, les valeurs de CI50 (moyenne \pm écart-type) sont estimées à $2,13 \pm 0,30$ et $1,66 \pm 0,23$ mg.mL⁻¹ respectivement pour les lignées cellulaires THP1 et B6-KPC3. Pour les NCLs de diamètre 100 nm, ces valeurs sont estimées à $2,51 \pm 0,36$ et $2,12 \pm 0,24$ mg.mL⁻¹. Les deux diamètres de NCLs testés présentent des toxicités proches mais légèrement plus élevées pour les petites tailles, ce qui a déjà été montré dans la littérature [12].

L'ajout de Cyt-C16 à la surface des NCLs ne modifie pas de manière significative les valeurs de CI50. Les NCLs de diamètre 50 nm contenant de la Cyt-C16 présentent des valeurs de CI50 de $2,15 \pm 0,19$ et $1,47 \pm 0,21$ mg.mL⁻¹ respectivement pour les lignées cellulaires THP1 et B6-KPC3. Pour les NCLs de diamètre 100 nm, les valeurs obtenues sont les suivantes $3,08 \pm 0,50$ et $2,16 \pm 0,25$ mg.mL⁻¹ et sont comparables à celles obtenues sans Cyt-C16.

Lorsque la Cyt-C16 se trouve à la surface des NCLs, leur toxicité n'est pas renforcée. Dans les précédentes études, les mêmes essais avaient été menées avec des NCLs encapsulant de la Gem-C12 sur deux autres lignées cellulaires (tumeurs pancréatique BxPc-3 et tumeur pulmonaire H460). Les valeurs d'IC50 obtenues pour les NCLs avec la Gem-C12 étaient diminuées d'un facteur 50 environ comparativement aux NCLs sans Gem-C12 [1].

Nous pouvons ainsi conclure que l'agent de réticulation synthétisé possède bien les propriétés désirées : il est composé d'une molécule endogène et son utilisation n'entraîne pas de toxicité supplémentaire. Cette étude est préliminaire et différentes études *in vitro* et *in vivo* supplémentaires seront nécessaire pour

observer sa réelle innocuité, telles que : des tests de génotoxicité (mutations géniques, chromosomiques et/ou altérations primaires de l'ADN), de formation de radicaux libres (stress oxydatif), de bio-persistance, de capacité phagocytaire, de cancérogénicité et des études pharmacocinétiques (évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion) [13].

VII. Etude de tolérance *in vivo*

VII.1. Méthode

Lorsqu'une forme pharmaceutique est injectée, les tissus vivants qui l'entourent peuvent réagir de différentes façons. Afin de connaître l'impact *in vivo* des plateformes développées lorsqu'elles sont injectées en SC, une étude de tolérance a été menée chez le rat.

Les formules testées sont d'une part un hydrogel composé de NCLs de diamètre 50 nm et réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (*m/m_{Labrafac}*) et d'autre part un organogel contenant 1% de Cyt-C16 (*m/m_{Labrafac}*). Ces deux gels sont comparés avec un contrôle composé d'huile de sésame. L'huile de sésame est un excipient autorisé pour la formulation de médicaments destinés aux voies SC et/ou intramusculaire (Haldol Decanoas® 50 mg/mL solution injectable en ampoule (Janssen-Cilag), Modecate® 125 mg/mL solution injectable IM en flacon (Sanofi-Aventis)). Ainsi, les réactions provoquées par les deux formes inédites seront comparées aux réactions provoquées par un excipient actuellement accepté par la Pharmacopée Européenne.

L'étude a été conduite sur 57 rats femelles (Sprague-Dawley), âgées d'au moins 8 semaines. Les animaux sont nés et élevés au sein du service commun d'animalerie hospitalo-universitaire (SCAHU) du CHU d'Angers dans des cages (6 rats par cage). Chaque cage contient un abri pour les animaux (enrichissement) et une litière en copeaux de bois. L'eau et l'alimentation sont disponibles *ad libitum*. Les cages sont stockées dans une pièce climatisée avec des cycles d'alternance de lumière et d'obscurité de 12 heures. L'ensemble des expérimentations animales ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63/UE et avec l'accord du Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale des Pays de la Loire (autorisation CEEA 2012-37 et 2012-73).

L'anesthésie des animaux a été réalisée par inhalation d'isoflurane (Isoflurane Belamont, Belamont Laboratoires, Boulogne-Billancourt, France) à la dose de 5% dans un flux d'oxygène de 3 L.min⁻¹. La nuque de chaque animal a été rasée pour faciliter l'injection et le suivi du point d'injection. Un volume de 500 µL de l'une des formules testées a été injecté en SC avec une seringue de 1 mL (Soft-Ject®, HSW, Tuttlingen, Allemagne) et une aiguille 18 G (Terumo®, Leuven, Belgique). Pendant leur réveil, les animaux sont surveillés. Chaque condition (formule et temps) a été répétée sur un groupe de 3 animaux. Tout au long

de l'étude, la masse et le comportement des animaux ont été contrôlés pour vérifier l'absence de signe de souffrance.

Lors de six temps différents (1, 2, 4, 7, 14, 28 jours), les animaux ont été de nouveau anesthésiés (comme décrit précédemment) et euthanasiés par une ponction cardiaque réalisée sur thorax ouvert. Le sang collecté a été utilisé pour réaliser des bilans hématologique et biochimique. Les tissus entourant la zone d'injection ont également été prélevés pour une analyse histologique. Ce protocole est résumé sur la figure 3.9.

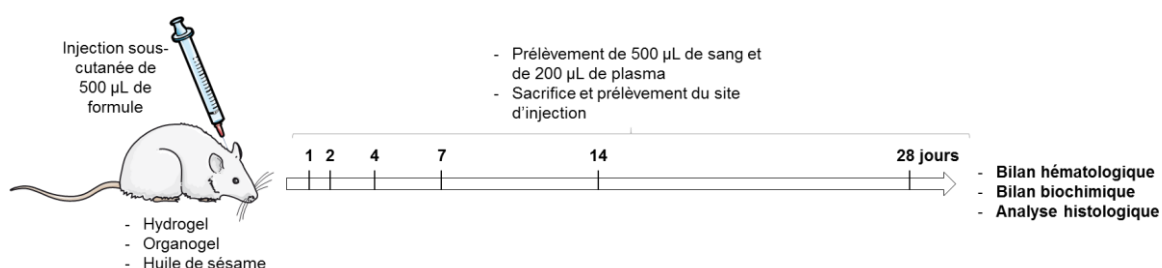


Figure 3.9 : Protocole de l'étude de tolérance *in vivo*.

VII.1.1. Bilan hématologique

Un premier prélèvement de 500 μ L de sang a été placé dans un tube contenant de l'EDTA (Tube BD Microtainer® MAP K2 EDTA, BD, New Jersey, Etats-Unis) afin d'éviter sa coagulation. Les prélèvements ont été conservés à 4°C et rapidement analysés.

Le bilan hématologique a été réalisé avec le concours du Pr Marc Zandecki par le Laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers. Les paramètres étudiés sont : la concentration en hématies, la concentration en hémoglobine, l'hématocrite, le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), la concentration en plaquettes, le volume plaquettaire moyen (VPM), la concentration en leucocytes et la formule leucocytaire.

VII.1.2. Bilan biochimique

Un second volume de 500 μ L de sang a été placé dans un tube hépariné (Li-Heparin - Tube Micro, Sarstedt, Marnay, France). Les tubes ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 min à 2000 g afin de récupérer seulement le plasma. Environ 200 μ L de plasma sont récoltés et congelés à -20°C.

L'ensemble des analyses biochimiques ont été réalisées par le Département de Biochimie et Génétique du CHU d'Angers avec l'aide du Dr Valérie Moal. Les paramètres mesurés sont la concentration en urée, en sodium, en potassium, en chlore, en créatinine, en phosphatase alcaline, en aspartate aminotransférase (ASAT) et en alanine aminotransférase (ALAT).

VII.1.3. Analyse histologique

Les tissus entourant la zone d'injection ont été prélevés (pièce d'environ 3x3 cm) et immédiatement placé dans une solution de formol pour déshydrater l'échantillon. Le jour suivant, les échantillons de tissus ont été coupés dans leur longueur afin de traverser les différentes structures de la peau ainsi que la forme injectée (Figure 3.10).

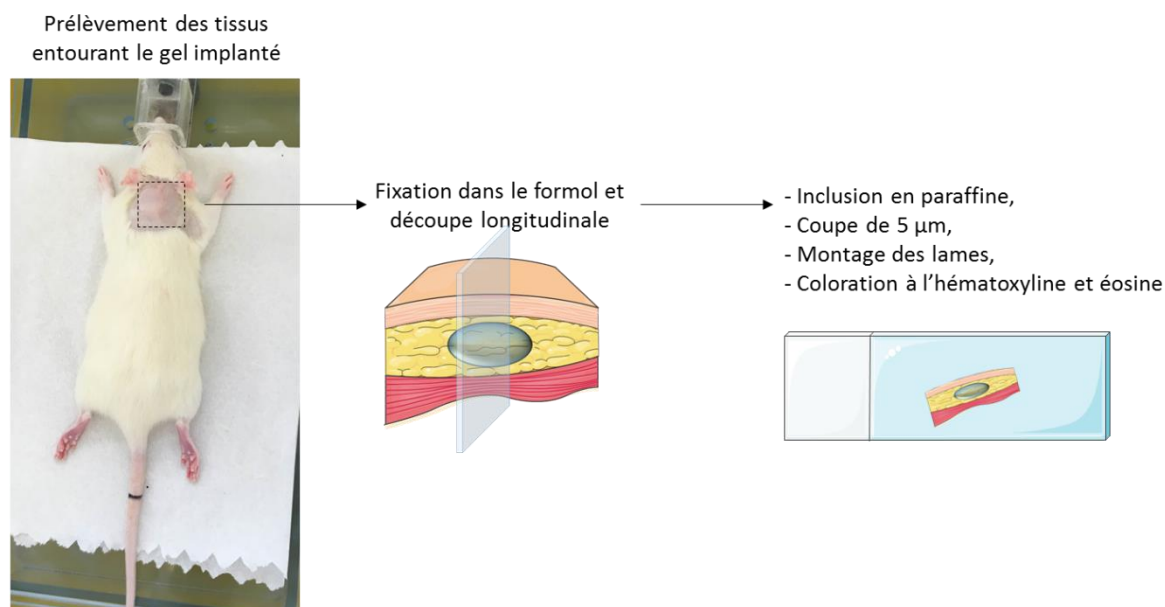


Figure 3.10 : Découpe des échantillons de tissus entourant la zone d'injection.

Les morceaux d'échantillon obtenus ont été inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur des tissus paraffinés ont ensuite été réalisées au microtome. Les coupes sont placées sur une lame en verre, déparaffinées et colorées avec un mélange hématoxyline-éosine. Finalement, les préparations sont montées entre lames et lamelles pour permettre leur conservation et leur observation. Toutes les étapes de préparation des tissus ont été réalisées par le Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire du CHU d'Angers sous le contrôle du Pr Marie-Christine Rousselet.

Les lames ont été scannées avec un scanner de lame complète Aperio (Scanscope CS System, Aperio Technologies, Leica Biosystems Imaging, Wetzlar, Allemagne) pour obtenir des images de haute résolution, observées avec le logiciel Aperio image scope® (Leica Biosystems Imaging, Wetzlar, Allemagne). Pour chaque image, différents paramètres ont été évalués : le recrutement de leucocytes, la présence de fibroblastes et de dépôt de collagène et, enfin, la création de nouveaux capillaires sanguins. Chacun de ces paramètres a été noté avec l'un des grades suivants : normal, minimum, moyen, modéré et important.

VII.2. Résultats

Les administrations en SC des trois formes testées n'ont pas posé de problèmes particuliers. De par sa fluidité, l'huile de sésame est moins bien retenue et à tendance à refouler par le point d'injection, ce qui n'a pas été observé pour les formes gélifiées. Durant les premières 24 heures après l'administration des 3 formules, des comportements de grattage et de toilette du site d'injection ont pu être observés chez les animaux mais n'ont pas été reportés au-delà de cette période. Tout le long de l'étude, aucun animal n'a présenté de modification de son comportement (diminution du toilettage, asthénie) ou de signe de souffrance. Les poids des animaux ont été fréquemment contrôlés car une perte de masse corporelle reste le meilleur marqueur de souffrance (Figure 3.11).

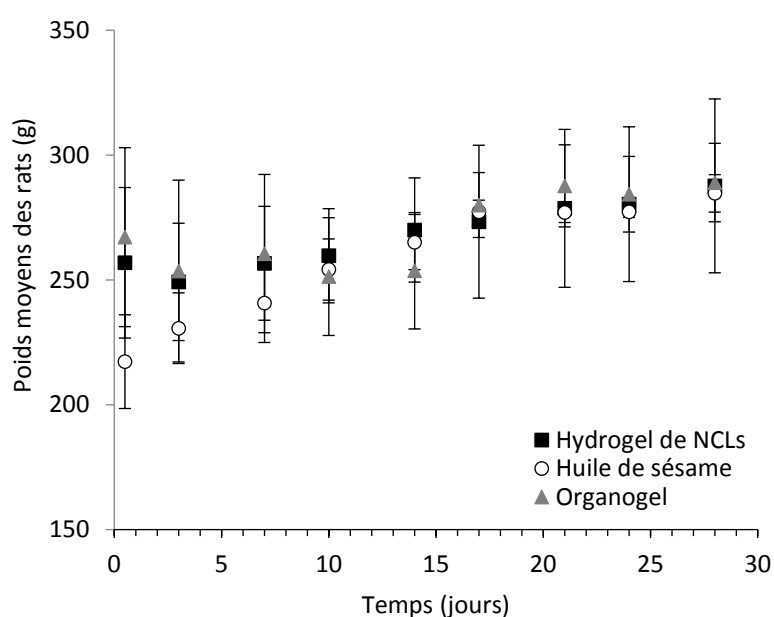


Figure 3.11 : Evolution des poids des rats femelles (Sprague-Dawley) ayant reçu une injection sous-cutanée (500 µL) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹) (■), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$)) (○) ou d'huile de sésame (▲). (n=3-54, moyenne ± écart-type).

Quelle que soit la formulation reçue, les animaux présentent une évolution de leur poids équivalente. La prise de poids ne présente pas de cassure et suit l'évolution normale pour cette espèce. Les trois formules administrées ne semblent pas modifier l'état de santé général des rats. Par ailleurs, les formes injectées restent visibles tout au long de l'étude sous la forme d'une grosseur sous la peau. La zone entourant le site d'injection ne semble pas infectée, érythémateuse ou douloureuse. Sur les 54 animaux traités, seul deux, ayant reçu l'organogel, ont présenté une croûte au niveau du site d'injection. Lors du sacrifice de chaque animal, un prélèvement de sang a été réalisé pour permettre un bilan hématologique complet sur sang frais (Tableaux 3.4 et 3.5) et un bilan biochimique sur plasma (Tableau 3.6).

Tableau 3.4 : Bilans hématologiques. Concentrations en hématies et hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), concentration en plaquettes et volume plaquettaire moyen (VPM) dans le sang de rats femelles (Sprague-Dawley) ayant reçu une injection sous-cutanée (500 µL) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS). (n=3, moyenne ± écart-type).

		Hématies x 10⁻¹² (/L)	Hémoglobine (g/dL)	Hématocrite (%)	VGM (fL)	TCMH (pg)	CCMH (g/dL)	Plaquettes x 10⁻⁹ (/L)	VPM (fl)
	<i>Groupe contrôle</i>	7,1 ± 0,1	12,7 ± 0,3	37,7 ± 1,7	53,0 ± 1,9	17,9 ± 0,3	33,8 ± 1,8	532,3 ± 63,1	7,6 ± 0,3
1 jour	<i>HS</i>	7,8 ± 0,3	13,9 ± 0,2	41,1 ± 0,4	52,9 ± 1,9	17,9 ± 0,6	33,9 ± 0,6	586,3 ± 70,8	7,43 ± 0,3
	<i>Hydrogel</i>	7,5 ± 0,2	13,4 ± 0,4	40,0 ± 0,55	53,6 ± 1,2	18,0 ± 0,2	33,5 ± 0,7	649,0 ± 113,5	7,8 ± 0,1
	<i>Organogel</i>	7,8 ± 0,5	14,1 ± 0,4	41,4 ± 0,9	53,6 ± 2,3	18,2 ± 0,7	34,0 ± 0,2	685,7 ± 51,3	7,5 ± 0,1
2 jours	<i>HS</i>	7,4 ± 0,3	14,0 ± 0,5	43,6 ± 1,3	59,0 ± 1,1	19,0 ± 0,3	32,2 ± 0,1	679,3 ± 73,3	7,3 ± 0,3
	<i>Hydrogel</i>	7,9 ± 0,2	14,9 ± 0,3	45,1 ± 0,7	57,0 ± 1,0	18,9 ± 0,4	33,1 ± 0,2	547,0 ± 41,9	7,0 ± 0,1
	<i>Organogel</i>	8,2 ± 0,1	15,2 ± 0,4	45,8 ± 1,0	56,1 ± 1,5	18,6 ± 0,5	33,1 ± 0,2	645,3 ± 43,8	7,2 ± 0,1
4 jours	<i>HS</i>	7,8 ± 0,1	14,7 ± 0,2	43,9 ± 0,6	56,2 ± 1,4	18,9 ± 0,2	33,6 ± 0,6	513,0 ± 142,6	7,5 ± 0,1
	<i>Hydrogel</i>	7,7 ± 0,2	14,4 ± 0,4	42,8 ± 1,3	55,9 ± 1,5	18,8 ± 0,6	33,6 ± 0,1	702,0 ± 48,5	7,2 ± 0,3
	<i>Organogel</i>	8,0 ± 0,1	14,5 ± 0,4	42,7 ± 1,1	53,2 ± 1,4	18,1 ± 0,5	34,0 ± 0,4	640,0 ± 67,0	7,2 ± 0,2
7 jours	<i>HS</i>	7,1 ± 0,4	13,7 ± 0,7	41,4 ± 2,4	58,0 ± 0,3	19,1 ± 0,1	33,0 ± 0,2	586,7 ± 58,6	7,6 ± 0,2
	<i>Hydrogel</i>	7,9 ± 0,1	14,6 ± 0,4	44,1 ± 1,4	55,7 ± 1,7	18,4 ± 0,4	33,0 ± 0,3	676,3 ± 90,8	7,6 ± 0,2
	<i>Organogel</i>	8,1 ± 0,4	14,7 ± 0,6	44,5 ± 1,3	55,0 ± 2,1	18,2 ± 0,8	33,0 ± 0,3	627,7 ± 14,3	7,4 ± 0,3
14 jours	<i>HS</i>	7,5 ± 0,1	14,1 ± 0,5	41,9 ± 1,2	55,7 ± 0,6	18,8 ± 0,5	33,8 ± 0,8	621,3 ± 35,0	7,5 ± 0,1
	<i>Hydrogel</i>	7,7 ± 0,1	14,4 ± 0,5	43,3 ± 1,4	56,6 ± 1,6	18,8 ± 0,6	33,2 ± 0,2	595,0 ± 11,4	7,5 ± 0,1
	<i>Organogel</i>	7,4 ± 0,1	13,7 ± 0,4	41,3 ± 1,0	56,0 ± 0,4	18,6 ± 0,2	33,3 ± 0,1	568,0 ± 94,3	7,5 ± 0,2
28 jours	<i>HS</i>	7,2 ± 0,1	13,2 ± 0,2	41,6 ± 0,2	57,6 ± 1,4	18,3 ± 0,5	31,8 ± 0,2	634,0 ± 77,5	7,4 ± 0,1
	<i>Hydrogel</i>	7,9 ± 0,1	14,2 ± 0,9	44,3 ± 2,8	56,1 ± 0,5	18,0 ± 0,1	32,0 ± 0,4	675,3 ± 59,2	7,4 ± 0,2
	<i>Organogel</i>	7,6 ± 0,1	13,8 ± 0,2	42,8 ± 0,7	56,1 ± 0,2	18,0 ± 0,3	32,1 ± 0,4	704,3 ± 47,7	7,5 ± 0,2

Tableau 3.5 : Formule leucocytaire. Concentration en leucocytes et proportion en granulocytes neutrophiles, lymphocytes, monocytes, granulocytes éosinophiles et granulocytes basophiles, dans le sang de rats femelles (Sprague-Dawley) ayant reçu une injection sous-cutanée (500 μL) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS). ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

		Leucocytes $\times 10^{-9}$ (/L)	Granulocytes Neutrophiles (%)	Lymphocytes (%)	Monocytes (%)	Granulocytes Eosinophiles (%)	Granulocytes Basophiles (%)
<i>Groupe contrôle</i>		10,6 \pm 2,0	8,6 \pm 2,2	86,5 \pm 5,7	2,3 \pm 1,7	2,6 \pm 2,1	0,03 \pm 0,06
1 jour	<i>HS</i>	13,5 \pm 4,3	6,4 \pm 2,2	91,6 \pm 3,4	1,1 \pm 1,4	0,9 \pm 0,2	0,00 \pm 0,00
	<i>Hydrogel</i>	12,1 \pm 1,8	8,3 \pm 3,1	88,7 \pm 3,6	2,1 \pm 0,6	0,9 \pm 0,3	0,00 \pm 0,00
	<i>Organogel</i>	11,5 \pm 1,8	13,1 \pm 4,1	84,8 \pm 3,6	1,1 \pm 0,9	1,1 \pm 0,2	0,00 \pm 0,00
2 jours	<i>HS</i>	17,6 \pm 9,1	7,6 \pm 1,4	89,1 \pm 3,6	2,9 \pm 2,3	0,4 \pm 0,4	0,03 \pm 0,06
	<i>Hydrogel</i>	14,7 \pm 2,7	8,3 \pm 3,8	87,5 \pm 4,6	3,5 \pm 0,7	0,7 \pm 0,3	0,07 \pm 0,06
	<i>Organogel</i>	15,7 \pm 0,6	15,2 \pm 9,6	82,2 \pm 8,3	2,1 \pm 1,4	0,5 \pm 0,5	0,00 \pm 0,00
4 jours	<i>HS</i>	9,8 \pm 1,3	7,2 \pm 0,9	89,8 \pm 0,2	2,2 \pm 0,9	0,8 \pm 0,3	0,00 \pm 0,00
	<i>Hydrogel</i>	12,5 \pm 2,3	8,1 \pm 1,0	89,7 \pm 1,2	0,9 \pm 0,8	0,9 \pm 0,4	0,00 \pm 0,00
	<i>Organogel</i>	13,4 \pm 2,3	11,2 \pm 5,4	86,2 \pm 3,6	2,1 \pm 1,6	0,4 \pm 0,5	0,03 \pm 0,06
7 jours	<i>HS</i>	10,9 \pm 7,2	7,6 \pm 1,5	90,1 \pm 2,1	1,8 \pm 0,5	0,4 \pm 0,2	0,03 \pm 0,06
	<i>Hydrogel</i>	13,7 \pm 0,7	11,0 \pm 3,4	85,3 \pm 4,2	2,9 \pm 0,8	0,8 \pm 0,2	0,03 \pm 0,06
	<i>Organogel</i>	20,7 \pm 10,1	7,5 \pm 1,9	89,6 \pm 2,4	2,2 \pm 1,6	0,6 \pm 0,2	0,03 \pm 0,06
14 jours	<i>HS</i>	12,6 \pm 1,6	6,3 \pm 1,2	90,2 \pm 1,1	2,5 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	0,00 \pm 0,00
	<i>Hydrogel</i>	15,9 \pm 4,2	7,1 \pm 0,5	89,8 \pm 1,8	2,3 \pm 0,9	0,8 \pm 0,4	0,03 \pm 0,06
	<i>Organogel</i>	12,0 \pm 10,6	9,1 \pm 4,2	87,7 \pm 3,7	2,3 \pm 0,6	0,9 \pm 0,0	0,05 \pm 0,07
28 jours	<i>HS</i>	10,3 \pm 1,6	10,1 \pm 3,9	87,1 \pm 5,1	1,6 \pm 1,4	1,2 \pm 0,2	0,03 \pm 0,06
	<i>Hydrogel</i>	13,6 \pm 3,4	8,9 \pm 1,7	86,9 \pm 0,7	3,2 \pm 1,6	1,0 \pm 0,2	0,07 \pm 0,06
	<i>Organogel</i>	9,4 \pm 0,3	8,4 \pm 0,4	88,6 \pm 1,8	1,8 \pm 1,5	1,1 \pm 0,3	0,00 \pm 0,00

Tableau 3.6 : Analyse biochimique plasmatique. Concentrations en urée, sodium, potassium, chlore, en créatinine, phosphatase alcaline, aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT) dans le plasma de rats femelles (Sprague-Dawley) ayant reçu une injection sous-cutanée (500 µL) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$)) ou d'huile de sésame (HS). (n=3, moyenne ± écart-type).

		Urée (mmol/L)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chlore (mmol/L)	Créatinine (µmol/L)	Phosphatase alcaline (UI/L)	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)
	<i>Groupe contrôle</i>	7,8 ± 0,6	140,3 ± 0,6	4,2 ± 0,4	105,0 ± 0,0	32,3 ± 3,1	201,3 ± 44,5	160,5 ± 60,1	85,0 ± 17,0
1 jour	<i>HS</i>	8,0 ± 0,6	140,0 ± 0,0	4,1 ± 0,3	105,3 ± 1,2	39,7 ± 4,0	141,7 ± 22,2	168,7 ± 52,7	112,7 ± 16,8
	<i>Hydrogel</i>	7,0 ± 0,9	138,3 ± 0,6	4,7 ± 0,3	105,0 ± 1,0	37,0 ± 3,0	147,3 ± 27,5	158,0 ± 49,1	78,3 ± 21,0
	<i>Organogel</i>	7,8 ± 0,6	139,7 ± 1,2	4,4 ± 0,3	105,7 ± 1,5	39,0 ± 2,7	128,3 ± 16,9	135,0 ± 13,2	80,7 ± 19,4
2 jours	<i>HS</i>	7,6 ± 0,4	138,3 ± 1,5	5,0 ± 0,4	103,3 ± 1,5	32,7 ± 3,2	351,3 ± 75,6	152,7 ± 57,3	99,3 ± 12,6
	<i>Hydrogel</i>	6,6 ± 0,3	140,3 ± 1,2	3,9 ± 0,5	104,7 ± 0,6	30,0 ± 2,0	227,3 ± 27,0	143,7 ± 64,7	90,3 ± 13,4
	<i>Organogel</i>	6,9 ± 0,5	139,0 ± 1,0	4,3 ± 0,2	105,0 ± 0,0	42,7 ± 2,1	214,3 ± 27,7	111,3 ± 19,0	89,3 ± 13,0
4 jours	<i>HS</i>	8,3 ± 0,8	137,7 ± 2,1	4,4 ± 0,4	103,0 ± 1,0	32,0 ± 3,5	242,7 ± 50,0	111,0 ± 30,8	79,0 ± 15,7
	<i>Hydrogel</i>	7,9 ± 1,3	139,0 ± 1,0	4,8 ± 0,6	105,0 ± 1,0	33,3 ± 5,5	238,0 ± 43,0	120,0 ± 17,1	79,33 ± 4,2
	<i>Organogel</i>	7,1 ± 0,9	138,7 ± 1,2	4,1 ± 0,2	105,3 ± 2,1	37,7 ± 5,5	174,7 ± 20,1	112,7 ± 8,4	70,3 ± 21,6
7 jours	<i>HS</i>	9,0 ± 0,5	138,7 ± 0,6	5,0 ± 0,4	105,0 ± 2,0	36,0 ± 5,2	260,0 ± 17,1	153,7 ± 33,1	86,7 ± 7,1
	<i>Hydrogel</i>	7,2 ± 0,3	137,7 ± 1,5	5,2 ± 0,3	103,3 ± 0,6	29,7 ± 5,5	201,3 ± 18,6	125,3 ± 35,2	78,3 ± 5,5
	<i>Organogel</i>	7,5 ± 0,3	139,0 ± 1,0	4,8 ± 0,3	103,0 ± 1,0	33,7 ± 3,5	197,7 ± 18,9	148,0 ± 45,9	77,0 ± 5,6
14 jours	<i>HS</i>	8,2 ± 0,2	138,7 ± 1,5	4,8 ± 0,2	102,7 ± 0,6	35,0 ± 5,0	222,7 ± 30,0	108,0 ± 14,0	71,0 ± 14,1
	<i>Hydrogel</i>	8,2 ± 0,5	136,0 ± 0,0	5,3 ± 0,0	102,3 ± 0,6	33,7 ± 1,5	262,0 ± 36,8	129,0 ± 40,6	73,3 ± 8,4
	<i>Organogel</i>	8,3 ± 0,8	139,0 ± 0,0	4,7 ± 0,4	104,7 ± 1,5	32,3 ± 5,0	225,7 ± 10,3	126,0 ± 11,8	78,7 ± 18,2
28 jours	<i>HS</i>	6,7 ± 0,8	137,7 ± 1,5	4,7 ± 0,4	105,0 ± 1,0	34,7 ± 2,1	191,7 ± 29,0	129,7 ± 43,0	73,3 ± 22,9
	<i>Hydrogel</i>	6,0 ± 0,3	139,0 ± 1,7	4,6 ± 0,1	104,0 ± 2,0	32,7 ± 1,5	241,3 ± 43,1	113,7 ± 12,1	81,7 ± 14,1
	<i>Organogel</i>	7,0 ± 0,2	138,0 ± 1,7	4,4 ± 0,5	103,0 ± 2,0	26,3 ± 4,2	187,0 ± 23,3	168,0 ± 60,9	124,7 ± 54,9

Quels que soient la forme injectée et le temps considéré, le bilan hématologique n'est pas modifié de façon significative durant l'étude. Entre le second et le quatorzième jour, le nombre global de leucocytes semblent légèrement augmenté. Cependant, ces nombres restent proches des valeurs considérées comme normale dans la littérature (3.10^9 à 15.10^9 /L) [14]. De plus, la répartition en pourcentage des différents types de cellules leucocytaires reste inchangée au cours de l'étude. Enfin, les bilans biochimiques des animaux restent constants.

Pour chaque sacrifice, les tissus entourant l'implant injecté ont été prélevés. Les coupes de tissus ont ensuite été colorées avec une coloration hématoxyline-éosine. L'hématoxyline permet de colorer les structures contenant l'ADN et l'éosine colore spécifiquement en rose les protéines. Ainsi, les noyaux des cellules ressortent en bleu-violet, tandis que les cytoplasmes et la matrice extracellulaire présentent différentes nuances de roses [15].

Les différentes lames sont comparées avec un contrôle sain (Figure 3.12) et pour chaque condition (formules et temps) une note a été attribuée (Tableau 3.7).

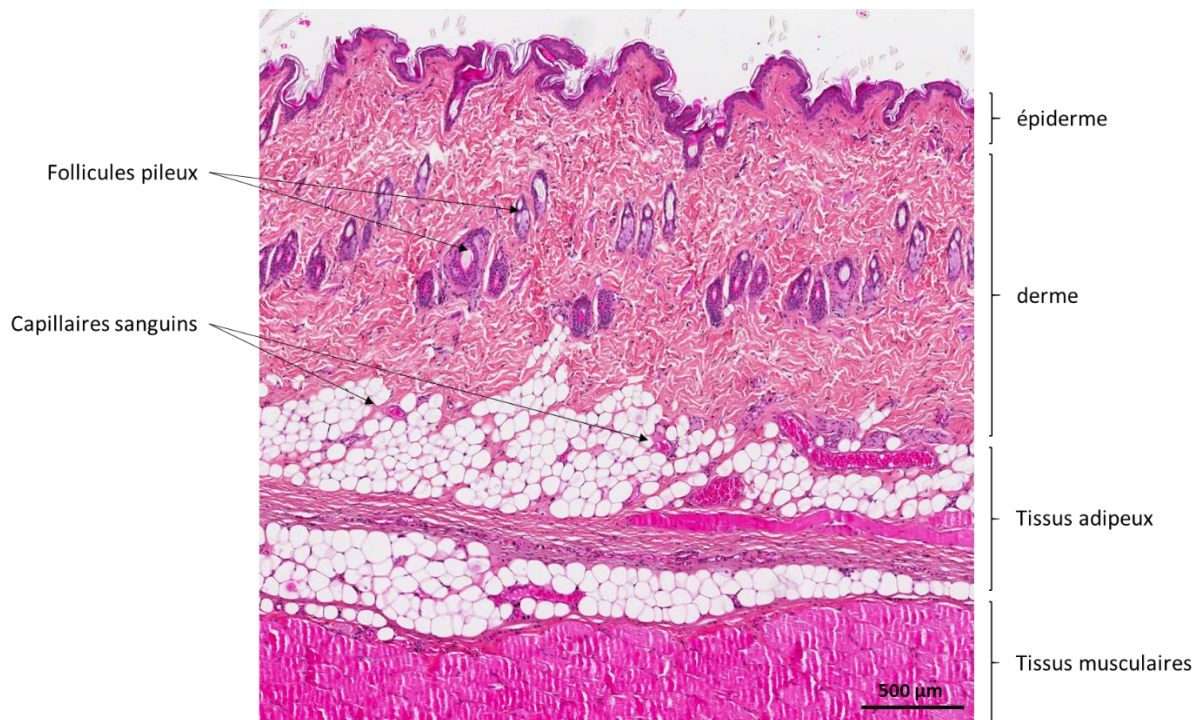


Figure 3.12 : Coupe histologique d'un tissu sous cutané non traité.

Tableau 3.7 : Réactions des tissus avoisinants les implants : injection sous-cutanée (500 μ L) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 mg.mL^{-1}), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS) chez des rats femelles (Sprague-Dawley). (n=3, moyenne \pm écart-type).

		Infiltration de leucocytes	Fibroblastes et dépôt de collagène	Néo-angiogénèse
1 jours	HS	+++	0	0
	Hydrogel	+++	0	0
	Organogel	+++	0	0
2 jours	HS	+++	0	0
	Hydrogel	+++	0	0
	Organogel	+++	0	0
4 jours	HS	+++	+/-	+/-
	Hydrogel	+++	+/-	0
	Organogel	+++	+	+/-
7 jours	HS	++	++	+
	Hydrogel	++	++	+
	Organogel	++	++	+
14 jours	HS	+	+++	++
	Hydrogel	+	+++	+++
	Organogel	+	+++	++
28 jours	HS	+/-	+++	++
	Hydrogel	+/-	+++	+++
	Organogel	+/-	+++	++

0 : normal, +/- : minimum, + : moyen, ++ : modéré et +++ : important

Dès les premières 24 heures, une réaction inflammatoire aiguë est observée pour les trois formules. La zone qui contenait la forme injectée est bien visible. Cette cavité ovoïde est vide de toute structure. En effet, les étapes de préparation du tissu ont conduit à l'élimination de la formule et aucun tissu vivant ne s'y est infiltré. La réaction inflammatoire se traduit par le recrutement de nombreux leucocytes tout autour du site d'injection. Ces cellules sont principalement composées de granulocytes neutrophiles et de quelques granulocytes éosinophiles. Plus ces cellules sont proches des marges de la cavité et plus elles sont concentrées. Les tissus avoisinants présentent également un œdème interstitiel qui semblent légèrement plus importants pour les formes gélifiées. Après 48 heures, les cavités contenant les formulations sont toujours bien délimitées et le recrutement des granulocytes se poursuit.

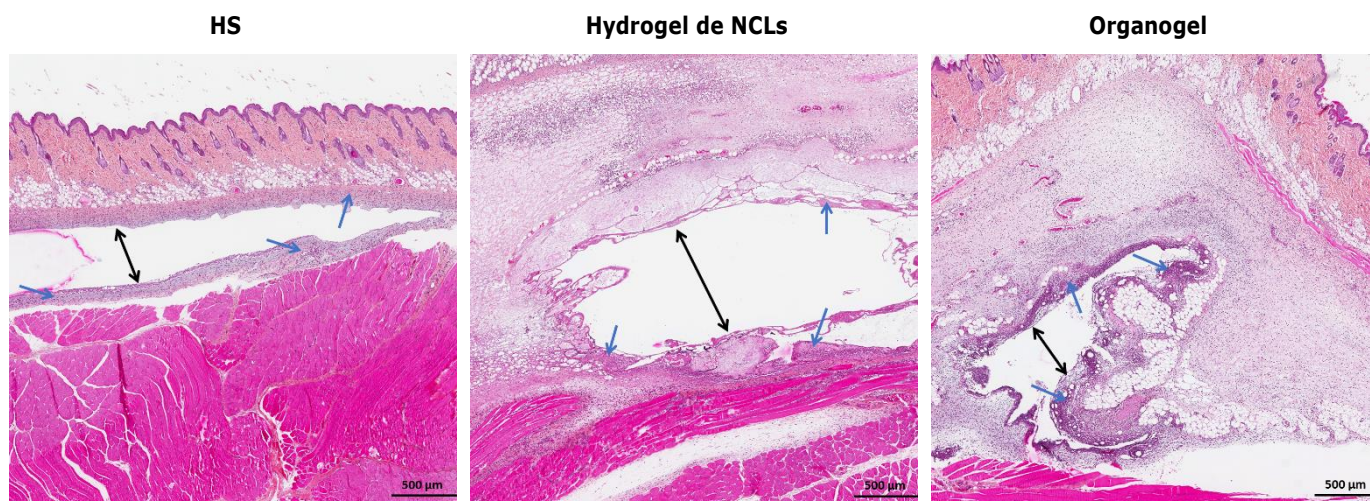


Figure 3.13 : Coupes histologiques représentatives des réactions tissulaires observés autour du site d'injection des implants au second jour : injection sous-cutanée (500 μ L) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 mg.mL^{-1}), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS) chez des rats femelles (Sprague-Dawley). Zone contenant la formule injectée (flèche noire), leucocytes (flèches bleues), vaisseaux sanguins (flèches rouges), capsule fibreuse (flèche verte).

A partir du quatrième jour d'observation, le nombre de leucocytes présents dans les tissus se stabilise et quelques fibroblastes apparaissent.

Après une semaine, les granulocytes commencent à diminuer et cèdent leur place aux macrophages. De plus, autour des formes implantées, les fibroblastes se multiplient. Les zones d'injection des formes organogel et huile de sésame gardent le même aspect de cavité vide et bien délimitée par contre l'espace contenant l'hydrogel de NCLs change d'aspect. En effet, la cavité se fragmente en plusieurs grandes vacuoles entre lesquelles des tissus vivants s'infiltrent.

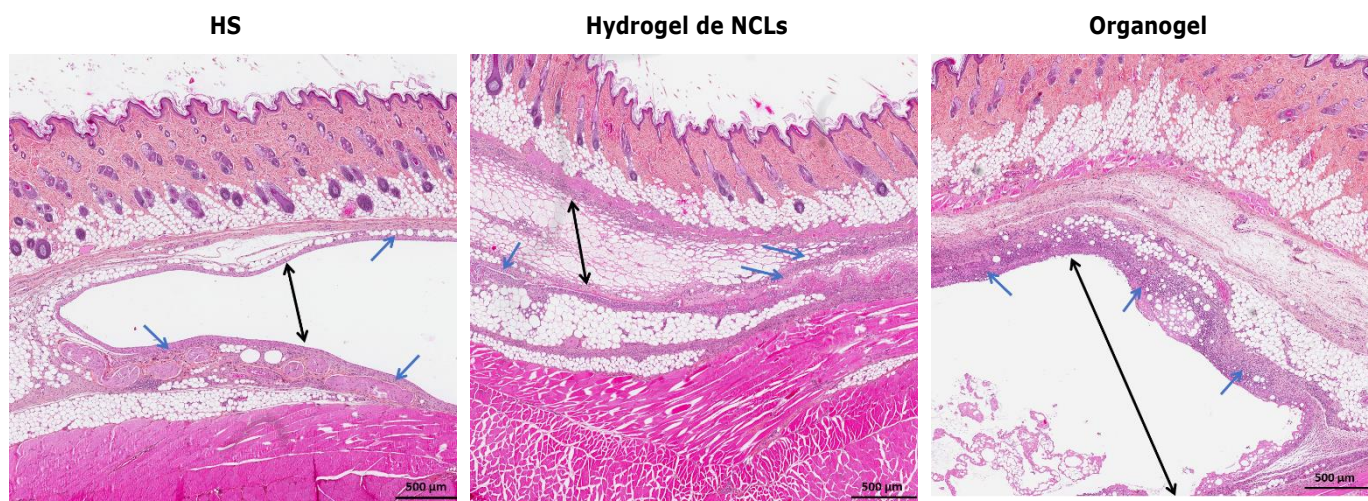


Figure 3.14 : Coupes histologiques représentatives des réactions tissulaires observés autour du site d'injection des implants au septième jour : injection sous-cutanée (500 μ L) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS) chez des rats femelles (Sprague-Dawley). Zone contenant la formule injectée (flèche noire), leucocytes (flèches bleues), vaisseaux sanguins (flèches rouges), capsule fibreuse (flèche verte).

Au quatorzième jour, les cavités qui contenaient l'organogel et l'huile de sésame sont toujours visibles et vides. Les formes hydrogels présentent un aspect de plus en plus infiltré par la matrice extracellulaire et quelques cellules. Les cavités vides ou non sont maintenant entourées d'une capsule fibreuse composée de fibroblastes et de dépôt de collagène. Quelques leucocytes, principalement des cellules mononuclées (macrophages et lymphocytes), sont encore retrouvés à l'intérieur et autour de cette capsule mais leur nombre reste modéré. De plus, des capillaires sanguins nouvellement formés peuvent être observés tout autour de l'implant.

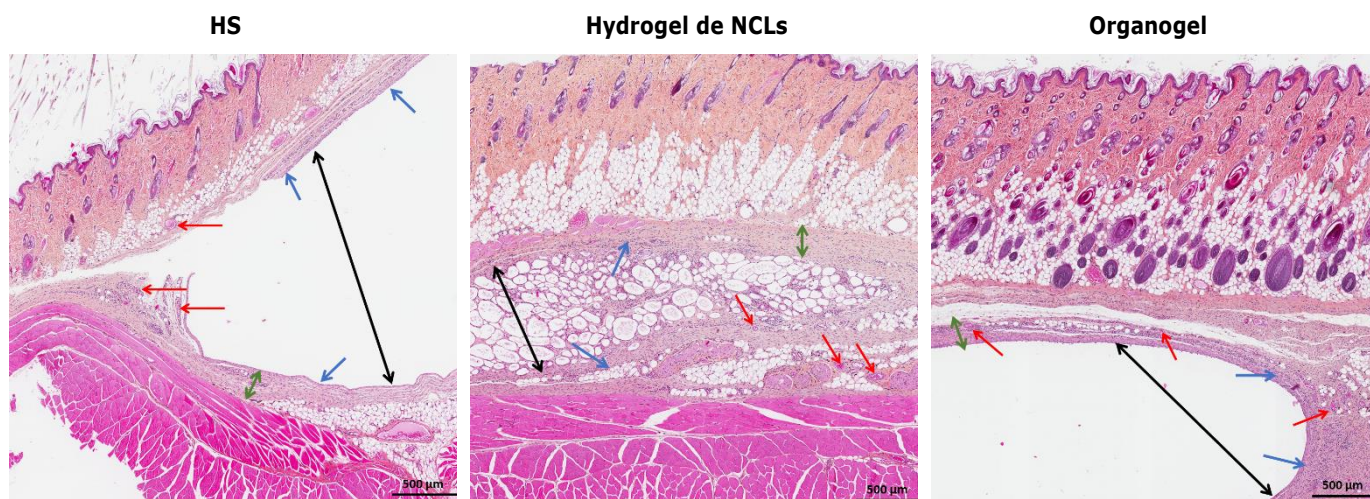


Figure 3.15 : Coupes histologiques représentatives des réactions tissulaires observés autour du site d'injection des implants au quatorzième jour : injection sous-cutanée (500 μ L) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS) chez des rats femelles (Sprague-Dawley). Zone contenant la formule injectée (flèche noire), leucocytes (flèches bleues), vaisseaux sanguins (flèches rouges), capsule fibreuse (flèche verte).

Le développement d'une fibrose conséquente autour des formules est classique des réactions inflammatoires de type réaction à corps étrangers. Le corps étranger est entouré par un granulome macrophagique composé de tissus fibreux et de macrophages qui tentent de phagocyter le corps étranger. Lorsque ce dernier est de taille importante les macrophages s'accumulent sur sa périphérie et finissent par fusionner ensemble sous la forme de cellules géantes (cellules de Müller). Dans la littérature, l'injection d'huile dans les tissus conduit à un oléome dans lequel le granulome macrophagique s'associe en général à une fibrose rétractile marquée [16].

A la fin de l'étude, quatre semaines après leur administration, les cavités contenant l'huile et l'organogel sont toujours bien délimitées et acellulaires. Elles sont entourées d'une capsule fibreuse. Les hydrogels présentent, quant à eux, un aspect de plus en plus fragmenté et infiltré par des cellules. Cependant, la zone d'injection est également entourée d'une capsule de fibroblastes.

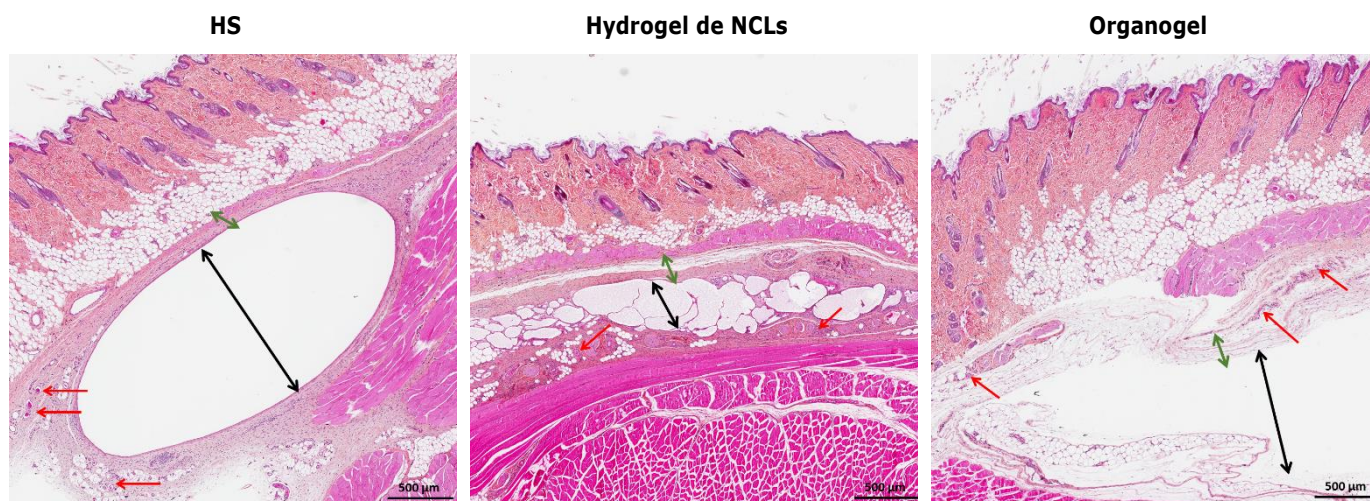


Figure 3.16 : Coupes histologiques représentatives des réactions tissulaires observés autour du site d'injection des implants au vingt-huitième jour : injection sous-cutanée (500 μ L) d'hydrogel de NCLs (NCLs de 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) à la concentration de 410,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), d'organogel (contenant 1% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac})) ou d'huile de sésame (HS) chez des rats femelles (Sprague-Dawley). Zone contenant la formule injectée (flèche noire), leucocytes (flèches bleues), vaisseaux sanguins (flèches rouges), capsule fibreuse (flèche verte).

Durant la semaine qui suit leur injection, les hydrogels de NCLs et les organogels testés provoquent une première phase d'inflammation aiguë qui est suivie par une phase sub-chronique/chronique. Cette réaction inflammatoire est locale et ne présente pas de signe de gravité associé. Par ailleurs, le traumatisme induit par le passage de l'aiguille lors de l'injection participe également au déclenchement de l'inflammation aiguë. Enfin, les formes utilisées ont été réalisées dans des conditions propres mais non parfaitement aseptiques, ce qui a pu également augmenter la réaction inflammatoire. Bastiat *et al.* ont développé des formes organogels à base d'huile de carthame en administration SC, pour libérer la rivastigmine, qui est un PA utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Ces organogels réalisés et administrés en condition aseptique, ont présenté une réponse inflammatoire de type corps étranger, comparable en intensité à celle que nous observons [17]. Par ailleurs, le contrôle composé d'huile de sésame provoque les mêmes réactions que les deux formes gélifiées. L'huile de sésame est actuellement un excipient utilisé pour des formes destinées à une injection parentérale. Ainsi, les réactions provoquées par les deux plateformes gélifiées semblent acceptables.

Cette étude a été réalisée sur une période d'un mois, qui n'est pas suffisante pour observer la dégradation complète des formes injectées. Une étude de plus longue durée serait intéressante pour étudier le devenir des gels ainsi que la cicatrisation de tissus les entourant. L'utilisation de modèles animaux supplémentaires permettrait également d'élargir cette étude de tolérance.

VIII. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des plateformes gélifiées développées dans le chapitre II, en vue de leur utilisation en tant que forme injectable.

Plusieurs résultats importants ont été obtenus :

1. Les hydrogels de NCLs conservent leurs propriétés viscoélastiques sur une période de 6 mois ;
2. L'injection des hydrogels de NCLs est possible avec une seringue munie d'une aiguille (18, 21 ou 26 G) sans altérer leur structure ;
3. Aucune toxicité supplémentaire n'a été observée lorsque les NCLs sont modifiées par la Cyt-C16 ;
4. L'étude de la libération des NCLs montre que celle-ci est prolongée par rapport à une forme suspension.

Ces trois dernières particularités, prouvées *in vitro*, font des hydrogels de NCLs des candidats particulièrement intéressants pour être utilisés comme forme injectable permettant une libération prolongée. Cependant l'intégrité des NCLs lorsqu'elles sont conservées plusieurs mois sous leur forme gélifiée reste à vérifier. En effet, après un mois de conservation, une augmentation des valeurs de Z-average et de PdI des NCLs a été montrée. A ce jour, nous n'avons pas pu prouver si cette altération est liée à une mauvaise redispersion des NCLs ou une réelle modification de leur forme.

Enfin, une étude de tolérance a été menée chez des rats femelles, pendant 1 mois, après que les formes hydrogels de NCLs et organogels aient été injectées en SC. D'une manière générale, les implants ne modifient pas l'état général de santé des animaux (masse corporelle, comportement, bilans biochimique et hématologique). L'observation des tissus entourant les implants (hydrogels de NCLs ou organogel) montrent une réaction inflammatoire localisée et séparée en deux temps : une réaction inflammatoire aiguë durant 48 h *post* administration, suivi d'une inflammation sub-chronique. Ce processus inflammatoire correspond à une inflammation de type corps étranger et est comparable avec la réponse induite par l'injection dans les mêmes conditions d'huile de sésame, qui est un excipient autorisé pour les préparations injectables. Il est important de noter que seul les implants hydrogels de NCLs présentent une infiltration par des tissus biologiques contrairement aux formes lipidiques. Ce qui pourrait être dû à sa composition contenant une phase aqueuse importante ou à la libération progressive de NCLs. Cette particularité peut présager une meilleure cicatrisation des tissus après la résorption complète du gel. L'étude de tolérance a été menée sur une période d'un mois qui n'est pas suffisante pour conduire aux complètes résorptions de l'hydrogel de NCLs et de l'organogel. Une étude plus longue devra donc être menée pour la compléter. Par ailleurs, la formation d'une capsule fibreuse autour du gel durant la phase d'inflammation sub-chronique

pourrait occasionner une variation des profils de libération des PAs. Cette question pourra être résolue en réalisant une étude pharmacocinétique de ces formes.

Dans ce chapitre, les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus pour les hydrogels de NCLs et les organogels sont prometteurs pour permettre leur utilisation en tant que plateforme de libération de PAs. Dans les deux prochains chapitres, deux applications utilisant les formes hydrogels de NCLs seront abordées.

IX. Bibliographie

- [1] E. Moysan, Y. González-Fernández, N. Lautram, J. Béjaud, G. Bastiat, J.P. Benoit, An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure, *Soft Matter*. 10 (2014) 1767–1777.
- [2] The dissolution procedure: development and validation, Monograph, The United States Pharmacopeial Convention. 2011.
- [3] S.S. Iyer, W.H. Barr, H.T. Karnes, Profiling *in vitro* drug release from subcutaneous implants: a review of current status and potential implications on drug product development, *Biopharm Drug Dispos*. 27 (2006) 157–170.
- [4] D.J. Burgess, D.J.A. Crommelin, A.S. Hussain, M.L. Chen, Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report, *AAPS PharmSci*. 6 (2015) 100–111.
- [5] H.M. Kinnunen, V. Sharma, L.R. Contreras-Rojas, Y. Yu, C. Alleman, A. Sreedhara A, S. Fischerc, L. Khawlie, S.T. Yohed, D. Bumbacae, A novel *in vitro* method to model the fate of subcutaneously administered biopharmaceuticals and associated formulation components, *J Control Release*. 214 (2015) 94–102.
- [6] N. Fogh-Andersen, B.M. Altura, B.T. Altura, O. Siggaard-Andersen, Composition of interstitial fluid, *Clin Chem*. 41 (1995) 1522–1525.
- [7] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J Intern Med*. 242 (1997) 27–33.
- [8] G. Bastiat, C.O. Pritz, C. Roider, F. Fouchet, E. Lignières, A. Jesacher, R. Glueckert, M. Ritsch-Marte, A. Schrott-Fischer, P. Saulnier, J.P. Benoit, A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging, *J Control Release*. 170 (2013) 334–342.
- [9] C. Simonsson, G. Bastiat, M. Pitorre, A.S. Klymchenko, J. Béjaud, Y. Mély, J.P. Benoit, Inter-nanocarrier and nanocarrier-to-cell transfer assays demonstrate the risk of an immediate unloading of dye from labeled lipid nanocapsules, *Eur J Pharm Biopharm*. 98 (2016) 47–56.
- [10] S.R. Hingorani, L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramaudt, R.H. Hruban, A.K. Rustgi, S. Chang, D.A. Tuveson, Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice, *Cancer Cell*. 7 (2005) 469–483.
- [11] R.E. Stopczynski, D.P. Normolle, D.J. Hartman, H. Ying, J.J. DeBerry, K. Bielefeldt, A.D. Rhim, R.A. DePinho, K.M. Albers, B.M. Davis, Neuroplastic changes occur early in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Res*. 74 (2014) 1718–1727.
- [12] G. Le Roux, H. Moche, A. Nieto, J.P. Benoit, F. Nesslany, F. Lagarce, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules, *Toxicol In Vitro*. 41 (2017) 189–199.
- [13] AFSSAPS – Groupe de travail « innovation non clinique », Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire. 2011.
- [14] F. Descat, Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme, thèse de l'école nationale vétérinaire de Toulouse. 2002.
- [15] A.H. Fischer, K.A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller, Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections, *CSH Protoc*. (2008) pdb.prot 4986.
- [16] Collège Français des Pathologistes (CoPath). La réaction inflammatoire : Les inflammations, consulté en ligne en mars 2017 à l'adresse suivante : http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_3/site/html/4.html.
- [17] G. Bastiat, F. Plourde, A. Motulsky, A. Furtos, Y. Dumont, R. Quirion R, G. Fuhrmann, J.C. Leroux, Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer's disease, *Biomaterials*. 31 (2010) 6031–6038.

Chapitre IV :

Devenir des nanocapsules lipidiques après leur injection sous-cutanée.

SOMMAIRE

I. AVANT-PROPOS	136
II. PUBLICATION: PASSIVE AND SPECIFIC TARGETING OF LYMPH NODES : THE INFLUENCE OF THE ADMINISTRATION ROUTE	138
III. BIBLIOGRAPHIE	146

I. Avant-propos

Les hydrogels de NCLs développés se destinent à être administrés localement ou en sous-cutanée. Injectés en sous-cutanée (SC), ils forment un dépôt sous la peau à partir duquel les NCLs se détachent progressivement pour être libérées. Les injections SC sont faciles à mettre en œuvre et le patient peut être formé à réaliser ce geste lui-même. Pourtant cette voie n'est relativement que peu envisagée dans les recherches en nanomédecines. Ainsi, les injections SC de NCLs n'ont été testées *in vivo* qu'avec deux actifs : la Gem-C12 dans le cadre i) de la restauration d'une réponse immunitaire dans des modèles tumoraux de lymphome et de mélanome (en ciblant de manière spécifique une sous-population de cellules immunitaires : les « *myeloid-derived suppressor cells* » ou MDSC) [1] ou ii) dans le traitement de métastases dans le médiastin de tumeurs bronchiques non à petites cellules [2] et l'ivermectine pour le développement d'un traitement antiparasitaire [3].

A ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur le devenir des NCLs après leur injection SC. L'utilisation des formes hydrogels de NCLs va permettre la libération des NCLs dans le tissu sous-cutané, il est donc primordial de connaître le devenir des NCLs pour ensuite pouvoir proposer des applications thérapeutiques adaptées. La forme hydrogel n'étant pas administrable par voie intraveineuse (IV), nous avons d'abord réalisé une étude sur les formes suspensions afin de pouvoir comparer les injections SC et IV.

Le devenir des NCLs a donc été étudié en injectant en SC et en IV des formes suspensions chez le rat (Sprague Dawley). Différents sites d'injection SC ont également été comparés. Les pharmacocinétiques et biodistributions des NCLs ont été établies sur une période de quatre semaines. Les NCLs étaient suivies grâce à une sonde fluorescente : le 1,1'-dioctadécyl-3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine 4-chlorobenzènesulfonate (DiD).

Etonnamment, les profils pharmacocinétiques ont montré que quasiment aucune NCLs n'est retrouvée dans la circulation sanguine après une injection SC. La taille des NCLs semble les empêcher de pouvoir rejoindre les capillaires sanguins à partir du tissu sous-cutané. Par contre, l'injection IV permet de retrouver des NCLs à la fois dans la circulation sanguine et dans tous les organes prélevés (foie, rate, ganglions lymphatiques). Après une injection SC, les ganglions lymphatiques sont principalement et majoritairement ciblés par les NCLs.

L'injection SC permet une séquestration des NCLs dans la circulation lymphatique dont elles suivent le flux. Ainsi le site d'administration a également une importance car les NCLs ne pourront atteindre que les ganglions lymphatiques présents en aval de la circulation lymphatique à partir du site d'injection. Cette circulation est ascendante dans l'animal. Elle part des membres inférieurs en remontant vers le thorax,

ce qui signifie qu'une injection SC au niveau de la queue a permis de cibler un plus grand nombre de ganglions qu'une injection derrière la nuque du rat. Par ailleurs, dépendant du site d'injection SC, ce ciblage « passif » des ganglions lymphatiques est plus spécifique qu'avec une injection IV.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *European Journal of Nanomedicine* » en 2015 [4].

II. Publication: Passive and specific targeting of lymph nodes : the influence of the administration route

DE GRUYTER

Eur. J. Nanomed. 2015; 7(2): 121–128

Marion Pitorre, Guillaume Bastiat*, Elodie Marie dit Chatel and Jean-Pierre Benoit

Passive and specific targeting of lymph nodes: the influence of the administration route

Abstract: Patients diagnosed with an advanced-stage cancer present a dismal prognosis due to the presence of metastases. From the primary tumor, the cancer cells are disseminated via lymphatic circulation; metastases develop initially in lymph nodes. Therefore, the targeting of lymph nodes needs to be improved in the design of future chemotherapy, and one way to ensure this targeting is by using the subcutaneous (SC) route. Using lipid nanocapsules (LNCs) (40 nm and fluorescently-labeled with DiD) as nanocarriers, a correlation between the SC injection site (behind the neck, the right and left flanks, and above the tail) for LNC administration and specific lymph node accumulation (left and right cervical, axillary and inguinal lymph nodes) was achieved for Sprague-Dawley rats. The pharmacokinetic and biodistribution profiles confirmed the absence of LNCs in systemic circulation after SC administration due to the optimal size of the LNCs. With appropriate SC administration, LNCs can accumulate in specific lymph nodes, whereas IV administration led to a weak accumulation of LNCs in all lymph nodes. Specific accumulation followed the lymph flow: bottom-up from the lower to upper limbs and top down from the head, with two lymph circulation partitions: right upper limb and the rest. Administration above the tail presented high inguinal and axillary lymph node accumulation whereas weak accumulation was observed after administration behind the neck. LNCs administered in the left flank only accumulated in the left inguinal and axillary lymph nodes, whereas left and right inguinal and axillary lymph nodes presented accumulation after administration in the right flank. Cervical lymph nodes, in the opposite direction of lymph flow, were never targeted after SC administration, whatever the injection site.

Keywords: lipid nanocapsules; lymph-node targeting; subcutaneous administration.

DOI 10.1515/ejnm-2015-0003

Received January 8, 2015; accepted March 16, 2015

Introduction

In the USA, in 2014, cancer was the leading cause of death and was responsible for the death of 1600 people per day (1). The main explanation is poor treatment efficacy, in spite of recent improvements [the 5-year relative survival rate for all cancer types increased from 49% to 68% between 1975 and 2009 (1)], because the early detection of cancer is very difficult to achieve. For example, pancreatic cancer usually develops without any symptoms in the early stages, and only 9% of pancreatic cancer is diagnosed as non-metastatic cancer (1). Breast, colon, lung and prostate cancers generally include some lymph-node metastases, and these four types of cancer are themselves responsible for almost half (47%) of all cancer deaths (1). The presence of metastases in lymph nodes is always a dismal prognosis for patients. Metastasis formation results in the migration of cancer cells from the primary tumor. Two ways are considered for cancer cell dissemination: via the blood circulation and the lymphatic system. Although systemic circulation is often more readily accessible to tumor cells, the lymphatic system gives a better chance for metastasis formation. Firstly, the smallest lymphatic vessels are broader than blood capillaries and the lymph moves slowly. Secondly, lymphatic fluid and interstitial fluid have an almost identical composition, so the lymph encourages tumor cell viability and proliferation. Finally, lymph nodes can be compared to cell incubators: lymph nodes enable the stagnation of cancer cells and exchanges with blood (2, 3).

Currently, the treatment of lymph node metastases is the conventional surgical resection of the lymph nodes, often leading to complications such as pain, infection, and lymphedema (1, 4). Moreover, the role of lymph nodes in immune response against cancer is not well-known, and their suppression can prove to be an obstacle to patient

*Corresponding author: Guillaume Bastiat, LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France, Phone: +33 244 688531, Fax: +33 244 688546, E-mail: guillaume.bastiat@univ-angers.fr
Marion Pitorre, Elodie Marie dit Chatel and Jean-Pierre Benoit: LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France

recovery. When tumors spread beyond the sentinel nodes, patients are no longer surgical candidates because metastasis resection often becomes impractical and inefficient. In these cases, standard treatment is by systemic chemotherapy (1, 4). However, the lymphatic system is not easily accessible by conventional intravenous chemotherapy, which limits treatment efficacy (5). Additionally, chemotherapy is responsible for many side effects and poor compliance. For all these reasons, the targeting of metastases in lymph nodes can play a key role to improve cancer treatment. Over the last 2 years, there have been various studies focusing on the targeting of lymph nodes and the lymphatic system. Kono and collaborators developed specific antigen-loaded liposomes to activate the immune response system against tumor cells. These liposomes had their surface modified with a pH-sensitive polymer, with the objective of promoting antigen release in the endosomes of dendritic cells, and to encourage cross presentation for T cell activation (6, 7). Others studies used nanoparticles to release luciferin and allowed the *in vivo* imaging of lymph-node metastases (8), and the release of immunostimulating agents for vaccination (9) or against autoimmune diseases (10). The subcutaneous (SC) administration of the treatment was the common administration route for lymph-node targeting, and the injections were performed in the vicinity of the target.

The goal of this study was to provide a correlation between SC sites for nanocarrier administration and specific lymph-node accumulation. The choice of the nanocarrier was lipid nanocapsules (LNCs). This nanocarrier was obtained using a solvent-free phase-inversion process and was composed of a lipid core and a PEGylated surfactant shell. Numerous studies have reported the use of LNCs with intravenous (IV) or local brain administration (11, 12), but no data have been published using SC administration. Pharmacokinetic and biodistribution profiles were established after SC administration, using four various injection sites: behind the neck, the right and left flanks, and above the tail. IV administration was used as a control. Right and left inguinal, axillary and cervical lymph nodes were chosen as organs of interest. For this purpose, fluorescence labeling, using DiD, was performed to monitor LNC distribution.

Materials and methods

Materials

Labrafac® WL 1349 (caprylic–capric acid triglycerides) was provided by Gattefossé® S.A. (Saint-Priest, France). Kolliphor® HS15 (a mixture of free polyethyleneglycol 660 and polyethyleneglycol 660

hydroxystearate) was supplied by BASF (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride and acetone were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Span® 80 (sorbitane monooleate) was purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate (DiD) was provided by Life Technologies (Saint-Aubin, France). Water was obtained from a MilliQ filtration system (Millipore, Paris, France).

Preparation of the formulations and characterization

The LNC technology was prepared following the phase-inversion temperature (PIT) process (13). Briefly, 750 µL of DiD dissolved in acetone (1 mg/mL) and acetone was evaporated before the addition of Labrafac® WL 1349 (0.75 g), Kolliphor® HS15 (1.25 g), Span® 80 (0.25 g), NaCl (0.045 g) and water (1.02 g). All were then mixed and heated to 75°C under magnetic stirring followed by cooling to 45°C (rate of 5°C/min). This cycle was repeated three times, and during the final cooling at about 60°C, a sudden dilution with 2 mL room-temperature water was added to dilute the emulsion and form DiD-loaded LNCs. The resulting formulation was filtered (0.22 µm filter) and syringes with a 28-Gauge needle were filled with the LNC suspension. A non-loaded LNC suspension was also prepared as reported previously without the first DiD addition step.

The hydrodynamic diameter (Z-average), the polydispersity index (PDI) and the zeta potential of DiD-loaded LNCs were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer® Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). LNC-based formulations were diluted 1:60 (v/v) in deionized water. The curve fittings of the correlation functions were performed using an exponential fit (Cumulant approach) for Z-ave and PDI determinations for LNC suspensions. Smoluchowski's model was used to obtain the zeta potential value. Each measurement was done in triplicate at 25°C. Fluorescence measurements were assessed to control the DiD loading in LNCs, using a microplate reader Fluoroscan Ascent® (Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France). Filter pairs with adequate excitation and emission wavelength couples (λ_{ex} – λ_{em}) were used, i.e., 646–678 nm, respectively. Titration curves with DiD dissolved in Labrafac® WL 1349 was performed to evaluate the encapsulation rate.

Animals

For *in vivo* studies, female Sprague-Dawley rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) (n=120) were housed and maintained at the university animal facility (SCAHU) in disposable plastic cages (4 animals per cage) containing environmental enrichment, with hardwood chip bedding, along with water and food *ad libitum*. The cages were maintained in an air-conditioned room with a 12-h-light-12-h-dark cycle. All the animal experiments were carried out in accordance with EU Directive 2010/63/EU and with the agreement of the "Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale des Pays de la Loire" (authorization CEEA; 2012-37 and 2012-73).

Pharmacokinetic and biodistribution studies

Rats (9 weeks old, n=24 for each group) were anesthetized (isoflurane) and 500 µL of DiD-loaded LNC suspensions were injected

intravenously into the tail vein or subcutaneously behind the neck, in left and right flanks or above the tail. From 30 min. to 24 h, about 300 μL of blood was removed from the lateral tail vein into a collection tube containing Li-heparin (Tube Micro from Sarstedt, Marnay, France). In addition, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days post administration, 4 rats per group were sacrificed by carbon dioxide asphyxia. Blood, organs (i.e., liver and spleen) and lymph nodes (i.e., left and right inguinal, axillary and cervical lymph nodes) were removed. The lymph node removal was performed as described by Tilney et al. (14).

For pharmacokinetic studies, each blood sample was diluted by a factor of 2 with deionized water. The DiD concentrations (loaded inside LNCs) in blood over time were determined using the microplate reader at the excitation and emission wavelengths previously described, using extrapolation from the linear titration curve ($r^2=0.988$). The titration curve was established by mixing the DiD-loaded LNC suspension (250 μL) and fresh blood from rats (250 μL), with final DiD concentrations ranging from 0.05 to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The DiD concentration in blood was normalized in function of animal weight, assuming blood represents 64 mL/kg of rat body weight (15), and was reported as the percentage of the injected dose. The trapezoidal method was used to determine the area under the curve (AUC) during the whole experimental period.

For the biodistribution study, all organs and lymph nodes were analyzed by a fluorescence CRI Maestro™ imaging system (Woburn, USA). Semi-quantitative data were obtained by using a time exposition of 10 ms between 630 and 800 nm. The software Maestro 2.10 (Woburn, USA) was used to calculate the average signal expressed in photons/cm²/s.

Results

LNC-based formulation

LNCs were obtained with the phase-inversion temperature method (13) and are composed of an oily core (Labrafac® WL 1349) surrounded by an organized assembly made of sorbitan oleate (Span® 80) and PEGylated surfactants (Kolliphor® HS15) with the PEG chains oriented towards the aqueous phase. The DiD-loaded LNC diameter was 38 ± 6 nm (Z-average). The PDI was 0.12 ± 0.05 , i.e., a monomodal and monodispersed distribution. The zeta potential of the nano-objects was slightly negative (-4 ± 1 mV). The wavelength of Zetasizer® Nano Series DTS 1060 laser beam used for the physico-chemical parameter analysis is close to the DiD wave length excitation, and the autocorrelation function is not optimal to determine the LNC size using the Cumulant approach or others methods. To confirm the DiD-loaded LNC parameters, non-loaded LNCs were prepared and the Z-Ave, PDI and zeta potential were found to be similar to those obtained with DiD-loaded LNCs. Fluorescence analysis confirmed the total encapsulation of DiD inside LNCs as previously reported for others lipophilic carbocyanine dyes (16).

LNC pharmacokinetics vs. injection sites and administration routes in healthy rats

The pharmacokinetic profiles of fluorescent-labeled DiD-loaded LNCs was examined after intravenous (IV) and subcutaneous (SC) administration in Sprague-Dawley rats (Figure 1). Four sites were chosen for SC injections: behind the neck, in the right and the left flanks, and above the tail, whereas the tail vein was selected for IV injection. IV pharmacokinetic profile was standard, with a first distribution phase followed by the elimination step. The percentages of injected dose of 1, 0.25 and <0.15% were recovered 1, 3 and 7-days post administration, respectively. It corresponded to an AUC of 11 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. After SC administration, the blood exposition of DiD-loaded LNC was much lower. The percentages of the injected dose were always lower than about 0.4% whatever the post-administration time and the injection site. It corresponded to an AUC of 0.008, 0.008, 0.005 and 0.007 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ when the formulation was subcutaneously injected behind the neck, in the right flank, in the left flank and above the tail, respectively, i.e., a decrease by a mean factor of about 1600.

LNC biodistribution vs. injection sites and administration routes in healthy rats

To complete the pharmacokinetic study, the biodistribution of DiD-loaded LNCs was assessed after IV and SC administrations in Sprague-Dawley rats. Semi-quantitative

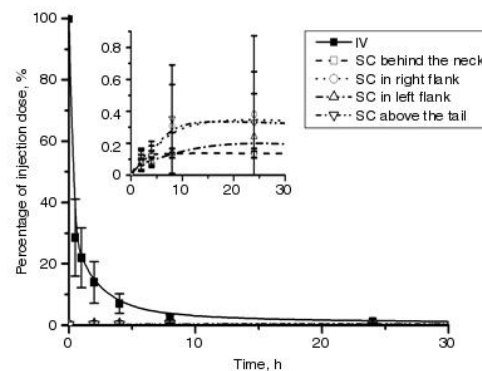


Figure 1: Pharmacokinetic profiles (% of administered dose of DiD vs. time) of DiD-loaded lipid nanocapsules (LNCs) in healthy Sprague-Dawley rats, after intravenous (IV) administration in the tail vein and subcutaneous (SC) administrations behind the neck, in the right flank, in the left flank and above the tail ($n=4$, mean \pm SD).

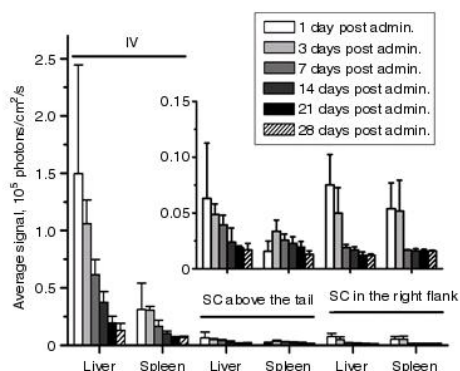


Figure 2: Biodistribution profiles of DiD-loaded lipid nanocapsules (LNC) in healthy Sprague-Dawley rats, after intravenous (IV) administration in the tail vein and subcutaneous (SC) administration in the right flank and above the tail. Semi-quantification of the fluorescence signals of the removed liver and spleen using fluorescence images at various times post LNC administration (1, 3, 7, 14, 21 and 28 days) ($n=4$, mean \pm SD).

fluorescence signals for liver and spleen extracted after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days are reported in Figure 2. One day after IV administration, high DiD accumulation in the liver and spleen were visible, followed by a continuous decrease in the average fluorescence signal until 28 days. After SC administration in the right flank and above the tail, a very low accumulation was observed in the liver and spleen one day after administration and throughout the study. Whatever the time, all average fluorescence signals were lower than values observed 28 days post IV administration. Similar results were observed after SC administration in the left flank and behind the neck of the animal (data not shown). The high LNC accumulation in the liver and spleen after IV administration were consistent with the numerous published data using LNC (17, 18). In addition, the differences in the LNC biodistribution profiles after IV and SC administration were correlated to the pharmacokinetic profiles, since a very low fraction of LNCs reached systemic circulation after SC administration whereas the total injected dose was in the blood after IV administration (Figure 1).

Left and right cervical, axillary and inguinal lymph nodes were also extracted and the fluorescence signal was analyzed after the IV (Figure 3A) and SC (above the tail, in the right flank, in the left flank, and behind the neck in Figure 3B, 3C, 3D and 3E, respectively) administrations.

After IV administration, the DiD accumulation was distributed in a homogeneous fashion in all lymph nodes studied, with a fairly limited fluorescence signal,

whereas SC administration produced specific accumulation depending on the injection site. Cervical lymph nodes were never targeted by LNCs regardless the site of SC administration. After administration behind the neck, only the axillary lymph nodes (right and left) were preferentially targeted by LNC. However this accumulation presented low fluorescence values compared to the other injection sites. The rats that had received an injection above the tail, presented a highly homogenous fluorescence in inguinal and axillary lymph nodes on both sides of the animal. LNCs subcutaneously delivered in the left flank accumulated exclusively in the left side lymph nodes, and mostly in the axillary lymph node. Finally, after right flank administration, LNCs were spread over both sides of the animal.

Discussion

This study was carried in order to understand LNC circulation in the animal body, focusing on the specific targeting of lymph nodes after SC administration from various injection sites. The monitoring of LNCs was possible to assess the pharmacokinetic and biodistribution profiles and to make comparisons with IV administration, by using fluorescent-labeled LNCs. For this purpose, DiD was encapsulated in LNCs because the fluorescence and physico-chemical properties of DiD supported the choice of this fluorescence labeling. It is highly fluorescent in lipophilic nanocarriers and weakly fluorescent in aqueous media (19); the auto-fluorescence wavelength emitted by animals is limited because it is a near-infrared fluorophore (20, 21), and there is a strong fluorescence labeling stability of the nanocarrier (no DiD release even in favorable media) (16).

The SC administration of nanocarriers to deliver anticancer treatment is a promising alternative to conventional IV administration for lymph-node targeting. Indeed, nanoparticles are small enough to travel through the aqueous channels of the interstitial tissue, but large enough to prevent their absorption into the blood. Size is a fundamental parameter to reach the lymphatic circulation system. With diameter <10 nm, nanoparticles are mainly absorbed into the blood stream. When larger than 100 nm, they do not spread through the lymphatic system, and remain trapped in interstitial tissue (2, 3). Moreover, it has been observed that lipid compositions for nanocarriers improve lymphatic uptake efficiency, and that PEGylated surface modification can improve lymph node targeting (2, 3). Based on such observations, the LNCs used for this

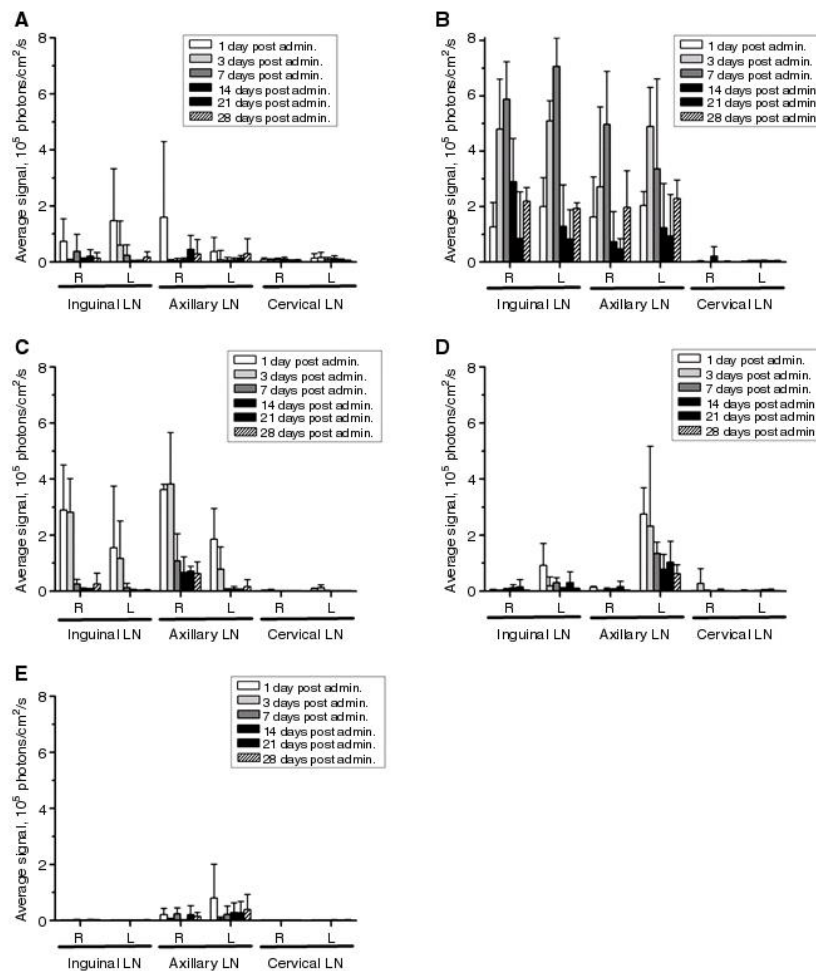


Figure 3: Biodistribution profiles of DiD-loaded lipid nanocapsules (LNCs) in healthy Sprague-Dawley rats, after (A) intravenous (IV) administration in the tail vein and subcutaneous (SC) administrations (B) above the tail, (C) in the right flank, (D) in the left flank and (E) behind the neck. Semi-quantification of the fluorescence signals of the removed right (R) and left (L) inguinal, axillary and cervical lymph nodes (LN) using fluorescence images at various times post LNC administration (1, 3, 7, 14, 21 and 28 days) ($n=4$, mean \pm SD).

study have been identified as good candidates to target the lymphatic system after SC administration: i) the size of the LNCs was about 40 nm, which is in the optimal size range; ii) the LNC core and shell were composed of triglyceride and PEGylated surfactant.

To determine a correlation between the SC administration sites and the targeted lymph nodes, the formulations were administered to rats in five different ways: IV administration in the tail vein, and SC administration behind the neck, on the right and left flanks, and above the tail.

Two behaviors were observed after IV and SC administrations. The distribution of LNCs after IV injection was not specific and related to all the body as all the lymph nodes were targeted (Figures 3A and 4A). The accumulation in all lymph nodes was weak in comparison to the accumulation observed after SC administration. SC administrations enabled sequestration in the lymphatic system and specific lymph node targeting (Figure 3B to 3E), without absorption in the blood stream, preventing the accumulation of LNCs in the liver and spleen (Figures 1 and 2).

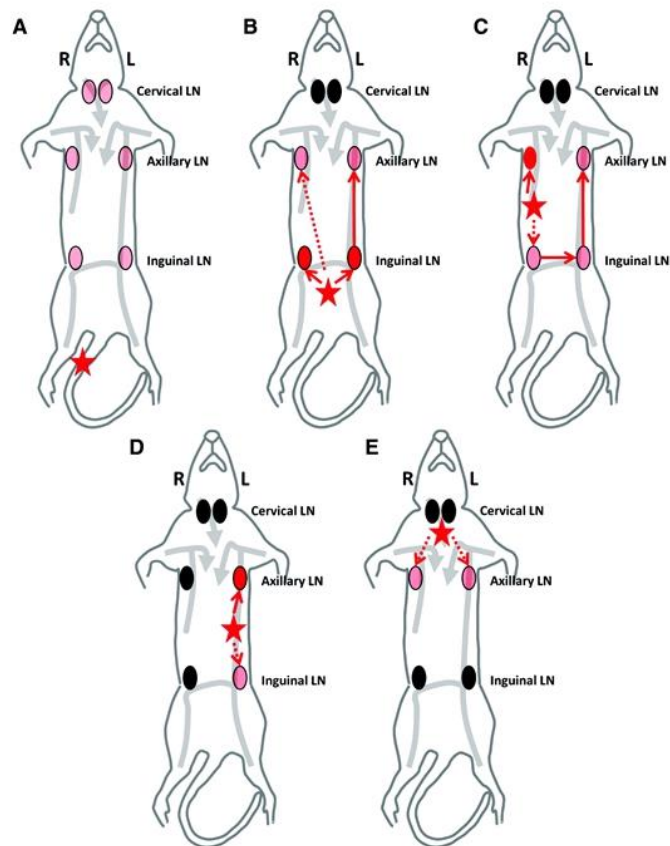


Figure 4: Biodistribution profiles of DiD-loaded lipid nanocapsules (LNC) in healthy Sprague-Dawley rats, after (A) intravenous (IV) administration in the tail vein and subcutaneous (SC) administration (B) above the tail, (C) in the right flank, (D) in the left flank and (E) behind the neck. Diagrams of the animals in dorsal *decubitus* with the localization of LNC administration (star), lymph flow (grey arrows), direct accumulation (solid red arrows) or passive spreading (dot red arrows) for LNC distribution, and positions of the lymph nodes (oval).

In addition to lymph-node targeting efficacy, SC administration was a promising alternative to conventional IV administration to avoid severe side effects due to too much systemic exposure to chemotherapeutics. Using gemcitabine-loaded LNCs, recent results have shown that SC administration reduced the myelosuppression that is observed after IV administration (22), at the same dose.

Differences observed for LNC biodistribution after the four SC administrations can be explained by the anatomy of the lymphatic system. The lymphatic system is separated into two parts: a right part which drains only the head and the right upper limb, and a left part for the other upper limb and lower limbs (grey arrows in Figure 4A to 4E).

The lymph flow is bottom-up from lower to upper limbs and top down from the head, since the lymph returns in the blood via the subclavian vein (14, 23, 24). The distribution of LNCs after SC administration followed the direction of lymph circulation. When LNCs were administered behind the neck, cervical lymph nodes, even close to the administration site, were not targeted (in the opposite direction of the lymph flow) even with passive spreading. Similar results were obtained for the other SC administration sites. Nevertheless, a low accumulation was observed in the right and left axillary lymph nodes, due to partial passive spreading in the opposite direction of the lymph flow. No accumulation was observed in the two inguinal

lymph nodes, that were too far from the injection site for passive spreading (Figure 4E). When administered above the tail, a high direct distribution of LNCs was observed in the left and right inguinal lymph nodes, followed by a direct distribution to the left axillary lymph nodes (lymph flow in the direction of the lymph node). In addition, high passive spreading was also observed in the right axillary lymph node (Figure 4B). When LNCs were administered in the left flank, a high direct distribution of LNCs was observed in the left axillary lymph node, and passive spreading in the opposite direction of the lymph flow was observed in the left inguinal lymph node. No LNCs were distributed in the right inguinal and axillary lymph nodes, since they were too far from the injection site for passive spreading, and it corresponds to the other lymphatic circulation sites (for the right axillary lymph node) (Figure 4D). Administered on the right side, a high, direct distribution was observed in the right axillary lymph node, and passive spreading was observed in the right inguinal lymph node. The injection site was located at the frontier of the two lymphatic circulation sites. As the inguinal right lymph node was targeted, it follows that direct accumulation was observed in the left inguinal lymph node followed by accumulation in the left axillary lymph node (Figure 4C). When LNCs were administered in the left flank, they were sequestered in the left lymphatic system and in the left side of the animal. After administration in the right flank, LNCs were found between the two sides since they can circulate in both flanks.

Conclusion

To improve chemotherapy protocols, a promising way to deliver drugs in lymph nodes should be the SC administration of drug-loaded nanocarriers. Using LNCs as nanocarriers, passive and specific targeting of lymph nodes was observed, depending on the SC administration site. With appropriate SC administration, LNCs can accumulate in specific lymph nodes. Therefore a personalized therapeutic scheme for patients could be considered when specific lymph node targeting is needed. In addition, LNCs were sequestered in the lymphatic system, without returning to the blood circulation. The limitation of side effects, often due to excessive drug dosage to overcome liver metabolism, could be expected.

Acknowledgments: This work has been carried out within the research program NICHE, financially supported by EuroNanoMed2 ERA-NET. SCAHU at Angers University is also acknowledged for animal facility.

References

1. American Cancer Society. American Cancer Society: Cancer facts and figures 2014. 2014. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>.
2. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:3–20.
3. Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:785–92.
4. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–72.
5. Ryan GM, Kaminskis LM, Bulitta JB, McIntosh MP, Owen DJ, Porter CJ. PEGylated polylysine dendrimers increase lymphatic exposure to doxorubicin when compared to PEGylated liposomal and solution formulations of doxorubicin. *J Control Release* 2013;172:128–36.
6. Yoshizaki Y, Yuba E, Sakaguchi N, Koiwai K, Harada A, Kono K. Potentiation of pH-sensitive polymer-modified liposomes with cationic lipid inclusion as antigen delivery carriers for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 2014;35:8186–96.
7. Yuba E, Tajima N, Yoshizaki Y, Harada A, Hayashi H, Kono K. Dextran derivative-based pH-sensitive liposomes for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 2014;35:3091–101.
8. Patel AR, Lim E, Francis KP, Singh M. Opening up the optical imaging window using nano-luciferin. *Pharm Res* 2014;31:3073–84.
9. Vicente S, Goins BA, Sanchez A, Alonso MJ, Phillips WT. Biodistribution and lymph node retention of polysaccharide-based immunostimulating nanocapsules. *Vaccine* 2014;32:1685–92.
10. Wu C, Zhang M, Zhang Z, Wan K-W, Ahmed W, Phoenix DA, et al. Thymopentin nanoparticles engineered with high loading efficiency, improved pharmacokinetic properties, and enhanced immunostimulating effect using soybean phospholipid and PHBHHx polymer. *Mol Pharm* 2014;11:3371–7.
11. Resnier P, LeQuinio P, Lautram N, André E, Gaillard C, Bastiat G, et al. Efficient in vitro gene therapy with PEG siRNA lipid nanocapsules for passive targeting strategy in melanoma. *Biotechnol J* 2014;9:1389–401.
12. Vanpouille-Box C, Hindré F. Nanovectorized radiotherapy: a new strategy to induce anti-tumor immunity. *Front Oncol* 2012;2:136.
13. 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.
14. Tilney NL. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 1971;109:369–83.
15. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001;21:15–23.
16. Bastiat G, Pritz CO, Roider C, Fouchet F, Lignières E, Jesacher A, et al. A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging. *J Control Release* 2013;170:334–42.
17. Hirsjärvi S, Sancey L, Dufort S, Belloche C, Vanpouille-Box C, Garcion E, et al. Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *Int J Pharm* 2013;453:594–600.

18. Lacoëuille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, et al. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 2007;344:143–9.
19. Texier I, Goutayer M, Da Silva A, Guyon L, Djaker N, Josserand V, et al. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 2009;14:054005.
20. Hirsjärvi S, Dufort S, Bastiat G, Saulnier P, Passirani C, Coll JL, et al. Surface modification of lipid nanocapsules with polysaccharides: from physicochemical characteristics to in vivo aspects. *Acta Biomater* 2013;9:6686–93.
21. Hirsjärvi S, Dufort S, Gravier J, Texier I, Yan Q, Bibette J, et al. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2013;9:375–87.
22. Wauthoz N, Bastiat G, Moysan E, Cieslak A, Kondo K, Zandecchi M, et al. Safe lipid nanocapsules-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2015. doi: 10.1067/j.nano.2015.02.010.
23. Job TT. The adult anatomy of the lymphatic system in the common rat (*Epimys norvegicus*). *Anat Rec* 1915;9:447–58.
24. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The Laboratory Rat*. Academic Press; 2005. 930.

the field of polymer physico-chemistry (University of Pau, France) in 2003, he joined the University of Montreal (Canada) for post-doctoral positions in the Center for Self-Assembled Chemical Structures and in the Canadian Research Chair in Drug Control Release, focusing in self-assembled vesicle structures and organogel for drug delivery. He follows his research works in the INSERM 1066 laboratory and develops new pharmaceutical technologies for parenteral administration based on lipid nanocapsules, gels and non-phospholipidic vesicles. During his scientific career, he wrote 28 publications and was the author of more than 40 communications in national and international conferences.



Elodie Marie dit Chatel
LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France

Elodie Marie dit Chatel, 22 years old, obtained her Bachelor's degree in analytic biology and micro-organism experimental design, with a specialization in animal model (University of Angers, France). She obtained an internship position in the INSERM 1066 laboratory (Angers, France), under the co-direction of Dr Guillaume Bastiat and Marion Pitorre. During her trainee, she was in charge of the pharmacokinetic and biodistribution experimental protocols after subcutaneous administration of nanocarriers in murine model.

Bionotes



Marion Pitorre
LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France

Marion Pitorre, 25 years old, is a PhD student and she performs her research works in the INSERM 1066 laboratory (Angers, France), under the co-direction of Pr Jean-Pierre Benoit and Dr Guillaume Bastiat. She obtained her Pharm D at the University Paul Sabatier (Toulouse, France) in 2013, with a Master of University of Angers, based on the innovation in pharmaceutical technologies, with an internship position in Pierre Fabre group in Toulouse. During her PhD, Marion PITORRE is interested about new nanocarriers for the targeting of lymph nodes to stop the dissemination of metastases.



Guillaume Bastiat
LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France, guillaume.bastiat@univ-angers.fr

Guillaume Bastiat, 38 years old, is an associate professor at the Faculty of Pharmacy, University of Angers (France). After his PhD in



Jean-Pierre Benoit
LUNAM Université, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, F-49933 Angers, France; and Inserm, U1066 IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cédex 9, France

Jean-Pierre Benoit, trained in pharmacy, teaches Pharmaceutical Technology at the Faculty of Pharmacy, Angers University. He acquired a solid foundation in the domain of micro- and nanoencapsulation. He has developed a highly competitive research group at an international level. Jean-Pierre Benoit is currently the director of a 70 members strong research team, recognised and financed by INSERM. His research activity has resulted in the publication of over 260 original refereed scientific articles and reviews, and 25 patents. In 2010 Benoit received the PSWC Research Achievement Award in New Orleans from the FIP, and in 2011 the Prize of Notoriety from the French National Academy of Pharmacy.

III. Bibliographie

- [1] M.S. Sasso, G. Lollo, M. Pitorre, S. Solito, L. Pinton, S. Valpione, G. Bastiat, S. Mandruzzato, V. Bronte, I. Marigo, J.P. Benoit, Low dose gemcitabine-loaded lipid nanocapsules target monocytic myeloid-derived suppressor cells and potentiate cancer immunotherapy, *Biomaterials*. 96 (2016) 47–62.
- [2] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousselet, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 11(5) (2015) 1237–1245.
- [3] G.V.U. Gamboa, S.D. Palma, A. Lifschitz, M. Ballent, C. Lanusse, C. Passirani, J.P. Benoit, D.A. Allemandi, Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications, *Parasitol Res*. 115 (2016) 1945–1953.
- [4] M. Pitorre, G. Bastiat, E. Marie Dit Chatel, J.P. Benoit, Passive and specific targeting of lymph nodes: the influence of the administration route, *Eur J Nanomedicine*. 7 (2015) 121–128.

Chapitre V :

Application des hydrogels de nanocapsules lipidiques au traitement du glioblastome

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	148
II. GLIOBLASTOME ET TRAITEMENTS ACTUELS	149
III. HYDROGEL DE NCLS A BASE DE GEM-C12	151
III.1. Formulation d'un hydrogel de NCLS-Gem-C12	151
III.2. Cinétique de libération in vitro des NCLS	152
III.3. Cytotoxicité in vitro des NCLS-Gem-C12	154
III.4. Efficacité anti-tumorale in vivo (modèle de glioblastome sous-cutané)	155
III.5. Tolérance dans le tissu cérébral à court terme	156
III.6. Conclusion	158
IV. HYDROGEL DE NCLS A BASE DE CYT-C16	158
V. CONCLUSION	161
VI. BIBLIOGRAPHIE	162

I. Introduction

Dans les chapitres II et III, nous avons développé une nouvelle plateforme gélifiée à base de NCLs. Celle-ci a prouvé sa capacité à être injectée et permettre une libération prolongée des NCLs. Sa bonne biocompatibilité a également été montrée à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les propriétés viscoélastiques de ce matériau laissent supposer qu'il peut facilement s'adapter à la conformation de son site d'administration et en épouser les contours. Les hydrogels pourraient ainsi être administrés à l'intérieur d'une plaie pour y délivrer des PAs (antibactérien ou cicatrisant par exemple).

Le traitement de différents cancers passe par le retrait chirurgical, quand il est possible, de la masse tumorale ce qui laisse une importante lésion. En fonction de la localisation de la tumeur et de l'organe considéré, la résection de l'ensemble des cellules cancéreuses n'est pas toujours possible. Or, les cellules restantes peuvent être à l'origine du développement d'une nouvelle tumeur. L'administration locale d'un agent de chimiothérapie peut permettre de tuer ces cellules résiduelles pour limiter le risque de récurrence de la maladie.

Les NCLs ont déjà servi à encapsuler différentes molécules lipophiles anticancéreuses (tamoxifène, paclitaxel, étoposide...) et à leur administration par voie systémique ou locale (NCLs en suspension) [1-5]. Leur forme gélifiée, facilement injectable, pourrait être utilisée localement à la suite de l'exérèse chirurgicale d'une tumeur. Placée dans la cavité de résection, elle libérera les NCLs pour cibler sur une période prolongée les cellules cancéreuses avoisinantes.

Nous envisageons cette stratégie thérapeutique pour le glioblastome, une tumeur cérébrale particulièrement maligne. Dans ce chapitre, l'utilisation de deux types d'hydrogel de NCLs, formulés à partir de la Gem-C12 et de la Cyt-C16, a été explorée pour proposer un traitement local des suites opératoires de la résection d'un glioblastome.

II. Glioblastome et traitements actuels

Les tumeurs cérébrales représentent seulement 2% des cancers de l'adulte mais sont toujours de très mauvais pronostic. Parmi elles, le glioblastome est à la fois la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs du système nerveux central (SNC) de l'adulte [6,7].

Le glioblastome est un astrocytome de grade IV qui présente une forte propension à la nécrose et l'angiogénèse ainsi qu'une résistance à l'apoptose [6]. Ce cancer apparaît principalement entre 50 et 75 ans et peut être de deux types : une tumeur primaire qui apparaît *de novo* dans 90% des cas ou plus rarement une forme secondaire qui résulte de l'infiltration lente d'une tumeur gliale.

Dans les deux cas, le tableau clinique est similaire et la médiane de survie est inférieure à 15 mois [6]. En général, les patients souffrent de céphalées qui découlent de l'hypertension intracrânienne provoquée par le volume de la tumeur. Les autres symptômes sont dépendants de la localisation de la tumeur (effet de masse) et peuvent revêtir différentes formes : déficit sensitivomoteur, troubles phasiques, troubles du comportement, ralentissement idéo-moteur, crise d'épilepsie [8,9].

L'incidence du glioblastome est estimée à 5 cas pour 100 000 habitants [10]. Du fait de l'allongement de la durée de vie et de l'amélioration du diagnostic, le nombre de nouveaux cas est en augmentation [11,12].

Le diagnostic est principalement réalisé grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), celle-ci permet de connaître l'emplacement et la taille de la tumeur. Cependant, seule l'analyse histologique pourra confirmer de façon définitive le diagnostic [13].

Les conséquences physiques, psychologiques et neurologiques de cette tumeur sont très handicapantes pour le patient et s'aggravent rapidement en l'absence d'une prise en charge adaptée. Le traitement débute par l'exérèse chirurgicale de la tumeur. Elle est proposée en première intention dès que la localisation de la tumeur ne risque pas d'entraîner des lésions neurologiques trop importantes. L'examen anatomopathologique de la pièce opératoire et le diagnostic histologique permettent de confirmer le diagnostic de glioblastome.

Les traitements adjuvants ne sont débutés que plusieurs semaines après l'exérèse chirurgicale afin de permettre une bonne cicatrisation du tissu cérébral. Ils associent radiothérapie et chimiothérapie et sont découpés en trois temps [14] :

- Une phase d'induction (6 semaines) durant laquelle le patient est irradié 5 jours sur 7 avec une dose de 2 Gy (dose totale de 60 Gy) et reçoit une prise quotidienne de témozolomide par voie orale à 75 mg/m² ;
- Une pause de 4 semaines ;
- Une phase de consolidation qui consiste en 6 cycles de chimiothérapie de 28 jours. A chaque début de cycle, le patient reçoit pendant 5 jours une dose de témozolomide de 150 à 200 mg/m²/jour.

Malgré ces protocoles, seuls 8% des patients survivent plus de 2,5 ans après le diagnostic de leur maladie [15]. La principale limite à laquelle se heurtent les traitements actuels est l'emplacement anatomique de la tumeur. En effet, le SNC est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite le passage des PAs dans le cerveau et jusqu'à la tumeur. D'autre part, l'exérèse chirurgicale est restreinte pour éviter des séquelles pouvant être motrices, sensorielles ou cognitives. Enfin, les cellules tumorales, qui ne sont pas éliminées par la résection, sont responsables de la majorité des récurrences de la maladie.

L'administration locale d'un médicament après la résection tumorale est une option thérapeutique prometteuse. En effet, le PA est ainsi suffisamment concentré sur son site d'action pour être efficace sans avoir à traverser la BHE. D'autre part, le risque d'effets indésirables systémiques est diminué.

Actuellement, le seul médicament approuvé par la FDA et l'ANSM pour une administration locale est le Gliadel®. Ces implants polymères biodégradables imprégnés de carmustine sont placés lors de l'exérèse chirurgicale à la place de la tumeur à une dose finale maximale de 61,6 mg (soient 8 implants de 7,7 mg chacun). Près de 20 ans après son approbation réglementaire, des méta-analyses et des études rétrospectives ont montré que l'administration locale de Gliadel®, seule ou avec une thérapie concomitante, améliore légèrement la médiane et la survie globale [16,17]. La pénétration de la carmustine dans les tissus restent peu profondes et sa libération rapide (80% de la carmustine libérée en 1 semaine) sont souvent cités comme des lacunes qui peuvent affecter l'efficacité des implants [18,19]. De plus, la carmustine est un agent alkylant et le glioblastome présente des résistances intrinsèques ou acquises aux agents alkylants [20,21]. Bien que biodégradable, la résorption complète de la matrice polymère des implants prend du temps, les ré-opérations et les autopsies ont montré des résidus de polymères 232 jours après l'implantation [22]. La présence de ces résidus et la facilité de migration des implants dans les tissus occasionnent plusieurs complications, telles que de l'hypertension intracrânienne, des abcès, des œdèmes cérébraux, des infections intracrâniennes ou des difficultés de cicatrisation [13].

Malgré les limites rencontrées par le Gliadel® en clinique, l'administration locale d'anticancéreux reste une approche prometteuse dans le traitement du glioblastome. De nombreuses recherches sont menées dans ce but [23–26]. La structure des hydrogels de NCLs permettrait leur administration et adaptation à la zone de résection tout en limitant le risque de lésion des tissus environnants. D'autre part, leur composition à base de NCLs biocompatibles et l'absence de polymères permettent d'espérer une bonne tolérance. Enfin, les NCLs en suspension ont déjà prouvé leur potentiel *in vivo* sur le glioblastome en association avec le ferrociphénol ou le paclitaxel [27–30].

III. Hydrogel de NCLs à base de Gem-C12

Une première application a été envisagée avec les hydrogels de NCLs sous leur forme initiale à base de Gem-C12. Ces travaux ont été menés par Chiara Bastiancich qui réalise sa thèse en cotutelle entre le laboratoire MINT et le « *Louvain Drug Research Institute* » de l'Université Catholique de Louvain. Dans le cadre de cette collaboration, nous avons synthétisé les molécules de Gem-C12 et fourni les protocoles de formulation.

Ces travaux ont conduit à une première publication dans « *Journal of Controlled Release* » [31], dont les principaux résultats sont présentés dans la partie présente, qui serviront de base solide pour les essais préliminaires que nous avons développés dans le cadre des traitements du glioblastome.

Comme évoqué précédemment, le développement de formes pour la libération locale de PAs est considéré comme particulièrement prometteur pour le traitement du glioblastome. La gemcitabine est un agent de chimiothérapie dont le mécanisme d'action est différent de celui de la carmustine. C'est un analogue nucléosidique et non un agent alkylant. Ainsi, la gemcitabine pourrait s'avérer intéressante pour surmonter les résistances des cellules de glioblastome. Par ailleurs, cet actif présente de bonnes propriétés de radiosensibilisation [32]. Enfin, la forme hydrogel de NCLs réticulées avec la Gem-C12 (NCLs-Gem-C12) permet d'administrer et de retenir les NCLs localement sans avoir recours à une matrice polymère additionnelle.

III.1. Formulation d'un hydrogel de NCLs-Gem-C12

Le protocole de formulation des NCLs est identique à celui utilisé par Moysan *et al.* [33]. La concentration en Gem-C12 est fixée à 7,5% ($m/m_{Labfrac}$). Toutes les formules sont placées avant leur gélification dans des seringues. Les NCLs ont ensuite été caractérisées et l'encapsulation de la Gem-C12 a été dosée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Z-average, PdI, PZ et efficacité d'encapsulation de la Gem-C12, dans des NCLs formulées avec ou sans Gem-C12 (n=4, moy ± écart-type). (adapté de la référence [31]).

	Z-average (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taux de charge (%)
NCLs sans Gem-C12	68 ± 5	0,12 ± 0,08	-2 ± <1	-	-
NCLs avec Gem-C12	69 ± 4	0,27 ± 0,05	-3 ± <1	98 ± 11	7,3 ± 0,8

L'encapsulation de la Gem-C12 ne modifie pas les valeurs de Z-average et PdI des NCLs. Par ailleurs, cette encapsulation est efficace et le taux de charge obtenu est suffisant pour une application thérapeutique. En effet, un volume de 10 μL , qui est le volume limite injectable dans le cerveau d'une souris permet une dose de Gem-C12 de 5,5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels après leur extrusion au travers d'une seringue munie d'une aiguille de 30 G ont été mesurées (Figure 5.1). Comme montré précédemment, l'encapsulation de la Gem-C12 permet d'obtenir un hydrogel. En l'absence de Gem-C12 qui sert d'agent de réticulation, les NCLs restent sous une forme de suspension liquide. L'hydrogel de NCLs-Gem-C12 présentent des valeurs de module élastique G' proches de 1000 Pa relativement similaire aux valeurs retrouvées pour le tissu cérébral [34].

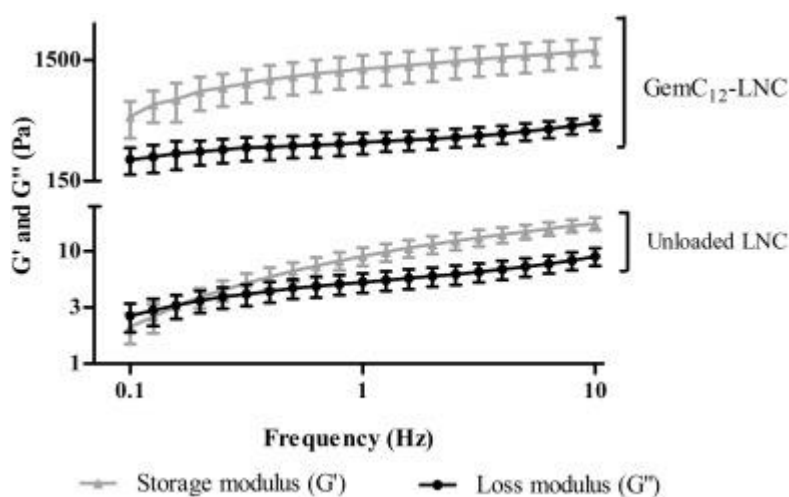


Figure 5.1 : Modules élastiques G' et visqueux G'' de formulations de NCLs (Gem-C12 : 0 (Unloaded LNC) et 7,3% (m/m_{Labrafac}) (GemC₁₂-LNC)). Balayage en fréquence d'oscillation de 0,1 à 10Hz et amplitude de déformation de cisaillement fixe à 0,1%. Rheomètre MCR 102 (Anton Paar, Austria) et géométrie cône-plan (50 mm et 0,5°). (n=3, moyenne \pm écart-type). (adapté de la référence [31]).

III.2. Cinétique de libération *in vitro* des NCLs

La concentration en Gem-C12 utilisée est plus élevée que celle utilisée précédemment *in vivo* (7,5% contre 5% m/m_{Labrafac}) [35]. En effet, l'objectif était d'obtenir une libération très lente des NCLs pour cibler de façon prolongée les cellules cancéreuses résiduelles. Lorsque la concentration en Gem-C12 est plus élevée, la structure du gel est davantage réticulée et donc la libération des NCLs est plus longue.

La cinétique de libération des NCLs a été évaluée *in vitro*. Pour cela un volume de 200 μL de gel est incubé avec 300 μL de liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel à 37°C. Le LCR artificiel est une solution ionique tamponnée à pH = 7,35 et contenant du D-glucose, du L-acide ascorbique et de la BSA. La libération des NCLs est suivie en dosant par HPLC la Gem-C12 dans le LCR artificiel au contact du gel (Figure 5.2).

Durant les premières 48 heures, 56 % de la dose de Gem-C12 est libérée. Puis la libération est ralentie et atteint une valeur de 77 % au bout d'un mois. La Gem-C12 n'est pas soluble dans l'eau, sa libération est directement corrélée à la dégradation du gel et la libération des NCLs. Après un mois, la quantité de Gem-C12 contenue dans le gel resté intact est égale à $8 \pm 3\%$ de la dose initiale.

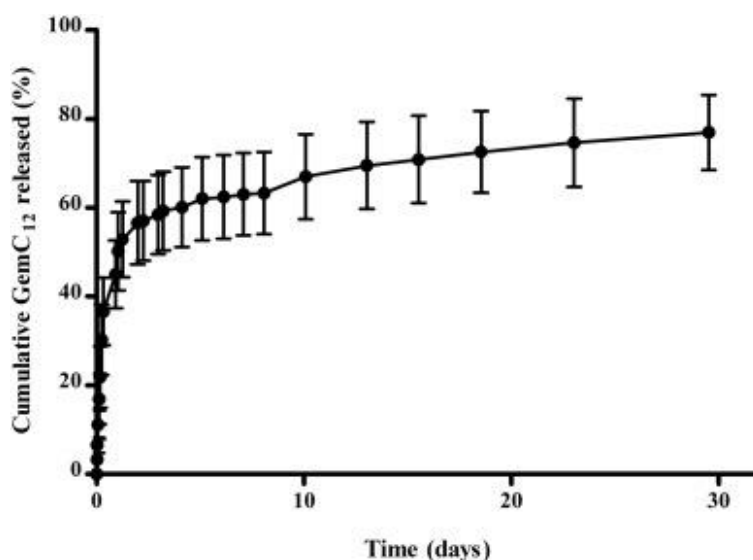


Figure 5.2 : Libération cumulative de Gem-C12 (encapsulée dans des NCLs) dans un liquide céphalo-rachidien artificiel (pH=7,4 et 37°C), à partir d'un hydrogel de NCLs réticulés avec 7,5% de Gem-C12 ($m/m_{Labrafac}$). (n= 4, moyenne \pm écart-type). (adapté de la référence [31]).

La forme hydrogel de NCLs-Gem-C12 permet *in vitro* une libération prolongée de NCLs durant un mois. Des essais *in vivo* devront confirmer cette observation car les facteurs tels que le renouvellement et le flux de LCR peuvent modifier et, en particulier, accélérer ce profil de libération. D'autre part, la libération de la Gem-C12 est découpée en deux phases, qui pourront être exploitées en permettant une phase d'induction de toxicité grâce à la libération rapide d'une dose importante suivie d'une phase de consolidation de cette toxicité avec des doses faibles et prolongées.

III.3. Cytotoxicité *in vitro* des NCLs-Gem-C12

Un essai *in vitro* a été conduit sur une lignée cellulaire de gliome (U-87 MG) afin de comparer la toxicité de la Gem-C12 encapsulée avec celles de la Gem-C12 non encapsulée et de la gemcitabine native (forme non modifiée). Pour tester la Gem-C12 non encapsulée, la molécule a dû être mise en œuvre dans des micelles (eau/éthanol/Tween® 80 ; 6,9/87,6/5,5 v/v) car elle n'est pas soluble dans l'eau. Les différentes formes de gemcitabine ont été incubées 24 ou 48 h à des concentrations allant de 0,01 à 100 μM . Enfin, la détection du nombre de cellules viables a été réalisée au moyen d'un test MTT (Figure 5.3).

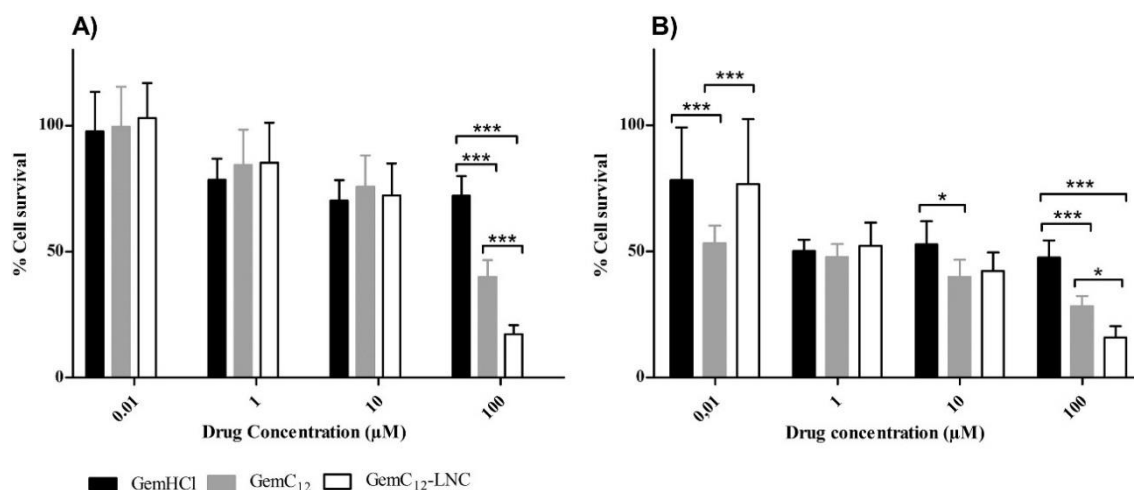


Figure 5.3 : Proportion de cellules vivantes : lignée cellulaire U-87 MG en fonction de la concentration de différentes formulations de gemcitabine après 24 h (A) et 48 h (B) d'incubation à 37°C. Formulations de gemcitabine non modifiée en solution (GemHCl), de micelles de Gem-C12 (GemC12) et de NCLs encapsulant la Gem-C12 (GemC12-LNC). (n= 3, moyenne \pm écart-type, * : $p < 0,05$ et *** : $p < 0,001$). (adapté de la référence [31]).

Après 24h d'incubation, les trois formulations testées de gemcitabine présentent une toxicité d'autant plus importante que leur concentration est élevée. A la concentration de 100 μM , les NCLs encapsulent la Gem-C12 ont un effet toxique significativement plus important que les deux autres formulations de gemcitabine. Le pourcentage de cellules survivantes est encore plus faible pour un temps d'incubation de 48 h. Les valeurs moyennes de CI50 obtenues après 48 h sont de 12,06 ; 0,18 et 0,56 μM pour la gemcitabine en solution, les micelles de Gem-C12 et les NCLs encapsulant la Gem-C12, respectivement. Les micelles de Gem-C12 sont plus efficaces que les NCLs encapsulant la Gem-C12 aux faibles concentrations. Cependant, à la concentration de 100 μM , les NCLs encapsulant la Gem-C12 sont significativement plus toxiques que les micelles de Gem-C12 et que la gemcitabine non modifiée.

Ces différences observées peuvent être expliquées par leurs mécanismes de pénétration dans les cellules. En effet, la Gem-C12 seule est certainement prise en charge par des transporteurs nucléosidiques [36]. Les NCLs privilégient la voie de l'endocytose, comme cela a pu être démontré sur les lignée cellulaires 9L

et F98 (gliome) [37,38]. Lorsque la concentration en Gem-C12 est élevée, les transporteurs nucléosidiques atteignent un seuil de saturation, tandis que l'endocytose n'est pas affectée. Ainsi, la toxicité des NCLs encapsulant la Gem-C12 dépasse celle de la Gem-C12 seule.

La Gem-C12 présente une activité supérieure sur les lignées cellulaires U-87 MG, comparée à sa molécule native. Par ailleurs, l'encapsulation de la Gem-C12 n'altère pas son action et semble même la renforcer pour des concentrations élevées.

III.4. Efficacité anti-tumorale *in vivo* (modèle de glioblastome sous-cutané)

L'efficacité *in vivo* de l'hydrogel de NCLs réticulés par la Gem-C12 a été testée sur un modèle sous-cutané de xéno greffe de glioblastome humain (lignée cellulaire U-87 MG) chez la souris nude. Les formes testées sont administrées par une injection intra-tumorale. Les hydrogels de NCLs réticulés par la Gem-C12 sont comparés à la Gem-C12 non encapsulée (micelles) et à des NCLs sans Gem-C12 (Figure 5.4).

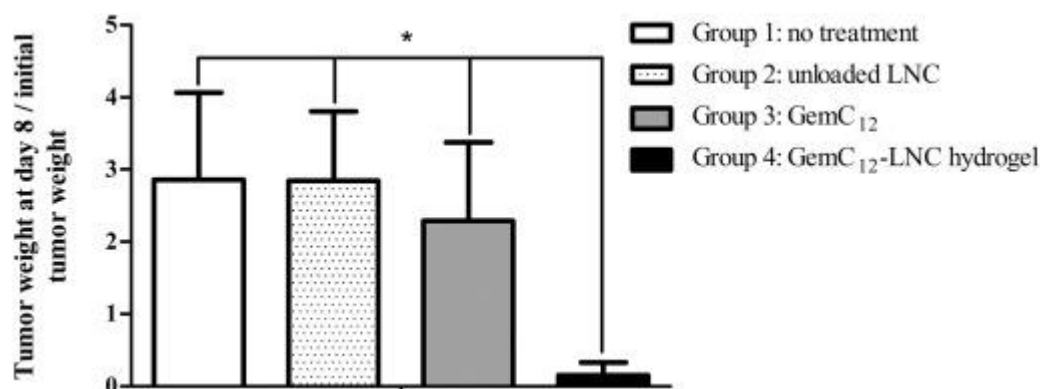


Figure 5.4 : Efficacité antitumorale : rapport entre la masse de la tumeur après 8 jours de traitement par rapport à sa masse initiale, après une injection intra-tumorale d'une dose de Gem-C12 de 19,5 mg.kg⁻¹. Comparaison de l'hydrogel de NCLs réticulés par la Gem-C12 (Group 4), de la Gem-C12 sous forme de micelles (Group 3) et de NCLs sans Gem-C12 (Group 2) sur un modèle sous-cutané de xéno greffe de glioblastome humain (lignée cellulaire U-87 MG) chez la souris. (n=7, moyenne ± écart type, * : p < 0.05). (adapté de la référence [31]).

L'injection de l'hydrogel de NCLs réticulées par la Gem-C12 permet de réduire de façon significative la masse de la tumeur, tandis que les NCLs ou la Gem-C12 seules n'ont pas d'effet. Par ailleurs, l'injection de la Gem-C12 seule provoque une forte inflammation ainsi qu'une nécrose des tissus entourant le site d'injection. Les hydrogels de NCLs réticulées par la Gem-C12 entraînent une inflammation limitée durant les 4 jours qui suivent l'injection. L'encapsulation de la Gem-C12 semble limiter les réactions inflammatoires provoquées par cette molécule.

III.5. Tolérance dans le tissu cérébral à court terme

Une dernière étude a été menée *in vivo* sur la tolérance du tissu cérébral vis-à-vis de l'hydrogel de NCLs réticulées par la Gem-C12. Une injection de 10 μ L a été réalisée dans le cortex au niveau du lobe frontal gauche des souris (NMRI). Les hydrogels ont été comparés à du PBS, des NCLs sans Gem-C12 et des micelles de Gem-C12. Après 7 jours, les cerveaux ont été prélevés. La réaction inflammatoire, l'apoptose et l'activation de la microglie ont ensuite été évaluées sur les coupes histologiques de cerveaux (Figure 5.5).

Au cours de l'étude, toutes les souris ont survécu jusqu'à la date de leur sacrifice et n'ont montré aucun comportement anormal.

Les cerveaux ayant reçu une injection de PBS ou de NCLs blanches n'ont montré aucune réponse inflammatoire ou apoptose. L'injection de micelles de Gem-C12 entraîne une forte réaction inflammatoire (recrutement de granulocytes), ainsi qu'une importante apoptose cellulaire. Cette réaction était prévisible car la gemcitabine est un agent cytotoxique connue pour son action apoptotique [39].

L'hydrogel de NCLs réticulés par la Gem-C12 ne provoque pas de réaction inflammatoire. La forme hydrogel semble protéger les tissus de l'action agressive directe de la Gem-C12. Toutefois, un petit nombre de cellules en état d'apoptose sont retrouvées de façon sporadique autour du site d'injection. Cette observation est certainement liée à une libération progressive de la Gem-C12 par le biais des NCLs.

L'activation de la microglie a également été comparée. Ces cellules sont des macrophages spécifiques des tissus cérébraux et sont recrutés très rapidement en cas de lésion ou d'inflammation même modérées. Sur les sites d'injection du PBS, des NCLs sans Gem-C12 et de l'hydrogel de NCLs réticulés par la Gem-C12, le recrutement de la microglie est similaire et modéré. Elle peut être davantage liée au traumatisme provoqué par l'aiguille lors de l'injection qu'aux formes injectées elles-mêmes. Pour la Gem-C12 seule, le nombre de microglies recrutées est beaucoup plus important ce qui confirme la forte neuro-inflammation.

Les hydrogels de NCLs réticulés par la Gem-C12 semblent être bien tolérés par le tissu cérébral à court terme.

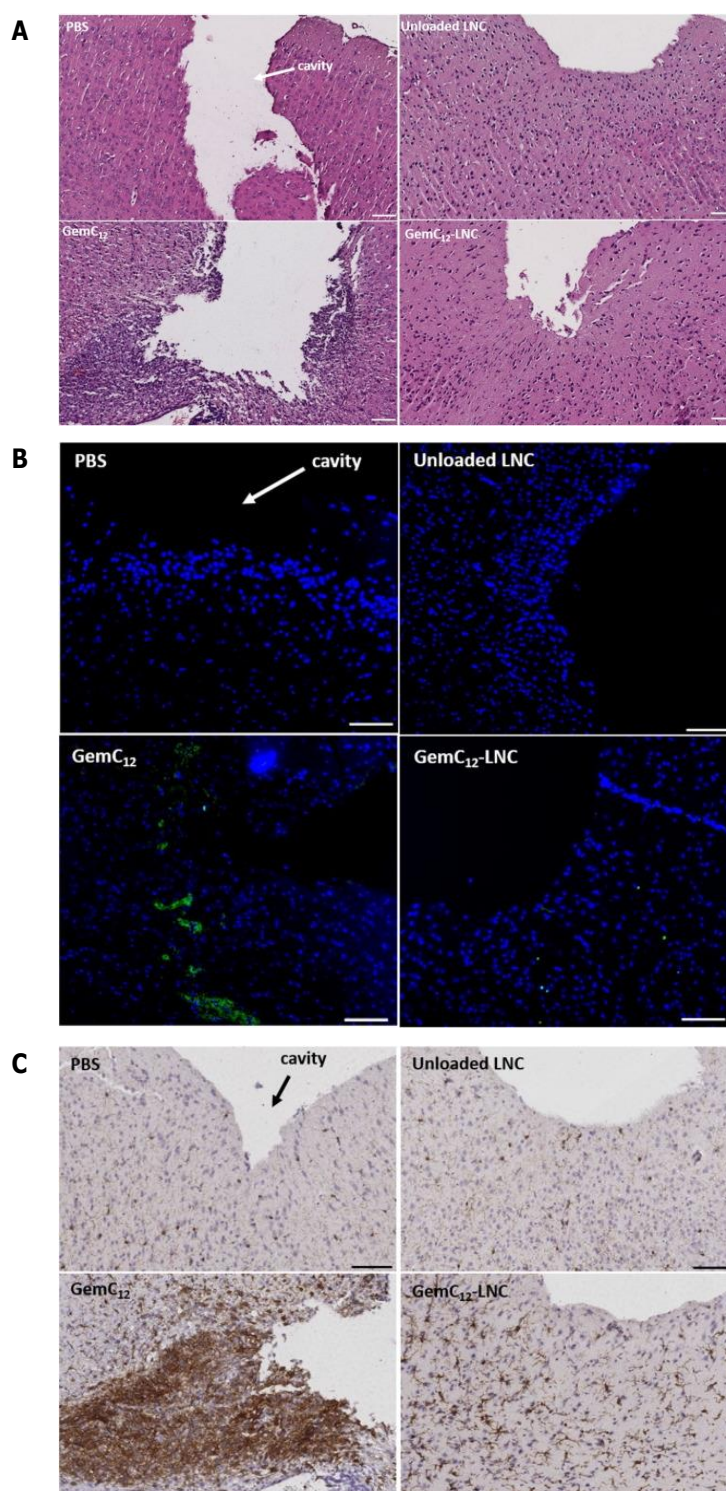


Figure 5.5 : Essai *in vivo* de tolérance à court terme (7 jours) après injection de PBS, de NCLs sans Gem-C12, de Gem-C12 (micelles) ou d'hydrogel de NCLs réticulées par la Gem-C12 dans les tissus cérébraux sains de souris. (A) Evaluation de la réponse inflammatoire (coloration hématoxyline-éosine) ; (B) Evaluation de l'apoptose cellulaire dans les tissus cérébraux (traitement par le test TUNEL, cellules apoptotiques marquées en vert) ; et (C) Evaluation de l'activation de la microglie (immunohistochimie avec coloration Iba-1 et contre-coloration à l'hématoxyline). (n=3 et barre d'échelle de 100 μ m). (adapté de la référence [31]).

III.6. Conclusion

Grâce à ce travail, une première preuve de concept a été établie sur l'administration locale d'hydrogels de NCLs réticulées par la Gem-C12 pour le traitement du glioblastome. En effet, l'hydrogel peut être facilement injecté avec une aiguille 30 G et permet *in vitro* une libération lente des NCLs encapsulant la Gem-C12. Ces dernières démontrent de bonnes propriétés cytotoxiques sur des cellules de glioblastome en culture. Les essais *in vivo*, ont d'une part montré l'efficacité de la forme pour réduire de façon très significative la taille d'une tumeur sous-cutanée et d'autre part leur bonne tolérance à court terme dans le tissu cérébral.

IV. Hydrogel de NCLs à base de Cyt-C16

Une seconde application des hydrogels de NCLs pour le traitement local du glioblastome est envisagée. Cette fois, la structure de l'hydrogel est permise par la Cyt-C16 tandis que l'effet thérapeutique peut être obtenu par d'autres molécules.

Ces travaux s'inspirent des recherches menées sur le peptide NFL-TBS.40-63 (NFL) par Eyer *et al.* [40–42]. Ce peptide dérive d'un neurofilament et a la capacité de pénétrer de façon spécifique dans les cellules de glioblastome. A l'intérieur de la cellule, le peptide interagit avec les dimères de tubuline ce qui perturbe l'organisation des microtubules et conduit finalement à l'inhibition de la prolifération cellulaire. Cette propriété a été prouvée sur différentes lignées cellulaires à la fois murines (rat : 9L et F98, souris : GL261) et humaine (T98G et U-87 MG). Par ailleurs, cette action n'est que peu ou pas observée pour les cellules saines (astrocytes et neurones).

Le NFL a été utilisé pour augmenter l'absorption cellulaire de NCLs contenant du paclitaxel (PTX) [40]. Cette molécule lipophile est un agent anti-microtubules qui peut être utilisé dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, des cancers de l'ovaire, des cancers du sein, des sarcomes de Kaposi associés au sida. Le NFL s'absorbe à la surface des NCLs par une incubation de 24h à température ambiante. *In vitro*, le peptide adsorbé permet le ciblage spécifique et l'augmentation de la pénétration des NCLs dans les cellules de glioblastome. Lorsque les NCLs sont en présence du NFL libre (non adsorbé), elles ne présentent pas d'amélioration de leur incubation. L'injection de NCLs contenant du paclitaxel et associées au NFL dans un modèle de tumeur orthotopique (ligné cellulaire GL261) chez la souris, permet d'améliorer la réduction de la taille de la tumeur (75%) par rapport aux NCLs contenant du PTX mais sans NFL (60%). Dans cette étude, les NCLs étaient suivies grâce à un marquage par fluorescence. Seule une faible quantité de fluorescence résiduelle était encore visible 21 jours après le traitement. L'utilisation d'une forme gélifiée pourrait prolonger le temps de résidence des NCLs au sein de la tumeur et prolonger leur temps d'action.

En partenariat avec le Dr. Joël Eyer qui a rejoint notre unité en janvier 2017, nous souhaitons associer les propriétés thérapeutiques des NCLs contenant du PTX et associées au NFL aux propriétés galéniques de l'hydrogel de NCLs réticulées par la Cyt-C16. L'association de différentes quantités de NFL avec des hydrogels de NCLs réticulées par la Cyt-C16 a été réalisée pour vérifier que la gélification n'est pas altérée.

Différentes quantités de peptide NFL ont été ajoutées dans un hydrogel de NCLs afin de vérifier que l'association de NCLs n'est pas empêchée et conduit toujours à la formation de l'hydrogel. Les résultats qui vont suivre sont des résultats préliminaires.

Les gels ont été formulés avec des NCLs de diamètre 50 nm et 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}). La trempée est réalisée avec la moitié du volume d'eau classique. En parallèle, le peptide NFL est dilué à la concentration adaptée dans de l'eau dé-ionisée et ces solutions permettront de compléter le volume d'eau de trempée manquant. Pour protéger l'intégrité du peptide, celui-ci n'est ajouté que lorsque la formule a atteint une température inférieure à 37°C. Après une nuit à 4°C, les propriétés viscoélastiques des gels ont été mesurées. Pour ce faire, environ 250 μL de gel sont déposés sur la partie fixe de la géométrie du rhéomètre. La géométrie mobile est un plan de diamètre 20 mm et est positionnée à une distance de 800 μm de la partie fixe de l'appareil. Les modules élastiques G' et visqueux G'' sont mesurés avec un balayage en fréquence d'oscillation de 0,1 à 10 Hz pour une amplitude de déformation de cisaillement fixée à 0,0%. Les valeurs de Z-average, PdI et PZ des NCLs sont ensuite contrôlées.

Les concentrations finales en peptide dans les formulations varient de 0,015 à 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le nombre de peptide présent pour une nanocapsule a été estimé pour chacune des concentrations testées. Pour ce faire, le nombre de NCLs présent dans une formulation a été calculé selon les équations suivantes :

$$\text{Nombre de NCLs} = \frac{V_{\text{total NCLs}}}{\frac{4}{3} \pi \left(\frac{Z - \text{average}}{2} \right)^3} \times 10^{21}$$

où le volume total de NCLs est calculé comme étant : $V_{\text{total NCLs}} = V_{\text{Labrafac}} + 0,7 \times V_{\text{Kolliphor}} + V_{\text{Span 80}}$ en considérant des densités de 0,945, 1,05 et 0,99 pour le Labrafac, le kolliphor et le Span 80, respectivement. Les volumes sont exprimés en mL (ou en cm^3) et le Z-average en nm. Le Kolliphor est composé de 30% de polyéthylène glycol libre soluble dans l'eau qui ne participent pas à la structure des NCLs et de 70% d'hydrostéarate de polyéthylène glycol qui participe en tant que tensioactif à la structure des NCLs.

Les concentrations testées vont de 1 à 200 peptides NFL pour une NCL. L'observation macroscopique ne permet pas de faire de différence entre les formulations. Après leur conservation une nuit à 4°C, elles présentent toutes un aspect gélifié similaire à la formule sans peptide. Les propriétés viscoélastiques des

hydrogels sont données en figure 5.6, les caractéristiques de distribution de taille et PZ sont données dans le tableau 5.2.

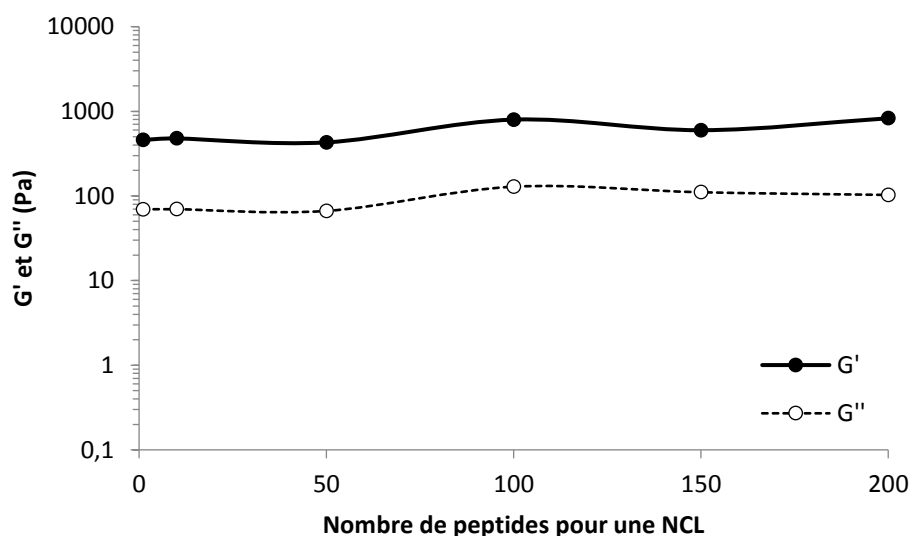


Figure 5.6 : Modules élastiques G' et visqueux G'' des hydrogels obtenus en fonction du nombre estimé de peptides NFL par NCL. Fréquence d'oscillation de 1Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,01%. Hydrogel de NCLs de diamètre 50 nm, réticulé avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}) et à la concentration de 410,2 mg.mL⁻¹.

Tableau 5.2 : Z-average, PdI et PZ des NCLs associées à différentes quantités de peptide NFL.

Nombre de peptides NFL pour une NCL	Concentration en peptide ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Z-average (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)
0	0	51	0,06	-5
1	0,02	51	0,09	-8
10	0,16	55	0,15	-8
50	0,74	58	0,18	-7
100	1,49	58	0,18	-9
150	2,23	63	0,25	-8
200	2,97	82	0,39	-7

Quelle que soit la quantité de peptide NFL ajouté, les propriétés viscoélastiques des hydrogels ne varient pas (Figure 5.6). Plus la quantité de peptides NFL est importante, plus les valeurs de Z-average et PdI des NCLs augmentent. Cette variation peut être liée à l'adsorption du peptide sur la surface des nanocapsules.

V. Conclusion

Les hydrogels de NCLs sont des formes prometteuses pour délivrer localement et de façon prolongée un actif. Cette propriété pourrait être utilisée dans la prise en charge des suites opératoires d'une résection de glioblastome. En effet, la libération progressive des NCLs contenant des agents anticancéreux permettrait de cibler les cellules cancéreuses résiduelles et ainsi limiter le risque de développement d'une nouvelle tumeur.

Les hydrogels de NCLs formés grâce à la Gem-C12 ont prouvé leur intérêt sur un modèle sous-cutané de glioblastome. Cette forme permet une forte réduction de la taille de la tumeur. De plus, elle a également prouvé sa bonne tolérance lorsqu'elle est injectée dans le tissu cérébral. La gemcitabine modifiée est toxique pour les cellules de glioblastome. Son mode d'action diffère des agents alkylants ce qui limite le risque de résistance. Enfin, la gemcitabine présente également des propriétés radio-sensibilisantes qui pourrait améliorer l'efficacité des radiothérapies adjuvantes à la chirurgie.

Parallèlement, des essais préliminaires ont été menés sur l'association des hydrogels de NCLs à base de Cyt-C16 et le peptide NFL. Ils ont permis de prouver que le peptide NFL n'empêche pas la gélification des NCLs grâce à l'action de la Cyt-C16. Ces résultats sont préliminaires et serviront de base à des travaux orientés sur l'évaluation préclinique des hydrogels de NCLs dans les modèles de résection de glioblastome.

VI. Bibliographie

- [1] A.L. Lainé, E. Adriaenssens, A Vessières, G. Jaouen, C. Corbet, E. Desruelles, P. Pigeon, R.A. Toillon, C. Passirani, The *in vivo* performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer, *Biomaterials*. 34 (2013) 6949–6956.
- [2] E. Allard, C. Passirani, E. Garcion, P. Pigeon, A. Vessières, G. Jaouen, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas, *J Control Release*. 130 (2008) 146–153.
- [3] A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarce, *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomed*. 10 (2015) 589–601.
- [4] A.C. Groo, P. Saulnier, J.C. Gimel, J. Gravier, C. Ailhas, J.P. Benoit, F. Lagarce, Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery, *Int J Nanomedicine*. 8 (2013) 4291–4302.
- [5] B. Saliou, O. Thomas, N. Lautram, A. Clavreul, J. Hureaux, T. Urban, J.P. Benoit, F. Lagarce, Development and *in vitro* evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide, *Eur J Pharm Sci*. 50 (2013) 172–180.
- [6] F.B. Furnari, T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, W.K. Cavenee, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes Dev*. 21 (2007) 2683–2710.
- [7] C. Bastiancich, P. Danhier, V. Prétat, F. Danhier, Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma, *J Control Release*. 243 (2016) 29–42.
- [8] L. Bauchet, H. Mathieu-Daudé, P. Fabbro-Peray, V. Rigau, M. Fabbro, O. Chinot, L. Pallusseau, C. Carnin, K. Lainé, A. Schlama, A. Thiebaut, M.C. Patru, F. Bauchet, M. Lionnet, M. Wager, T. Faillot, L. Taillandier, D. Figarella-Branger, L. Capelle, H. Loiseau, D. Frappaz, C. Campello, C. Kerr, H. Duffau, M. Reme-Saumon, B. Trétarre, J.P. Daires, D. Henin, F. Labrousse, P. Menei, J. Honnorat, Société Française de Neurochirurgie (SFNC), Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie (CNO-SFNC), Société Française de Neuropathologie (SFNP), Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF), Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004, *Neuro-Oncol*. 12 (2010) 725–735.
- [9] S.A. Grossman, J.F. Batará, Current management of glioblastoma multiforme, *Semin Oncol*. 31 (2004) 635–644.
- [10] T.A. Dolecek, J.M. Propp, N.E. Stroup, C. Kruchko, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009, *Neuro-Oncol*. 14(5) (2012) 1–49.
- [11] V.K.Y. Ho, J.C. Reijneveld, R.H. Enting, H.P. Bienfait, P. Robe, B.G. Baumert, O. Visser, Dutch Society for Neuro-Oncology (LWNO), Changing incidence and improved survival of gliomas, *Eur J Cancer*. 50 (2014) 2309–2318.
- [12] S. Lönn, L. Klaeboe, P. Hall, T. Mathiesen, A. Auvinen, H.C Christensen, C. Johansen, T. Salminen, T. Tynes, M. Feychting, Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries, *Int J Cancer*. 108 (2004) 450–455.
- [13] M.C. Mabray, R.F. Barajas, S. Cha, Modern Brain Tumor Imaging, *Brain Tumor Res Treat*. 3 (2015) 8–23.
- [14] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. 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, R.O. Mirimanof, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, The National Cancer Institute of Canada

- Clinical Trials Group, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med.* 352 (2005) 987–996.
- [15] N.R. Smoll, K. Schaller, O.P. Gautschi, Long-term survival of patients with glioblastoma multiforme (GBM), *J Clin Neurosci.* 20 (2013) 670–675.
- [16] S.A. Chowdhary, T. Ryken, H.B. Newton, Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis, *J Neurooncol.* 122 (2015) 367–382.
- [17] S. Dixit, M. Hingorani, S. Achawal, I. Scott, The sequential use of carmustine wafers (Gliadel®) and post-operative radiotherapy with concomitant temozolomide followed by adjuvant temozolomide: a clinical review, *Br J Neurosurg.* 25 (2011) 459–469.
- [18] D.A. Bota, A. Desjardins, J.A. Quinn, M.L. Affronti, H.S. Friedman, Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel®) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther Clin Risk Manag.* 3 (2007) 707–715.
- [19] T.A. Juratli, G. Schackert, D. Krex, Current status of local therapy in malignant gliomas--a clinical review of three selected approaches, *Pharmacol Ther.* 139 (2013) 341–58.
- [20] K. Messaoudi, A. Clavreul, F. Lagarce, Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide, *Drug Discov Today.* 20 (2015) 899–905.
- [21] J.N. Sarkaria, G.J. Kitange, C.D. James, R. Plummer, H. Calvert, M. Weller, W. Wick, Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 2900–2908.
- [22] Guilford Pharmaceuticals, NDA #20,637 Food and Drug Agency, 2001, [accessed 12-22-2016] URL: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3815b2_05_FDA.pdf
- [23] P.P. Wang, J. Frazier, H. Brem, Local drug delivery to the brain, *Adv Drug Deliv Rev.* 54 (2002) 987–1013.
- [24] S. Brem, B. Tyler, K. Li, G. Pradilla, F. Legnani, J. Caplan, H. Brem, Local delivery of temozolomide by biodegradable polymers is superior to oral administration in a rodent glioma model, *Cancer Chemother Pharmacol.* 60 (2007) 643–650.
- [25] B. Tyler, K.D. Fowers, K.W. Li, V.R. Recinos, J.M. Caplan, A. Hdeib, R. Grossman, L. Basaldella, K. Bekelis, G. Pradilla, F. Legnani, H. Brem H, A thermal gel depot for local delivery of paclitaxel to treat experimental brain tumors in rats, *J Neurosurg.* 113 (2010) 210–217.
- [26] A.K. Vellimana, V.R. Recinos, L. Hwang, K.D. Fowers, K.W. Li, Y. Zhang, S. Okonma, C.G. Eberhart, H. Brem, B.M. Tyler, Combination of paclitaxel thermal gel depot with temozolomide and radiotherapy significantly prolongs survival in an experimental rodent glioma model, *J Neurooncol.* 111 (2013) 229–236.
- [27] M. Roger, A. Clavreul, N.T. Huynh, C. Passirani, P. Schiller, A. Vessièrès, C. Montero-Menei, P. Menei, Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy, *Int J Pharm.* 423 (2012) 63–68.
- [28] S. Vinchon-Petit, D. Jarnet, A. Paillard, J.P. Benoit, E. Garcion, P. Menei, *In vivo* evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy, *J Neurooncol.* 97 (2010) 195–205.
- [29] E. Allard, D. Jarnet, A. Vessièrès, S. Vinchon-Petit, G. Jaouen, J.P. Benoit, C. Passirani, Local delivery of ferrociphenol lipid nanocapsules followed by external radiotherapy as a synergistic treatment against intracranial 9L glioma xenograft, *Pharm Res.* 27 (2010) 56–64.
- [30] E. Allard, N.T. Huynh, A. Vessièrès, P. Pigeon, G. Jaouen, J.P. Benoit, C. Passirani, Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model, *Int J Pharm.* 379 (2009) 317–323.
- [31] C. Bastiancich, K. Vanvarenberg, B. Ucakar, M. Pitorre, G. Bastiat, F. Lagarce, V. Préat, F. Danhier, Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma, *J Control Release.* 225 (2016) 283–293.
- [32] S. Galbán, B. Lemasson, T.M. Williams, F. Li, K.A. Heist, T.D. Johnson, J.S. Leopold, T.L. Chenevert, T.S. Lawrence, A. Rehemtulla, T. Mikkelsen, E.C. Holland, C.J. Galbán, B.D. Ross, DW-MRI as a

- Biomarker to Compare Therapeutic Outcomes in Radiotherapy Regimens Incorporating Temozolomide or Gemcitabine in Glioblastoma, *PLoS ONE*. 7(4) (2012).
- [33] E. Moysan, Y. González-Fernández, N. Lautram, J. Béjaud, G. Bastiat, J.P. Benoit, An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure, *Soft Matter*. 10 (2014) 1767–1777.
- [34] S. Chatelin, A. Constantinesco, R. Willinger, Fifty years of brain tissue mechanical testing: from *in vitro* to *in vivo* investigations, *Biorheology*. 47 (2010) 255–276.
- [35] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousselet, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 11 (2015) 1237–1245.
- [36] E. Moysan, G. Bastiat, J.P. Benoit, Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: a review of several promising chemical modifications, *Mol Pharm*. 10 (2013) 430–444.
- [37] A. Paillard, F. Hindré, C. Vignes-Colombeix, J.P. Benoit, E. Garcion, The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability, *Biomaterials*. 31 (2010) 7542–54.
- [38] E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, J.P. Benoît, A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats, *Mol Cancer Ther*. 5 (2006) 1710–1722.
- [39] G. Carpinelli, B. Bucci, I. D’Agnano, R. Canese, F. Caroli, L. Raus, E. Brunetti, D. Giannarelli, F. Podo, C.M. Carapella, Gemcitabine treatment of experimental C6 glioma: the effects on cell cycle and apoptotic rate, *Anticancer Res*. 26 (2006) 3017–3024.
- [40] J. Balzeau, M. Pinier, R. Berges, P. Saulnier, J.P. Benoit, J. Eyer, The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells, *Biomaterials*. 34 (2013) 3381–3389.
- [41] R. Berges, J. Balzeau, A.C. Peterson, J. Eyer, A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis, *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 20 (2012) 1367–1377.
- [42] A. Bocquet, R. Berges, R. Frank, P. Robert, A.C. Peterson, J. Eyer, Neurofilaments Bind Tubulin and Modulate Its Polymerization, *J Neurosci*. 29 (2009) 11043–11054.

Discussion générale, conclusion et perspectives

SOMMAIRE

I. DISCUSSION GENERALE	166
I.1. Contexte de ce travail	166
I.2. Interactions des molécules de Cyt-C16 entre elles	167
I.2.1. Structure cristalline de la Cyt-C16	168
I.2.2. Inhibition de la formation des liaisons hydrogène	170
I.3. Comportement des NCLs au sein des hydrogels	173
I.4. Particularités des formes hydrogels de NCLs	176
II. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	178
III. BIBLIOGRAPHIE	182

I. Discussion générale

I.1. Contexte de ce travail

Les nanotechnologies concernent aujourd'hui des pans de plus en plus divers de notre société. Depuis la fin des années 90, le nombre de brevets en lien avec ces technologies ne cesse de s'accroître, ce qui est en passe de révolutionner divers secteurs d'activité. Plus de la moitié des brevets déposés sont liés aux sciences des matériaux ou aux domaines de l'électronique. L'autre moitié est divisée en cinq secteurs différents, dont les nanobiotechnologies qui regroupent toutes les applications en biologie et sciences du vivant [1,2].

Malgré cette discrète présence des sciences du vivant, les nanotechnologies sont considérées comme très prometteuses dans le domaine médical. Elles peuvent être à l'origine d'améliorations thérapeutiques notamment en ciblant la libération d'un principe actif ou en prolongeant son temps de circulation dans l'organisme. Elles peuvent également être utilisées dans un but de diagnostic ou de régénération tissulaire. Cependant, le cadre réglementaire strict et les risques potentiels associés aux applications médicales ralentissent considérablement l'arrivée sur le marché des nanosystèmes (NSs).

Aujourd'hui, encore peu de produits de santé employant des NSs sont commercialisés. Certains emploient des nanocristaux. C'est par exemple le cas des comprimés de Rapamune® (Pfizer) utilisés en prophylaxie du rejet d'une greffe de rein [3,4]. Les formes micellaires sont également retrouvées, telles que l'Estrasorb™ (Graceway Pharmaceuticals) utilisé dans le traitement topique des bouffées de chaleur associées à la ménopause [5]. Le domaine de la cancérologie a permis la mise sur le marché de formes plus innovantes de NSs. Il s'agit d'une part de l'Abraxane™ (Celgene) qui est composé de nanoparticules d'albumine (130 nm) associées à du paclitaxel. Ce médicament est utilisé seul dans le traitement du cancer du sein métastatique ou peut être associé à la gemcitabine dans le cas d'adénocarcinome du pancréas métastatique [6,7]. D'autre part, les liposomes ont été employés dans différents médicaments. Des liposomes contenant de la doxorubicine sont par exemple retrouvés dans le Caelyx® (Janssen-Cilag) (également nommé Doxil® aux Etats-Unis) ou le Myocet® (TEVA Santé) [8-11]. Ces médicaments traitent le cancer de l'ovaire, le sarcome de Kaposi ou le cancer métastatique du sein. Le DaunoXome® (Novex Pharma) est une forme liposomal de la daunorubicine qui permet de traiter les sarcomes de Kaposi [12]. Enfin, les liposomes sont également à la base de deux autres médicaments non liés à la cancérologie. Il s'agit de Visudyne® (Novartis Pharma SAS) qui traite la dégénération maculaire liée à l'âge avec de la verteporfine [13] et de l'Ambisome® (Gilead Sciences) qui emploie de l'amphotéricine B contre les infections fongiques invasives [14]. Enfin, un produit de contraste utilise des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique : l'Endorem® (Guerbet) [15].

L'unité MINT INSERM U1066 / CNRS 6021 s'intéresse aux développements de micro et nanomédecines depuis plusieurs années. En 2002, Heurtault *et al.* ont conçu les nanocapsules lipidiques [16–18], qui permettent l'encapsulation de molécules thérapeutiques dans leur cœur lipidique liquide ou au sein de leur interface supposée structurée [19,20]. Leur bonne biocompatibilité, leur procédé de formulation peu contraignant et leur taille pouvant être modulée font d'elles des vecteurs de choix pour différentes applications thérapeutiques.

Classiquement les NCLs se présentent sous la forme d'une suspension liquide. L'encapsulation d'une gemcitabine modifiée a fortuitement conduit à une forme gélifiée des NCLs [21,22]. La molécule, nommée Gem-C12, est formée de l'association d'une chaîne laurique à la gemcitabine. Elle présente des propriétés amphiphiles qui lui permettent de se placer préférentiellement au niveau de l'interface huile/eau des NCLs. Une molécule de Gem-C12 est capable de former des liaisons hydrogène avec une seconde molécule placée à la surface d'une NCL voisine. Ainsi, les NCLs s'associent entre elles sous la forme d'un réseau tridimensionnel qui mène à la gélification du système. Cette nouvelle plateforme permet de combiner les propriétés des NCLs et celles d'un hydrogel. Lorsqu'une partie de l'hydrogel est dissous, une suspension de NCLs est obtenue. De plus, cette forme peut être employée pour permettre une libération prolongée et/ou une application locale.

Au cours de cette thèse, notre objectif était de reproduire la structure des hydrogels de NCLs sans faire appel à la Gem-C12 qui est très toxique. Afin de limiter la toxicité des hydrogels de NCLs, la gemcitabine a été remplacée par une molécule endogène : la cytidine. Cette dernière a été modifiée en greffant sur sa fonction amine libre une chaîne palmitique, ce qui permet d'obtenir la Cyt-C16. La synthèse de cette nouvelle molécule a permis la formulation et la caractérisation de nouveaux hydrogels de NCLs. Cette molécule permet également d'obtenir un organogel. Ces deux formes pourront être utilisées comme des plateformes polyvalentes pouvant mettre en œuvre des PAs de nature diverse. Les principales problématiques résultant de ce travail sont la compréhension des mécanismes permettant l'association des molécules de Cyt-C16 dans les formes hydrogel et organogel, ainsi que le comportement des NCLs encapsulant de la Cyt-C16. Dans cette partie, différentes pistes de réflexion seront proposées autour de ces deux problématiques. De plus, la forme hydrogel de NCLs que nous avons développée sera confrontée aux différentes formes conventionnelles (avec réseau polymère) ou similaires (sans réseau polymère) ayant pu être décrites dans la littérature.

I.2. Interactions des molécules de Cyt-C16 entre elles

L'encapsulation de la Cyt-C16 permet d'obtenir un hydrogel résultant de l'association des NCLs. Ces associations sont supposées permises par des liaisons hydrogène. Les molécules de cytidine se placeraient à l'interface des NCLs avec d'une part les chaînes aliphatiques dirigées vers le cœur lipidique des NCLs et d'autre part la base pyrimidique et le ribose tournés vers la phase aqueuse. Les fonctions alcools libres présentes sur le cycle de ribose pourraient créer des liaisons hydrogène avec une autre molécule présente

à proximité, comme observé pour la Gem-C12 [21]. Grâce à ces liaisons hydrogène, les NCLs s'associent entre elles pour former un réseau qui stabilise la phase aqueuse dans laquelle il est immergé. L'observation en microscopie confocale des hydrogels a permis d'objectiver la présence d'un réseau fibreux qui n'est pas présent lorsque les NCLs ne contiennent pas de Cyt-C16 (Figure 2.14).

Plus la quantité de Cyt-C16 employée est importante et plus l'hydrogel obtenu est « rigide ». En effet, un plus grand nombre de molécules offre la possibilité de créer davantage de liaisons hydrogène ce qui réticule de façon plus importante le gel et stabilise sa structure.

Le nombre de molécules de Cyt-C16 présentes dans une NCL a été estimé en utilisant le même calcul que présenté dans le chapitre V (partie IV). Pour une concentration en Cyt-C16 de 2,5 % (m/m_{Labrafac}), plus de mille ou de sept mille molécules sont retrouvées associées à une seule NCL de diamètre respectif 50 ou 100 nm. Chaque molécule dispose de trois fonctions alcools différentes, ce qui offre la possibilité de créer un très grand nombre de liaisons hydrogène et de combinaisons différentes d'interactions entre les NCLs.

En parallèle, la formation d'un organogel semble également permise par l'association des molécules de Cyt-C16 au moyen de liaisons hydrogène. Dans le milieu lipophile, les têtes formées par le nucléoside, correspondant à la partie hydrophile de la Cyt-C16, interagissent au cœur de fibres. Les chaînes palmitiques sont orientées vers l'extérieur de ces fibres et permettent la stabilisation du réseau dans le milieu lipophile environnant. Ce type d'association a largement été décrit dans la littérature [23–28].

I.2.1. Structure cristalline de la Cyt-C16

Afin de mieux comprendre l'action de la Cyt-C16, nous avons souhaité étudier sa structure sous sa forme pure. La molécule synthétisée se présente sous la forme d'une poudre blanche. Si en son sein, les molécules s'organisent sous la forme d'un cristal, nous pourrions en tirer des comparaisons avec leur comportement dans les gels.

Dans leurs travaux, Bastiat *et al.* ont modifié des acides aminés (phénylalanine et tyrosine) par l'ajout de chaînes aliphatiques, afin d'obtenir des molécules organogélatrices. Les valeurs d'enthalpie de fusion de ces molécules seules sont comparables à celles mesurées pour la transition gel/solution des organogels obtenus avec ces molécules. Les mêmes interactions entre molécules sont donc impliquées dans les formes cristallines (molécules pures) et dans les formes organogel (molécules dans une matrice composée d'huile) [28]. Pour étudier la structure cristalline de la Cyt-C16, nous avons eu recours à la cristallographie aux rayons X.

Cette technique utilise un monocristal de l'échantillon étudié. Un monocristal correspond à la répétition organisée d'un même motif dans l'espace. Les cristaux, au sens usuel, sont composés de l'association de plusieurs monocristaux. Un monocristal est un système anisotrope dans lequel la lumière se propage dans une direction privilégiée en fonction de ses paramètres de maille.

Dans le cas de la diffraction des rayons X, le monocristal subit une rotation dans les trois dimensions tout en étant exposé à des rayonnements X. Le traitement numérique des tâches de diffraction des rayons X

obtenues permet de déterminer la structure complète du système cristallin dont la nature des atomes présents et leurs positions respectives dans la maille.

Un premier essai a été réalisé directement sur le produit obtenu à la fin de la synthèse de la Cyt-C16. Cette tentative n'a pas été concluante car aucun monocristal n'a pu être trouvé. Un second essai a été réalisé après une étape de recristallisation de la Cyt-C16. Pour ce faire, la molécule a été dissoute dans l'acétone, puis le solvant a très lentement été évaporé dans une atmosphère saturée en acétone. Malgré cette précaution, la Cyt-C16 ne forme pas de cristaux et reste sous une forme amorphe.

Pourtant la cytidine native est organisée sous forme de cristaux dont les paramètres ont été décrits par Furberg *et al.* en 1950 [29,30]. Le cristal de la molécule ($C_9H_{13}O_5N_3$) est décrit comme étant orthorhombique et présente les paramètres de maille suivant : $a=13,93$; $b=14,75$ et $c=5,10$ Å. Le motif unitaire du monocristal contient quatre molécules, les cycles pyrimidiques se trouvent dans le plan tandis que les cycles de ribose n'y sont pas. Les fonctions alcool situées en 2', 3' et 5' du ribose permettent d'établir de nombreuses liaisons hydrogène qui assurent la cohésion et l'organisation des molécules entre elles (Figure 6.1).

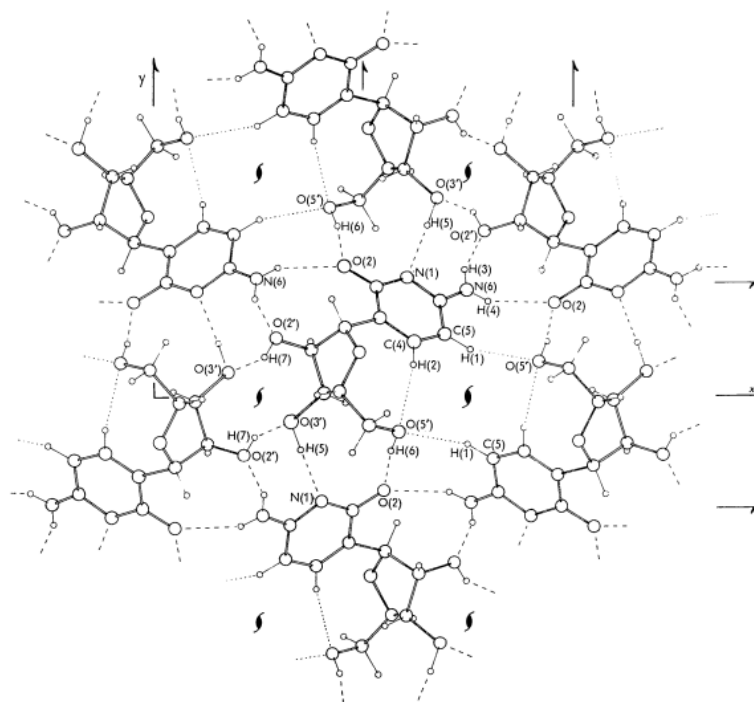


Figure 6.1 : Projection de la structure cristalline de la cytidine. Les lignes pointillées représentent les liaisons hydrogène. (adapté de la référence [30]).

L'ajout d'une chaîne palmitique sur la molécule de cytidine semble empêcher l'organisation sous une forme cristalline de la Cyt-C16. Cependant, si sous sa forme solide la Cyt-C16 reste amorphe, il est probable que de nombreuses liaisons hydrogène soient encore établies entre les molécules mais de façon complètement aléatoire. Il est donc très vraisemblable que les hydrogels et les organogels soient structurés par des liaisons hydrogène.

A titre de comparaison, les mêmes tests ont été réalisées avec la Gem-C12. Celle-ci se révèle également sous une forme amorphe, ce qui empêche donc l'utilisation de la cristallographie aux rayons X. La description de la structure cristalline de la molécule native de gemcitabine a été faite par Wu *et al.* en 2015 [31]. Le cristal de $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ est orthorhombique et présente les paramètres de maille suivants $a=17,64$; $b=6,99$ et $c=18,65$ Å.

Des résultats similaires ont été observés pour le tryptophane modifié par une chaîne aliphatique par Bastiat *et al.* [28]. Le tryptophane à l'état pur est sous forme cristalline [32,33], tandis que sa modification par une chaîne aliphatique empêche toute formation de monocristal. Le tryptophane modifié se présente seulement dans un état amorphe, mais permet tout de même la formation d'un organogel quand il est solubilisé dans l'huile. Le réseau fibreux de tryptophane modifié se forme par des liaisons hydrogène entre les parties tryptophane au cœur des fibres.

I.2.2. Inhibition de la formation des liaisons hydrogène

Les essais de cristallographie ne nous ont pas permis d'étayer notre hypothèse selon laquelle les hydrogels sont obtenus grâce à des liaisons hydrogène entre les NCLs. Afin de prouver leur implication dans la structure des hydrogels, nous avons mesuré l'impact de l'inhibition de la formation de liaisons de faible énergie sur les propriétés viscoélastiques de ces derniers.

Pour cela, nous avons ajouté trois produits différents, connus pour empêcher la formation de liaisons de faible énergie :

- L'urée qui est un agent chaotropique, c'est-à-dire, qu'une fois solubilisé dans l'eau, il favorise la solvataion des groupes hydrophobes et déstabilise les liaisons hydrogène. Cette molécule est classiquement utilisée pour détruire la structure tridimensionnelle des protéines [34,35].
- Le chlorure de sodium (NaCl) dont les ions H^+ et Cl^- en solution entrent en compétition avec d'éventuelles interactions électrostatiques et limitent leurs formations.
- L'éthanol qui permet de réduire la formation des liaisons de Van der Waals.

Ces trois substances ont été ajoutées dissoutes dans l'eau de trempe des hydrogels de NCLs de diamètre 50 nm et réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$). Le nombre de moles de ces substances est 60 fois plus important que le nombre de moles de Cyt-C16 présent dans les formules. Les propriétés viscoélastiques des gels obtenus ont ensuite été mesurées afin d'observer l'impact du chlorure de sodium, de l'éthanol et de l'urée sur la gélification (Figure 6.2).

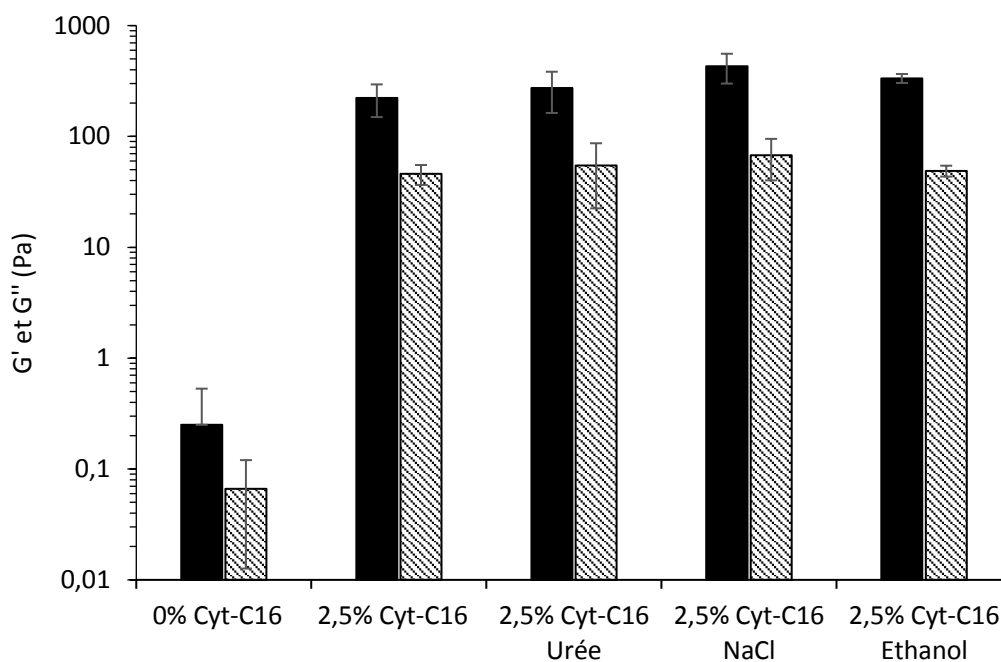


Figure 6.2 : Modules élastique G' (barre noire) et visqueux G'' (barre rayée) des hydrogels de NCLs, additionnés d'urée, de NaCl et d'éthanol (ratio molaire de 60 par rapport à la Cyt-C16). Fréquence d'oscillation de 1 Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. NCLs de diamètre 50 nm, réticulées avec 2,5% de Cyt-C16 ($m/m_{Labrafac}$) à la concentration de $410,2 \text{ mg.mL}^{-1}$. ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

L'ajout d'urée, de NaCl et d'éthanol n'entraîne aucune différence significative sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels. Soit la structure du gel n'est pas permise par des liaisons de faible énergie, ce qui reste peu probable, soit un rapport molaire de 60 n'est pas suffisant pour induire un changement.

Dans leurs travaux sur la Gem-C12, Moysan *et al.* avaient également réalisé des essais similaires [21]. L'ajout de 20 moles d'urée pour une mole de Gem-C12 dans une formulation, entraînait une diminution significative des modules élastique G' et visqueux G'' . Ceux-ci passaient d'une valeur respective de 410 et 21 Pa à 90 et 10 Pa. En parallèle, l'ajout de NaCl et d'éthanol n'avait aucun impact. Ces résultats permettaient de prouver l'influence des liaisons hydrogène dans la réticulation des NCLs.

Dans le cas des hydrogels à base de Cyt-C16, l'ajout d'urée avec un rapport molaire de 20 ou de 60 par rapport à la Cyt-C16, ne permet pas de modifier les valeurs de modules élastique G' et visqueux G'' . La présence d'une fonction alcool supplémentaire sur le cycle ribose de la cytidine permet d'établir un plus grand nombre de liaisons hydrogène comparé à la Gem-C12. L'ajout d'urée, même en quantité trois fois supérieure, ne suffit pas à déstabiliser la structure du gel. Ces essais pourront être répétés en augmentant encore la quantité d'urée testée.

Dans un second temps, nous avons essayé d'ajouter des chaînes de 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[méthoxy-(polyéthylène glycol)2000] (DSPE-mPEG2000) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Etats-Unis) à la surface des NCLs. La présence des chaînes de PEG de 2000 Da peut, en encombrant la surface des NCLs, limiter l'association des molécules de Cyt-C16 entre elles.

L'ajout de chaînes de DSPE-mPEG2000 peut être réalisé de deux façons. La première méthode est la plus conventionnelle, elle consiste à post-insérer les chaînes de DSPE-mPEG2000 dans les NCLs déjà formulées [36]. La seconde méthode est nommée « *one-step* », les chaînes de DSPE-mPEG2000 sont placées avec les autres constituants des NCLs avant le début du procédé de formulation. Cette méthode est plus rapide et tout aussi efficace que la méthode originale [37].

Des NCLs de diamètres 50 et 100 nm, contenant 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}), ont été formulées par la méthode « *one-step* » avec 5% de DSPE-mPEG2000 (m/m_{Labrafac}). Les propriétés viscoélastiques des hydrogels obtenus ont ensuite été mesurées (Figure 6.3).

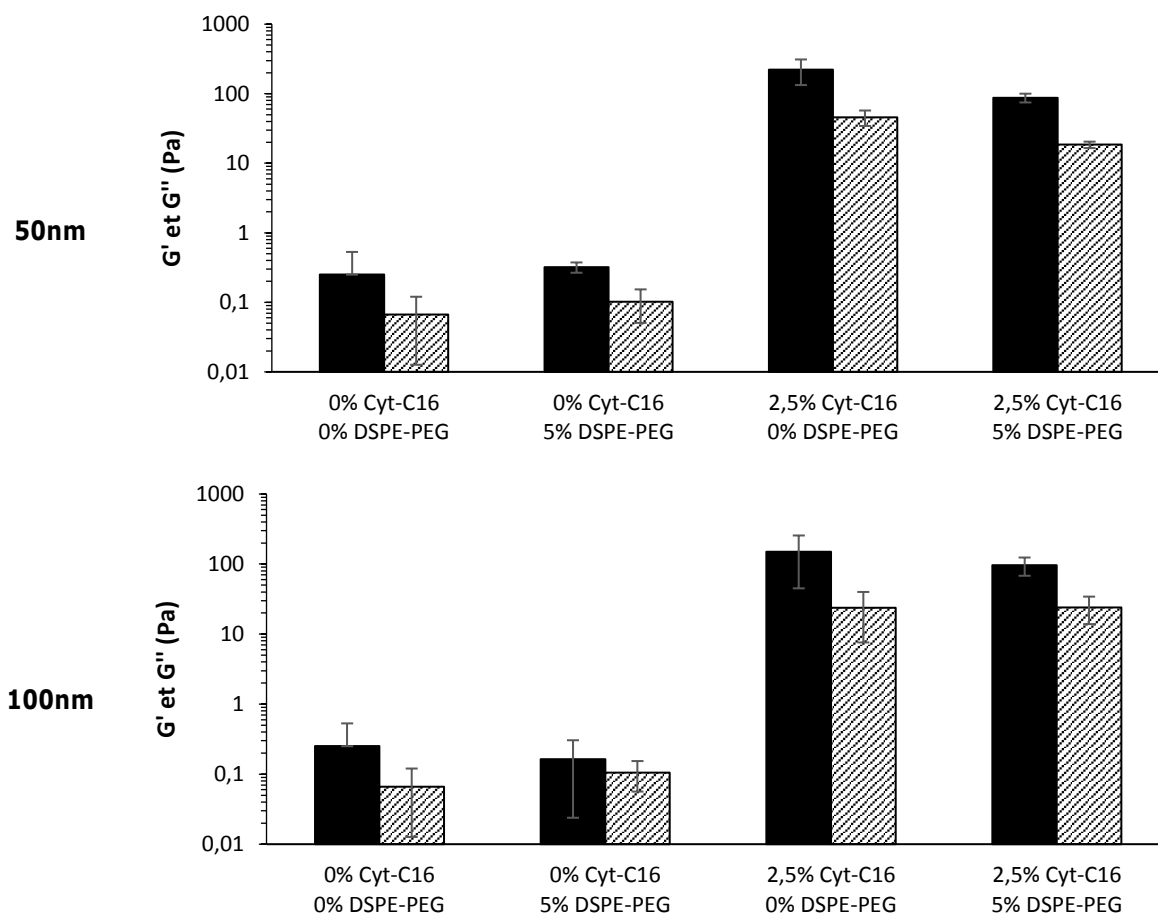


Figure 6.3 : Modules élastique G' (barre noire) et visqueux G'' (barre rayée) des hydrogels. Fréquence d'oscillation de 1Hz et amplitude de déformation de cisaillement de 0,1%. Hydrogels de NCLs de diamètres 50 ou 100 nm, réticulé ou non avec 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}), à la concentration respective de 410,2 et 503,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en présence ou non d'une concentration en DSPE-mPEG2000 de 5% (m/m_{Labrafac}). (n=3, moyenne \pm écart-type).

L'ajout de 5% de DSPE-mPEG200 (m/m_{Labrafac}) n'a aucune action significative sur les valeurs des modules élastiques G' et visqueux G'' des hydrogels. La présence de DSPE-mPEG2000 dans les NCLs non réticulées ne modifie pas leurs propriétés viscoélastiques.

Les chaînes de DSPE-mPEG2000 s'organisent à la surface des NCLs, en augmentant l'épaisseur de la couronne de PEG liée aux NCLs. Nous pouvons nous attendre à ce que l'encombrement stérique occasionné par ces chaînes gêne l'association des molécules de Cyt-C16. Les chaînes de DSPE-mPEG2000 présentent peut-être une souplesse suffisante pour s'écarter et permettre ces interactions. Par ailleurs, la masse molaire du DSPE-mPEG2000 est égale à $2805 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui représente environ une molécule de DSPE-mPEG2000 introduite pour trois molécules de Cyt-C16 dans les formules. Ce rapport molaire n'est peut-être pas suffisant pour impacter la réticulation du système.

L'ajout d'une quantité plus importante de DSPE-mPEG2000 est envisageable, cependant dans la littérature les quantités maximales reportées correspondent à environ 8% (m/m_{Labrafac}) [37,38]. Cette quantité ne permettrait d'atteindre qu'un ratio d'une molécule de DSPE-mPEG2000 pour deux molécules de Cyt-C16.

I.3. Comportement des NCLs au sein des hydrogels

Lorsque les hydrogels de NCLs sont conservés, les NCLs présentent rapidement des modifications de la dispersion de leur taille (Figure 3.2). Ces variations peuvent être liées à la modification des NCLs elles-mêmes, par exemple par un procédé de coalescence. Elles peuvent également être liées à une mauvaise redispersions des NCLs en suspension. Les NCLs qui étaient réticulées dans leur forme gélifiée ne sont pas toutes complètement séparées lors de la dissolution du gel.

Dans la majorité des essais de cette thèse, les valeurs de Z-average et de PdI des NCLs ont été mesurées sur une suspension de NCLs fraîchement préparées et n'ayant pas encore gélifié. Les suspensions préparées avec des NCLs déjà gélifiées présentent une moins bonne polydispersité, et ce, dès le lendemain de la préparation des hydrogels. D'autre part, nous avons aussi pu observer que lorsque les dilutions d'hydrogels de NCLs sont conservées plusieurs jours à 4°C , les PdI en sont également affectés.

Ainsi, les NCLs contenant de la Cyt-C16 interagissent entre elles dans leur forme hydrogel, mais tout porte à croire qu'elles continuent à pouvoir interagir sous leur forme suspension. En suspension, les NCLs ne seraient donc pas totalement indépendantes les unes des autres, mais plutôt associées sous la forme d'agrégats de quelques NCLs.

Dans le chapitre II, des résultats de dosage de la Cyt-C16 dans les hydrogels de NCLs ont été montrés. La molécule avait simplement été dosée dans la formulation sans étape de séparation préalable. La totalité

de la quantité de Cyt-C16 présente au départ de la formulation était retrouvée, ce qui confirme que le procédé de formulation n'altère pas l'intégrité de la molécule.

D'autres essais de dosage ont été réalisés après différentes étapes de séparation. Les hydrogels ont d'abord été dissous puis filtrés sur un filtre Millex-HP (polyéthersulfone, Merck Milipore, Darmstadt, Allemagne). Deux tailles de filtre ont été utilisées : 0,22 et 0,45 μm . De plus, la filtration sur les filtres 0,45 μm a été réalisée avec ou sans sonication préalable des échantillons dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Parallèlement, 300 μL d'une suspension de NCLs ont été placés dans un filtre Amicon-ultra 30 kDa, (Merck Milipore, Darmstadt, Allemagne) et centrifugés à 6700 g pendant 30 minutes. Les quantités de Cyt-C16 présentes après chacune de ces étapes ont été dosées avec la méthode de LC-MS/MS précédemment présentée (Chapitre II, partie V.4). Tous ces tests ont été menés avec des hydrogels de NCLs présentant un diamètre de 50 ou 100 nm et réticulées avec 1 ou 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{labrafac}) (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 : Proportion de Cyt-C16 dans les NCLs une fois les hydrogels dissous puis filtrés, par rapport à la quantité initiale utilisée dans des hydrogels, mesurée par LC-MS/MS ($n=3$; moyenne \pm écart-type).

	Non filtré (%)	Filtré 0,22 μm (%)	Filtré 0,45 μm (%)	Filtré 0,45 μm après sonication (%)	Phase aqueuse (amicon) (%)
NCL 50 nm, 2,5% Cyt-C16	102,0 \pm 8,8	19,8 \pm 0,4	26,7 \pm 0,6	63,1 \pm 11,1	0,1 \pm <0,1
NCL 50 nm, 1% Cyt-C16	106,6 \pm 5,2	55,6 \pm 6,2	61,4 \pm 2,6	89,0 \pm 7,9	1,6 \pm 1,3
NCL 100 nm, 2,5% Cyt-C16	98,6 \pm 3,4	11,4 \pm 0,8	21,0 \pm 3,2	37,7 \pm 6,3	0,4 \pm 0,4
NCL 100 nm, 1% Cyt-C16	96,0 \pm 1,4	30,3 \pm 1,8	44,4 \pm 1,5	64,2 \pm 8,4	1,1 \pm 0,7

Tout d'abord le dosage de la Cyt-C16 a été réalisé dans les phases aqueuses des suspensions, qui ont été séparées des NCLs grâce à une centrifugation sur filtre amicon. La quantité de Cyt-C16 retrouvée est négligeable et s'approche de sa limite de détection de $0,4 \pm <0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$. Il n'y a donc pas de Cyt-C16 libre en dehors des NCLs.

Lorsque les NCLs sont filtrées, la quantité de Cyt-C16 retrouvée est réduite et est comprise entre 20 et 60% de la quantité initiale. Par rapport aux filtres 0,45 μm , l'utilisation d'un filtre 0,22 μm diminue davantage la quantité de Cyt-C16 retrouvée. D'autre part, la sonication des échantillons permet d'améliorer les résultats obtenus après passage sur un filtre 0,45 μm .

Ces résultats semblent montrer qu'une partie des NCLs sont retenues par la filtration. Plus le filtre est petit, plus la quantité de NCLs retenue est importante. Cette observation semble confirmer que les NCLs en suspension continuent à interagir les unes avec les autres. Elles forment des agrégats de NCLs qui peuvent être retenus par le filtre. La sonication permet de désolidariser une partie de ces agrégats car la quantité de Cyt-C16 retrouvée après filtration est améliorée. Par ailleurs, la formation d'agrégats semble augmenter lorsque la concentration en Cyt-C16 est élevée ce qui est cohérent puisque la quantité disponible de

donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène augmente. La formation d'agrégats semble aussi augmenter pour les diamètres de 100 nm.

Les valeurs de Z-average et de PdI des suspensions de NCLs ont été mesurées avant et après filtration sur un filtre 0,45 µm (Tableau 6.2).

Tableau 6.2 : Valeurs de Z-average et PdI des suspensions de NCLs, de diamètres 50 et 100 nm contenant 1 ou 2,5% de Cyt-C16 (m/m_{Labrafac}), avant et après filtration sur un filtre 0,45 µm (avec ou sans sonication) ou 0,22 µm. (n=3 ; moyenne ± écart-type).

	NCL 50 nm, 2,5% Cyt-C16		NCL 50 nm, 1% Cyt-C16		NCL 100 nm, 2,5% Cyt-C16		NCL 100 nm, 1% Cyt-C16	
	Z-average (nm)	PdI	Z-average (nm)	PdI	Z-average (nm)	PdI	Z-average (nm)	PdI
Avant filtration	58 ± 2	0,21 ± 0,02	54 ± 1	0,06 ± 0,01	93 ± 2	0,09 ± 0,02	99 ± 4	0,12 ± 0,05
Après filtration (0,45 µm)	56 ± 2	0,15 ± 0,04	55 ± 2	0,07 ± 0,02	90 ± 2	0,06 ± 0,03	96 ± 2	0,08 ± 0,03
Après filtration (0,45 µm) et sonication	53 ± <1	0,08 ± 0,01	55 ± 2	0,06 ± 0,02	89 ± 3	0,11 ± 0,03	96 ± 3	0,09 ± 0,03
Après filtration (0,22 µm)	50 ± 1	0,05 ± 0,01	52 ± 2	0,06 ± 0,01	88 ± 2	0,05 ± 0,01	94 ± 2	0,07 ± 0,02

Avant la filtration des NCLs, les valeurs de Z-average et PdI mesurées sont supérieures à celles obtenues directement après la formulation des NCLs (Tableau 2.8). Ces observations sont compatibles avec la présence d'agrégats composés de deux NCLs ou plus. Après la filtration, les valeurs de Z-average des NCLs sont légèrement inférieures. L'indice de polydispersité est par contre nettement amélioré. Ces 2 paramètres qui définissent la distribution de taille des NCLs semblent tendre vers les valeurs initialement obtenues juste après le procédé de formulation (Tableau 2.8). Cette observation semble corroborer notre hypothèse de la présence d'agrégats de NCLs en suspension retenus par la filtration.

I.4. Particularités des formes hydrogels de NCLs

Les formes hydrogel développées permettent d'associer les propriétés des gels et des NCLs. D'une part, les NCLs servent à encapsuler et à protéger une ou plusieurs molécules pouvant être lipophiles ou amphiphiles. Ces nano-objets présentent une très bonne stabilité, prolongent le temps de circulation de l'actif dans l'organisme et sont ainsi des NSs prometteurs pour des applications en santé [19].

Les NCLs se présentent classiquement sous la forme d'une suspension. Elles ont majoritairement été envisagées pour des injections IV. Différentes preuves de concept ont été démontrées pour des applications antitumorales : mélanome [39,40], poumon [41], hépatocarcinome [42]. Quelques rares études ont utilisé les NCLs avec des injections SC, notamment pour des applications antiparasitaires [43] et antitumorales [22,44] ou des injections intra-tumorales dans le cadre du traitement du glioblastome [45-49]. Cependant, leur forme « en suspension » ne leur permet pas d'être retenues sur leur site d'administration, ce qui limite leur période d'action. L'utilisation d'une forme gélifiée de NCLs pourrait permettre de prolonger le temps de résidence des NCLs après leur application et ainsi d'imaginer de nouvelles applications avec une libération soutenue de NCLs.

En parallèle, les hydrogels peuvent être utilisés seuls pour former un dépôt à partir duquel un PA est libéré progressivement. Des hydrogels ont par exemple été développés pour libérer la protéine-2 morphogénétique osseuse (BMP-2) et ainsi améliorer la régénération osseuse [50]. D'autres études ont développé un hydrogel libérant de façon prolongée de la dexaméthasone dans l'oreille interne [51,52]. Cependant, ces formes peuvent plus difficilement mettre en œuvre des PAs lipophiles, et une forme d'hydrogel chargé en nanosystèmes (encapsulant des PAs lipophiles) sera préférée avec ce type d'actifs [53].

La stratégie de disperser des NSs dans une matrice gélifiée est la plus simple et la plus explorée (Chapitre I). D'une part, cette méthode est très facile à mettre en œuvre. D'autre part, elle permet de protéger et moduler les cinétiques de libération des NSs. Cependant, cette technique présente le risque de multiplier le nombre d'excipients utilisés et d'augmenter la toxicité de la formulation. En effet, l'injection d'un médicament en SC est à l'origine d'une réaction inflammatoire dite à corps étranger. Celle-ci entraîne la formation d'une capsule fibreuse composée de fibroblastes et de dépôt de collagène autour de l'implant, ce qui peut être à l'origine d'une modification de la cinétique de libération du médicament. Cette réaction est systématique et elle peut suivre l'implantation de matériaux de nature diverse, tels que : le téflon, le polyuréthane, le caoutchouc, le silicone, le polyéthylène, le PEG, l'or ou le titane [54,55]. Ces matériaux non biodégradables sont couramment utilisés dans le développement de médicaments et/ou dispositifs médicaux implantables (approuvés par la FDA et l'ANSM).

Le développement d'hydrogels implantables utilisant des polymères biodégradables est couramment utilisé en recherche préclinique et commence à se concrétiser au travers d'études cliniques. A ce jour, aucune

forme hydrogel n'est utilisée en France en injections parentérales. Toutefois, l'ANSM autorise l'utilisation de différents implants polymères biodégradables. Ces médicaments se présentent sous une forme solide et permettent une libération prolongée de principes actifs. C'est par exemple le cas du Zoladex[®], qui contient la goséréline (analogue de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires). Injecté en SC, ce médicament permet une libération du PA durant trois mois et il est utilisé comme traitement adjuvant des cancers de la prostate métastasés [56]. Une autre forme implantable à base de polymère est le Gliadel[®]. Il est placé dans le cerveau pour traiter les suites opératoires d'une résection de glioblastome grâce à une libération progressive de carmustine [57]. Différentes études ont montré que la molécule active est rapidement libérée. Après une semaine, moins de 20% de la dose de départ de carmustine est présente dans l'implant. Par contre, des études rétrospectives ont montré que la matrice polymère est retrouvée jusqu'à 232 jours après son implantation. La présence de ces résidus polymères risque d'occasionner différents effets indésirables notamment liés au risque de migration dans les tissus [58]. Cette forme conventionnelle, considérée comme biodégradable, entraîne la présence d'excipients et de résidus dans l'organisme bien au-delà de sa période d'efficacité. Une simplification de la composition des formules développées permet de limiter cette réaction.

Lorsque des NSs sont dispersés dans un hydrogel de polymère, ils vont se libérer plus ou moins rapidement par diffusion au sein de la matrice, tandis que le réseau tridimensionnel formant la matrice gel pourra être lentement éliminé. A contrario, la forme hydrogel de NCLs n'utilise pas de polymère pour gélifier la phase aqueuse, et permet la libération progressive de NCLs qui contiennent les PAs. Lorsque les NCLs ont toutes été libérées, il ne reste plus aucun excipient sur le site d'action. Ainsi, la libération des PAs (transportés par les NCLs) est en phase avec à la disparition de l'hydrogel. Dans la forme que nous avons développée, la matrice de l'hydrogel est directement formée par l'association des NCLs à l'aide de liaisons hydrogène permises par la présence de la Cyt-C16. Le réseau tridimensionnel formé peut être plus ou moins réticulé en fonction de la concentration en NCLs et/ou en Cyt-C16.

Le développement d'une plateforme de libération hydrogel grâce à l'association de NSs a déjà été décrit auparavant. Les NSs utilisés sont des nanoparticules polymères à base de PLGA, de dextrane ou encore de copolymère de mPEG et de POA. Elles sont associées au moyen de liaisons physiques : interactions électrostatiques [59–61] ou hydrophobes [62–64]. Ces hydrogels ont été envisagés pour des applications d'ingénierie tissulaire (reconstruction osseuse) avec ou sans dexaméthasone [59,60,65], de régulation de la glycémie [61] ou pour libérer du paclitaxel en cancérologie [64]

A notre connaissance, les hydrogels de NCLs développés sont les premières formes de ce genre impliquant des liaisons hydrogène. D'autre part, les NCLs présentent de bonnes propriétés de biocompatibilité et leur procédé de formulation ne requiert pas de solvant organique contrairement aux nanoparticules polymères. Les hydrogels de NCLs sont donc des formes innovantes et prometteuses pour permettre une libération prolongée de PA tout en réduisant le risque de toxicité lié à leur injection.

II. Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse ont mené à la synthèse d'une nouvelle molécule formée par l'association d'une chaîne palmitique fixée sur la fonction amine libre de la molécule de cytidine (via une fonction amide). Cette molécule peut être utilisée en tant qu'agent de réticulation pour obtenir deux plateformes gélifiées.

La première forme est un hydrogel qui découle de l'encapsulation de la Cyt-C16 dans des NCLs. La présence de la Cyt-C16 à la surface de ces nano-objets permet leur agrégation en un réseau tridimensionnel grâce à des liaisons hydrogène ce qui gélifie la phase aqueuse de la formulation.

La seconde forme est permise par la solubilisation de la Cyt-C16 dans une huile. Les molécules s'associent entre elles par le biais de liaisons hydrogène ce qui emprisonne la phase lipidique liquide.

Nous avons montré que les propriétés des hydrogels peuvent être modifiées en fonction de la concentration en NCLs ou en Cyt-C16. Plus ces concentrations sont élevées et plus l'hydrogel obtenu est « rigide ». La forme hydrogel ne peut pas être obtenue avec des diamètres de NCLs inférieurs à 50 nm. Au-delà de cette valeur, la taille des particules n'affecte pas les propriétés viscoélastiques des hydrogels. Concernant les organogels, une augmentation de la concentration en Cyt-C16 permet également d'obtenir un gel plus « rigide ».

Par la suite, nous avons montré que les hydrogels de NCLs sont injectables au moyen d'une seringue et d'une aiguille. Par ailleurs, ils permettent une libération prolongée des NCLs *in vitro* et ont démontré une bonne stabilité de leur propriété rhéologique pendant 6 mois.

La Cyt-C16 a prouvé *in vitro*, sur deux lignées cellulaires différentes, qu'elle ne modifie pas la toxicité des NCLs. Cette indication de non toxicité de la Cyt-C16 est très prometteuse mais devra être confirmée par d'autres tests *in vitro* et *in vivo*.

Une étude de tolérance *in vivo* chez le rat a été menée sur les hydrogels de NCLs et les organogels. L'injection SC de ces deux formes entraîne une réaction inflammatoire locale se développant en deux temps : une première phase aiguë d'environ 48 heures et une seconde phase sub-chronique/chronique au-delà. Cette réaction est normale et fait suite à toute introduction de corps étrangers dans l'organisme. Elle peut être observée après l'injection d'un excipient ou d'une forme pharmaceutique. C'est par exemple le cas de l'huile de sésame qui a été utilisée en tant que contrôle dans cette étude. Cette réaction peut également faire suite à une procédure chirurgicale, notamment autour de points de suture. Enfin, la réaction inflammatoire reste localisée et n'affecte pas l'état de santé général des animaux étudiés.

Les deux plateformes gélifiées obtenues peuvent être utilisées pour mettre en œuvre des principes actifs de nature différente. Les hydrogels peuvent être utilisés pour libérer des actifs lipophiles, lesquels seront encapsulés dans les NCLs. Cette forme semi solide ouvre des applications jusque-là limitées pour les suspensions de NCLs. C'est particulièrement le cas des applications topiques qui nécessitent de retenir la forme au niveau du site d'administration (application cutanée, ophtalmique, nasale, vaginale).

D'autre part, les hydrogels peuvent également être envisagés pour permettre la libération prolongée des NCLs. En effet, l'injection d'un hydrogel de NCLs devrait mener à la formation d'un dépôt qui retiendra et ralentira la libération des NCLs sur le site d'injection.

De plus, si l'utilisation d'un PA lipophile dans les NCLs semble particulièrement adapté, la solubilisation d'une molécule hydrophile dans la phase aqueuse de l'hydrogel peut également être imaginée. Ainsi, deux actifs pourraient être combinés dans une même plateforme. Les cinétiques de libération attendues sont alors dépendantes de la nature du PA considéré. Pour de petites molécules hydrophiles, la libération sera très rapide car seulement dépendante de son coefficient de diffusion dans l'hydrogel. La libération des molécules lipophiles sera par contre plus lente car calquée sur celle des NCLs (Figure 6.4). Enfin, différents composés biologiques, tels que des peptides ou des siRNA pourront également être ajoutés dans la phase aqueuse pour de nouvelles propositions thérapeutiques.

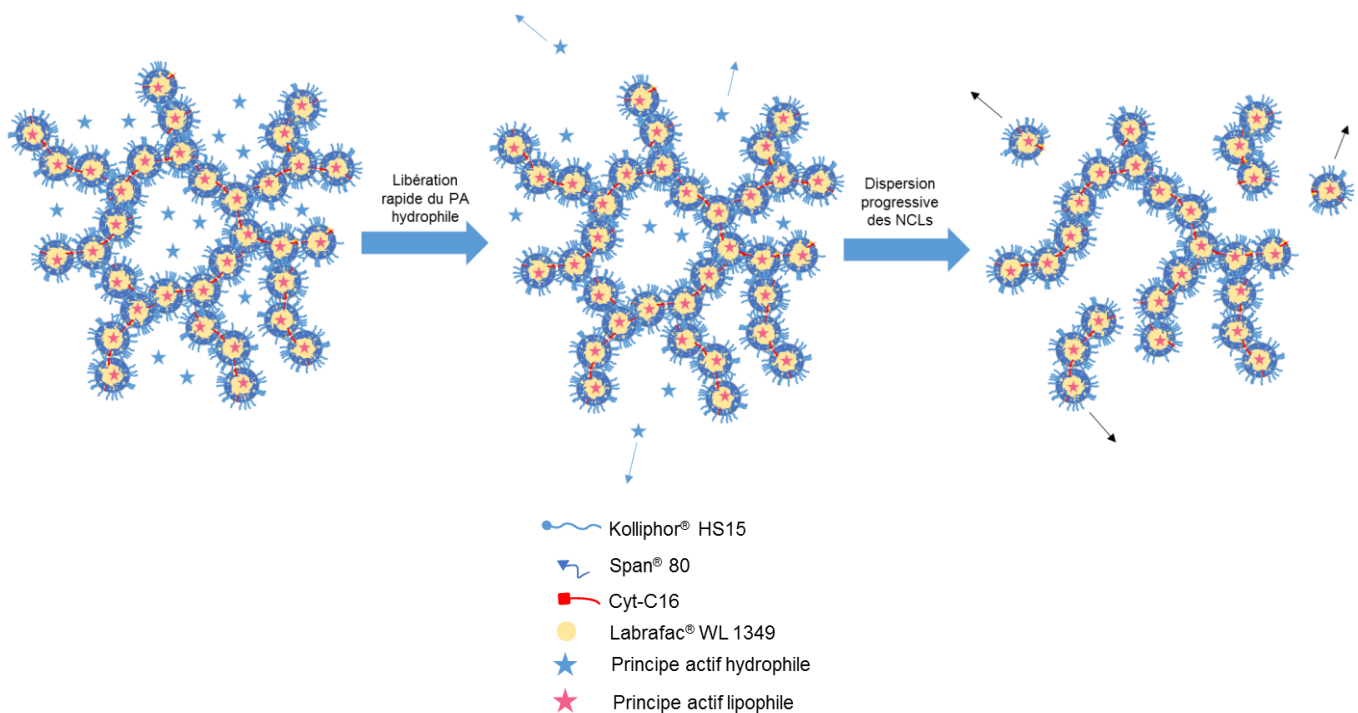


Figure 6.4 : Représentation schématique de la libération d'un principe actif hydrophile et d'un principe actif lipophile à partir d'un hydrogel de NCLs.

Les organogels sont des formes intéressantes pour obtenir une libération prolongée de PAs hydrophiles. Le PA hydrophile choisi est simplement dispersé sous forme solide dans l'organogel. La forme semi-solide est ensuite administrée sous forme de dépôt, par exemple au moyen d'une injection sous-cutanée. La matrice

gélifiée va ensuite être lentement dégradée, ce qui permettra la libération progressive et prolongée du PA hydrophile solide, qui ne peut pas diffuser dans la matrice d'huile. La dégradation de l'organogel est permise par les milieux biologiques environnants et, en particulier, par la présence de lipases (Figure 6.5).

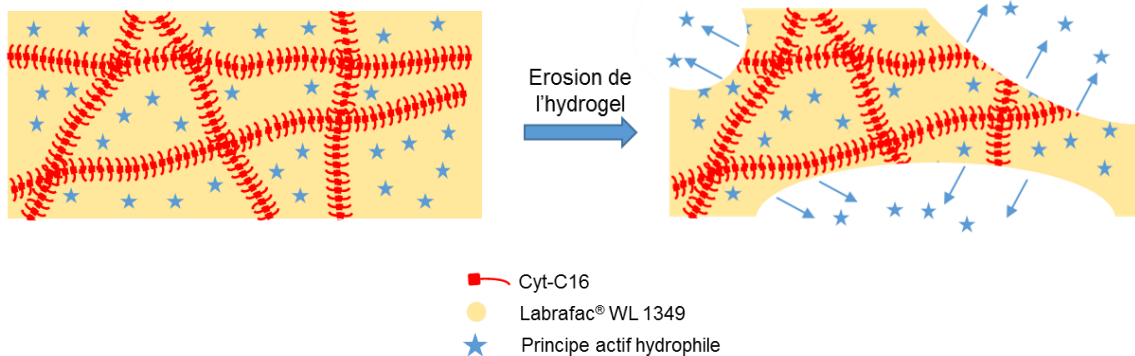


Figure 6.5 : Représentation schématique de la libération prolongée d'un principe actif hydrophile à partir d'un organogel. Le principe actif hydrophile est dispersé sous sa forme solide dans le gel.

Ces deux plateformes pourront être choisies pour proposer la libération prolongée de PAs lipophiles dans le cas des hydrogels et de PAs hydrophiles pour les organogels.

Les premières applications ont été envisagées sur les formes hydrogels de NCLs. L'injection SC de NCLs permet de cibler de façon passive mais spécifique les ganglions lymphatiques et le système lymphatique. L'utilisation de cette voie d'administration pourra être considérée pour traiter par exemple des métastases ganglionnaires liées à un cancer du sein.

Par ailleurs, les hydrogels de NCLs ont commencé à être testés en tant que traitement local des suites d'une résection chirurgicale de glioblastome. Ils permettraient de cibler les cellules cancéreuses résiduelles à l'origine de la majorité des cas de récurrence de la maladie. Une première partie des essais ont été menées avec la Gem-C12, mais un nouveau projet débutant cherche à utiliser le paclitaxel. Un premier essai à montrer que la co-encapsulation de la Cyt-C16 et du paclitaxel est possible sans altérer la gélification de la formule. D'autre part, nous souhaitons également associer le peptide NFL aux NCLs afin d'augmenter leur internalisation dans les cellules gliales. Ce peptide peut être ajouté aux hydrogels sans modifier leurs propriétés rhéologiques. Ce projet sera poursuivi *in vitro* afin de prouver que l'association du peptide avec les hydrogels de NCLs contenant du paclitaxel permet d'augmenter leur internalisation. Puis une étude d'efficacité pourra être menée *in vivo* sur un modèle déjà développé de résection de glioblastome orthotopique chez le rat.

Enfin, les hydrogels de NCLs pourront être utilisés à des fins de compréhension fondamentale du comportement d'objets nanométriques. En effet, au sein de notre équipe, le Dr Jean-Christophe Gimel travaille depuis plusieurs années sur la modélisation *in silico* du déplacement d'une sphère au sein d'une matrice gélifiée. Dans ce modèle numérique, la forme gélifiée découle de l'association aléatoire de nombreuses sphères rigides [58–60]. Le déplacement de la particule est régi par un mouvement brownien qui peut être caractérisé par un coefficient de diffusion (D). Ce dernier est principalement influencé par la fraction volumique du milieu qui est disponible pour la particule en mouvement, c'est-à-dire non occupée par la matrice gélifiée. Les hydrogels de NCLs présentent une structure très proche de celle des matrices gélifiées de ce modèle qui sont formées de sphères agrégées. Ils pourraient donc servir à reproduire *in vitro* ce modèle *in silico*. Une faible quantité de NCLs marquées avec un fluorochrome pourraient ainsi être introduites dans un hydrogel de NCLs. La technique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) pourrait ensuite être utilisée. Une zone de l'hydrogel est illuminée très fortement avec un laser afin de détruire toutes les sondes fluorescentes présentes à cet endroit (blanchiment). Puis l'évolution de la fluorescence de cette zone est suivie dans le temps. Un retour de fluorescence correspondra aux mouvements des NCLs libres dans la matrice gélifiée et permettra d'en déduire le coefficient de diffusion des particules. Différents paramètres, tels que la taille des NCLs en mouvement, la taille des NCLs formant l'hydrogel ainsi que leur concentration (fraction volumique), pourront être étudiés et corrélés aux propriétés de diffusion des NCLs en mouvement. L'hydrogel de NCLs pourra ainsi être une preuve expérimentale des lois de diffusion établies par les précédents travaux *in silico*.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis d'apporter de nouvelles possibilités quant à l'utilisation des NCLs. Leur association en plateforme gélifiée ouvre de nombreuses applications médicales nécessitant une administration locale et/ou une libération prolongée dans le temps de PAs.

III. Bibliographie

- [1] A. Hullmann, Who is winning the global nanorace?, *Nat Nanotechnol.* 1 (2006) 81–83.
- [2] P. Dobson, The long way to the market, *Nat Nanotechnol.* 11 (2016) 916–917.
- [3] R.W.G. Johnson, Sirolimus (Rapamune) in renal transplantation, *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 11 (2002) 603–607.
- [4] J. Camardo, The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation, *Transplant Proc.* 35 (2003) 18S–24S.
- [5] L.M. Chiechi, Estrasorb, *IDrugs Investig Drugs J.* 7 (2004) 860–864.
- [6] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int J Nanomedicine.* 4 (2009) 99–105.
- [7] S.M. Hoy, Albumin-bound paclitaxel: a review of its use for the first-line combination treatment of metastatic pancreatic cancer, *Drugs.* 74 (2014) 1757–1768.
- [8] Y. Barenholz, Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J Controlled Release.* 160 (2012) 117–134.
- [9] F. Muggia, A. Hamilton, Phase III data on Caelyx in ovarian cancer, *Eur J Cancer.* 37(Suppl 9) (2001) S15–18.
- [10] J. Rom, S. Bechstein, C. Domschke, M. Golatta, C. Mayer, J. Heil, J. Thum, K. Smetanay, C. Windemuth-Kieselbach, M. Wallwiener, F. Marme, F. Schuetz, C. Sohn, A. Schneeweiss, Efficacy and toxicity profile of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with advanced breast cancer, *Anticancer Drugs.* 25 (2014) 219–224.
- [11] G. Batist, J. Barton, P. Chaikin, C. Swenson, L. Welles, Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy, *Expert Opin Pharmacother.* 3 (2002) 1739–1751.
- [12] E. Rosenthal, I. Poizot-Martin, T. Saint-Marc, J.P. Spano, P. Cacoub, DNX Study Group, Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma, *Am J Clin Oncol.* 25 (2002) 57–59.
- [13] N. Mandal, I.H. Chisholm, Identifying the proportion of age related macular degeneration patients who would benefit from photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne), *Br J Ophthalmol.* 86 (2002) 118–119.
- [14] F. Aversa, A. Busca, A. Candoni, S. Cesaro, C. Girmenia, M. Luppi, A.M. Nosari, L. Pagano, L. Romani, G. Rossi, A. Venditti, A. Novelli, Liposomal amphotericin B (AmBisome®) at beginning of its third decade of clinical use, *J Chemother.* (2017) 1–13.
- [15] A. Chachuat, B. Bonnemain, European clinical experience with Endorem, A new contrast agent for liver MRI in 1000 patients, *Radiol.* 35 (1995) S274–276.
- [16] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm Res.* 19(6) (2002) 875–880.
- [17] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *Eur J Pharm Sci.* 18(1) (2003) 55–61.
- [18] B. Heurtault, P. Saulnier, J.P. Benoit, J.E. Proust, B. Pech, J. Richard, Lipid nanocapsules, preparation process and use as medicine. US20090238865 A1 (2009)
- [19] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine, *Int J Pharm.* 379 (2009) 201–209.
- [20] F. Lagarce, C. Passirani, Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules, *Curr Pharm Biotechnol.* 17 (2016) 723–727.
- [21] E. Moysan, Y. González-Fernández, N. Lautram, J. Béjaud, G. Bastiat, J.P. Benoit, An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure, *Soft Matter.* 10(11) (2014) 1767–1777

- [22] N. Wauthoz, G. Bastiat, E. Moysan, A. Cieślak, K. Kondo, M. Zandecki, V. Moal, M.C. Rousselet, J. Hureauux, J.P. Benoit, Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice, *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 11(5) (2015) 1237–1245.
- [23] A.C. Couffin-Hoarau, A. Motulsky, P. Delmas, J.C. Leroux, In situ-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm Res.* 21 (2004) 454–457.
- [24] A. Motulsky, M. Lafleur, A.C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, F. Boury, J.P. Benoit, J.C. Leroux, Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials.* 26 (2005) 6242–6253.
- [25] F. Plourde, A. Motulsky, A.C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, H. Ong, J.C. Leroux, First report on the efficacy of l-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J Control Release.* 108(2–3) (2005) 433–441.
- [26] A. Vintiloiu, J.C. Leroux, Organogels and their use in drug delivery-a review, *J Control Release.* 125 (2008) 179–192.
- [27] A. Vintiloiu, M. Lafleur, G. Bastiat, J.C. Leroux, In situ-forming oleogel implant for rivastigmine delivery. *Pharm Res.* 25(4) (2008) 845–852.
- [28] G. Bastiat, J.C. Leroux, Pharmaceutical organogels prepared from aromatic amino acid derivatives, *J Mater Chem.* 19 (2009) 3867–3877.
- [29] S. Furberg, The crystal structure of cytidine, *Acta Crystallogr.* 3 (1950) 325–333.
- [30] S. Furberg, C.S. Peterson, C. Rømming, A refinement of the crystal structure of cytidine, *Acta Crystallogr.* 18 (1965) 313–320.
- [31] D. Wu, P.X. Tang, S.S. Li, H.Z. Luo, H. Li, X-ray powder diffraction data for gemcitabine, *Powder Diffr.* 30 (2015) 76–78.
- [32] C.H. Görbitz, K.W. Törnroos, G.M. Day, Single-crystal investigation of L-tryptophan with $Z' = 16$, *Acta Crystallogr B.* 68 (2012) 549–557.
- [33] C.B. Hübschle, M. Messerschmidt, P. Luger, Crystal structure of DL-Tryptophan at 173K, *Cryst Res Technol.* 39 (2004) 274–278.
- [34] G. Salvi, P. De Los Rios, M. Vendruscolo, Effective interactions between chaotropic agents and proteins, *Proteins.* 61 (2005) 492–499.
- [35] B.J. Bennion, V. Daggett, The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003) 5142–5147.
- [36] T. Perrier, P. Saulnier, F. Fouchet, N. Lautram, J.P. Benoît, Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms, *Int J Pharm.* 396 (2010) 204–209.
- [37] A.L. Lainé, J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, M. Wiber, I. Texier, J.L. Coll, J.P. Benoit, C. Passirani, Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and *in vivo* fate prediction through FRET monitoring, *J Controlled Release.* 188 (2014) 1–8.
- [38] A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarce, *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomed.* 10 (2015) 589–601.
- [39] M.S. Sasso, G. Lollo, M. Pitorre, S. Solito, L. Pinton, S. Valpione, G. Bastiat, S. Mandruzzato, V. Bronte, I. Marigo, J.P. Benoit, Low dose gemcitabine-loaded lipid nanocapsules target monocytic myeloid-derived suppressor cells and potentiate cancer immunotherapy, *Biomaterials.* 96 (2016) 47–62.
- [40] G.V.U. Gamboa, S.D. Palma, A. Lifschitz, M. Ballent, C. Lanusse, C. Passirani, J.P. Benoit, D.A. Allemandi, Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications, *Parasitol Res.* 115 (2016) 1945–1953.
- [41] A. Clavreul, A. Montagu, A.L. Lainé, C. Tétaud, N. Lautram, F. Franconi, C. Passirani, A. Vessières, C.N. Montero-Menei, P. Menei, Targeting and treatment of glioblastomas with human mesenchymal stem cells carrying ferrociphenol lipid nanocapsules, *Int J Nanomedicine.* 10 (2015) 1259–1271.

- [42] M. Roger, A. Clavreul, N.T. Huynh, C. Passirani, P. Schiller, A. Vessières, C. Montero-Menei, P. Menei, Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy, *Int J Pharm.* 423 (2012) 63–68.
- [43] A. Cikankowitz, A. Clavreul, C. Tétaud, L. Lemaire, A. Rousseau, N. Lepareur, D. Dabli, F. Bouchet, E. Garcion, P. Menei, O. Couturier, F. Hindré, Characterization of the distribution, retention, and efficacy of internal radiation of (188)Re-lipid nanocapsules in an immunocompromised human glioblastoma model, *J Neurooncol.* 131 (2017) 49–58.
- [44] C. Bastiancich, K. Vanvarenberg, B. Ucakar, M. Pitorre, G. Bastiat, F. Lagarce, V. Préat, F. Danhier, Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma, *J Control Release Off.* 225 (2016) 283–293.
- [45] A. Vashist, A. Vashist, Y.K. Gupta, S. Ahmad, Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body, *J Mater Chem B.* 2 (2013) 147–166.
- [46] W. Kenneth Ward, A Review of the Foreign-body Response to Subcutaneously-implanted Devices: The Role of Macrophages and Cytokines in Biofouling and Fibrosis, *J Diabetes Sci Technol.* 2 (2008) 768–777.
- [47] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin Immunol.* 20 (2008) 86–100.
- [48] G.A. Dijkman, P.F. del Moral, J.W. Plasman, J.J. Kums, K.P. Delaere, F.M. Debruyne, F.J. Hutchinson, B.J. Furr, A new extra long acting depot preparation of the LHRH analogue Zoladex. First endocrinological and pharmacokinetic data in patients with advanced prostate cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37 (1990) 933–936.
- [49] J. Perry, A. Chambers, K. Spithoff, N. Laperriere, Gliadel® Wafers in the Treatment of Malignant Glioma: A Systematic Review, *Curr Oncol.* 14(5) (2007) 189–94.
- [50] Guilford Pharmaceuticals, NDA #20,637 Food and Drug Agency, 2001, [accessed 12-22-2016] URL: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3815b2_05_FDA.pdf n.d.
- [51] Q. Wang, L. Wang, M.S. Detamore, C. Berkland, Biodegradable Colloidal Gels as Moldable Tissue Engineering Scaffolds, *Adv Mater.* 20 (2008) 236–239.
- [52] Q. Wang, J. Wang, Q. Lu, M.S. Detamore, C. Berkland, Injectable PLGA based colloidal gels for zero-order dexamethasone release in cranial defects, *Biomaterials.* 31 (2010) 4980–4986.
- [53] Z. Gu, A.A. Aimetti, Q. Wang, T.T. Dang, Y. Zhang, O. Veisheh, H. Cheng, R.S. Langer, D.G. Anderson, Injectable Nano-Network for Glucose-Mediated Insulin Delivery, *ACS Nano.* 7 (2013) 4194–4201.
- [54] R.C.A. Ghanami, B.R. Saunders, C. Bosquillon, K.M. Shakesheff, C. Alexander, Responsive particulate dispersions for reversible building and deconstruction of 3D cell environments, *Soft Matter.* 6 (2010) 5037–5044.
- [55] M.R. Fraylich, R. Liu, S.M. Richardson, P. Baird, J. Hoyland, A.J. Freemont, C. Alexander, K. Shakesheff, F. Cellési, B.R. Saunders, Thermally-triggered gelation of PLGA dispersions: towards an injectable colloidal cell delivery system, *J Colloid Interface Sci.* 344 (2010) 61–69.
- [56] Y. Liang, Y. Qiao, S. Guo, L. Wang, Y. Zhai, C. Xie, R. Hu, L. Deng, A. Dong, Investigation on injectable, thermally and physically gelable poly(ethylene glycol)/poly(octadecanedioic anhydride) amphiphilic triblock co-polymer nanoparticles, *J Biomater Sci Polym Ed.* 23 (2012) 465–482.
- [57] W.W. Yang, E. Pierstorff, Reservoir-based polymer drug delivery systems, *J Lab Autom.* 17 (2012) 50–58.
- [58] J.C. Gimel, T. Nicolai, Self-diffusion of non-interacting hard spheres in particle gels, *J Phys Condens Matter Inst Phys J.* 23 (2011) 234115.
- [59] S. Babu, J.C. Gimel, T. Nicolai, C. De Michele, The influence of bond rigidity and cluster diffusion on the self-diffusion of hard spheres with square well interaction, *J Chem Phys.* 128 (2008) 204504.
- [60] S. Babu, J.C. Gimel, T. Nicolai, Tracer diffusion in colloidal gels, *J Phys Chem B.* 112 (2008) 743–748.

Thèse de Doctorat

Marion PITORRE

Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées : un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation.

Two pharmaceutical gel platforms: a hydrogel of lipid nanocapsules and an organogel, obtained with the same nucleoside crosslinking agent.

Résumé

Une nouvelle plateforme hydrogel uniquement formée par l'association de nanocapsules lipidiques (NCLs) a été développée en s'inspirant de précédents travaux utilisant une gemcitabine modifiée. Afin de limiter la toxicité de l'hydrogel, la gemcitabine a été remplacée par la cytidine, rendue amphiphile par une chaîne aliphatique (Cyt-C16). Placée à l'interface huile/eau des NCLs, la Cyt-C16 permet la formation d'un réseau tridimensionnel de NCLs à l'origine de la gélification. Un plan de mélange a permis d'optimiser les procédés de formulation de 4 tailles de NCLs modèles. Les propriétés viscoélastiques des hydrogels sont modulables. Plus les concentrations en NCLs et Cyt-C16 sont élevées, plus le gel est « rigide », indépendamment de la taille des NCLs qui doit être supérieure à 50 nm pour permettre la gélification. Les hydrogels sont injectables et permettent une libération prolongée de NCLs (de taille mono-disperse), sans toxicité supplémentaire in vitro, du fait de la présence de la Cyt-C16. De plus, uniquement solubilisée dans l'huile, la Cyt-C16 permet d'obtenir un organogel, dont les propriétés viscoélastiques sont renforcées en augmentant sa concentration. L'injection sous-cutanée (SC) in vivo des deux gels est bien tolérée et entraîne une réaction inflammatoire locale comparable à celle provoquée par un excipient pharmaceutiquement acceptable. Ces deux formes pourront être utilisées pour libérer de façon prolongée différents actifs. Deux applications précliniques des hydrogels ont été explorées, l'une utilisant la voie SC pour cibler les ganglions lymphatiques, la seconde permettant un traitement local des suites opératoires d'une résection de glioblastome.

Mots clés

Nanocapsules lipidiques, Hydrogel, Organogel, Libération prolongée, Nanomédecine, Cytidine modifiée, Injection sous cutanée.

Abstract

An innovative hydrogel platform obtained by the association of lipid nanocapsules (LNCs) was based on the previous work on modified gemcitabine. To limit the inherent toxicity of the hydrogel, gemcitabine was replaced by cytidine, then modified by an aliphatic chain (Cyt-C16). The hydrogel network was allowed by H-bond interactions between cytidine moieties exposed at the oil/water interfaces of LNCs. An experimental plan provided the formulation processes for 4 optimized sizes of model LNCs. The gelation was only possible for LNC sizes higher than 50 nm, and the hydrogel viscoelastic properties are versatile. The hydrogel is more "rigid" when LNC and Cyt-C16 concentrations increase, independently of the LNC size. The hydrogels are injectable and allow a sustained release of LNCs (with monodisperse size), without additional in vitro cytotoxicity due to Cyt-C16. Moreover, when solubilized in oil, Cyt-C16 alone produced an organogel platform, whose viscoelastic properties are strengthened increasing its concentration. Both types of gels showed a good biocompatibility after an in vivo subcutaneous (SC) injection, with a local inflammatory response similar to that of induced by an approved excipient. These two forms could be used to sustain the release of various drugs, and two preclinical applications of hydrogels have been explored: one using the SC route to target lymph nodes, and the second for local treatment after glioblastoma resection.

Key Words

Lipid nanocapsules, Hydrogel, Organogel, Sustained release, Nanomedicine, Modified cytidine, Subcutaneous injection.