



HAL
open science

Synthèse de polyesters fluorés pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores

Sophie Houvenagel

► **To cite this version:**

Sophie Houvenagel. Synthèse de polyesters fluorés pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores. Pharmacie galénique. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS347 . tel-02354905

HAL Id: tel-02354905

<https://theses.hal.science/tel-02354905>

Submitted on 8 Nov 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.

Synthèse de polyesters fluorés pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Pharmacotechnie et biopharmacie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 7 novembre 2017, par

Mme Sophie Houvenagel

Composition du Jury :

Mme Catherine Amiel Pr. Université de Paris Est Créteil (UMR 7182)	Rapporteur
M. Bruno Ameduri D.R. ENSCM (UMR 5253)	Rapporteur
M. Olivier Sandre D.R. Université de Bordeaux (UMR 5629)	Examineur
M. Olivier Couture C.R. ESPCI (UMR CNRS 7587 Inserm U979)	Examineur
M. Elias Fattal Pr. Université Paris Sud (UMR 8612)	Président
M. Nicolas Tsapis D.R. Université Paris Sud (UMR 8612)	Directeur de thèse
Mme Laurence Moine C.R. Université Paris Sud (UMR 8612)	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse, le Dr. Nicolas Tsapis et le Dr. Laurence Moine. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. J'ai beaucoup appris lors de nos nombreuses discussions scientifiques qui se déroulaient toujours dans la bonne humeur. Merci Nicolas de m'avoir encadrée en te montrant toujours disponible, motivant, rassurant et attentionné. Merci Laurence pour ton dynamisme, tes remarques toujours constructives et tes conseils judicieux.

Je remercie le Pr. Elias Fattal de m'avoir si bien accueillie au sein de l'unité et surtout au sein de son équipe, puis d'avoir évalué mon travail.

Je remercie le Pr. Catherine Amiel et le Dr. Bruno Ameduri d'avoir été les rapporteurs de ce travail ainsi que le Dr. Olivier Sandre et le Dr. Olivier Couture d'avoir examiné mon travail.

Je remercie particulièrement le Dr. Olivier Couture d'avoir pris de son temps pour les expériences d'ultrasons, et d'être venu jusqu'à Châtenay-Malabry pour nous aider et installer un montage en des temps très chargés. Merci aussi à Vincent Faugeras d'avoir mis au point ce montage.

Je remercie très chaleureusement le Dr. Guilherme Picheth pour sa contribution importante à mon projet, ses conseils et sa bonne humeur. Cela m'a beaucoup aidée de commencer ma thèse en travaillant avec toi, tu savais prendre plus de recul par rapport au projet.

Je tiens à remercier le Dr. Annie Brûlet pour son aide précieuse sur la diffusion de neutrons, sa patience, sa disponibilité, sa fiabilité et sa motivation pour le projet. Un grand merci aussi au Dr. Alexis Chennevière pour son aide et sa patience.

Je remercie sincèrement le Dr. Jean-Philippe Michel de s'être investi dans le projet et d'avoir été extrêmement patient pour réaliser les expériences d'AFM. Merci d'avoir persévéré et d'avoir su te montrer disponible pour m'aider et répondre à mes questions.

Un grand merci à Camille Dejean pour sa contribution très importante pour les dosages RMN, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Merci au Dr. Nicolas Huang pour son aide sur les mesures de tension interfaciale.

Je remercie Claire Boulogne et Cynthia Gillet de m'avoir formée puis beaucoup aidée lors des expériences de TEM et de cryo-TEM, toujours dans le calme et la bonne humeur.

Un grand merci à Stéphanie Denis de m'avoir formée et aidée pour la culture cellulaire.

Je remercie Ludivine Mousnier de m'avoir formée sur la synthèse et la formulation dès que je suis arrivée, et pour ses conseils judicieux tout au long de ma première année.

Merci aussi à Emilie Langlois pour son aide pour les synthèses.

Merci également à Anne et Emeline pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 5 et toutes les personnes avec qui j'ai partagé de bons moments pendant ces trois années à l'Institut Galien. Mathilde, Alexandre, Tanguy,

Remerciements

Marion, Elise et Claire, vous avez été des vrais « coachs » et vous m'avez tirée vers le haut. Merci aussi à Henrique, Federica, Julie, Jean-Baptiste, Daniele, GianPiero, Nelly, Caroline, Maria, Julien, Marie, Thomas, Quentin, Isabella, Stefania, Ivana, Ludmila, Barbara, Johanna, Félix, Anaëlle, Giovanna, Naila, Rosana, Dunja, Walhan, Hung et Hélène.

Un grand merci à mes amis de plus longue date, notamment de Chimie Paris, Diane, Hafssa, Héloïse et Madeleine, qui m'ont soutenue tout au long de la thèse, mais aussi Quentin, Arnaud, Bruno, Maxime, Luc, Théo et Charlie. Merci aussi à l'équipe de Jamais sans mon coach, Pierre, Chloé, Simon, Sylvain et Alicia. Et surtout, un grand merci à mes amies de la vallée de Chevreuse, Amélie, Amandine, Cécile et Célia, qui m'ont chaleureusement encouragée.

Je remercie particulièrement Serge pour ses conseils précieux lors de ma recherche de thèse.

Enfin, je souhaite remercier toute ma famille, mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée à aller dans la voie qui m'intéressait, mon grand-père qui m'a donné un certain goût pour la recherche, Claire et Olivier qui ont toujours été à l'écoute et optimistes.

Enfin, merci à Ivan de m'avoir soutenue au jour le jour.

Table des matières

Introduction générale.....	11
Travaux antérieurs	
1. L'imagerie ultrasonore	19
1.1. Principe.....	19
1.2. Paramètres ultrasonores.....	20
1.2.1. Fréquence.....	21
1.2.2. Pression et intensité acoustique	21
1.2.3. Temps d'exposition	21
1.3. Les agents de contraste ultrasonores (ACUs).....	22
1.3.1. Comportement des agents de contraste	22
1.3.2. Indice mécanique	23
1.3.3. Techniques d'imagerie de contraste	24
1.3.4. Microbulles	25
1.3.5. ACUs de taille nanométrique.....	32
2. Chaînes perfluorées et polymères	48
2.1. Propriétés des chaînes perfluorées.....	48
2.2. Perfluorocarbures et applications médicales	49
2.2.1. Structure chimique.....	50
2.2.2. Biocompatibilité	50
2.3. Polymères terminés par des chaînes perfluorées linéaires	52
2.3.1. Modification des propriétés de surface de films de polymères	52
2.3.2. Modification des propriétés associatives de polymères en solution.....	53
2.4. Copolymères contenant des chaînes perfluorées pendantes	57
2.4.1. Voies de synthèse.....	57
2.4.2. Copolymères à enchaînement aléatoire	59
2.4.3. Copolymères à blocs hydrophile / fluorophile	60
2.4.4. Copolymères à blocs lipophile / fluorophile.....	61
2.4.5. Copolymères à blocs hydrophile / lipophile / fluorophile dits « triphiles »	62
2.5. Polymères fluorés pour l'encapsulation de PFCs	65
3. Notre approche.....	67
Références.....	69

Chapitre 1: Fonctionnalisation de polyesters par des terminaisons fluorées pour l'encapsulation du bromure de perfluorooctyle dans des nanocapsules PEGylées échogènes

Abstract.....	84
1. Introduction.....	85
2. Materials and methods.....	87
2.1. Materials.....	87
2.2. Polymers synthesis.....	87
2.3. Polymers characterization.....	88
2.4. Interfacial tension measurements.....	88
2.5. Nanocapsules preparation.....	89
2.6. Size distribution and Zeta potential.....	89
2.7. PFOB encapsulation efficiency by ^{19}F NMR spectroscopy.....	89
2.8. Transmission electron microscopy (TEM).....	90
2.9. Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM).....	90
2.10. Small angle neutrons scattering (SANS).....	90
2.10.1. SANS data collection.....	90
2.10.2. SANS data modelling.....	91
2.11. Cell culture and cell viability studies.....	92
2.12. In vitro ultrasound imaging.....	92
3. Results and discussion.....	93
3.1. Polymers synthesis and characterization.....	93
3.2. Polymers interfacial properties.....	95
3.3. PFOB nanocapsules: physical characterization.....	95
3.4. Cytotoxicity studies.....	102
3.5. In vitro ultrasound imaging.....	103
4. Conclusion.....	106
5. Acknowledgements.....	106
References.....	107
Supporting information.....	110

Chapitre 2 : Synthèse de polymères triblocs hydrophiles-lipophiles-fluorophiles pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores

Abstract.....	124
1. Introduction.....	125
2. Materials and methods.....	127
2.1. Materials.....	127
2.2. Polymer synthesis.....	127
2.2.1. Synthesis of PEG-PLA.....	127
2.2.2. Synthesis of PEG-PLA-Br macroinitiator.....	128
2.2.3. Synthesis of PEG-PLA-PFMA _x polymers.....	128
2.3. Polymer characterization.....	128
2.4. Interfacial tension measurements.....	129
2.5. Nanocapsules preparation.....	129
2.6. Size distribution and Zeta potential.....	129
2.7. PFOB encapsulation efficiency by ¹⁹ F NMR spectroscopy.....	130
2.8. Transmission electron microscopy (TEM).....	130
2.9. Cryo-transmission electron microscopy (cryoTEM).....	130
2.10. Small angle neutrons scattering (SANS).....	131
2.10.1. SANS data collection.....	131
2.10.2. SANS data modelling.....	131
2.11. Hydrolytic degradation of polymers.....	131
2.12. Cell culture.....	132
2.13. Cytotoxicity evaluation of NCs and polymer degradation products.....	132
2.14. <i>In vitro</i> ultrasound measurements.....	132
3. Results and discussion.....	134
3.1. Polymers synthesis and characterization.....	134
3.2. Polymers interfacial properties.....	137
3.3. PFOB nanocapsules: physical characterization.....	139
<i>Size distribution and zeta potential</i>	139
<i>PFOB encapsulation efficiency</i>	139
<i>Nanocapsules morphology</i>	140
<i>Shell thickness</i>	142
3.4. Cytotoxicity studies.....	143
3.5. <i>In vitro</i> ultrasound measurements.....	145

4. Conclusion.....	148
5. Acknowledgements.....	148
References.....	149
Supporting information.....	151

Chapitre 3 : Propriétés mécaniques et acoustiques de nanocapsules de bromure de perfluorooctyle

1. Introduction.....	162
2. Materials and methods.....	163
2.1. Materials.....	163
2.2. Nanocapsules preparation.....	163
2.3. Nanocapsules characterization.....	163
2.4. AFM experiments.....	164
2.5. <i>In vitro</i> ultrasound measurements.....	164
3. Results and discussion.....	166
3.1. Nanocapsules characterization.....	166
3.2. AFM imaging and indentation.....	167
3.2.1. Choice of the substrate.....	167
3.2.2. Force measurements.....	171
3.3. Acoustic response.....	176
4. Conclusion.....	179
5. Acknowledgements.....	179
References.....	180

Chapitre 4 : Influence des chaînes de poly(éthylène glycol) et des chaînes perfluorées sur la réponse acoustique de nanocapsules de bromure de perfluorooctyle

1. Introduction.....	182
2. Materials and methods.....	185
2.1. Materials.....	185
2.2. Synthesis of C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	185
2.2.1. Synthesis of C ₆ H ₁₃ -PLA.....	185
2.2.2. Synthesis of C ₆ H ₁₃ -PLA-Br macroinitiator.....	186
2.2.3. Synthesis of C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	186
2.3. Characterization of polymers.....	186
2.4. Interfacial tension measurements.....	187

2.5.	Nanocapsules preparation.....	187
2.6.	Size distribution	187
2.7.	<i>In vitro</i> ultrasound measurements	188
3.	Results and discussion.....	189
3.1.	Synthesis and characterization of C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	189
3.2.	Interfacial properties of C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	191
3.3.	PFOB nanocapsules.....	192
3.4.	<i>In vitro</i> ultrasound measurements	193
	PLA-C ₈ F ₁₇ /PEG-PLA and PLA-C ₆ H ₁₃ /PEG-PLA mixtures	194
	Triblock copolymers: C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀ / PEG-PLA-PFMA ₁₀ mixtures	195
4.	Conclusion.....	197
5.	Acknowledgements.....	197
	References.....	198

Discussion générale

1.	La synthèse des polymères.....	201
	Le choix du solvant pour l'ATRP.....	201
	La synthèse du macroamorceur	202
2.	La conformation des polymères en solvant organique.....	202
3.	La capacité des polymères à encapsuler le PFOB.....	204
4.	Les morphologies obtenues	207
5.	Les paramètres influençant la réponse ultrasonore des capsules	212
5.1.	Notre hypothèse initiale : diminuer le rapport épaisseur sur rayon.....	212
5.2.	La présence du PEG.....	215
5.3.	Les propriétés mécaniques.....	218
5.4.	La densité	218
5.5.	La morphologie.....	219
5.6.	Conclusion sur les critères influençant la réponse acoustique.....	221
6.	Les pistes d'amélioration de notre système en tant qu'ACU	222
	Références.....	224
	Conclusion générale.....	227

Abréviations

ACU: Agent de contraste ultrasonore
 AFM : Microscopie à force atomique – *Atomic force microscopy*
 ATRP : Polymérisation radicalaire par transfert d'atome – *Atom transfer radical polymerization*
 CAD: Maladie de l'artère coronaire
 CaCO₃: Carbonate de calcium
 CO₂: Dioxyde de carbone
 Cryo-TEM : Cryo-microscopie électronique en transmission – *Cryo-transmission electron microscopy*
d_H: *Hydrodynamic diameter*
 DLS : *Dynamic light scattering*
 DP : *Degree of polymerization*
 DSC : *Differential Scanning Calorimetry*
 EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
 EPR: Effet de perméabilité et de rétention accrue – *Enhanced permeation and retention effect*
 Et₃N : *Triethylamine*
 FDA: *Food and drug administration*
 FMA : Méthacrylate de 1H,1H,2H,2H-heptadécafluorodécyl – *1H,1H,2H,2H-Heptadecafluorodecyl methacrylate*
 FZ curves: *Force distance curves*
 HFB : *2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol*
 HMDS : *1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane*
 HUVEC : Human endothelial umbilical vein cells
 IV: Intraveineuse – *Intravenous*
 IRM: Imagerie par resonance magnétique
 MI : Indice mécanique – *Mechanical index*
 MMA : Méthacrylate de méthyle – *Methyl methacrylate*
 MRI: *Magnetic resonance imaging*
 MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenyltetrazolium bromide
 NC: Nanocapsule
 NHS: N-hydroxysuccinimide
 NMP: Polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes – *Nitroxide-mediated polymerization*
 NMR: *Nuclear magnetic resonance*
 PB : Polybutadiène
 PBCA: Poly(*n*-butyl-cyanoacrylate)
 PCMA : Poly(méthacrylate de 2-cinnamoyloxyéthyle)
 PDHI : Imagerie harmonique Doppler de puissance
 PDI: *Polydispersity index*
 PEG : Poly(éthylène glycol)
 PEGMA : Poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol) éther de méthyle)
 PEG-PCL : poly(éthylène glycol)-*b*-polycaprolactone
 PEG-PLA-PFMA : Poly(éthylène glycol)-*b*-polylactide-*b*-poly(méthacrylate de 1H,1H,2H,2H-heptadécafluorodécyl)
 PEG40S : Stéarate de polyoxyéthylène 40
 PFB : Perfluorobutane

Abréviations

PFC: Perfluorocarbure – *Perfluorocarbon*
PFCE : Perfluoroéther couronne – *Perfluoro-15-crown-5-ether*
PFDCO : 1,8-dichloro-perfluorooctane
PFMA : Poly(méthacrylate de 1H,1H,2H,2H-heptadécafluorodécyl) – *Poly(1H,1H,2H,2H-Heptadecafluorodecyl methacrylate)*
PFOA : Acide perfluorooctanoïque
PFOB : Bromure de perfluorooctyle – *Perfluorooctyl bromide*
PFOS : Acide perfluorooctane sulfonique
PFH : Perfluorohexane
PFP : Perfluoropentane
PGMA : poly(méthacrylate de glycidyle)
PLA : Polylactide
PLA-PEG : Polylactide-*b*-poly(éthylène glycol)
PLLA : Poly(L-lactide)
PLGA : Poly(lactide-*co*-glycolide)
PLGA-PEG: Poly(lactide-*co*-glycolide)-*b*-poly(éthylène glycol)
PMDETA: *N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine*
PMMA: Poly(méthacrylate de méthyle)
PNIPAM : poly(*N*-isopropylacrilamide)
PRC: Polymérisation radicalaire contrôlée
PS : Polystyrène
PTFEMA : Poly(méthacrylate de 2,2,2-trifluoroéthyle)
PVA: Alcool polyvinylique – *Poly(vinyl alcohol)*
PVDF : *Polyvinylidene fluoride*
RAFT : Polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition/fragmentation – *Reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*
RES : Système réticulo-endothélial – *Reticuloendothelial system*
RMN: Résonance magnétique nucléaire
ROP : Polymérisation par ouverture de cycle – *Ring-opening polymerization*
SANS : Diffusion de neutrons aux petits angles – *Small angle neutron scattering*
SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles – *Small angle X-ray scattering*
SC : Cholate de sodium – *Sodium cholate*
SCS: Section efficace de diffusion – *Scattering Cross Section*
SD : *Standard deviation*
SEC : *Size exclusion chromatography*
SEM : *Standard error of the mean*
Sn(Oct)₂ : bis(2-éthylhexanoate) d'étain - *stannous 2-ethyl hexanoate*
TEM : Microscopie électronique en transmission – *Transmission electron microscopy*
TFA : *Trifluoroacetic acid*
TFEMA: méthacrylate de 2,2,2-trifluoroéthyle
TFT : Trifluorotoluène
THF : Tétrahydrofurane
UCA: *Ultrasound contrast agent*
US : Ultrasons – *Ultrasound*

Introduction générale

L'échographie fait partie des techniques d'imagerie médicale les plus utilisées. Appelée aussi ultrasonographie ou imagerie ultrasonore, elle est facilement accessible, peu coûteuse, non-irradiante, et permet de visualiser les tissus en temps réel. L'échographe étant mobile, l'examen échographique peut, de plus, être réalisé directement au lit du patient. L'ultrasonographie est cependant limitée par la faible différence d'échogénicité entre certains tissus et la difficulté à visualiser des vaisseaux d'un diamètre inférieur à 200 microns. Depuis les années 1990, l'injection d'agents de contraste ultrasonores (ACUs) par voie intraveineuse a permis d'améliorer considérablement le contraste et de visualiser des vaisseaux habituellement non observables. Ces ACUs commerciaux sont des microbulles de gaz stabilisées par des tensioactifs, des lipides ou des protéines. Ces bulles de 1 à 8 μm de diamètre sont actuellement utilisées en clinique pour l'imagerie des cavités cardiaques ou encore la perfusion myocardique. Cependant, du fait de leur grande taille et de leur faible stabilité après injection intraveineuse, leur utilisation reste limitée au compartiment intravasculaire. Pour imager les tumeurs cancéreuses, il est nécessaire de développer des ACUs plus stables et plus petits pouvant s'accumuler dans les tumeurs (Paefgen et al., 2015).

Au sein de l'Institut Galien Paris-Sud, des agents de contraste de taille nanométrique ont été développés. Il s'agit de nanocapsules composées d'une coque polymère renfermant un cœur de perfluorocarbure liquide. Ce cœur liquide apporte de la stabilité au système comparé aux gaz, qui sont difficiles à stabiliser dans des nanobulles. Par ailleurs, la coque polymère est plus résistante que les membranes de lipides, tensioactifs ou protéines. Composée de poly(lactide-*co*-glycolide)-*b*-poly(éthylène glycol) (PLGA-PEG), elle possède des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) en surface qui confèrent au système une excellente furtivité. Ceci se traduit par une circulation prolongée dans le compartiment sanguin, rendant l'accumulation dans les tumeurs possible. Ces nouveaux systèmes nanoparticulaires ont démontré leur potentialité en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique du fluor (Diou et al., 2012) ainsi qu'en tant que vecteurs d'anti-cancéreux (Boissenot et al., 2016). Cependant, du point de vue de la réponse ultrasonore, ces nanocapsules se sont révélées décevantes aux fréquences cliniques, du fait d'une épaisseur trop importante de leur coque par rapport à leur rayon. L'épaisseur de la coque doit être réduite pour augmenter l'échogénicité de ces nanocapsules. Des travaux antérieurs sur des nanocapsules de poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) sans PEG ont montré qu'il suffisait de diminuer la quantité de polymère mise en jeu lors de la formulation pour diminuer l'épaisseur (Pisani et al., 2006). Toutefois, la simple diminution de la quantité de PLGA-PEG conduit au démouillage du polymère autour de la goutte de liquide fluoré, et à la coexistence de gouttes de perfluorocarbure non-encapsulé et de nanocapsules non échogènes (Diou et al., 2016). L'objectif de ce travail de thèse est de synthétiser des polymères à

terminaisons fluorées permettant de faciliter l'ancrage autour de la goutte de liquide fluoré et ainsi réduire l'épaisseur des coques des nanocapsules.

Ce manuscrit se divise en deux parties. Une première partie bibliographique permettra de situer le contexte général de l'étude. Après une description des principes de l'imagerie de contraste ultrasonore, nous nous intéresserons à l'évolution des agents de contraste, depuis les premières microbulles jusqu'aux systèmes nanoparticulaires. Ceci nous permettra de situer les nanocapsules par rapport aux autres systèmes, puis de détailler leur mécanisme de formation pour démontrer la nécessité d'employer des polymères fluorés. Nous nous focaliserons ensuite sur les propriétés des perfluorocarbures et des polymères contenant des chaînes perfluorées.

La seconde partie du manuscrit concernera les travaux expérimentaux, divisés en quatre chapitres. Les deux premiers chapitres, qui font l'objet de publications, décriront chacun la synthèse d'une famille de polymères et leur formulation en nanocapsules. Dans chacun de ces articles, la caractérisation physico-chimique des nanocapsules est suivie d'une évaluation de leur cytotoxicité et de leur réponse ultrasonore *in vitro*. Les deux derniers chapitres, bien que rédigés selon un format d'article scientifique, présentent des résultats préliminaires visant à comprendre les paramètres influençant la réponse acoustique des nanocapsules. Les études de nanoindentation réalisées dans le chapitre 3 essaient de corrélérer les propriétés mécaniques des capsules à leurs propriétés acoustiques. Le chapitre 4 se focalise sur l'influence des différentes composantes du polymère (chaînes de PEG, chaînes perfluorées) sur la réponse acoustique des nanocapsules. Enfin, une discussion générale permettra de comparer les résultats obtenus pour parvenir à la conclusion et aux perspectives de ce travail.

Références

- Boissenot, T., Fattal, E., Bordat, A., Houvenagel, S., Valette, J., Chacun, H., Gueutin, C., Tsapis, N., 2016. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108, 136–144.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E., 2012. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ¹⁹F MRI. *Biomaterials* 33, 5593–5602.
- Paefgen, V., Doleschel, D., Kiessling, F., 2015. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* 6, 197.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.

Travaux antérieurs

1. L'imagerie ultrasonore

1.1. Principe

L'imagerie ultrasonore ou échographie se distingue des autres techniques d'imagerie médicale (rayons X, imagerie par résonance magnétique, ...) de par plusieurs atouts : son faible coût, sa large disponibilité, et son caractère non-irradiant et inoffensif pour le corps humain. L'examen échographique permet de plus d'imager en temps réel et peut être réalisé chez le patient sans nécessiter d'hospitalisation.

Le principe de l'échographie repose sur la réflexion des ondes ultrasonores, qui sont des ondes mécaniques longitudinales nécessitant un milieu pour se propager. L'onde ultrasonore correspond à la propagation de proche en proche d'une déformation provoquant des fluctuations de pression locales et des déplacements des molécules autour de leur point d'équilibre. Le passage de l'onde entraîne la formation de zones successives de compression et de raréfaction (Figure 1).

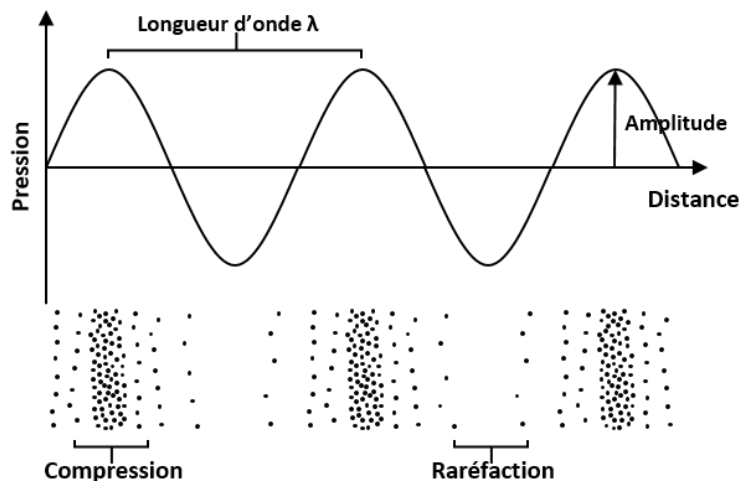


Figure 1: Représentation des variations locales de pression et des zones de compression et raréfaction lors de la propagation d'une onde ultrasonore

La vitesse de propagation de l'onde c dépend du milieu et définit la longueur d'onde λ par la relation :

$$c = \lambda \times f$$

où f est la fréquence et correspond au nombre de fois où l'onde oscille en une seconde. On définit également l'impédance acoustique d'un milieu comme :

$$Z = \rho \times c$$

où ρ est la densité du milieu. L'impédance acoustique caractérise l'aptitude d'un milieu à laisser pénétrer les ondes ultrasonores et à reprendre sa forme originelle après déformation.

En imagerie ultrasonore, un transducteur génère une onde ultrasonore incidente qui va subir plusieurs phénomènes lors de sa propagation dans les tissus. Elle sera partiellement transmise aux tissus plus profonds, partiellement réfléchiée vers le transducteur sous forme d'échos, partiellement diffusée, et partiellement cédée au milieu sous forme de chaleur (absorption).

Si l'onde incidente rencontre une grande interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes en incidence normale, elle sera partiellement transmise et partiellement réfléchiée vers le transducteur (Figure 2A). L'intensité réfléchiée est alors directement proportionnelle à la différence d'impédance acoustique entre les deux tissus. Si l'angle d'incidence n'est pas de 90°, une partie de l'onde peut être réfractée dans une autre direction et ne pas atteindre le transducteur. La réfraction peut être une source d'artéfacts dans l'image.

Si l'onde incidente rencontre des interfaces de dimensions inférieures à la longueur d'onde ou des interfaces rugueuses ou irrégulières, elle sera diffusée dans plusieurs directions. Les échos de diffusion seront donc plus faibles en intensité, mais l'avantage est que certains atteindront le transducteur (rétrodiffusion) quel que soit l'angle d'incidence. La plupart des tissus possèdent des microstructures de taille inférieure à la longueur d'onde, qui seront donc source de diffusion. Certaines directions seront plus ou moins favorisées selon la taille des diffuseurs, comme représenté en Figure 2B.

Enfin lors de la propagation de l'onde ultrasonore, une partie de l'énergie de l'onde est convertie en chaleur et cédée au milieu, ce qui diminue l'intensité du faisceau.

L'image échographique résulte de l'intensité réfléchiée et rétrodiffusée, reçue par le transducteur et codée en niveau de gris.

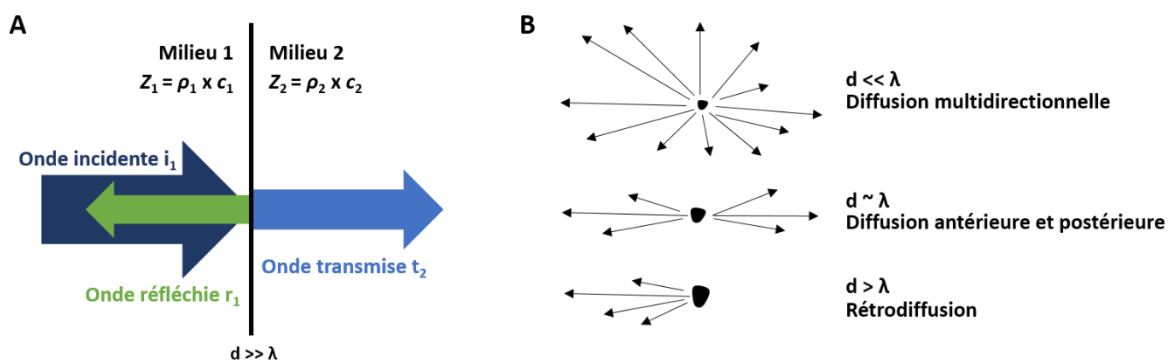


Figure 2: Représentation simplifiée des phénomènes d'interaction de l'onde avec les tissus : réflexion et transmission en incidence normale à l'interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes (A) et phénomènes de diffusion aux interfaces hétérogènes ou de taille inférieure (B)

1.2. Paramètres ultrasonores

Plusieurs paramètres ultrasonores peuvent être modulés pour l'examen échographique : la fréquence d'émission, la pression acoustique et le temps d'exposition.

1.2.1. Fréquence

Par définition, les ultrasons se propagent à des fréquences supérieures à 20 kHz. Les fréquences utilisées en clinique pour le diagnostic sont généralement comprises entre 1 et 20 MHz (Chan and Perlas, 2011). Augmenter la fréquence améliore la résolution spatiale mais atténue également le signal par absorption, ce qui diminue la profondeur d'exploration (Figure 3). La profondeur de pénétration est ainsi réduite d'environ 10 à 1 cm en augmentant la fréquence de 3,5 à 10 MHz.

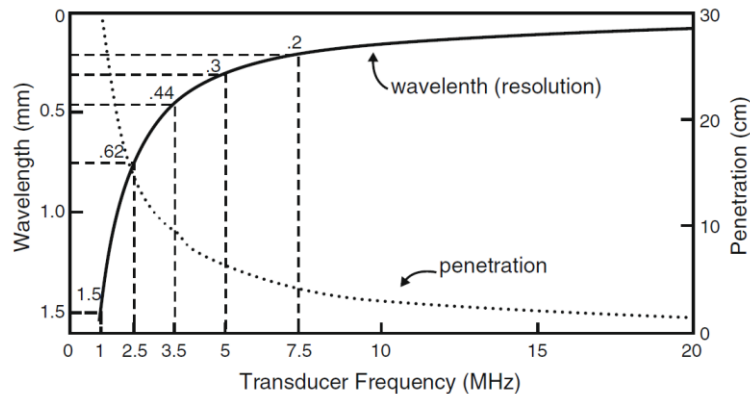


Figure 3: Evolution de la profondeur de pénétration et de la résolution spatiale en fonction de la fréquence des ultrasons (Chan and Perlas, 2011)

1.2.2. Pression et intensité acoustique

L'énergie de l'onde ultrasonore provoque des variations de pression locales dans le milieu de propagation comme illustré en Figure 1. En imagerie, la pression acoustique appliquée au niveau du transducteur sera directement liée à la quantité d'énergie reçue par le tissu ciblé. Elle se mesure en Pascals (Pa) et est souvent de l'ordre du MPa.

L'intensité ultrasonore est définie comme l'énergie qui traverse perpendiculairement une surface pendant une unité de temps. Elle se mesure en W/cm^2 et est liée à la pression acoustique P , la densité du milieu ρ et la vitesse de propagation de l'onde c par la relation :

$$I = \frac{P^2}{\rho c} = \frac{P^2}{Z}$$

Il s'agit d'un paramètre important à prendre en compte puisque les ultrasons dits de haute intensité (supérieure à $5 W/cm^2$) peuvent engendrer des lésions tissulaires irréversibles. Par ailleurs, il faut tenir compte de la perte d'intensité par atténuation, qui sera plus importante au niveau des couches profondes du tissu.

1.2.3. Temps d'exposition

L'utilisation d'un faisceau ultrasonore continu pourrait provoquer un échauffement pouvant détruire les tissus. En échographie, les ondes émises sont donc divisées en plusieurs impulsions

répétées périodiquement afin de laisser le temps à l'énergie de se dissiper entre deux impulsions. Il est donc possible de faire varier la durée d'une impulsion (généralement entre quelques μs et quelques ms) et la fréquence de répétition des impulsions.

1.3. Les agents de contraste ultrasonores (ACUs)

L'imagerie ultrasonore présente de nombreux avantages et est utilisée pour des applications obstétriques, cardiaques, abdominales et vasculaires. Cependant, la faible différence d'impédance acoustique entre les tissus et la difficulté de visualiser les vaisseaux de diamètre inférieur à $200\ \mu\text{m}$ constituent un frein majeur au développement de l'échographie. Il est donc nécessaire d'utiliser des agents de contraste pour augmenter l'intensité rétrodiffusée et mieux visualiser certains tissus.

Les agents de contraste ultrasonores (ACUs) sont des particules que l'on administre par voie intraveineuse (IV) et qui permettent d'augmenter l'intensité ultrasonore rétrodiffusée pour améliorer le contraste de l'image échographique. Les ACUs peuvent se comporter différemment selon leurs propriétés physiques et les paramètres ultrasonores appliqués.

1.3.1. Comportement des agents de contraste

A faible pression acoustique, les ACUs augmentent l'intensité rétrodiffusée de par leur forte différence d'impédance acoustique avec le milieu. L'efficacité de l'interaction de l'onde avec l'ACU peut être décrite par sa section efficace de diffusion :

$$SCS = \frac{4\pi}{9} k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_d - 3\rho}{2\rho_d + \rho} \right)^2 \right]$$

où k est le vecteur de l'onde incidente, R est le rayon de l'ACU, κ_d et κ sont les compressibilités de l'ACU et du milieu respectivement, ρ_d et ρ les densités de l'ACU et du milieu respectivement (De Jong et al., 1991). Un ACU augmentera donc plus efficacement la rétrodiffusion des ultrasons si son diamètre est élevé et si ses propriétés physiques (densité et compressibilité) diffèrent de celles du milieu environnant. L'agent de contraste doit cependant avoir un diamètre inférieur à $6\text{-}8\ \mu\text{m}$ pour franchir les capillaires pulmonaires après une injection IV (Schutt et al., 2003). Les premiers ACUs développés, des microbulles d'air de 1 à $7\ \mu\text{m}$ de diamètre, sont donc des réflecteurs particulièrement efficaces du fait de leur grande taille et des grandes différences de densité et de compressibilité entre l'air et le sang. En imagerie de contraste, l'intensité rétrodiffusée sera également proportionnelle à la concentration des ACUs. Pour les microbulles, une injection dans le sang de $0,25\ \text{mL}$ correspondant à environ $2,5 \times 10^8$ microbulles permet d'améliorer considérablement la visualisation des vaisseaux sanguins (Schutt et al., 2003).

A des pressions acoustiques un peu plus élevées, les ondes ultrasonores peuvent entraîner des fluctuations importantes du volume de l'ACU, qui devient alors lui-même une source émettrice d'ultrasons. Ce phénomène de résonance produit un signal non-linéaire du fait de la différence d'énergie nécessaire à la compression et la dilatation de la microbulle. La fréquence de résonance dépend du diamètre de l'agent de contraste ; pour des microbulles de 1 à 7 μm de diamètre, elle est comprise entre 2 et 15 MHz, échelle de fréquences actuellement utilisées en clinique (Calliada et al., 1998). Le signal non-linéaire produit est caractérisé par la génération d'harmoniques à des fréquences différentes de celle de l'onde incidente (fréquence fondamentale), la seconde harmonique (double de la fréquence fondamentale) étant la plus intense (Correas et al., 2001). Cette réponse spécifique des microbulles permet de les distinguer des tissus biologiques environnants et est à l'origine du développement des méthodes d'imagerie harmonique.

A pression acoustique élevée, la coque de la microbulle se brise et le gaz diffuse rapidement dans le milieu environnant. Cette destruction des microbulles entraîne l'émission d'un signal très puissant et riche en composantes non-linéaires. Bien que ce signal soit extrêmement court, la destruction des microbulles reste la méthode la plus sensible et la plus spécifique pour détecter les microbulles (Correas et al., 2001).

1.3.2. Indice mécanique

L'indice mécanique (MI) a été introduit pour caractériser les effets mécaniques des ultrasons sur les tissus biologiques, notamment le phénomène de cavitation. La cavitation correspond à l'apparition et l'oscillation de bulles sous l'effet de la succession des pics de pression positive et négative de l'onde. Le MI est défini comme la pression de raréfaction maximale P^- divisée par la racine carrée de la fréquence fondamentale f_0 du transducteur :

$$MI = \frac{P^-}{\sqrt{f_0}}$$

Il est sans unité et reflète en quelque sorte la puissance des ultrasons envoyés par le transducteur. Il ne doit pas excéder 1,9 pour le diagnostic clinique. A faible MI ($< 0,1$), les microbulles d'air oscillent principalement de façon linéaire, mais leur réponse est parfois insuffisante pour qu'elles soient détectées. Un MI compris entre 0,1 et 0,5 entraînera des oscillations non-linéaires, et au-delà d'un certain seuil ($> 0,5$), les microbulles seront détruites (cavitation inertielle). Néanmoins, ces valeurs de seuils sont seulement indicatives parce qu'elles dépendent fortement des caractéristiques de la microbulle.

1.3.3. Techniques d'imagerie de contraste

Les trois principales techniques d'imagerie de contraste ultrasonore sont résumées ci-dessous et schématisées en Figure 4.

Imagerie fondamentale

En imagerie fondamentale, à faible MI, le transducteur émet une onde acoustique à la fréquence fondamentale f_0 , et l'image échographique est construite à partir de la réponse à cette même fréquence. L'utilisation de microbulles avec cette technique améliore la visualisation de certains organes comme les cavités cardiaques. Néanmoins, ce mode d'imagerie a montré ses limites pour l'imagerie de petits vaisseaux dans lesquels la concentration en microbulles est faible et autour desquels se trouvent des tissus fortement échogènes (De Jong et al., 2000).

Imagerie harmonique

En imagerie harmonique, l'image est construite en filtrant le signal ultrasonore reçu autour de la seconde harmonique à la fréquence $2f_0$. Ce mode d'imagerie à MI moyen vise à distinguer la réponse non-linéaire des microbulles de la réponse plus linéaire des tissus environnants. L'imagerie harmonique a ainsi permis la visualisation de vaisseaux extrêmement petits (diamètre inférieur à $40\ \mu\text{m}$) même avec un flux sanguin très lent (Calliada et al., 1998). Cependant, il s'est finalement avéré qu'aux fortes pressions acoustiques utilisées, les tissus peuvent également émettre des harmoniques, donc l'imagerie n'est pas véritablement spécifique du produit de contraste (Aubé and Lebigot, 2003). Par ailleurs, une filtration assez étroite est nécessaire afin de minimiser le recouvrement entre la fréquence fondamentale et la seconde harmonique, ce qui diminue la résolution de l'image (Correas et al., 2001).

L'imagerie harmonique par inversion de pulse essaie de pallier à ce dernier défaut. Le transducteur émet une impulsion suivie immédiatement d'une impulsion équivalente de sens contraire (déphasée de 180°). Dans un milieu linéaire, la somme des deux réponses est voisine de zéro. En revanche, s'il existe une composante non-linéaire, la réponse à la seconde impulsion sera différente de la première et le signal sera non nul. Ce mode d'imagerie présente l'avantage de recueillir toutes les harmoniques paires et d'éliminer complètement la fréquence fondamentale, évitant ainsi les problèmes de recouvrement et augmentant alors la résolution spatiale (Aubé and Lebigot, 2003).

Emission acoustique stimulée

A fort indice mécanique, la destruction des microbulles entraîne l'émission d'un signal très puissant et riche en composantes harmoniques permettant de détecter la présence de

microbulles de façon très sensible et très spécifique. Cette technique peut être utilisée en imagerie Doppler pour la visualisation de petits vaisseaux impossibles à détecter sans ACU, ou pour la détection de métastases du foie (Blomley et al., 1999). Néanmoins, le signal est extrêmement court et un nombre très faible de passages peut être réalisé (1 à 3) avant de détruire toutes les microbulles. De plus, l'augmentation du contraste est hétérogène puisque la destruction des bulles est focale-dépendante (Correas et al., 2001).

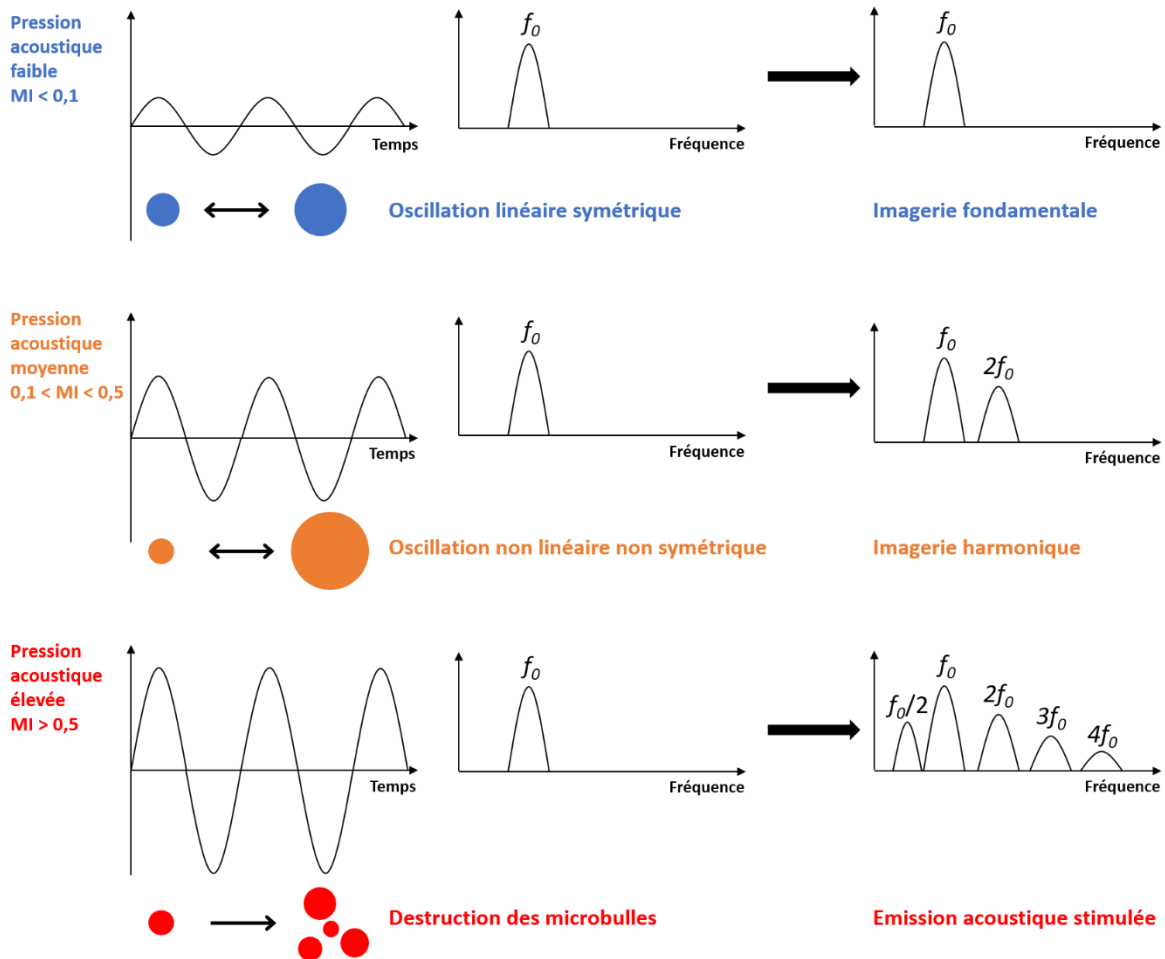


Figure 4: Représentation simplifiée du comportement des microbulles et des différentes techniques d'imageries

1.3.4. Microbulles

Microbulles d'air

L'imagerie de contraste ultrasonore a débuté vers la fin des années 1960, après le premier rapport de Gramiak et Shah (Gramiak and Shah, 1968) montrant que l'injection d'une solution saline agitée permettait d'augmenter considérablement le contraste dans l'aorte. Par la suite, des injections intracardiaques rapides de différentes solutions ont également mis en évidence le rôle des bulles produites par l'injection dans le rehaussement du contraste dans le ventricule gauche

(Feigenbaum et al., 1970; Kremkau et al., 1970). L'objectif fût dès lors de produire des bulles plus stables et suffisamment petites pour franchir les capillaires pulmonaires. Il aura fallu vingt ans avant le développement des premiers agents de contraste commercialisés, notamment Albunex[®], microbulles d'air stabilisées par une enveloppe d'albumine obtenues par sonication d'une solution d'albumine du sérum humain (Barnhart et al., 1990). Après injection IV, ces microbulles peuvent franchir les capillaires pulmonaires et atteindre le ventricule gauche (Figure 5), mais leur demi-vie est très courte (< 1 min) (Feinstein et al., 1990). D'autres microbulles d'air entourées d'une matrice de galactose (Echovist[®]) engendraient un contraste plus intense et plus reproductible au niveau du cœur droit (Smith et al., 1984), mais n'étaient pas assez stables pour pouvoir traverser les poumons après injection IV (Correas et al., 2001). L'ajout de 0,1% d'acide palmitique dans la matrice de galactose a permis d'augmenter fortement la stabilité de ces microbulles commercialisées sous le nom de Levovist[®] (Schlief et al., 1990). Cette formulation s'est révélée efficace pour l'imagerie du ventricule gauche et de plusieurs organes comme le foie, la rate, et les ovaires, réduisant ainsi le nombre de biopsies (Blomley et al., 1999; Ota and Ono, 2004; Wu et al., 2015). Néanmoins, du fait de la grande solubilité de l'air dans l'eau, le temps de circulation très court de ces formulations a limité leur succès commercial.

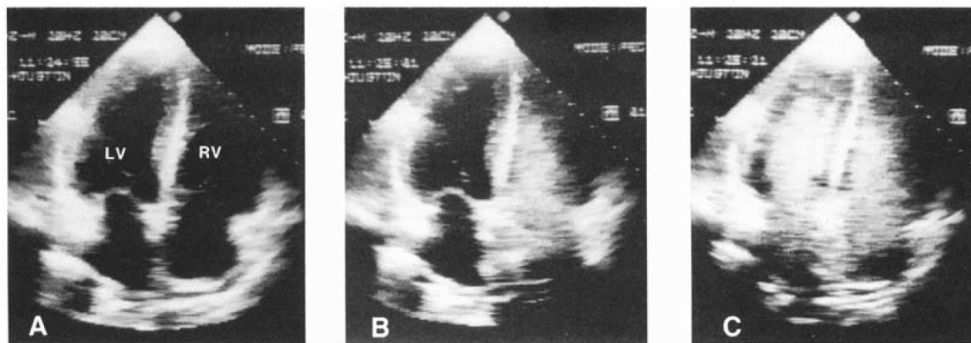


Figure 5: Echocardiographie chez un patient avant injection IV d'Albunex (A), juste après (B) montrant l'augmentation du contraste dans le ventricule droit, puis dans les deux ventricules (C) (Feinstein et al., 1990)

Microbulles de gaz

L'utilisation de perfluorocarbures (PFCs) gazeux à la place de l'air a permis d'augmenter considérablement la stabilité des microbulles grâce à leur faible solubilité dans l'eau et leur faible coefficient de diffusion. Cette stratégie a donné lieu au développement d'une nouvelle génération d'agents de contraste comme Optison[®] (reformulation d'Albunex[®] en remplaçant l'air par l'octafluoropropane), Definity[®], Sonazoid[®], Imagent[®] et Sonovue[®], ce dernier encapsulant de l'hexafluorure de soufre. Les caractéristiques des principaux ACUs approuvés sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1:Caractéristiques des principaux ACUs approuvés en clinique (Paefgen et al., 2015; Son et al., 2014)

Nom	Coque	Gaz	Diamètre (µm)	Applications cliniques	Fabricant	Date approbation	Pays
Albunex	Albumine	Air	4,3	Imagerie transpulmonaire	Molecular Biosystems Inc., Etat-Unis	1993, retiré	Japon, Etats-Unis
Echovist	Galactose	Air	2	Imagerie du cœur droit	Schering AG, Allemagne	1991, retiré	Allemagne, Royaume-Uni
Levovist	Galactose et acide palmitique	Air	2-4	Imagerie du cœur, Imagerie Doppler	Schering AG, Allemagne	1991, retiré	Canada, Europe, Chine, Japon
Optison	Albumine	Octafluoropropane	2-4,5	Opacification du ventricule gauche	GE Healthcare, Royaume-Uni	1998	Etats-Unis, Europe
Imagent	Phospholipides	Perfluorohexane, N ₂	6	Echocardiographie, perfusion du cœur, anomalies tumorales et du flux sanguin	Schering AG, Allemagne	2002, retiré	Etats-Unis
Definity/Luminity	Phospholipides	Octafluoropropane	1,1-3,3	Echocardiographie, imagerie du foie et des reins	Lantheus medical imaging, Etats-Unis	2001/2006	Amérique du Nord, Europe
Sonovue/Lumason	Phospholipides	Hexafluorure de soufre	2-3	Opacification du ventricule gauche, microvascularisation (foie et sein)	Bracco Diagnostics, Italie	2001/2014	Etats-Unis, Europe, Chine
Sonazoid	Phospholipides	Perfluorobutane	2	Perfusion myocardique, imagerie du foie	GE Healthcare, Royaume-Uni/ Daiichi Sankyo, Japon	2007	Japon, Corée du Sud

Microbulles à coques lipidiques

A part Optison®, la plupart des microbulles de gaz citées ci-dessus sont stabilisées par des phospholipides avec ou sans surfactant, qui forment des coques flexibles facilement détectables grâce à leurs oscillations non-linéaires. Des formulations de liposomes de gaz de 2-10 µm de diamètre ont également été proposées comme ACUs (Unger et al., 1994; Unger and Wu, 1994). Dans la suite de cette partie nous nous focaliserons plus sur les microbulles à base de polymères.

Microbulles à coques polymères

Afin d'accroître la stabilité *in vivo* des microbulles, plusieurs groupes se sont orientés vers l'utilisation de coques polymères, plus résistantes aux ondes ultrasonores que les parois souples à base de phospholipides, protéines ou tensioactifs. Les premiers polymères utilisés pour formuler des microbulles étaient des polymères naturels tels que la gélatine (Carroll et al., 1980) et l'alginate (Wheatley et al., 1990), mais les microbulles d'air formées étaient bien trop grandes pour une administration IV (Figure 6). L'utilisation de polymères naturels augmente de plus le risque de contamination et engendre des problèmes de reproductibilité.

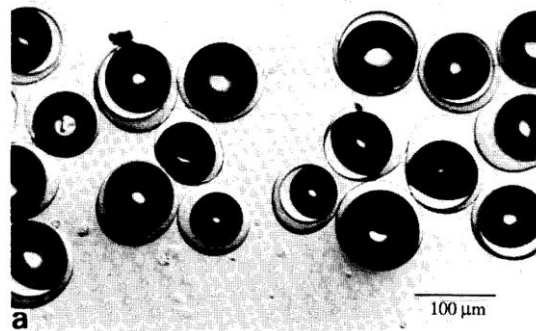


Figure 6: Photomicrographie de microbulles d'air encapsulé dans une coque d'alginate (Wheatley et al., 1990)

Cyanoacrylates

Des formulations à base de polyalkylcyanoacrylates ont ensuite été proposées. Ces polymères ont été initialement utilisés comme colle chirurgicale du fait de leurs propriétés de bioadhésion (Mehdizadeh and Yang, 2013). Ils sont dégradables, non-toxiques, et faciles à synthétiser du fait de la forte réactivité des cyanoacrylates qui polymérisent facilement dans l'eau. La formulation Sonovist® (appelée aussi Sonavist®, Schering AG, Berlin) est ainsi obtenue par polymérisation interfaciale du *n*-butyl-2-cyanoacrylate à la surface de bulles d'air formées par agitation d'eau en présence de tensioactif (Harris et al., 1995) (Figure 7). Après injection IV, ces agents de 1-2 µm de diamètre circulent pendant plus de 10 minutes dans le sang et sont pris en charge par le système réticulo-endothélial, permettant ainsi la détection de lésions au niveau du foie et de la rate (Bauer et al., 1999; Forsberg et al., 1999). Sonovist® a cependant été retiré du marché en 1999, mais nous n'avons pas trouvé la raison. Olbrich et al. ont mis au point un processus de fabrication en deux étapes menant à la formation de microbulles stabilisées par des nanoparticules de poly(*n*-butyl-cyanoacrylate) (PBCA) et permettant de contrôler l'épaisseur de la coque des microbulles (Olbrich et al., 2006). Fokong et al. ont également proposé un processus de fabrication amélioré pour produire des microbulles d'air/PBCA avec une faible distribution de taille et une stabilité en suspension de plus de 4 mois (Fokong et al., 2011). Elles nécessitent cependant d'être injectées à faible vitesse afin de ne pas être détruites.

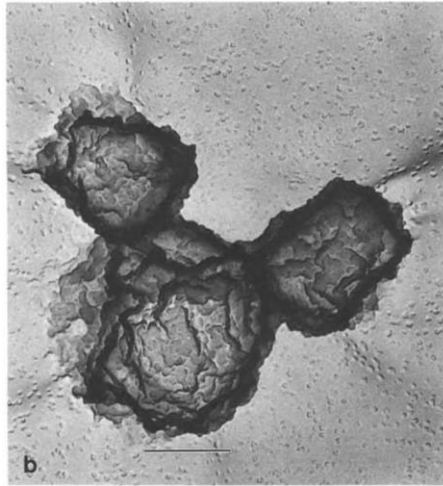


Figure 7: Image de microscopie électronique en transmission des microbulles d'air/PBCA Sonovist® (scale bar = 400 nm) (Harris et al., 1995)

Alcool polyvinylique

L'alcool polyvinylique (PVA) a aussi été utilisé pour stabiliser des microbulles d'air. Ces microbulles sont préparées par réticulation à l'interface air/eau d'un PVA téléchélique possédant des terminaisons aldéhydes (Cavalieri et al., 2005). La réaction d'acétalisation entre ces groupements aldéhydes et les groupements -OH du PVA se fait en condition acide sous agitation forte d'une solution aqueuse de PVA. Il est possible de contrôler le diamètre et l'épaisseur de la coque en modifiant la température et le pH lors de la réaction. Ces microbulles sont stables dans l'eau pendant plusieurs mois à température ambiante, et leur surface peut être aisément modifiée par greffage covalent de différentes molécules comme des β -cyclodextrines ou du poly-L-lysine. Elles permettent d'augmenter le contraste ultrasonore *in vitro* de 20 dB en imagerie linéaire (Grishenkov et al., 2009a) et peuvent être détruites à des valeurs de MI compatibles avec les seuils cliniques imposés (Grishenkov et al., 2009b).

Poly(lactide-co-glycolide) et polylactide

Plusieurs équipes travaillent sur des microbulles de gaz stabilisées dans des coques de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). Ce polymère est réputé pour ses propriétés de biocompatibilité (Yamaguchi and Anderson, 1993) et biodégradabilité (Gilding and Reed, 1979), et est approuvé par la FDA dans des sutures et des formulations parentérales comme Eligard®, Lupron Depot®, ZOLADEX®, Sandostatin LAR Depot® et Risperdal Consta®.

Le groupe de Margaret Wheatley a travaillé sur le développement de microsphères creuses de PLGA par encapsulation puis sublimation d'un cœur solide volatile de carbonate d'ammonium (Narayan and Wheatley, 1999). Plusieurs techniques d'encapsulation ont été essayées, comme l'évaporation de solvant, la coacervation, et le spray-drying (Narayan et al., 2001), néanmoins les microsphères formées avaient des diamètres moyens trop grands (de l'ordre de 10 μm) pour

franchir les capillaires pulmonaires. La mise au point d'un procédé de double émulsion a finalement permis de former des microcapsules vides de PLGA de 1,2 μm de diamètre moyen avec une réponse acoustique *in vitro* augmentée de 24-25 dB (El-Sherif and Wheatley, 2003). Forsberg et al ont ensuite montré que l'augmentation de la proportion de lactide dans le PLGA permettait d'allonger la durée du contraste en échographie Doppler rénale chez le lapin (Figure 8) (Forsberg et al., 2004). Ce groupe a alors continué de développer des ACUs à base de polylactide (PLA) pouvant encapsuler des anti-cancéreux délivrés *in situ* par l'application d'ultrasons (Cochran et al., 2011; Eisenbrey et al., 2010) ou pouvant être utilisés en combinaison avec d'autres modalités d'imagerie (Teraphongphom et al., 2015).

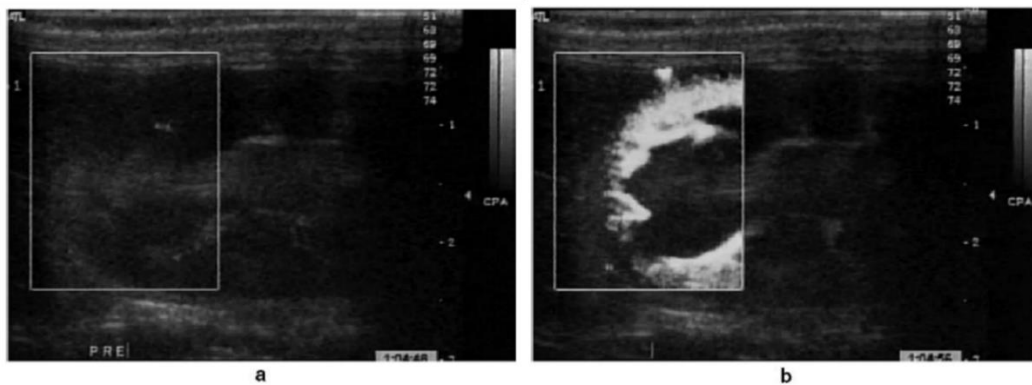


Figure 8: Exemples d'images d'échographie Doppler rénale chez le lapin (a) pre- and (b) postadministration de 0,1 mL/kg de microbulles de PLA (Forsberg et al., 2004)

Une équipe de Philips Research (Pays-Bas) a également travaillé sur des microbulles à base de PLGA et PLA comme ACUs. Elles sont préparées par encapsulation d'une huile (dodécane, cyclodécane, hexadécane ...) par émulsion évaporation de solvant (Lensen et al., 2011) ou ink-jet printing (Böhmer et al., 2006), qui est ultérieurement éliminée par lyophilisation. Dans le cas de l'hexadécane, il est possible de l'enlever partiellement par lyophilisation de manière à y encapsuler un principe actif lipophile qui sera libéré par application d'ultrasons (Kooiman et al., 2009). D'autres travaux ont porté sur les microbulles de PLGA. Xu et al ont rapporté la préparation de microbulles d'air encapsulant du vert d'indocyanine comme agent de contraste double pour l'imagerie par ultrasons et par fluorescence (Xu et al., 2009). Sanna et al ont développé des microbulles d'air avec des coques de PLA, PLGA, et poly(lactide-co-glycolide)-*b*-poly(éthylène glycol) (PLGA-PEG), ce dernier permettant la conjugaison d'un ligand ciblant un antigène de la membrane spécifique de la prostate (PSMA) pour la détection et le traitement du cancer de la prostate (Sanna et al., 2011).

Quelques ACUs à base de PLGA ou PLA sont en développement clinique, comme AI-700 sous le nom d'Imagify® (Acusphere, Etats-Unis). Ces microparticules poreuses de 2,3 μm de diamètre moyen encapsulent du décafluorobutane dans une matrice de PLGA avec un phospholipide (1,2-diarachidoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, DAPC) sans toutefois posséder une structure

cœur/coque bien définie (Figure 9) (Straub et al., 2005). Elles sont préparées par spray-drying d'une émulsion contenant du bicarbonate d'ammonium pour créer les pores. Ces ACUs présentent une haute résistance aux fortes pressions acoustiques ($MI = 1,6$) permettant des temps de visualisation plus longs pour évaluer la perfusion myocardique et diagnostiquer les maladies de l'artère coronaire (Straub et al., 2005). Imagify® n'a cependant pas été approuvé par la FDA en 2009 du fait d'une spécificité insuffisante pour la détection de maladies de l'artère coronaire et d'un manque de valeur ajoutée par rapport aux autres ACUs approuvés.

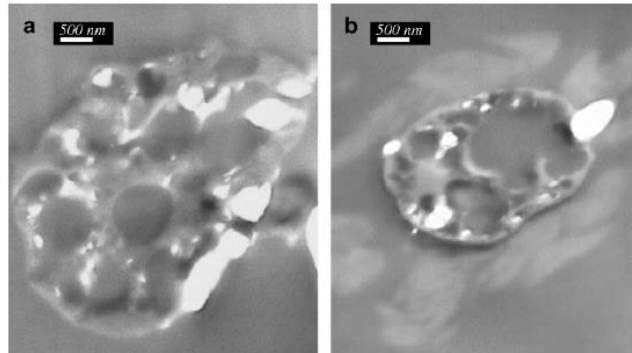


Figure 9: Images de microscopie électronique en transmission de sections transversales des microparticules AI-700 (Straub et al., 2005)

Un autre produit de contraste à base de PLA a été développé par Point Biomedical (Etats-Unis) : PB127 ou CARDIOSphere®. Cet ACU de 4,4 μm de diamètre moyen encapsule de l'azote dans une coque composée d'une couche interne de PLA et d'une couche externe d'albumine servant d'interface biologique (Villanueva et al., 2001). Les résultats de la phase II étaient satisfaisants pour la détection de CAD par échocardiographie myocardique (Wei et al., 2003) mais la phase III a montré une sensibilité et une spécificité inférieures à la tomographie d'émission monophotonique et CARDIOSphere® n'a donc pas été approuvé (Thomas, 2013).

Poloxamères

Les poloxamères, notamment le Pluronic F68, sont souvent utilisés comme tensioactifs pour faciliter la préparation de microbulles à coques lipidiques. Ando et al. ont cependant étudié la préparation de microbulles avec le Pluronic F68 comme seul composant de la coque (Ando et al., 2016). Les microbulles d'air ainsi formées étaient fortement instables, mais les microbulles encapsulant du perfluorohexane (PFH) se sont révélées plus stables (pas d'augmentation de volume pendant $\sim 3\text{h}$). La coque de poloxamère permet à la microbulle de résonner à une fréquence comparable à celle de microbulles équivalentes sans coque, contrairement aux microbulles stabilisées par des tensioactifs ou des lipides qui résonnent à plus haute fréquence (Ando et al., 2016). Cette étude a donc montré la capacité inattendue du Pluronic F68 à stabiliser

des microbulles de PFH sans l'ajout d'autres composants dans la coque, mais la stabilité obtenue d'environ 3h reste assez faible.

1.3.5. ACUs de taille nanométrique

Les microbulles sont donc des ACUs intéressants pour l'imagerie des vaisseaux sanguins, l'échocardiographie, et la détection d'anomalies de perfusion des tissus comme le myocarde (Schutt et al., 2003). Elles permettent également de détecter des lésions au niveau du foie après avoir été prises en charge par le système réticulo-endothélial (Postema and Gilja, 2011). Néanmoins, leur grande taille et leur faible stabilité *in vivo* ne leur permet pas de quitter l'espace intravasculaire pour notamment s'extravaser dans les tumeurs. C'est pourquoi la recherche s'est orientée vers le développement d'ACUs plus stables et plus petits pouvant s'accumuler dans les tumeurs par l'effet de perméabilité et de rétention accrue (effet EPR) que nous détaillons ci-dessous. Ces nanosystèmes visent en général aussi à encapsuler un principe actif qui pourra être libéré localement grâce à l'application d'ultrasons (agents théranostiques).

Effet de perméabilité et de rétention accrue (effet EPR) et PEGylation

Au niveau d'une tumeur, les cellules sont en forte croissance puisqu'elles possèdent un potentiel de réplication infini. Pour subvenir à ses besoins en nutriments et oxygène, la tumeur doit développer son propre réseau vasculaire. Cette angiogenèse anarchique entraîne la formation de vaisseaux sanguins ayant de larges pores de 200 à 800 nm (Torchilin, 2011) (Figure 10). De plus, les vaisseaux lymphatiques sont comprimés donc le drainage lymphatique (élimination des molécules non-assimilées) est moins efficace. La combinaison d'un endothélium vasculaire plus perméable et d'un drainage lymphatique réduit permet d'accroître l'accumulation des ACUs ou vecteurs de médicaments à l'intérieur de la tumeur, à condition que leur circulation dans le compartiment sanguin soit prolongée.

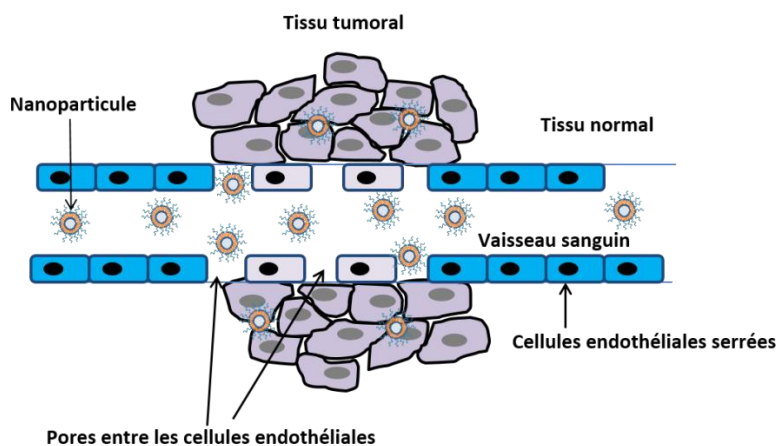


Figure 10: Représentation de la perméabilité accrue au niveau du tissu tumoral

En effet, après administration intraveineuse, les nanoparticules à surface hydrophobe sont rapidement opsonisées et éliminées vers les organes du système réticulo-endothélial comme le foie. La stratégie la plus employée pour prolonger le temps de circulation des nanoparticules dans le compartiment sanguin consiste à recouvrir la surface des nanoparticules de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG). Ces chaînes permettent de minimiser l'opsonisation des nanoparticules par répulsion stérique. Ainsi par leur temps de demi-vie augmenté dans le sang, les nanoparticules ont plus de chance d'atteindre les tumeurs et de s'y accumuler par l'effet EPR.

Nanobulles

Plusieurs groupes se sont donc tournés vers la formulation d'ACUs de tailles nanométriques encapsulant de l'air ou un perfluorocarbure (PFC) gazeux tel que l'octafluoropropane (C_3F_8). Les nanobulles étant extrêmement instables du fait de la pression de Laplace importante (Leroy and Norisuye, 2016), il est indispensable de les stabiliser dans des enveloppes de tensioactifs, lipides ou polymères. Par ailleurs, diminuer la taille d'un ACU va fortement réduire son échogénicité (la section efficace de diffusion dépend du rayon à la puissance 6), ce qu'il va falloir compenser en jouant par exemple sur la concentration en bulles, sur les propriétés de la coque, ou sur les paramètres ultrasonores.

Tensioactifs

Dans ce contexte, des nanobulles d'octafluoropropane stabilisées par les tensioactifs Span 60 et Tween 80 ont été développées (Oeffinger and Wheatley, 2004). Ces nanobulles de 450 - 700 nm de diamètre engendrent une augmentation du contraste ultrasonore *in vitro* de 23-27 dB pendant plusieurs minutes à 5 MHz. Elles sont toutefois limitées par la faible biocompatibilité du Tween 80 qui peut engendrer des effets cardiovasculaires indésirables (Millard et al., 1977; Paefgen et al., 2015; Xing et al., 2010). Xing et al. ont donc substitué le Tween 80 par du stéarate de polyoxyéthylène 40 (PEG40S). Les nanobulles ainsi formées ont rehaussé le contraste *in vivo* en imagerie Doppler de puissance du rein après injection IV chez le lapin, néanmoins le contraste n'a duré qu'une minute (Xing et al., 2010). Par ailleurs, la méthode de préparation de ces ACUs n'est pas optimisée puisqu'elle nécessite de séparer les microbulles des nanobulles formées par centrifugation, filtration ou flottaison. Ces procédés affectent le rendement et la stabilité des nanobulles formées et entraînent le gaspillage de matières premières.

Lipides

Quelques équipes se sont donc orientées vers la préparation de nanobulles à coques lipidiques par hydratation de film de phospholipides suivie de l'introduction du PFC gazeux et sonication (Jiang et al., 2016; Krupka et al., 2010). L'ajout de Pluronic permet de réduire leur taille (jusqu'à

~200 nm) tout en maintenant une échogénicité comparable à celle de microbulles contrôles formulées sans Pluronic, que les auteurs attribuent au plus grand nombre de nanobulles et à la présence du Pluronic qui apporte de la fluidité à la membrane. Ils démontrent aussi *in vivo*, par imagerie de la microcirculation tumorale, que les nanobulles pénètrent plus facilement dans les petits capillaires que les microbulles. Cependant, le contraste dans les tumeurs diminue très fortement en moins de 5 min (Krupka et al., 2010). Dans une autre étude, l'ajout d'un phospholipide PEGylé avec du Pluronic F68 et du glycérol permet aux nanobulles de s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR et de produire un contraste pendant 1h (Yin et al., 2012). Néanmoins, la méthode de préparation de ces nanobulles nécessite encore plusieurs étapes pour séparer les nanobulles des microbulles formées. Cai et al. ont essayé d'optimiser l'épaisseur du film lipidique de manière à préparer des nanobulles lipidiques qui ne nécessitent pas d'ajout de tensioactifs ni d'étapes de séparation (Cai et al., 2015). Comparées aux microbulles Sonovue®, les nanobulles ainsi développées entraînent un contraste plus important dans les tumeurs pendant 5 minutes (Cai et al., 2015). Plus récemment, la réticulation de la membrane lipidique avec du *N,N*-diéthyl acrylamide a permis d'accroître davantage la stabilité des nanobulles et de maintenir un signal ultrasonore *in vitro* pendant 24h, et *in vivo* dans les tumeurs pendant 8 min (Perera et al., 2017). La préparation de ces nanobulles est cependant complexe et requiert l'ajout de nombreux réactifs.

D'autres nanobulles lipidiques d'octafluoropropane ont été préparées, mais par évaporation en phase inverse (Negishi et al., 2013; Suzuki et al., 2010, 2008). Toutefois, ces nanobulles contenaient beaucoup moins d'octafluoropropane par rapport à la quantité de lipides (15 µL/mg de lipides) que les microbulles comme Definity® (200 µL/mg de lipides). Oda et al. ont alors synthétisé des lipides fluorés pour augmenter la quantité d'octafluoropropane encapsulé dans les nanobulles. Ceci s'est révélé plus ou moins efficace selon le nombre et la disposition des atomes de fluor dans les lipides. En revanche, l'injection IV de nanobulles formulées avec les lipides fluorés a entraîné la mort de plusieurs souris (Oda et al., 2015). Leur toxicité est donc un frein à leur développement.

Du Toit et al ont essayé d'accroître la stabilité de nanobulles lipidiques par l'ajout de polymères tels que du chitosan, de l'alginate ou du poly(*N*-isopropylacrilamide) (PNIPAM) directement dans le film lipidique ou couche par couche sur les liposomes déjà formés (Du Toit et al., 2011). L'augmentation de la stabilité *in vivo* n'était cependant pas significative (contraste vasculaire visible pendant 9 minutes comparé à 5 minutes pour les nanobulles sans polymère). Une deuxième approche, qui consistait à formuler des nanobulles purement polymères à base de chitosan, PBCA, alginate et PNIPAM sous forme d'hydrogels polyioniques, a permis d'augmenter

fortement la persistance du contraste vasculaire *in vivo* (jusqu'à 40 min), mais à très forte fréquence (60 MHz, supérieure aux fréquences utilisées en clinique) (Du Toit et al., 2011).

Polymères

La présence d'une coque polymère peut donc se révéler efficace pour minimiser la fuite des gaz et accroître la persistance des nanobulles. Comme pour les microbulles, le PLGA a été largement utilisé dans ce but. Néstor et al ont développé des nanobulles d'air/PLGA de 370 nm de diamètre qui peuvent augmenter le contraste *in vitro* de 16 dB à 10 MHz, mais de seulement 4 dB à 5 MHz (Néstor et al., 2011). Par ailleurs, la coque de PLGA présente l'avantage de pouvoir encapsuler un principe actif et d'être facilement fonctionnalisée avec des anticorps ou aptamères ciblant activement les tumeurs (Wu et al., 2017; Xu et al., 2010; Zhang et al., 2014). Des nanocapsules de PLGA-PEG encapsulant du paclitaxel et piégeant de l'air après lyophilisation ont aussi été développées (Ma et al., 2015). La conjugaison de deux anticorps permettant un ciblage actif des tumeurs pancréatiques a permis une augmentation du contraste ultrasonore dans les tumeurs pendant 10 min, une faible amélioration comparée aux 9 min obtenues avec Sonovue® (Ma et al., 2016). Les caractéristiques des nanobulles développées sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Caractéristiques des nanobulles développées en tant qu'ACUs

Coque	Cœur	Diamètre moyen (nm)	Réponse ultrasonore et persistance	Référence
Tensioactifs Span 60 et Tween 80	C ₃ F ₈	450 à 700	Contraste <i>in vitro</i> de 23-27 dB pendant 3 à 15 min, en mode A à 5 MHz	(Oeffinger and Wheatley, 2004)
Tensioactifs Span 60 et PEG40S	C ₃ F ₈	400 – 600	Contraste <i>in vivo</i> pendant 1 min dans le rein après injection IV, en imagerie Doppler puissance à 3-9 MHz	(Xing et al., 2010)
Phospholipides (DPPC, DPPE et DPPA) et Pluronic (L31, L61, L81, L64 ou P85)	C ₃ F ₈	200 à 1000	Contraste <i>in vivo</i> pendant moins de 5 min dans les tumeurs après injection IV, en imagerie harmonique de la perfusion à 6 MHz puis en imagerie du microflux	(Krupka et al., 2010)
Phospholipides (DPPC, DSPE-PEG2000 et DPPA) et Pluronic F68	C ₃ F ₈	430	Contraste <i>in vivo</i> pendant 1h dans les tumeurs après injection IV, en mode « contrast pulse sequencing » à 7 MHz	(Yin et al., 2012)
Phospholipides (DPPC et DSPE-PEG2000)	C ₃ F ₈	450 à 700	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs plus important qu'avec Sonovue® à 5 min après injection IV, à 3-9 MHz	(Cai et al., 2015)
Phospholipides (DPPE, DSPC et DSPE-PEGCOOH) et PEG4000 puis fonctionnalisation avec de l'herceptine	C ₃ F ₈	600	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs pendant 40 min après injection IV, à 5 -12 MHz	(Jiang et al., 2016)
Phospholipides (DPPC, DPPA, DPPE et mPEG-DSPE), Pluronic L10, et réticulation avec du <i>N,N</i> -diéthyl acrylamide et de la <i>N,N</i> -bis(acryoyl) cystamine	C ₃ F ₈	100	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs pendant 8 min après injection IV, en imagerie harmonique à 8 MHz	(Perera et al., 2017)
Phospholipides (DSPC et mPEG-DSPE et DSPE-PEG-mal couplé avec un peptide AG73)	C ₃ F ₈	400 – 600	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs pendant 4 min, à 16 MHz	(Negishi et al., 2013)
Phospholipides (DSPC et mPEG-DSPE) et phospholipides (DPPC et DSPC) modifiés avec des atomes de fluor	C ₃ F ₈	600 – 700	Contraste <i>in vitro</i> pendant 30 min, en imagerie harmonique à 18 MHz	(Oda et al., 2015)
Phospholipides (DSPC et DSPE-PEG) + chitosan/PNIPAM ou chitosan/alginate (1) Ou : hydrogels polyioniques de chitosan/PBCA (2)	C ₃ F ₈	100 (1) 200 (2)	Contraste vasculaire <i>in vivo</i> pendant 9 min (1) et 40 min (2) à 60 MHz	(Du Toit et al., 2011)
PLGA	air	370	Contraste <i>in vitro</i> pendant 30 min en mode A, de 13-15 dB à 10 MHz et de 4-5 dB à 5 MHz	(Néstor et al., 2011)
PLGA puis fonctionnalisation avec un anticorps (HuCC49ΔC _H 2) et encapsulation de Rouge de Texas	air	270	Contraste <i>in vitro</i> à 5 MHz	(Xu et al., 2010)
PLGA puis fonctionnalisation avec un anticorps anti-antigène de leukocyte humain (HLA-G) et encapsulation de méthotrèxate	PFC non précisé	480	Contraste <i>in vitro</i> à 5-12 MHz, et ablation des tumeurs <i>in vivo</i> par application d'ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU)	(Zhang et al., 2014)
PLGA-PEG puis fonctionnalisation avec 2 anticorps (anti-antigène carcinoembryonnaire et anti-antigène carbohydrate) et encapsulation de paclitaxel	air	100	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs pendant 10 min à 1 MHz	(Ma et al., 2016)

DPPC: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, DPPE: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine, DPPA: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphate, DSPE-PEG2000: 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[biotinyl(polyéthylène glycol)2000], mPEG-DSPE: 1,2-distéaroyl-phosphatidyléthanol amine-méthoxy-polyéthylène glycol 2000, DSPE-PEG-mal : 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyléthanolamine-polyéthyléneglycol-maléimide, DSPE-PEG-COOH : 2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-carboxy polyéthylène glycol, 2000DSPC : 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine

Nanoémulsions de perfluorocarbures

L'utilisation de tensioactifs, de lipides et surtout de polymères permet donc d'accroître la stabilité des nanobulles de gaz, mais de manière assez limitée. Une alternative pour augmenter leur persistance consiste à remplacer l'air ou les PFCs gazeux par des PFCs liquides. Les PFCs liquides sont particulièrement intéressants pour la formulation d'ACUs puisqu'ils possèdent une impédance acoustique assez différente de celle des milieux biologiques, une faible solubilité dans l'eau, et une inertie chimique et biologique exceptionnelle. Ils ont notamment été utilisés comme produits de remplacement sanguin grâce à leur capacité élevée de solubilisation des gaz comme l'oxygène. Leurs caractéristiques seront détaillées dans la deuxième partie de ce chapitre.

Nanoémulsions purement liquides

L'équipe de Wickline et Lanza s'est la première intéressée aux nanoémulsions de PFCs liquides comme ACUs. Ils ont développé une émulsion de 1,8-dichloro-perfluorooctane (PFDCO) d'environ 250 nm stabilisée par des lipides et des tensioactifs. Cette émulsion permet de détecter les thrombus vasculaires à 7,5 MHz grâce à une stratégie de ciblage actif avec un couplage avidine-biotine. Malgré la faible échogénicité inhérente des nanogouttelettes en circulation, leur accumulation accrue au niveau du tissu ciblé et leur liaison à la surface du thrombus permettent d'augmenter considérablement le contraste ultrasonore *in vivo* (Lanza et al., 1996). Cette équipe a également travaillé sur des nanoémulsions de bromure de perfluorooctyle (PFOB) de 465 nm de diamètre, qui engendrent un rehaussement du contraste dans la cavité ventriculaire gauche à 5 MHz grâce à l'utilisation de l'imagerie harmonique Doppler de puissance (PDHI) (Figure 11). Contrairement aux microbulles, le contraste n'est pas affecté par l'insonification continue et persiste pendant plus d'une heure (Wickline et al., 2002). Cependant, aucun rehaussement du contraste n'était visible avec des nanoémulsions de diamètre inférieur (230 nm), démontrant que la taille joue un rôle majeur et peut constituer un frein au développement de ces ACUs pour l'imagerie d'autres organes comme les tumeurs.

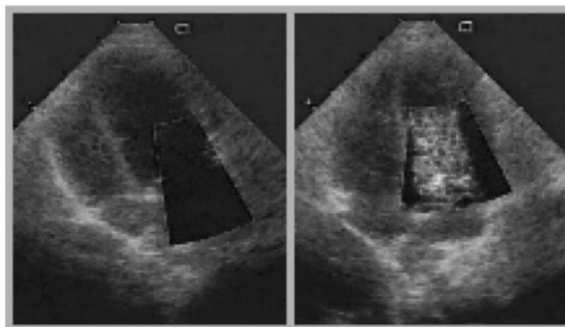


Figure 11: Vue apicale quatre cavités en PDHI chez le chien avant (gauche) et après administration IV d'une nanoémulsion de PFOB de 450 nm de diamètre (droite) (Wickline et al., 2002)

L'influence de la taille des émulsions sur l'échogénicité a aussi été mise en évidence dans une étude sur des nanoémulsions de PFOB stabilisées par des tensioactifs fluorés (Astafyeva et al., 2015). En effet, le signal ultrasonore rétrodiffusé par ces émulsions de 230 nm de diamètre dépend fortement de la présence d'une faible proportion (<1%) de plus grandes microgouttelettes dans l'échantillon. Le rapport signal sur bruit est ainsi divisé par 2,7 après centrifugation et élimination des microgouttelettes (Astafyeva et al., 2015). Une autre étude rapporte cependant une échogénicité satisfaisante *in vitro* pour des nanoémulsions de PFOB de 230 nm (Hu et al., 2016), qui peut être due aux paramètres ultrasonores utilisés ou à la composition différente de l'enveloppe. Cette enveloppe contient du chitosan et du PEG conjugué avec de l'acide folique pour cibler les tumeurs surexprimant le récepteur folate. *In vivo*, elles génèrent un contraste légèrement moins intense que Sonovue® mais qui persiste plus longtemps au niveau des tumeurs grâce au ciblage actif (> 160 min comparé à 40 min avec Sonovue®) (Li et al., 2017).

Nanoémulsions à changements de phase

Les nanoémulsions de PFCs liquides peuvent donc offrir une bonne stabilité acoustique et des temps de circulation plus longs, mais elles restent moins échogènes que leurs équivalents gazeux. Une stratégie pour bénéficier à la fois de la stabilité des PFCs liquides et de l'échogénicité très élevée des gaz consiste à formuler des nanoémulsions de PFCs qui, liquides à température ambiante, peuvent sous l'effet d'une augmentation de la température évoluer vers une phase gazeuse.

Dans ce contexte, Sonus Pharmaceuticals (Etats-Unis) a mis au point EchoGen®, une émulsion de perfluoropentane (PFP) dont le point d'ébullition est de 29 °C. Après administration IV, ces gouttes de 0,4 µm de diamètre se transforment en microbulles gazeuses de 2 à 5 µm qui persistent dans le compartiment sanguin pendant 20 min (Forsberg et al., 1995). Une autre étude a ensuite démontré la possibilité de transformer les gouttelettes en microbulles dans la seringue juste avant l'injection par « activation hypobarique », plutôt que de laisser la transformation se faire après l'injection par simple augmentation de la température à 37°C (Forsberg et al., 1998). Cette nouvelle méthode d'activation hypobarique permet de former 20 fois plus de microbulles par unité de volume que la méthode conventionnelle, permettant une meilleure visualisation des carcinomes hépatocellulaires (Forsberg et al., 1998). EchoGen® a obtenu l'autorisation de commercialisation sur le marché européen en 1998 mais n'a pas été approuvé par la FDA et a finalement été retiré du marché par Sonus Pharmaceuticals en 2000.

Le groupe de Natalya Rapoport a également travaillé sur les nanoémulsions de PFP pouvant évoluer vers une phase gazeuse par augmentation de la température. Les formulations

développées sont constituées de micelles mélangées à des nanogouttelettes de PFP (400-700 nm de diamètre), toutes deux stabilisées par les mêmes copolymères à bloc: poly(éthylène glycol)-*b*-poly(L-lactide) (PEG-PLLA) ou poly(éthylène glycol)-*b*-polycaprolactone (PEG-PCL) (Gao et al., 2008; Rapoport et al., 2007). La doxorubicine est encapsulée dans le cœur des micelles ainsi que dans la paroi des nanogouttelettes, qui sont converties en nano/microbulles par augmentation de la température une fois injectées (Figure 12). Après injection IV chez la souris, les micelles et nanobulles s'accumulent dans les tumeurs par effet EPR et les nanobulles coalescent pour former des microbulles fortement échogènes (Figure 13). Le contraste peut durer plusieurs jours dans la tumeur et les ultrasons permettent de libérer localement la doxorubicine et de stopper la croissance de la tumeur, alors que le volume de la tumeur continue d'augmenter après administration de la formulation sans application d'ultrasons (Rapoport et al., 2007).

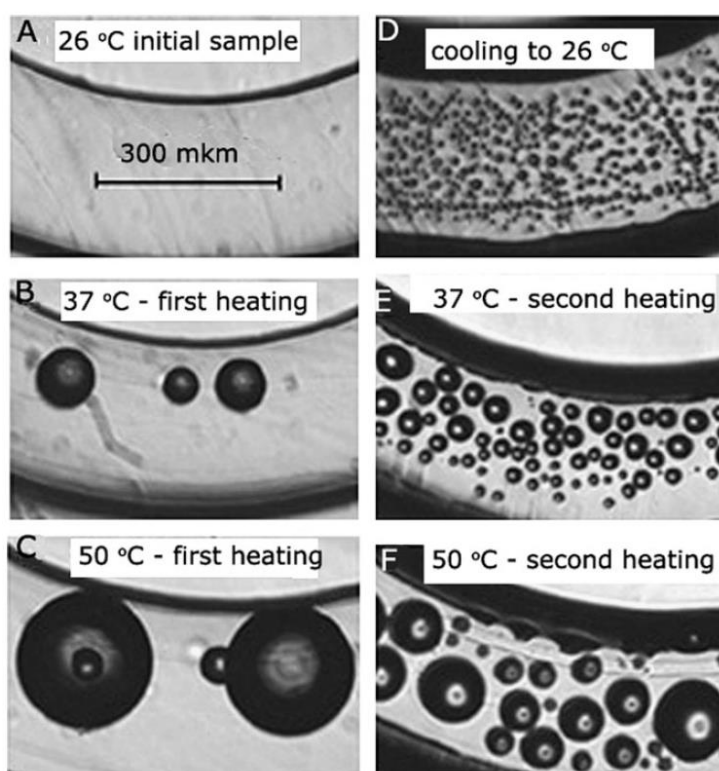


Figure 12: Images optiques d'une formulation de doxorubicine/PEG-PLLA/PFP placée dans un capillaire en plastique fermé (diamètre intérieur 340 μm). L'échantillon est visualisé pendant un cycle de chauffage/refroidissement/chauffage en utilisant une platine chauffante et un microscope à fluorescence. A) A 26°C, les nanogouttelettes ne sont pas résolues au plus fort grossissement disponible (x100). Lors du chauffage à 37°C (B) et 50°C (C), de grandes bulles grossissent par attraction et coalescence avec des plus petites. D) Après refroidissement à température ambiante, la structure initiale n'est pas restaurée et des microgouttelettes sont formées par désintégration des grandes microbulles et condensation du PFP. E) et F) Les images sont prises lors d'une seconde étape de chauffage à 37°C et 50°C respectivement. La croissance des grandes microbulles par attraction et coalescence avec les petites se manifeste par la réduction du nombre de petites microbulles (Rapoport et al., 2007)

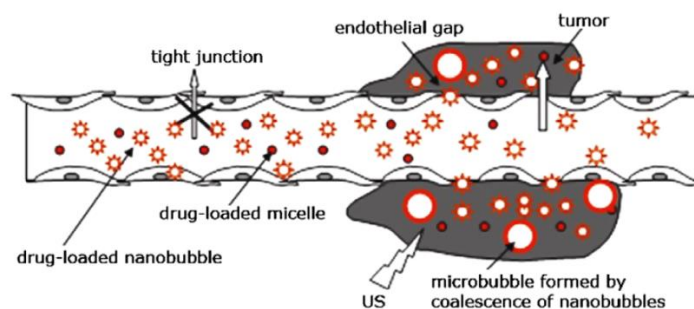


Figure 13: Représentation schématique du ciblage du médicament grâce à la microvasculature tumorale défectueuse en utilisant le système comprenant des micelles (petits cercles), des nanobulles (étoiles) et des microbulles (grands cercles). Une fois accumulées dans le tissu tumoral par effet EPR, les nanobulles coalescent pour former des microbulles échogènes (Rapoport et al., 2007)

Le même type de nanoémulsion encapsulant du paclitaxel et combiné avec l'application d'ultrasons à 1 MHz s'est révélé efficace pour le traitement des cancers du sein, des ovaires et du pancréas chez la souris (Rapoport et al., 2010, 2009). Cependant, le développement de ces nanoémulsions reste limité par la non-réversibilité de la vaporisation des nanogouttelettes en microbulles, et surtout par la difficulté à manipuler et encapsuler le PFP qui s'évapore facilement.

Afin de faciliter l'encapsulation du PFP, l'utilisation de copolymères à bloc de poly(éthylène glycol)-*b*-poly(aspartate de fluoroheptyl) pour stabiliser les nanoémulsions a été rapportée. La présence des chaînons fluorés dans le polymère permet de multiplier la concentration de PFP encapsulé par 2,3, mais ces nanoémulsions nécessitent d'être constamment manipulées à 10 °C (Nishihara et al., 2009). Les auteurs ont par la suite modifié la méthode de préparation en utilisant la sonication dans un bain à ultrasons à 40°C plutôt que l'émulsification haute pression ou la sonication avec une tige (Shiraishi et al., 2011). Cette méthode s'est révélée satisfaisante pour encapsuler le PFP tout en manipulant à des températures plus élevées. Toutefois le temps de circulation de ces nanoémulsions dans le compartiment sanguin s'est révélé très court (10 min) et leur réponse ultrasonore n'a pas été évaluée (Shiraishi et al., 2011).

Pour s'affranchir des difficultés liées à la manipulation du PFP, Rapoport et al. l'ont remplacé par le perfluoroéther couronne (PFCE), un autre PFC ayant un point d'ébullition plus élevé (146 °C) et présentant l'avantage d'être facilement détectable en imagerie par résonance magnétique (IRM) du fluor (Rapoport et al., 2011). Étonnamment, malgré une température d'ébullition très élevée, les gouttelettes de PFCE sont tout de même transformées en bulles sous l'effet des ultrasons à 1 MHz, à température ambiante et à des pressions acoustiques légèrement supérieures à celles nécessaires pour le PFP (0,20 – 0,23 MPa vs 0,14 – 0,16 MPa). L'application d'ultrasons peut entraîner une augmentation de la température, mais qui reste très faible (2-3 °C). La transition gouttelettes-bulles repose donc majoritairement sur un mécanisme non

thermique dans le cas du PFCE, probablement grâce à sa capacité élevée à solubiliser des gaz comme l'oxygène (Rapoport et al., 2011).

En revanche, Couture et al. ont montré que l'augmentation du signal ultrasonore par des nanoémulsions de perfluorohexane (PFH), dont le point d'ébullition est plus faible (56 °C), ne provenait pas de la vaporisation du PFH. Ainsi à température ambiante et à haute fréquence (20 – 50 MHz), le signal provient essentiellement de la différence d'impédance acoustique entre le milieu et ces gouttelettes de 300 – 1000 nm de diamètre stabilisées par un tensioactif fluoré (Couture et al., 2006). Ceci peut s'expliquer par le fait que formuler des PFCs en gouttelettes de taille nanométrique augmente leur point d'ébullition apparent. En effet, la pression de Laplace qui s'exerce sur les gouttelettes est inversement proportionnelle à leur rayon, et est donc très forte sur des nanogouttelettes (Rapoport et al., 2009). Les seuils de pression acoustique nécessaires à la vaporisation de nanogouttelettes de PFP ou PFH peuvent donc être assez élevés. Plusieurs stratégies ont donc été envisagées pour augmenter l'efficacité de la conversion des nanogouttelettes en microbulles.

L'équipe de Paul Sheeran et Paul Dayton a alors encapsulé des PFCs à points d'ébullition encore plus faibles, comme le perfluorobutane (PFB) (-1,7 °C). Les microbulles formées sont ultérieurement condensées pour générer des nanogouttelettes qui peuvent grâce à la pression de Laplace rester à l'état liquide et être injectées, avant d'être vaporisées grâce à l'apport d'énergie thermique ou acoustique (Figure 14) (Sheeran et al., 2012, 2011). *In vivo*, ces émulsions induisent une augmentation du contraste similaire aux microbulles et ont un temps de circulation 3,3 fois plus long que les microbulles (Sheeran et al., 2015).

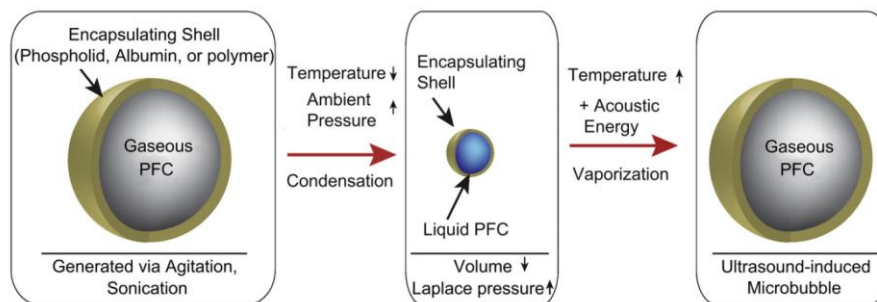


Figure 14: L'exposition des microbulles de PFC préalablement formées à une température ambiante diminuée et une pression ambiante augmentée résulte en la condensation du coeur gazeux. La taille diminuée résulte en une augmentation de la pression de Laplace, qui permet de préserver la particule à l'état liquide. Une fois exposée à une température plus élevée et à de l'énergie acoustique, la vaporisation de la gouttelette génère une plus grande microbulle échogène (Sheeran et al., 2012)

Une autre stratégie pour augmenter l'efficacité de la conversion des nanogouttelettes en microbulles repose sur l'ajout de nanoparticules solides superparamagnétiques dans le coeur des nanogouttelettes. Ces nanoparticules jouent le rôle d'agents de nucléation pour promouvoir

la transition de phase de nanoémulsions de PFP (stabilisées par une enveloppe d'albumine et de PEG) plus efficacement, comme illustré en Figure 15 (Lee et al., 2015).

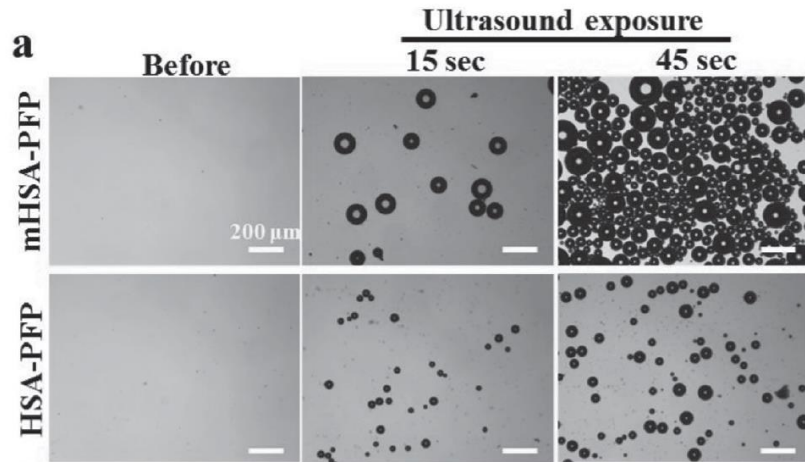


Figure 15: Images optiques de nanoémulsions de PFP avec (haut) ou sans (bas) nanoparticules solides superparamagnétiques avant et après exposition aux ultrasons pendant 15 et 45 secondes (Lee et al., 2015)

Des stratégies similaires ont été adoptées avec l'incorporation de nanoparticules plasmoniques (comme des nanoparticules d'or, qui sous irradiation laser peuvent chauffer localement) dans des nanoémulsions de PFP (Wilson et al., 2012) ou PFH (Fernandes et al., 2016) servant d'agents de contraste pour l'imagerie photoacoustique et l'imagerie ultrasonore.

Les caractéristiques des nanoémulsions développées en tant qu'ACUs sont rassemblées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Caractéristiques des nanoémulsions développées en tant qu'ACUs

Coque	Cœur	Diamètre moyen (nm)	Réponse ultrasonore et persistance	Référence
Lipides et tensioactifs (lécithine, cholestérol, glycérine, huile de carthame, N(6(biotinoyl)amino)hexanoyl)dipalmitoylL α phosphatidyléthanolamine))	PFDCO	230	Contraste des thrombus vasculaires <i>in vivo</i> à 7,5 MHz grâce à l'accumulation des gouttelettes et leur liaison aux thrombus	(Lanza et al., 1996)
Lipides et tensioactifs (lécithine, cholestérol, glycérine)	PFOB	460	Contraste dans la cavité ventriculaire gauche <i>in vivo</i> persistant pendant 1h, à 5 MHz en imagerie harmonique Doppler puissance	(Wickline et al., 2002)
Tensioactifs fluorés	PFOB ou PFP ou PFH	230-320	Signal ultrasonore <i>in vitro</i> provenant essentiellement d'une faible quantité de microgouttelettes dans l'échantillon	(Astafyeva et al., 2015)
Conjugué chitosan-PEG-acide folique, Pluronic F68, lecithine d'œuf, acide oléique	PFOB	230	Contraste <i>in vitro</i> à 3-11 MHz	(Hu et al., 2016)
Conjugués chitosan-acide folique et PEG-alginate, lecithine d'œuf, acide oléique	PFOB	300	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs surexprimant le récepteur folate pendant 160 min	(Li et al., 2017)
Copolymère PLLA-PEG ou PCL-PEG	PFP	400-700	Contraste <i>in vivo</i> dans les tumeurs pendant plusieurs jours, à 14 MHz	(Rapoport et al., 2007)
Copolymère poly(éthylène glycol)-poly(aspartate de fluoroheptyl)	PFP	200	Temps de circulation inférieur à 10 min	(Shiraishi et al., 2011)
Copolymère PLLA-PEG, PDLA-PEG ou PCL-PEG, et pour certaines addition d'un phospholipide (DSPE-PEG2000) et d'un tensioactif fluoré Zonyl FSO	PFCE	200-350	Conversion des gouttelettes de PFCE en microbulles réversible <i>in vitro</i> à 1 MHz et ~0.20 MPa	(Rapoport et al., 2011)
Tensioactif fluoré Zonyl FSO	PFH	300-1000	Signal ultrasonore <i>in vitro</i> à 20-50 MHz dû à la différence d'impédance acoustique entre les gouttelettes et le milieu: pas de comportement non-linéaire observé	(Couture et al., 2006)
Phospholipides (DPPC, LPC, DPPE-PEG2000)	PFB	200-300	Vaporisation à des MI ~1,2 <i>in vitro</i> à 8 MHz	(Sheeran et al., 2011)
Phospholipides (DSPC, DSPE-PEG2000), propylène glycol, glycérol	PFB et/ou C ₃ F ₈	200-300	Vaporisation à des MI ~0,4 <i>in vitro</i> à 5 MHz, temps de circulation <i>in vivo</i> 3,3 fois plus long que des microbulles	(Sheeran et al., 2015, 2012)
Conjugué albumine-PEG	PFP + Fe ₃ O ₄ nanoparticules	300-400	Conversion en microbulles plus efficace avec Fe ₃ O ₄ <i>in vitro</i> (70% de nanogouttelettes converties après 45s d'exposition à 1,85 MHz vs 25% sans Fe ₃ O ₄)	(Lee et al., 2015)

Nanoparticules générant du dioxyde de carbone

Une stratégie s'affranchissant de l'utilisation de perfluorocarbures a été proposée par Kang et al. Le principe repose sur la formulation de nanoparticules polymères pouvant générer du dioxyde de carbone (CO_2) gazeux (Kang et al., 2010). L'eau diffusant dans les nanoparticules va hydrolyser les liaisons des chaînons carbonates présents dans le polymère pour former des nanobulles de CO_2 à la surface des nanoparticules. Ces nanobulles vont croître et/ou coalescer pour former des microbulles. Le mécanisme et la structure des polymères sont représentés en Figure 16. Le comportement non-linéaire des microbulles permet de produire un contraste ultrasonore visible pendant 30 min après injection sous-cutanée. Cependant, après injection intra-tumorale, le contraste dans la tumeur n'était visible que pendant 1 minute.

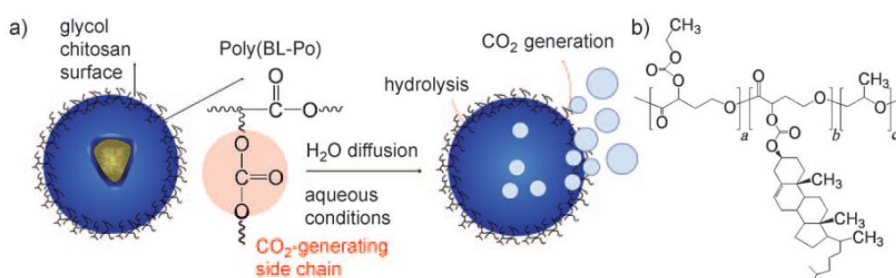


Figure 16: Représentation des nanoparticules polymères générant du CO_2 (a) et structure des polymères employés (b) (Kang et al., 2010)

Les auteurs se sont donc tournés vers la formulation de nanoparticules composées d'un cœur de carbonate de calcium (CaCO_3) pouvant générer du CO_2 au pH légèrement acide des tumeurs (6,8 – 7,2) (Min et al., 2015). L'environnement acide des tumeurs est nécessaire pour générer le CO_2 de manière à produire un contraste ultrasonore : après injection intra-tumorale, le contraste est visible dans les tumeurs pendant 120 minutes, alors qu'après injection dans le foie ou injection sous-cutanée, aucun contraste n'est visible. Toutefois, aucun résultat après injection IV n'est rapporté dans cette étude. Kim et al. ont alors formulé des nanogels d'alginate contenant du CaCO_3 qui, administrés par voie IV, s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs par effet EPR et rehaussent le contraste ultrasonore pendant 1h (Kim et al., 2016).

Nanocapsules polymères

De nombreuses équipes ont donc focalisé leurs recherches sur les nanobulles ou nanoparticules générant du gaz, et sur les nanoémulsions de PFCs liquides. Cependant, très peu se sont tournées vers les nanocapsules de PFCs liquides stabilisées dans des coques polymères solides. Bien que la présence d'une coque polymère moins souple puisse éventuellement réduire l'échogénicité, elle pourra en revanche considérablement augmenter la stabilité acoustique et la persistance *in vivo*.

On a vu précédemment que des copolymères à blocs ont été utilisés pour stabiliser des nanoémulsions servant d'ACUs, mais ils contiennent généralement une grande proportion de PEG hydrosoluble et jouent le rôle de tensioactif, il ne s'agit pas d'une coque solide (Lee et al., 2015; Rapoport et al., 2007; Shiraishi et al., 2011). Au sein de l'Institut Galien Paris Sud, notre équipe a développé une nouvelle stratégie basée sur des nanocapsules de PLGA renfermant un cœur de PFOB (Pisani et al., 2006). Ces nanocapsules sont formulées de manière simple et reproductible par un processus d'émulsion évaporation de solvant comme illustré en Figure 17. Le polymère et le PFOB sont solubilisés dans un solvant organique volatil (le dichlorométhane). Cette phase organique est émulsifiée, à l'aide d'une tige de sonication, avec un grand volume de phase aqueuse contenant un tensioactif, le cholate de sodium (SC). Le dichlorométhane est ensuite éliminé par évaporation, donnant lieu à la formation des capsules. Le tensioactif est finalement éliminé par ultracentrifugation et redispersion dans l'eau.

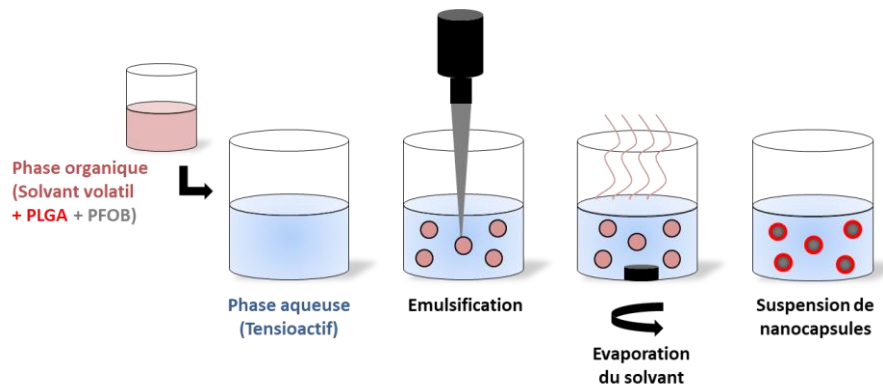


Figure 17: Processus de préparation des nanocapsules de PLGA/PFOB par émulsion évaporation de solvant

La combinaison de la coque polymère et du cœur liquide confère une bonne stabilité au système, qui engendre un rehaussement du contraste significatif *in vitro* en échographie ainsi qu'en IRM du fluor (Pisani et al., 2008b). Cependant après injection IV de ces capsules, bien qu'une augmentation du contraste ait été observée pendant quelques secondes dans la veine cave inférieure, aucune augmentation du contraste n'a été détectée dans la tumeur, signe de l'élimination rapide des capsules par le système réticulo-endothélial. Le remplacement du PLGA par du PLGA-PEG a alors permis d'accroître le temps de circulation des nanocapsules et de favoriser leur accumulation dans les tumeurs par effet EPR, augmentant ainsi le contraste en IRM du fluor (Diou et al., 2012). Toutefois, aucun rehaussement du contraste n'était visible en échographie. Les travaux précédents sur les nanocapsules de PLGA/PFOB avaient montré que diminuer l'épaisseur de la coque permettait d'augmenter la compressibilité et l'échogénicité des capsules (Pisani et al., 2008b). L'épaisseur était de plus parfaitement contrôlable en modulant les proportions de polymère et de PFOB dans la formulation : décroître la quantité de polymère permettait de réduire l'épaisseur (Pisani et al., 2006). Néanmoins, cette stratégie ne fonctionne pas avec le PLGA-PEG : la diminution de la quantité de PLGA-PEG ne permet pas de réduire

l'épaisseur et résulte en la formation de gouttelettes de PFOB non-encapsulées en plus de nanocapsules à coques épaisses (Diou et al., 2016). Ceci est probablement dû à un phénomène de démouillage du film de polymère à l'interface PFOB/eau à la fin de l'évaporation. En effet, la formation de la capsule peut être décomposée en trois étapes, illustrées en Figure 18, pendant lesquelles se produisent des phénomènes déterminants pour la morphologie finale de la capsule (Diou et al., 2016; Pisani et al., 2008a):

- (1) Pendant l'émulsification, la phase organique solubilisant à la fois le polymère et le PFOB forme des gouttes d'émulsion directe, stabilisées par le tensioactif, dans la phase aqueuse. La taille de la goutte d'émulsion déterminera directement la taille de la nanocapsule finale.
- (2) Lors de l'évaporation du solvant, le PFOB va atteindre sa limite de miscibilité avec le solvant. Il y a alors séparation de phases et nucléation d'une goutte de PFOB au sein de la goutte d'émulsion (Pisani et al., 2008a), créant une nouvelle interface PFOB/solvant. La couche de solvant autour du PFOB s'amincit au fur et à mesure de l'évaporation.
- (3) A la fin de l'évaporation, le polymère précipite pour former une coque solide autour de la goutte de PFOB. La morphologie finale de la capsule dépendra alors fortement des phénomènes interfaciaux intervenant à cette étape.

Dans le cas du PLGA-PEG, lorsqu'il atteint sa limite de solubilité dans le solvant, il migre à l'interface avec l'eau pour orienter les chaînes hydrophiles de PEG vers la phase aqueuse. A forte concentration en PLGA-PEG dans la phase organique, il y a suffisamment de chaînes polymères pour couvrir toutes les interfaces. En revanche, à faible quantité de PLGA-PEG, des inhomogénéités de concentration et un démouillage local peuvent apparaître : au sein de la même goutte de phase organique, le dichlorométhane peut être stabilisé soit par le cholate de sodium seul (avec une tension interfaciale γ_1 de 8,1 mN/m), soit par le PLGA-PEG et le cholate de sodium ensemble (avec une tension interfaciale γ_2 de moins de 7,2 mN/m) (Pisani et al., 2009). Des instabilités interfaciales peuvent ainsi apparaître, entraînant une fuite du dichlorométhane de la région de faible tension de surface γ_2 vers la région de plus haute tension de surface γ_1 . Dans ce cas, le PLGA-PEG pourrait précipiter autour d'une goutte de PFOB tandis qu'une autre gouttelette de PFOB serait expulsée vers la phase aqueuse (Figure 18) (Diou et al., 2016).

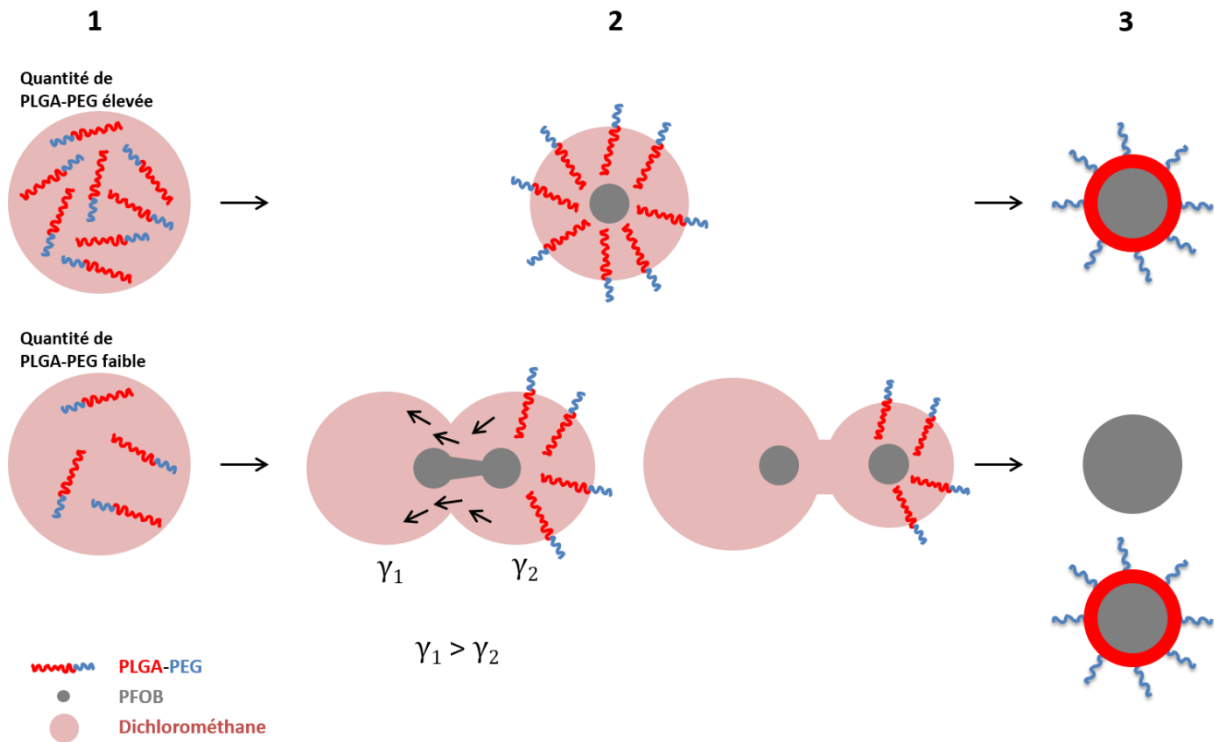


Figure 18: Schéma représentant le mécanisme possible de la formation de la capsule dans le cas d'une quantité de PLGA-PEG élevée (haut) ou faible (bas) (Diou et al., 2016)

La présence du PEG rend donc le contrôle de la morphologie des capsules plus difficile, mais elle est essentielle pour augmenter le temps de circulation des capsules et favoriser leur accumulation dans les tumeurs. Une idée a émergé dans le but d'éviter le démouillage du polymère autour de la goutte de PFOB tout en conservant le PEG pour la furtivité : fonctionnaliser le polymère avec un chaînon fluoré. Des interactions favorables entre ce chaînon fluoré et le PFOB pourraient ainsi faciliter l'ancrage du polymère autour de la goutte de PFOB, même à faible quantité de polymère, et permettre de réduire l'épaisseur de la coque. La seconde partie de cette étude bibliographique s'intéresse donc aux propriétés des chaînes fluorées et aux interactions potentielles entre chaînes fluorées.

2. Chaînes perfluorées et polymères

2.1. Propriétés des chaînes perfluorées

Les perfluorocarbures (PFCs) ou fluorocarbures sont des composés organiques synthétiques qui dérivent des alcanes par la substitution partielle (fluorocarbures) ou totale (perfluorocarbures) des atomes d'hydrogène par des atomes de fluor, ce qui leur confère des propriétés uniques. Nous parlerons ici de chaînes perfluorées ou fluoroalkylées pour décrire des chaînes contenant majoritairement des atomes de carbone et de fluor de type C_xF_{2x+1} .

Le fluor est l'élément le plus électronégatif du tableau périodique et son nuage électronique dense possède une très faible polarisabilité (Krafft, 2001; Riess, 2002). L'atome de fluor étant plus grand que l'atome d'hydrogène (rayons de Van der Waals de 1,47 Å et 1,20 Å respectivement) (Bondi, 1964), les chaînes perfluorées sont plus volumineuses que leurs analogues hydrocarbonées (sections transversales d'environ 30 et 20 Å² respectivement). Le volume moyen des groupes CF₂ et CF₃ est ainsi de l'ordre de 38 et 92 Å³ comparé à 27 et 54 Å³ pour les groupes CH₂ et CH₃ respectivement (Krafft, 2001). Un groupe CF₃ est donc presque aussi volumineux qu'un groupe C(CH₃)₃ (Schlosser and Michel, 1996; Smart, 2001). Une autre conséquence de la plus grande taille de l'atome de fluor est la plus grande rigidité des chaînes perfluorées, dans lesquelles la liberté de conformation est fortement réduite (Krafft and Riess, 1998). Plusieurs études ont montré que ces chaînes adoptent une conformation hélicoïdale afin de minimiser les répulsions électrostatiques et l'encombrement stérique (Jang et al., 2003; Monde et al., 2006; Schwarz et al., 2004).

La liaison C-F est la liaison simple la plus stable que l'on puisse trouver en chimie organique (~485 kJ/mol en moyenne contre ~425 kJ/mol pour la liaison C-H). De plus, le caractère très électroattracteur du fluor renforce les liaisons C-C du squelette carboné. Ces fortes liaisons intramoléculaires sont responsables de l'exceptionnelle stabilité thermique et chimique des PFCs. Par ailleurs, les chaînes perfluorées sont biologiquement inertes. Le nuage électronique dense forme une barrière protectrice contre l'approche de réactifs (Krafft, 2001).

La faible polarisabilité du fluor résulte en de faibles interactions de van der Waals entre les chaînes perfluorées. Cette faible cohésion intermoléculaire est responsable de beaucoup de propriétés remarquables des PFCs comme de faibles tensions de surface, des pressions de vapeur élevées par rapport à leur masse molaire, une grande compressibilité et une excellente capacité de dissolution des gaz. Les PFCs sont également caractérisés par des densités élevées, des faibles constantes diélectriques et des faibles indices de réfraction (Krafft and Riess, 1998).

Les chaînes perfluorées sont considérablement plus hydrophobes que leurs analogues hydrogénées, et ont la particularité d'être également lipophobes (Smart, 2001). Ces propriétés favorisent la ségrégation des chaînes perfluorées en solution dans des milieux aqueux ou organiques et la formation de micro- ou nano-domaines fluorés (Amado and Kressler, 2011; Riess, 2002). Ceci a donné lieu au développement de la « fluorous chemistry », terme initialement introduit en 1994 par Horváth et Rábai dans le premier article décrivant l'utilisation d'un système biphasique perfluorocarbure/hydrocarbure pour faciliter la séparation et le recyclage d'un catalyseur (Horvath and Rabai, 1994). Le principe de cette chimie consiste à accroître l'affinité de réactifs, substrats ou catalyseurs pour des phases perfluorées liquides ou solides afin de faciliter le recyclage de catalyseurs et la purification de produits de réaction (Gladysz and Curran, 2002). Ceci est réalisé par introduction de fragments perfluorés appelés tags fluorés ou *F*-tags. Cette affinité pour les phases perfluorées, ou fluorophilie, est généralement exprimée par un coefficient de partition ($\ln P$) entre des volumes égaux de perfluoro(méthylcyclohexane) et de toluène (Duchowicz et al., 2004; Huque et al., 2002).

L'introduction d'une chaîne perfluorée dans une molécule permet ainsi de modifier son comportement aux interfaces, de la rendre amphiphile ou d'accentuer un comportement amphiphile existant. Par exemple, les tensioactifs fluorés possèdent une activité de surface très forte et des concentrations micellaires critiques plus faibles que leurs analogues hydrogénés. Ils peuvent diminuer la tension superficielle de l'eau jusqu'à 15 – 20 mN/m, valeurs qui ne peuvent être atteintes avec des tensioactifs hydrogénés (30 – 40 mN/m) (Krafft, 2001). L'utilisation de tensioactifs fluorés, de lipides fluorés, ou de composés amphiphiles fluorés/hydrogénés diblocs ou triblocs permet de générer des assemblages supramoléculaires hautement organisés et des structures colloïdales variées comme des émulsions, des micelles, des vésicules, des tubules et des microbulles (Krafft, 2012; Krafft and Riess, 2009).

2.2. Perfluorocarbures et applications médicales



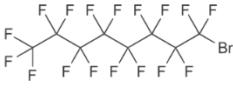
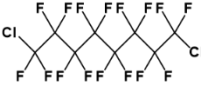

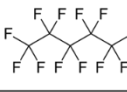
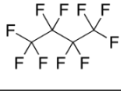


Les propriétés remarquables des PFCs, notamment leur inertie biologique et leur forte capacité à dissoudre les gaz, ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs pour leur utilisation médicale. En 1966, Clark et Golan démontrent qu'une souris peut vivre plusieurs heures dans un bain de PFC saturé en oxygène et introduisent ainsi le concept de ventilation liquide (Clark and Gollan, 1966). Les PFCs ont par la suite été utilisés comme transporteurs d'oxygène *in vivo* dans des formulations de liquides de remplacement sanguin comme Fluosol-DA® (perfluorodécane et perfluorotripropylamine), cependant retiré du marché en 1994, et Oxygent® (PFOB), dont le développement a été stoppé après la phase III par la faillite d'Alliance Pharmaceuticals en 2010. Le champ d'application des PFCs s'est ensuite élargi au développement d'agents de contraste

pour l'échographie et l'IRM du fluor, de vecteurs de médicaments, de substituts de surfactants pulmonaires, de matériaux pour l'ophtalmologie et la chirurgie reconstructive (Krafft and Riess, 2007).

2.2.1. Structure chimique

Les PFCs utilisés pour des applications médicales peuvent être linéaires ou cycliques, et contenir quelques halogènes et atomes d'hydrogène ou d'azote (Tableau 4). Ils peuvent être obtenus industriellement par substitution dans un composé organique des atomes d'hydrogènes par des atomes de fluor, qui peut être réalisée par fluoration électrochimique, réaction avec des fluorures de métaux lourds, ou action directe de la molécule F_2 (Riess, 1984).

Tableau 4: Structure des PFCs utilisés pour des applications médicales

Nom	Structure	Point d'ébullition	Applications médicales
Perfluoroéther couronne (PFCE)		146 °C	Agent de contraste pour l'IRM du fluor, ACU
Perfluorodécaline		142 °C	Transporteur d'oxygène
Bromure de perfluorooctyle (PFOB)		142 °C	Transporteur d'oxygène, agent de contraste pour l'IRM du fluor, ACU
1,8-dichloro-perfluorooctane		115 °C	Transporteur d'oxygène
Perfluorohexane (PFH)		56 °C	ACU
Perfluoropentane (PFP)		29 °C	ACU
Perfluorobutane (PFB)		-1,7 °C	ACU
Octafluoropropane		-36,7 °C	ACU
Hexafluorure de soufre		-64 °C	ACU

2.2.2. Biocompatibilité

Même à forte dose, la plupart des PFCs étudiés pour des applications médicales n'induisent pas de toxicité, de réactions immunologiques ni d'effet cancérogène, mutagène ou tératogène (Krafft, 2001). La pharmacocinétique et les mécanismes d'excrétion d'émulsions de PFCs injectables ont

été largement étudiés et peuvent être résumés comme suit (Riess, 2001; Tsuda et al., 1988). Après injection IV, les gouttelettes de PFCs sont progressivement phagocytées par les monocytes circulants et les macrophages du système réticulo-endothélial (RES). La cinétique de cette étape dépend fortement de la taille des gouttelettes, les plus grandes étant phagocytées plus rapidement. Les PFCs sont stockés temporairement dans les organes du RES, notamment le foie, la rate et la moelle osseuse. Ils ne sont pas métabolisés et vont progressivement réintégrer la circulation sanguine par diffusion à travers les membranes cellulaires. Une partie des PFCs peut être temporairement déposée dans le tissu adipeux, où leur persistance est plus élevée du fait de leur lipophilie, avant de retourner dans le compartiment sanguin. Une fois dans la circulation sanguine, les PFCs sont pris en charge par les lipoprotéines et acheminés vers les poumons où ils sont excrétés par exhalation. La cinétique de ces étapes dépend fortement de la lipophilie du PFC (Riess, 2001; Tsuda et al., 1988). Ces étapes sont illustrées en Figure 19.

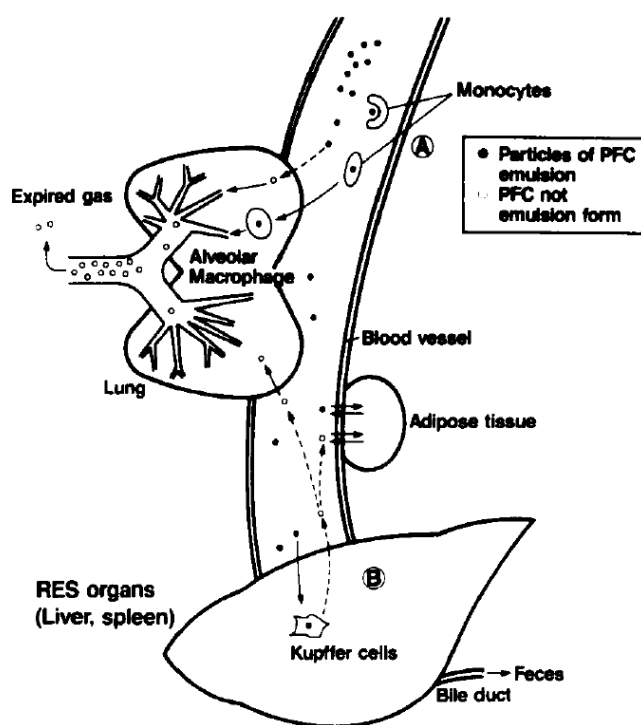


Figure 19: Représentation schématique de l'élimination des PFCs (Tsuda et al., 1988)

Les temps d'excrétion de certains composés perfluorés peuvent parfois augmenter considérablement quand la longueur de chaîne dépasse 8 carbones (Riess, 2009). Ainsi la rétention prolongée de certains composés comme l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS) (demi-vies dans l'organisme de plusieurs années) est source de toxicité sur le long terme (Zaggia and Ameduri, 2012). Cette toxicité dépend fortement de la structure chimique des composés, puisque par exemple le PFOB, de structure chimique proche, a une demi-vie de 5 jours au niveau du foie et de la rate (Mattrey et al., 1982) et est biocompatible (autorisé par la FDA depuis 1993 (NDA#020091)).

La biocompatibilité de composés diblocs semi-fluorés linéaires de type $C_nF_{2n+1}-C_mH_{2m+1}$ a également été étudiée et aucune toxicité n'a été rapportée (Krafft and Riess, 2009). Certains composés à chaîne courte possédant des groupes perfluorés branchés tels que $C_3F_7(CF_3)_2CH$ ou $C_2F_5(CF_3)_2Cl$ présentent cependant une toxicité importante par inhalation (Probst et al., 1987), qui provient probablement de leur susceptibilité accrue aux attaques nucléophiles (Cook and Pierce, 1973). Le perfluoroisobutylène $(CF_3)_2C=CF_2$, qui possède également une structure branchée, est aussi extrêmement toxique et réactif (Krafft and Riess, 2009).

Pour conclure, de manière générale les chaînes perfluorées linéaires de type C_xF_{2x+1} de longueur de chaîne inférieure ou égale à 8 carbones sont inertes et non-toxiques, cependant de légers changements dans la structure peuvent avoir une forte influence. La synthèse de nouveaux polymères contenant des chaînes fluorées pour le développement d'ACUs devra toujours s'accompagner d'une évaluation de leur cytotoxicité potentielle.

Les propriétés remarquables des PFCs se retrouvent chez les polymères fluorés, notamment leur haute résistance thermique et chimique, leur faible énergie de surface, leur faible inflammabilité, leur caractère très hydrophobe et lipophile. Les polymères fluorés trouvent donc de nombreuses applications en tant que matériaux anticorrosion, matériaux résistants aux solvants et aux températures élevées, matériaux de revêtements hydrophobes ou anti-salissures (Ameduri et al., 2001; Yao et al., 2014). Leurs faibles indices de réfraction et leurs faibles constantes diélectriques les rendent également intéressants pour le développement de dispositifs optiques et électroniques (Vitale et al., 2015; Yao et al., 2014). Au cours de la thèse, nous nous sommes intéressés à deux types de polymères contenant des chaînes fluoroalkylées linéaires de type C_xF_{2x+1} : les polymères possédant une terminaison de chaîne linéaire C_xF_{2x+1} , et les polymères possédant plusieurs chaînes C_xF_{2x+1} pendantes (structure en peigne). Les deux parties suivantes visent à étudier les travaux antérieurs portant sur ces deux catégories de polymères, avec un focus sur l'impact des segments fluorés sur les propriétés physico-chimiques du polymère.

2.3. Polymères terminés par des chaînes perfluorées linéaires

L'introduction d'une chaîne perfluorée linéaire courte en terminaison de la chaîne polymère peut notamment avoir un impact considérable sur (1) les propriétés de surface du polymère et (2) son comportement associatif en solution.

2.3.1. Modification des propriétés de surface de films de polymères

Plusieurs travaux rapportent la fonctionnalisation de polymères (PVA, polyéthylène) avec des terminaisons perfluorées linéaires dans le but de diminuer les tensions de surfaces des films

formés. Les groupements fluorés s'orientent en effet préférentiellement vers l'air. Les tensions de surface diminuent quand la longueur de chaîne fluorée augmente et quand la concentration en groupements CF_3 à la surface augmente (Mclain et al., 1996; Sato et al., 1992). Diminuer la masse molaire du polymère ou fonctionnaliser les deux extrémités de chaînes plutôt qu'une seule sont deux stratégies permettant d'augmenter la proportion de segments fluorés à la surface, et de réduire ainsi plus efficacement les tensions de surface (Mclain et al., 1996).

La fonctionnalisation par des terminaisons perfluorées linéaires a également été réalisée sur des polymères biodégradables comme les polylactides (PLA) (Giuntoli et al., 2012; Lee et al., 2001). La synthèse se fait par polymérisation en masse par ouverture de cycle (ROP pour ring-opening polymerization) du L-lactide ou D,L-lactide amorcée par des alcools fluorés tels que $C_7F_{15}-CH_2-OH$ ou $C_{10}F_{21}-CH_2-CH_2-OH$. A masse molaire constante, la ségrégation en surface des groupements fluorés les plus longs est bien plus importante que celle des chaînons plus courts, ce qui rend les films de polymères plus hydrophobes et plus résistants à l'érosion de surface par hydrolyse. La fonctionnalisation de polymères biodégradables par des terminaisons fluorées pourrait ainsi permettre de retarder et contrôler leur dégradation (Lee et al., 2001).

La synthèse d'un PLLA terminé par une chaîne $CH_2-C_7F_{15}$ (PLLA-PFO) a également été rapportée pour formuler des microcapsules d'air comme ACUs (Böhmer et al., 2006; Chlon et al., 2009; Kooiman et al., 2009; Lensen et al., 2011). Contrairement aux microcapsules de PLGA ou PLA non fluorés, les capsules de PLLA-PFO résistent bien à la lyophilisation et à la redispersion post-lyophilisation. La surface hydrophobe du polymère permet de réduire l'intrusion de l'eau à travers les pores de la coque de la microcapsule. Ces microcapsules présentent des seuils de pression d'activation acoustique à 1 MHz comparables à ceux des microcapsules de PLLA non fluoré (0,50 – 0,70 MPa), mais sont ensuite plus efficacement détruites quand la pression acoustique augmente (Chlon et al., 2009). Ces microcapsules sont donc intéressantes pour l'encapsulation et la libération contrôlée d'un principe actif sous l'application d'ultrasons.

Les études citées dans cette partie ont toutes pour objectif de diminuer les tensions de surface des polymères et les rendre plus hydrophobes ou plus résistants. La fonctionnalisation par des groupements fluorés peut en outre servir à modifier le comportement associatif des polymères en solution.

2.3.2. Modification des propriétés associatives de polymères en solution

Xu et al. ont rapporté la synthèse de PEGs terminés aux deux extrémités par des chaînes perfluorées C_6F_{13} ou C_8F_{17} (Figure 20A) (Xu et al., 1997). En solution aqueuse, les segments fluorés s'associent plus fortement que leurs équivalents hydrogénés pour générer des structures

micellaires reliées par des chaînes de PEG formant un réseau tridimensionnel (Figure 20B). La viscosité des solutions augmente fortement avec la concentration en polymère et augmente considérablement en remplaçant les groupes C_6F_{13} par des groupes C_8F_{17} (la viscosité à cisaillement nul d'une solution à 5% de polymère passe de 3,85 Pa.s à 200 Pa.s). La formation du réseau peut être caractérisée par un temps de relaxation correspondant au temps nécessaire à un chaînon terminal hydrophobe pour s'extraire d'une micelle du réseau (Figure 20C) : à 5% en polymère, ce temps de relaxation est 40 fois plus long pour C_8F_{17} (83 ms) que pour C_6F_{13} (2,1 ms). Une étude similaire réalisée en ne modifiant les PEGs qu'à une seule extrémité démontre aussi que les PEGs fluorés sont des agents épaississants associatifs plus efficaces que leurs équivalents hydrogénés (Zhang et al., 1998).

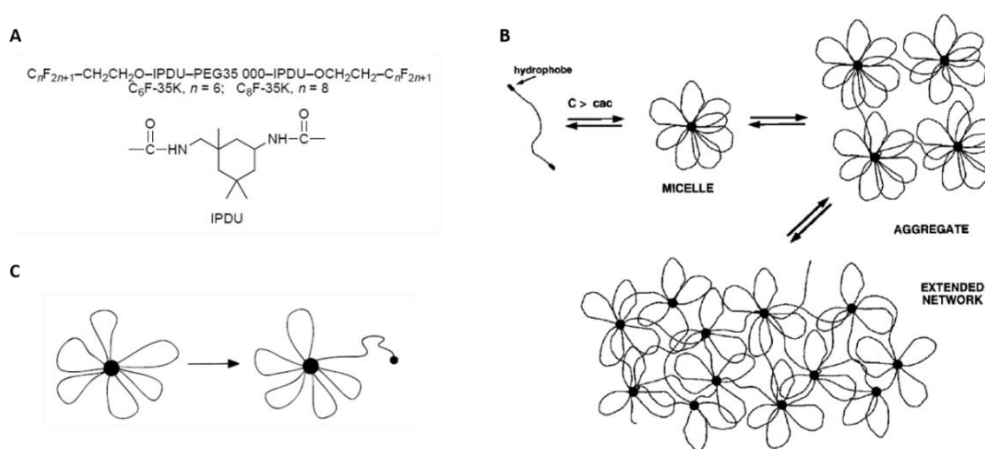


Figure 20: Structure des PEG terminés par des chaînes C_6F_{13} et C_8F_{17} (A), représentation schématique de leur association en solution aqueuse formant un réseau dont les points de jonction sont les cœurs fluorés des micelles (B) et représentation de la sortie d'un groupe terminal hydrophobe du cœur de la micelle vers la solution (C) (Xu et al., 1997)

L'introduction d'un espaceur hydrogéné de 11 CH_2 entre le PEG et la chaîne fluorée C_8F_{17} , plus long que les 2 CH_2 dans les deux études citées précédemment, entraîne une ségrégation de phases avec une phase supérieure micellaire diluée coexistant avec une phase inférieure de micelles plus concentrées (Calvet et al., 2003; Cathebras et al., 1998). Ce processus de déphasage dépend fortement des proportions relatives de la partie hydrophile et de la partie hydrophobe du système, et donc de plusieurs paramètres : le degré de fonctionnalisation du PEG par la chaîne fluorée, la masse molaire du PEG, la longueur de l'espaceur hydrogéné, et la longueur de chaîne fluorée. Les temps de relaxation extrêmement élevés (de l'ordre de 100 s) comparés à ceux obtenus avec des PEGs non fluorés montrent encore que les segments fluorés peuvent produire des systèmes aux propriétés rhéologiques exceptionnelles.

D'autres polymères que des PEGs ont été fonctionnalisés par des terminaisons perfluorées linéaires. Weberskirch et al. ont rapporté la synthèse d'une poly(*N*-acyléthylène imine) contenant une terminaison de chaîne perfluorée $CH_2-CH_2-C_8F_{17}$ d'un côté et l'autre terminaison hydrogénée pour générer des micelles à doubles compartiments (Weberskirch et al., 2000). En

faisant varier la longueur de la chaîne hydrogénée, tout en maintenant celle de la chaîne fluorée constante, il est possible de contrôler le premier point de micellisation qui est déterminé par le groupement terminal le plus hydrophobe. Avec un groupement terminal hydrogéné long ($C_{16}H_{33}$), à basse concentration, les micelles possèdent majoritairement un cœur hydrocarboné alors que les chaînons fluorés peuvent s'associer à côté sous forme de dimères ou de trimères pour former un réseau fluoré environnant. A partir d'une certaine concentration (31 wt%), les segments fluorés s'agrègent complètement pour former des micelles à deux compartiments, l'un hydrocarboné et l'autre fluoré, l'objectif étant à terme d'imiter le caractère multi-compartimenté de certains systèmes biologiques comme les cellules eucaryotes (Weberskirch et al., 2000). Des études de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) montrent par la suite que ces micelles sont cylindriques (Figure 21) et qu'elles permettent de solubiliser une molécule fluorée (le 1,4-diiodoperfluorobutane) (Kubowicz et al., 2005b).

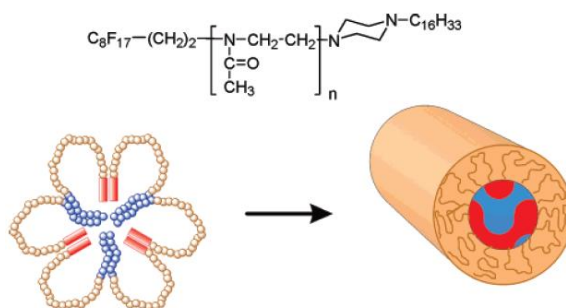


Figure 21: Structure d'une poly(N-acyléthylène imine) fonctionnalisée par une chaîne hydroalkylée (en bleu) et une chaîne fluoroalkylée (en rouge) et illustration de leur agrégation en micelles cylindriques lors de l'augmentation de la concentration en polymère (Kubowicz et al., 2005b)

On observe donc que la chaîne hydrophile du milieu forme une boucle pour pouvoir générer ce type de micelle avec un cœur hydrophobe/fluoré. Le groupe de Jörg Kressler s'est intéressé à l'influence de la longueur de ce bloc hydrophile dans un système un peu différent. Des copolymères à blocs symétriques de type A-B-A hydrophile-lipophile-hydrophile ont été fonctionnalisés aux deux extrémités par des chaînons linéaires C_9F_{19} . Les auteurs montrent par RMN ^{19}F que ces polymères s'auto-assemblent dans l'eau suivant la concentration et la température, mais que si le bloc hydrophile est trop court, il ne peut former de boucle de manière à séquestrer les chaînes fluorées vers le cœur de la micelle (Figure 22) (Kyeremateng et al., 2010). Schwieger et al. ont plus récemment utilisé ce même type de polymère amphiphile fonctionnalisé avec des terminaisons C_9F_{19} pour favoriser son adsorption et insertion dans les bicouches et monocouches lipidiques (Schwieger et al., 2016, 2014). En effet, les polymères interagissent avec les membranes lipidiques en insérant leurs chaînes hydrophobes, et le caractère fortement hydrophobe des chaînons fluorés augmente fortement ces interactions : ils servent de points d'ancrage additionnels dans les membranes.

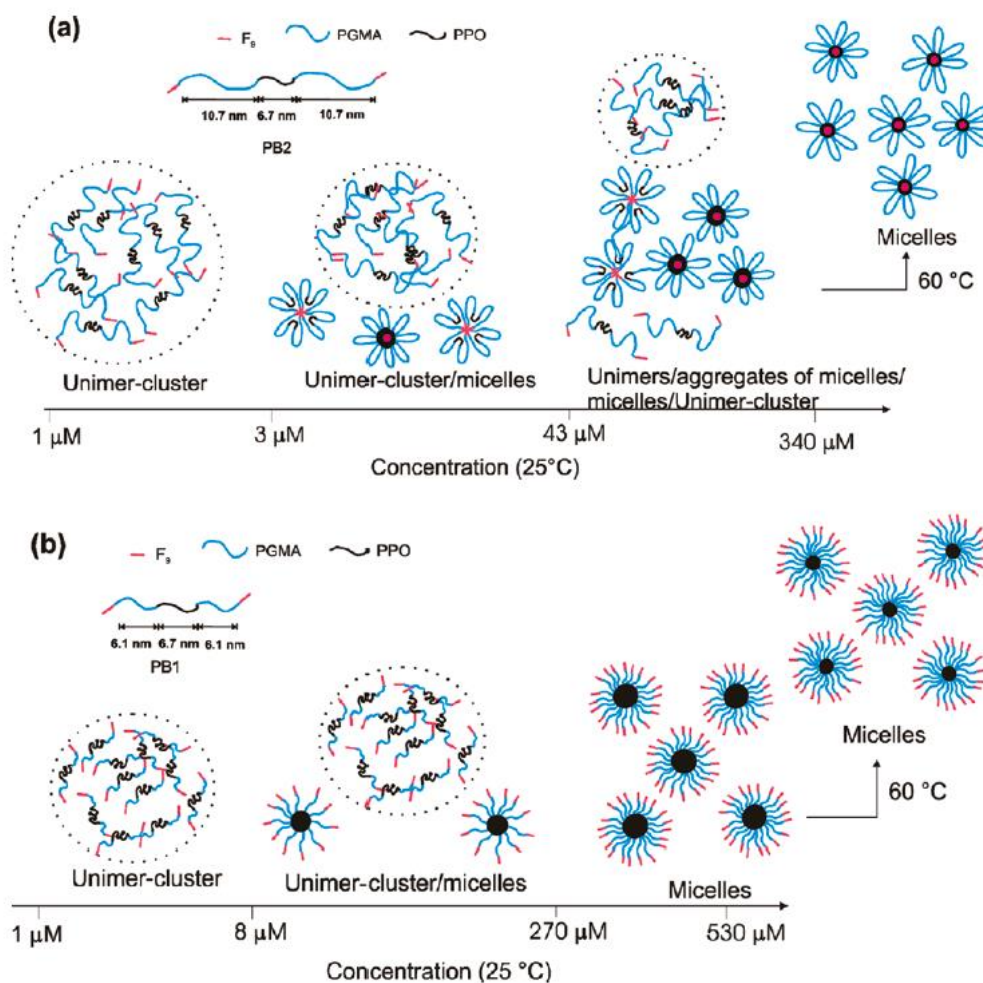


Figure 22: Mode d'association des polymères contenant un bloc hydrophobe central (noir), des blocs hydrophiles de part et d'autre (bleu) et des extrémités perfluorées linéaires (rouge) : comparaison entre des blocs hydrophiles longs (a) et courts (b) (Kyeremateng et al., 2010)

Plus récemment, l'équipe de Roey J. Amir a rapporté la synthèse de PEGs modifiés par des dendrons contenant 4 terminaisons hydrophobes (comportant un groupe CF_3) greffées par des liaisons clivables sous l'action d'enzymes (Figure 23A) (Buzhor et al., 2016). En solution aqueuse, ces hybrides PEG-dendrons fluorés s'auto-assemblent sous forme de micelles, ce qui les rend invisibles en RMN ^{19}F . En présence de certaines enzymes, les liaisons sont clivées et les micelles se désassemblent, libérant ainsi les groupements fluorés et produisant un signal visible en RMN ^{19}F (Figure 23B). Les auteurs ont étudié un autre type d'architecture avec un dendron contenant 4 groupements hydrophobes non fluorés clivables et un groupement fluoré non-clivable. Le désassemblage des micelles en présence d'enzymes augmente la mobilité du PEG-fluoré restant et génère aussi un signal détectable en RMN ^{19}F . Ces systèmes pourraient donc servir de sondes pour détecter par IRM ^{19}F la présence d'enzymes surexprimées dans certains tissus pathologiques (Figure 23C) (Buzhor et al., 2016).

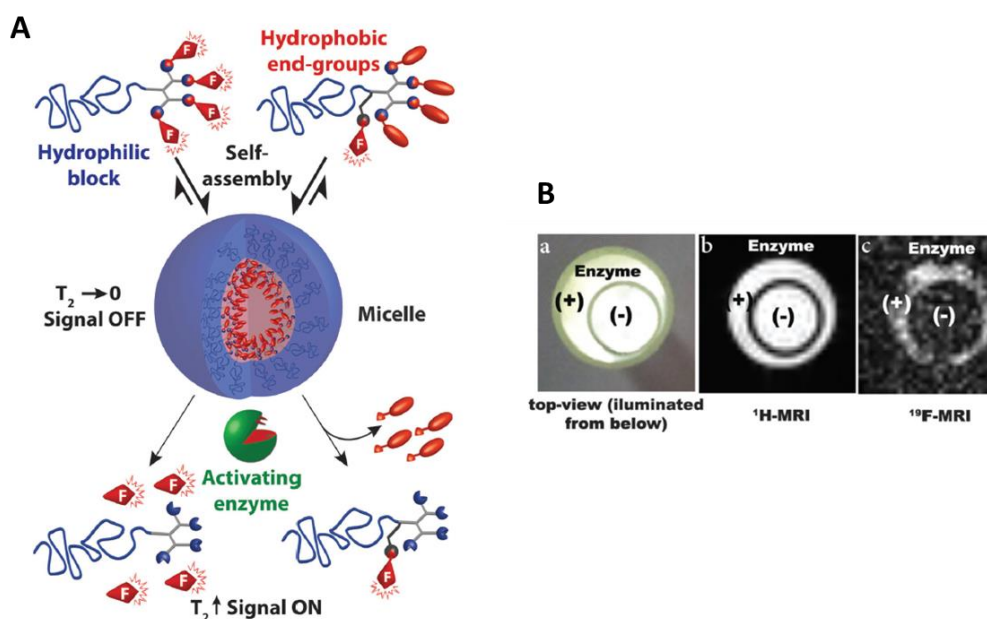


Figure 23: Illustration du mécanisme d'activation des deux types d'architectures synthétisées (A) et photographie d'un tube RMN de 5 mm de diamètre contenant des micelles non-activées, à l'intérieur d'un tube de 8 mm de diamètre contenant des micelles activées par les enzymes (B-a), image spin-echo IRM ^1H (B-b) et image spin-echo IRM ^{19}F (B-c) (Buzhor et al., 2016)

Nous avons donc montré que l'introduction d'une terminaison fluorée linéaire courte dans un polymère peut avoir une influence majeure sur ses propriétés. Un changement d'architecture de la chaîne polymère peut également induire des changements considérables. Nous nous intéresserons dans la partie suivante aux avancées concernant l'introduction de chaînes perfluorées pendantes (structure en peigne) dans des copolymères et l'impact sur leurs propriétés physico-chimiques et sur leur comportement en solution. Plusieurs études intéressantes rapportent la synthèse de polymères contenant des perfluoropolyéthers (Frediani et al., 2010; Lopez et al., 2016; Singh et al., 2011), mais nous nous focaliserons essentiellement sur les chaînes pendantes fluoroalkylées de type $\text{C}_x\text{F}_{2x+1}$. Après une description des voies de polymérisation les plus couramment utilisées pour synthétiser de tels polymères, une revue des travaux antérieurs portant sur ces polymères est proposée, en les classant en fonction de leur structure (statistique, en bloc) et des affinités de chaque bloc.

2.4. Copolymères contenant des chaînes perfluorées pendantes

2.4.1. Voies de synthèse

Les copolymères contenant des chaînes fluoroalkylées pendantes sont majoritairement formés par des acrylates fluorés ou des méthacrylates fluorés. Les voies de polymérisation utilisées pour ces monomères sont principalement les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).

Le principe de la PRC repose sur l'établissement d'un équilibre d'activation/désactivation entre des espèces dormantes et des espèces actives propageantes. Cet équilibre doit être fortement déplacé vers la formation des espèces dormantes pour minimiser les réactions de terminaison et de transfert irréversible des chaînes. Ceci est réalisé en introduisant dans le milieu réactionnel une entité capable de piéger de manière momentanée les chaînes propageantes. Deux autres critères doivent par ailleurs être remplis pour obtenir une distribution étroite des masses molaires : l'amorçage de la polymérisation doit être rapide par rapport à la propagation, et l'échange dans l'équilibre d'activation/désactivation doit aussi être rapide par rapport à la propagation.

Trois techniques de PRC peuvent être distinguées : la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP : nitroxyde-mediated polymerization), par transfert d'atomes (ATRP : atom-transfer radical polymerization), et par transfert de chaîne réversible par addition/fragmentation (RAFT : reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization).

La NMP utilise des radicaux nitroxydes stables pour terminer de manière réversible les chaînes propageantes. Cette technique est largement utilisée pour la polymérisation de styrènes et d'acrylates, mais moins adaptée à la polymérisation de méthacrylates (Hansen et al., 2007). La RAFT fait intervenir des réactions de transfert réversible entre un composé de type thiocarbonylthio et une chaîne en croissance. Elle peut s'appliquer à une large gamme de monomères et de milieux, mais très peu d'agents RAFT sont commercialisés. En outre, les polymères obtenus peuvent être colorés ou posséder une odeur parfois rémanente. L'ATRP repose sur une réaction redox réversible représentée en Figure 24: un métal de transition (Mt) est oxydé lorsqu'une chaîne dormante (P-X) devient active (P•) par le transfert d'un atome d'halogène (X). Le métal est sous forme de complexe avec un ligand multidenté (L) qui favorise la liaison avec l'halogène. L'ATRP peut être employée avec une large gamme de monomères. Son inconvénient majeur réside dans l'élimination parfois difficile du métal (souvent le cuivre), mais des techniques comme l'immobilisation sur colonne d'alumine peuvent tout de même être efficaces (Hansen et al., 2007).

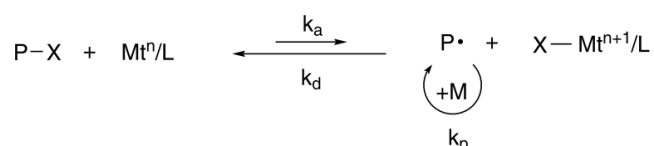


Figure 24: Mécanisme de l'ATRP (Hansen et al., 2007)

Les trois techniques sont couramment employées avec des monomères fluorés (Hansen et al., 2007). Cependant, dans la plupart des études d'intérêt citées ci-dessous, l'ATRP semble être la

technique la plus utilisée pour la synthèse de copolymères à base d'acrylates ou méthacrylates fluoroalkylés, suivie de la RAFT.

2.4.2. Copolymères à enchaînement aléatoire

La copolymérisation de monomères avec une faible quantité de comonomère contenant une chaîne perfluorée a été utilisée pour modifier des propriétés variées des polymères : augmenter leur résistance aux températures élevées et aux faisceaux d'électrons (Gong and Chien, 1989), accroître leur stabilité photochimique (Chiantore et al., 2000), modifier leurs propriétés thermiques et optiques (Zhou et al., 2008), ou encore améliorer leur caractère viscosifiant en solution aqueuse (Hwang and Hogen-Esch, 1995; Xie and Hogen-Esch, 1996; Zhang et al., 1992, 1990). En effet, comme vu précédemment avec les polymères à terminaison fluorée, l'ajout de chaînes fluorées pendantes dans un polymère peut aussi modifier son comportement associatif en solution. Par exemple, des copolymères statistiques de méthacrylate de poly(éthylène glycol) éther de méthyle (PEGMA) et de méthacrylate de 1H,1H,2H,2H-heptadécafluorodécyl (FMA) s'associent dans l'eau pour former des agrégats avec un compartiment intérieur fluoré (Figure 25) (Yuta Koda et al., 2015). Ces polymères sont d'intérêt pour des applications médicales puisqu'ils peuvent être conjugués à des protéines par des liaisons disulfures clivables et ne sont pas toxiques.

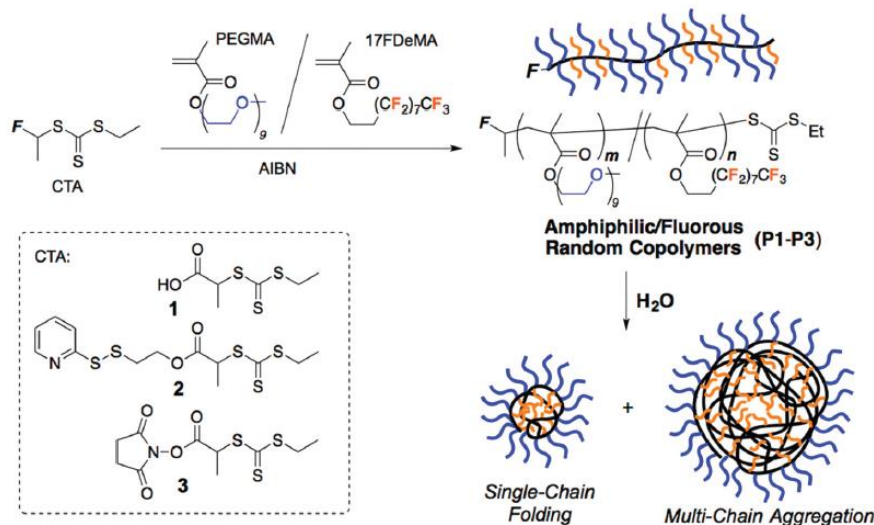


Figure 25: Synthèse des copolymères statistiques amphiphiles et illustration de leur association dans l'eau (Yuta Koda et al., 2015)

L'arrangement des monomères fluorés au sein du copolymère a une influence importante sur ses propriétés. Par exemple, une étude sur la copolymérisation du méthacrylate de méthyle (MMA) avec du méthacrylate de 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutyle pour la préparation de films a montré qu'une structure à blocs favorisera des énergies de surface plus faibles qu'une structure

statistique (Chen et al., 2015). En effet, la restriction conformationnelle des segments fluorés dans un copolymère statistique peut les empêcher de s'orienter vers la surface.

Dans la suite de cette partie, nous nous focaliserons donc d'avantage sur les copolymères possédant une structure à blocs, dont au moins l'un des blocs est formé de chaînes perfluorées pendantes.

2.4.3. Copolymères à blocs hydrophile / fluorophile

Plusieurs articles décrivent la synthèse de copolymères contenant des blocs hydrophiles de poly(éthylène glycol) linéaire et des blocs de chaînes fluorées pendantes. Lim et al. ont synthétisé des copolymères constitués d'un PEG de 5000 g/mol et d'un bloc méthacrylate de chaînes pendantes $\text{CH}_2\text{-C}_7\text{F}_{15}$ de masse molaire variée (PEG-*b*-PDHFOMA) par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) (Lim et al., 2002). L'augmentation de la masse molaire du bloc fluoré rend le polymère insoluble dans l'eau. Par ailleurs, ces polymères s'associent dans le chloroforme sous forme de micelles, ou de bâtonnets lorsque le bloc fluoré est encore plus long. Ce type de morphologies est facilement visible sur des images de microscopie électronique en transmission (TEM) où les domaines fluorés apparaissent plus foncés du fait de la densité électronique élevée du fluor (Figure 26).

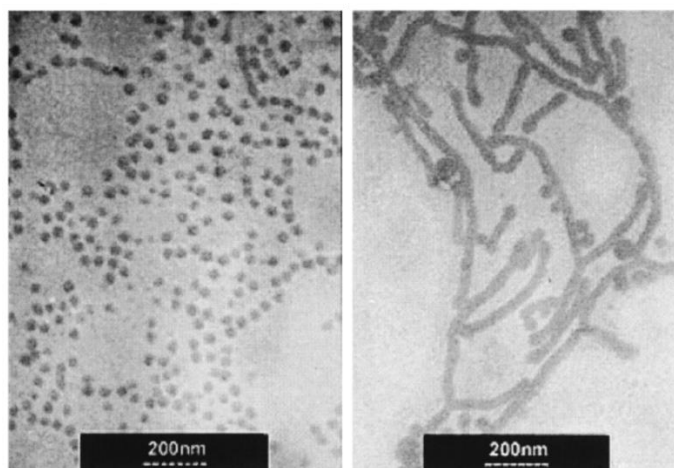


Figure 26 : Images TEM des agrégats formés dans le chloroforme : PEG_{5K}-*b*-PDHFOMA_{4.5K} (gauche) et PEG_{5K}-*b*-PDHFOMA_{12.5K} (droite) (Lim et al., 2002)

Des morphologies micellaires ont également été observées dans l'eau avec des polymères triblocs fluoré-PEG-fluoré contenant des segments $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{F}_{13}$ pendants (Hussain et al., 2003). L'augmentation de la concentration en polymère entraîne la formation d'une sorte de réseau fibreux après évaporation de l'eau (Figure 27). Ce type de ségrégation en nano-domaines a aussi été observé avec un film de polymère dibloc comprenant un PEG linéaire et un bloc de méthacrylate fluoré avec des chaînes $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}_8\text{F}_{17}$ (Li et al., 2013).

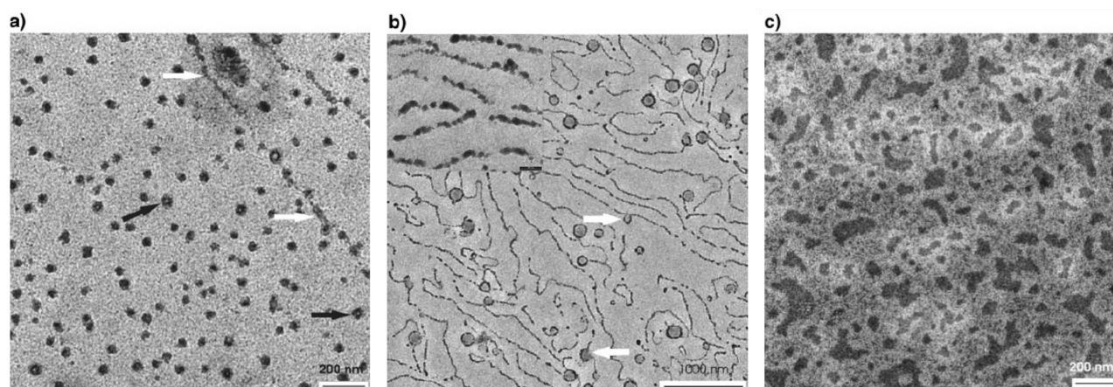


Figure 27: Images TEM des agrégats formés après évaporation de l'eau à partir de solutions de polymère tribloc fluoré-PEG-fluoré à différentes concentrations initiales: 2,5 g/L (a), 3,5 g/L (b) et 5,7 g/L (c). L'insert en (b) est un zoom sur le réseau fibreux formé (barre d'échelle 200 nm) (Hussain et al., 2003)

Des polymères avec des blocs hydrophiles différents du PEG ont également été envisagés. Peng et al. ont étudié les propriétés d'association d'un polymère composé d'un bloc hydrophile de poly(acide acrylique) et d'un bloc hydrophobe/fluoré de poly(acrylate de 2,2,2-trifluoroéthyle-*co*-acrylate de *n*-butyle) (PAA₅₀-*b*-P(*n*BA₃₉-*co*-TFEA₁₁₅)) pouvant servir à la formulation d'agents de contraste pour l'IRM ¹⁹F (Peng et al., 2012). Les signaux RMN des protons du bloc fluoré sont visibles dans l'acétone mais s'élargissent et disparaissent lorsque du D₂O est ajouté en proportion croissante, démontrant la mobilité réduite des chaînes fluorées et leur association en micelles (Figure 28).

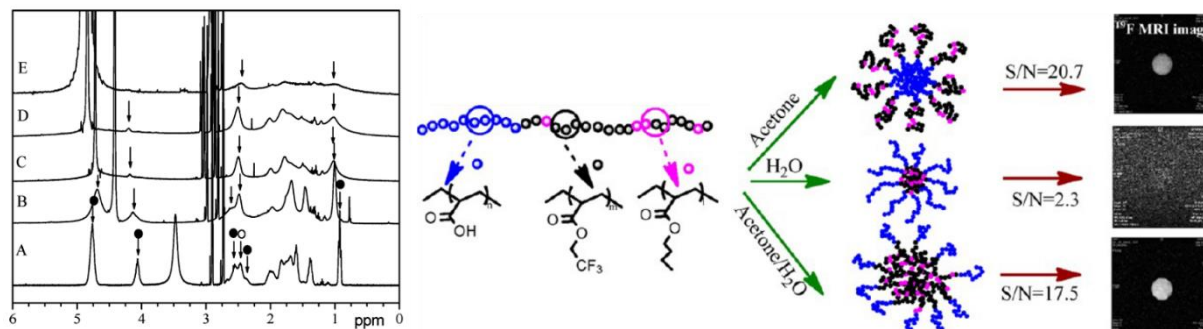


Figure 28 : Gauche : Spectres RMN ¹H du PAA₅₀-*b*-P(*n*BA₃₉-*co*-TFEA₁₁₅) dans des mélanges acétone-*d*₆/D₂O avec différentes fractions volumiques de D₂O : 0 (A), 0,25 (B), 0,5 (C), 0,75 (D) et 1 (E). Les pics étiquetés « o » correspondent aux protons du bloc PAA et ceux étiquetés « • » correspondent aux protons des blocs P*n*BA et PTFEA. Droite : Structure du polymère, illustration des modes d'association selon la qualité du solvant, et signal résultant en IRM ¹⁹F (Peng et al., 2012)

2.4.4. Copolymères à blocs lipophile / fluorophile

D'autres groupes se sont intéressés aux copolymères composés de blocs lipophiles et de blocs fluorés. Plusieurs études rapportent notamment la copolymérisation en blocs d'acrylates/méthacrylates fluoroalkylés avec des acrylates/méthacrylates hydrogénés (Li, Wu and Han, 2002; Sun and Liu, 2011; Yang *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015), ou avec du styrène (Martinelli et al., 2010; Yang et al., 2011). Différentes morphologies peuvent être observées selon les solvants utilisés. Par exemple, Dong et al. ont décrit la formation de

particules semi-sphériques dans le chloroforme, de particules un peu plus sphériques dans le tétrahydrofurane (THF), et d'unimères homogènes dans le trifluorotoluène (TFT) qui est un meilleur solvant pour les chaînes fluorées (Figure 29) (Dong et al., 2012).

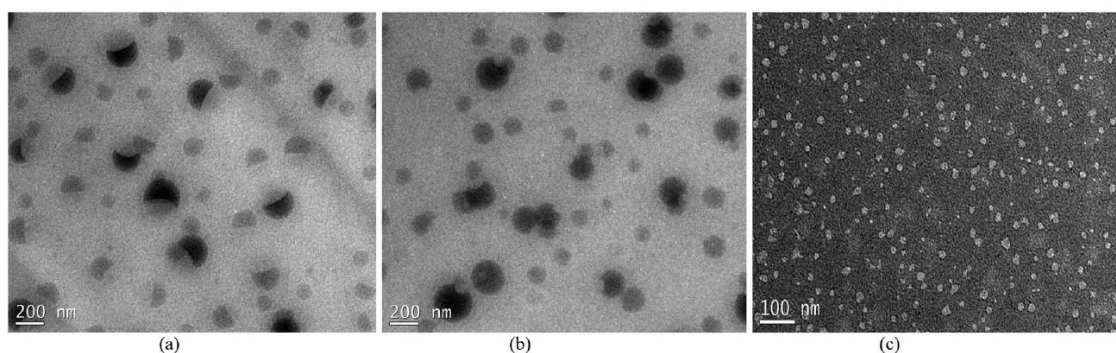


Figure 29: Images TEM d'un copolymère à bloc de MMA et de méthacrylate de dodécafluoroheptyle dans le chloroforme (a), le THF (b) et le TFT (c) (Dong et al., 2012)

Par ailleurs, des polymères diblocs contenant un bloc fluoré de poly(méthacrylate de 2,2,2-trifluoroéthyle) (PTFEMA) et un bloc « photo-réliculable » de poly(méthacrylate de glycidyle) (PGMA) (Jiang et al., 2013; Zou et al., 2013) ou de poly(méthacrylate de 2-cinnamoyloxyéthyle) (PCEMA) (He et al., 2013; Zhang et al., 2015) ont été synthétisés dans le but de préparer des surfaces superhydrophobes. En effet, dans des solvants sélectifs (tels que des mélanges dichlorométhane/TFEMA ou dichlorométhane/méthanol), ces polymères s'auto-assemblent en micelles ou vésicules qui peuvent ultérieurement être réticulées. Ceci donne lieu à la formation de structures hiérarchiques présentant une rugosité à l'échelle nanométrique et à l'échelle micrométrique, une caractéristique des surfaces superhydrophobes que l'on trouve dans la nature.

2.4.5. Copolymères à blocs hydrophile / lipophile / fluorophile dits « triphiles »

Le synthèse de copolymères à blocs de trois affinités différentes, que l'on peut qualifier de « triphiles », a été largement étudiée pour générer des structures micellaires multi-compartimentées, comme le démontrent plusieurs articles de revue (Amado and Kressler, 2011; Moughton et al., 2012; Wyman and Liu, 2013). Une illustration des morphologies variées pouvant être obtenues est reprise en Figure 30.

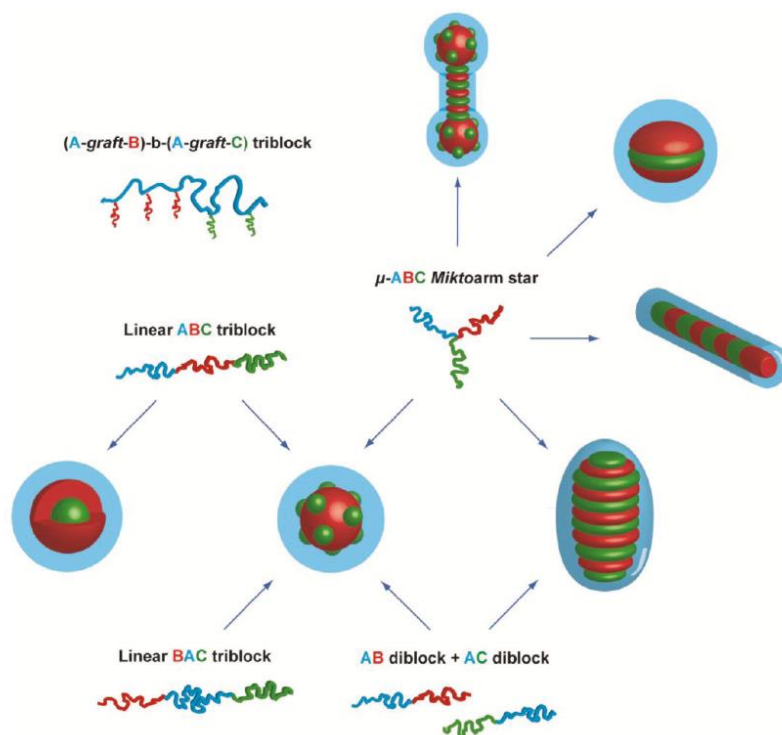


Figure 30: Représentation schématique des 5 stratégies principales adoptées pour la production de micelles multicompartimentées avec un exemple illustratif de la morphologie produite (Moughton et al., 2012)

C'est vers la fin des années 1990 que certaines équipes ont commencé à utiliser des monomères fluorés pour former le troisième bloc incompatible. Avec leur caractère fortement hydrophobe et lipophile, les chaînes fluorées permettent en effet d'accentuer les différences d'affinités entre les trois blocs. Par exemple, une étude a montré qu'un poly(éthylène glycol)-*b*-polystyrène-*b*-1,2-polybutadiène (PEG-*b*-PS-*b*-PB) forme à 1% dans l'eau des micelles cœur-couronne sphériques, dans lesquelles les blocs hydrophobes PS et PB sont mélangés de façon homogène dans le cœur de la micelle. La fluoration sélective du bloc PB avec des chaînes C₆F₁₃ entraîne alors la formation de micelles cœur-coque-couronne de forme plus ellipsoïdale avec un cœur fluoré, une coque de PS et une couronne de PEG, structure confirmée par des observations en TEM et des analyses de diffusion aux petits angles (SAXS et SANS) (Zhou et al., 2003). La formation de micelles multi-compartimentées est également possible avec d'autres structures de polymères triblocs, comme des structures en étoile (Figure 30) (Li et al., 2004). La présence de deux compartiments séparés (lipophile et fluorophile) permet alors de solubiliser à la fois du pyrène et un dérivé du fluoronaphtalène (Lodge et al., 2005).

Contrairement aux études précédentes, la formation de ces structures multicompartimentées a été mise en évidence par cryo-microscopie électronique (cryo-TEM), technique plus adaptée que la TEM puisque qu'elle n'implique pas d'étape de séchage et permet d'observer l'échantillon dans son environnement natif en solution. L'équipe d'André Laschewsky a par la suite publié de nombreuses études sur des polymères triblocs linéaires comprenant un bloc fluoré dans

lesquelles les structures multicompartimentées sont observées par cryo-TEM (Berlepsch et al., 2009; Kubowicz et al., 2005a; Marsat et al., 2011; Skrabania et al., 2010, 2009). Ils ont en outre utilisé la cryo-tomographie électronique pour montrer une restitution tridimensionnelle de l'échantillon obtenue à partir d'images bidimensionnelles obtenues sous différentes inclinaisons (Figure 31B) (Berlepsch et al., 2009). Avec des séquences du type hydrophile-lipophile-fluorophile à 0,5% dans l'eau, des structures ressemblant à des framboises constituées de petits « nodules » fluorés d'environ 3 nm placés sur un cœur lipophile plus grand (15 nm) et entourés d'une couronne hydrophile ont été obtenues (Figure 31A) (Kubowicz et al., 2005a). Des séquences du type lipophile-hydrophile-fluorophile peuvent produire des structures ressemblant à des ballons de football dans lesquelles des domaines fluorés sont dispersés au sein du cœur lipophile mais aussi au niveau de l'interface cœur hydrophobe/couronne hydrophile (Figure 31B) (Berlepsch et al., 2009). En faisant varier la nature et la longueur des blocs, ce type de séquence peut également générer des structures bisphériques après recuit (Figure 31C), qui peuvent solubiliser une molécule lipophile (le néopentylbenzène) et une molécule fluorée (l'hexafluorobenzène) (Marsat et al., 2011).

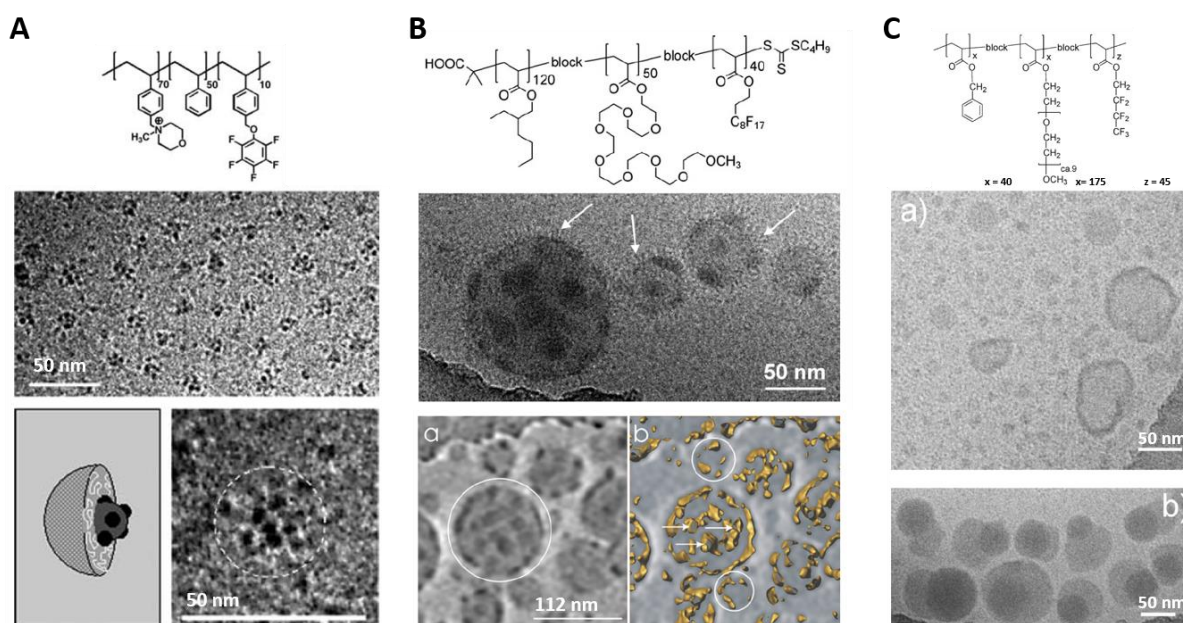


Figure 31: Exemples de structures de polymères triblocs linéaires et images cryo-TEM des agrégats formés en solution dans l'eau à 0,5% : (A) : structure « framboise » avec une séquence hydrophile-lipophile-fluorophile (Kubowicz et al., 2005a), (B) : structure « ballon de football » avec une séquence lipophile-hydrophile-fluorophile et restitution tridimensionnelle obtenue par cryo-tomographie électronique (en doré) (Berlepsch et al., 2009), (C) : vésicules de formes et tailles variées avec une séquence lipophile-hydrophile-fluorophile (a) se transformant en structures bisphériques après recuit à 75°C pendant 2 semaines (b) (Marsat et al., 2011)

Une autre étude a décrit la synthèse d'un polymère tribloc lipophile-hydrophile-fluorophile, mais pour formuler des hydrogels. En effet, à masses molaires équivalentes, ce polymère (PMMA-*b*-PEGMA-*b*-PFMA) à 29 wt% forme un hydrogel possédant une transition sol-gel à 50°C alors que le contrôle non fluoré (PMMA-*b*-PEGMA-*b*-PMMA) ne forme pas de gel jusqu'à 45 wt% (Shunmugam et al., 2007).

2.5. Polymères fluorés pour l'encapsulation de PFCs

La plupart des travaux cités précédemment sur les polymères contenant des chaînes perfluorées ont donc généralement pour objectif de modifier les propriétés de surface de polymères ou leur comportement associatif en solution. Quelques études visaient à solubiliser des molécules fluorées modèles dans des micelles (Kubowicz et al., 2005b; Lodge et al., 2005; Marsat et al., 2011), mais peu d'articles rapportent l'utilisation de polymères fluorés pour favoriser l'encapsulation de PFCs pour des applications médicales. Les PFCs sont en effet largement utilisés pour la formulation d'ACUs et de liquides de remplacement sanguin, mais leur encapsulation dans des bulles ou émulsions s'avère difficile du fait de leur caractère à la fois hydrophobe et lipophile, et de leur tendance à s'évaporer facilement. Plusieurs équipes se sont alors orientées vers l'utilisation de tensioactifs fluorés ou lipides fluorés pour améliorer leur encapsulation (Astafyeva et al., 2015; Couture et al., 2006; Fernandes et al., 2016; Oda et al., 2015). Très peu se sont en revanche tournées vers la fonctionnalisation de polymères avec des chaînons fluorés pour favoriser les interactions avec le PFC.

Une étude a rapporté la synthèse d'un copolymère à blocs de méthoxy-poly(éthylène glycol)-*b*-polycaprolactone terminé par une chaîne linéaire courte $\text{CH}_2\text{-C}_3\text{F}_7$ (mPEG-PCL-HFB) pour la formulation de nanocapsules de PFC (Li et al., 2014). La synthèse se fait par ROP de la ϵ -caprolactone amorcée par le 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB), puis le PCL-HFB obtenu est mis à réagir avec l'anhydride succinique pour former du HOOC-PCL-HFB. Un couplage de type EDC/NHS avec un mPEG-NH₂ permet finalement d'obtenir le mPEG-PCL-HFB (Figure 32). L'ajout du chaînon fluoré permet d'accroître l'efficacité d'encapsulation des PFCs dans les nanocapsules (augmentation de 4,3% à 14,7% pour le PFH et de 2,1% à 5,4% pour le 1,1,1,3,3-pentafluorobutane). Ceci suggère qu'il existe des interactions favorables entre le segment fluoré HFB et le PFC au moment de la formulation par triple émulsification. Ces nanocapsules de mPEG-PCL-HFB de 130-150 nm de diamètre se transforment plus efficacement en microbulles gazeuses que leurs analogues non fluorées sous l'effet de l'hyperthermie modérée induite par l'application d'ultrasons (Li et al., 2014). Néanmoins, le contraste ultrasonore *in vitro* ne dure pas plus de 30 secondes.

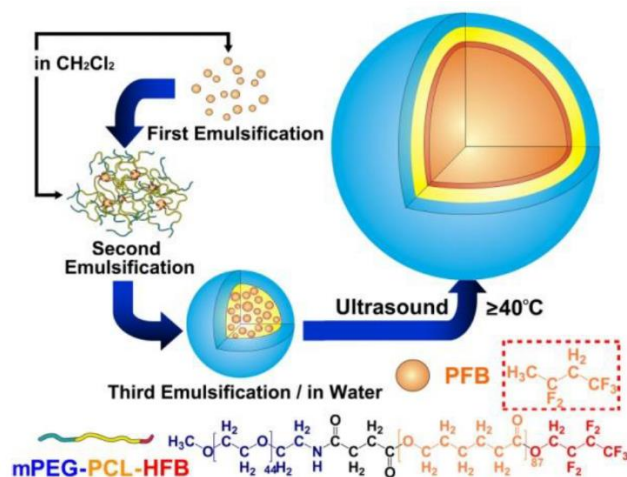


Figure 32: Structure du polymère mPEG-PCL-HFB et représentation du procédé de fabrication des nanocapsules de PFC par triple émulsification (Li et al., 2014)

Trois autres études ont décrit l'utilisation de polymères contenant des terminaisons fluorées pour accroître l'encapsulation de PFCs, mais avec une architecture branchée de chaînes fluoroalkylées pendantes. Comme évoqué dans la partie 1.3.5. de ce chapitre, Shiraishi et al. ont synthétisé des copolymères diblocs de poly(éthylène glycol)-*b*-poly(aspartate de 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl) contenant des chaînons fluorés C₄F₉ pendants pour encapsuler efficacement du PFP (Shiraishi et al., 2011). Plus récemment, Koda et al. ont développé des polymères en étoile à base de méthacrylate de méthyle et de méthacrylates fluoroalkylés de longueur de chaîne croissante (C₄F₉ à C₈F₁₇) pour encapsuler différentes molécules perfluorées modèles (Y Koda et al., 2015). Enfin, des copolymères triblocs issus de trois monomères différents (un monomère contenant un motif oligoéthylène glycol, un monomère réticulable contenant de l'acide méthacrylique, et un monomère contenant une chaîne fluorée C₈F₁₇) ont été utilisés pour formuler des nanoémulsions de PFH, PFP et PFB (Figure 33) (Huang et al., 2016). La réticulation du second bloc permet d'éviter la fuite du PFC et d'accroître considérablement la stabilité du nanosystème et d'éviter une vaporisation du PFC prématurée et non-spécifique. Dans le cas du PFH (point d'ébullition 56 °C), la stabilité est telle qu'aucun contraste n'est visible et aucune vaporisation n'a lieu sous l'application d'ultrasons à 37°C. Avec le PFP (point d'ébullition 29 °C), les nanoémulsions réticulées sont stables à température ambiante, et la vaporisation à 37°C intervient à partir d'un MI élevé (0,95). Avec le PFB (point d'ébullition -1,7 °C), la vaporisation des nanoémulsions réticulées intervient à des faibles pressions acoustiques (MI = 0,23), mais à température ambiante. L'augmentation de la masse molaire du polymère (des deuxièmes et troisièmes blocs uniquement) entraîne une réticulation plus importante et augmente la stabilité des nanoémulsions, qui sont alors vaporisées à des pressions acoustiques et températures satisfaisantes (MI= 0,23 à 37°C). Cette étude porte avant tout sur l'influence de la réticulation dans la stabilisation du système et non

pas sur l'influence du bloc fluoré. Même en présence du bloc fluoré, les nanoémulsions de PFP et de PFB non réticulées sont fortement instables.

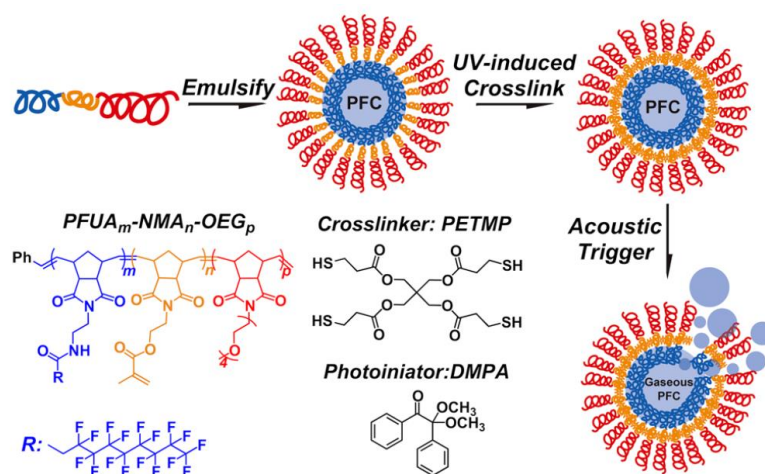


Figure 33: Structure des polymères triblocs contenant des chaînes fluorées pendantes, formant des nanoémulsions de PFCs stabilisées par la réticulation du second bloc (Huang et al., 2016)

3. Notre approche

L'objectif de ce travail est d'augmenter l'échogénicité de nanocapsules polymères tout en conservant leurs propriétés furtives avec des chaînes de PEG. Pour cela, notre stratégie repose sur la fonctionnalisation du polymère avec des chaînons fluorés pour favoriser l'ancrage du polymère autour de la goutte de PFOB, grâce à des interactions favorables entre ces chaînons fluorés et le PFOB (Figure 34). Notre hypothèse est que la formulation des capsules avec une faible quantité de polymère fluoré permettrait de réduire l'épaisseur de la coque et ainsi améliorer la réponse acoustique des capsules.

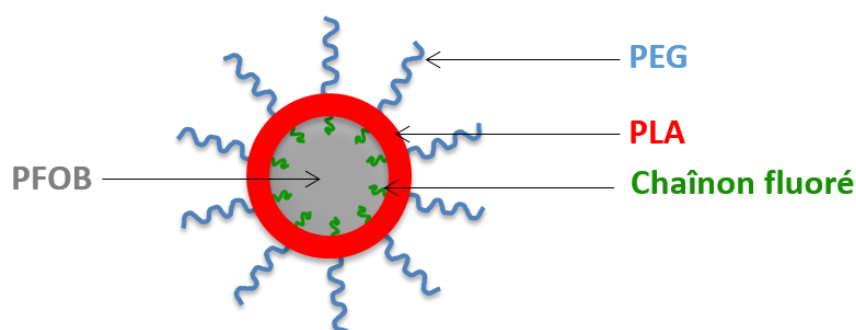


Figure 34: Représentation simplifiée de notre stratégie pour former des capsules à coques fines (grâce au chaînon fluoré) et furtives (grâce au PEG)

Pour former de telles capsules, nous avons développé deux stratégies différentes, illustrées en Figure 35.

Comme évoqué dans la partie 2.3 de ce chapitre, la modification d'un polymère avec une terminaison perfluorée linéaire courte peut avoir des effets majeurs sur ses propriétés de surface et son comportement associatif en solution. Notre première stratégie se voulait simple et a porté sur la synthèse de PLAs terminés par des chaînons fluorés linéaires courts (C_3F_7 à $C_{13}F_{27}$), dont la synthèse peut se faire simplement par ROP du lactide amorcée par des alcools fluorés. Ceci permet, grâce à la grande variété d'alcools fluorés commerciaux disponible, d'étudier facilement l'influence de la longueur de chaîne perfluorée sur les propriétés des capsules. Afin de conserver facilement les propriétés furtives des capsules, la formulation peut se faire en mélangeant un PLA fluoré avec du PLA-PEG (Figure 35).

La deuxième stratégie consiste à synthétiser directement un polymère tribloc composé des trois parties PEG, PLA et fluorée sur la même chaîne. Pour cela nous avons choisi de combiner la ROP du lactide à l'ATRP d'un méthacrylate possédant une chaîne C_8F_{17} (méthacrylate de 1H,1H-2H,2H-heptadécafluorodécyl) (Figure 35). Ceci nous permet de moduler aisément la taille du bloc fluoré en faisant varier le degré de polymérisation.

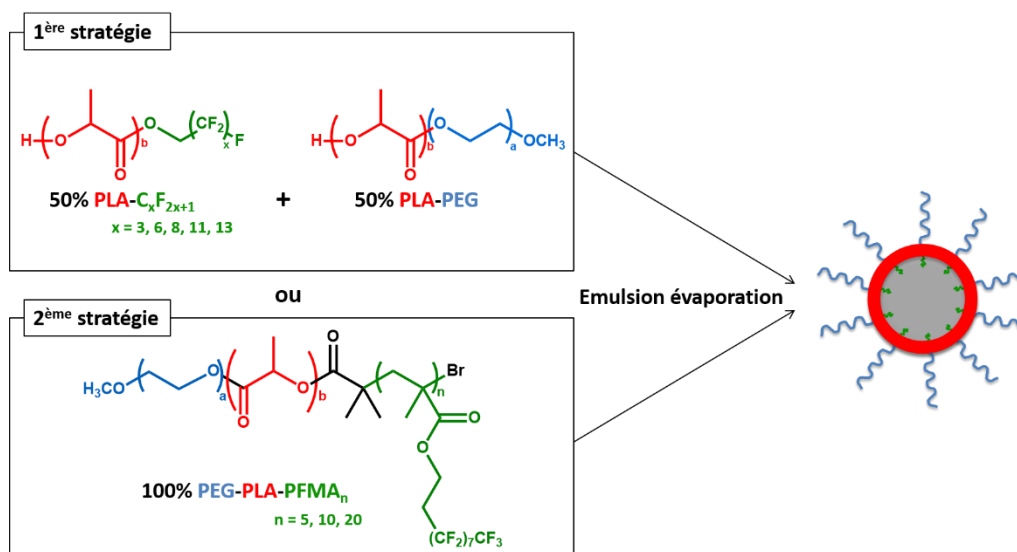


Figure 35: Représentation des deux stratégies utilisées pour stabiliser les capsules avec des chaînons fluorés

Références

- Amado, E., Kressler, J., 2011. Triphilic block copolymers with perfluorocarbon moieties in aqueous systems and their biochemical perspectives. *Soft Matter* 7, 7144.
- Ameduri, B., Boutevin, B., Guida-Pietrasanta, F., Rousseau, A., 2001. Fluorinated oligomers, telomers and (co)polymers: Synthesis and applications. *J. Fluor. Chem.* 107, 397–409.
- Ando, Y., Tabata, H., Sanchez, M., Cagna, A., Koyama, D., Krafft, M.P., 2016. Microbubbles with a Self-Assembled Poloxamer Shell and a Fluorocarbon Inner Gas. *Langmuir* 32, 12461–12467.
- Astafyeva, K., Somaglino, L., Desgranges, S., Berti, R., Patinote, C., Langevin, D., Lazeyras, F., Salomir, R., Polidori, A., Contino-Pépin, C., Urbach, W., Taulier, N., 2015. Perfluorocarbon nanodroplets stabilized by fluorinated surfactants: characterization and potentiality as theranostic agents. *J. Mater. Chem. B* 3, 2892–2907.
- Aubé, C., Lebigot, J., 2003. Echographie de contraste. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, B63–B70.
- Barnhart, J., Levene, H., Villapando, E., Maniquis, J., Fernandez, J., Rice, S., Jablonski, E., Gjoen, T., Tolleshaug, H., 1990. Characteristics of Albunex: air-filled albumin microspheres for echocardiography contrast enhancement. *Invest. Radiol.* 25, S162–S164.
- Bauer, a, Blomley, M., Leen, E., Cosgrove, D., Schlieff, R., 1999. Liver-specific imaging with SHU 563A: diagnostic potential of a new class of ultrasound contrast media. *Eur. Radiol.* 9 Suppl 3, S349–S352.
- Berlepsch, H. v., Böttcher, C., Skrabania, K., Laschewsky, A., 2009. Complex domain architecture of multicompartment micelles from a linear ABC triblock copolymer revealed by cryogenic electron tomography. *Chem. Commun.* 2290.
- Blomley, M.J.K., Albrecht, T., Cosgrove, D.O., Eckersley, R.J., Butler-Barnes, J., Jayaram, V., Patel, N., Heckemann, R.A., Bauer, A., Schlieff, R., 1999. Stimulated acoustic emission to image a late liver and spleen-specific phase of Levovist in normal volunteers and patients with and without liver disease. *Ultrasound Med. Biol.* 25, 1341–1352.
- Böhmer, M.R., Schroeders, R., Steenbakkens, J.A.M., de Winter, S.H.P.M., Duineveld, P.A., Lub, J., Nijssen, W.P.M., Pikkemaat, J.A., Stapert, H.R., 2006. Preparation of monodisperse polymer particles and capsules by ink-jet printing. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 289, 96–104.
- Bondi, A., 1964. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* 68, 441–451.
- Buzhor, M., Avram, L., Frish, L., Cohen, Y., Amir, R.J., 2016. Fluorinated smart micelles as enzyme-responsive probes for 19 F-magnetic resonance. *J. Mater. Chem. B* 4, 3037–3042.
- Cai, W. Bin, Yang, H.L., Zhang, J., Yin, J.K., Yang, Y.L., Yuan, L.J., Zhang, L., Duan, Y.Y., 2015. The Optimized Fabrication of Nanobubbles as Ultrasound Contrast Agents for Tumor Imaging. *Sci. Rep.* 5, 13725.
- Calliada, F., Campani, R., Bottinelli, O., Bozzini, A., Sommaruga, M.G., 1998. Ultrasound contrast agents: Basic principles, in: *European Journal of Radiology*.
- Calvet, D., Collet, A., Viguier, M., Berret, J.-F., Séréro, Y., 2003. Perfluoroalkyl End-Capped Poly(ethylene oxide). Synthesis, Characterization, and Rheological Behavior in Aqueous Solution. *Macromolecules* 36, 449–457.
- Carroll, B.A., Turner, R.J., Tickner, E.G., Boyle, D.B., Young, S.W., 1980. Gelatin Encapsulated Nitrogen Microbubbles as Ultrasonic Contrast Agents. *Invest. Radiol.* 15, 260–266.
- Cathebras, N., Collet, A., Viguier, M., Berret, J.-F., 1998. Synthesis and Linear Viscoelasticity of Fluorinated Hydrophobically Modified Ethoxylated Urethanes (F-HEUR). *Macromolecules* 31, 1305–1311.
- Cavaliere, F., El Hamassi, A., Chiessi, E., Paradossi, G., 2005. Stable polymeric microballoons as multifunctional device for biomedical uses: Synthesis and characterization. *Langmuir* 21, 8758–8764.
- Chan, V., Perlas, A., 2011. Basics of ultrasound imaging, in: *Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management*. pp. 13–19.
- Chen, A., Blakey, I., Jack, K.S., Whittaker, A.K., Peng, H., 2015. Control through monomer placement of surface properties and morphology of fluoromethacrylate copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 53, 2633–2641.
- Chiantore, O., Lazzari, M., Aglietto, M., Castelvetro, V., Ciardelli, F., 2000. Photochemical stability of partially fluorinated acrylic protective coatings. I. Poly(2,2,2-trifluoroethyl methacrylate) and poly(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl methacrylate-co-ethylhexyl methacrylate)s. *Polym. Degrad. Stab.* 67, 461–467.
- Chlon, C., Guedon, C., Verhaagen, B., Shi, W.T., Hall, C.S., Lub, J., Bohmer, M.R., 2009. Effect of Molecular Weight, Crystallinity, and Hydrophobicity on the Acoustic Activation of Polymer-Shelled Ultrasound Contrast Agents. *Biomacromolecules* 10, 1025–1031.
- Clark, L.C., Gollan, F., 1966. Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. *Science (80-)*. 152, 1755–1756.
- Cochran, M.C., Eisenbrey, J., Ouma, R.O., Soulen, M., Wheatley, M.A., 2011. Doxorubicin and paclitaxel

- loaded microbubbles for ultrasound triggered drug delivery. *Int. J. Pharm.* 414, 161–170.
- Cook, E.W., Pierce, J.S., 1973. Toxicology of Fluoro-olefins. *Nature* 242, 117–118.
- Correas, J.M., Bridal, L., Lesavre, A., Mejean, A., Claudon, M., Helenon, O., 2001. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur. Radiol.* 11, 1316–1328.
- Couture, O., Bevan, P.D., Cherin, E., Cheung, K., Burns, P.N., Foster, F.S., 2006. Investigating perfluorohexane particles with high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 73–82.
- De Jong, N., Frinking, P.J.A., Bouakaz, A., Ten Cate, F.J., 2000. Detection procedures of ultrasound contrast agents. *Ultrasonics* 38, 87–92.
- De Jong, N., Ten Cate, F.J., Lancée, C.T., Roelandt, J.R.T.C., Bom, N., 1991. Principles and recent developments in ultrasound contrast agents. *Ultrasonics* 29, 324–330.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E., 2012. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19F MRI. *Biomaterials* 33, 5593–5602.
- Dong, X., He, L., Wang, N., Liang, J.-Y., Niu, M.-J., Zhao, X., 2012. Diblock fluoroacrylate copolymers from two initiators: synthesis, self-assembly and surface properties. *J. Mater. Chem.* 22, 23078.
- Du Toit, L.C., Govender, T., Pillay, V., Choonara, Y.E., Kodama, T., 2011. Investigating the effect of polymeric approaches on circulation time and physical properties of nanobubbles. *Pharm. Res.* 28, 494–504.
- Duchowicz, P.R., Fernández, F.M., Castro, E.A., 2004. Alternative statistical and theoretical analysis of fluorophilicity. *J. Fluor. Chem.* 125, 43–48.
- Eisenbrey, J.R., Burstein, O.M., Kambhampati, R., Forsberg, F., Liu, J.B., Wheatley, M.A., 2010. Development and optimization of a doxorubicin loaded poly(lactic acid) contrast agent for ultrasound directed drug delivery. *J. Control. Release* 143, 38–44.
- El-Sherif, D.M., Wheatley, M.A., 2003. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66, 347–55.
- Feigenbaum, H., Stone, J.M., Lee, D.A., Nasser, W.K., Chang, S., 1970. Identification of Ultrasound Echoes from the Left Ventricle by Use of Intracardiac Injections of Indocyanine Green. *Circulation* 41, 615–621.
- Feinstein, S.B., Cheirif, J., Ten Cate, F.J., Silverman, P.R., Heidenreich, P. a, Dick, C., Desir, R.M., Armstrong, W.F., Quinones, M. a, Shah, P.M., 1990. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J. Am. Coll. Cardiol.* 16, 316–324.
- Fernandes, D.A., Fernandes, D.D., Li, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Rousseau, D., Gradinaru, C.C., Kolios, M.C., 2016. Synthesis of Stable Multifunctional Perfluorocarbon Nanoemulsions for Cancer Therapy and Imaging. *Langmuir* 32, 10870–10880.
- Fokong, S., Siepmann, M., Liu, Z., Schmitz, G., Kiessling, F., Gätjens, J., 2011. Advanced Characterization and Refinement of Poly N-Butyl Cyanoacrylate Microbubbles for Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med. Biol.* 37, 1622–1634.
- Forsberg, F., Goldberg, B.B., Liu, J.B., Merton, D.A., Rawool, N.M., Shi, W.T., 1999. Tissue-specific US contrast agent for evaluation of hepatic and splenic parenchyma. *Radiology* 210, 125–132.
- Forsberg, F., Lathia, J.D., Merton, D.A., Liu, J. Bin, Le, N.T., Goldberg, B.B., Wheatley, M.A., 2004. Effect of shell type on the in vivo backscatter from polymer-encapsulated microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 30, 1281–1287.
- Forsberg, F., Liu, J.B., Merton, D.A., Rawool, N.M., Goldberg, B.B., 1995. Parenchymal enhancement and tumor visualization using a new sonographic contrast agent. *J. Ultrasound Med.* 14, 949–57.
- Forsberg, F., Roy, R., Merton, D.A., Rawool, N.M., Liu, J. Bin, Huang, M., Kessler, D., Goldberg, B.B., 1998. Conventional and hypobaric activation of an ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* 24, 1143–1150.
- Frediani, M., Rosi, L., Camaiti, M., Berti, D., Mariotti, A., Comucci, A., Vannucci, C., Malesci, I., 2010. Polylactide/perfluoropolyether block copolymers: Potential candidates for protective and surface modifiers. *Macromol. Chem. Phys.* 211, 988–995.
- Gao, Z., Kennedy, A.M., Christensen, D.A., Rapoport, N.Y., 2008. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics* 48, 260–270.
- Gilding, D.K., Reed, A.M., 1979. Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Polyglycolic-Poly(Actic Acid) Homopolymers and Copolymers .1. *Polymer (Guildf)*. 20, 1459–1464.
- Giuntoli, G., Rosi, L., Frediani, M., Sacchi, B., Frediani, P., 2012. Fluoro-functionalized PLA polymers as potential water-repellent coating materials for protection of stone. *J. Appl. Polym. Sci.* 125, 3125–

- 3133.
- Gladysz, J.A., Curran, D.P., 2002. Fluorous chemistry: From biphasic catalysis to a parallel chemical universe and beyond. *Tetrahedron* 58, 3823–3825.
- Gong, B., Chien, J.C.W., 1989. Copolymer of Trifluoroethylmethacrylate-N-p-methoxyphenyl Citraconimide as High Tg E-Beam Resist. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 27, 1149–1160.
- Gramiak, R., Shah, P., 1968. Echocardiography of the aortic root. *Invest. Radiol.* 3, 356–366.
- Grishenkov, D., Pecorari, C., Brismar, T.B., Paradossi, G., 2009a. Characterization of Acoustic Properties of PVA-Shelled Ultrasound Contrast Agents: Linear Properties (Part I). *Ultrasound Med. Biol.* 35, 1127–1138.
- Grishenkov, D., Pecorari, C., Brismar, T.B., Paradossi, G., 2009b. Characterization of Acoustic Properties of PVA-Shelled Ultrasound Contrast Agents: Ultrasound-Induced Fracture (Part II). *Ultrasound Med. Biol.* 35, 1139–1147.
- Hansen, N.M.L., Jankova, K., Hvilsted, S., 2007. Fluoropolymer materials and architectures prepared by controlled radical polymerizations. *Eur. Polym. J.* 43, 255–293.
- Harris, J.R., Depoix, F., Urich, K., 1995. The structure of gas-filled n-butyl-2-cyanoacrylate (BCA) polymer particles. *Micron* 26, 103–111.
- He, G., Hu, J., Liu, G., Li, Y., Zhang, G., Liu, F., Sun, J., Zou, H., Tu, Y., Xiao, D., 2013. Superhydrophobic hierarchically assembled films of diblock copolymer hollow nanospheres and nanotubes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 2378–2386.
- Horvath, I.T., Rabai, J., 1994. Facile Catalyst Separation Without Water: Fluorous Biphasic Hydroformylation of Olefins. *Science* (80-.). 266, 72–75.
- Hu, Y., Wang, Y., Jiang, J., Han, B., Zhang, S., Li, K., Ge, S., Liu, Y., 2016. Preparation and Characterization of Novel Perfluorooctyl Bromide Nanoparticle as Ultrasound Contrast Agent via Layer-by-Layer Self-Assembly for Folate-Receptor-Mediated Tumor Imaging. *Biomed Res. Int.* 2016.
- Huang, Y., Vezeridis, A.M., Wang, J., Wang, Z., Thompson, M., Mattrey, R.F., Gianneschi, N.C., 2016. Polymer-Stabilized Perfluorobutane Nanodroplets for Ultrasound Imaging Agents. *J. Am. Chem. Soc.* jacs.6b08800.
- Huque, F.T.T., Jones, K., Saunders, R.A., Platts, J.A., 2002. Statistical and theoretical studies of fluorophilicity. *J. Fluor. Chem.* 115.
- Hussain, H., Busse, K., Kressler, J., 2003. Poly(ethylene oxide)- and poly(perfluorohexylethyl methacrylate)-containing amphiphilic block copolymers: Association properties in aqueous solution. *Macromol. Chem. Phys.* 204, 936–946.
- Hwang, F.S., Hogen-Esch, T.E., 1995. Effect of Water-Soluble Spacers on the Hydrophobic Association of Fluorocarbon-Modified Poly(acrylamide). *Macromolecules* 28, 3328–3335.
- Jang, S.S., Blanco, M., Goddard, W.A., Caldwell, G., Ross, R.B., 2003. The Source of Helicity in Perfluorinated N-Alkanes. *Macromolecules* 36, 5331–5341.
- Jiang, B., Zhang, L., Shi, J., Zhou, S., Liao, B., Liu, H., Zhen, J., Pang, H., 2013. Synthesis, characterization and bulk properties of well-defined poly(hexafluorobutyl methacrylate)-block-poly(glycidyl methacrylate) via consecutive ATRP. *J. Fluor. Chem.* 153, 74–81.
- Jiang, Q., Hao, S., Xiao, X., Yao, J., Ou, B., Zhao, Z., Liu, F., Pan, X., Luo, B., Zhi, H., 2016. Production and characterization of a novel long-acting Herceptin-targeted nanobubble contrast agent specific for Her-2-positive breast cancers. *Breast Cancer* 23, 445–455.
- Kang, E., Min, H.S., Lee, J., Han, M.H., Ahn, H.J., Yoon, I.C., Choi, K., Kim, K., Park, K., Kwon, I.C., 2010. Nanobubbles from gas-generating polymeric nanoparticles: Ultrasound imaging of living subjects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49, 524–528.
- Kim, M., Lee, J.H., Kim, S.E., Kang, S.S., Tae, G., 2016. Nanosized Ultrasound Enhanced-Contrast Agent for in Vivo Tumor Imaging via Intravenous Injection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 8409–8418.
- Koda, Y., Terashima, T., Sawamoto, M., 2015. Fluorinated microgel star polymers as fluororous nanocapsules for the encapsulation and release of perfluorinated compounds. *Polym. Chem.* 6, 5663–5674.
- Koda, Y., Terashima, T., Sawamoto, M., Maynard, H.D., 2015. Amphiphilic/fluorous random copolymers as a new class of non-cytotoxic polymeric materials for protein conjugation. *Polym. Chem.* 6, 240–247.
- Kooiman, K., Bohmer, M.R., Emmer, M., Vos, H.J., Chlon, C., Shi, W.T., Hall, C.S., de Winter, S.H.P.M., Schroen, K., Versluis, M., de Jong, N., van Wamel, A., 2009. Oil-filled polymer microcapsules for ultrasound-mediated delivery of lipophilic drugs. *J. Control. Release* 133, 109–118.
- Krafft, M.P., 2012. Controlling phospholipid self-assembly and film properties using highly fluorinated components - Fluorinated monolayers, vesicles, emulsions and microbubbles. *Biochimie* 94, 11–25.
- Krafft, M.P., 2001. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 209–228.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2009. Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon-

- Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds-Unique "Apolar" Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering. *Chem. Rev.* 109, 1714–1792.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2007. Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses. *J. Polym. Sci. Part a-Polymer Chem.* 45, 1185–1198.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 1998. Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie* 80, 489–514.
- Kremkau, W., Gramiak, R., Carstensen, E.L., Shah, P.M., Kramer, D.H., 1970. Ultrasonic Detection of Cavitation at Catheter Tips. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 110, 177–183.
- Krupka, T.M., Solorio, L., Wilson, R.E., Wu, H., Azar, N., Exner, A.A., 2010. Formulation and characterization of echogenic lipid-pluronic nanobubbles. *Mol. Pharm.* 7, 49–59.
- Kubowicz, S., Baussard, J.F., Lutz, J.F., Thünemann, A.F., Von Berlepsch, H., Laschewsky, A., 2005a. Multicompartment micelles formed by self-assembly of linear ABC triblock copolymers in aqueous medium. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 5262–5265.
- Kubowicz, S., Thünemann, A.F., Weberskirch, R., Möhwald, H., 2005b. Cylindrical Micelles of α -Fluorocarbon- ω -hydrocarbon End-Capped Poly(N-acyl ethylene Imine)s. *Langmuir* 21, 7214–7219.
- Kyeremateng, S.O., Henze, T., Busse, K., Kressler, J., 2010. Effect of hydrophilic block-A length tuning on the aggregation behavior of α,ω -perfluoroalkyl end-capped ABA triblock copolymers in water. *Macromolecules* 43, 2502–2511.
- Lanza, G.M., Wallace, K.D., Scott, M.J., Cacheris, W.P., Abendschein, D.R., Christy, D.H., Sharkey, A.M., Miller, J.G., Gaffney, P.J., Wickline, S.A., 1996. A Novel Site- Targeted Ultrasonic Contrast Agent With Broad Biomedical Application. *Circulation* 94, 3334–3340.
- Lee, J.Y., Carugo, D., Crake, C., Owen, J., De Saint Victor, M., Seth, A., Coussios, C., Stride, E., 2015. Nanoparticle-Loaded Protein-Polymer Nanodroplets for Improved Stability and Conversion Efficiency in Ultrasound Imaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.* 27, 5484–5492.
- Lee, W.K., Losito, I., Gardella, J.A., Hicks, W.L., 2001. Synthesis and surface properties of fluorocarbon end-capped biodegradable polyesters. *Macromolecules* 34, 3000–3006.
- Lensen, D., Gelderblom, E.C., Vriezema, D.M., Marmottant, P., Verdonschot, N., Versluis, M., de Jong, N., van Hest, J.C.M., 2011. Biodegradable polymeric microcapsules for selective ultrasound-triggered drug release. *Soft Matter* 7, 5417–5422.
- Leroy, V., Norisuye, T., 2016. Investigating the Existence of Bulk Nanobubbles with Ultrasound. *Chemphyschem* 17, 2787–2790.
- Li, H., Gu, W.Y., Li, L., Zhang, Y.M., Russell, T.P., Coughlin, E.B., 2013. Synthesis of Semicrystalline/Fluorinated Side-Chain Crystalline Block Copolymers and Their Bulk and Thin Film Nanoordering. *Macromolecules* 46, 3737–3745.
- Li, H., Wang, J., Wang, P., Zheng, J., Song, F., Yin, T., Zhou, G., Zheng, R., Zhang, C., 2014. Phase-transition contrast nanocapsules triggered by low-intensity ultrasound. *Chem. Commun.* 50, 15163–15166.
- Li, K., Liu, Y., Zhang, S., Xu, Y., Jiang, J., Yin, F., Hu, Y., Han, B., Ge, S., Zhang, L., Wang, Y., 2017. Folate receptor-targeted ultrasonic PFOB nanoparticles: Synthesis, characterization and application in tumor-targeted imaging. *Int. J. Mol. Med.* 39, 1505–1515.
- Li, K., Wu, P., Han, Z., 2002. Preparation and surface properties of fluorine-containing diblock copolymers. *Polymer (Guildf.)* 43, 4079–4086.
- Li, Z., Kesselman, E., Talmon, Y., Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2004. Multicompartment Micelles from ABC Miktoarm Stars in Water. *Science (80-.)*. 306, 98–101.
- Lim, K.T., Lee, M.Y., Moon, M.J., Lee, G.D., Hong, S., Dickson, J.L., Johnston, K.P., 2002. Synthesis and properties of semifluorinated block copolymers containing poly(ethylene oxide) and poly(fluorooctyl methacrylates) via atom transfer radical polymerisation. *Polymer (Guildf.)* 43, 7043–7049.
- Lodge, T.P., Rasdal, A., Li, Z., Hillmyer, M.A., 2005. Simultaneous, segregated storage of two agents in a multicompartment micelle. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17608–17609.
- Lopez, G., Guerre, M., Schmidt, J., Talmon, Y., Admiral, V., Habas, J.-P., Améduri, B., 2016. An amphiphilic PEG-b-PFPE-b-PEG triblock copolymer: synthesis by CuAAC click chemistry and self-assembly in water. *Polym. Chem.* 7, 402–409.
- Ma, J., Shen, M., Xu, C.S., Sun, Y., Duan, Y.R., Du, F., 2016. Biodegradable double-targeted PTX-mPEG-PLGA nanoparticles for ultrasound contrast enhanced imaging and antitumor therapy in vitro. *Oncotarget.*
- Ma, J., Xing, L.X., Shen, M., Li, F., Zhu, M.J., Jin, L.F., Li, Z., Gao, F., Su, Y., Duan, Y.R., Du, L.F., 2015. Ultrasound contrast-enhanced imaging and in vitro antitumor effect of paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid)-monomethoxypoly(ethylene glycol) nanocapsules with ultrasound-targeted microbubble destruction. *Mol. Med. Rep.* 11, 2413–2420.
- Marsat, J.N., Heydenreich, M., Kleinpeter, E., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., Laschewsky, A., 2011. Self-

- assembly into multicompartment micelles and selective solubilization by hydrophilic-lipophilic-fluorophilic block copolymers. *Macromolecules* 44, 2092–2105.
- Martinelli, E., Fantoni, C., Gallot, B., Glisenti, A., Galli, G., 2010. Polystyrene-polyperfluorooctylethyl acrylate diblock copolymers: The effect of dilution of the fluorinated mesogenic chains on bulk and surface properties. *Macromol. Symp.* 296, 294–302.
- Mattrey, R.F., Long, D.M., Multer, F., Mitten, R., Higgins, C.B., 1982. Perfluorooctyl bromide: A Reticuloendothelial-Specific and Tumor-Imaging Agent for Computed Tomography. *Radiology* 145, 755–758.
- Mclain, S.J., Sauer, B.B., Firment, L.E., 1996. Surface Properties and Metathesis Synthesis of Block Copolymers Including Perfluoroalkyl-Ended Polyethylenes. *Macromolecules* 29, 8211–8219.
- Mehdizadeh, M., Yang, J., 2013. Design Strategies and Applications of Tissue Bioadhesives. *Macromol. Biosci.* 13, 271–288.
- Millard, R., Baig, H., Vatner, S.F., 1977. Cardiovascular effects of radioactive suspensions and Tween 80 solutions microsphere. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1, H331–H334.
- Min, K.H., Min, H.S., Lee, H.J., Park, D.J., Yhee, J.Y., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Silvestre, O.F., Chen, X., Hwang, Y.S., Kim, E.C., Lee, S.C., 2015. PH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: A theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers. *ACS Nano* 9, 134–145.
- Monde, K., Miura, N., Hashimoto, M., Taniauchi, T., Inabe, T., 2006. Conformational analysis of chiral helical perfluoroalkyl chains by VCD. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6000–6001.
- Moughton, A.O., Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2012. Multicompartment block polymer micelles. *Macromolecules* 45, 2–19.
- Narayan, P., Marchant, D., Wheatley, M.A., 2001. Optimization of spray drying by factorial design for production of hollow microspheres for ultrasound imaging. *J. Biomed. Mater. Res.* 56, 333–41.
- Narayan, P., Wheatley, M.A., 1999. Preparation and characterization of hollow microcapsules for use as ultrasound contrast agents. *Polym. Eng. Sci.* 39, 2242–2255.
- Negishi, Y., Hamano, N., Tsunoda, Y., Oda, Y., Choijams, B., Endo-Takahashi, Y., Omata, D., Suzuki, R., Maruyama, K., Nomizu, M., Emoto, M., Aramaki, Y., 2013. AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature. *Biomaterials* 34, 501–507.
- Néstor, M.M., Kei, N.P.E., Guadalupe, N.A.M., Elisa, M.E.S., Adriana, G.Q., David, Q.G., 2011. Preparation and in vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging. *Ultrasonics* 51, 839–845.
- Nishihara, M., Imai, K., Yokoyama, M., 2009. Preparation of perfluorocarbon/fluoroalkyl polymer nanodroplets for cancer-targeted ultrasound contrast agents. *Chem. Lett.* 38, 556–557.
- Oda, Y., Suzuki, R., Mori, T., Takahashi, H., Natsugari, H., Omata, D., Unga, J., Uruga, H., Sugii, M., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F., Hashida, M., Maruyama, K., 2015. Development of fluorous lipid-based nanobubbles for efficiently containing perfluoropropane. *Int. J. Pharm.* 487, 64–71.
- Oeffinger, B.E., Wheatley, M.A., 2004. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* 42, 343–347.
- Olbrich, C., Hauff, P., Scholle, F., Schmidt, W., Bakowsky, U., Briel, A., Schirner, M., 2006. The in vitro stability of air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles. *Biomaterials* 27, 3549–3559.
- Ota, T., Ono, S., 2004. Intrapancreatic accessory spleen: Diagnosis using contrast enhanced ultrasound. *Br. J. Radiol.* 77, 148–149.
- Paefgen, V., Doleschel, D., Kiessling, F., 2015. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* 6.
- Peng, H., Thurecht, K.J., Blakey, I., Taran, E., Whittaker, A.K., 2012. Effect of Solvent Quality on the Solution Properties of Assemblies of Partially Fluorinated Amphiphilic Diblock Copolymers. *Macromolecules* 45, 8681–8690.
- Perera, R.H., Wu, H., Peiris, P., Hernandez, C., Burke, A., Zhang, H., Exner, A.A., 2017. Improving performance of nanoscale ultrasound contrast agents using N,N-diethylacrylamide stabilization. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13, 59–67.
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V., Tsapis, N., 2008a. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 326, 66–71.
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E., Tsapis, N., 2009. Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG. *Soft Matter* 5, 3054–3060.
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B.T., Beloeil, J.C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S.L., Fattal, E., 2008b. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging.

- Adv. Funct. Mater. 18, 2963–2971.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.
- Postema, M., Gilja, O.H., 2011. Contrast-enhanced and targeted ultrasound. *World J. Gastroenterol.* 17, 28–41.
- Probst, A., Raab, K., Ulm, K., von Werner, K., 1987. Synthesis and chemistry of perfluoro-2-iodo-2-methylalkanes. *J. Fluor. Chem.* 37, 223–245.
- Rapoport, N., Gao, Z., Kennedy, A., 2007. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1095–1106.
- Rapoport, N., Kennedy, A.M., Shea, J.E., Scaife, C.L., Nam, K.H., 2010. Ultrasonic nanotherapy of pancreatic cancer: Lessons from ultrasound imaging. *Mol. Pharm.* 7, 22–31.
- Rapoport, N., Nam, K.H., Gupta, R., Gao, Z., Mohan, P., Payne, A., Todd, N., Liu, X., Kim, T., Shea, J., Scaife, C., Parker, D.L., Jeong, E.K., Kennedy, A.M., 2011. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. *J. Control. Release* 153, 4–15.
- Rapoport, N.Y., Kennedy, A.M., Shea, J.E., Scaife, C.L., Nam, K.H., 2009. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles. *J. Control. Release* 138, 268–276.
- Riess, J.G., 2009. Highly fluorinated amphiphilic molecules and self-assemblies with biomedical potential. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 294–304.
- Riess, J.G., 2002. Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective. *Tetrahedron* 58, 4113–4131.
- Riess, J.G., 2001. Oxygen carriers (“blood substitutes”) - Raison d’être, chemistry, and some physiology. *Chem. Rev.* 101, 2797–2919.
- Riess, J.G., 1984. Reassessment of Criteria for the Selection of Perfluorochemicals for Second-Generation Blood Substitutes: Analysis of Structure/Property Relationships. *Artif. Organs* 8, 44–56.
- Sanna, V., Pintus, G., Bandiera, P., Anedda, R., Punzoni, S., Sanna, B., Migaleddu, V., Uzzau, S., Sechi, M., 2011. Development of Polymeric Microbubbles Targeted to Prostate-Specific Membrane Antigen as Prototype of Novel Ultrasound Contrast Agents. *Mol. Pharm.* 8, 748–757.
- Sato, T., Tsugaru, T., Yamauchi, J., Okaya, T., 1992. Surface properties of poly (vinyl alcohol) films with a fluoroalkyl group at one end. *Polymer (Guildf)*. 33, 5066–5072.
- Schlieff, R., Staks, T., Mahler, M., Rufer, M., Fritzsche, T., Seifert, W., 1990. Successful opacification of the left heart chambers on echocardiographic examination after intravenous injection of a new saccharide based contrast agent. *Echocardiography* 7, 61–64.
- Schlosser, M., Michel, D., 1996. About the “physiological size” of fluorine substituents: Comparison of sensorially active compounds with fluorine and methyl substituted analogues. *Tetrahedron* 52, 99–108.
- Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M., Riess, J.G., 2003. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew. Chemie-International Ed.* 42, 3218–3235.
- Schwarz, R., Seelig, J., Künnecke, B., 2004. Structural properties of perfluorinated linear alkanes: A ¹⁹F and ¹³C NMR study of perfluorononane. *Magn. Reson. Chem.* 42, 512–517.
- Schwieger, C., Achilles, A., Scholz, S., Rüger, J., Bacia, K., Saalwaechter, K., Kressler, J., Blume, A., 2014. Binding of amphiphilic and triphilic block copolymers to lipid model membranes: the role of perfluorinated moieties. *Soft Matter* 10, 6147–6160.
- Schwieger, C., Blaffert, J., Li, Z., Kressler, J., Blume, A., 2016. Perfluorinated Moieties Increase the Interaction of Amphiphilic Block Copolymers with Lipid Monolayers. *Langmuir* 32, 8102–8115.
- Sheeran, P.S., Luois, S., Dayton, P.A., Matsunaga, T.O., 2011. Formulation and acoustic studies of a new phase-shift agent for diagnostic and therapeutic ultrasound. *Langmuir* 27, 10412–10420.
- Sheeran, P.S., Luois, S.H., Mullin, L.B., Matsunaga, T.O., Dayton, P.A., 2012. Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons. *Biomaterials* 33, 3262–3269.
- Sheeran, P.S., Rojas, J.D., Puett, C., Hjelmquist, J., Arena, C.B., Dayton, P.A., 2015. Contrast-enhanced ultrasound imaging and in vivo circulatory kinetics with low-boiling-point nanoscale phase-change perfluorocarbon agents. *Ultrasound Med. Biol.* 41, 814–831.
- Shiraishi, K., Endoh, R., Furuhashi, H., Nishihara, M., Suzuki, R., Maruyama, K., Oda, Y., Jo, J.I., Tabata, Y., Yamamoto, J., Yokoyama, M., 2011. A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int. J. Pharm.* 421, 379–387.
- Shunmugam, R., Smith, C.E., Tew, G.N., 2007. ATRP Synthesis of ABC Lipophilic–Hydrophilic–Fluorophilic Triblock Copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 45, 2601–2608.

- Singh, A., Naskar, A.K., Haynes, D., Drews, M.J., Smith, D.W., 2011. Synthesis, characterization and surface properties of poly(lactic acid)-perfluoropolyether block copolymers. *Polym. Int.* 60, 507–516.
- Skrabania, K., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., Laschewsky, A., 2010. Synthesis of ternary, hydrophilic-lipophilic-fluorophilic block copolymers by consecutive RAFT polymerizations and their self-assembly into multicompartment micelles. *Macromolecules* 43, 271–281.
- Skrabania, K., Laschewsky, A., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., 2009. Synthesis and micellar self-assembly of ternary hydrophilic-lipophilic-fluorophilic block copolymers with a linear PEO chain. *Langmuir* 25, 7594–7601.
- Smart, B.E., 2001. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.* 109, 3–11.
- Smith, M.D., Kwan, O.L., Reiser, H.J., DeMaria, A.N., 1984. Superior intensity and reproducibility of SHU-454, a new right heart contrast agent. *J Am Coll Cardiol* 3, 992–998.
- Son, S., Min, H.S., You, D.G., Kim, B.S., Kwon, I.C., 2014. Echogenic nanoparticles for ultrasound technologies: Evolution from diagnostic imaging modality to multimodal theranostic agent. *Nano Today* 9, 525–540.
- Straub, J.A., Chickering, D.E., Church, C.C., Shah, B., Hanlon, T., Bernstein, H., 2005. Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography. *J. Control. Release* 108, 21–32.
- Sun, Y., Liu, W., 2011. Synthesis and characterization of a new fluorinated macroinitiator and its diblock copolymer by AGET ATRP. *J. Fluor. Chem.* 132, 9–14.
- Suzuki, R., Namai, E., Oda, Y., Nishiie, N., Otake, S., Koshima, R., Hirata, K., Taira, Y., Utoguchi, N., Negishi, Y., Nakagawa, S., Maruyama, K., 2010. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J. Control. Release* 142, 245–250.
- Suzuki, R., Takizawa, T., Negishi, Y., Utoguchi, N., Sawamura, K., Tanaka, K., Namai, E., Oda, Y., Matsumura, Y., Maruyama, K., 2008. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J. Control. Release* 125, 137–144.
- Teraphongphom, N., Chhour, P., Eisenbrey, J.R., Naha, P.C., Witschey, W.R.T., Opananont, B., Jablonowski, L., Cormode, D.P., Wheatley, M.A., 2015. Nanoparticle Loaded Polymeric Microbubbles as Contrast Agents for Multimodal Imaging. *Langmuir* 31, 11858–11867.
- Thomas, J.D., 2013. Myocardial contrast echocardiography perfusion imaging: Still waiting after all these years. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 1362–1364.
- Torchilin, V., 2011. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 131–135.
- Tsuda, Y., Yamanouchi, K., Yokoyama, K., Suyama, T., Watanabe, M., Ohyanagi, H., Saitoh, Y., 1988. Discussion and considerations for the excretion mechanism of perfluorochemical emulsion. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16, 473–483.
- Unger, E., Fritz, T., Shen, D., Lund, P., Sahn, D., Ramaswami, R., Matsunaga, T., Yellowhair, D., Kulik, B., 1994. Gas filled lipid bilayers as imaging contrast agents. *J. Liposome Res.* 4, 861–874.
- Unger, E.C., Wu, G., 1994. Gas filled liposomes and their use as ultrasonic contrast agents. US5305757 A.
- Villanueva, F.S., Gertz, E.W., Csikari, M., Pulido, G., Fisher, D., Sklenar, J., 2001. Detection of Coronary Artery Stenosis With Power Doppler Imaging. *Circulation* 103, 2624–2631.
- Vitale, A., Bongiovanni, R., Ameduri, B., 2015. Fluorinated oligomers and polymers in photopolymerization. *Chem. Rev.* 115, 8836–8866.
- Weberskirch, R., Preuschen, J., Spiess, H.W., Nuyken, O., 2000. Design and synthesis of a two compartment micellar system based on the self-association behavior of poly(N-acyl ethyleneimine) end-capped with a fluorocarbon and a hydrocarbon chain. *Macromol.Chem.Phys.* 201, 995–1007.
- Wei, K., Crouse, L., Weiss, J., Villanueva, F., Schiller, N.B., Naqvi, T.Z., Siegel, R., Monaghan, M., Goldman, J., Aggarwal, P., Feigenbaum, H., DeMaria, A., 2003. Comparison of usefulness of dipyridamole stress myocardial contrast echocardiography to technetium-99m sestamibi single-photon emission computed tomography for detection of coronary artery disease (PB127 Multicenter Phase 2 Trial results). *Am. J. Cardiol.* 91, 1293–1298.
- Wheatley, M.A., Schrope, B., Shen, P., 1990. Contrast agents for diagnostic ultrasound: development and evaluation of polymer-coated microbubbles. *Biomaterials* 11, 713–717.
- Wickline, S.A., Hughes, M., Ngo, F.C., Hall, C.S., Marsh, J.N., Brown, P.A., Allen, J.S., McLean, M.D., Scott, M.J., Fuhrhop, R.W., Lanza, G.M., 2002. Blood contrast enhancement with a novel, non-gaseous nanoparticle contrast agent. *Acad. Radiol.* 9, 290–293.
- Wilson, K., Homan, K., Emelianov, S., 2012. Biomedical photoacoustics beyond thermal expansion using triggered nanodroplet vaporization for contrast-enhanced imaging. *Nat. Commun.* 3, 618.
- Wu, M., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, M., Luo, Y., Tang, J., Wang, Z., Wang, D., Hao, L., Wang, Z., 2017. Paclitaxel-loaded and A10-3.2 aptamer-targeted poly(lactide-co-glycolic acid) nanobubbles for

- ultrasound imaging and therapy of prostate cancer. *Int. J. Nanomedicine* 12, 5313–5330.
- Wu, Y., Peng, H., Zhao, X., 2015. Diagnostic performance of contrast-enhanced ultrasound for ovarian cancer: A meta-analysis. *Ultrasound Med. Biol.* 41, 967–974.
- Wyman, I.W., Liu, G., 2013. Micellar structures of linear triblock terpolymers: Three blocks but many possibilities. *Polymer (Guildf)*. 54, 1950–1978.
- Xie, X., Hogen-Esch, T.E., 1996. Copolymers of N,N-Dimethylacrylamide and 2-(N-ethylperfluorooctanesulfonamido)ethyl Acrylate in Aqueous Media and in Bulk. *Synthesis and Properties. Macromolecules* 29, 1734–1745.
- Xing, Z., Wang, J., Ke, H., Zhao, B., Yue, X., Dai, Z., Liu, J., 2010. The fabrication of novel nanobubble ultrasound contrast agent for potential tumor imaging. *Nanotechnology* 21, 145607 (8pp).
- Xu, B., Li, L., Yekta, A., Masoumi, Z., Kanagalingam, S., Winnik, M.A., Zhang, K., Macdonald, P.M., Menchen, S., 1997. Synthesis, Characterization, and Rheological Behavior of Polyethylene Glycols End-Capped with Fluorocarbon Hydrophobes. *Langmuir* 13, 2447–2456.
- Xu, J.S., Huang, J., Qin, R., Hinkle, G.H., Povoski, S.P., Martin, E.W., Xu, R.X., 2010. Synthesizing and binding dual-mode poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanobubbles for cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 31, 1716–1722.
- Xu, R.X., Huang, J., Xu, J.S., Sun, D., Hinkle, G.H., Martin, E.W., Povoski, S.P., 2009. Fabrication of indocyanine green encapsulated biodegradable microbubbles for structural and functional imaging of cancer. *J. Biomed. Opt.* 14.
- Yamaguchi, K., Anderson, J.M., 1993. In vivo biocompatibility studies of medisorb 65/35 D,L-lactide / glycolide copolymer microspheres. *J. Control. Release* 24, 81–93.
- Yang, J.P., Yuan, D.X., Zhou, B., Gao, J., Ni, H.G., Zhang, L., Wang, X.P., 2011. Studies on the effects of the alkyl group on the surface segregation of poly(n-alkyl methacrylate) end-capped 2-perfluorooctylethyl methacrylate films. *J. Colloid Interface Sci.* 359, 269–278.
- Yao, W., Li, Y., Huang, X., 2014. Fluorinated poly(meth)acrylate: Synthesis and properties. *Polymer (Guildf)*. 55, 6197–6211.
- Yin, T., Wang, P., Zheng, R., Zheng, B., Cheng, D., Zhang, X., Shuai, X., 2012. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors. *Int. J. Nanomedicine* 7, 895–904.
- Zaggia, A., Ameduri, B., 2012. Recent advances on synthesis of potentially non-bioaccumulable fluorinated surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 188–195.
- Zhang, G., Hu, J., Tu, Y., He, G., Li, F., Zou, H., Lin, S., Yang, G., 2015. Preparation of superhydrophobic films based on the diblock copolymer P(TFEMA-r-Sty)-b-PCEMA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 19457–19464.
- Zhang, H., Pan, J., Hogen-Esch, T.E., 1998. Synthesis and Characterization of One-Ended Perfluorocarbon-Functionalized Derivatives of Poly(ethylene glycol)s. *Macromolecules* 31, 2815–2821.
- Zhang, X., Zheng, Y., Wang, Z., Huang, S., Chen, Y., Jiang, W., Zhang, H., Ding, M., Li, Q., Xiao, X., Luo, X., Wang, Z., Qi, H., 2014. Methotrexate-loaded PLGA nanobubbles for ultrasound imaging and Synergistic Targeted therapy of residual tumor during HIFU ablation. *Biomaterials* 35, 5148–5161.
- Zhang, Y.-X., Da, A.-H., Butler, G.B., Hogen-Esch, T.E., 1992. A fluorine-containing hydrophobically associating polymer. I. Synthesis and solution properties of copolymers of acrylamide and fluorine-containing acrylates or methacrylates. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 30, 1383–1391.
- Zhang, Y.-X., Da, A.-H., Hogen-Esch, T.E., Butler, G.B., 1990. A fluorocarbon-containing hydrophobically associating polymer. *J. Polym. Sci. Part C Polym. Lett.* 28, 213–218.
- Zhou, D., Teng, H., Koike, K., Koike, Y., Okamoto, Y., 2008. Copolymers of Methyl Methacrylate and Fluoroalkyl Methacrylates: Effects of Fluoroalkyl Groups on the Thermal and Optical Properties of the Copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 46, 4748–4755.
- Zhou, Z., Li, Z., Ren, Y., Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2003. Micellar shape change and internal segregation induced by chemical modification of a tryptych block copolymer surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10182–10183.
- Zou, H., Lin, S., Tu, Y., Liu, G., Hu, J., Li, F., Miao, L., Zhang, G., Luo, H., Liu, F., Hou, C., Hu, M., 2013. Simple approach towards fabrication of highly durable and robust superhydrophobic cotton fabric from functional diblock copolymer. *J. Mater. Chem. A* 1, 11246.

Travaux expérimentaux

Dans la partie Travaux Antérieurs, nous avons montré que les nanocapsules polymères à cœur liquide pourraient constituer, de par leur stabilité élevée, une alternative intéressante aux nanobulles ou aux nanoémulsions pour l'imagerie ultrasonore. Nous avons également montré que les chaînes perfluorées, à la fois hydrophobes et lipophobes, ont tendance à s'associer et à former des domaines fluorés. Le travail expérimental de thèse présenté ici, avait pour objectif initial de synthétiser des polymères fluorés pour formuler des nanocapsules à coques fines, donc plus échogènes, tout en restant furtives. Notre première stratégie, basée sur le mélange d'un PLA terminé par une chaîne perfluorée linéaire et d'un PLA-PEG, est décrite dans le premier chapitre. Le deuxième chapitre décrit notre deuxième stratégie, qui repose sur la synthèse de polymères triblocs possédant un bloc fluoré en peigne. Afin d'essayer de comprendre les paramètres influençant la réponse ultrasonore des nanocapsules développées, le chapitre 3 se focalise sur les propriétés mécaniques des nanocapsules, et le chapitre 4 s'intéresse aux différentes composantes du polymère (chaînes de PEG, chaînes perfluorées, architecture des chaînes perfluorées).

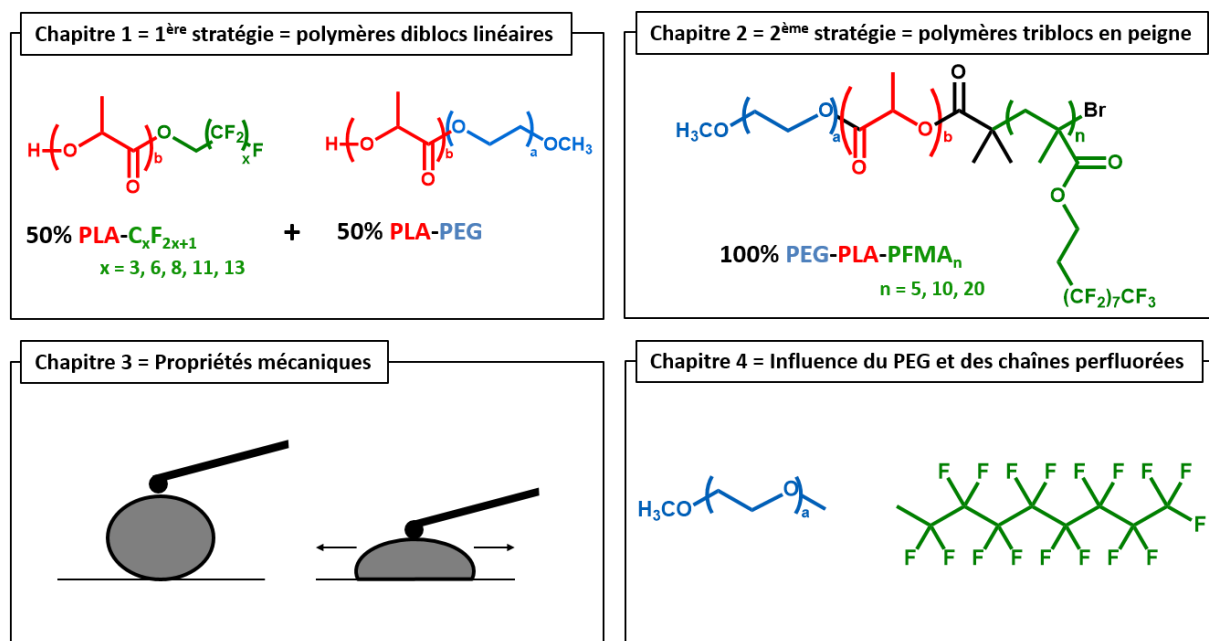


Schéma représentant l'organisation des quatre chapitres de travaux expérimentaux

Chapitre 1

Fonctionnalisation de polyesters par des terminaisons
fluorées pour l'encapsulation du bromure de
perfluorooctyle dans des nanocapsules PEGylées
échogènes

Dans ce premier chapitre, nous avons synthétisé des PLAs à terminaisons perfluorées de longueur de chaîne croissante (PLA-C_xF_{2x+1} avec x = 3, 6, 8, 11, 13). Les nanocapsules de PFOB ont pu être formulées en mélangeant un tel PLA-C_xF_{2x+1} avec du PLA-PEG pour la furtivité, et en diminuant la masse totale de polymère dans le but de diminuer l'épaisseur des coques.

Les résultats montrent que ces polymères fluorés ne réduisent pas la tension interfaciale entre le PFOB et le solvant organique utilisé pendant la formulation, et ne permettent pas une réduction significative de l'épaisseur de la coque (expériences de diffusion de neutrons aux petits angles). Cependant, l'efficacité d'encapsulation du PFOB augmente avec la longueur de chaîne fluorée jusqu'à C₈F₁₇. Par ailleurs, les nanocapsules formulées avec les polymères fluorés n'entraînent aucune toxicité spécifique *in vitro* par rapport au PLA non fluoré. Les expériences d'imagerie ultrasonore *in vitro* réalisées avec les échantillons présentant les valeurs d'épaisseurs les plus faibles, à savoir les nanocapsules de 50% PLA-C₆F₁₃ / 50% PLA-PEG et les nanocapsules de PLA-PEG pur, montrent que les nanocapsules fluorées rehaussent plus fortement le contraste, probablement grâce à la teneur plus élevée en PFOB et à la densité plus élevée de la capsule résultant de la fluoration des polymères. Ces résultats mettent en évidence le bénéfice de la fluoration pour améliorer l'échogénicité des agents de contraste à ultrasons de taille nanométrique.

End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules

Polymer Chemistry, 2017, **8**, 2559 – 2570

Sophie Houvenagel^a, Guilherme Picheth^{a,e}, Camille Dejean^b, Annie Brûlet^c, Alexis Chennevière^c, Olivier Couture^d, Nicolas Huang^a, Laurence Moine^{a*}, Nicolas Tsapis^{a*}

^a Institut Galien Paris-Sud, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b BioCIS, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

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

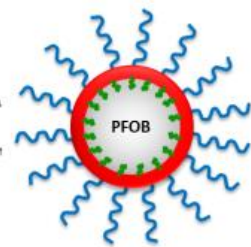
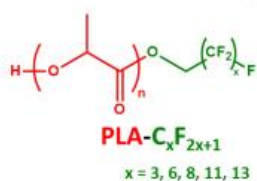
^d Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), Paris, France


^e Biopol, Chemistry Department, Federal University of Paraná, 81531-980. Curitiba, PR, Brazil

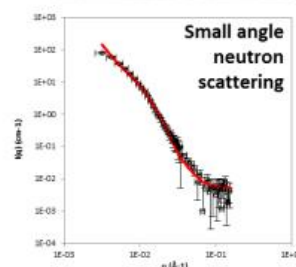
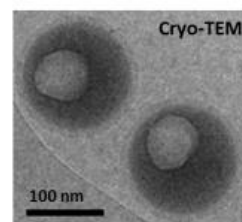
* Corresponding authors at: CNRS, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France. Tel.: +33 146835813. E-mail address: laurence.moine@u-psud.fr (Laurence Moine) and nicolas.tsapis@u-psud.fr (Nicolas Tsapis).

Graphical abstract

Fluorinated end-capped polylactides



Ultrasound 
Higher echogenicity than pure PLA-PEG nanocapsules



Keywords

Perfluorocarbons, nanocapsules, fluorinated polymers, ultrasound contrast agents

Abstract

Perfluorinated end-capped polylactides (PLAs) with various perfluorinated chain lengths from C_3F_7 to $C_{13}F_{27}$ were synthesized and formulated into PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide (PFOB) to be used as ultrasound contrast agents (UCAs). We show that the perfluorinated end groups do not reduce the interfacial tension between PFOB and the organic solvent used during formulation and do not allow a significant reduction of shell thickness (Small angle neutron scattering (SANS) experiments). However, the PFOB encapsulation efficiency increases with the fluorinated chain length until C_8F_{17} . This suggests the possible presence of favorable fluorophilic interactions between PFOB and perfluorinated end groups. In addition, nanocapsules formulated with the different fluorinated polymers do not promote any specific toxicity *in vitro* compared to non-fluorinated PLAs. Ultrasound imaging performed on samples presenting the lowest thickness values, namely nanocapsules made from 50% PLA- C_6F_{13} / 50% polylactide-*b*-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) and pure PLA-PEG nanocapsules, shows that fluorinated nanocapsules exhibit a higher ultrasound contrast enhancement *in vitro* most probably thanks to the higher PFOB content and density arising from polymer fluorination. This highlights the benefit of fluorination for improving the echogenicity of nano-sized ultrasound contrast agents.

1. Introduction

Ultrasound imaging is an extensively used clinical diagnostic modality which enables safe, cost-effective and non-invasive real-time imaging of tissues. However, the use of ultrasound contrast agents (UCAs) is required to help visualize tissues with similar levels of echogenicity (Correas et al., 2001; Diaz-Lopez et al., 2010). Commercial UCAs mainly consist of gas microbubbles of 1 – 6 μm stabilized by a layer of lipids or proteins (Paefgen et al., 2015; Schneider et al., 1995). These UCAs improve the microvasculature visualization, but their use for cancer detection and tumor characterization is limited by their large size and poor stability (Paefgen et al., 2015). Tumor imaging requires more stable nano-sized UCAs which could extravasate into the tumors through leaky endothelium by the enhanced permeation and retention (EPR) effect (Yuan et al., 1995), provided their half-life in the blood is long enough. Since gas nanobubbles are difficult to stabilize (Leroy and Norisuye, 2016), research has focused on UCAs based on liquid perfluorocarbons which possess low solubility in blood and a difference of acoustic impedance with tissues (Schutt et al., 2003). To further increase nanosystem stability, several groups have reported the use of polymeric shells which are more resistant to disassembly under ultrasonic waves than lipid or protein layers (Chlon et al., 2009; Cui et al., 2005; El-Sherif and Wheatley, 2003; Néstor et al., 2011; Sanna et al., 2011; Yang et al., 2014; Zha et al., 2014; Zhao et al., 2015).

In this context, our group has previously developed nanocapsules consisting of a solid polymeric shell of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and a liquid core of perfluorooctyl bromide (PFOB) (Pisani et al., 2006). PFOB is biocompatible and its liquid state provides good stability and resistance to mechanical stresses and pressure changes. These nanocapsules were previously imaged by ultrasonography in nonlinear mode (Tissue Harmonic Imaging) in the vena cava of a mouse liver after intravenous injection (Pisani et al., 2008). Nevertheless, due to dilution in the blood and elimination by the mononuclear phagocyte system, these nanocapsules could not allow tumor imaging. PLGA was therefore replaced by a poly(lactide-co-glycolide)-poly(ethylene glycol) (PLGA-PEG) copolymer to yield stealth nanocapsules that accumulated in the tumor by the EPR effect (5% of the injected dose), and provided contrast enhancement in tumor with ^{19}F Magnetic Resonance Imaging (Diou et al., 2014, 2012). Encapsulation of paclitaxel in the PLGA-PEG shell led to a significant twofold reduction in tumor growth as compared with negative control and generic Taxol® group, making these nanocapsules promising for use as theranostic agents (Boissenot et al., 2016). However, their echogenicity further needs to be improved as no ultrasound signal could be detected in tumors. Thinning the shell of plain PLGA/PFOB nanocapsules, by decreasing the amount of polymer used in the formulation, previously enabled to increase their compressibility and echogenicity *in vitro* (Pisani et al., 2008, 2006). Attempts to use the same strategy with PLGA-PEG resulted in local dewetting of the polymer at the interface

between the aqueous phase and PFOB, leading to the formation of PFOB droplets along with nanocapsules instead of yielding nanocapsules with thinner shells (Diou et al., 2016).

The aim of this work is therefore to reduce the capsules' shell thickness to improve their echogenicity while retaining their stealth properties with PEG chains. Our strategy was to synthesize new perfluorinated end-functionalized polylactide (PLA) polymers and mix them with poly(lactide-co-ethylene glycol) (PLA-PEG) to formulate the nanocapsules (Figure 1). We expect the perfluorinated end group to improve the wetting around the PFOB droplet through fluorophilic interactions and promote the formation of capsules with thin shells when we reduce the amount of polymer in the formulation. Indeed, incorporation of perfluoroalkyl chains in a material usually enhances its tendency to self-assemble through the formation of fluorophilic phases (Hillmyer and Lodge, 2002; Krafft and Riess, 2009; Riess, 2002).

We therefore synthesized a family of PLAs end-capped with short linear perfluorinated chains of various lengths (PLA- C_xF_{2x+1}), from C_3F_7 to $C_{13}F_{27}$, as well as a hydrocarbon control. We present here the characterization of nanocapsules in terms of size distribution, morphology, PFOB encapsulation efficiency, shell thickness by Small Angle Neutron Scattering, cytotoxicity and *in vitro* ultrasound imaging.

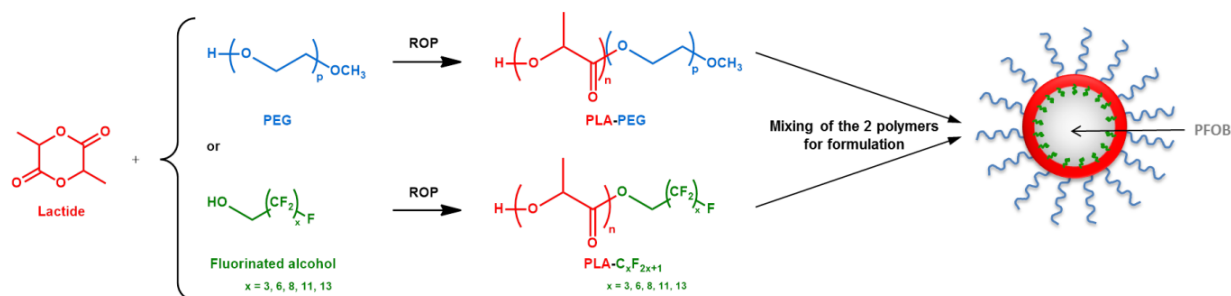


Figure 1: Schematic representation of the strategy used to formulate PEGylated thin nanocapsules

2. Materials and methods

2.1. Materials

DL-lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). Poly(ethylene glycol) methyl ether (OH-PEG-OCH₃, average $M_n = 5\,000$ g/mol), stannous 2-ethyl hexanoate (stannous octoate, Sn(Oct)₂), dried toluene, poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 30\,000$ - $70\,000$ g/mol, 87-90% hydrolyzed), sodium cholate, D₂O and trifluoroacetic acid (TFA) were provided by Sigma-Aldrich (France). 1-hexanol was from ACROS Organics (Belgium). 2,2,3,3,4,4-heptafluoro-1-butanol, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-heptanol, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-nonanol, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-dodecanol, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-tetradecanol, perfluorooctyl bromide (PFOB) and perfluoro-1,5-crown-5-ether (PFCE) were purchased from Fluorochem (UK). Deuterated chloroform (CDCl₃) and deuterated acetone (acetone-d) were obtained from Euriso-top (France). All solvents were purchased from Carlo Erba (France). Cell culture reagents such as DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), FBS (Fetal Bovine Serum), trypsin-EDTA solution and PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate buffer) were purchased from Sigma Aldrich (France). Water was purified using a RIOS/Synergy system from Millipore (France). NMR sample tubes and coaxial inserts were obtained from CortecNet (France).

2.2. Polymers synthesis

All polylactide (PLA) derived polymers were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide with the presence of stannous octoate as catalyst (Böhmer et al., 2006; Lee et al., 2001). All glassware was dried by heating under vacuum and handled under argon atmosphere. In a 10 mL Schlenck tube equipped with a magnetic stir-bar, DL-lactide (10.4 mmol, 1.5g) and the corresponding initiator (0.075 mmol) – OH-PEG-OCH₃ for polylactide-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG), 1-hexanol for PLA-C₆H₁₃, 2,2,3,3,4,4-Heptafluoro-1-butanol for PLA-C₃F₇, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-heptanol for PLA-C₆F₁₃, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-nonanol for PLA-C₈F₁₇, 1*H*,1*H*-perfluoro-1-dodecanol for PLA-C₁₁F₂₃ or 1*H*,1*H*-perfluoro-1-tetradecanol for PLA-C₁₃F₂₇ – were added to the flask under argon flow. The tube was sealed with a rubber cap and a stannous octoate solution (0.05 mmol, 20 mg) dissolved in 2 mL of dried toluene was added through the septum. The tube was purged with argon for 15 minutes and then placed into a 130°C oil bath. Polymerization was carried out for 55 min under magnetic stirring, and then quenched by immersing the tube in a cold water bath. After evaporation of toluene, the reaction product was dissolved in chloroform followed by precipitation into excess cold diethyl ether. The product was then dissolved in acetone (or THF for PLA-C₆H₁₃ and PLA-PEG) and precipitated into water. The polymer was finally freeze-dried for 24h using an Alpha-1-2 LD apparatus (Christ, France) and a white powder was obtained. Lactide conversion $\geq 95\%$ (¹H NMR). ¹H NMR (300 MHz,

CDCl₃, δ , ppm): **PLA-C₆H₁₃, C₃F₇, C₆F₁₃, C₈F₁₇, C₁₁F₂₃, C₁₃F₂₇**: 5.10-5.28 (CHCH₃COO), 4.46-4.81 (OCH₂CF₂), 4.38 (terminal CHCH₃COO), 2.73 (terminal HOCHCH₃COO), 1.52-1.61 (CHCH₃COO); **PLA-PEG**: 5.10-5.28 (CHCH₃COO), 3.64 (OCH₂CH₂), 1.52-1.61 (CHCH₃COO). ¹⁹F NMR (200 MHz, CDCl₃, δ , ppm): **PLA-C₃F₇**: -79.0 (CF₃), -118.7 (CH₂CF₂), -125.8 (CF₂CF₂CF₃); **PLA-C₆F₁₃, C₈F₁₇, C₁₁F₂₃, C₁₃F₂₇**: -79.0 (CF₃), -117.7 (CH₂CF₂), -120.0 ((CF₂)_{x-5}CF₂CF₃), -120.8 (CH₂CF₂CF₂), -121.4 (CH₂CF₂CF₂CF₂), -124.3 (CF₂CF₃).

2.3. Polymers characterization

Size Exclusion Chromatography (SEC) was performed at 30 °C with two columns from Polymer Laboratories (PL-gel MIXED-D; 300 × 7.5 mm) and a differential refractive index detector (Spectrasystem RI-150, Thermo Electron Corp.), using chloroform as an eluent, a Waters 515 pump at a flow rate of 1 mL/min, and toluene as a flow-rate marker. The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards from Polymer Laboratories.

¹H NMR and ¹⁹F NMR spectroscopies were performed in 5 mm diameter tubes in CDCl₃ or acetone-d on a Bruker Avance-300 (300 MHz) spectrometer and a Bruker ARX-200 (200 MHz) spectrometer, respectively.

The molar masses of PLA-C_xF_{2x+1} were also estimated by ¹⁹F NMR with PFCE as an internal standard on the hypothesis that all polymer chains have the same lengths and all polymer chains have a fluorinated end group. A known mass of fluorinated polymer was dissolved in a precise volume of a solution of PFCE at 0.293 mmol/L in CDCl₃. The molar concentration of PLA-C_xF_{2x+1} was calculated by integrating the resonance peak at -79.0 ppm, corresponding to the CF₃ group of PLA-C_xF_{2x+1} and normalized by the area of the single resonance PFCE peak at -87.6 ppm. The molar mass was deduced from the calculated molar concentration and the known mass in the tube.

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed using a DSC Q1000 (TA Instruments). The polymers (2-5 mg) were sealed in aluminum pans and heated from 20 to 70°C at a heating rate of 20°C/min and cooled to 20 °C before a second heating scan from 20 to 70°C at 20°C/min to determine the glass transition temperature (T_g). A nitrogen flow was maintained throughout the test (20 mL/min).

2.4. Interfacial tension measurements

The interfacial tension measurements were carried out using the pendant drop method, employing a Tracker tensiometer (Teclis, France). Drops of PFOB of 0.1-0.3 μ L were formed using a syringe and a G22 stainless steel needle into a methylene chloride solution containing the polymers at 25 mg/mL placed in an optical glass cuvette. The interfacial tension was determined from the drop profile using the Laplace equation and the forces balance between

capillarity and gravity. The measurements were performed on at least three independent drops and the experiment was repeated on different days to ensure reproducibility.

2.5. Nanocapsules preparation

Nanocapsules (NCs) of PFOB were prepared by an emulsion-evaporation process as previously described (Diou et al., 2012; Pisani et al., 2006). PLA-PEG or a mixture of 50 wt% PLA-PEG with 50 wt% PLA-C₆H₁₃ or PLA-C_xF_{2x+1} (total mass 30 mg or 50 mg), was dissolved into 2 mL of methylene chloride along with 30 μ L of PFOB. The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip (Digital Sonifier, Branson Ultrasonics, France) at 30% of maximal power, for 1 min over ice. Solvent was allowed to evaporate by magnetic stirring at 300 rpm at room temperature for 3 h. The native suspensions of NCs were filtered through 0.45 μ m PVDF filters, and if necessary, were purified to remove sodium cholate by ultracentrifugation for 1h, at 4 °C and at 27 440 g (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The pellet was finally resuspended in water to the desired concentration.

2.6. Size distribution and Zeta potential

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

2.7. PFOB encapsulation efficiency by ¹⁹F NMR spectroscopy

PFOB encapsulation efficiency was determined by ¹⁹F NMR on a Bruker Avance-400 (400 MHz) spectrometer with a 5 mm dual probe ¹⁹F/¹H. The NMR quantitative method using stem coaxial inserts was originally proposed by Henderson for ³¹P compounds (Henderson, 2002) and adapted previously for ¹⁹F NMR (Diou et al., 2014). 1 mL of unpurified and filtered nanocapsules were freeze-dried for 24h using an Alpha-1-2 LD apparatus (Christ, France) and lyophilisates were dissolved into 1 mL of chloroform. Sodium cholate was removed by centrifugation for 5 min at 4696 g. The organic solution was collected and introduced into a usual 5mm-NMR sample tube loaded with a stem coaxial insert containing TFA in D₂O as an external standard ([TFA]= 9.4 μ mol/mL). The total amount of PFOB in the suspension, n_{PFOB} , was determined after integration of the peak at -64.7 ppm corresponding to the CF₂Br group and normalization by the area of the TFA peak at -76.5 ppm using a PFOB calibration curve in chloroform (supplementary information). Absolute encapsulation efficiency, η_{encaps} , was calculated as follows:

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

where m_{PFOB}^{feed} , $m_{polymer}^{feed}$ and m_{SC}^{feed} are the initial masses of the components introduced during NCs preparation, m_{NC} corresponds to the mass of NCs recovered after freeze-drying and M_{PFOB} is the molar mass of PFOB (498.96 g/mol).

2.8. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) using a JEOL JEM-1400 operating at 80 kV. 5 μ L of purified suspensions of nanocapsules (0.5 mg/mL) were deposited for 1 min on glow-discharged copper grids covered with formvar-carbon film. Samples were then stained using 2% phosphotungstic acid (pH = 7) for 30 s. The excess solution was blotted off using a filter paper. Images were acquired using an Orius camera (Gatan Inc, USA).

2.9. Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM)

Cryo-TEM was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) using a JEOL JEM-1400 operating at 120 kV. 5 μ L of purified suspensions of nanocapsules (25 mg/mL) were deposited on glow-discharged Lacey copper grids covered with carbon film containing holes. The excess solution was blotted off for 5 s using filter paper and the grids were subsequently frozen in liquid ethane using a Leica EM GP automatic system (Leica, Austria) under a 90% humidity atmosphere. Images were recorded on a US1000XP camera (Gatan Inc, USA) with a -2 μ m defocus.

2.10. Small angle neutrons scattering (SANS)

2.10.1. SANS data collection

Small Angle Neutron Scattering (SANS) measurements were performed on the PACE and TPA spectrometers of the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEA-Saclay, France). Nanocapsules were filtered, purified and resuspended in the desired mixture of H₂O and D₂O at a final volume fraction of $\varphi_v = 1\%$. Two mixtures were used to match or not the scattering length densities of the various components, PFOB or PLA, and to focus on the structure of the selected features. In water, we expected core-shell structures with PFOB as core and the mixture of PLA-based polymers as shell. The 40/60 (v/v) H₂O/D₂O mixture matched the scattering length density of the PFOB core ($\rho_{PFOB} = \rho_{core} = 3.6 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) and enabled focusing on the polymeric shell. The 67/33 (v/v) H₂O/D₂O mixture matched the scattering length density of PLA ($\rho_{PLA} = \rho_{shell} = 1.7 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) and allowed observing the PFOB core. Two configurations were used on PACE: the first one with a sample-to-detector distance of $D = 2.9 \text{ m}$ and a neutron wavelength of $\lambda = 4.6 \text{ \AA}$ to cover a scattering vector (q) range of $3.2 \times 10^{-3} - 3.4 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$; the second one with $D = 4.7 \text{ m}$ and $\lambda = 13 \text{ \AA}$ to cover a q range of $1.4 \times 10^{-2} - 1.5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Samples under PLA matching

conditions were further analyzed with the TPA spectrometer, the Very SANS (VSANS) spectrometer at LLB. This high resolution VSANS spectrometer with a sample-to-detector distance of $D = 6$ m and a neutron wavelength of $\lambda = 6 \text{ \AA}$ allowed to cover a q range of $5.6 \times 10^{-4} - 4.0 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$. SANS and VSANS measurements were performed in 1 mm thick quartz cuvettes to minimize the incoherent scattering. Scattered intensity curves were corrected from the scattering from the empty quartz cuvette and the electronic background, and normalized (only for SANS measurements, not VSANS ones) by the incoherent signal of 1 mm water sample to account for non-uniform efficiency of detector, using the LLB PASINET software (Brulet et al., 2007).

2.10.2. SANS data modelling

Vesicle model

The scattered intensity curves obtained under PFOB matching condition were fitted using the vesicle model with Sasview software ("Sasview software," n.d.). This model provides the form factor, $P(q)$, for a unilamellar vesicle of inner radius R_{core} and thickness T , according to the following equation:

$$P(q) = \frac{\text{scale}}{V_{\text{shell}}} \left[\frac{3V_1(\rho_1 - \rho_2) J_1(qR_1)}{qR_1} + \frac{3V_2(\rho_2 - \rho_{\text{solv}}) J_1(qR_2)}{qR_2} \right]^2$$

Where scale is a scale factor, V_{shell} is the volume of the shell, V_1 is the volume of the core, V_2 is the total volume of the vesicle, $R_1 = R_{\text{core}}$ is the radius of the core, R_2 is the outer radius of the vesicle ($R_2 = R_{\text{core}} + T$). For the vesicle, $\rho_1 = \rho_{\text{core}} = \rho_{\text{solv}}$ is the scattering length density of the core and the solvent, $\rho_2 = \rho_{\text{shell}}$ is the scattering length density of the shell, and $J_1(x) = \frac{\sin x - x \cos x}{x^2}$. The fit gives geometrical parameters of the nanocapsules: the mean core radius R_{core} , the polydispersity of the core radius σ_{core} , the thickness of the shell T and the polydispersity of the thickness σ_T . A lognormal distribution was assumed for both radius and thickness.

Guinier regime

Under PLA matching conditions, the scattering intensity corresponds to the fluctuations of the PFOB core. The scattered intensity curves in these matching conditions were fitted at low q values ($q < 2.5 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$) to determine the radius of gyration R_g using the Guinier approximation with Sasview software according to:

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad qR_g < 1$$

For a sphere, the radius of gyration is related to the radius of the sphere with the formula:

$$R_{\text{sphere}}^2 = 5/3 R_g^2$$

2.11. Cell culture and cell viability studies

The cytotoxicity of all NCs was evaluated in two distinct cell lines obtained from ATCC (USA). Human endothelial umbilical vein cells (HUVEC) were cultured in DMEM supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat inactivated FBS. The J774.A1 murine macrophage- monocyte cell line was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat inactivated FBS. Cells were split twice a week, by trypsinisation for HUVEC and by scraping for J774.A1 cells. All cell lines were maintained at 37 °C and 5% CO₂ under a humidified atmosphere. In order to evaluate the *in vitro* cytotoxicity, NCs were resuspended in cell culture medium before being added onto the cells. The cell viability was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were seeded in 100 µL of culture medium (12 x 10³ cells/well or 3 x 10³ cells/well for 24 and 72 h incubation respectively) in 96 well plates (TPP, Switzerland) and pre-incubated for 24 h. 100 µL of a serial dilution of NCs (0.01 to 10 mg/mL) was then added to the medium. After 24 or 72h of incubation, the incubation medium was replaced by fresh medium containing 0.5 mg/mL of MTT (Sigma, France). After 1h15 incubation, the culture medium was gently aspirated and replaced by 200 µL dimethylsulfoxide (ACS grade, VWR, France) to dissolve the formazan crystals. The absorbance of the solubilized dye, which correlates with the number of living cells, was measured with a microplate reader (LAB Systems Original Multiscan MS, Finland) at 570 nm. The percentage of viable cells in each well was calculated as the absorbance ratio between NC-treated and untreated control cells.

2.12. In vitro ultrasound imaging

In vitro ultrasound imaging experiments were performed using a programmable ultrasound scanner with a 5 MHz probe with 192 elements. 0.8 mL of purified nanocapsules resuspended at a final concentration of 50 mg/mL were placed in a silicone tube in a 37°C thermostated bath. A picture of the set-up is given in supplementary material (Figure S8). Images were obtained using an ultrafast B-mode sequence (Couture et al., 2009) at 0.1 MPa peak negative pressure. Ultrafast images were acquired at a frame rate of 100 Hz and data were transferred to a computer for analysis by Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA). The backscattered intensity of the samples was obtained by averaging the power of the first and last image of the video in the region-of-interest (the silicone tube). The resulting intensities were subtracted by the backscattered intensity obtained with the tube filled with Milli-Q water. Commercial Sonovue microbubbles (diluted to 1/1000) were used as a reference positive control for the ultrasound set-up and parameters chosen for our study.

3. Results and discussion

3.1. Polymers synthesis and characterization

Poly lactide polymers terminated by a perfluorinated end chain of increasing length (C_xF_{2x+1} with $x = 3, 6, 8, 11, 13$) were synthesized by ring opening polymerization (ROP) of lactide initiated by fluorinated alcohols of respective lengths. A control terminated by a hydrogenated chain (PLA- C_6H_{13}) and poly lactide-*b*-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) were also synthesized by ROP of lactide initiated respectively by hexyl alcohol and polyethylene glycol methyl ether of 5,000 g/mol. The same monomer/initiator feed molar ratio of 278 was used for all polymers to target a 20,000 g/mol PLA block, which allows studying the influence of the end group alone.

Preliminary tests targeting a polymerization degree of 20 were performed to verify by 1H NMR the ability of fluorinated alcohols to initiate the polymerization of lactide. As shown in Figure 2, the triplet at 4.10 ppm corresponding to the CH_2 of the initiator is shifted to 4.65 ppm in the polymer, which confirms the formation of the ester bond and the good initiation by the fluorinated alcohol. Moreover, the ratio of the integral values $2I_{CH_{PLA}}/I_{OCH_2CF_2}$ is approximately 20, which is consistent with the targeted polymerization degree and therefore indicates that within experimental error all polymer chains contain a fluorinated end group. 1H NMR spectra of all synthesized polymers and initiators are shown in supplementary material (Figure S1 and Figure S2).

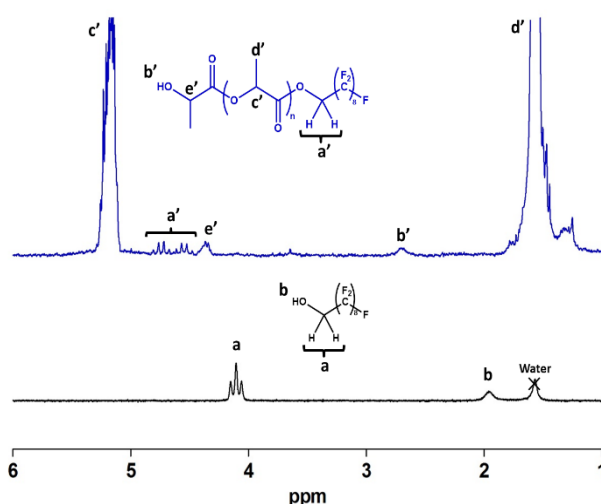


Figure 2: 1H NMR spectrum in $CDCl_3$ of a short PLA- C_8F_{17} with 20 lactide units (blue line) and of the fluorinated alcohol (black line) confirming the good initiation of the ROP of lactide by the fluorinated alcohol: shift from 4.10 ppm (H^a) to 4.65 ppm ($H^{a'}$)

^{19}F NMR spectra of all synthesized fluorinated end-capped polymers also present some differences in the CF_2 zone compared to the spectra of their corresponding fluorinated initiators (Figure 3 and Figure S3), confirming again the successful initiation by the fluorinated alcohols.

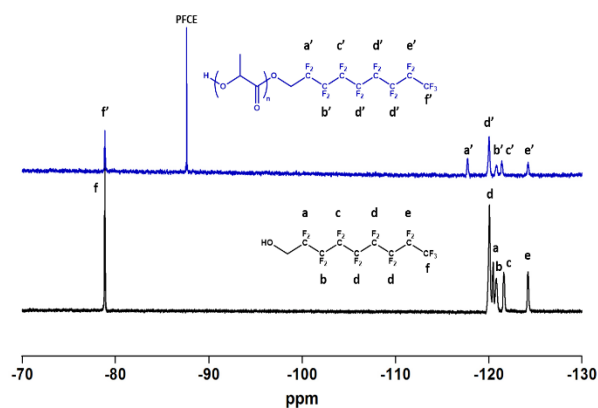


Figure 3: ^{19}F NMR spectra of PLA-C₈F₁₇ in CDCl₃ with PFCE as internal standard (blue line) and its corresponding fluorinated initiator in CDCl₃ (black line)

Molar masses of all synthesized polymers were estimated by SEC and NMR (^{19}F NMR for fluorinated end-capped PLAs and ^1H NMR for PLA-PEG) (Table 1). The differences between SEC and NMR values can arise from the difference of conformation of PLA-based polymers in CHCl₃ compared to PMMA standards, as well as from the calculation with ^{19}F NMR spectra which is based on the hypothesis that all polymer chains possess a fluorinated end group and have the same length. Both techniques yield M_n values close to the targeted M_n of 20,000 g/mol. Dispersities (D) are all below 1.5, showing the efficacy of all fluorinated alcohols to initiate the lactide polymerization by ROP (Table 1).

Table 1: Number-average molar mass, dispersity, glass transition temperature of the synthesized polymers, and interfacial tension measured with the pendant drop method at the interface between PFOB and methylene chloride solutions of polymer at 25 mg/mL. Interfacial tension without any polymer is 2.0 ± 0.3 mN/m.

Polymer	M_n^{NMR} ($\times 10^3$ g.mol ⁻¹)	M_n^{SEC} ($\times 10^3$ g.mol ⁻¹)	D	T_g (°C)	Interfacial tension (± 0.3 mN/m)
PLA-PEG	23.5	20.2	1.3	13	2.0
PLA-C ₆ H ₁₃	-	20.8	1.5	52	1.9
PLA-C ₃ F ₇	17.5	23.2	1.5	53	1.7
PLA-C ₆ F ₁₃	17.0	23.5	1.5	51	1.7
PLA-C ₈ F ₁₇	15.5	24.1	1.5	53	2.2
PLA-C ₁₁ F ₂₃	16.5	21.9	1.4	53	1.8
PLA-C ₁₃ F ₂₇	15.0	21.9	1.5	53	2.2

Glass transition temperatures (T_g) of PLA-C₆H₁₃ and all perfluoroalkyl end-capped PLAs are between 51 and 53 °C (Table 1), close to values reported for unmodified PLA polymers (Chen et al., 2003; Essa et al., 2010; Martin and Averous, 2001; Park and Kim, 2004; Piorkowska et al., 2006). Comparatively, Giuntoli et al. observed a decrease of 10-15 °C in the T_g of PLA with incorporation of a C₆F₁₃ end chain. This decrease was stronger as the molar mass decreases, however, the molar masses were all lower (5,000 – 12,000 g/mol) than in our study (Giuntoli et al., 2012). Indeed, Lee et al. reported a decrease of the T_g of L-PLA from 51 to 34°C upon addition

of a C₁₀F₂₁ fluorinated end chain at low molar mass ($M_n^{SEC} = 14,000$ g/mol), but no influence at higher molar mass ($M_n^{SEC} = 29,000$ g/mol) (Lee et al., 2001). Considering our results, we assume that 20,000 g/mol is high enough not to observe any influence of fluorinated end chains from C₃F₇ to C₁₃F₂₇ on the glass transition of PLA. Regarding PLA-PEG, T_g is strongly reduced to 13 °C, which can be explained by the plasticizing effect of PEG chains (Piorkowska et al., 2006), in agreement with previous reports (Lucke et al., 2000; Salem et al., 2001).

3.2. Polymers interfacial properties

Perfluorinated chains are well known to be both hydrophobic and lipophobic, therefore often referred as fluorophilic. Incorporation of perfluoroalkyl moieties in a material usually modifies its surface properties and enhances its propension to self-associate and generate fluorous compartments (Hillmyer and Lodge, 2002; Krafft and Riess, 2009; Riess, 2002). Our strategy was to favor fluorophilic interactions between PFOB and the perfluorinated end groups of the synthesized polymers, and thus improve the wetting of the polymer layer at the PFOB/aqueous phase interface to yield nanocapsules with thin shells.

The interfacial tension at the PFOB/methylene chloride interface is, however, not modified upon addition of PLA-C_xF_{2x+1} polymers at 25 mg/mL in the methylene chloride phase (Table 1). Values between 1.7 and 2.2 mN/m were measured for all polymers including the non-fluorinated controls as well as without any polymer, indicating an absence of any interaction between the perfluorinated end chain and PFOB independently of the chain length. The polymers may adopt a certain conformation in the solvent, which would hide the fluorinated groups. This could occur either within a single polymer coil or between several polymer chains, especially if the perfluorinated end chains interact preferentially with each other rather than with PFOB, forming micelles with fluorophilic cores. In the latter case, reducing the polymer concentration should lower these interactions and make the fluorinated groups more accessible for interaction with PFOB. However, attempts to decrease polymer concentration down to 0.1 mg/mL did not induce any change in the interfacial tension. Moreover, no micelles could be detected using DLS analysis of the polymers in methylene chloride. The most probable explanation could be that the proportion of perfluorinated end group compared to the 20,000 g/mol PLA block is not high enough to induce a decrease of the interfacial tension.

3.3. PFOB nanocapsules: physical characterization

Size distribution and zeta potential

For formulation, PLA-PEG was blended with each PLA-C_xF_{2x+1} or PLA-C₆H₁₃ (control) at a 50:50 (w/w) ratio in the organic phase to form nanocapsules with a liquid core of PFOB by an

emulsion-evaporation process (Diou et al., 2012; Pisani et al., 2006). During the evaporation, we expect the hydrophobic PLA blocks of each polymer to blend homogeneously, the perfluorinated end groups to orientate towards the PFOB core, whereas the hydrophilic PEG chains would orientate towards the aqueous phase (Figure 1). A control formulation with 100% PLA-PEG was also prepared. Since the objective of this study is to reduce shell thickness, we tried to lower the initial mass of polymer in the organic phase (from 50 to 30 mg), while keeping the amount of PFOB constant.

Within experimental error, no significant differences in size can be observed between all samples, which present hydrodynamic diameters in the 110-140 nm range (Table 2, Figure S4 and S5 for DLS intensity graphs). However, polydispersity (PDI) values are higher for formulations prepared from 30 mg of polymer (≥ 0.22) compared to those from 50 mg of polymer (≤ 0.19), suggesting a wider distribution of sizes and eventually the presence of non-encapsulated PFOB droplets as previously observed with PLGA-PEG (Diou et al., 2016), regardless of the polymer used. All samples present negative zeta potential ranging from -24 to -35 mV regardless of the fluorinated chain length (Table 2).

Table 2: Characterization of nanocapsules prepared from total polymer masses of 50 or 30 mg. Data are presented as the mean \pm SD (n=3)

Polymer	50 mg			30 mg		
	d_H (nm)	PDI (± 0.02)	ζ (mV)	d_H (nm)	PDI (± 0.02)	ζ (mV)
100% PLA-PEG	113 \pm 3	0.18	-24 \pm 8	115 \pm 4	0.22	-30 \pm 9
50% PLA-C ₆ H ₁₃ 50% PLA-PEG	125 \pm 12	0.18	-25 \pm 9	108 \pm 6	0.24	-35 \pm 9
50% PLA-C ₃ F ₇ 50% PLA-PEG	129 \pm 13	0.19	-24 \pm 9	110 \pm 5	0.23	-34 \pm 9
50% PLA-C ₆ F ₁₃ 50% PLA-PEG	127 \pm 12	0.19	-26 \pm 12	124 \pm 14	0.24	-35 \pm 9
50% PLA-C ₈ F ₁₇ 50% PLA-PEG	129 \pm 13	0.19	-25 \pm 8	118 \pm 11	0.24	-31 \pm 9
50% PLA-C ₁₁ F ₂₃ 50% PLA-PEG	137 \pm 12	0.18	-29 \pm 9	118 \pm 10	0.25	-34 \pm 7
50% PLA-C ₁₃ F ₂₇ 50% PLA-PEG	131 \pm 14	0.19	-28 \pm 11	111 \pm 10	0.24	-34 \pm 8

Imaging of nanocapsules

Imaging of nanocapsules by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) revealed no morphological differences related to polymer end-group chemistry, perfluoroalkyl chain length, or polymer quantity. Typical images of nanocapsules made from 50% PLA-C₈F₁₇ and 50% PLA-PEG at 50 mg are presented in Figure 4 and supplementary data (Figure S6 and Figure S7). TEM with negative staining shows spherical nanoparticles, with a size and polydispersity in agreement with DLS measurements. Cryo-TEM allows confirming their well-defined core-shell structure. The PFOB core, with high electronic

density, appears black and is centered inside the lighter polymeric shell. Nanocapsules also present a white meniscus inside the core. Indeed, rapid freezing of nanocapsules during sample preparation causes solidification and shrinking of PFOB, which does not fill entirely the polymeric shell cavity anymore (Diou et al., 2016). Despite the presence of a perfluoroalkyl end group, shell thickness appears polydisperse within a same sample (Figure 4), as previously observed with PLGA-PEG (Diou et al., 2016), and unlike plain PLGA nanocapsules (Pisani et al., 2006).

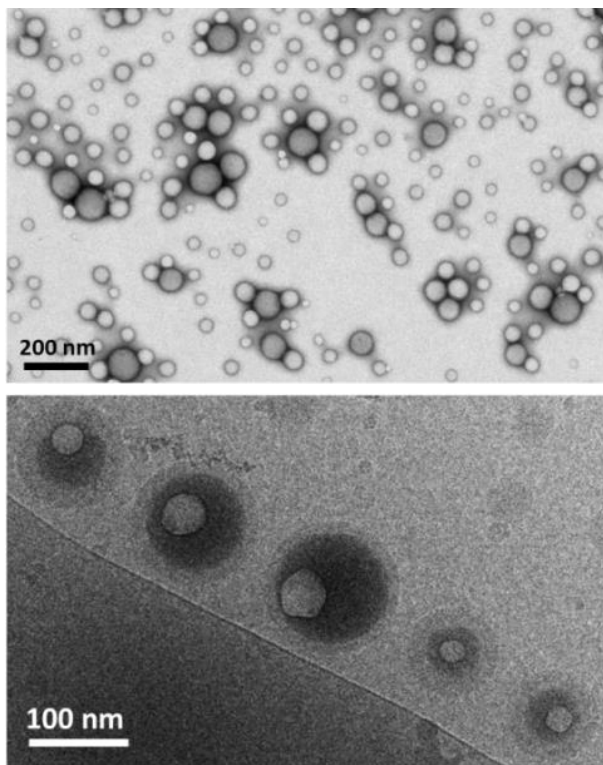


Figure 4: Typical images of nanocapsules made from 50% PLA-C₈F₁₇ 50% PLA-PEG (total polymer mass 50 mg) obtained by TEM after negative staining (top) and cryo-TEM (bottom)

PFOB encapsulation efficiency

PFOB encapsulation efficiency in nanocapsules was then measured after freeze-drying to remove any remaining non-encapsulated PFOB droplets. In a general manner, formulations prepared from a higher polymer quantity present higher PFOB encapsulation efficiency (59 – 94%) than those obtained with 30 mg polymer (35 – 60%) (Figure 5). This result suggests that 30 mg of polymer might not be sufficient to engulf all the PFOB into nanocapsules (less than 60%).

At a high polymer amount, more PFOB is encapsulated in the nanocapsules made from mixtures with 50% PLA-PEG (74-94%) compared to pure PLA-PEG (59%). Although no significant difference can be observed between the non-fluorinated PLA-C₆H₁₃ and the fluorinated PLAs, the two highest amounts of encapsulated PFOB are reached with PLA-C₈F₁₇ (91%) and PLA-C₁₁F₂₃

(94%). This could indicate the presence of favorable fluorophilic interactions between PFOB and the perfluoroalkyl end chains, which might be stronger with increasing fluorinated chain length until a certain point. Indeed, the longest perfluoroalkyl end group leads to a lower PFOB encapsulation efficiency (74%). This might arise from stronger fluororous interactions between the longest perfluorinated end chains than between PFOB and the perfluorinated end groups, leading eventually to a higher proportion of nanoparticles rather than nanocapsules. Another possible explanation could be that steric hindrance between the fluorines (Oda et al., 2015) prevents their orientation towards the PFOB core to allow entrapping more PFOB.

At a low polymer quantity, the encapsulation efficiency increases with the length of the perfluorinated end group until PLA-C₈F₁₇, suggesting again the presence of favorable fluorophilic interactions between PFOB and the fluorinated end chains. Even though the fluorinated end group did not have an impact on the interfacial tension, it appears to play a role during nanocapsule formulation process, when mixed with 50% PLA-PEG. Such a finding is consistent with reports showing the successful use of fluorinated polymers to enhance the encapsulation efficiency of fluorinated molecules. Li et al. showed that functionalizing a methoxy-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) with a C₃F₇ end chain (mPEG-PCL-C₃F₇) allowed increasing the encapsulation efficiencies of perfluorohexane in nanocapsules from 4.3 to 14.7% (Li et al., 2014). In our case, due to its higher boiling point, PFOB is easier to encapsulate. Still, the end-functionalization with short perfluoroalkyl chains can improve its encapsulation efficiency. The 3-fold increase in encapsulation efficiency observed by Li et al. probably arises from the lower molar mass (PEG 2,000 g/mol and PCL 10,000 g/mol) than in our study, implying a higher proportion of fluorinated end groups therefore promoting stronger fluororous interactions and better encapsulation. The increase of encapsulation efficiency with fluorinated chain length was also observed by Koda et al., though for a very different system (Koda et al., 2015).

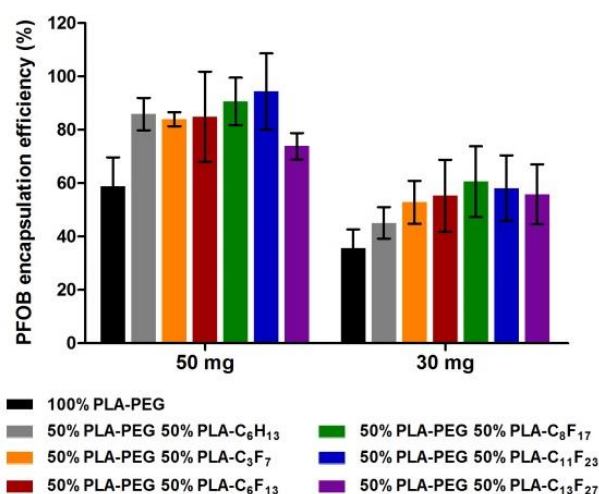


Figure 5: PFOB encapsulation efficiency in freeze-dried nanocapsules. Results are presented as mean \pm SD (n = 4)

Morphological features (thickness and core radius) of nanocapsules

Although capsules radii and shell thickness can be measured on cryo-TEM images, the number of imaged capsules is very limited. Small Angle Neutron Scattering (SANS) was therefore used to yield average geometrical parameters on a statistically significant number of nanocapsules. Two contrast matching conditions were used to focus either on the polymer shell or the PFOB core of the capsules.

Under PLA matching conditions, the scattering curves correspond to the fluctuations of the PFOB core. These curves displayed a q^{-4} variation indicating the presence of sharp interfaces between the PFOB core and the PLA shell. As nanocapsule sizes are large compared to the usual length scales probed with SANS measurements (0.5 – 50 nm), additional experiments were performed at very small angle on the high resolution TPA spectrometer to determine the radius of gyration R_g of the objects. Indeed, in the Guinier range ($q.R_g < 1$), the evolution of scattered intensity follows the equation $I(q) = I_0 \exp(-\frac{q^2 R_g^2}{3})$, allowing the determination of R_g . Very small angle measurements were performed only with samples under PLA matching conditions because the polymer shell of capsules under PFOB matching conditions did not scatter enough at very low q . One example of a satisfying fit with this Guinier approximation is given in Figure 6a while others are shown in supplementary material (Figure S9). R_g values of the PFOB core are displayed in Table 3. Since the PFOB core is a sphere as confirmed by microscopy images (Figure 4), the radius of the PFOB core was calculated as $R_{core}^2 = 5/3 R_g^2$. Surprisingly, the core radii are very large (between 110 and 200 nm) and not consistent with both DLS results (hydrodynamic radii of the whole capsules around 55 – 70 nm, Table 2) and cryo-TEM images (PFOB core radii from 30 to 80 nm, Figure 4). We assume that this arises from the presence of some non-encapsulated PFOB droplets which are much larger than the capsules as they tend to coalesce, and are not as visible in DLS since PFOB refractive index is close to the one of water (Tressaud and Haufe, 2008). Although we did not observe any PFOB droplets in cryo-TEM images for these samples, they had been observed previously with PLGA-PEG nanocapsules, with very large sizes and polydispersity (Diou et al., 2016).

Table 3: R_g values of the PFOB core obtained from fits with Guinier approximation in PLA matching condition and calculated R_{core} values of the PFOB core with the formula $(5/3)^{1/2}R_g$

Polymer	50 mg		30 mg	
	R_g (nm)	R_{core} (nm)	R_g (nm)	R_{core} (nm)
100% PLA-PEG	101 ± 12	130	86 ± 6	112
50% PLA-C ₆ H ₁₃ 50% PLA-PEG	123 ± 5	159	149 ± 4	192
50% PLA-C ₃ F ₇ 50% PLA-PEG	117 ± 4	151	124 ± 6	161
50% PLA-C ₆ F ₁₃ 50% PLA-PEG	115 ± 1	148	131 ± 5	170
50% PLA-C ₈ F ₁₇ 50% PLA-PEG	116 ± 1	150	124 ± 1	160
50% PLA-C ₁₃ F ₂₇ 50% PLA-PEG	105 ± 14	135	153 ± 7	198

Except for the 100% PLA-PEG sample, the PFOB radius is larger when the polymer quantity is lowered: 160 – 200 nm for 30 mg compared to 130 – 160 nm for 50 mg (Table 3). This finding is in agreement with the reduced PFOB encapsulation efficiencies at 30 mg (Figure 5), implying a higher proportion of non-encapsulated large PFOB droplets that increase the measured average PFOB radius in SANS. However, this trend is not confirmed with the capsules made from 100% PLA-PEG, which exhibit the lowest radii (130 nm at 50 mg, 112 nm at 30 mg) whereas they present low PFOB encapsulation efficiencies (Figure 5). One reason could be that the capsules made from 100% PLA-PEG are less resistant to the freeze-drying process used to measure the encapsulated PFOB content, whereas the capsules were not freeze-dried for SANS measurements. Indeed, De Jaeghere et al. reported that introduction of PEG to PLA nanoparticles induced their aggregation after freeze-drying. This aggregation was attributed to the tendency of PEG chains to crystallize during the freezing process, this phenomenon being PEG-concentration dependent (De Jaeghere et al., 1999). In our study, some 100% PLA-PEG capsules might break during freezing and lose their encapsulated PFOB during the drying process while fluorinated nanocapsules containing less PEG might be stronger.

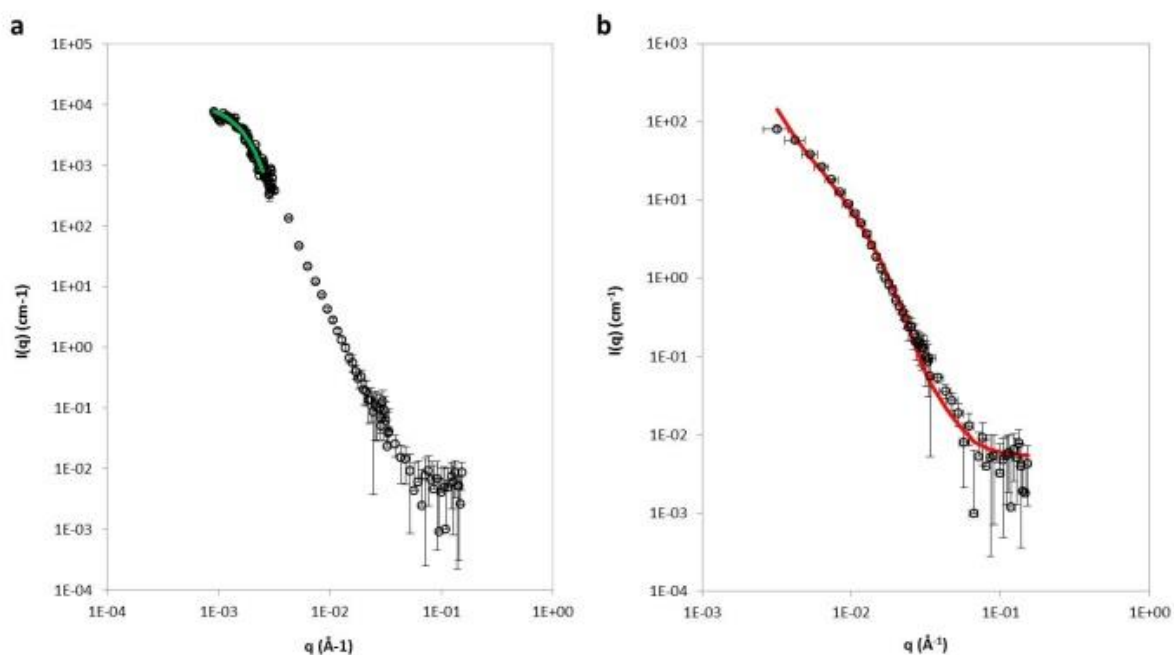


Figure 6: Experimental scattered intensity curves (black circles) of nanocapsules made from 50 mg of 50% PLA-C₆F₁₃ 50% PLA-PEG in (a) PLA contrast matching condition fitted with the Guinier approximation at $q < 0.0025 \text{ \AA}^{-1}$ (green line) and in (b) PFOB matching condition fitted with the vesicle model (red line)

Our results under PLA matching conditions therefore demonstrated the presence of large non-encapsulated PFOB droplets. PFOB contrast matching was then used to focus on the polymer shell. The scattering curves were fitted with the vesicle model, assuming a lognormal distribution for both thickness and core radius. One example of a satisfying fit is given in Figure 6b while others are shown in supplementary material (Figure S6).

The best fit parameters for all nanocapsules are displayed in Table 4. The mean PFOB core radius values are all in the same range (53 - 57 nm) with a high polydispersity, in agreement with TEM and cryo-TEM images (Figure 4). Core radii are much lower under PFOB matching conditions compared to PLA matching conditions, confirming that nanocapsules are smaller than non-encapsulated PFOB droplets. Thickness values are also similar for all samples (14.2 - 18.6 nm) and consistent with cryo-TEM images. For all polymers, the mean thickness is slightly reduced when the polymer amount is decreased, although the differences (1 - 4 nm) are not significant. At a low polymer quantity, the formulation made from 50% PLA-C₆F₁₃ 50% PLA-PEG presents the smallest thickness (14.2 nm) but the one made from 100% PLA-PEG is already very low (14.4 nm). We show here that it is not possible to significantly decrease the capsules shell thickness with these mixtures of polymers, as previously observed with PLGA-PEG (Diou et al., 2016).

Table 4: Geometrical parameters (thickness T and core radius R_{core}) of nanocapsules obtained by SANS curves fitting with the vesicle model

Polymer	50 mg		30 mg	
	$T \pm \sigma_T$ (nm)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)	$T \pm \sigma_T$ (nm)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)
100% PLA-PEG	15.8 ± 4.1	56 ± 27	14.4 ± 4.0	56 ± 27
50% PLA-C ₆ H ₁₃ 50% PLA-PEG	18.6 ± 5.9	55 ± 27	17.1 ± 4.4	56 ± 28
50% PLA-C ₃ F ₇ 50% PLA-PEG	18.0 ± 5.8	54 ± 27	16.8 ± 4.4	56 ± 27
50% PLA-C ₆ F ₁₃ 50% PLA-PEG	18.0 ± 5.5	53 ± 27	14.2 ± 3.8	56 ± 28
50% PLA-C ₈ F ₁₇ 50% PLA-PEG	17.4 ± 4.9	54 ± 27	15.8 ± 4.0	57 ± 28
50% PLA-C ₁₃ F ₂₇ 50% PLA-PEG	16.4 ± 4.8	53 ± 26	14.8 ± 3.5	56 ± 28

3.4. Cytotoxicity studies

The biological inertness of perfluorocarbons is well documented (Krafft and Riess, 2007). However, perfluorinated chains are often associated to toxicity due to their low excretion profiles and persistence in the organism, especially for linear perfluorinated chains longer than C₇F₁₅ (Barmantlo et al., 2015; Riess, 2009; Zaggia and Ameduri, 2012). The influence of the perfluorinated end group on cellular viability was evaluated on two different cell lines, human umbilical vein endothelial (HUVEC) and murine macrophages (J774.A1) using an MTT assay. The nanocapsules were incubated at concentrations ranging from 0.01 to 10 mg/mL during 24h and 72h. At both incubation times, cell viability of HUVEC slightly decreases as nanocapsule concentration increases, but remains above 60% for all formulations even at high concentrations (Figure 7). Regarding J774.A1, after 24h incubation, cellular viability decreases down to 50% at 10 mg/mL, a huge concentration that is very unlikely to be reached *in vivo*. The viability decrease is even more pronounced after 72h incubation, with values reaching 20% cell viability at 10 mg/mL. The differences observed between the two cell lines can arise from the ability of J774.A1 macrophages to internalize faster and higher amounts of NCs than HUVEC (Reul et al., 2012). For both cell types and both incubation time, within experimental error the fluorinated groups do not induce any specific toxicity in comparison to samples made from non-fluorinated polymers. However, additional cytotoxicity experiments after degradation of the polymers at 37°C are required to evaluate the possible toxicity of the degradation products, as well as *in vivo* studies to study the effects arising from a prolonged exposure to NCs.

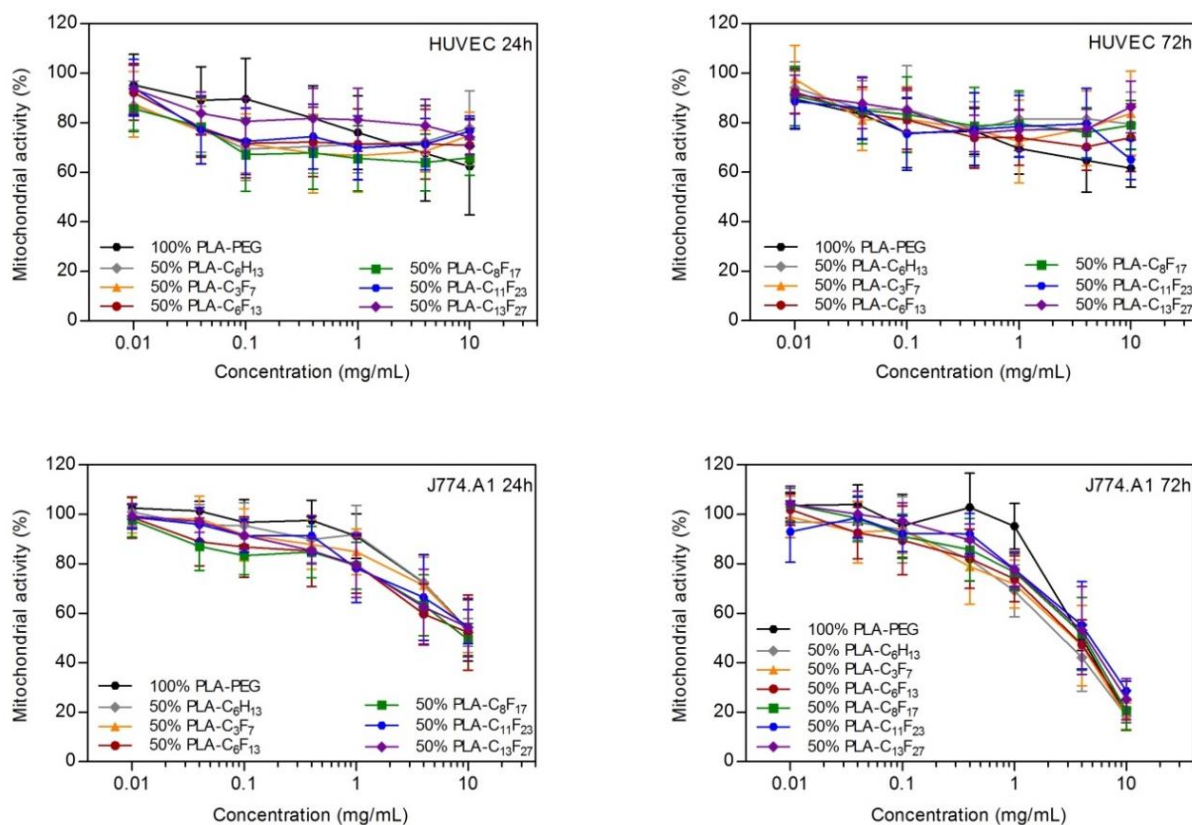


Figure 7: Viability assays on HUVEC (top) and J774.A1 (bottom) cell lines after 24h (left) and 72h (right) incubation with nanocapsules of increasing concentration. Results are presented as mean \pm SD ($n = 2$)

3.5. In vitro ultrasound imaging

Although the shell thickness was not significantly reduced, ultrasound imaging was performed on the two samples presenting the lowest thickness values to evaluate the potential impact of the fluorinated tail on the signal.

NCs made from 30 mg 50% PLA-C₆F₁₃ 50% PLA-PEG and 100% PLA-PEG were therefore imaged *in vitro* at 37°C using ultrafast imaging in fundamental mode. The backscattered intensity was 10 times higher with nanocapsules containing the fluorinated polymer (1.2×10^3 arbitrary units, a. u.) than with nanocapsules of pure PLA-PEG (0.1×10^3 a. u.) (Figure 8). Given the similar thickness values (14.2 and 14.4 nm) of the two samples, the difference observed in the ultrasound response cannot originate from a difference of thickness. One possibility could be the difference (1/2 lower) of percentage of PLA-PEG in the formulation. Indeed, Jablonowski et al. reported that adding PLA-PEG to PLA-shelled air microbubbles considerably reduces the echogenicity of the bubbles, in a dose-dependent manner (Jablonowski et al., 2016). However, the prime difference between the two types of NCs lies in the presence of the fluorine tail, which allows encapsulating more PFOB (encapsulation efficiency of 55%) than in pure PLA-PEG NCs (36%). Moreover, the scattering cross section of a particle is defined as $SCS =$

$\frac{4\pi}{9} k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{3(\rho_d - \rho)^2}{4(\rho_d + \rho)^2} \right]$ where k is the wavenumber, R is the radius of the particle, κ_d and κ the compressibilities of respectively the particle and the medium, ρ_d and ρ the densities of respectively the particle and the medium (Dejong et al., 1991). A contrast agent will therefore backscatter ultrasound waves more effectively if its radius is larger and if its physical properties (compressibility and density) differ a lot from the ones of the surrounding medium. Since the two samples have similar radii (58 and 62 nm), differences of compressibility and density of the NCs might also explain the difference of ultrasound contrast enhancement. Indeed, the high density of the fluorinated chain (density of corresponding fluorinated initiator is 1.6 g.cm⁻³) increases the difference of density between the fluorinated NCs and surrounding water as compared to pure PLA-PEG NCs. The density of PEG 5000 g/mol is approximately 1.2 g.cm⁻³ and it is 1.28 g.cm⁻³ for PLGA (Astafyeva et al., 2015). To fully understand this echogenicity improvement in presence of fluorinated polymer, an exhaustive study is being carried as function of the fluorinated chain length and also by varying the ratio PLA-C_xF_{2x+1} / PLA-PEG.

One can also observe that the backscattered intensity was much lower with NCs than with commercial Sonovue microbubbles (200 – 300 x 10³ a.u.), that we used as control to allow a comparison using these particular set-up and ultrasound parameters (Figure 8). Since Sonovue microbubbles have a 20-fold larger radius than the formulated NCs and are filled with gaseous sulphur hexafluoride, achieving the same level of ultrasound contrast enhancement with liquid-filled nano-sized agents is, according to the formula above, difficult. Despite the lower echogenicity of fluorinated nanocapsules compared to microbubbles, they possess the potential to accumulate into the tumors by the EPR effect and induce ultrasound contrast enhancement to facilitate tumor diagnosis and characterization (Boissenot et al., 2016; Diou et al., 2012). This requires *in vivo* studies in the future.

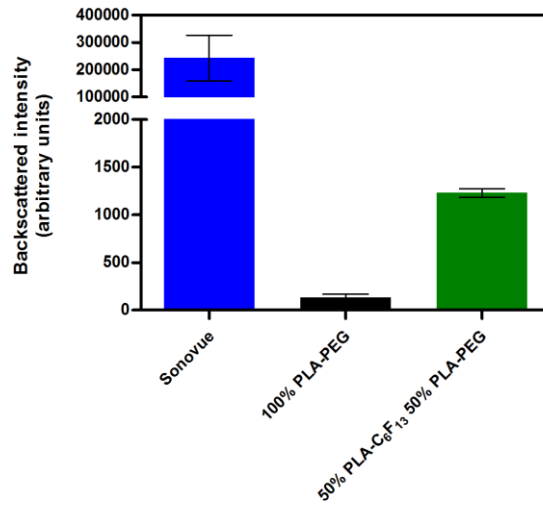


Figure 8 : Ultrasound backscattered intensity in fundamental mode for NCs made with low polymer amount (30 mg) and Sonovue microbubbles.

4. Conclusion

Perfluorinated end-capped polyesters with distinct perfluoroalkyl chain lengths were successfully synthesized and formulated into PEGylated nanocapsules of PFOB. These polymers do not induce any specific cytotoxicity compared to non-fluorinated PLAs. We demonstrate here that a linear fluorinated chain of length ranging from C_3F_7 to $C_{13}F_{27}$ at the extremity of a 20,000 g/mol PLA block does not significantly improve the wetting of the polymer layer at the PFOB/aqueous phase interface to allow reducing the thickness of the capsules containing 50% PLA-PEG, as previously observed with pure PLGA-PEG (Diou et al., 2016). Despite similar thicknesses, fluorinated chains up to C_8F_{17} favor the increase of PFOB encapsulation efficiency. The combination of better PFOB encapsulation and an increase of nanocapsule shell density due to fluorination favors better ultrasound contrast enhancement of fluorinated nanocapsules compared to those obtained with pure PLA-PEG. Although this contrast enhancement was much lower than with commercial Sonovue microbubbles, these nano-sized capsules hold greater potential to accumulate into the tumors by the EPR effect and should allow tumor diagnosis.

5. Acknowledgements

Authors would like to thank Mehrez Sghaier and Najet Yagoubi from Laboratoire Matériaux et Santé (EA401, Univ. Paris-Sud) for DSC experiments and Stéphanie Denis (Institut Galien Paris-Sud) for her help with cell culture. This work has been supported by the Region Ile-de-France in the framework of DIM Nano-K. The present work has benefited also from the core facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11-IDEX-0003-02). SANS analysis was performed using SasView software, originally developed by the DANSE project under NSF award DMR-0520547. Authors acknowledge financial support from ANR (Investissements d’Avenir, Nanobiotechnologies, ANR-10-NANO-06-04). Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- Astafyeva, K., Thomas, J.L., Coulouvrat, F., Guedra, M., Diou, O., Mousnier, L., Tsapis, N., Urbach, W., Taulier, N., 2015. Properties of theranostic nanoparticles determined in suspension by ultrasonic spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 25483–25493.
- Barmantlo, S.H., Stel, J.M., van Doom, M., Eschauzier, C., de Voogt, P., Kraak, M.H.S., 2015. Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 198, 47–53.
- Böhmer, M.R., Schroeders, R., Steenbakkens, J.A.M., de Winter, S.H.P.M., Duineveld, P.A., Lub, J., Nijssen, W.P.M., Pikkemaat, J.A., Stapert, H.R., 2006. Preparation of monodisperse polymer particles and capsules by ink-jet printing. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 289, 96–104.
- Boissenot, T., Fattal, E., Bordat, A., Houvenagel, S., Valette, J., Chacun, H., Gueutin, C., Tsapis, N., 2016. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108, 136–144.
- Brulet, A., Lairez, D., Lapp, A., Cotton, J.P., 2007. Improvement of data treatment in small-angle neutron scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 165–177.
- Chen, C.C., Chueh, J.Y., Tseng, H., Huang, H.M., Lee, S.Y., 2003. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials* 24, 1167–1173.
- Chlon, C., Guedon, C., Verhaagen, B., Shi, W.T., Hall, C.S., Lub, J., Bohmer, M.R., 2009. Effect of Molecular Weight, Crystallinity, and Hydrophobicity on the Acoustic Activation of Polymer-Shelled Ultrasound Contrast Agents. *Biomacromolecules* 10, 1025–1031.
- Correas, J.M., Bridal, L., Lesavre, A., Mejean, A., Claudon, M., Helenon, O., 2001. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur. Radiol.* 11, 1316–1328.
- Couture, O., Bannouf, S., Montaldo, G., Aubry, J.F., Fink, M., Tanter, M., 2009. Ultrafast Imaging of Ultrasound Contrast Agents. *Ultrasound Med. Biol.* 35, 1908–1916.
- Cui, W.J., Bei, J.Z., Wang, S.G., Zhi, G., Zhao, Y.Y., Zhou, X.S., Zhang, H.W., Xu, Y., 2005. Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *J. Biomed. Mater. Res. Part B-Applied Biomater.* 73B, 171–178.
- De Jaeghere, F., Allemann, E., Leroux, J.C., Stevels, W., Feijen, J., Doelker, E., Gurny, R., 1999. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: Influence on physical stability and in vitro cell uptake. *Pharm. Res.* 16, 859–866.
- Dejong, N., Tencate, F.J., Lancee, C.T., Roelandt, J.R.T.C., Bom, N., 1991. Principles and Recent Developments in Ultrasound Contrast Agents. *Ultrasonics* 29, 324–330.
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N., Fattal, E., 2010. Liquid Perfluorocarbons as Contrast Agents for Ultrasonography and F-19-MRI. *Pharm. Res.* 27, 1–16.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Fattal, E., Delplace, V., Mackiewicz, N., Nicolas, J., Meriaux, S., Valette, J., Robic, C., Tsapis, N., 2014. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 170–177.
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E., 2012. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19F MRI. *Biomaterials* 33, 5593–5602.
- El-Sherif, D.M., Wheatley, M.A., 2003. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66, 347–55.
- Essa, S., Rabanel, J.M., Hildgen, P., 2010. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75, 96–106.
- Giuntoli, G., Rosi, L., Frediani, M., Sacchi, B., Frediani, P., 2012. Fluoro-functionalized PLA polymers as potential water-repellent coating materials for protection of stone. *J. Appl. Polym. Sci.* 125, 3125–3133.
- Henderson, T.J., 2002. Quantitative NMR Spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: Purity determinations for military nerve agents. *Anal. Chem.* 74, 191–198.
- Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2002. Synthesis and self-assembly of fluorinated block copolymers. *J. Polym. Sci. Part a-Polymer Chem.* 40, 1–8.
- Jablonowski, L.J., Alfego, D., Andorko, J.I., Eisenbrey, J.R., Teraphongphom, N., Wheatley, M.A., 2016. Balancing stealth and echogenic properties in an ultrasound contrast agent with drug delivery

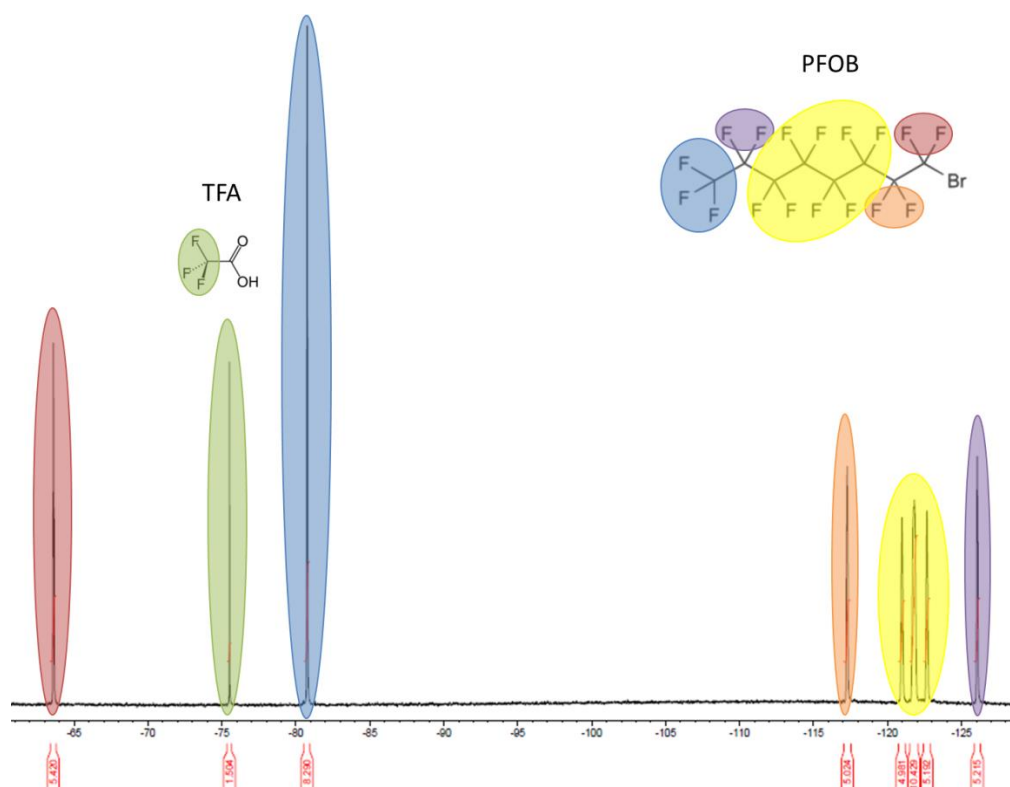
- potential. *Biomaterials* 103, 197–206.
- Koda, Y., Terashima, T., Sawamoto, M., 2015. Fluorinated microgel star polymers as fluorinated nanocapsules for the encapsulation and release of perfluorinated compounds. *Polym. Chem.* 6, 5663–5674.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2009. Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds—Unique “Apolar” Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering. *Chem. Rev.* 109, 1714–1792.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2007. Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses. *J. Polym. Sci. Part a-Polymer Chem.* 45, 1185–1198.
- Lee, W.K., Losito, I., Gardella, J.A., Hicks, W.L., 2001. Synthesis and surface properties of fluorocarbon end-capped biodegradable polyesters. *Macromolecules* 34, 3000–3006.
- Leroy, V., Norisuye, T., 2016. Investigating the Existence of Bulk Nanobubbles with Ultrasound. *Chemphyschem* 17, 2787–2790.
- Li, H., Wang, J., Wang, P., Zheng, J., Song, F., Yin, T., Zhou, G., Zheng, R., Zhang, C., 2014. Phase-transition contrast nanocapsules triggered by low-intensity ultrasound. *Chem. Commun.* 50, 15163–15166.
- Lucke, A., Tessmar, J., Schnell, E., Schmeer, G., Gopferich, A., 2000. Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials* 21, 2361–2370.
- Martin, O., Averous, L., 2001. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer (Guildf)*. 42, 6209–6219.
- Néstor, M.M., Kei, N.P.E., Guadalupe, N.A.M., Elisa, M.E.S., Adriana, G.Q., David, Q.G., 2011. Preparation and in vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging. *Ultrasonics* 51, 839–845.
- Oda, Y., Suzuki, R., Mori, T., Takahashi, H., Natsugari, H., Omata, D., Unga, J., Uruga, H., Sugii, M., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F., Hashida, M., Maruyama, K., 2015. Development of fluorinated lipid-based nanobubbles for efficiently containing perfluoropropane. *Int. J. Pharm.* 487, 64–71.
- Paefgen, V., Doleschel, D., Kiessling, F., 2015. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* 6.
- Park, S.J., Kim, S.H., 2004. Preparation and characterization of biodegradable poly (1-lactide)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. *J. Colloid Interface Sci.* 271, 336–341.
- Piorkowska, E., Kulinski, Z., Galeski, A., Masirek, R., 2006. Plasticization of semicrystalline poly(L-lactide) with poly(propylene glycol). *Polymer (Guildf)*. 47, 7178–7188.
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B.T., Beloeil, J.C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S.L., Fattal, E., 2008. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 18, 2963–2971.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.
- Reul, R., Tsapis, N., Hillaireau, H., Sancey, L., Mura, S., Recher, M., Nicolas, J., Coll, J.L., Fattal, E., 2012. Near infrared labeling of PLGA for in vivo imaging of nanoparticles. *Polym. Chem.* 3, 694–702.
- Riess, J.G., 2009. Highly fluorinated amphiphilic molecules and self-assemblies with biomedical potential. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 294–304.
- Riess, J.G., 2002. Fluorinated micro- and nanophases with a biomedical perspective. *Tetrahedron* 58, 4113–4131.
- Salem, A.K., Cannizzaro, S.M., Davies, M.C., Tendler, S.J.B., Roberts, C.J., Williams, P.M., Shakesheff, K.M., 2001. Synthesis and characterisation of a degradable poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymer with biotinylated end groups. *Biomacromolecules* 2, 575–580.
- Sanna, V., Pintus, G., Bandiera, P., Anedda, R., Punzoni, S., Sanna, B., Migaletto, V., Uzzau, S., Sechi, M., 2011. Development of Polymeric Microbubbles Targeted to Prostate-Specific Membrane Antigen as Prototype of Novel Ultrasound Contrast Agents. *Mol. Pharm.* 8, 748–757.
- Sasview software [WWW Document], n.d. URL <http://www.sasview.org> (accessed 3.1.16).
- Schneider, M., Arditi, M., Barrau, M.B., Brochot, J., Broillet, A., Ventrone, R., Yan, F., 1995. BR1: A New Ultrasonographic Contrast Agent Based on Sulfur Hexafluoride-Filled Microbubbles. *Invest. Radiol.* 30, 451–457.
- Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M., Riess, J.G., 2003. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew. Chemie-International Ed.* 42, 3218–3235.
- Tressaud, A., Haufe, G., 2008. Fluorine and Health Molecular Imaging, *Biomedical Materials and Pharmaceuticals Preface*. *Fluor. Heal. Mol. Imaging, Biomed. Mater. Pharm.*

- Yang, P., Li, D., Jin, S., Ding, J., Guo, J., Shi, W.B., Wang, C.C., 2014. Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials* 35, 2079–2088.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1995. Vascular-Permeability in a Human Tumor Xenograft - Molecular-Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Res.* 55, 3752–3756.
- Zaggia, A., Ameduri, B., 2012. Recent advances on synthesis of potentially non-bioaccumulable fluorinated surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 188–195.
- Zha, Z.B., Wang, J.R., Zhang, S.H., Wang, S.M., Qu, E., Zhang, Y.Y., Dai, Z.F., 2014. Engineering of perfluorooctylbromide polypyrrole nano-/microcapsules for simultaneous contrast enhanced ultrasound imaging and photothermal treatment of cancer. *Biomaterials* 35, 287–293.
- Zhao, Y.J., Song, W.X., Wang, D., Ran, H.T., Wang, R.H., Yao, Y.Z., Wang, Z.G., Zheng, Y.Y., Li, P., 2015. Phase-Shifted PFH@PLGA/Fe₃O₄ Nanocapsules for MRI/US Imaging and Photothermal Therapy with near-Infrared Irradiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 14231–14242.

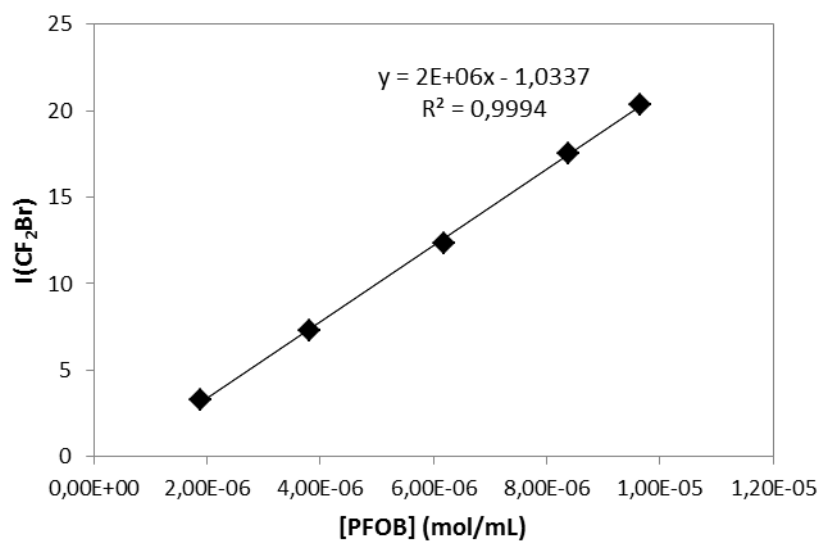
Supporting information

Calculation of PFOB encapsulation efficiency

A calibration curve with five solutions of known concentration of PFOB in chloroform was established. PFOB solutions were collected and introduced into a usual 5mm-NMR sample tube loaded with a stem coaxial insert containing TFA in D₂O as an external standard ([TFA]= 9.4 μmol.mL⁻¹). The same insert was used for all solutions and the integration of the TFA peak at -76.5 ppm was set to 3. A typical ¹⁹F NMR spectrum is shown below.



Integrations of the peak at -64.7 ppm corresponding to the CF₂Br group of PFOB were drawn as a function of PFOB concentration. A typical calibration curve is shown below.



For each NCs sample, the integration of the TFA peak was set to 3 and the resulting integration of the CF₂Br peak was used to calculate the concentration of PFOB in the tube with the equation of the curve, and therefore the amount of encapsulated PFOB n_{PFOB} . Absolute encapsulation efficiency η_{encaps} was then calculated as follows:

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

where m_{PFOB}^{feed} , $m_{polymer}^{feed}$ and m_{SC}^{feed} are the initial masses of the components introduced during NCs preparation, m_{NC} corresponds to the mass of NCs recovered after freeze-drying and M_{PFOB} is the molar mass of PFOB (498.96 g/mol).

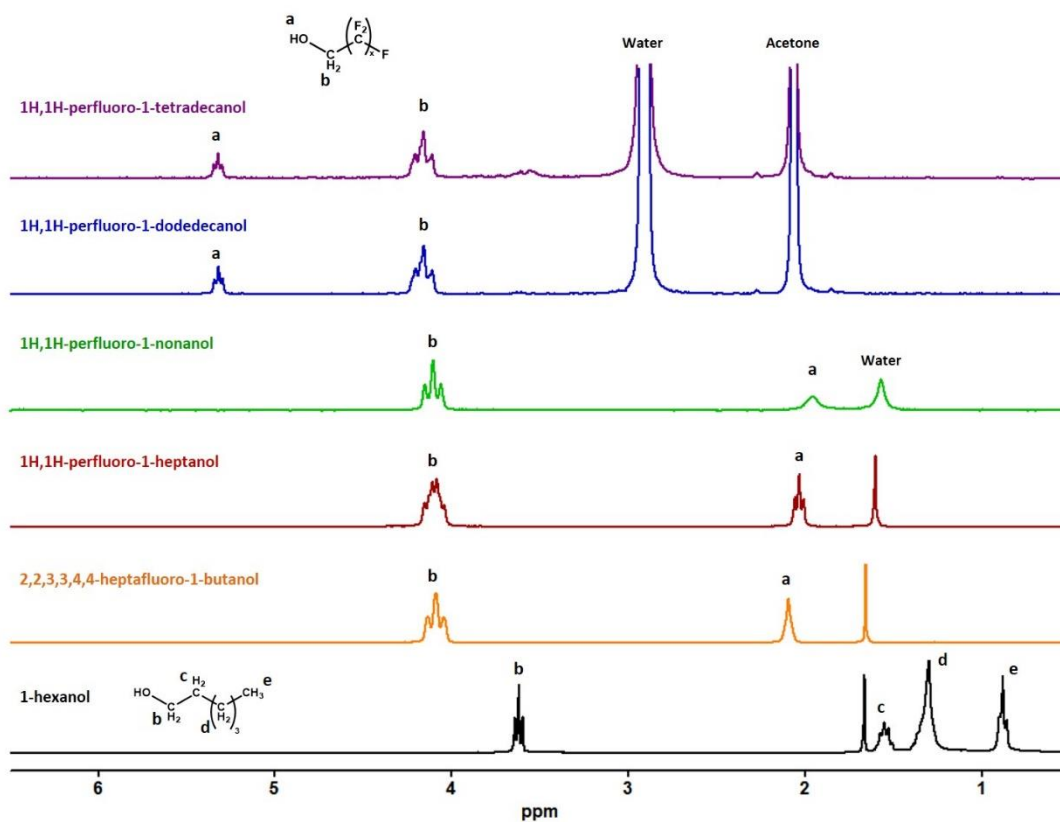


Figure S1: ¹H NMR spectra of the initiators used for polymers synthesis. All initiators were dissolved in CDCl₃ except 1H, H-perfluoro-1-tetradecanol and 1H,1H-perfluoro-1-dodecanol that were dissolved in acetone-d₆

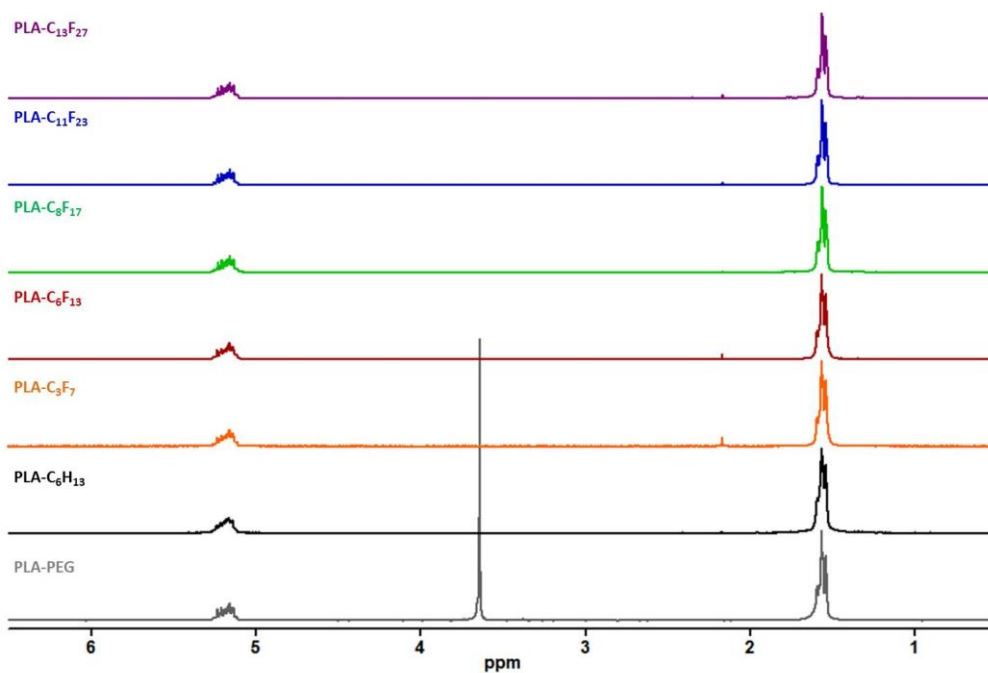


Figure S2: ^1H NMR spectra of all synthesized polymers in CDCl_3

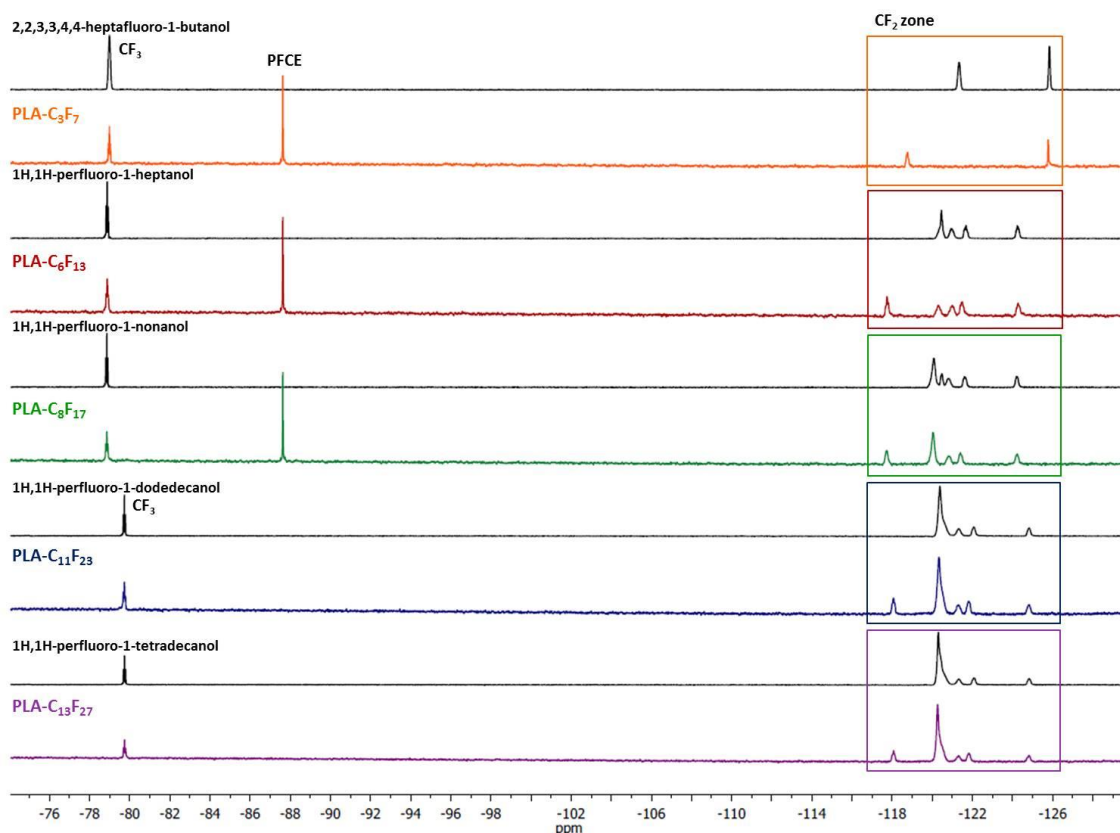


Figure S3: ^{19}F NMR spectra of the fluorinated polymers (color) and their corresponding fluorinated initiators (black) showing the shifts in the CF_2 zone. PLA- C_3F_7 , PLA- C_6F_{13} and PLA- C_8F_{17} were dissolved in CDCl_3 with PFCE, their corresponding initiators in CDCl_3 without PFCE. PLA- $\text{C}_{11}\text{F}_{23}$ and PLA- $\text{C}_{13}\text{F}_{27}$ and their corresponding fluorinated initiators were dissolved in acetone- d_6

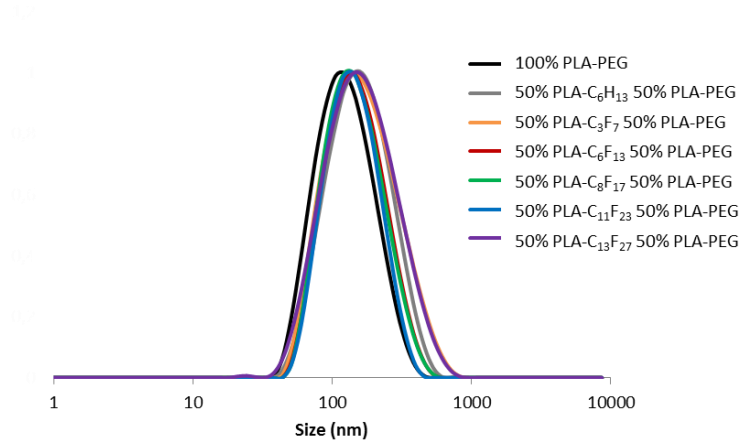


Figure S4: DLS intensity distribution of nanocapsules made from 50 mg of polymer

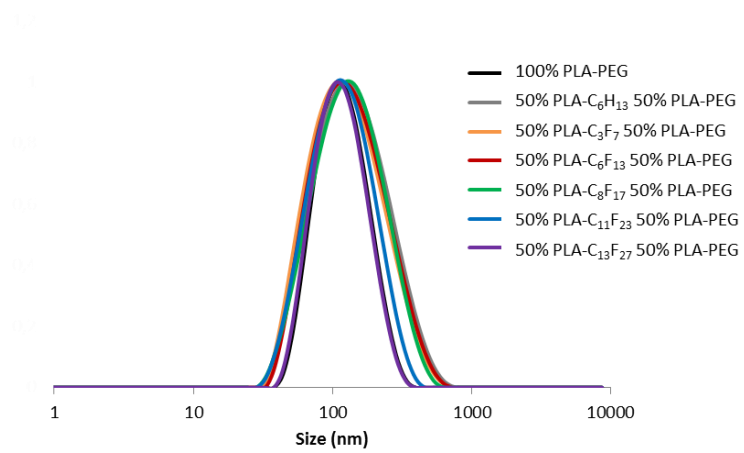


Figure S5: DLS intensity distribution of nanocapsules made from 30 mg of polymer

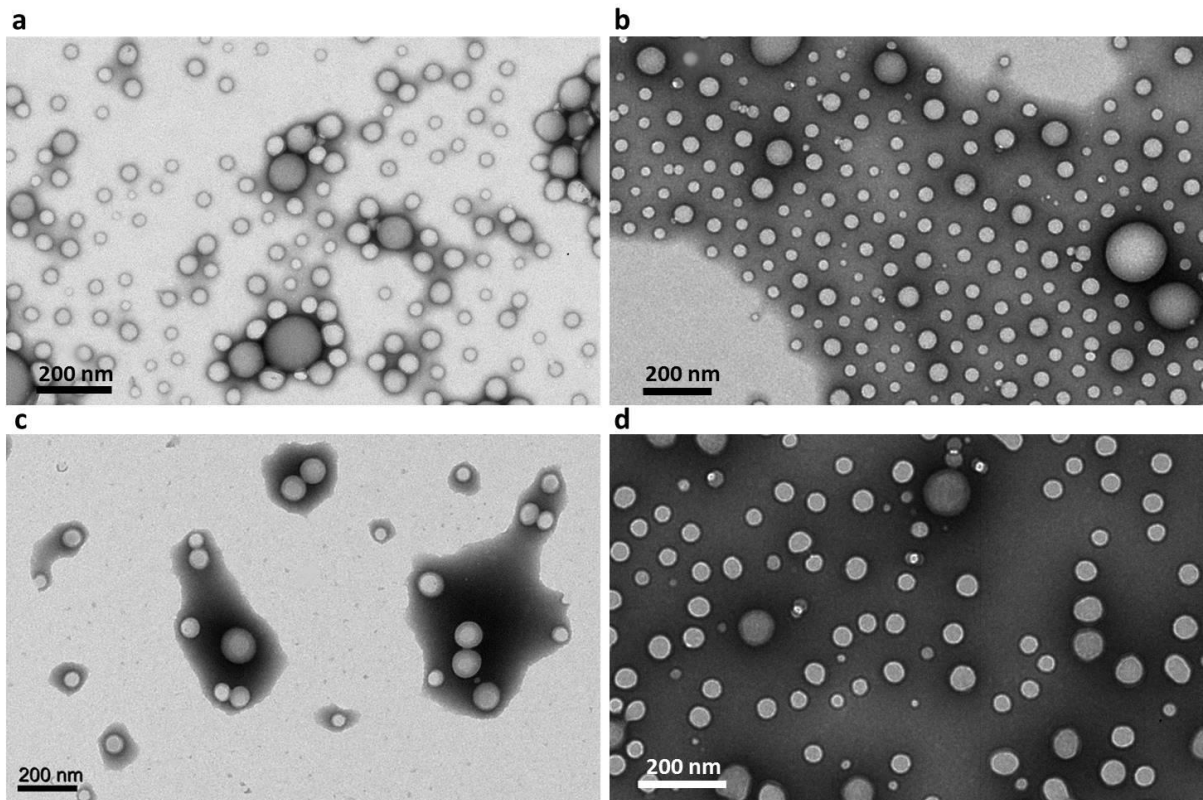


Figure S6: TEM images of NCs made from 50% PLA-C₈F₁₇ / 50% PLA-PEG at 50 mg (a) and 30 mg (b), and NCs made from 100% PLA-PEG at 50 mg (c) and 30 mg (d) with negative staining

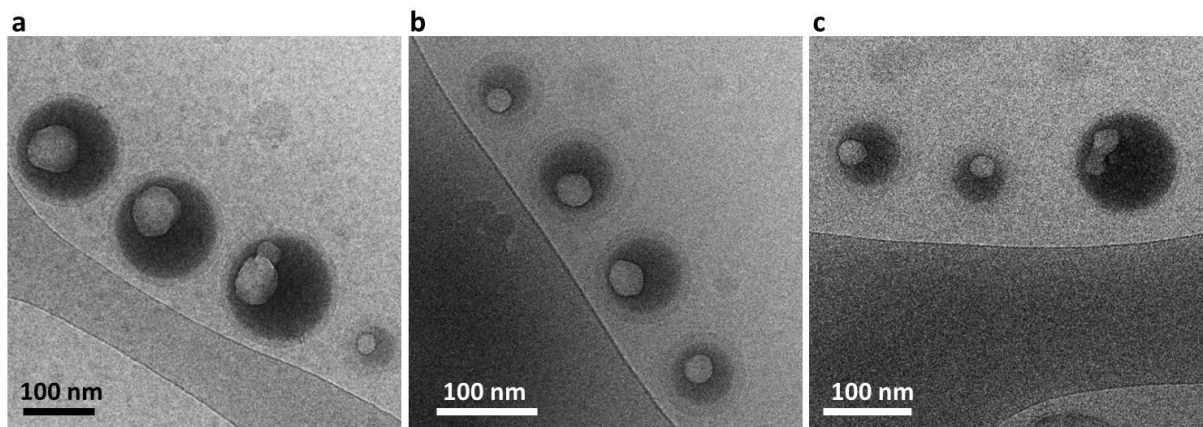
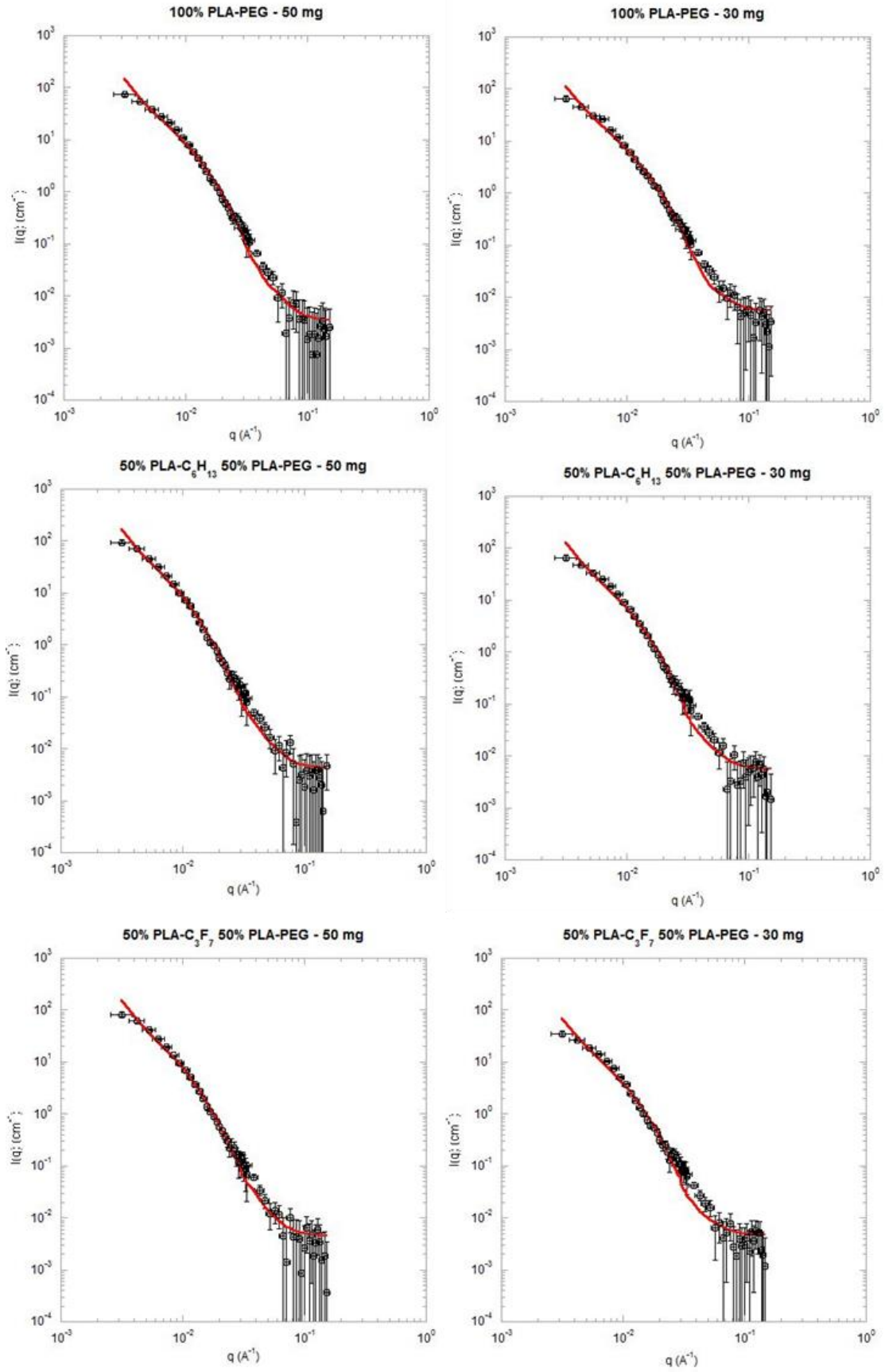


Figure S7: Cryo-TEM images of NCs made from 50% PLA-C₈F₁₇ / 50% PLA-PEG at 50 mg (a) and NCs made from 100% PLA-PEG at 50 mg (b) and 30 mg (c)



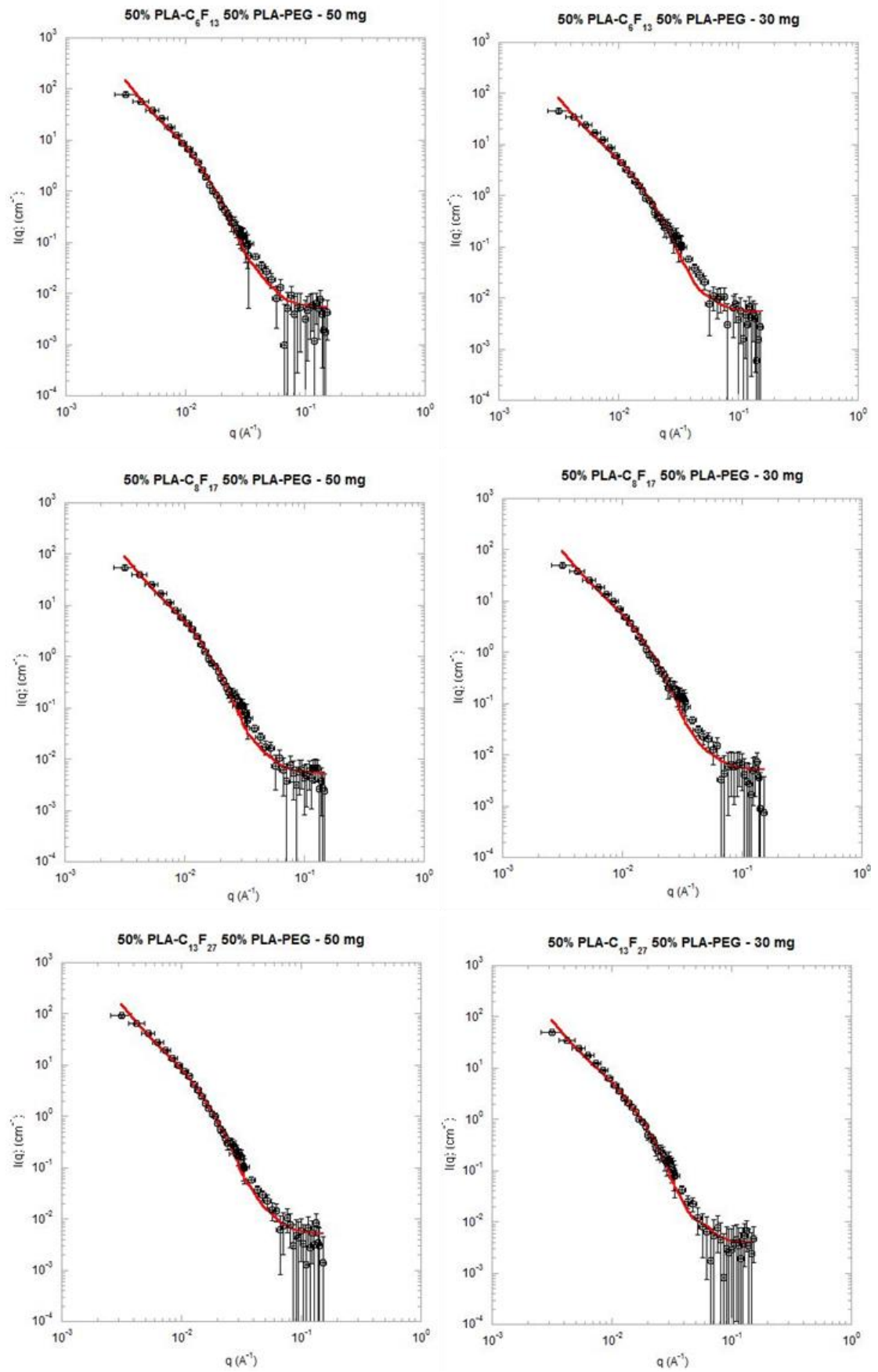
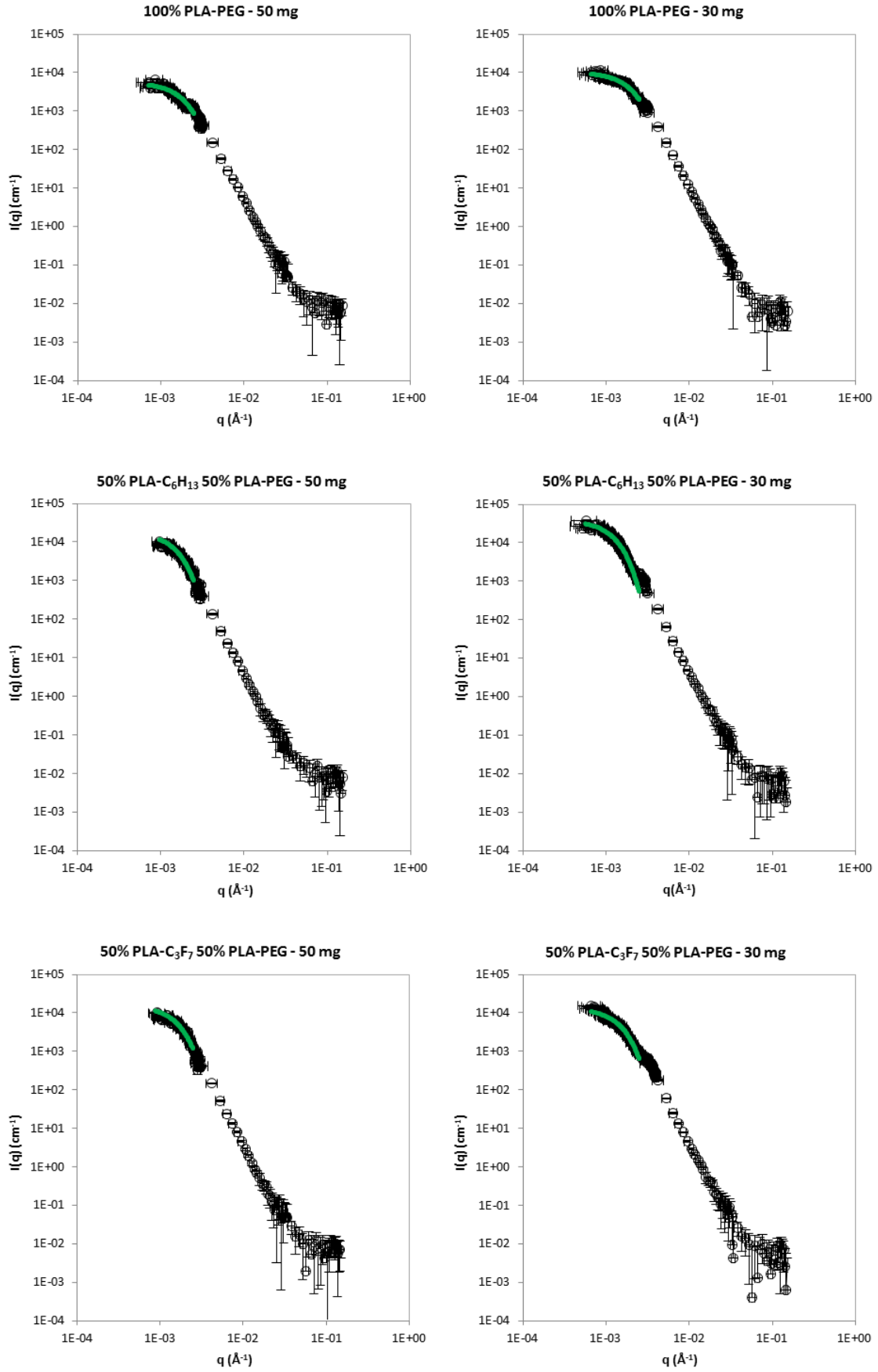


Figure S8: Experimental scattered intensity curves (black circles) in PFOB matching condition fitted with the vesicle model (red line)



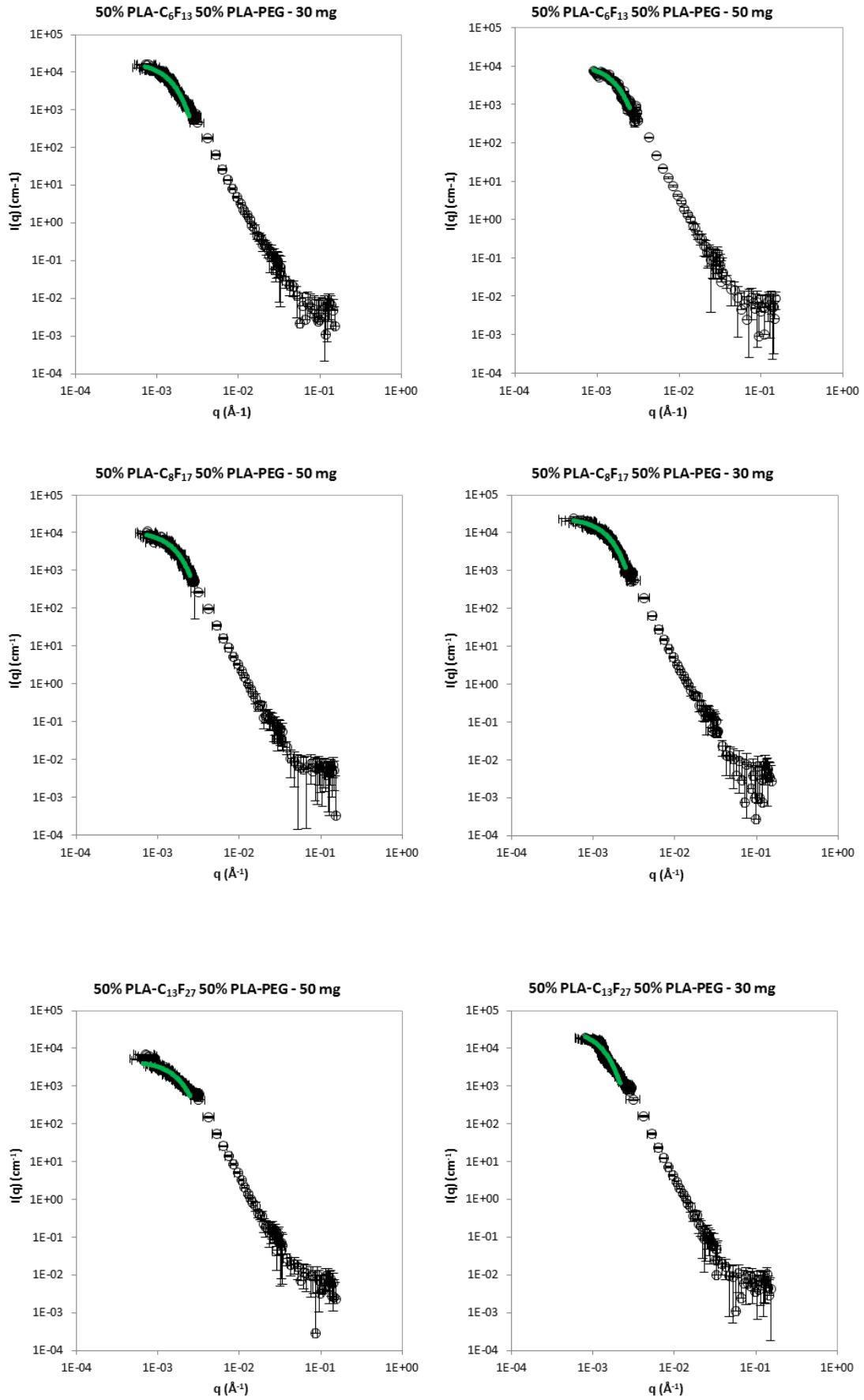


Figure S9: Experimental scattered intensity curves (black circles) in PLA matching condition fitted with the Guinier approximation for $q < 0.0025 \text{ \AA}^{-1}$ (green line)

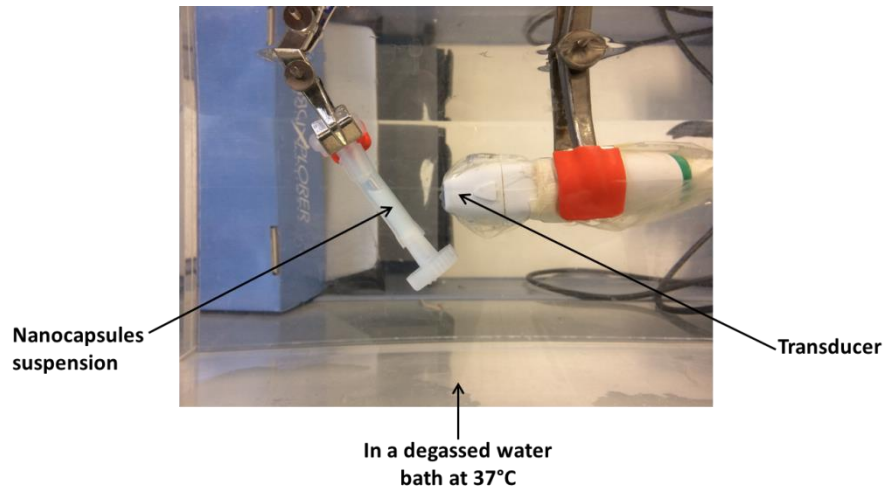


Figure S10 : Picture of the ultrasound imaging set-up

Chapitre 2

Synthèse de polymères triblocs hydrophiles – lipophiles – fluorophiles pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores

Bien que les PLAs fonctionnalisés par des terminaisons perfluorées linéaires aient permis de former des nanocapsules plus échogènes que les nanocapsules de PLA-PEG pur, ces nanocapsules restent fortement moins échogènes que les microbulles actuellement utilisées en clinique. Par ailleurs, l'utilisation de ces polymères n'a pas permis de diminuer l'épaisseur de la coque des nanocapsules. A ce stade du projet, il apparaissait nécessaire de synthétiser d'autres polymères pouvant permettre de diminuer l'épaisseur des coques et d'améliorer davantage l'échogénicité des nanocapsules.

Dans ce deuxième chapitre, nous avons synthétisé des copolymères triblocs de poly(éthylène glycol)-*b*-polylactide-*b*-poly(méthacrylate de 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodécyl) (PEG-PLA-PFMA_x) avec une structure en peigne et un nombre croissant de chaînes perfluorées pendantes ($x = 5, 10$ ou 20). La synthèse a été réalisée en combinant les techniques de polymérisation par ouverture de cycle et de polymérisation radicalaire par transfert d'atomes. Les mesures de tension interfaciale ont confirmé l'adsorption de ces polymères fluorés à l'interface PFOB / solvant organique, quel que soit le nombre de chaînes perfluorées. Nous avons ensuite formulé les nanocapsules de PFOB en diminuant la masse de polymère dans l'objectif de diminuer l'épaisseur des coques. L'efficacité d'encapsulation du PFOB dans ces nanocapsules fluorées est ainsi presque doublée à faible masse de polymère par rapport aux nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. En outre, la morphologie des nanocapsules est fortement influencée par le nombre de chaînes perfluorées et par la quantité de polymère utilisée pour la formulation, menant à des capsules avec 2 ou 3 cœurs de PFOB à une quantité élevée de PEG-PLA-PFMA₂₀ et à des capsules avec un seul cœur et une coque fine à faible quantité de polymère fluoré. Les mesures de SANS ont en effet confirmé que l'épaisseur est réduite jusqu'à 11 nm avec PEG-PLA-PFMA₁₀. Ces nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ diffusent l'intensité ultrasonore plus efficacement que les nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. Par ailleurs, ces polymères fluorés ainsi que leurs produits de dégradation n'entraînent aucune cytotoxicité *in vitro* par rapport au PEG-PLA. Les résultats de ce chapitre montrent que l'ajout d'un bloc fluoré en peigne dans du PEG-PLA permet de formuler des agents de contraste prometteurs pour l'imagerie ultrasonore des tumeurs.

Comblike fluorophilic-lipophilic-hydrophilic polymers for nanocapsules as ultrasound contrast agents

Sophie Houvenagel^a, Laurence Moine^{a*}, Guilherme Picheth^a, Camille Dejean^b, Annie Brûlet^c, Alexis Chennevière^c, Vincent Faugeras^d, Olivier Couture^d, Nicolas Huang^a, Nicolas Tsapis^{a*}

^a Institut Galien Paris-Sud, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

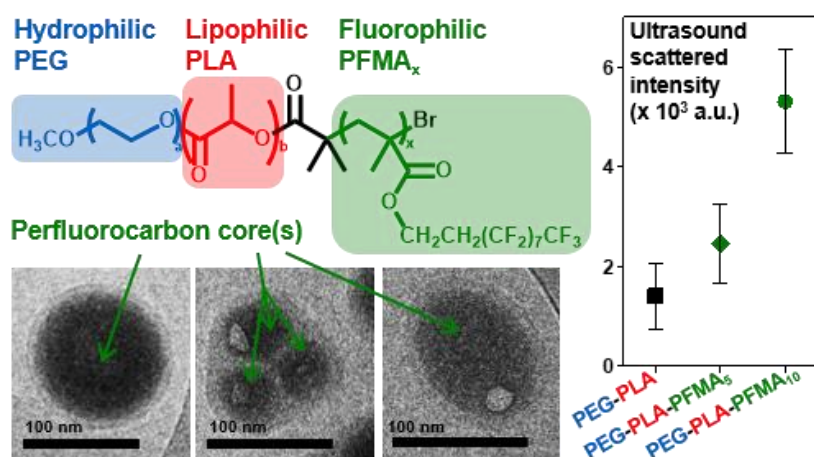
^b BioCIS, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

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

^d Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), Paris, France

* Corresponding authors at: CNRS, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail address: laurence.moine@u-psud.fr (Laurence Moine) and nicolas.tsapis@u-psud.fr (Nicolas Tsapis)

Graphical abstract



Keywords

Comb-like fluorinated polymers, fluorous interactions, nanocapsules, perfluorocarbons, ultrasound contrast agents

Abstract

We have synthesized triblock copolymers of poly(ethylene glycol)-polylactide-poly(1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodecyl methacrylate) (PEG-PLA-PFMA) with distinct numbers of perfluorinated pendant chains (5, 10 or 20) by a combination of ring-opening polymerization and atom transfer radical polymerization. These polymers were used to formulate nanocapsules (NCs) of 110-150 nm diameter containing a perfluorooctyl bromide (PFOB) core to be used as ultrasound contrast agents (UCAs). Interfacial tension measurements confirmed the adsorption of these fluorinated polymers at the PFOB/organic solvent interface, regardless of the number of perfluorinated chains. These fluororous interactions led to a 2-fold increase in PFOB encapsulation efficiency in fluorinated NCs as compared to plain PEG-PLA NCs. The morphology of NCs was strongly influenced by the number of perfluorinated chains and the amount of polymer used for formulation, leading to capsules with 2 or 3 PFOB cores at high PEG-PLA-PFMA₂₀ amount and NCs with a single core and a thinner shell at low fluorinated polymer amount. SANS measurements confirmed the observed reduction of mean shell thickness down to 11 nm for PEG-PLA-PFMA₁₀. These fluorinated NCs finally yielded higher *in vitro* ultrasound signal compared to plain PEG-PLA NCs. In addition, no *in vitro* cytotoxicity was induced by the fluorinated polymers and their degradation products. Our results highlight the benefit of adding comb-like fluorinated blocks in PEG-PLA polymers to enhance the echogenicity of nanocapsules intended as UCAs.

1. Introduction

Ultrasound is one of the most widely used clinical imaging modality owing to its low cost, safety, portability, and possible combination with therapy (Boissenot et al., 2016a). Nevertheless, this technique has been limited by the lack of effective ultrasound contrast agents (UCAs) to allow tissue differentiation (Paefgen et al., 2015; Schutt et al., 2003). Commercially available UCAs consist of gas microbubbles of 1 – 6 μm stabilized by a layer of lipids or proteins (Fisher et al., 2002; Schneider et al., 1995). Their large size and high compressibility make them ideal ultrasound reflectors, currently used to enhance the blood pool signal and assess tissue blood flow at the microvascular level (Lindner, 2004). However, the fast diffusion of the encapsulated gas results in short circulation time in the bloodstream (a few minutes) (Abou-Saleh et al., 2016), and their large micrometer size prevents their accumulation in solid tumors. For tumor imaging, more stable nano-sized UCAs able to extravasate into tumors by the enhanced permeation and retention (EPR) effect (Yuan et al., 1995) are required. Since gas nanobubbles are difficult to stabilize (Leroy and Norisuye, 2016), research has focused on the encapsulation of liquid perfluorocarbons (Cosco et al., 2015). To further improve UCAs stability, several groups have reported the use of polymeric shells which are more stable than lipid or protein layers (Chlon et al., 2009; El-Sherif and Wheatley, 2003; Sanna et al., 2011; Yang et al., 2014).

In this context, polymeric UCAs have been developed recently in our group. These polymeric nanocapsules (NCs) of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) encapsulating liquid perfluorooctyl bromide (PFOB) showed long-lasting *in vitro* echogenicity and allowed *in vivo* blood pool imaging (Pisani et al., 2008b). However, quick elimination by the mononuclear phagocyte system hampered their accumulation in the tumor. PLGA was then replaced by poly(lactide-co-glycolide)-poly(ethylene glycol) (PLGA-PEG) copolymer to formulate long-circulating NCs which accumulated in the tumor by the EPR effect, and yielded contrast enhancement by ^{19}F Magnetic Resonance Imaging (Diou et al., 2012). Nevertheless, the acoustic response of these capsules was too weak at clinical frequencies, owing mainly to the important thickness of their shells. The strategy of decreasing the polymer amount in the formulation, which previously allowed reducing the thickness of plain PLGA NCs (Pisani et al., 2006), failed using PLGA-PEG due to local dewetting (Diou et al., 2016).

Our aim is therefore to improve the nanocapsule echogenicity by reducing their shell thickness, while keeping their long-circulating properties with PEG chains. Recently, we reported that functionalizing PLA with a short linear perfluorinated end group induced an increase of PFOB encapsulation efficiency into PEGylated NCs made of a mixture of PLA-PEG and fluorinated-PLA, for perfluorinated chain length up to C_8F_{17} (Houvenagel et al., 2017). However, the shell thickness was not reduced, and although a higher *in vitro* echogenicity was obtained due to

fluorination, there is still room for improvement since the ultrasound signal was much lower than commercial Sonovue microbubbles.

Here, the strategy consists in synthesizing triblock hydrophilic-hydrophobic-fluorophilic copolymers of poly(ethylene glycol)-polylactide-poly(1H,1H,2H,2H-heptafluorodecyl methacrylate) (PEG-PLA-PFMA), containing a higher proportion of C_8F_{17} chains, to formulate the nanocapsules. We intend to favor fluorophilic interactions between the fluorinated chains and PFOB to improve the wetting of the polymer around the PFOB core and yield capsules with thin shells as we decrease the amount of polymer in the formulation. We present here the polymer synthesis and the characterization of nanocapsules in terms of size distribution, morphology, PFOB encapsulation efficiency, shell thickness as measured by Small Angle Neutron Scattering, cytotoxicity and *in vitro* ultrasound scattering.

2. Materials and methods

2.1. Materials

DL-lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). Poly(ethylene glycol) methyl ether (OH-PEG-OCH₃, average $M_n = 5\,000$ g/mol), stannous 2-ethyl hexanoate (stannous octoate, Sn(Oct)₂), N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA), triethylamine (Et₃N), dried toluene, cyclohexanone, magnesium sulfate (MgSO₄), sodium cholate, D₂O and trifluoroacetic acid (TFA) were provided by Sigma-Aldrich (France). 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodecyl methacrylate (FMA) and perfluorooctyl bromide (PFOB) were purchased from Fluorochem (UK). 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide and copper(I) bromide (CuBr) were provided by ACROS Organics (Belgium). Deuterated chloroform (CDCl₃) was obtained from Euriso-top (France). All solvents were purchased from Carlo Erba (France). Cell culture reagents such as DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), FBS (Fetal Bovine Serum), trypsin-EDTA solution and PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate buffer) were purchased from Sigma Aldrich (France). Water was purified using a RIOS/Synergy system from Millipore (France). NMR sample tubes and coaxial inserts were obtained from CortecNet (France).

2.2. Polymer synthesis

The synthesis route involved 3 steps as shown in Figure 2.

2.2.1. Synthesis of PEG-PLA

PEG-PLA was synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide initiated by OH-PEG-OCH₃ in the presence of stannous octoate catalyst (Nijenhuis et al., 1992). All glassware was dried by heating under vacuum and handled under argon atmosphere. To a 250 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar were added DL-lactide (156.14 mmol, 22.50 g) and OH-PEG-OCH₃ (1.13 mmol, 5.66 g). The flask was sealed with a rubber cap and a stannous octoate solution (0.75 mmol, 306 mg) dissolved in 30 mL of dried toluene was added through the septum. The tube was purged with argon for 15 minutes and then placed into a 130°C oil bath. Polymerization was carried out for 1h under magnetic stirring, and then quenched by immersing the tube in a cold water bath. After evaporation of toluene, the reaction product was dissolved in chloroform and precipitated twice into excess cold diethyl ether. The polymer was finally dried under vacuum and 25.13 g of a white powder was obtained. Lactide conversion = 94% (¹H NMR). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 5.10-5.28 (CHCH₃COO of PLA), 3.64 (OCH₂CH₂ of PEG), 3.38 (OCH₃ of PEG), 2.70 (end HOCHCH₃COO of PLA), 1.45-1.67 (CHCH₃COO of PLA). $M_n^{\text{NMR}} = 23,500$ g/mol; $M_n^{\text{SEC}} = 24,300$ g/mol.

2.2.2. Synthesis of PEG-PLA-Br macroinitiator

PEG-PLA-Br was synthesized by esterification of PEG-PLA with excess 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide using a known procedure (Spasova et al., 2009; Zhao et al., 2004). In a 250 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar, PEG-PLA (1.06 mmol, 25 g) was dissolved in 160 mL of CH_2Cl_2 . Excess of triethylamine (37.23 mmol, 5.2 mL) was added to the solution, and the mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide (37.23 mmol, 4.6 mL) was added dropwise for 15 min. The mixture was allowed to stir at room temperature overnight, and was subsequently washed twice with saturated brine and once with water. The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 before being concentrated under reduced pressure and precipitated twice in excess cold diethyl ether. The product was finally dried under vacuum to provide 16.55 g of an off-white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 5.10-5.28 (CHCH_3COO of PLA), 3.64 (OCH_2CH_2 of PEG), 3.38 (OCH_3 of PEG), 1.95 and 1.98 ($\text{C}(\text{Br})(\text{CH}_3)_2$), 1.45-1.67 (CHCH_3COO of PLA). $M_n^{\text{NMR}} = 23,500$ g/mol; $M_n^{\text{SEC}} = 25,200$ g/mol.

2.2.3. Synthesis of PEG-PLA-PFMA_x polymers

PEG-PLA-PFMA_x polymers were synthesized by ATRP of 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodecyl methacrylate (FMA) initiated by PEG-PLA-Br with $\text{CuBr}/\text{PMDETA}$ as the catalyst system (Li et al., 2013). All glassware was dried by heating under vacuum and handled under argon atmosphere. To a 100 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar were added PEG-PLA-Br (0.21 mmol, 5 g) and a solution of PMDETA (0.21 mmol, 37 mg) and FMA (1.06 mmol for $x = 5$, 2.13 mmol for $x = 10$, 4.26 mmol for $x = 20$) in cyclohexanone (15 mL). After dissolution of the macroinitiator, CuBr (0.21 mmol, 31 mg) was added and the mixture was subjected to two freeze-pump-thaw cycles. The reaction proceeded at 100°C for 42h. The mixture was cooled and diluted with THF, and the copper catalyst was removed with a neutral alumina column. After concentration under reduced pressure, the product was precipitated twice in excess cold diethyl ether and dried under vacuum. FMA conversion (^1H NMR) = 84% ($x = 20$), 80% ($x = 10$), 67% ($x = 5$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 5.10-5.28 (CHCH_3COO of PLA), 4.28 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ of PFMA), 3.64 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ of PEG), 3.38 (end OCH_3 of PEG), 2.47 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ of PFMA), 1.70-2.00 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}$ of PFMA), 1.45-1.67 (CHCH_3COO of PLA), 0.80-1.45 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}$ of PFMA). Molar masses are displayed in Table 1.

2.3. Polymer characterization

Size exclusion chromatography (SEC) was performed at 30°C with two columns from Polymer Laboratories (PL-gel MIXED-D; 300×7.5 mm) and a differential refractive index detector (Spectrasystem RI-150, Thermo Electron Corp.), using chloroform as an eluent, a Waters 515 pump at a flow rate of 1 mL/min, and toluene as a flow-rate marker. The calibration curve was

based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards from Polymer Laboratories. ^1H NMR and ^{19}F NMR spectroscopies were performed in 5 mm diameter tubes in CDCl_3 on a Bruker Avance-400 (400 MHz) spectrometer. Differential scanning calorimetry (DSC) was performed using a DSC Q1000 (TA Instruments). The polymers (2-5 mg) were sealed in aluminum pans and heated from -20 to 100°C at a heating rate of $20^\circ\text{C}/\text{min}$ and cooled to -20°C before a second heating scan from -20 to 100°C at $20^\circ\text{C}/\text{min}$ to determine the glass transition temperature (T_g). A nitrogen flow was maintained throughout the test ($20\text{ mL}/\text{min}$).

2.4. Interfacial tension measurements

Interfacial tension measurements were carried out using the pendant drop method, employing a Tracker tensiometer (Teclis, France). Drops of PFOB were formed using a syringe and a G22 stainless steel needle into a methylene chloride solution containing the polymers at $25\text{ mg}/\text{mL}$ placed in an optical glass cuvette. The interfacial tension was determined from the drop profile using the Laplace equation and the forces balance between capillarity and gravity. The measurements were performed on at least three independent drops and the experiment was repeated on different days to ensure reproducibility.

2.5. Nanocapsules preparation

Nanocapsules (NCs) of PFOB were prepared by an emulsion-evaporation process as previously described (Diou et al., 2012; Houvenagel et al., 2017). The polymer (50, 30 or 20 mg) was dissolved into 2 mL of methylene chloride along with $30\ \mu\text{L}$ of PFOB. The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip (Digital Sonifier, Branson Ultrasons, France) at 30% of maximal power, for 1 min over ice. Solvent was allowed to evaporate by magnetic stirring at 300 rpm at room temperature for 3 h. Suspensions of NCs were filtered through $0.45\ \mu\text{m}$ PVDF filters, and if necessary, were purified to remove sodium cholate by ultracentrifugation for 1h, at 4°C and at $27\ 440\ \text{g}$ (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The pellet was finally resuspended in water to the desired concentration.

2.6. Size distribution and Zeta potential

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of the nanocapsules were measured by quasi-elastic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Suspensions were diluted in water to a concentration of $1\text{ mg}/\text{mL}$. Measurements were performed at 20°C , at an angle of 173° to avoid multiple scattering. Zeta potential measurements were carried out with the same instrument, at 25°C , in 1 mM NaCl. Measurements were performed in triplicate.

2.7. PFOB encapsulation efficiency by ^{19}F NMR spectroscopy

PFOB encapsulation efficiency was determined by ^{19}F NMR on a Bruker Avance-400 (400 MHz) spectrometer with a 5 mm dual probe $^{19}\text{F}/^1\text{H}$. The NMR quantitative method using stem coaxial inserts was originally proposed by Henderson for ^{31}P compounds (Henderson, 2002) and adapted previously for ^{19}F NMR (Diou et al., 2014) (Houvenagel et al., 2017). 1 mL of unpurified nanocapsules were freeze-dried for 24h using an Alpha-1-2 LD apparatus (Christ, France) and lyophilisates were dissolved into 1 mL of chloroform. Sodium cholate was removed by centrifugation for 5 min at 4696 g. The organic solution was collected and introduced into a usual 5mm-NMR sample tube loaded with a stem coaxial insert containing TFA in D_2O as an external standard ($[\text{TFA}] = 9.4 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). The total amount of PFOB in the suspension, n_{PFOB} , was determined after integration of the peak at -64.7 ppm corresponding to the CF_2Br group and normalization by the area of the TFA peak at -76.5 ppm. Absolute encapsulation efficiency, η_{encaps} , was calculated as follows:

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

where $m_{\text{PFOB}}^{\text{feed}}$, $m_{\text{polymer}}^{\text{feed}}$ and $m_{\text{SC}}^{\text{feed}}$ are the initial masses of the components introduced during NCs preparation, m_{NC} corresponds to the mass of NCs recovered after freeze-drying and M_{PFOB} is the molar mass of PFOB (498.96 g/mol).

2.8. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) using a JEOL JEM-1400 operating at 80 kV. 5 μL of purified suspensions of nanocapsules (0.5 mg/mL) were deposited for 1 min on glow-discharged copper grids covered with formvar-carbon film. Samples were then stained using 2% phosphotungstic acid (pH = 7) for 30 s. The excess solution was blotted off using a filter paper. Images were acquired using an Orius camera (Gatan Inc, USA).

2.9. Cryo-transmission electron microscopy (cryoTEM)

CryoTEM was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) using a JEOL JEM-1400 operating at 120 kV. 5 μL of purified suspensions of nanocapsules (25 mg/mL) were deposited on glow-discharged Lacey copper grids covered with carbon film containing holes. The excess solution was blotted off for 5 s using filter paper and the grids were subsequently frozen in liquid ethane using a Leica EM GP automatic system (Leica, Austria) under a 90% humidity atmosphere. Images were recorded on a US1000XP camera (Gatan Inc, USA) with a -2 μm defocus.

2.10. Small angle neutrons scattering (SANS)

2.10.1. SANS data collection

Small Angle Neutron Scattering (SANS) measurements were performed on the PACE spectrometer of the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEA-Saclay, France). Nanocapsules were filtered, purified and resuspended at a final volume fraction of $\varphi_v = 1\%$ in a 40/60 (v/v) H₂O/D₂O mixture to match the scattering length density of the PFOB core ($\rho_{PFOB} = \rho_{core} = 3.6 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). This mixture has a weak contrast with PFMA block polymer ($\rho_{PFMA} = 3.0 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). So, using contrast matching of the PFOB core, we focused on the polymeric shell of PEG-PLA blocks. Two configurations were used: the first one with a sample-to-detector distance of $D = 4.7 \text{ m}$ and a neutron wavelength of $\lambda = 13 \text{ \AA}$ and the second one with $D = 2.9 \text{ m}$ and $\lambda = 4.6 \text{ \AA}$ to cover a broad q range of $3.2 \times 10^{-3} - 1.5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. SANS measurements were performed in 1 mm thick quartz cuvettes to minimize the incoherent scattering. Scattered intensity curves were corrected from the scattering from the empty quartz cuvette and the electronic background, and normalized by the incoherent signal of 1 mm water sample to account for non-uniform efficiency of detector, using the LLB PASINET software (Brulet et al., 2007).

2.10.2. SANS data modelling

The scattered intensity curves obtained in PFOB matching condition were fitted using the vesicle model with Sasview software ("Sasview software," n.d.). This model provides the form factor, $P(q)$, for a unilamellar vesicle of inner radius R_{core} and thickness T , according to the following equation:

$$P(q) = \frac{scale}{V_2} \left[\frac{3V_1(\rho_1 - \rho_2) J_1(qR_1)}{qR_1} + \frac{3V_2(\rho_2 - \rho_{solv}) J_1(qR_2)}{qR_2} \right]^2$$

Where $scale$ is a scale factor, V_1 is the volume of the core, V_2 is the total volume of the vesicle, $R_1 = R_{core}$ is the radius of the core, R_2 is the outer radius of the vesicle ($R_2 = R_{core} + T$), and $J_1(x) = \frac{\sin x - x \cos x}{x^2}$. For the vesicle, $\rho_1 = \rho_{core} = \rho_{solv}$ is the scattering length density of the core and the solvent, $\rho_2 = \rho_{shell}$ is the scattering length density of the shell. The fit gives geometrical parameters of the nanocapsules: the mean core radius R_{core} , the polydispersity of the core radius σ_{core} , the thickness of the shell T and the polydispersity of the thickness σ_T . A lognormal distribution was assumed for both radius and thickness.

2.11. Hydrolytic degradation of polymers

50 mg of each polymer (except PEG-PLA-PFMA₂₀) were suspended into 1 mL of NaOH 1M and vigorously stirred for 24h at 37°C in an incubator. After adjustment of the pH to 7 with HCl 1M,

the cloudy solution was dialyzed against deionized water for 96h to remove salt and lactic acid (dialysis membrane molecular weight cut off: 100–500 Da).

2.12. Cell culture

Human endothelial umbilical vein cells (HUVEC) obtained from ATCC (USA) were cultured in DMEM supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat inactivated FBS. The J774.A1 murine macrophage monocyte cell line (ATCC, USA) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat inactivated FBS. Cells were split twice a week, by trypsinisation for HUVEC and by scraping for J774.A1 cells. All cell lines were maintained at 37 °C and 5% CO₂ under a humidified atmosphere.

2.13. Cytotoxicity evaluation of NCs and polymer degradation products

To evaluate their *in vitro* cytotoxicity, NCs and polymer degradation products were diluted in cell culture medium before being added onto the cells. The cell viability was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were seeded in 100 µL of culture medium (12 x 10³ cells/well or 3 x 10³ cells/well for 24 and 72h incubation respectively) in 96 well plates (TPP, Switzerland) and pre-incubated for 24 h. 100 µL of a serial dilution of NCs (0.01 to 10 mg/mL) or of polymer degradation products (10⁻⁵ to 0.01 mg/mL of initial polymer) was then added to the medium. After 24 or 72h of incubation, the incubation medium was replaced by fresh medium containing 0.5 mg/mL of MTT (Sigma, France). After 1h incubation, the culture medium was gently aspirated and replaced by 200 µL dimethylsulfoxide (ACS grade, VWR, France) to dissolve the formazan crystals. The absorbance of the solubilized dye, which correlates with the number of living cells, was measured with a microplate reader (LAB Systems Original Multiscan MS, Finland) at 570 nm. The percentage of viable cells in each well was calculated as the absorbance ratio between treated and untreated control cells.

2.14. In vitro ultrasound measurements

Suspensions of nanocapsules (1 mL, 5 mg/mL) were placed in a 10 mm x 10 mm x 45 mm polystyrene cuvette in which 5-mm diameter holes were cut out and covered by acoustically transparent mylar membrane, as shown in Figure 1. The cuvette was placed in a water bath at 37°C, and a small magnetic bar allowed agitating gently the suspension without disturbing the signal. Measurements were performed after 4 minutes to allow temperature equilibration and removal of potential bubbles. A Handyscope HS5 (TiePie engineering, Netherlands) was used as both an arbitrary wave generator and a USB oscilloscope connected to a computer using Matlab

(Mathworks, USA). Samples were insonified by a transducer (focal length 51 mm, model I3-0506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France), which emitted 10 bursts of 500 cycles at 5 MHz. The scattered ultrasound signal was received by a second transducer (focal length 51 mm, model I3-1506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France) placed at a 90° angle compared to the transducer-transmitter (Figure 1). This scattered signal was preamplified before being measured by the oscilloscope connected to Matlab for signal processing. The signal was then windowed, Fourier-transformed and the scattered intensity within the bandwidth of each harmonics was summed. The resulting ultrasound scattered intensities were subtracted from the intensity obtained with the cuvette filled with Milli-Q water. At least 9 measurements were performed with each sample. Commercial SonoVue® microbubbles (diluted to 1/1000) were used as a reference positive control for the ultrasound set-up and parameters chosen for our study.

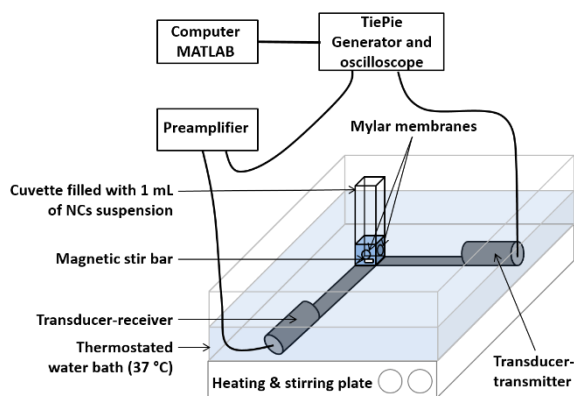


Figure 1: Simplified scheme of the experimental set up for *in vitro* ultrasound measurements

3. Results and discussion

3.1. Polymers synthesis and characterization

Triblock copolymers carrying perfluoroalkyl pendant chains were synthesized by a combination of ROP and ATRP as shown in Figure 2.

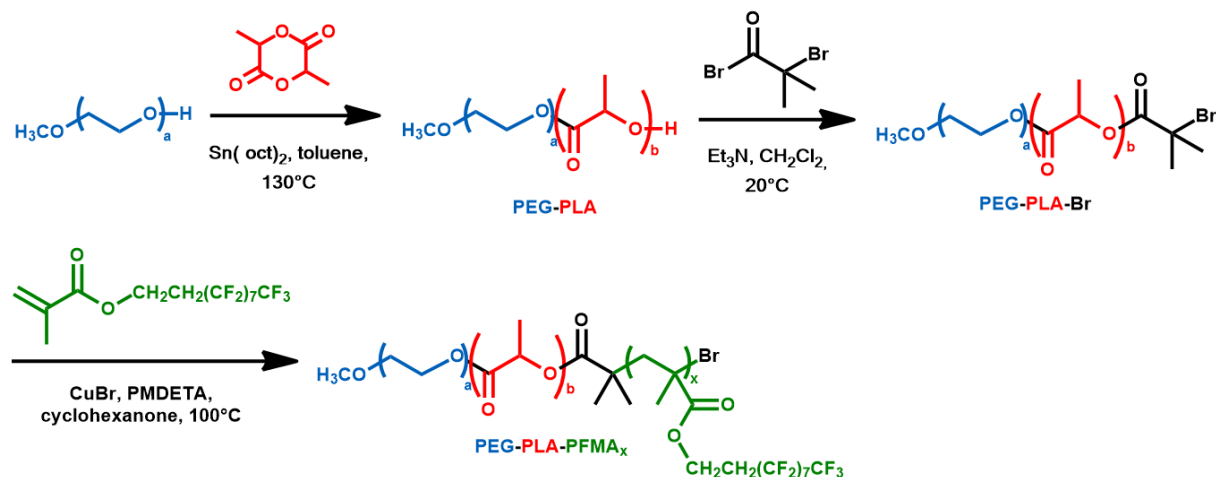


Figure 2: Synthesis of PEG-PLA-PFMA_x triblock copolymers.

ROP of D,L-lactide with polyethylene glycol methyl ether ($M_n = 5,000$ g/mol) as initiator and Sn(oct)₂ as catalyst first led to PEG-PLA diblock copolymer with molar mass close to the targeted M_n of 25,000 g/mol ($M_n^{\text{NMR}} = 23,500$ g/mol, $M_n^{\text{SEC}} = 25,500$ g/mol). PEG-PLA was subsequently converted to PEG-PLA-Br macroinitiator through esterification with excess 2-bromo-2-methylpropionyl bromide in the presence of triethylamine. Quantitative conversion was confirmed by ¹H NMR with disappearance of the end hydroxyl broad signal of PLA at 2.70 ppm and appearance of signals at 1.95 and 1.98 ppm corresponding to the methyl protons from 2-bromo-2-methylpropionyl end group (supplementary material Figure S1).

The final PEG-PLA-PFMA_x copolymers were prepared by ATRP of FMA in cyclohexanone with PEG-PLA-Br as macroinitiator and CuBr/PMDETA complex as catalyst. The nature and amount of solvent were initially varied to achieve final polymerization with satisfactory conversion (>65%). Three different monomer/initiator feed molar ratios ($x = 5, 10, 20$) were used to design polymers with various fluorinated block lengths. Successful polymerization was confirmed by ¹H NMR with appearance of the signals at 2.47 and 4.28 ppm corresponding respectively to CH₂CF₂ and CH₂CH₂CF₂ protons of the PFMA block (signals h and g, Figure 3), in addition to those of the methacrylate backbone 1.70 – 2.00 and 0.80 – 1.45 (signals e and f, Figure 3). The 4.28 ppm peak area was used to calculate the copolymer molar composition and molar mass by normalization with the 3.64 ppm peak corresponding to the OCH₂CH₂ of PEG (Table 1).

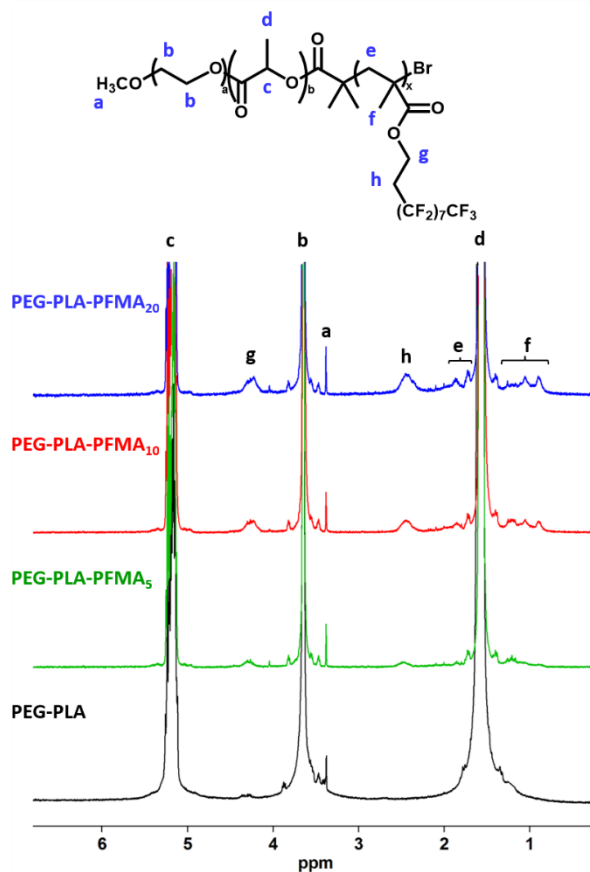


Figure 3: ^1H NMR spectra of PEG-PLA and triblock copolymers PEG-PLA-PFMA $_x$ in CDCl_3 (normalized with the PEG peak at 3.64 ppm).

^{19}F NMR spectra of all polymers further support the successful polymerization of FMA (Figure 4). A broadening of the fluorine resonances is observed in PEG-PLA-PFMA $_5$ spectrum as compared to the monomer. This effect is more pronounced as the number of perfluoroalkyl pendants increases, and leads to the overlapping of resonances of CF_2 groups b' in PEG-PLA-PFMA $_{10}$ and PEG-PLA-PFMA $_{20}$ spectra, in agreement with previous reports (Koda et al., 2015a, 2015b).

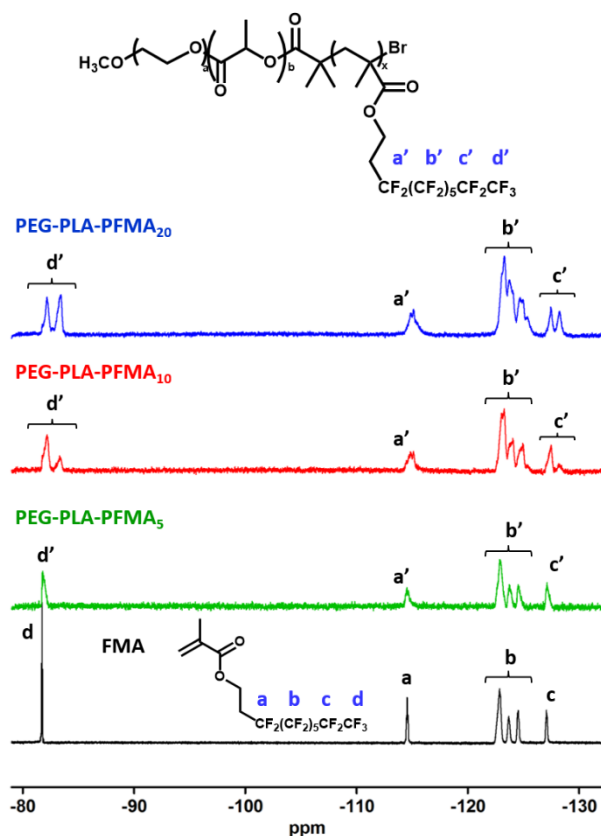


Figure 4: ^{19}F NMR spectra of FMA (black line) and triblock copolymers PEG-PLA-PFMA_x in CDCl_3 .

The molar masses were also determined by conventional SEC in chloroform (Table 1). All polymers present a single peak (supplementary material Figure S2), confirming the successful formation of copolymers rather than homopolymer blends. Although M_n^{SEC} values are close to M_n^{NMR} values, M_n^{SEC} does not increase with the polymerization degree of the PFMA block, as shown by the superposition of chromatograms and the values in the 24,000 – 26,500 g/mol range. Because of fluorophilicity of the perfluorinated chains, full swelling of the triblock polymers in chloroform is limited by a probable folding or formation of micellar domains. Indeed, the triblock polymers appeared more difficult and longer to solubilize than non-fluorinated PEG-PLA in common organic solvents such as chloroform, methylene chloride and acetone. To confirm this different behavior, DLS analysis of fluorinated polymers at 25 mg/mL in methylene chloride and chloroform was performed. It revealed an important increase of scattered intensity compared to plain PEG-PLA (around 15000 kcps for the triblocks compared to 200 kcps for PEG-PLA, see supplementary material Figure S3). This indicates presence of aggregates such as micelles which confirm that the fluorinated block strongly impacts the solubility and conformation of the polymers chains.

Table 1: Degree of polymerization (DP), number-average molar mass (M_n), dispersity (\mathcal{D}) and glass transition temperature (T_g) of PEG-PLA-PFMA_x polymers and their precursors. The DP and M_n^{NMR} were determined from the areas of the peak at 3.64 ppm (OCH₂CH₂ of PEG) versus 5.19 ppm (CH of PLA) for PLA, and versus 4.28 ppm (CH₂CH₂CF₂ of PFMA) for PFMA

Polymer	$M_n^{\text{theoretical}}$ (x 10 ³ g/mol)	DP PLA:PFMA	M_n^{NMR} (x 10 ³ g/mol)	M_n^{SEC} (x 10 ³ g/mol)	\mathcal{D}	T_g (°C)
PEG-PLA	25.0	257	23.5	24.3	1.29	13 ± 1
PEG-PLA-Br	25.0	260	23.7	25.2	1.28	ND
PEG-PLA-PFMA ₅	27.7	272:4	26.7	25.0	1.38	16 ± 1
PEG-PLA-PFMA ₁₀	30.3	291:7	29.7	24.9	1.39	20 ± 2
PEG-PLA-PFMA ₂₀	35.6	277:15	32.9	26.2	1.29	18 ± 1

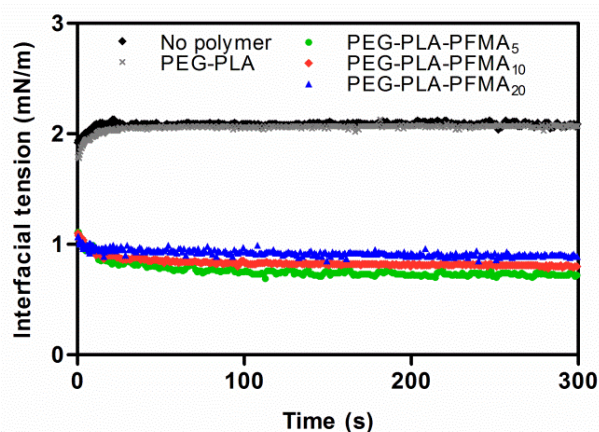
DSC thermograms of all polymers exhibited a single glass transition temperature (T_g) in the 16-20°C range for triblock copolymers, slightly higher than plain PEG-PLA ($T_g = 13^\circ\text{C}$) (Table 1). The T_g of the PEG block is too low to be detected, and the T_g of both PLA and PFMA blocks are probably very close to each other to be detected separately. Indeed, Li et al. reported the synthesis of PEG-PFMA block copolymers and found a T_g of -24.3 or -41.7 °C for the PEG block, and 19.5 °C for the PFMA block (Li et al., 2013), in agreement with our observations. Moreover, the glass transition of PEG-PLA-PFMA₂₀ appears less sharp than the others (supplementary material Figure S4), suggesting a stronger entanglement of polymer chains induced by a higher proportion of perfluoroalkyl units. This is consistent with the study of Li et al. where the glass transition of PFMA was observed only with the shorter PFMA block (28 fluorinated units) and not with increasing number of fluorinated units (36 and 38) (Li et al., 2013).

A series of triblock copolymers containing a fluorinated block with a comb-like structure was therefore successfully synthesized using a combination of ROP and ATRP. This will allow studying the influence of the number of perfluoroalkyl pendant chains on polymers interfacial properties and on nanocapsules characteristics.

3.2. Polymers interfacial properties

The importance of polymer interfacial behavior during the formulation process of perfluorocarbon micro- and nanocapsules was highlighted in previous reports (Diou et al., 2016; Mousnier et al., 2014; Pisani et al., 2008a). In particular, reducing the amount of PEG-PLGA in the formulation of PFOB nanocapsules led to local dewetting and expulsion of some PFOB droplets stabilized by sodium cholate (Diou et al., 2016). The interfacial tension at the PFOB/organic phase interface was therefore measured with each triblock polymer (Figure 5). A reduction from 2.0 to 0.9-1.0 mN/m is observed upon addition of each PEG-PLA-PFMA_x polymer at 25 mg/mL in methylene chloride, regardless of the number of fluorinated units, whereas no decrease is induced by addition of plain PEG-PLA ($\gamma = 2.0 \pm 0.3$ mN/m). The profile as a function of time after the drop formation is also different between fluorinated polymers and the non-fluorinated one,

showing a decrease of interfacial tension during the first few seconds with fluorinated polymers only (Figure 5). These results confirm that perfluoroalkyl pendant chains interact with PFOB and adsorb at the interface. Such finding is consistent with the reported fluorophilic character of perfluorinated chains, which usually form fluorous domains (Hillmyer and Lodge, 2002; Krafft and Riess, 2009; Riess, 2002). In a previous study, no reduction of interfacial tension could be observed with PLAs terminated by a linear fluorinated chain of length ranging from C_3F_7 to $C_{13}F_{27}$ (Houvenagel et al., 2017). Adsorption of PEG-PLA-PFMA_x polymers could potentially be favored by their higher fluorine content as compared to PLA-C_xF_{2x+1} polymers. However, the difference between PLA-C₁₃F₂₇ and PEG-PLA-PFMA₅ is not so important as compared to differences between all triblock polymers when taking into account the real degrees of polymerization: 25 mg of polymer contains ~ 45 μmol of fluorine for PLA-C₁₃F₂₇ and ~ 64 μmol for PEG-PLA-PFMA₅. This quantity then reaches ~ 100 μmol for PEG-PLA-PFMA₁₀ and ~ 194 μmol PEG-PLA-PFMA₂₀. Adsorption of triblock polymers is therefore probably favored by their comb-like architecture. In linear fluorinated PLAs, the fluorinated chain might be hidden by the PLA chain, whereas with the methacrylate backbone, the fluorinated part is more rigid and more voluminous, making it more exposed and able to adsorb at the PFOB-solvent interface.



Polymer	Interfacial tension (mN/m)
No polymer	2.0 ± 0.3
PEG-PLA	2.0 ± 0.3
PEG-PLA-PFMA ₅	0.9 ± 0.1
PEG-PLA-PFMA ₁₀	0.9 ± 0.1
PEG-PLA-PFMA ₂₀	1.0 ± 0.1

Figure 5: Interfacial tension measurements at the interface between PFOB and methylene chloride solutions of each polymer at 25 mg/mL with the pendant drop method: typical profiles as a function of time after the drop formation (top) and interfacial tension values at 200 s presented as mean \pm SD ($n > 6$) (bottom).

3.3. PFOB nanocapsules: physical characterization

PFOB nanocapsules (NCs) were formulated using an emulsion evaporation process (Diou et al., 2012; Pisani et al., 2006). Since the objective was to reduce shell thickness, the initial amount of polymer in the organic phase was decreased (50, 30 and 20 mg), while keeping the amount of PFOB constant.

Size distribution and zeta potential

For a fixed polymer quantity, NCs mean hydrodynamic diameters are slightly larger with all PEG-PLA-PFMA_x (117 – 147 nm) compared to PEG-PLA (113 – 131 nm) (Table 2). As observed with interfacial tension results, the number of fluorinated pendants does not seem to have an influence on size and zeta potential. The polymer mass in the formulation is a more important parameter. Indeed, NCs formulated from 20 mg of polymer exhibit larger sizes than NCs from 50 and 30 mg, especially with the fluorinated polymers (136 – 147 nm at 20 mg compared to 117 – 119 nm at higher polymer amounts). For all polymers, the polydispersity (PDI) increases as the polymer quantity decreases (< 0.19 at 50 mg, > 0.28 at 20 mg), suggesting a wider size distribution at low polymer amount. This might arise from the presence of a second population of objects, such as non-encapsulated PFOB droplets, despite the addition of perfluorinated chains in the polymer, as previously observed with PLGA-PEG (Diou et al., 2016). For all polymers, the zeta potential is negative and no significant difference is induced by the number of perfluoroalkyl chains (Table 2).

Table 2: Characterization of nanocapsules prepared from 50, 30 or 20 mg of each polymer. Data are presented as mean ± SD (n > 3) for d_H and ζ values.

Polymer	50 mg			30 mg			20 mg		
	d_H (nm)	PDI	ζ (mV)	d_H (nm)	PDI	ζ (mV)	d_H (nm)	PDI	ζ (mV)
PEG-PLA	113 ± 3	0.19	-17 ± 10	113 ± 3	0.22	-23 ± 9	131 ± 8	0.28	-29 ± 7
PEG-PLA-PFMA ₅	117 ± 2	0.17	-15 ± 8	120 ± 5	0.24	-20 ± 4	140 ± 9	0.34	-30 ± 15
PEG-PLA-PFMA ₁₀	116 ± 5	0.17	-15 ± 7	120 ± 6	0.26	-20 ± 5	136 ± 12	0.35	-21 ± 6
PEG-PLA-PFMA ₂₀	119 ± 3	0.16	-15 ± 9	123 ± 2	0.26	-21 ± 5	147 ± 3	0.44	-23 ± 10

PFOB encapsulation efficiency

PFOB encapsulation efficiency in NCs was measured by ¹⁹F NMR after freeze-drying to remove any non-encapsulated PFOB droplets remaining. As shown in Figure 6, more PFOB is encapsulated in PEG-PLA-PFMA_x NCs compared to plain PEG-PLA NCs. The difference appears even more important at low polymer amounts, with 49-61% PFOB encapsulated in PEG-PLA-PFMA_x NCs compared to 35% in PEG-PLA NCs at 30 mg, and 37-47% compared to 24% at 20 mg. Such results are consistent with interfacial tension measurements and demonstrate that

fluorophilic interactions between PFOB and the perfluorinated units of the polymers allow entrapping more PFOB into the NCs. One can also observe that PFOB encapsulation efficiency is slightly lower with PEG-PLA-PFMA₂₀ compared to PEG-PLA-PFMA₅ and PEG-PLA-PFMA₁₀ (about 9 – 12% of difference). This could be due to a stronger self-association of the polymer with the largest fluorinated block of 20 pendants, reducing their ability to interact with PFOB as compared with shorter blocks of 5 – 10 fluorinated units.

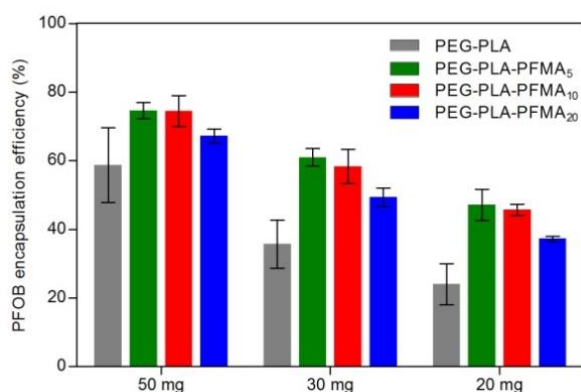


Figure 6: PFOB encapsulation efficiency in freeze-dried NCs. Results are presented as mean \pm SD (n = 4).

Nanocapsules morphology

Nanocapsules were then imaged by TEM with negative staining and cryo-TEM. In TEM images, one can observe mostly spherical objects with PEG-PLA (Figure 7A,B,C) whereas PEG-PLA-PFMA_x NCs exhibit more heterogeneous morphologies (Figure 7 and supplementary material). Indeed, capsules appear less spherical and a lot of broken capsules can be observed at low polymer amounts (Figure 7E,F,H,I,K,L). These broken capsules, which were neither observed in plain PEG-PLA samples nor for NCs made from 50 mg of PEG-PLA-PFMA_x, are sometimes very large (up to 1 μ m diameter, see supplementary material). Such finding is surprising since NCs are filtered on 0.45 μ m after the emulsion evaporation process. These objects might be very deformable to pass through the filter, and might be broken because of the filtration or because they are under vacuum during TEM observation. These large capsules can therefore explain the high PDI values observed at low fluorinated polymer amounts (Table 2).

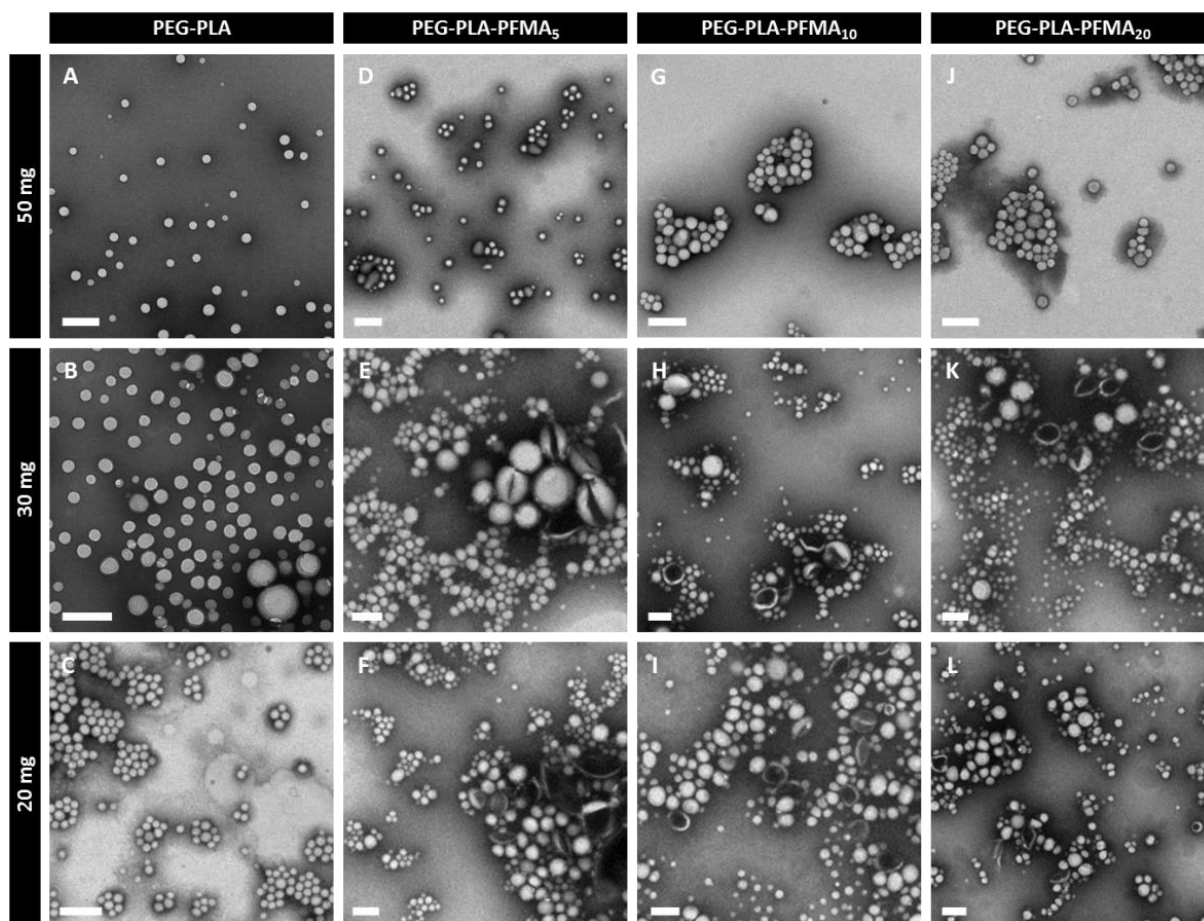


Figure 7: TEM images of formulated NCs with negative staining (scale bars = 200 nm). Additional images are shown in supplementary material.

Cryo-TEM allows distinguishing the dark PFOB core, with high electronic density, from the lighter polymeric shell (Figure 8 and supplementary material). NCs also present a white meniscus in the core, due to rapid freezing, which causes solidification and shrinking of PFOB. PFOB therefore does not fill entirely the shell cavity anymore as observed previously (Boissenot et al., 2016b; Diou et al., 2016; Houvenagel et al., 2017). One can observe that NCs morphology is strongly influenced by the number of fluorinated chains and the amount of polymer used for formulation. Indeed, all PEG-PLA NCs possess a spherical core-shell structure (Figure 8A,B,C), whereas the presence of five perfluoroalkyl chains induces the formation of some elongated NCs with a non-centered PFOB core looking like sunny-side up eggs (shown by red stars in Figure 8D,E). Such elongated morphology had already been observed with COOH-PEG-PLA NCs. This was attributed to an interfacial instability due to electrostatic repulsions between deprotonated carboxy functions leading to an increase of the total surface area. (Diou et al., 2014) Comparatively, with PEG-PLA-PFMA₅, we can imagine that the incompatibility between the various blocks may force the chains to adopt a particular conformation leading to an increase of the total surface area. The same type of morphologies (shown by red stars) is observed with 50 and 30 mg of PEG-PLA-PFMA₁₀, but with additional dark domains (shown by red arrows) in the

same object (Figure 8G,H), which correspond either to other PFOB cores, or to fluorinated rich domains formed by an aggregation of the perfluoroalkyl chains of the polymer (Li et al., 2004). PEG-PLA-PFMA₂₀ leads to NCs with 2 or 3 distinct PFOB cores at high polymer amounts, as shown by blue circles in Figure 8J,K. Such multi-core structures are probably favored by strong interactions between PFOB and perfluoroalkyl pendants. However, at 20 mg of each fluorinated polymer, although morphologies are still a bit heterogeneous within a same sample, one can observe a majority of capsules with a single centered PFOB core and a thin shell (Figure 8F,I,L). Interestingly, some are not perfectly spherical and seem ellipsoidal/elongated (shown by yellow triangles), which may indicate different mechanical properties. In this type of capsules, the PFOB core is not spherical and the shell thickness is homogeneous within the whole capsule, which is different from the other elongated NCs observed at higher polymer amounts.

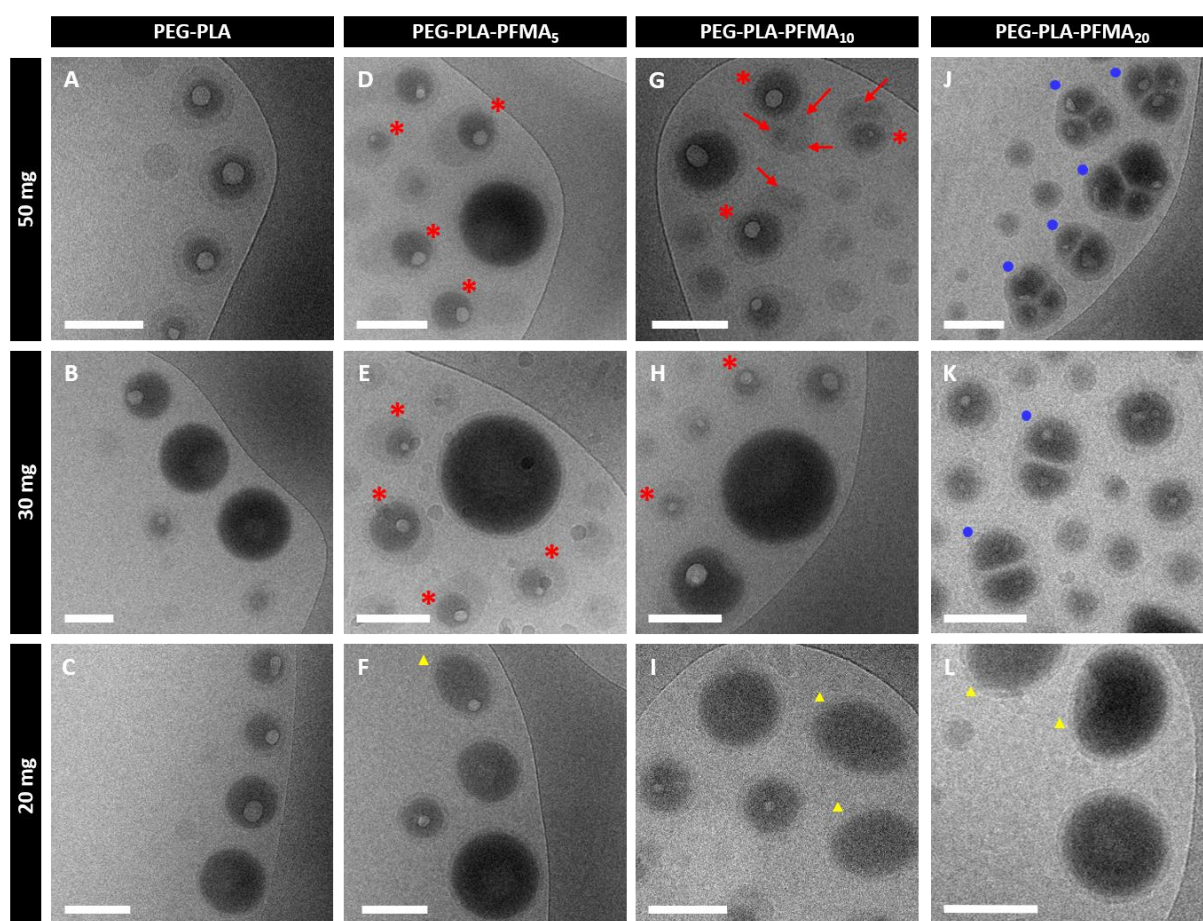


Figure 8: Cryo-TEM images of formulated NCs (scale bars = 100 nm). Additional images are given in supplementary material. Red stars show elongated NCs with a non-centered spherical PFOB core at high amounts of PEG-PLA-PFMA₅ and PEG-PLA-PFMA₁₀. In the case of PEG-PLA-PFMA₁₀, this type of elongated NCs also possesses additional darker domains shown by red arrows. Blue circles show NCs with 2 or 3 distinct PFOB cores. Yellow triangles show ellipsoidal NCs with a single non-spherical PFOB core and a shell thickness homogeneous within the same capsule

Shell thickness

Small Angle Neutron Scattering (SANS) was used to statistically determine shell thickness. We focused on PEG-PLA-PFMA₅ and PEG-PLA-PFMA₁₀ which showed better PFOB encapsulation

efficiency and higher solubility in methylene chloride than PEG-PLA-PFMA₂₀. NCs were resuspended in the appropriate mixture of H₂O and D₂O to match the scattering length density of the PFOB core and allow focusing on the polymeric shell. Scattered intensity curves were fitted with the vesicle model, assuming a lognormal distribution for both shell thickness and core radius. One example of a satisfying fit and the best fit parameters obtained for shell thickness are represented in Figure 9. Fitted curves and numerical values of shell thickness and core radius are given in supplementary material (Figure S9 and Table S1). Mean PFOB core radii are all in the same range (53 – 56 nm) with a high polydispersity, in agreement with DLS measurements. The mean thickness of PEG-PLA NCs is not impacted by the amount of polymer, with values between 16 and 14.5 nm. However, with fluorinated triblock polymers, the mean thickness is decreasing down to 13.5 nm and 11 nm for 20 mg of PEG-PLA-PFMA₅ and PEG-PLA-PFMA₁₀, respectively. A high polydispersity is nevertheless observed for all samples, especially for NCs made from higher fluorinated polymer amounts. This can be attributed to PFOB cores not being always well centered as seen on cryo-TEM images.

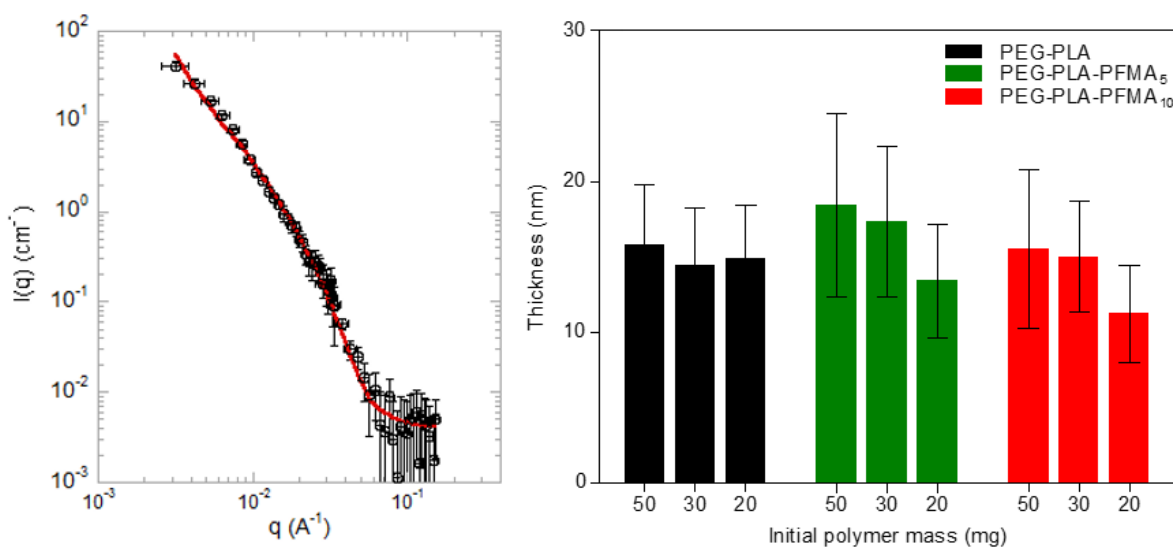


Figure 9: Experimental scattered intensity curve (black circles) of NCs made from 20 mg PEG-PLA-PFMA₁₀ in PFOB matching condition fitted with the vesicle model (red line) (left) and shell thickness values of NCs determined by fitting with the vesicle model (mean ± SD) (right)

3.4. Cytotoxicity studies

The biological inertness of perfluorocarbons is well documented (Krafft and Riess, 2007). Nevertheless, perfluoroalkyl moieties are often associated to a certain toxicity due to their low excretion profiles and prolonged retention in the organism, especially linear perfluorinated chains longer than eight carbons (Barmantlo et al., 2015; Riess, 2009; Zaggia and Ameduri, 2012). We therefore investigated the potential cytotoxicity of PEG-PLA-PFMA_x NCs using an MTT assay on two representative cell types. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were chosen for their high sensitivity and rapid response to external stimuli which make them a

widely used *in vitro* model for polymer cytotoxicity evaluation (Kirkpatrick et al., 1999). J774.A1 cells play a key role in phagocytosis and were chosen to highlight the possible toxicity of NCs after being engulfed by macrophages. At both 24 and 72h incubation times, cell viability of HUVEC slightly decreases as NCs concentration increases, but remains above 70% until 1 mg/mL, and above 50% at 10 mg/mL, with no difference between the polymers (Figure 10). Regarding J774.A1, cellular viability remains above 80% until 1 mg/mL at both incubation times. A strong decrease down to 45% after 24h and 20% after 72h is observed at 10 mg/mL, but this high concentration is unlikely to be reached *in vivo* (Figure 10). For both cell types and both incubation times, the perfluoroalkyl chains do not induce any specific toxicity in comparison to plain PEG-PLA, with no influence of the number of perfluoroalkyl chains. These results concur with reports from Koda et al. on the low toxicity of an amphiphilic fluorinated random copolymer containing PEG and C₈F₁₇ pendants (Koda et al., 2015b).

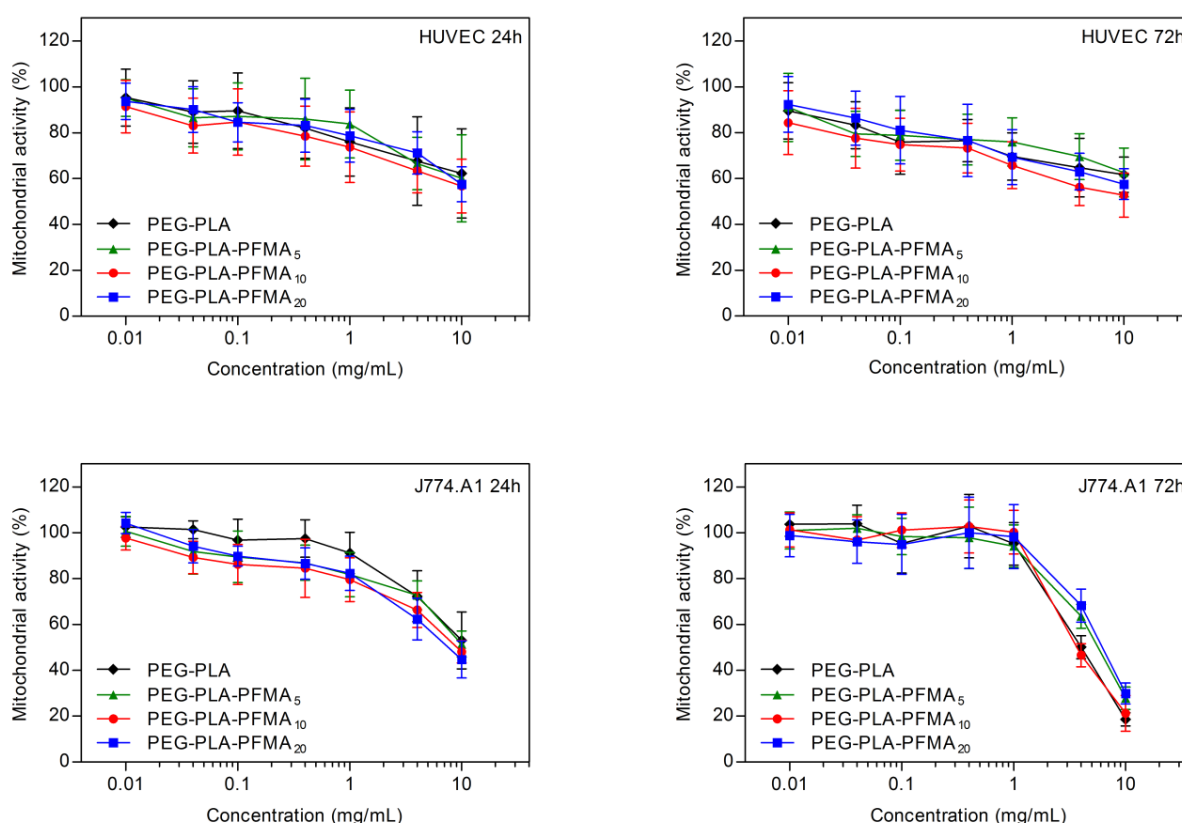


Figure 10: Viability assays on HUVEC (top) and J774.A1 (bottom) cell lines after 24h (left) and 72h (right) incubation with nanocapsules of increasing concentration. Results are presented as mean \pm SD (n = 3)

PEG-PLA diblock copolymer is well known to be degradable into non-toxic products (lactic acid and polyethylene glycol). However, toxicity of the remaining short PFMA block after degradation of the triblock copolymers must be investigated. Accelerated hydrolytic degradations of PEG-PLA-PFMA₅, PEG-PLA-PFMA₁₀, and PEG-PLA as control, were carried out in basic conditions. The *in vitro* cytotoxicity of degradation products was then evaluated using an MTT assay on the same cell lines as for NCs. Due to insolubility issues, only low concentrations could be tested

(maximum 0.01 mg/mL of initial polymer). In this range of concentrations, high HUVEC cellular viabilities (> 72%) were observed at both incubation times (Figure 11). J774.A1 cells show a slightly higher sensitivity depending on the incubation time, with cell viabilities above 87% after 24h and above 67% after 72h. Within experimental error, no significant differences between polymers can be observed for both cell types, indicating an absence of obvious toxicity arising from fluorinated degradation products (Figure 11). These results are encouraging and additional *in vivo* studies will be required to evaluate the potential toxicity arising from a prolonged exposure to the degradation products.

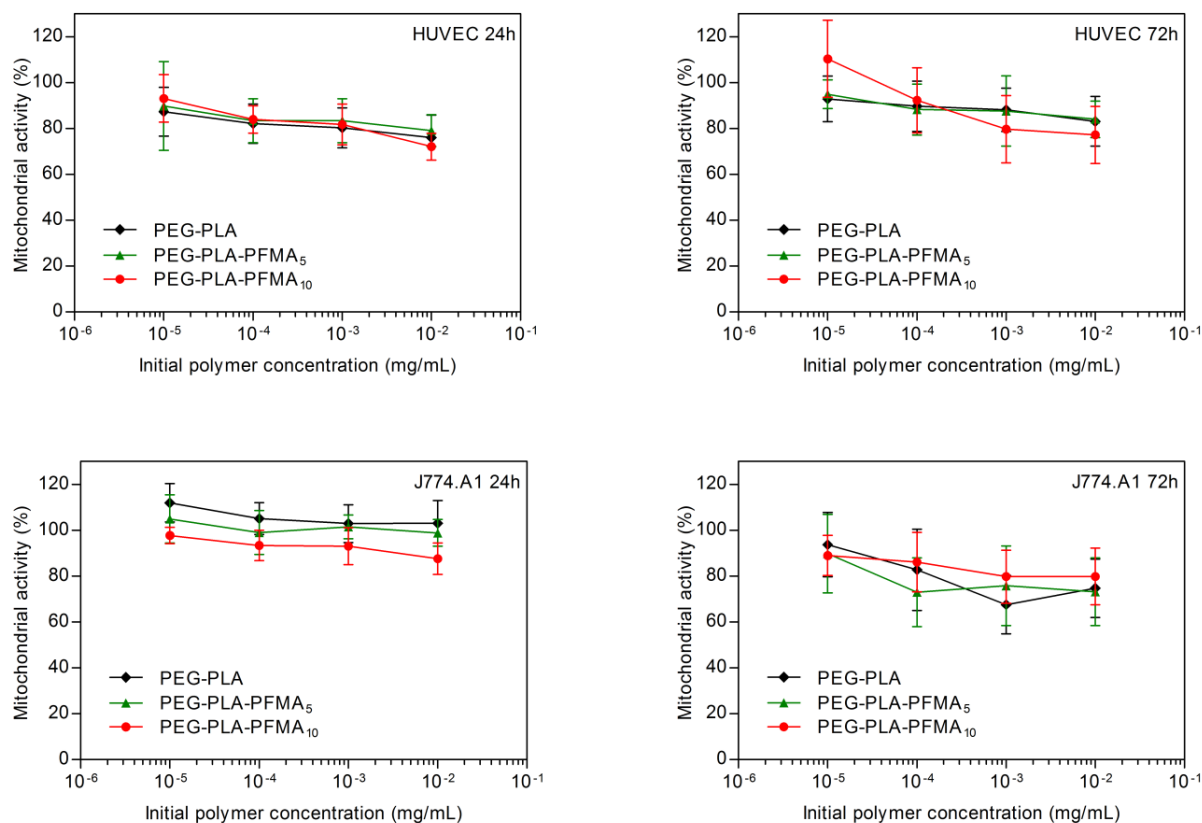


Figure 11: Viability assays on HUVEC (top) and J774.A1 (bottom) cell lines after 24h (left) and 72h (right) incubation with the polymers degradation products. Results are presented as mean \pm SD (n = 3)

3.5. *In vitro* ultrasound measurements

The acoustic response of NCs made from 30 and 20 mg polymer was evaluated *in vitro* at 5 MHz. Figure 12 presents the ultrasound scattered intensities measured at fundamental frequency and subtracted by the background level produced by Milli-Q water. No non-linear response could indeed be detected with our capsules, in agreement with previous studies showing the absence of nonlinear scattering with nano-sized agents (Couture et al., 2006; Hughes et al., 2005). At 30 mg polymer, all samples did not yield an ultrasound signal much higher than the background (intensity < 0.9×10^3 arbitrary units, a.u.). However, at 20 mg polymer, the ultrasound scattered intensity increases with the number of fluorinated pendant chains, from 1.4×10^3 a.u. with plain PEG-PLA to 2.5×10^3 a.u. with PEG-PLA-PFMA₅ and 5.3×10^3 a.u. with PEG-PLA-PFMA₁₀. Such

enhancement probably arises from several contributions which are summarized in Table 3. The slight diameters difference (maximum 27 nm difference) could hardly be considered for the higher efficacy in scattering ultrasound. One of the main contribution is probably the reduction of shell thickness (down to 13.5 nm for PEG-PLA-PFMA₅ and 11 nm for PEG-PLA-PFMA₁₀) which may increase the capsules compressibility and echogenicity as previously observed (Pisani et al., 2008b). Moreover, higher encapsulated PFOB contents and higher amounts of fluorinated chains in the polymers both increase the capsules density and strengthen the difference of acoustic impedance with the surrounding medium, as previously observed with linear fluorinated PLAs (Houvenagel et al., 2017). Although the quantity of PFOB and fluorinated chains is also high in samples made from 30 mg of PEG-PLA-PFMA₅ and PEG-PLA-PFMA₁₀, these two samples possess a larger shell thickness (> 15 nm) and a different morphology with a non-centered PFOB core (Table 3). The observed differences in capsules morphology are probably related to some differences in their mechanical properties which impact their response to ultrasound waves.

Nanocapsules made from 20 mg of fluorinated triblock polymers therefore appear as promising UCAs. Although the measured ultrasound scattered intensities were still lower than with SonoVue® microbubbles (16.5×10^3 a.u.) due to their large radius (20-fold larger than NCs) and gaseous core, these NCs have greater potential to accumulate into the tumors by the EPR effect and allow contrast ultrasound imaging of tumors.

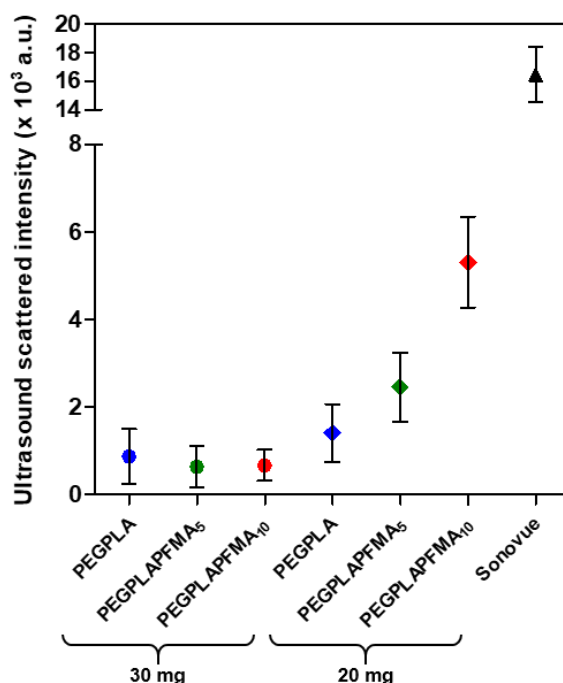








Figure 12: Ultrasound scattered intensity by NCs resuspended at 5 mg/mL made from 30 mg (circles) and 20 mg (diamonds) of each polymer and by SonoVue microbubbles (dark triangle) as positive control. Results are presented as mean \pm SEM ($n > 9$).

Table 3: Summary of NCs characteristics which could account for differences of ultrasound scattering: simplified representation of their morphology, mean hydrodynamic diameter (d_H), mean shell thickness (T), PFOB quantity and C₈F₁₇ chains quantity contained in 1 mL of formulation resuspended at a final polymer concentration of 5 mg/mL for ultrasound measurements, and sum of these 2 quantities in μmol .

Initial polymer mass	30 mg			20 mg		
Polymer	PEG-PLA	PEG-PLA-PFMA ₅	PEG-PLA-PFMA ₁₀	PEG-PLA	PEG-PLA-PFMA ₅	PEG-PLA-PFMA ₁₀
Main morphology						
Mean d_H (nm)	113	120	120	131	140	136
Mean T (nm)	14.5	17.5	15	15	13.5	11
PFOB quantity (μmol)	6.9	11.8	11.3	7.0	13.7	13.3
C ₈ F ₁₇ chains quantity (μmol)	0.0	0.7	1.2	0.0	0.7	1.2
$\mu\text{mol PFOB} + \mu\text{mol C}_8\text{F}_{17}$ chains	6.9	12.5	12.4	7.0	14.4	14.4

4. Conclusion

Novel triblock PEG-PLA-PFMA polymers with distinct lengths of PFMA block (5, 10 or 20 fluorinated pendant chains) were successfully synthesized and were shown to adsorb at the PFOB/methylene chloride interface. These favorable fluororous interactions led to an increase of the PFOB encapsulation efficiency into nanocapsules made of fluorinated polymers compared to plain PEG-PLA. The morphology of the nanocapsules was strongly influenced by the number of perfluorinated chains and the amount of polymer used for formulation: capsules with several PFOB cores or fluorinated-rich domains are obtained at high polymer amount, while a single PFOB core and a thinner shell are observed at low polymer amount. SANS measurements confirmed the observed reduction of mean shell thickness down to 11 nm with PEG-PLA-PFMA₁₀, which led to a 3.7-fold higher *in vitro* ultrasound response at 5 MHz compared to plain PEG-PLA nanocapsules. Finally, no *in vitro* cytotoxicity was induced by both the fluorinated polymers and their degradation products. Results are encouraging and future work will consist in performing *in vivo* studies to confirm the potential of these PEGylated/fluorinated nanocapsules to be used as ultrasound contrast agents for tumor imaging.

5. Acknowledgements

Authors would like to thank Mehrez Sghaier and Najet Yagoubi from Laboratoire Matériaux et Santé (EA401, Univ. Paris-Sud) for DSC experiments and Stéphanie Denis (Institut Galien Paris-Sud) for her help with cell culture. This work has been supported by the Region Ile-de-France in the framework of DIM Nano-K. The present work has benefited also from the core facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11-IDEX-0003-02). SANS analysis was performed using SasView software, originally developed by the DANSE project under NSF award DMR-0520547. Authors acknowledge financial support from ANR (Investissements d’Avenir, Nanobiotechnologies, ANR-10-NANO-06-04). Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- Abou-Saleh, R.H., Peyman, S.A., Johnson, B.R.G., Marston, G., Ingram, N., Bushby, R., Coletta, P.L., Markham, A.F., Evans, S.D., 2016. The influence of intercalating perfluorohexane into lipid shells on nano and microbubble stability. *Soft Matter* 12, 7223–7230.
- Barmantlo, S.H., Stel, J.M., van Doom, M., Eschauzier, C., de Voogt, P., Kraak, M.H.S., 2015. Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 198, 47–53.
- Boissenot, T., Bordat, A., Fattal, E., Tsapis, N., 2016a. Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *J. Control. Release* 241, 144–163.
- Boissenot, T., Fattal, E., Bordat, A., Houvenagel, S., Valette, J., Chacun, H., Gueutin, C., Tsapis, N., 2016b. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108, 136–144.
- Brulet, A., Lairez, D., Lapp, A., Cotton, J.P., 2007. Improvement of data treatment in small-angle neutron scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 165–177.
- Chlon, C., Guedon, C., Verhaagen, B., Shi, W.T., Hall, C.S., Lub, J., Bohmer, M.R., 2009. Effect of Molecular Weight, Crystallinity, and Hydrophobicity on the Acoustic Activation of Polymer-Shelled Ultrasound Contrast Agents. *Biomacromolecules* 10, 1025–1031.
- Cosco, D., Fattal, E., Fresta, M., Tsapis, N., 2015. Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art. *J. Fluor. Chem.* 171, 18–26.
- Couture, O., Bevan, P.D., Cherin, E., Cheung, K., Burns, P.N., Foster, F.S., 2006. Investigating perfluorohexane particles with high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 73–82.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Fattal, E., Delplace, V., Mackiewicz, N., Nicolas, J., Meriaux, S., Valette, J., Robic, C., Tsapis, N., 2014. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 170–177.
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E., 2012. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19F MRI. *Biomaterials* 33, 5593–5602.
- El-Sherif, D.M., Wheatley, M.A., 2003. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66, 347–55.
- Fisher, N.G., Christiansen, J.P., Leong-Poi, H., Jayaweera, A.R., Lindner, J.R., Kaul, S., 2002. Myocardial and microcirculatory kinetics of BR14, a novel third-generation intravenous ultrasound contrast agent. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 530–537.
- Henderson, T.J., 2002. Quantitative NMR Spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: Purity determinations for military nerve agents. *Anal. Chem.* 74, 191–198.
- Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2002. Synthesis and self-assembly of fluorinated block copolymers. *J. Polym. Sci. Part a-Polymer Chem.* 40, 1–8.
- Houvenagel, S., Picheth, G., Dejean, C., Brulet, A., Chenneviere, A., Couture, O., Huang, N., Moine, L., Tsapis, N., 2017. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. *Polym. Chem.* 8, 2559–2570.
- Hughes, M.S., Marsh, J.N., Hall, C.S., Fuhrhop, R.W., Lacy, E.K., Lanza, G.M., Wickline, S.A., 2005. Acoustic characterization in whole blood and plasma of site-targeted nanoparticle ultrasound contrast agent for molecular imaging. *J. Acoust. Soc. Am.* 117, 964.
- Kirkpatrick, C.J., Otto, M., Van Kooten, T., Krump, V., Kriegsmann, J., Bittinger, F., 1999. Endothelial cell cultures as a tool in biomaterial research. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 589–594.
- Koda, Y., Terashima, T., Sawamoto, M., 2015a. Fluorinated microgel star polymers as fluororous nanocapsules for the encapsulation and release of perfluorinated compounds. *Polym. Chem.* 6, 5663–5674.
- Koda, Y., Terashima, T., Sawamoto, M., Maynard, H.D., 2015b. Amphiphilic/fluororous random copolymers as a new class of non-cytotoxic polymeric materials for protein conjugation. *Polym. Chem.* 6, 240–247.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2009. Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds—Unique “Apolar” Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering. *Chem. Rev.* 109, 1714–1792.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2007. Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses. *J. Polym. Sci. Part a-*

- Polymer Chem. 45, 1185–1198.
- Leroy, V., Norisuye, T., 2016. Investigating the Existence of Bulk Nanobubbles with Ultrasound. *Chemphyschem* 17, 2787–2790.
- Li, H., Gu, W.Y., Li, L., Zhang, Y.M., Russell, T.P., Coughlin, E.B., 2013. Synthesis of Semicrystalline/Fluorinated Side-Chain Crystalline Block Copolymers and Their Bulk and Thin Film Nanoordering. *Macromolecules* 46, 3737–3745.
- Li, Z., Kesselman, E., Talmon, Y., Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2004. Multicompartment Micelles from ABC Miktoarm Stars in Water. *Science* (80-.). 306, 98–101.
- Lindner, J.R., 2004. Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 527–32.
- Mousnier, L., Huang, N., Morvan, E., Fattal, E., Tsapis, N., 2014. Influence of polymer end-chemistry on the morphology of perfluorohexane polymeric microcapsules intended as ultrasound contrast agents. *Int. J. Pharm.* 471, 10–17.
- Nijenhuis, A.J., Grijpma, D.W., Pennings, A.J., 1992. Lewis Acid-Catalyzed Polymerization of L-Lactide - Kinetics and Mechanism of the Bulk-Polymerization. *Macromolecules* 25, 6419–6424.
- Paefgen, V., Doleschel, D., Kiessling, F., 2015. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* 6.
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V., Tsapis, N., 2008a. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 326, 66–71.
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B.T., Beloeil, J.C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S.L., Fattal, E., 2008b. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 18, 2963–2971.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.
- Riess, J.G., 2009. Highly fluorinated amphiphilic molecules and self-assemblies with biomedical potential. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 294–304.
- Riess, J.G., 2002. Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective. *Tetrahedron* 58, 4113–4131.
- Sanna, V., Pintus, G., Bandiera, P., Anedda, R., Punzoni, S., Sanna, B., Migaleddu, V., Uzzau, S., Sechi, M., 2011. Development of Polymeric Microbubbles Targeted to Prostate-Specific Membrane Antigen as Prototype of Novel Ultrasound Contrast Agents. *Mol. Pharm.* 8, 748–757.
- Sasview software [WWW Document], n.d. URL <http://www.sasview.org> (accessed 3.1.16).
- Schneider, M., Arditi, M., Barrau, M.B., Brochot, J., Broillet, A., Ventrone, R., Yan, F., 1995. BR1: A New Ultrasonographic Contrast Agent Based on Sulfur Hexafluoride-Filled Microbubbles. *Invest. Radiol.* 30, 451–457.
- Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M., Riess, J.G., 2003. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew. Chemie-International Ed.* 42, 3218–3235.
- Spasova, M., Mespouille, L., Coulembier, O., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I., Dubois, P., 2009. Amphiphilic poly(D- or L-lactide)-b-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) block copolymers: Controlled synthesis, characterization, and stereocomplex formation. *Biomacromolecules* 10, 1217–1223.
- Yang, P., Li, D., Jin, S., Ding, J., Guo, J., Shi, W.B., Wang, C.C., 2014. Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials* 35, 2079–2088.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1995. Vascular-Permeability in a Human Tumor Xenograft - Molecular-Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Res.* 55, 3752–3756.
- Zaggia, A., Ameduri, B., 2012. Recent advances on synthesis of potentially non-bioaccumulable fluorinated surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 188–195.
- Zhao, Y., Shuai, X., Chen, C., Xi, F., 2004. Synthesis of star block copolymers from dendrimer initiators by combining ring-opening polymerization and atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 37, 8854–8862.

Supporting information

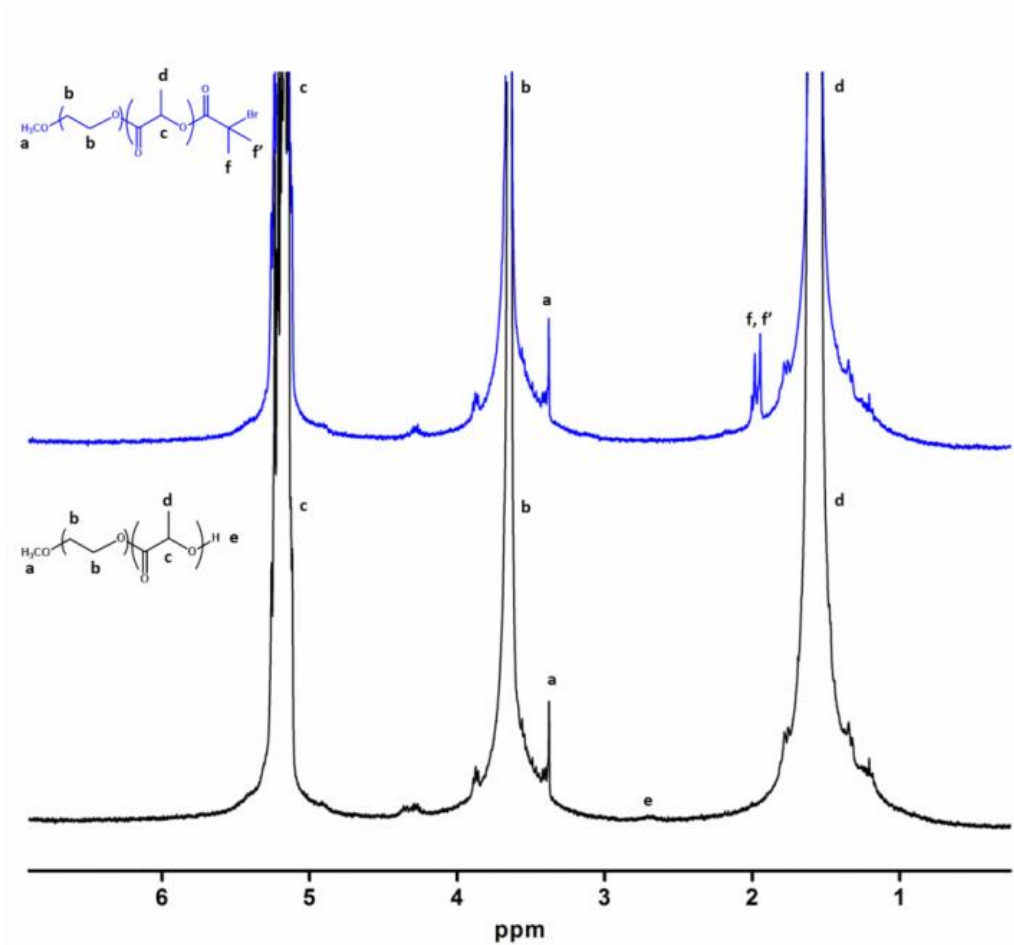


Figure S1: ^1H NMR spectra of PEG-PLA and PEG-PLA-Br macroinitiator in CDCl_3 (normalized by PEG peak at 3.64 ppm).

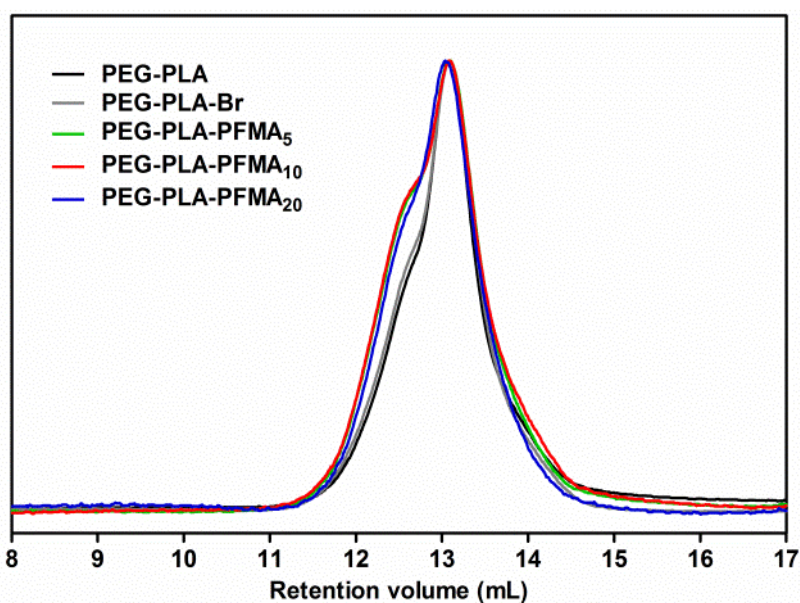


Figure S2: SEC chromatograms of all synthesized polymers in chloroform.

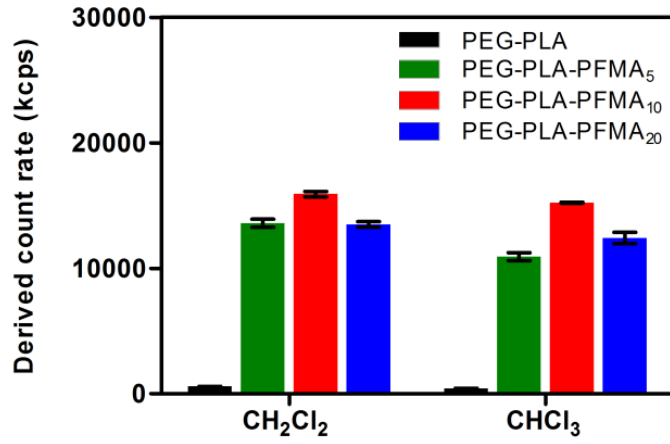


Figure S3: DLS of polymers at 25 mg/mL in methylene chloride and chloroform, showing an increase of scattered intensity with fluorinated triblock polymers.

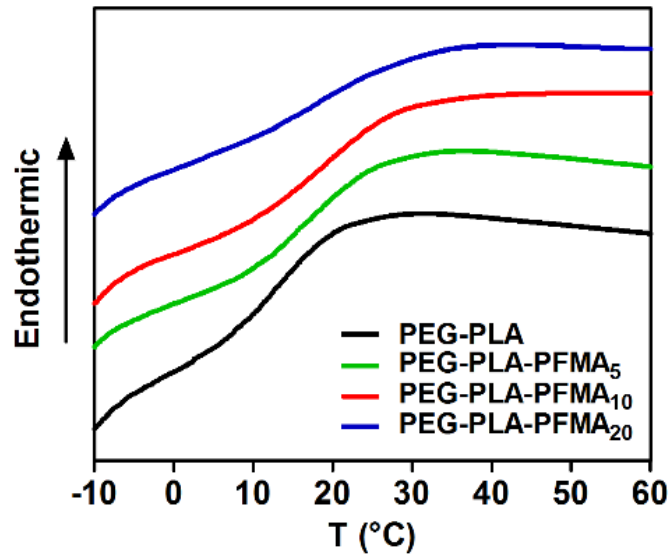


Figure S4: DSC thermograms of the synthesized polymers.

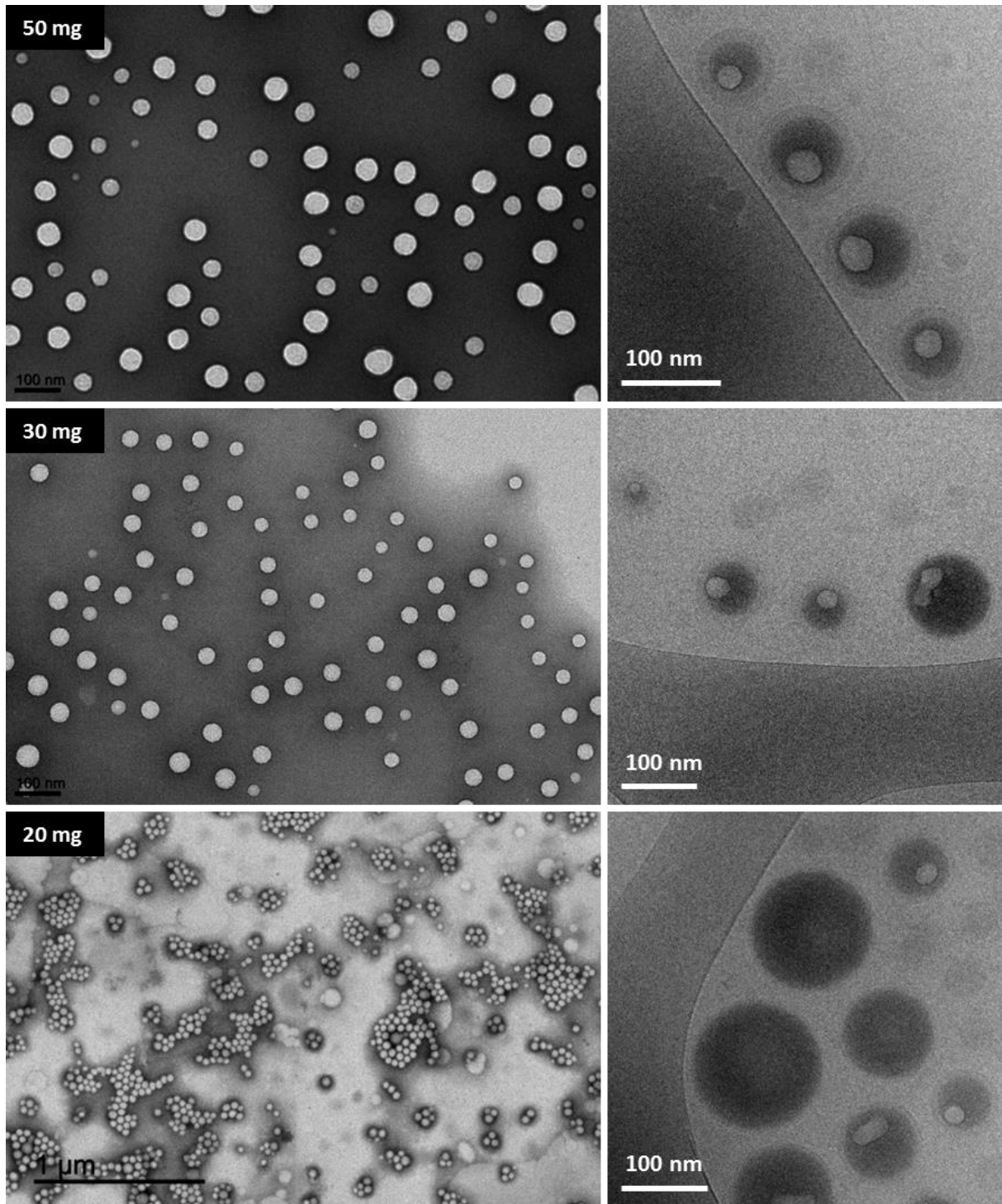


Figure S5: Additional TEM (left) and cryo-TEM (right) images of PEG-PLA NCs

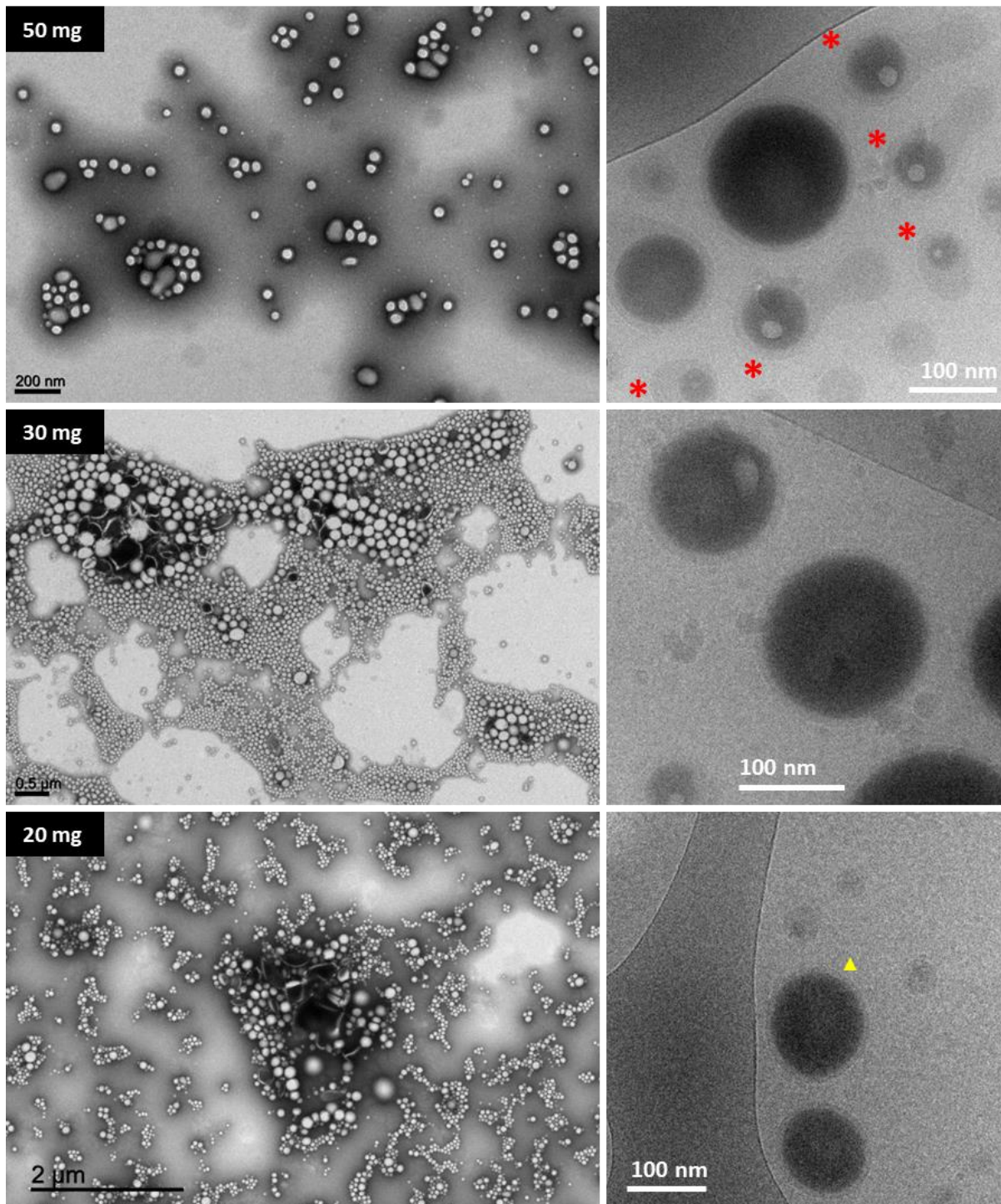


Figure S6: Additional TEM (left) and cryo-TEM (right) images of PEG-PLA-PFMA₅ NCs. Red stars show elongated NCs with a non-centered spherical PFOB core at high polymer amounts. Yellow triangles show ellipsoidal NCs with a single non-spherical PFOB core and a shell thickness homogeneous within the same capsule

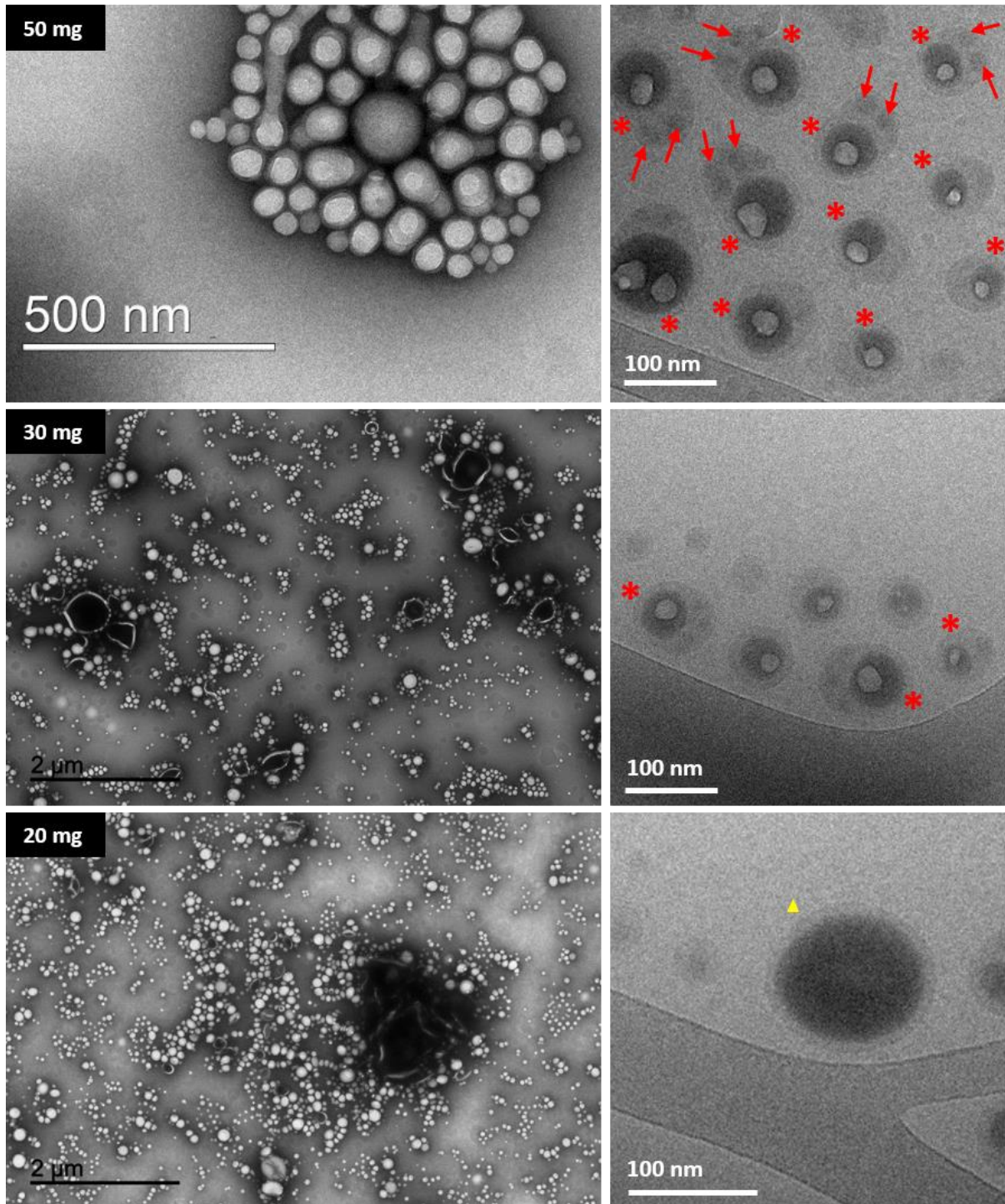


Figure S7: Additional TEM (left) and cryo-TEM (right) images of PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. Red stars show elongated NCs with a non-centered spherical PFOB core at high polymer amounts, with sometimes additional darker domains shown by red arrows. Yellow triangles show ellipsoidal NCs with a single non-spherical PFOB core and a shell thickness homogeneous within the same capsule

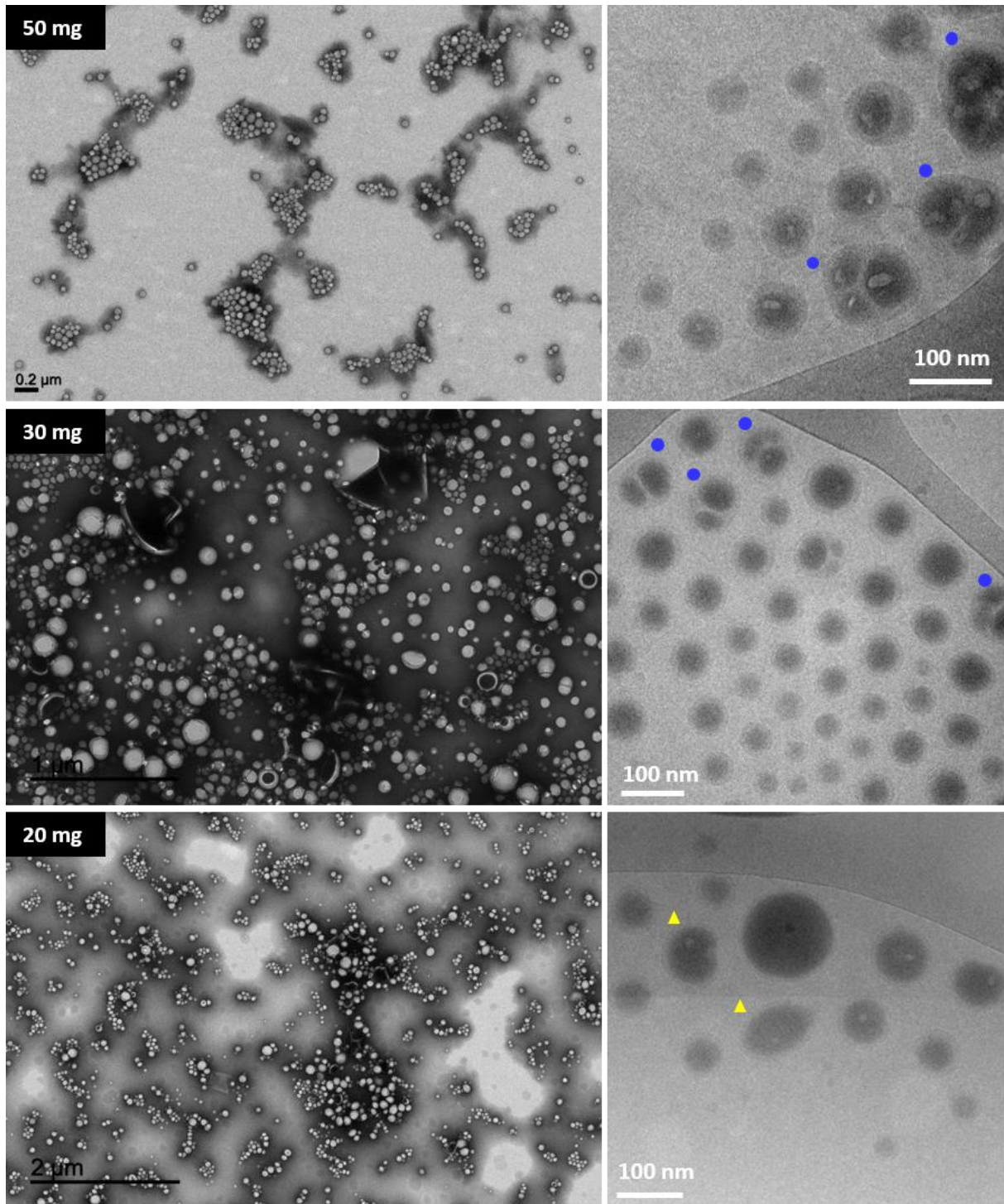
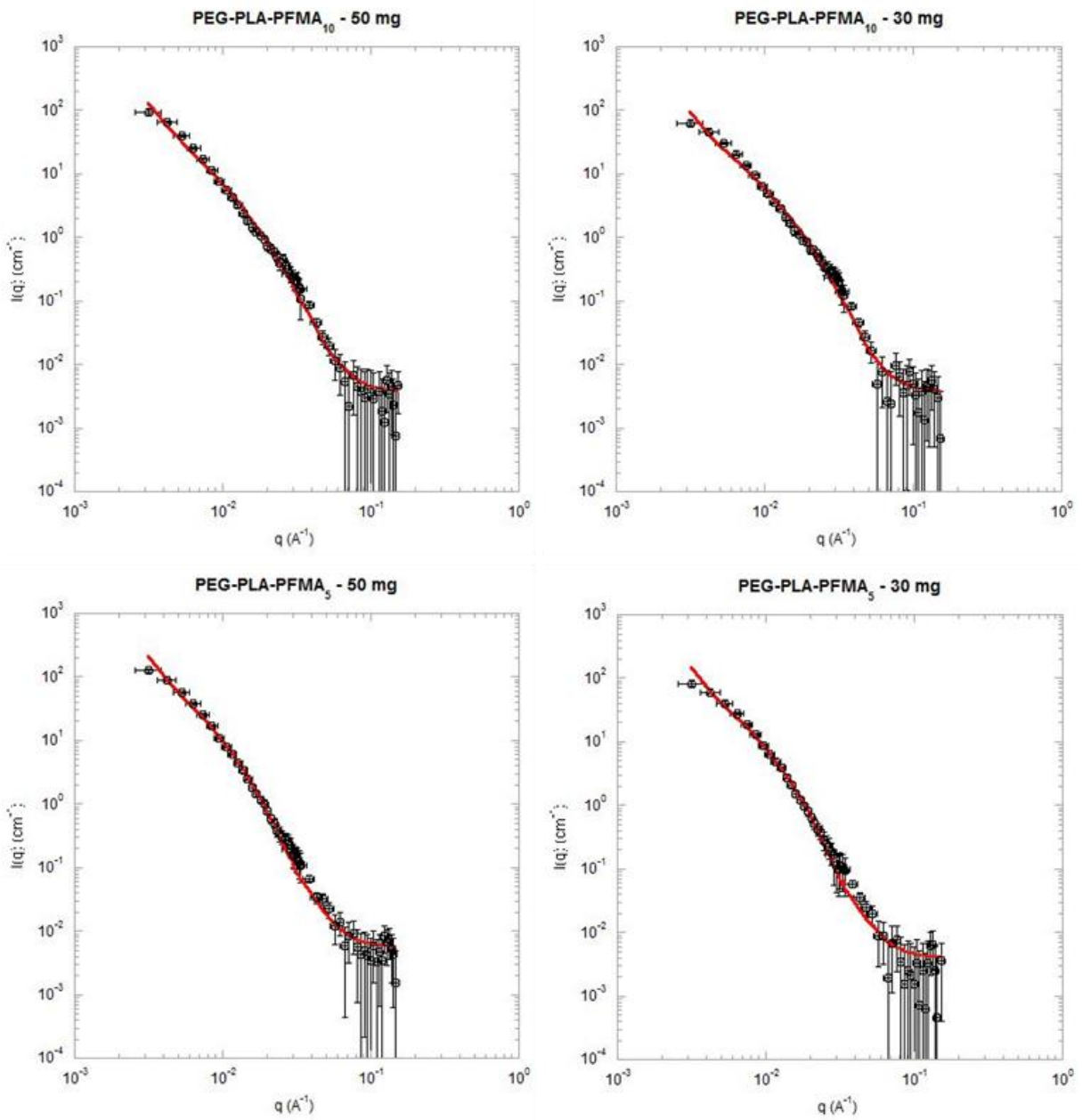


Figure S8: Additional TEM (left) and cryo-TEM (right) images of PEG-PLA-PFMA₂₀ NCs. Blue circles show NCs with 2 or 3 distinct PFOB cores. Yellow triangles show ellipsoidal NCs with a single non-spherical PFOB core and a shell thickness homogeneous within the same capsule

Table S1 : Geometrical parameters (shell thickness T and core radius R_{core}) of NCs obtained by curves fitting with the vesicle model

Polymer	50 mg		30 mg		20 mg	
	$T \pm \sigma_T$ (nm)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)	$T \pm \sigma_T$ (nm)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)	$T \pm \sigma_T$ (nm)	$R_{\text{core}} \pm \sigma_{\text{core}}$ (nm)
PEG-PLA	16 ± 4	56 ± 24	14.5 ± 4	56 ± 24	15 ± 3.5	56 ± 24
PEG-PLA-PFMA ₅	18.5 ± 6	54 ± 24	17.5 ± 5	53 ± 24	13.5 ± 4	56 ± 25
PEG-PLA-PFMA ₁₀	15.5 ± 5	55 ± 24	15 ± 3.5	56 ± 23	11 ± 3	53 ± 24



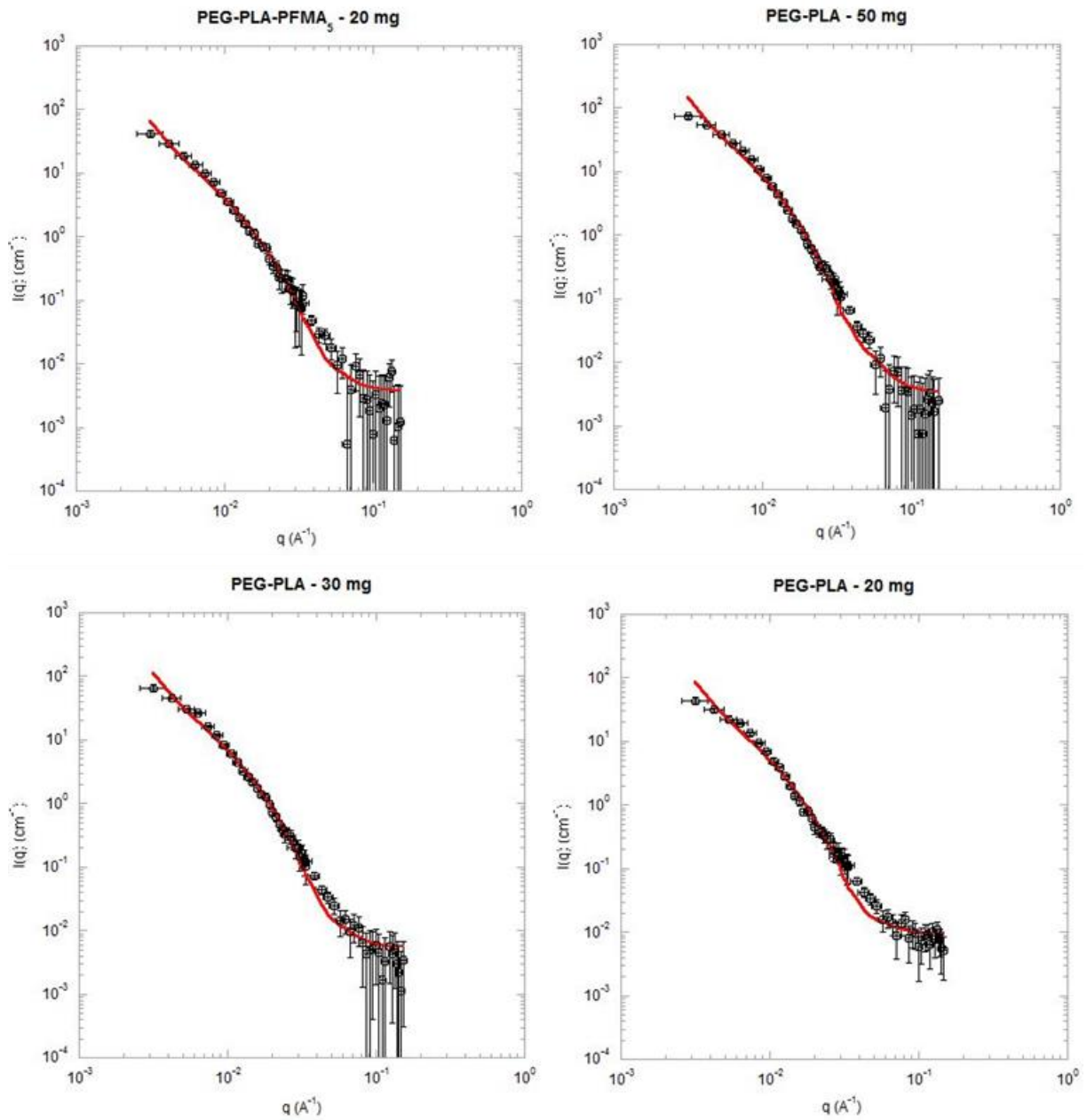


Figure S9 : Scattered intensity curves in PFOB matching condition (black circles) fitted with the vesicle model (red line)

Chapitre 3

Propriétés mécaniques et acoustiques de nanocapsules
de bromure de perfluorooctyle

Dans le deuxième chapitre, nous avons observé des différences de morphologie intéressantes entre les nanocapsules à base de polymères triblocs en peigne et les nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. En particulier, à faible quantité de polymère tribloc (20 mg), les images de TEM ont révélé la présence de quelques grandes capsules cassées, et les images de cryo-TEM ont mis en évidence la présence de quelques capsules à forme légèrement ellipsoïdale, alors que de telles morphologies n'ont pas été observées avec les nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. En outre, l'épaisseur de la coque des nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ était réduite jusqu'à 11 nm et leur réponse ultrasonore était supérieure à celle des nanocapsules de PEG-PLA non fluoré.

L'objectif de ce troisième chapitre était donc de comparer les propriétés mécaniques de ces deux types de nanocapsules (PEG-PLA et PEG-PLA-PFMA₁₀, à 20 mg), pour essayer de les corréler aux différences de morphologie et de réponse acoustique. Notre hypothèse était que les nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀, avec leurs coques fines et leurs formes légèrement ellipsoïdales, étaient sûrement plus déformables et plus compressibles que les nanocapsules de PEG-PLA, et donc plus échogènes.

De façon surprenante, les études de nanoindentation des capsules par microscopie à force atomique (AFM) ont montré que les nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ sont en fait plus rigides que les nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. Nous pensons donc que l'augmentation du signal acoustique provient essentiellement de l'augmentation de la densité de la capsule, du fait de la présence des chaînes perfluorées et de la plus forte efficacité d'encapsulation du PFOB.

Perfluorooctyl bromide nanocapsules mechanical properties and acoustic response

Sophie Houvenagel^a, Jean-Philippe Michel^a, Olivier Couture^b, Vincent Faugeras^b, Laurence Moine^a, Nicolas Tsapis^a

^a Institut Galien Paris-Sud, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b Institut Langevin, ESPCI, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), Paris, France

1. Introduction

In the 2nd chapter, we observed interesting morphological differences between nanocapsules made with triblock polymers and nanocapsules made with PEG-PLA. In particular, at low triblock polymer amount (20 mg), TEM imaging revealed the presence of some large and broken capsules, and cryo-TEM imaging showed the presence of some capsules with an ellipsoidal shape (Figure 1). Such morphologies were not observed with non-fluorinated PEG-PLA NCs. Moreover, the shell thickness of PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs was reduced down to 11 nm and the resulting ultrasound response was higher than with PEG-PLA NCs.

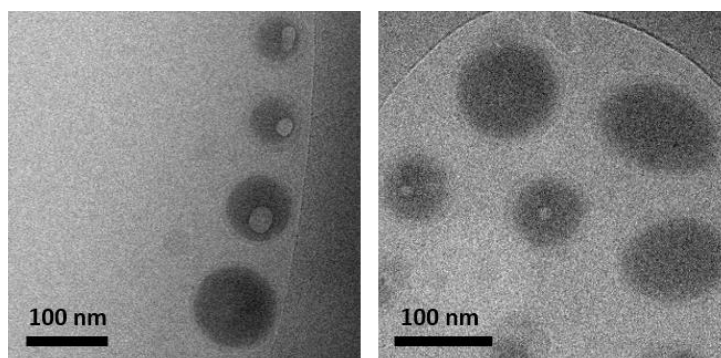


Figure 1: Cryo-TEM images of NCs made from 20 mg PEG-PLA (left) and NCs made from 20 mg PEG-PLA-PFMA₁₀ (right)

In the present chapter, we aim at comparing the mechanical properties of these two types of nanocapsules, PEG-PLA and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs, to potentially relate them to their morphologies and their acoustic response. After a brief reminder of NCs main physico-chemical characteristics, we will present the results of AFM indentation studies and *in vitro* scattering ultrasound measurements.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Materials for polymers synthesis, nanocapsules preparation and characterization were the same as in previous chapters. Poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 30\,000\text{--}70\,000$ g/mol, 87-90% hydrolyzed) and 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS) were obtained from Sigma-Aldrich (France). PLA-C₆H₁₃ of $M_n \sim 20000$ g/mol was synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide initiated by 1-hexanol, as reported in the 1st chapter (Houvenagel et al., 2017). PEG-PLA and PEG-PLA-PFMA₁₀ ($M_n^{\text{PEG}} \sim 5000$ g/mol, $M_n^{\text{PLA}} \sim 20000$ g/mol) were synthesized by ROP of DL-lactide initiated by poly(ethylene glycol) methyl ether, followed by atom transfer radical polymerization of 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodecyl methacrylate for PEG-PLA-PFMA₁₀, as reported in the 2nd chapter.

2.2. Nanocapsules preparation

Nanocapsules (NCs) were prepared by an emulsion evaporation process (Diou et al., 2012; Pisani et al., 2006). The polymer (either 50 mg PLA-C₆H₁₃, or 20 mg PEG-PLA, or 20 mg PEG-PLA-PFMA₁₀) was dissolved into 2 mL of methylene chloride along with 30 μL of PFOB. The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip (Digital Sonifier, Branson Ultrasons, France) at 30% of maximal power, for 1 min over ice. Solvent was allowed to evaporate by magnetic stirring at 300 rpm at room temperature for 3 h. Suspensions of NCs were then filtered through 0.45 μm PVDF filters. For PLA-C₆H₁₃ NCs, which are not PEGylated, an incubation with PVA (1% w/v) for 5 days at 4°C is necessary, prior to the purification step, to replace sodium cholate by PVA and prevent further aggregation. All NCs were then washed by ultracentrifugation for 1h, at 4 °C and at 6860 g for PLA-C₆H₁₃ NCs, and 27 440 g for PEG-PLA NCs and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The pellet was finally resuspended in ultrapure water to the desired concentration.

2.3. Nanocapsules characterization

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of NCs were measured by dynamic light scattering (DLS), using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Suspensions were diluted in water to a concentration of 1 mg/mL. Measurements were performed in triplicate at 20 °C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering. Zeta potential measurements were carried out with the same instrument at 25 °C in 1 mM NaCl.

PFOB encapsulation efficiency was determined by ¹⁹F NMR as previously described (Diou et al., 2014; Houvenagel et al., 2017).

Transmission electron microscopy (TEM) was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) using a JEOL JEM-1400 operating at 80 kV. 5 μL of purified suspensions of nanocapsules (0.5 mg/mL) were deposited for 1 min on glow-discharged copper grids covered with formvar-carbon film. Samples were then stained using 2% phosphotungstic acid (pH = 7) for 30 s. The excess solution was blotted off using a filter paper. Images were acquired using an Orius camera (Gatan Inc, USA).

Shell thickness was measured by Small Angle Neutron Scattering as previously reported in the 2nd chapter for PEG-PLA and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. For PLA-C₆H₁₃ NCs, we assume that the thickness/radius ratio is 0.35 as for PLGA NCs (Pisani et al., 2006), so the mean thickness was deduced from this ratio and from the mean hydrodynamic diameter measured by DLS.

2.4. AFM experiments

Nanocapsules were deposited onto microscope coverslips. The borosilicate glass surfaces of 10 mm x 10 mm were first cleaned with a piranha solution (10 mL sulfuric acid 95% + 4 mL hydrogen peroxide 30%) for 30 min, dried by argon gas, and made hydrophobic by silanisation with HMDS vapor (Michel et al., 2006). The reaction was allowed to proceed overnight in a glove box under argon. A 40 μL -droplet of NCs suspension diluted to 0.01 mg/mL was then deposited on the hydrophobic substrate and allowed to dry for 5h.

AFM experiments were performed with a JPK Nanowizard 3 UltraSpeed from JPK Instruments (Berlin, Germany). The microscope was located on an air-buffered table coupled to a dynamic anti-vibration device and enclosed in an acoustic box. AFM imaging was performed in air in AC mode (amplitude modulation) with gold coated silicon cantilevers PPP-NCHAuD of 40 ± 15 N/m nominal spring constant and 280 ± 5 kHz resonance frequency (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland). The pyramid-shaped tips had a radius of curvature around 10 nm. Images were taken at the scan rate of 1 Hz. Image processing (flatten, plane fit, edge and line detection) was performed with the JPK Data Processing software (JPK Instruments). Force measurements were performed in air by indenting NCs with setpoints between 200 and 300 nN at a speed of 1 $\mu\text{m/s}$ during an approach of 0.5 μm for PLA-C₆H₁₃ NCs, 0.15 μm for PEG-PLA NCs and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. Baseline adjustment and contact point determination were applied to all force-distance curves. Determination of capsules elastic moduli was performed with the JPK Data Processing software using the Hertz/Sneddon model. Poisson ratio was set to the value of 0.33 for glassy polymer (Lee and Lee, 2010).

2.5. *In vitro* ultrasound measurements

Ultrasound measurements were performed with the same set-up as in the 2nd chapter. Suspensions of nanocapsules (1 mL, 5 mg/mL) were placed in a 10 mm x 10 mm x 45 mm

polystyrene cuvette in which 5-mm diameter holes were cut out and covered by acoustically transparent mylar membrane. The cuvette was placed in a water bath at 37°C, and a small magnetic bar allowed agitating gently the suspension without disturbing the signal. Measurements were performed 4 minutes after the cuvette was placed in the water bath to allow temperature equilibration and removal of potential bubbles. A Handyscope HS5 (TiePie engineering, Netherlands) was used as both an arbitrary wave generator and a USB oscilloscope connected to a computer using Matlab (Mathworks, USA). Samples were insonified by a transducer (focal length 51 mm, model I3-0506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France), which emitted 10 bursts of 500 cycles at 5 MHz. The scattered ultrasound signal was received by a second transducer (focal length 51 mm, model I3-1506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France) placed at a 90° angle compared to the transducer-transmitter. This scattered signal was preamplified before being measured by the oscilloscope connected to Matlab for signal processing. The signal was then windowed, Fourier-transformed and the scattered intensity within the bandwidth of each harmonics was summed. The resulting ultrasound scattered intensities were subtracted from the intensity obtained with the cuvette filled with Milli-Q water. 6 measurements were performed with each sample. Commercial SonoVue® microbubbles (diluted to 1/1000) were used as a reference positive control for the ultrasound set-up and parameters chosen for our study.

3. Results and discussion

3.1. Nanocapsules characterization

Nanocapsules (NCs) made were formulated by an emulsion evaporation process using either 20 mg PEG-PLA or 20 mg PEG-PLA-PFMA₁₀. In addition, since an extensive study by AFM indentation on plain PLGA/PFOB microcapsules had been performed during the thesis of Baptiste Sarrazin (Sarrazin, 2015; Sarrazin et al., 2016), we wanted to use a non-PEGylated control for our experiments. Control nanocapsules were then prepared with 50 mg PLA-C₆H₁₃, because this sample had already been formulated with this mass and well characterized previously. NCs main characteristics are summarized in Table 1 and typical TEM images are shown in Figure 2.

Table 1: Characteristics of the 3 types of NCs: mean hydrodynamic diameter (d_H), polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), PFOB encapsulation efficiency (η_{PFOB}) and shell thickness (T)

	d_H (nm)	PDI	ζ (mV)	η_{PFOB} (%)	T (nm)
PLA-C ₆ H ₁₃ / 50 mg	155 ± 3	0.20	-12 ± 7	80 ± 10	~27
PEG-PLA / 20 mg	131 ± 8	0.28	-29 ± 7	24 ± 6	15 ± 4
PEG-PLA-PFMA ₁₀ / 20 mg	136 ± 12	0.35	-21 ± 6	46 ± 2	11 ± 3

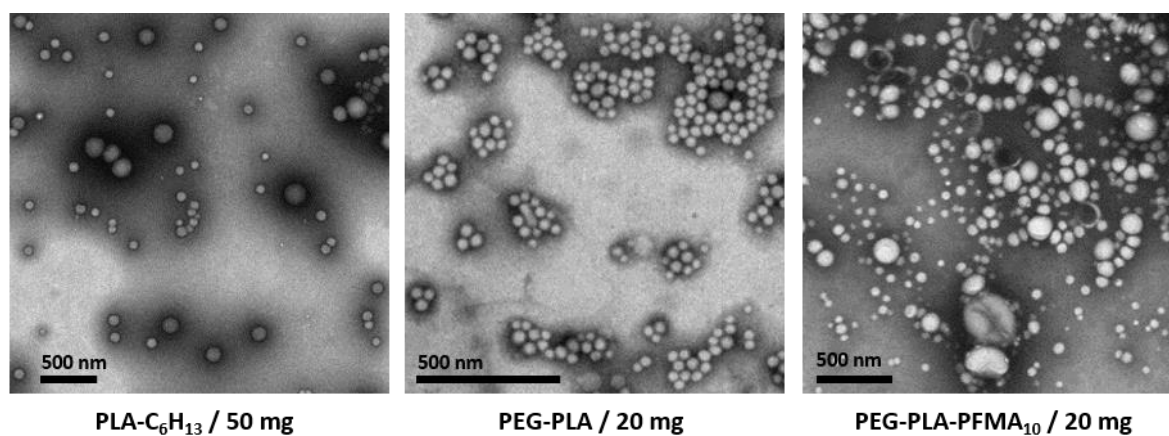


Figure 2: TEM images of the 3 types of NCs with negative staining

The PEGylated samples (PEG-PLA NCs and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs) were extensively characterized in the second chapter. At this low polymer amount (20 mg), we observed that PEG-PLA-PFMA₁₀ allows entrapping more PFOB into NCs than plain PEG-PLA ($\eta_{PFOB} = 46\%$ vs 24%) and allows decreasing the mean shell thickness from 15 to 11 nm, thanks to favorable interactions between PFOB and the fluorinated chains of the polymer. However, polydispersity is quite high at low polymer amount. In the case of PEG-PLA sample, the high PDI (0.28) is most probably due to the presence of non-encapsulated PFOB droplets (Diou et al., 2016). Regarding

PEG-PLA-PFMA₁₀ samples, the high PDI (0.35) can be explained by the presence of some large capsules that seem to be easily broken, as shown by TEM images (Figure 2 and 2nd chapter).

Regarding PLA-C₆H₁₃ NCs, as for previously developed PLGA nanocapsules, PVA was added before the purification step to prevent NCs aggregation (Diaz-Lopez et al., 2010; Diou et al., 2012). The resulting NCs present a mean hydrodynamic diameter of 155 nm and a PDI of 0.20. The high polymer amount used for formulation leads to a high PFOB encapsulation efficiency (80%). Zeta potential is less negative than for PEGylated samples, owing to the presence of PVA, which probably screens surface charges.

3.2. AFM imaging and indentation

3.2.1. Choice of the substrate

Finding the right conditions to image PEGylated NCs with a good resolution was very challenging. Attempts to image NCs in water on various substrates and at various concentrations (from 0.002 to 0.2 mg/mL) revealed unsuccessful. On freshly cleaved mica, almost no capsule could be observed on the surface, probably owing to repulsions between the negatively charged mica surface and the nanocapsules exhibiting a negative zeta potential (-21 and -29 mV). On glass surfaces modified with hydrophobic hexamethyldisilazane (HMDS), again almost no NC could be detected on the surface, probably due to their hydrophilic PEGylated surfaces. On the positively charged sapphire surface, although more capsules were detected on the surface, they seemed to be strongly adsorbed on this surface and were therefore much flattened (~25 nm high), probably due to the attractive interactions between the positive charges of the sapphire surface and the negatively charged surface of PEGylated NCs.

We therefore tried to image NCs in air. Based on previous results from the thesis of Baptiste Sarrazin on PLGA/PFOB microcapsules (Sarrazin et al., 2016), we first tried to deposit NCs on freshly cleaved mica or freshly piranha-cleaned silicon substrates. After deposition of 100 μ L of diluted suspensions of PEG-PLA NCs or PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs (either 0.2, 0.02 or 0.002 mg/mL) and drying at ambient air for 5h, nanocapsules were completely aggregated and flattened (~10-20 nm high). We also tried to rinse the surface gently with a wash bottle of ultrapure water, before allowing the sample to dry again for 1h, but this step was not always efficient to prevent aggregation. Examples of images on mica and silicon substrates are given in Figure 3.

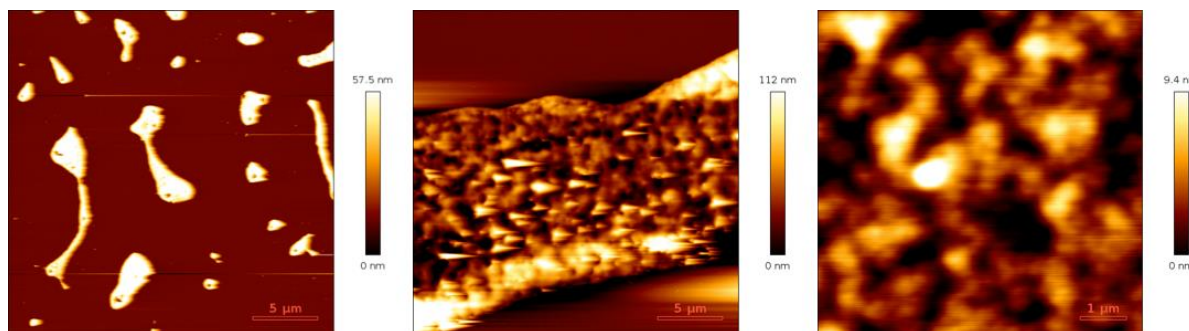


Figure 3: Examples of AFM height images in air where PEGylated NCs are completely aggregated on the surface: PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs diluted to 0.2 mg/mL on mica (left), PEG-PLA NCs diluted to 0.2 mg/mL on mica (middle) and PEG-PLA NCs diluted to 0.02 mg/mL on SiO₂ (right)

The use of glass surfaces modified with HMDS was finally the most adapted surface to image PEGylated NCs in air. Such conditions allowed solving the problem of aggregation, and slightly improved the problem of flattening. Indeed, NCs' heights ranged between 20 and 70 nm, values still far from the ~ 130 nm hydrodynamic diameters measured in DLS. Typical height and phase images of each sample are presented in Figure 5, Figure 6 and Figure 7, and typical height profiles are drawn in Figure 4. One should note that PLA-C₆H₁₃ NCs were not flattened on all tested substrates (mica, silicon and hydrophobic glass), with heights around 100 – 250 nm. The presence of PEG chains seems to strongly impact the nanocapsule-substrate interaction and results in more flattened and deformed NCs. Such flattening has already been observed in AFM studies of PEG-containing nanoparticles (Fritzen-Garcia et al., 2009; Murayama et al., 2013; Zanetti-Ramos et al., 2010). This could potentially arise from the difference of surface charge, since PEGylated NCs possess more negative zeta potential than PLA-C₆H₁₃ NCs (Table 1). The difference of glass transition temperature (13°C for PEG-PLA and 20°C for PEG-PLA-PFMA₁₀ vs 52°C for PLA-C₆H₁₃) might also account for the difference of NCs behavior during drying: at room temperature, PEGylated NCs are in a softer state and may therefore get deformed and flattened more easily than non-PEGylated ones. PEGylated capsules might also be less resistant since they were formulated using a lower polymer mass and present lower shell thickness.

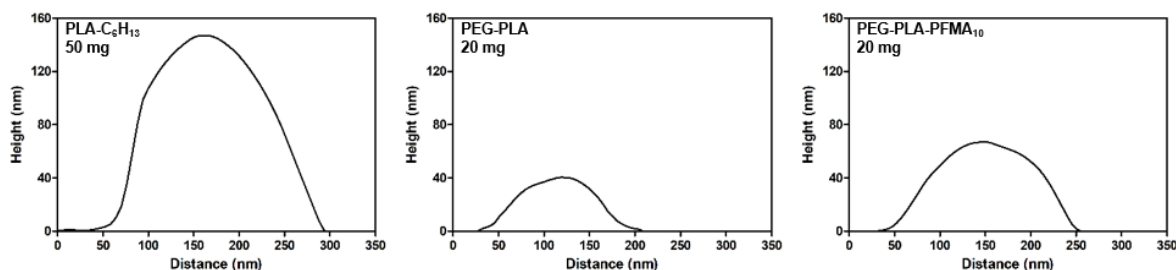


Figure 4: Typical height profiles of each type of NCs, highlighting the flattening of PEGylated NCs on the surface

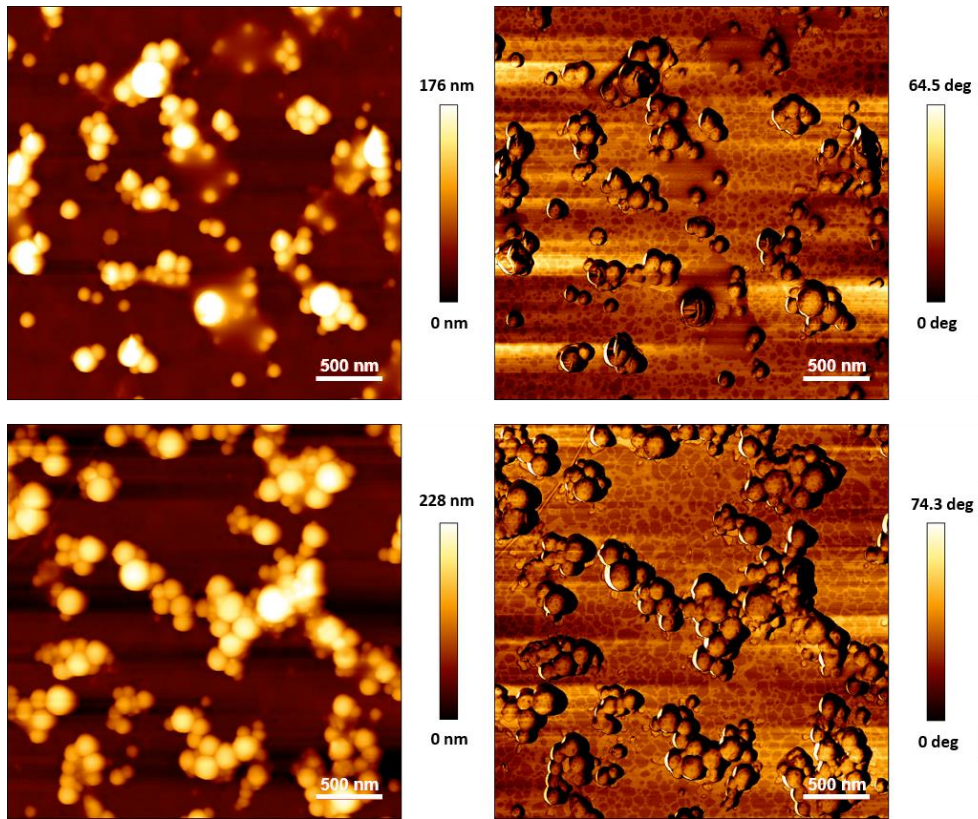


Figure 5: AFM height (left) and phase (right) images of PLA-C₆H₁₃ / 50 mg NCs

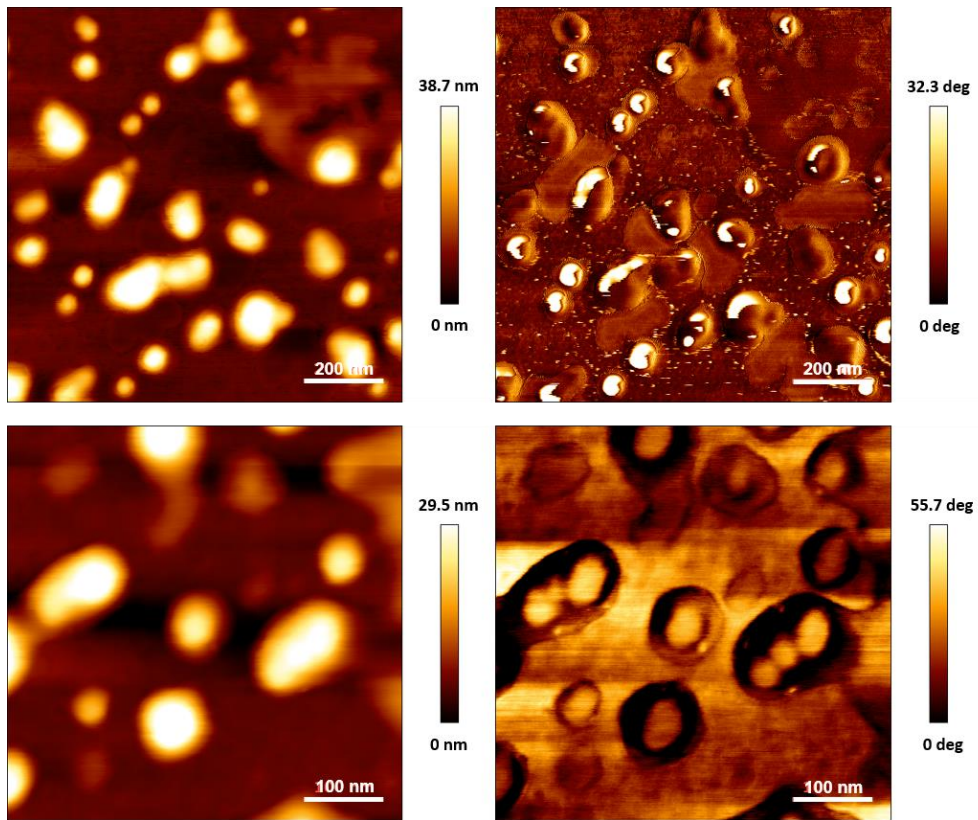


Figure 6: AFM height (left) and phase (right) images of PEG-PLA / 20 mg NCs

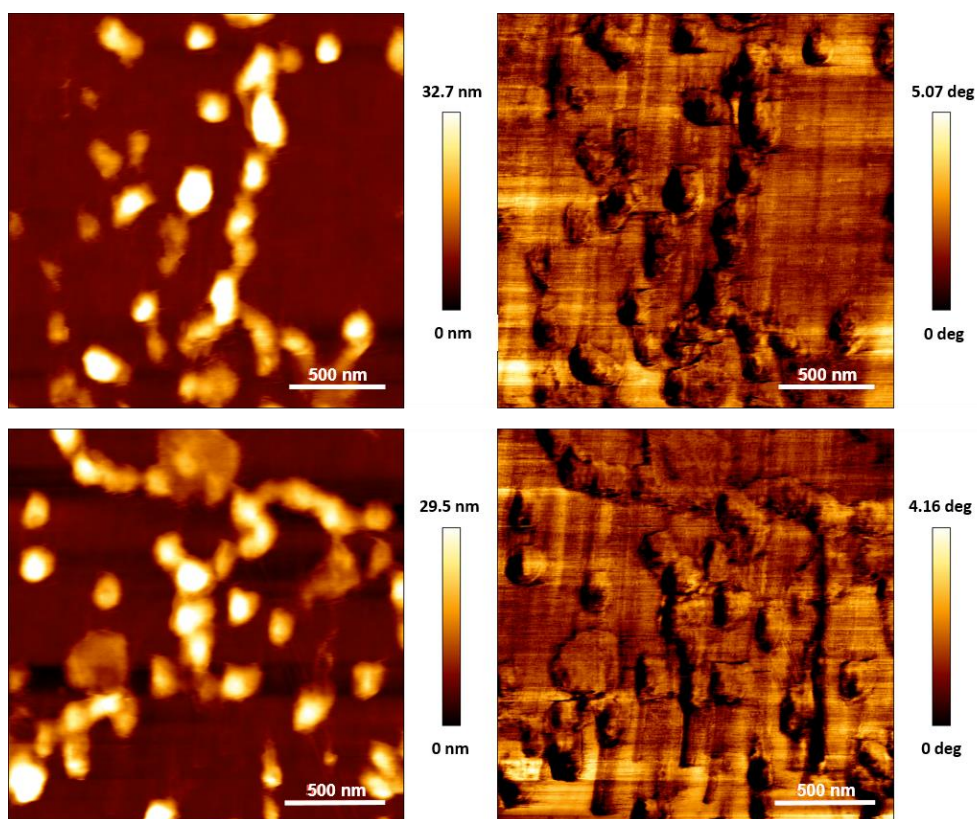


Figure 7: AFM height (left) and phase (right) images of PEG-PLA-PFMA₁₀ / 20 mg NCs

While PLA-C₆H₁₃ NCs appear spherical and quite monodisperse on AFM images (Figure 5), PEGylated samples appear a bit more polydisperse (Figure 6 and Figure 7), in agreement with DLS measurements (Table 1). For PEG-PLA NCs, height images seem to show some non-spherical NCs, nevertheless phase images provide more contrast and show that there are actually several spherical NCs close to each other (Figure 6), in agreement with TEM images (Figure 2). Phase images are produced from the changes in the phase of the cantilever oscillation during scanning and are very sensitive to the sample surface properties and viscoelastic properties. Indeed, such changes in the phase angle are related to energy dissipation during tip-sample interaction, and can arise from variations in sample topography, tip-sample molecular interactions, deformation at the tip-sample contact, or experimental conditions (Raghavan et al., 2000). Regarding PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs, they appear less spherical than the two other samples (Figure 7), but the contrast in phase images is much weaker (4 – 5 degrees compared to 30 – 75 degrees). Although interpretation of phase images is very complex, we can at least affirm here that the three types of NCs interact differently with the tip during scanning and exhibit different viscoelastic and surface properties. It is possible that NCs do not expose the same blocks at their surface: while PLA-C₆H₁₃ NCs are covered with PVA chains, PEG-PLA NCs expose hydrophilic PEG chains at their surface, and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs probably expose PEG chains as well but some fluorinated chains might also end up towards the surface.

3.2.2. Force measurements

Nanoindentation experiments were performed to compare the mechanical properties of the three types of NCs. The mean initial heights of NCs on which force measurements were performed are given in Table 2. In these measurements, the applied force was measured as a function of the z displacement of the piezo. A calibration curve was first obtained by indenting the incompressible glass surface without any NC. All these force-distance (FZ) curves were translated so that the $z = 0$ matches the contact point of the capsule (or the surface for the calibration curve).

Table 2: Characteristics of NCs on which indentation was performed

Height (nm)	PLA-C ₆ H ₁₃ / 50 mg	PEG-PLA / 20 mg	PEG-PLA-PFMA ₁₀ / 20 mg
Minimum	115	20	27
Mean \pm SD	181 \pm 34	33 \pm 7	39 \pm 12
Maximum	240	44	67
Number of NCs	14	13	16

Force-distance (FZ) curves obtained on 4 different NCs for each sample are represented in Figure 8, Figure 9 and Figure 10. The black curve corresponds to the calibration performed on the substrate without any NC, showing a linear behavior and a retraction curve fully superposed to the approach curve. Indentation depth can be visualized on the curves by the distance along the x-axis between the force curve on NC (colored curves) and the black one. Interestingly, the three types of NCs behave very differently. One should note that axis scales have been adapted to each sample, for ease of reading. Nevertheless, NCs share the same feature: they all exhibit a first linear regime as the tip indents the capsule. The differences in behavior arise after this first linear regime, as the compression is further pursued.

PLA-C₆H₁₃ NCs curves exhibit different regimes (Figure 8A). Just after the contact point with the capsule (between 0 and -45 nm, regime 1)), the force increases linearly until reaching a threshold around 100 nN, for which a discontinuity appears on the forward force curve. Such linear compression corresponds to indentation of 25% of the NC height. After this discontinuity, the force does not increase anymore as the tip is lowered down (regime 2). This regime may correspond to the progressive flattening of the NC rather than a buckling effect for which a sudden force drop is expected (Klug et al., 2006; Michel et al., 2006). This behavior is observed for some PLA-C₆H₁₃ NCs (FZa and FZb), but some others (see examples FZc and FZd) behave differently with shorter linear regime with lower slope. Finally, from z displacement higher than the height of the capsule (regime 3), the force increases much more sharply and linearly, with slopes corresponding to that of the calibration curve. This last regime is associated with the deflection of the cantilever on the incompressible surface (Figure 8B). Upon retraction, the curves are very different from the approach ones and display strong irreversible hysteresis that

suggest that NCs are irreversibly damaged. Indeed, when the capsules are indented a second time, the second curve is different, which confirms that the capsules are irreversibly flattened (Figure 8C). PLA-C₆H₁₃ NCs seem to adopt a plastic behavior upon compression associated with large indentation of the nanocapsule. Moreover, this sample showed some adhesion features, corresponding to adhesion forces at ~36 nN.

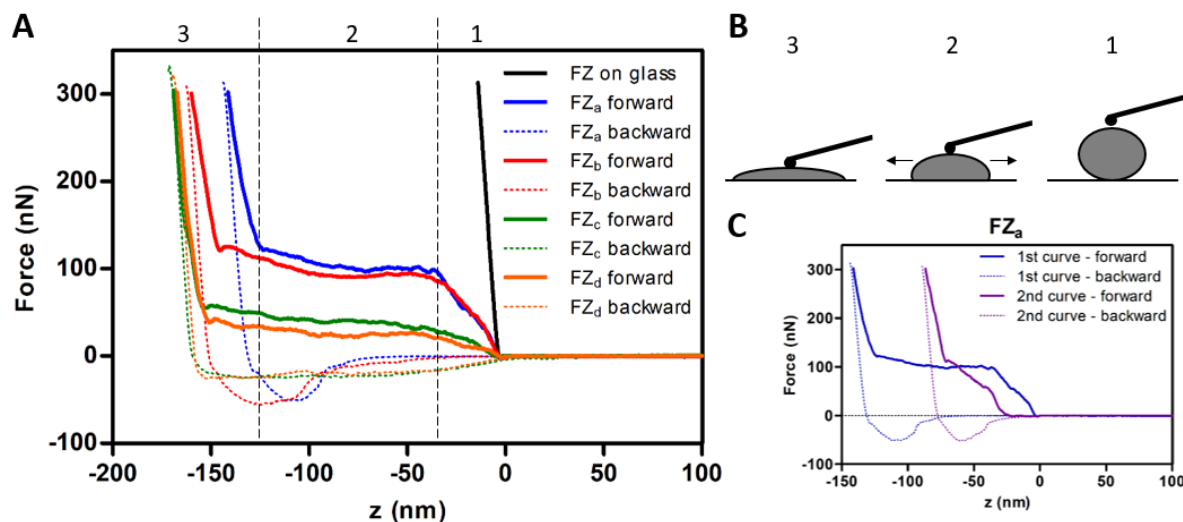


Figure 8: A: FZ indentation curves of PLA-C₆H₁₃ NCs (on 4 different nanocapsules: FZ_a, FZ_b, FZ_c, FZ_d). The force is drawn as a function of the z displacement of the piezo. Curves have been translated so that z = 0 matches the contact point of each NC. The black curve shows the cantilever on the glass surface. Colored lines show indentation on NCs: approach curves (plain lines) and corresponding retraction curves (dotted lines). Separations between the 3 different regimes of FZ_a are highlighted by black vertical dotted lines. B: Simplified schematic representation of what happens when the tip indents the capsule. C: Two consecutive curves on the same nanocapsule (FZ_a).

PEG PLA NCs force curves display more complex features (Figure 9). After a short linear regime, a complex behavior is taking place without any force drop. The last part of the curve has a slope much lower than the one of the calibration curve and therefore cannot correspond only to the deflection of the cantilever on the incompressible surface. A similar behavior had been reported in the thesis of Baptiste Sarrazin with NCs made of 50 mg PEG-PLA with a PLA block of 45000 g/mol, which exhibited a continuous decrease of elasticity as a function of the indentation depth, without any sharp rupture (Sarrazin, 2015). Moreover, curves are different from one capsule to another, which could be related to their difference in height before compression and to their flattened shape. Adhesion forces are much lower than with PLA-C₆H₁₃ NCs (~8 nN).

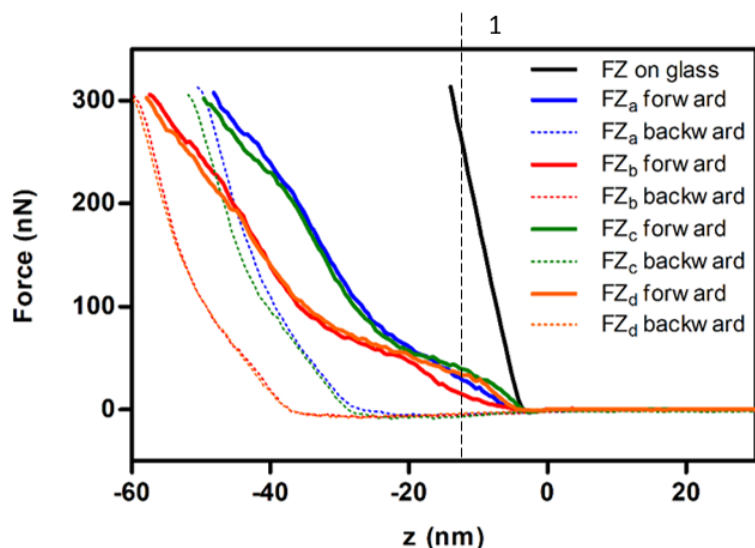


Figure 9: FZ indentation curves of PEG-PLA NCs (on 4 different nanocapsules: FZ_a, FZ_b, FZ_c, FZ_d). The force is drawn as a function of the z displacement of the piezo. Curves have been translated so that z = 0 matches the contact point of each NC. The black curve shows the cantilever on the glass surface. Colored lines show indentation on NCs: approach curves (plain lines) and corresponding retraction curves (dotted lines). The 1st regime is delimited by the black vertical dotted line.

Finally, PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs curves are highly different from the two other samples. Indeed, these NCs adopt a full linear behavior on the whole range of indentation corresponding to the initial height of NCs, as shown by the FZ forward curves with slopes lower to that of the calibration curve (Figure 10A). The comparison of force-distance scales shows also that PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs are stiffer than their counterparts, since the same force applied on the NC requires a much smaller z displacement of the piezo. All retraction curves show strong hysteresis upon the first compression and their slopes are close to that of the calibration curve: during retraction, this is mainly the backward deflection of the cantilever that is monitored. Low adhesion forces are measured (around 16 nN). Moreover, when nanocapsules were indented a second time, the FZ curves were superposed to the FZ curves of the first indentation (Figure 10B). Such observation confirms the elastic behavior of these NCs over the indentation depth studied (~ 20 nm). This behavior was also independent of the compression speed (from 0.1 $\mu\text{m/s}$ up to 2 $\mu\text{m/s}$, data not shown). The presence of fluorinated polymer in the NC composition clearly has a strong influence on the mechanical behavior of the nanocapsule stressed by the compression of the AFM tip in a controlled manner.

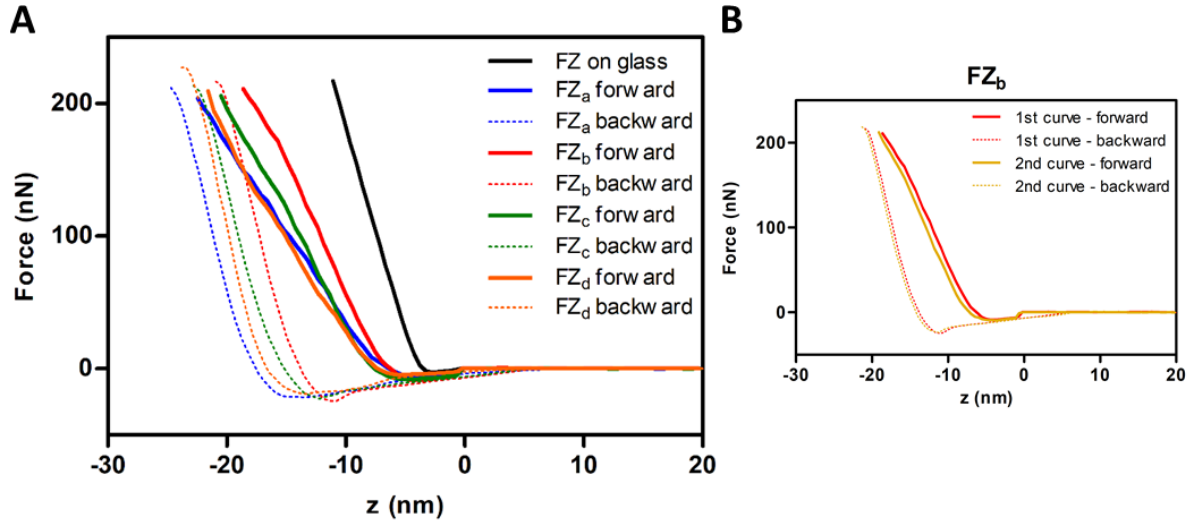


Figure 10: A: FZ indentation curves of PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs (on 4 different nanocapsules: FZ_a, FZ_b, FZ_c, FZ_d). The force is drawn as a function of the z displacement of the piezo. Curves have been translated so that z = 0 matches the contact point of each NC. The black curve shows the cantilever on the glass surface. Colored lines show indentation on NCs: approach curves (plain lines) and corresponding retraction curves (dotted lines). Only one linear regime is observed. **B:** Two consecutive curves on the same nanocapsule (FZ_b). Their superposition confirms the elastic behavior of the capsule

The different trends observed in FZ curves have demonstrated qualitatively that the three types of NCs possess different behaviors. To compare their mechanical properties more quantitatively, two parameters were calculated from the slopes of FZ curves: the spring constants and the Young's moduli of the capsules.

Spring constants of capsules were determined by linear fits, in the first zone (regime 1 on Figure 8 and Figure 9) for PEG-PLA and PLA-C₆H₁₃ samples, and in the whole curve for PEG-PLA-PFMA₁₀ sample. In these linear regimes, the capsule and the cantilever can be considered as two harmonic springs in series. The spring constant k_{cap} of the capsule is then related to the slope of the curve k_{eff} and the cantilever spring constant k_c (31 N/m) by the formula:

$$k_{cap} = \frac{k_c \times k_{eff}}{k_c - k_{eff}}$$

As indentation depths performed on NCs were comparable to their initial heights, elastic behavior is predominant and adhesion effects are negligible against applied force. Young's moduli E were then obtained by fitting the curves with the Hertz-Sneddon model (Hertz, 1895), which describes the pure elastic deformation of two spheres in contact according to the following equation:

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{4\sqrt{R_c}}{3} \delta^{3/2}$$

where R_c is the radius of tip curvature (around 10 nm), ν is the Poisson ratio of the sample, and δ is the indentation depth ($\delta = |z - z_0| - |D - D_0|$ with z and D the piezo-displacement and the cantilever deflection respectively, and z_0 and D_0 the piezo-displacement and the cantilever

deflection at which the tip-surface contact occurs, respectively). In this study, ν is assumed to be 0.33, value previously reported for glassy polymers and used in the thesis of Baptiste Sarrazin (Sarrazin et al., 2016).

The frequency distribution of k_{cap} for each sample is represented in Figure 11 and numerical values of k_{cap} and E are detailed in Table 3. PLA-C₆H₁₃ and PEG-PLA samples demonstrate narrow distributions compared to PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. Indeed, the slopes of the FZ curves k_{eff} are much higher for this last sample (Table 3) and closer to k_c of 31 N/m, so $k_c - k_{\text{eff}}$ is much lower and $(k_c - k_{\text{eff}})^{-1}$ is consequently very large and broad. The same trend is observed for the distribution of elastic moduli (Table 3).

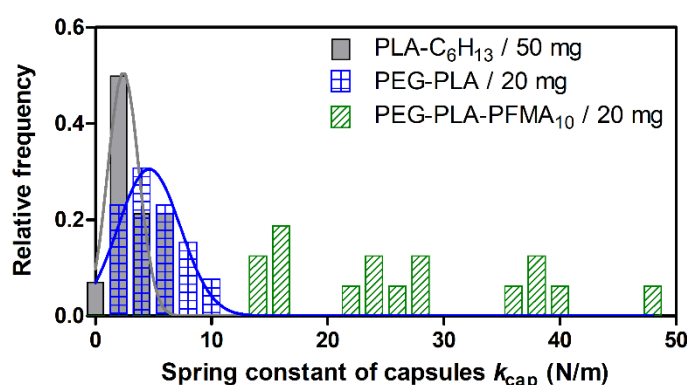


Figure 11: Statistics of spring constants of NCs measured by nanoindentation – Gaussian fits could be obtained for PLA-C₆H₁₃ NCs and PEG-PLA NCs, but not for PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs which exhibit a very wide distribution

Table 3: Characteristics of NCs determined from FZ curves: Spring constants of capsules (k_{cap}), Young's moduli (E) and adhesion forces

		PLA-C ₆ H ₁₃ 50 mg	PEG-PLA 20 mg	PEG-PLA-PFMA ₁₀ 20 mg
Number of NCs		14	13	16
k_{cap} (N/m)	Min	0.7	1.7	13.4
	Mean \pm SD	3.1 \pm 2.0	5.2 \pm 2.4	26.8 \pm 10.6
	Max	6.6	9.2	47.9
E (MPa)	Min	45	248	821
	Mean \pm SD	243 \pm 186	507 \pm 228	2099 \pm 945
	Max	697	967	3485
Adhesion force (nN)	Min	12	4	8
	Mean \pm SD	36 \pm 14	8 \pm 4	15 \pm 7
	Max	62	20	28

PLA-C₆H₁₃ NCs appear less stiff ($k_{\text{cap}} = 3.1 \pm 2.0$ N/m and $E = 243 \pm 186$ MPa) than PEG-PLA NCs ($k_{\text{cap}} = 5.2 \pm 2.4$ N/m and $E = 507 \pm 228$ MPa), although the two distributions are not fully discriminated from a statistical point of view. Such finding is somehow surprising since we could

think that addition of PEG chains would soften the material. Indeed, Young's modulus of bulk PLA was reported to be around 2000 MPa (Shumigin et al., 2011) whereas Young's modulus of PEG was reported to be only a few MPa (Huang et al., 2014; Soule and Cashman, 2004). However, the size, thickness and morphology of the capsule, which consists of a soft liquid core inside a solid polymeric shell, modify a lot its elastic properties. Indeed, for PLGA microcapsules of ~ 1 μm diameter and tunable shell thickness, Young's moduli were reported to decrease from 3000 to 100 MPa when thickness decreases from 200 to 10 nm (Sarrazin et al., 2016). One should also take into account the fact that the capsules were indented in air and not in water, and that PEGylated capsules were flattened on the surface, not the PLA-C₆H₁₃ NCs. These experimental conditions may modify the capsules' mechanical properties. Nevertheless, similar elastic moduli were obtained in the thesis of Baptiste Sarrazin from indentation in water on PEG-PLA nanocapsules of similar size (made of 50 mg polymer with a PLA block of 45000 g/mol) covalently attached to a gold substrate and therefore not flattened (Sarrazin, 2015).

One can also observe that PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs appear much stiffer ($k_{\text{cap}} = 26.8 \pm 10.6$ N/m and $E = 2.1 \pm 0.9$ GPa) than plain PEG-PLA NCs, but with a much broader distribution. This is also surprising since cryo-TEM images had shown the presence of capsules with an ellipsoidal shape and a thin shell, as if they were more deformable. Moreover, SANS measurements had shown that the mean shell thickness was lower with the fluorinated polymer (11 nm compared to 15 nm for PEG-PLA). Based on these observations, we could expect PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs to be more deformable and softer, and present lower spring constant and lower elastic modulus than PEG-PLA NCs. However, perfluorinated chains are characterized by a high density and a high stiffness compared to their hydrogenated counterparts (Krafft and Riess, 1998). Addition of fluorinated chains in PEG-PLA can then lead to the formation of stiffer NCs, as observed here. The broad distribution of spring constants and elastic moduli suggests a stronger heterogeneity in the fluorinated NCs population compared to the non-fluorinated ones. This heterogeneity most probably arises from the higher polydispersity in capsules size and shape observed in DLS and TEM experiments.

3.3. Acoustic response

To compare the acoustic response of the three samples, *in vitro* ultrasound scattering measurements were performed at 5 MHz, at 37 °C and at a final polymer concentration of 5 mg/mL. Figure 12 presents the ultrasound scattered intensities measured at the fundamental frequency and subtracted by the background level produced by Milli-Q water. Measurements were also performed with commercial Sonovue microbubbles as a reference positive control for the set-up and used parameters. For ease of reading, these results are not shown on the graph

because ultrasound scattered intensity was around 16.5×10^3 arbitrary units (a.u.), much higher than values measured with NCs due to the large radius and gaseous core of microbubbles.

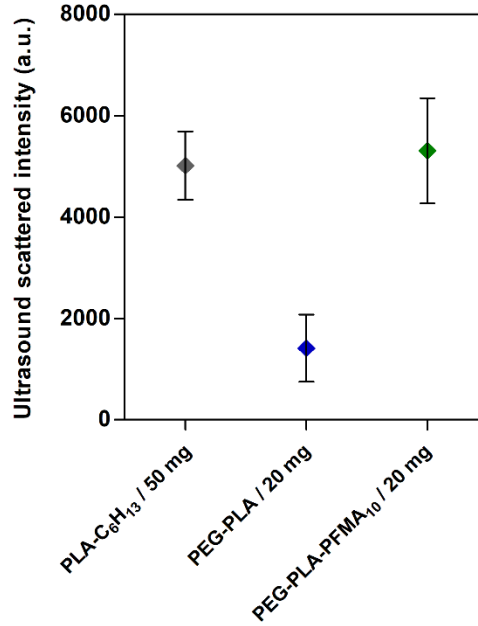


Figure 12: Ultrasound scattered intensity (arbitrary units) by the three different types of NCs, presented as mean \pm SEM ($n > 18$). For comparison, ultrasound scattered intensity by commercial Sonovue microbubbles was $16.5 \pm 1.9 \times 10^3$ a.u.

Ultrasound scattered intensity is about 5.0×10^3 a.u. for PLA-C₆H₁₃ NCs, 1.4×10^3 a.u. for PEG-PLA NCs and 5.3×10^3 a.u. for PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. Both PLA-C₆H₁₃ NCs and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs scatter ultrasound waves more effectively than PEG-PLA capsules. No obvious correlation with their spring constants or elastic moduli E can therefore be established, since we had the relation E (PLA-C₆H₁₃) $<$ E (PEG-PLA) $<$ E (PEG-PLA-PFMA₁₀). A lot of parameters can impact the capsules acoustic response. Indeed, as seen previously in the first chapter, the scattering cross section of a particle is defined as

$$SCS = \frac{4\pi}{9} k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_d - 3\rho}{2\rho_d + \rho} \right)^2 \right]$$

where k is the wavenumber, R is the radius of the particle, κ_d and κ the compressibilities of respectively the particle and the medium, ρ_d and ρ the densities of respectively the particle and the medium (Dejong et al., 1991).

The size of the particle therefore contributes a lot to its capacity to scatter ultrasound waves. In the present study, PLA-C₆H₁₃ NCs are just slightly larger (155 nm diameter) than other samples (131 nm for PEG-PLA and 136 nm for PEG-PLA-PFMA₁₀), which could only partially contribute to their effectiveness in scattering ultrasound.

The formula also demonstrates that the scattering cross section of a particle increases with the differences of compressibilities and densities between the particle and the surrounding medium.

The compressibility κ is the inverse of the bulk modulus B of a material (Landau and Lifshitz, 1951). For homogeneous isotropic materials, the Young's modulus E is proportional to the bulk modulus B according to the relation $E = 3B(1 - 2\nu)$ where ν is the Poisson ratio. Although the nanocapsules are not pure homogeneous materials, we assume that the measured Young's moduli can give us a qualitative idea of the compressibility of the nanocapsules. We can consider that a lower Young's modulus is a sign of a higher compressibility. In this way, PLA-C₆H₁₃ NCs are probably more compressible than other samples, which could explain their higher acoustic response. Regarding PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs, while they present a high Young's modulus of ~ 2 GPa, therefore a low compressibility, they also present a high density due to the presence of fluorinated chains, as seen in the first chapter. Moreover, a high amount of encapsulated PFOB will strongly increase capsules density as well. PFOB encapsulation efficiency was very high in PLA-C₆H₁₃ NCs (80%), and lower in PEGylated NCs but still much higher with PEG-PLA-PFMA₁₀ (46%) than with PEG-PLA (24%).

In the present study, capsules performance as ultrasound scatterers mainly depends on a balance between compressibility and density, and can be qualitatively summarized as follows:

- PLA-C₆H₁₃ NCs acoustic performance is favored by high compressibility, high PFOB encapsulation efficiency, and potentially a slightly larger size
- PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs acoustic performance is mainly favored by high density, owing to the fluorinated chains in the polymer and to the quite high PFOB encapsulation efficiency (at least higher than in PEG-PLA NCs)
- PEG-PLA NCs are much less effective ultrasound scatterers since they are less compressible than PLA-C₆H₁₃ NCs as shown by higher elastic modulus, and this loss of compressibility is not counterbalanced by higher density.

4. Conclusion

AFM indentation experiments have revealed some major differences in the mechanical behavior of the three types of NCs. When indented, capsules all exhibit a first linear regime, but differences in behavior arise as the compression is further pursued. Non-PEGylated NCs seem to undergo a plastic deformation which makes them irreversibly flattened. The behavior of PEG-PLA NCs is difficult to interpret because there is no sharp rupture, and upon higher compression there is a sort of slow decrease of elasticity. PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs exhibit a fully elastic behavior over the indentation depth studied. Additional experiments with higher indentation depth should be performed with this sample.

By focusing on the first linear elastic regimes of each type of NCs, elastic moduli of NCs were found to increase moderately from 0.24 GPa for PLA-C₆H₁₃ NCs to 0.51 GPa for PEG-PLA NCs, but much more strongly to 2.10 GPa for PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs. The high stiffness of perfluorinated chains seems to increase the stiffness of the whole capsule. To evaluate the differences of mechanical behavior between the polymers only, indentation on nanoparticles formulated without PFOB should be performed.

Capsules acoustic properties could not be directly correlated to their Young's moduli: PLA-C₆H₁₃ NCs and PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs are both quite effective ultrasound scatterers, while PEG-PLA NCs provide a signal just above background. Capsules acoustic performance depends on a compromise between compressibility and density which is not yet fully understood. It is possible that the presence of PEG chains decreases the capsules acoustic performance (by decreasing compressibility), and that fluorination allows counterbalancing this effect (by increasing density). To confirm that the trends observed in the capsules Young's moduli can be related to their compressibility, volumetric measurements and ultrasound velocity measurements should be performed on suspensions of nanocapsules to directly measure their compressibility (Diou et al., 2016; Pisani et al., 2008). It would also be more suitable to perform AFM indentation in water on non-flattened nanocapsules to evaluate their mechanical properties in conditions closer to their real environment after intravenous injection. This is possible by grafting the capsules onto gold surfaces, which requires the synthesis of a carboxylic acid-terminated PLA-PEG-COOH to allow a EDC/NHS coupling on amine-functionalized gold surfaces (Sarrazin, 2015).

5. Acknowledgements

We thank Ali Makky for fruitful discussions.

References

- Dejong, N., Tencate, F.J., Lancee, C.T., Roelandt, J.R.T.C., Bom, N., 1991. Principles and Recent Developments in Ultrasound Contrast Agents. *Ultrasonics* 29, 324–330.
- Diaz-Lopez, R., Tsapis, N., Santin, M., Bridal, S.L., Nicolas, V., Jaillard, D., Libong, D., Chaminade, P., Marsaud, V., Vauthier, C., Fattal, E., 2010. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials* 31, 1723–1731.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Fattal, E., Delplace, V., Mackiewicz, N., Nicolas, J., Meriaux, S., Valette, J., Robic, C., Tsapis, N., 2014. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 170–177.
- Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E., 2012. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ¹⁹F MRI. *Biomaterials* 33, 5593–5602.
- Fritzen-Garcia, M.B., Zanetti-Ramos, B.G., de Oliveira, C.S., Soldi, V., Pasa, A.A., Creczynski-Pasa, T.B., 2009. Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid substrates. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 405–409.
- Hertz, H.R., 1895. Über die Berührung elastischer Körper. *Gesammelte Werke* 1.
- Houvenagel, S., Picheth, G., Dejean, C., Brulet, A., Chenneviere, A., Couture, O., Huang, N., Moine, L., Tsapis, N., 2017. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. *Polym. Chem.* 8, 2559–2570.
- Huang, Q., Yoon, I., Villanueva, J., Kim, K., Sirbulu, D.J., 2014. Quantitative mechanical analysis of thin compressible polymer monolayers on oxide surfaces. *Soft Matter* 10, 8001–8010.
- Klug, W.S., Bruinsma, R.F., Michel, J.P., Knobler, C.M., Ivanovska, I.L., Schmidt, C.F., Wuite, G.J.L., 2006. Failure of viral shells. *Phys. Rev. Lett.* 97, 1–4.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 1998. Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie* 80, 489–514.
- Landau, L.D., Lifshitz, E.M., 1951. *Theory of Elasticity*, Course of Theoretical Physics, Pergamon P. ed.
- Lee, M.H., Lee, D., 2010. Elastic instability of polymer-shelled bubbles formed from air-in-oil-in-water compound bubbles. *Soft Matter* 6, 4326.
- Michel, J.P., Ivanovska, I.L., Gibbons, M.M., Klug, W.S., Knobler, C.M., Wuite, G.J.L., Schmidt, C.F., 2006. Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Pnas* 103, 6184–6189.
- Murayama, S., Jo, J.-I., Shibata, Y., Liang, K., Santa, T., Saga, T., Aoki, I., Kato, M., 2013. The simple preparation of polyethylene glycol-based soft nanoparticles containing dual imaging probes. *J. Mater. Chem. B* 1, 4932–4938.
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B.T., Beloeil, J.C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S.L., Fattal, E., 2008. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 18, 2963–2971.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.
- Raghavan, D., Gu, X., Nguyen, T., VanLandingham, M., Karim, A., 2000. Mapping polymer heterogeneity using atomic force microscopy phase imaging and nanoscale indentation. *Macromolecules* 33, 2573–2583.
- Sarrazin, B., 2015. *Propriétés Mécaniques de Bicouches et de Capsules Polymères Résolues à l'Échelle Nanométrique: Etude par Microscopie à Force Atomique*. Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Sarrazin, B., Tsapis, N., Mousnier, L., Taulier, N., Urbach, W., Guenoun, P., 2016. AFM investigation of liquid-filled polymer microcapsules elasticity. *Langmuir* 32, 4610–4618.
- Shumigin, D., Tarasova, E., Krumme, A., Meier, P., 2011. Rheological and Mechanical Properties of Poly (lactic) Acid / Cellulose and LDPE / Cellulose Composites. *Mater. Sci.* 17, 32–37.
- Soule, S.A., Cashman, K. V., 2004. The mechanical properties of solidified polyethylene glycol 600, an analog for lava crust. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 129, 139–153.
- Zanetti-Ramos, B.G., Fritzen-Garcia, M.B., Creczynski-Pasa, T.B., Oliveira, C.S. De, Pasa, A.A., Soldi, V., Borsali, R., 2010. Characterization of Polymeric Particles with Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering, and Atomic Force Microscopy. *Part. Sci. Technol.* 28, 472–484.

Chapitre 4

Influence des chaînes de poly(éthylène glycol) et des chaînes perfluorées sur la réponse acoustique de nanocapsules de bromure de perfluorooctyle

Dans les deux premiers chapitres, nos deux stratégies différentes (50% PLA-C_xF_{2x+1}/50% PEG-PLA et 100% de PEG-PLA-PFMA_n) ont permis d'améliorer la réponse ultrasonore des nanocapsules par rapport à des nanocapsules de PEG-PLA non fluoré. Nous n'avons cependant pas pu comparer ces deux stratégies entre elles puisque les expériences d'ultrasons ont été réalisées avec deux montages différents. Cependant, avec ces deux stratégies, le signal ultrasonore était toujours bien inférieur au signal obtenu avec les microbulles Sonovue®. Nous avons alors émis l'hypothèse que dans notre système, l'épaisseur de la coque n'est finalement pas un paramètre critique pour contrôler la performance acoustique des capsules, mais que la présence de chaînes de PEG et la présence de chaînes perfluorées pourraient être des paramètres importants. En effet, dans le troisième chapitre, nous avons observé que la PEGylation et la fluoration du PLA ont toutes les deux une influence non négligeable sur les propriétés mécaniques et acoustiques des nanocapsules.

Le chapitre 4 propose une étude un peu plus systématique, avec le même montage, où le pourcentage de polymère PEGylé et le pourcentage de polymère fluoré sont variés, ainsi que l'architecture des chaînes fluorées dans le polymère.

Les résultats confirment le fait que la présence de chaînes de PEG diminue considérablement le signal ultrasonore, alors que la présence de chaînes perfluorées a l'effet inverse. Diminuer le pourcentage de polymère PEGylé tout en conservant 100% de polymère fluoré semble alors être une piste intéressante pour trouver le bon compromis entre furtivité et échogénicité.

Influence of polymer PEGylation and fluorination on perfluorooctyl bromide nanocapsules acoustic response

Sophie Houvenagel^a, Laurence Moine^a, Olivier Couture^b, Vincent Faugeras^b, Nicolas Tsapis^a

^a Institut Galien Paris-Sud, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b Institut Langevin, ESPCI, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), Paris, France

1. Introduction

In the first and second chapters, we observed that our two different fluorination strategies (50% PLA-C_xF_{2x+1} / 50% PEG-PLA and 100% PEG-PLA-PFMA_n) could somehow lead to an improvement of nanocapsules echogenicity, which was however still far from the echogenicity of Sonovue® microbubbles. We noticed that the shell thickness was not always a critical parameter to understand the capsules acoustic performance, and we hypothesized that the presence of PEG chains and the presence of fluorinated chains could be important parameters. In the last chapter, both PEGylation and fluorination of PLA were shown to have a non-negligible influence on the nanocapsules (NCs) mechanical and acoustic properties. Indeed, regarding PEGylation, PEG-PLA NCs were shown to be stiffer and to scatter ultrasound less efficiently than non-PEGylated PLA-C₆H₁₃ NCs. Jablonowski et al. reported that shell PEGylation of PLA/air microbubbles of 1-2 μm diameter considerably reduces their echogenicity, in a dose-dependent manner (Jablonowski et al., 2016). Indeed, loss of acoustic signal occurs by adding > 5 wt% PEG-PLA or by inserting > 1 wt% PEGylated lipids into the shell (Jablonowski et al., 2017). Regarding fluorination, although fluorinated PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs were shown to be stiffer than non-fluorinated PEG-PLA NCs, they were also more efficient ultrasound scatterers.

The following chapter therefore aims at varying:

- the percentage of PEGylated polymer used for formulation
- the percentage of fluorinated polymer used for formulation
- the architecture of fluorinated chains in the polymer (linear versus comb-like)

and studying their influence on capsules acoustic properties.

To study these last two parameters without varying the amount of PEG, the synthesis of a control block copolymer of PLA and PFMA without PEG was required (Figure 1). We present here the synthesis and characterization of this control polymer, as well as its interfacial properties. Nanocapsules formulation with various polymer mixtures and *in vitro* ultrasound scattering results are then described.

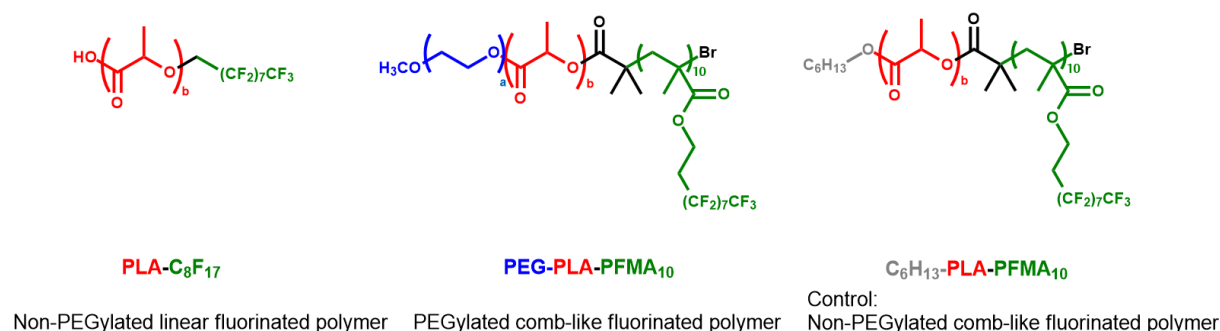


Figure 1: Structure of the different polymers used in this work, showing the necessity to synthesize a non-PEGylated comb-like fluorinated polymer as control

2. Materials and methods

2.1. Materials

DL-lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). Stannous 2-ethyl hexanoate (stannous octoate, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$), N,N,N',N'',N'' -pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA), triethylamine (Et_3N), dried toluene, cyclohexanone, magnesium sulfate (MgSO_4), sodium cholate and poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 30\,000$ - $70\,000$ g/mol, 87-90% hydrolyzed) were provided by Sigma-Aldrich (France). 1-hexanol, 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide and copper(I) bromide (CuBr) were provided by ACROS Organics (Belgium). 1H,1H,2H,2H-Heptadecafluorodecyl methacrylate (FMA) and perfluorooctyl bromide (PFOB) were purchased from Fluorochem (UK). All solvents were purchased from Carlo Erba (France). Water was purified using a RIOS/Synergy system from Millipore (France). NMR sample tubes and coaxial inserts were obtained from CortecNet (France).

PLA- C_8F_{17} and PLA-PEG of $M_n^{\text{PLA}} \sim 20000$ g/mol were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide initiated by respectively 1H,1H-perfluoro-1-nonanol and poly(ethylene glycol) methyl ether ($M_n^{\text{PEG}} = 5000$ g/mol), as reported in the 1st chapter (Houvenagel et al., 2017). PEG-PLA-PFMA₁₀ was synthesized by a combination of ROP and atom transfer radical polymerization (ATRP) of FMA, as reported in the 2nd chapter.

2.2. Synthesis of C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀

The synthesis route involved 3 steps as shown in Figure 2.

2.2.1. Synthesis of C_6H_{13} -PLA

C_6H_{13} -PLA was synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide initiated by 1-hexanol in the presence of stannous octoate catalyst (Houvenagel et al., 2017; Nijenhuis et al., 1992). All glassware was dried by heating under vacuum and handled under argon atmosphere. To a 250 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar were added DL-lactide (156.14 mmol, 22.50 g) and 1-hexanol (1.13 mmol, 142 μL). The flask was sealed with a rubber cap and a stannous octoate solution (0.75 mmol, 306 mg) dissolved in 30 mL of dried toluene was added through the septum. The tube was purged with argon for 15 minutes and then placed into a 130°C oil bath. Polymerization was carried out for 1h under magnetic stirring, and then quenched by immersing the tube in a cold water bath. After evaporation of toluene, the reaction product was dissolved in chloroform and precipitated twice into excess cold diethyl ether. The polymer was finally dried under vacuum and 18.96 g of a white powder was obtained. Lactide conversion = 94% (^1H NMR). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 5.10-5.28 ($-\text{CHCH}_3\text{COO}-$), 4.35

(terminal $CHCH_3COO-$), 4.13 ($-OCH_2C_5H_{11}$), 2.70 (terminal $HOCHCH_3COO-$), 1.45-1.67 ($-CHCH_3COO-$), 1.30 ($-(CH_2)_3CH_3$), 0.88 ($-CH_2CH_3$).

2.2.2. Synthesis of C_6H_{13} -PLA-Br macroinitiator

C_6H_{13} -PLA-Br was synthesized by esterification of C_6H_{13} -PLA with excess 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide using a known procedure (Spasova et al., 2009; Zhao et al., 2004). In a 100 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar, C_6H_{13} -PLA (0.640 mmol, 8.317 g) was dissolved in 60 mL of CH_2Cl_2 . Excess of triethylamine (14.55 mmol, 2.0 mL) was added to the solution, and the mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. 2-Bromo-2-methylpropionyl bromide (14.55 mmol, 1.8 mL) was added dropwise for 15 min. The mixture was allowed to stir at room temperature overnight, and was subsequently washed twice with saturated brine and once with water. The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$ before concentration under reduced pressure followed by 4 precipitations in excess cold diethyl ether. The product was finally dried under vacuum to provide 4.397 g of an off-white solid. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 5.10-5.28 ($-CHCH_3COO-$), 4.13 ($-OCH_2C_5H_{11}$), 1.94 and 1.98 ($C(Br)(CH_3)_2$), 1.45-1.67 ($-CHCH_3COO-$), 1.30 ($-(CH_2)_3CH_3$), 0.88 ($-CH_2CH_3$).

2.2.3. Synthesis of C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀

C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀ was synthesized by ATRP of FMA initiated by C_6H_{13} -PLA-Br with $CuBr/PMDETA$ as the catalyst system (Li et al., 2013). All glassware was dried by heating under vacuum and handled under argon atmosphere. To a 100 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir-bar was added C_6H_{13} -PLA-Br (0.12 mmol, 2.00 g) and a solution of $PMDETA$ (0.10 mmol, 18 mg) and FMA (1.05 mmol, 561 mg) in cyclohexanone (6 mL). After dissolution of the macroinitiator, $CuBr$ (0.10 mmol, 15 mg) was added and the mixture was subjected to two freeze-pump-thaw cycles. The reaction proceeded at 100 °C for 24h. The mixture was cooled and diluted with THF, and the copper catalyst was removed with a neutral alumina column. After concentration under reduced pressure, the product was precipitated twice in excess cold diethyl ether and dried under vacuum. FMA conversion = 80% (1H NMR). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 5.10-5.28 ($-CHCH_3COO-$ of PLA), 4.28 ($-OCH_2CH_2CF_2-$ of PFMA), 4.13 ($-OCH_2C_5H_{11}$), 2.47 ($-OCH_2CH_2CF_2-$ of PFMA), 1.45-1.67 ($-CHCH_3COO-$ of PLA), 1.30 ($-(CH_2)_3CH_3$), 0.88 ($-CH_2CH_3$).

2.3. Characterization of polymers

1H NMR and ^{19}F NMR spectroscopies were performed in 5 mm diameter tubes in $CDCl_3$ on a Bruker Avance-400 (400 MHz) spectrometer. The molar mass and dispersity of polymers were measured by size exclusion chromatography (SEC) on two different systems. The first one was equipped with two columns from Polymer Laboratories (PL-gel MIXED-D; 300 × 7.5 mm) and a

differential refractive index detector (Spectrasystem RI-150, Thermo Electron Corp.), using chloroform as the eluent at a flow rate of 1 mL/min, and toluene as a flow-rate marker. The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards from Polymer Laboratories. The second system was equipped with a guard column and two GMH HRm columns (Viscotek) with tetrahydrofuran (THF) as the eluent at 1 mL/min. A differential refractometer and a double SEC detector (model 270 Dual, Viscotek) with RALS and viscosimeter in series were used to analyze samples.

2.4. Interfacial tension measurements

The interfacial tension measurements were carried out using the pendant drop method, employing a Tracker tensiometer (Teclis, France). Drops of PFOB were formed using a syringe and a G22 stainless steel needle into a methylene chloride solution containing the polymers at 25 mg/mL placed in an optical glass cuvette. The interfacial tension was determined from the drop profile using the Laplace equation and the forces balance between capillarity and gravity. The measurements were performed on at least five independent drops.

2.5. Nanocapsules preparation

Nanocapsules (NCs) were prepared by an emulsion evaporation process as previously described (Diou et al., 2012; Houvenagel et al., 2017). 50 mg of polymer or of a mixture of polymers (see **Table 2** for details of compositions) were dissolved into 2 mL of methylene chloride along with 30 μ L of PFOB. The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5 % sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip (Digital Sonifier, Branson Ultrasonics, France) at 30% of maximal power, for 1 min over ice. Solvent was allowed to evaporate by magnetic stirring at 300 rpm at room temperature for 3 h. Suspensions of NCs were then filtered through 0.45 μ m PVDF filters. For non-PEGylated NCs, an incubation with PVA (1% w/v) for 5 days at 4°C is necessary, prior to the purification step, to replace sodium cholate by PVA and prevent further aggregation. All NCs were then washed by ultracentrifugation for 1h, at 4 °C and at 6860 g for non-PEGylated NCs, 27 440 g for PEGylated NCs (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The pellet was finally resuspended in ultrapure water to a final polymer concentration of 5 mg/mL.

2.6. Size distribution

The hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of NCs were measured by dynamic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Suspensions were diluted in water to a concentration of 1 mg/mL. Measurements were performed in triplicate at 20 °C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering.

2.7. *In vitro* ultrasound measurements

Ultrasound measurements were performed with the same set-up as in the 2nd and 3rd chapter. Suspensions of nanocapsules (1 mL, 5 mg/mL) were placed in a 10 mm x 10 mm x 45 mm polystyrene cuvette in which 5-mm diameter holes were cut out and covered by acoustically transparent mylar membrane. The cuvette was placed in a water bath at 37°C, and a small magnetic bar allowed agitating gently the suspension without disturbing the signal. Measurements were performed 4 minutes after the cuvette was placed in the water bath to allow temperature equilibration and removal of potentially formed bubbles. A Handyscope HS5 (TiePie engineering, Netherlands) was used as both an arbitrary wave generator and a USB oscilloscope connected to a computer using Matlab (Mathworks, USA). Samples were insonified by a transducer (focal length 51 mm, model I3-0506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France), which emitted 10 bursts of 500 cycles at 5 MHz. The scattered ultrasound signal was received by a second transducer (focal length 51 mm, model I3-1506-R-SU-F2.00IN, Olympus, France) placed at a 90° angle compared to the transducer-transmitter. This scattered signal was preamplified before being measured by the oscilloscope connected to Matlab for signal processing. The signal was then windowed, Fourier-transformed and the scattered intensity within the bandwidth of each harmonics was summed. The resulting ultrasound scattered intensities were subtracted from the intensity obtained with the cuvette filled with Milli-Q water. At least 9 measurements were performed with each sample. Commercial SonoVue® microbubbles (diluted to 1/1000) were used as a reference positive control for the ultrasound set-up and parameters chosen for our study.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀

C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ was synthesized by a combination of ROP and ATRP, as shown in Figure 2. The same scheme as for PEG-PLA-PFMA₁₀ synthesis (2nd chapter) was used, with replacement of HO-PEG-OCH₃ by HO-C₆H₁₃. This initiator was used to synthesize the non-fluorinated control PLA-C₆H₁₃ in the first chapter.

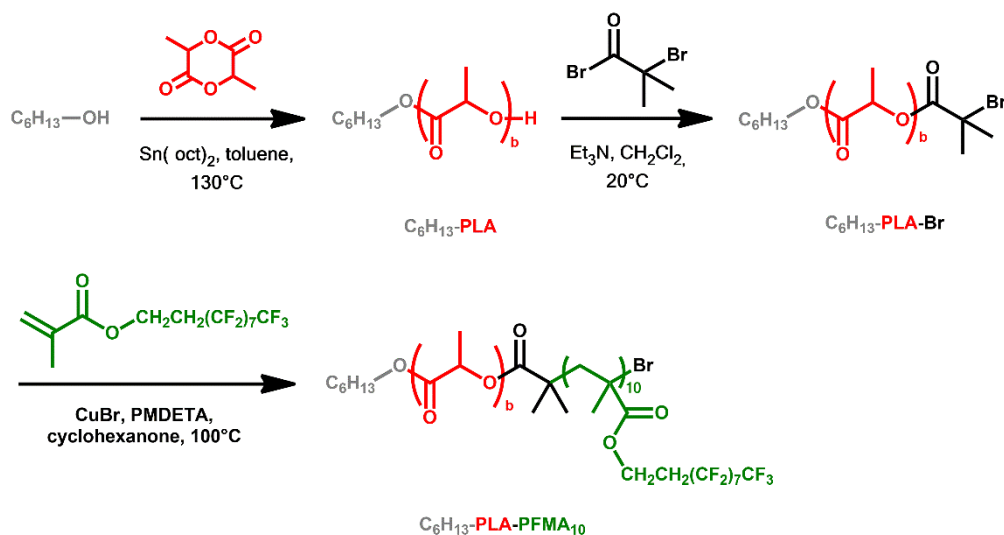


Figure 2: Synthesis scheme of C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀

The ROP of DL-lactide with 1-hexanol as initiator and stannous octoate as catalyst was performed as in the first chapter (Houvenagel et al., 2017), but with all quantities multiplied by 15. In this previous study, the real molar mass of the resulting C₆H₁₃-PLA was not determined since we could not visualize properly the peaks of the C₆H₁₃ extremity in the ¹H NMR spectrum. However, it was determined to be 20,400 g/mol using a 400 MHz spectrometer at Biopol (Curitiba, Brazil) during the thesis of Guilherme Picheth (Picheth, 2017). In the present study, molar mass was estimated to 13,700 g/mol using SEC with triple detection in THF and 15,500 g/mol using ¹H NMR on a 400 MHz spectrometer (Table 1). These lower values compared to the targeted *M_n* of 20,000 g/mol may be explained by the use of higher quantities of reagents, which probably results in a less homogeneous reactional medium and impacts the molar mass distribution of the synthesized polymer.

Table 1 : Characterization of polymers molar mass distribution by ¹H NMR, SEC in THF with triple detection and SEC in CHCl₃ with conventional calibration: Degree of polymerization (DP), number-average molar mass (*M_n*), dispersity (*D*) and intrinsic viscosity (IV). DP and *M_n*^{NMR} were determined from the areas of the peak at 4.13 (-OCH₂CH₂-) versus 5.19 ppm (CH of PLA) for PLA, and versus 2.47 ppm (CH₂CH₂CF₂ of PFMA) for PFMA

Polymer	<i>M_n</i> ^{theoretical} (x 10 ³ g/mol)	DP PLA:PFMA (NMR)	<i>M_n</i> ^{NMR} (x 10 ³ g/mol)	<i>M_n</i> ^{SEC THF} (x 10 ³ g/mol)	<i>D</i> ^{THF}	<i>M_n</i> ^{SEC CHCl₃} (x 10 ³ g/mol)	<i>D</i> ^{CHCl₃}	IV (dL/g)
C ₆ H ₁₃ -PLA	20.1	215:0	15.5	13.7	1.33	23.2	1.37	0.268
C ₆ H ₁₃ -PLA-Br	20.3	225:0	16.2	15.4	1.31	26.5	1.31	0.272
C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	25.6	225:7	19.9	20.5	1.31	31.7	1.29	0.226

C_6H_{13} -PLA-Br macroinitiator was then obtained by esterification of C_6H_{13} -PLA with excess of 2-bromo-2-methylpropionyl bromide in the presence of triethylamine. Quantitative conversion was confirmed by 1H NMR with disappearance of the end hydroxyl broad signal of PLA at 2.70 ppm and appearance of two signals at 1.94 and 1.98 ppm corresponding to the methyl protons from 2-bromo-2-methylpropionyl end group (Figure 3). Purification of the polymer by removal of unreacted 2-bromo-2-methylpropionyl bromide was tedious and required 4 precipitations into diethyl ether. These steps probably favored the slightly higher molar mass observed (15,400 – 16,200 g/mol) for the purified product compared to its precursor (Table 1). The final C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀ was prepared by ATRP of FMA in cyclohexanone with C_6H_{13} -PLA-Br as macroinitiator and CuBr/PMDETA complex as catalyst, using a monomer/initiator feed ratio of 10. Successful polymerization with satisfactory conversion (80%) was confirmed by 1H NMR with appearance of the signals at 2.47 and 4.28 ppm corresponding respectively to $CH_2CH_2CF_2$ and $CH_2CH_2CF_2$ protons of the PFMA block (Figure 3). A degree of polymerization (*DP*) of ~ 7 was calculated, close to the targeted value of 10 and equal to what was obtained for PEG-PLA-PFMA₁₀ in the 2nd chapter. Again, as for PEG-PLA-PFMA_x polymers, the ^{19}F NMR spectrum shows a broadening and overlapping of the resonances in the polymer spectrum as compared to the monomer, confirming the successful polymerization of FMA (Figure 4).

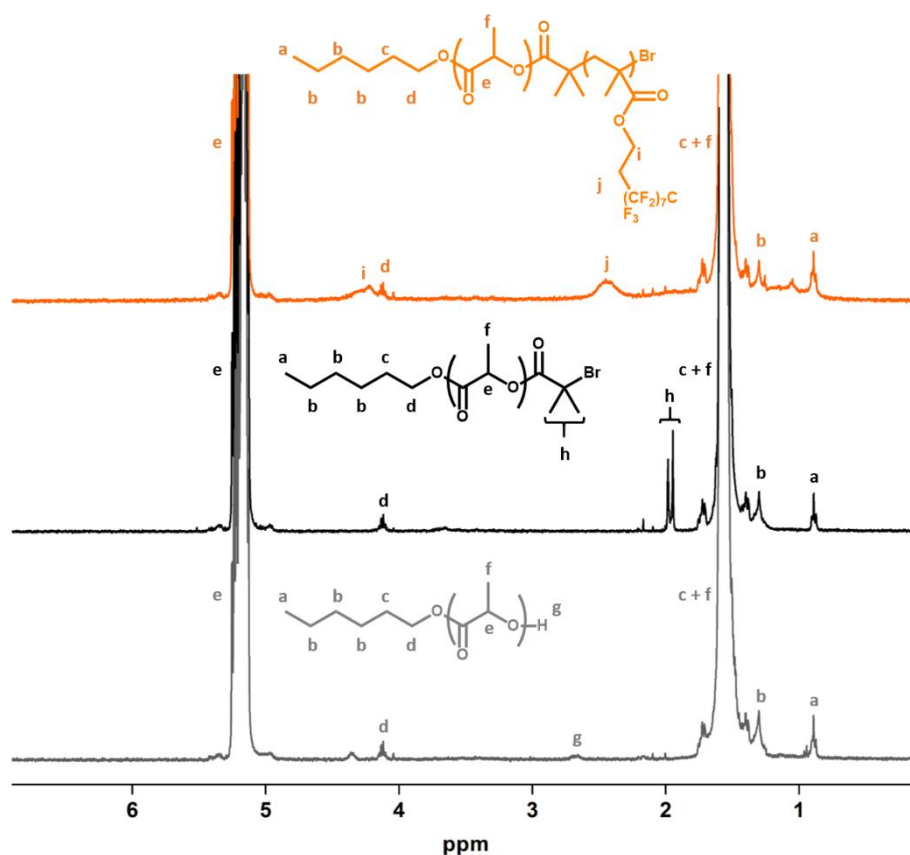


Figure 3: 1H NMR spectra of C_6H_{13} -PLA (grey), C_6H_{13} -PLA-Br (black) and C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀ (orange) in $CDCl_3$

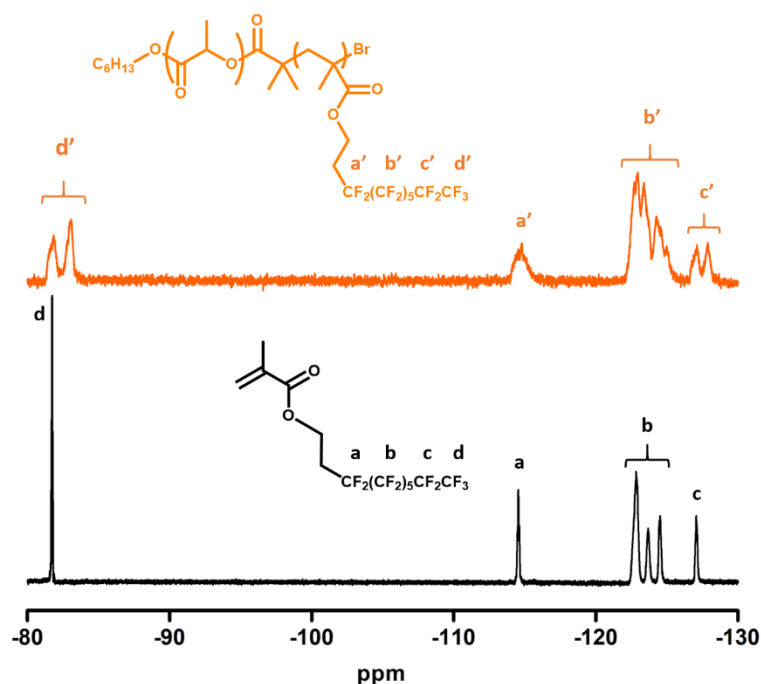


Figure 4: ^{19}F NMR spectra of the monomer FMA (black) and $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA-PFMA}_{10}$ (orange) in CDCl_3

SEC analysis of the polymers was achieved in THF and chloroform. The SEC chromatograms of $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA-PFMA}_{10}$ exhibit a single peak (with $D \sim 1.3$) which confirms the formation of a copolymer rather than a blend of homopolymers. Besides, the intrinsic viscosity (IV) of $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA-PFMA}_{10}$ in THF was found to be lower (0.226 dL/g) than for its precursors (~ 0.268 dL/g and 0.272 dL/g), whereas M_n is higher (Table 1). Such finding demonstrates that the fluorinated polymer expands much less in the solvent than its non-fluorinated precursors, probably because of fluorous interactions between fluorinated chains.

3.2. Interfacial properties of $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA-PFMA}_{10}$

In the first chapter, we had demonstrated that PLAs functionalized with short linear perfluorinated chains from C_3F_7 to $\text{C}_{13}\text{F}_{27}$ did not allow reducing the interfacial tension between PFOB and methylene chloride (Houvenagel et al., 2017). However, we showed in the second chapter that triblock copolymers PEG-PLA-PFMA $_x$ induced a decrease of interfacial tension from ~ 2 mN/m to ~ 1 mN/m regardless of the number of fluorinated chains in the PFMA block ($x = 5, 10$ or 20), proving their adsorption at the interface. Adsorption seemed to be favored predominantly by the comb-like structure of the PFMA block, rather than by the higher quantity of fluorine in the polymers. Nevertheless, we could not be sure if the triblock structure with the presence of a 5000 g/mol PEG block also played a role. Here, interfacial tension was measured at the interface between PFOB and a methylene chloride solution of $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA-PFMA}_{10}$. The value of 1 mN/m obtained indicates that the polymer also interacts with PFOB and adsorbs at the interface, whereas plain $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{-PLA}$ does not induce any reduction (1.9 mN/m) (Figure 5).

Stabilization of the interface is therefore favored by the comb-like architecture of the PFMA block without any influence of the presence of the PEG block.

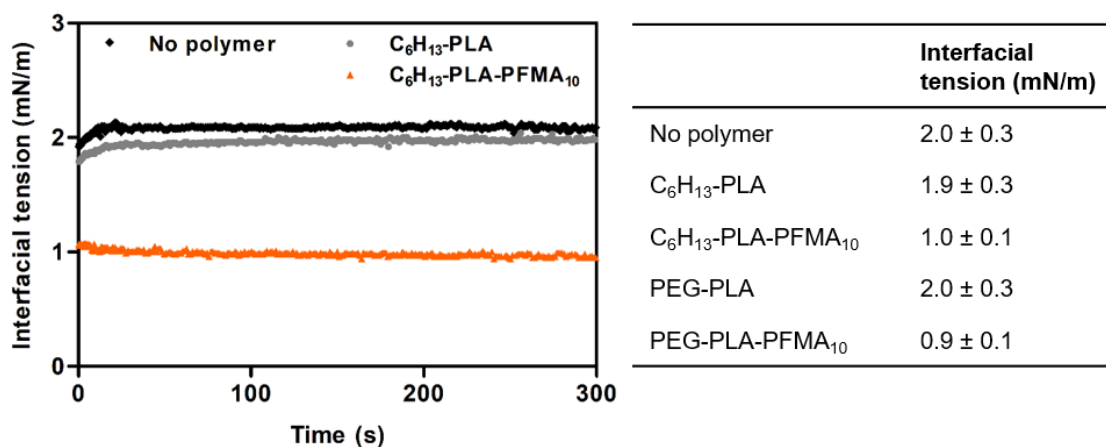


Figure 5: Interfacial tension measurements at the interface between PFOB and methylene chloride solutions of each polymer at 25 mg/mL with the pendant drop method: typical profiles as a function of time after the drop formation (left) and interfacial tensions values at 200s presented as mean \pm SD ($n > 5$) (right). For comparison, the table includes values for PEG-PLA and PEG-PLA-PFMA₁₀ from the 2nd chapter

3.3. PFOB nanocapsules

PFOB nanocapsules (NCs) were formulated by emulsion evaporation with various polymers including the C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀ control. While in the first two chapters the amount of polymer was decreased (50, 30 and 20 mg) in an attempt to reduce the capsules shell thickness, here the polymer mass was fixed. This allowed focusing on the influence of the proportion of PEG chains and of the fluorinated polymer architecture. A polymer mass of 50 mg was chosen since it generally yielded NCs with a higher PFOB content and a lower PDI. In addition to NCs formulated by pure polymers, various dual combinations of polymers were investigated: PLA- C_6H_{13} /PEG-PLA, PLA- C_8F_{17} /PEG-PLA and C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀/PEG-PLA-PFMA₁₀. This last combination allowed reducing the percentage of PEG while keeping 100% of fluorinated chains.

To investigate the effect of PEGylation on PFOB NCs echogenicity, we started with small proportions of PEGylated polymer. However, attempts to formulate NCs with 5, 10 or 25 wt% PEG-PLA (and either PLA- C_6H_{13} or PLA- C_8F_{17} as the other polymer) revealed unsuccessful and led to the formation of large aggregates along with spherical microparticles visible by optical microscopy. Such finding is surprising since nice nanocapsules could be formed with 0 and 50 wt% PEG-PLA. The same phenomenon occurred when trying to formulate NCs from 5, 10 or 25 wt% PEG-PLA-PFMA₁₀ along with C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀. Consequently, the present study focuses on mixtures with 0, 50 and 100 wt% PEGylated polymer.

Table 2 presents the size and polydispersity index (PDI) of all NCs. Mixtures of PEG-PLA with either PLA- C_8F_{17} or PLA- C_6H_{13} both possess low PDIs (< 0.20) and slightly larger diameters for

50 wt% mixtures (125-129 nm) compared to pure PEG-PLA (113 nm). Non-PEGylated NCs present larger sizes (149-155 nm), probably due to lower surface tension during emulsification. Regarding the C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀/PEG-PLA-PFMA₁₀ combination, the 50 wt% mixture also presents a larger size (143 nm) compared to pure PEG-PLA-PFMA₁₀ (116 nm), but also a larger distribution (PDI = 0.24 compared to 0.17). Finally, pure C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ NCs have the largest size (160 nm) and the largest PDI (0.25). More importantly, this last formulation was not stable: some aggregates could be observed after 7 days of storage at 4°C, whereas all other formulations were stable in terms of size distribution for at least 4 weeks. It is possible that some PFMA chains end up at the shell surface rather than towards the inner PFOB core due to potential steric hindrance, which could favor aggregation of the capsules after a certain time, in spite of addition of PVA. Further studies would be required to understand the reasons for this aggregation and to optimize formulation with this new polymer, for example by decreasing the polymer amount.

Table 2: Size distribution of NCs prepared from various mixtures of polymers (total mass 50 mg): Hydrodynamic diameter (d_H) presented as mean \pm SD ($n > 3$ except for formulations labeled with *: $n = 1$) and polydispersity index (PDI)

wt% non-PEGylated polymer	wt% PEGylated polymer	d_H (nm)	PDI ($\pm < 0.03$)
100% PLA-C ₈ F ₁₇	0% PEG-PLA	149 \pm 5	0.18
50% PLA-C ₈ F ₁₇	50% PEG-PLA	129 \pm 11	0.18
0% PLA-C ₈ F ₁₇	100% PEG-PLA	113 \pm 3	0.19
100% PLA-C ₆ H ₁₃	0% PEG-PLA	155 \pm 3	0.20
50% PLA-C ₆ H ₁₃	50% PEG-PLA	125 \pm 11	0.18
0% PLA-C ₆ H ₁₃	100% PEG-PLA	113 \pm 3	0.19
100% C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	0% PEG-PLA-PFMA ₁₀	160 \pm 2*	0.25*
50% C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	50% PEG-PLA-PFMA ₁₀	143 \pm 2*	0.24*
0% C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	100% PEG-PLA-PFMA ₁₀	116 \pm 5	0.17

3.4. *In vitro* ultrasound measurements

The capsules acoustic properties were evaluated by *in vitro* scattering measurements at 37 °C, at a frequency of 5 MHz and a final polymer concentration of 5 mg/mL. Ultrasound scattered intensities at fundamental frequency are presented in Figure 6 as a function of the percentage of PEGylated polymer used for formulation. One should note that measurements on pure C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ capsules were performed on freshly purified NCs as well as 3 days after preparation, before observing any aggregation.

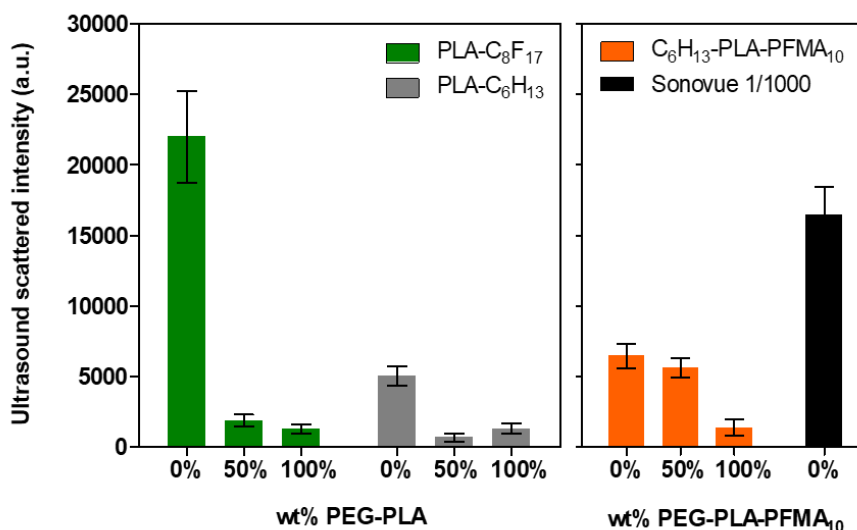


Figure 6: Ultrasound scattered intensity (arbitrary units) by NCs made from 50 mg of various mixtures with PEG-PLA (left) or PEG-PLA-PFMA₁₀ (right) and by Sonovue microbubbles. Results are presented as mean \pm SEM (n>9)

PLA-C₈F₁₇/PEG-PLA and PLA-C₆H₁₃/PEG-PLA mixtures

Interestingly, pure PLA-C₈F₁₇ capsules induced a much higher ultrasound response (22.0×10^3 a.u.) than all other NCs ($< 6.5 \times 10^3$ a.u.). Signal at fundamental frequency was even higher than with Sonovue microbubbles (16.5×10^3 a.u.). Moreover, it was particularly stable over time and still high after 1h (12.1×10^3 a.u.), whereas no signal could be detected with Sonovue after 1h. Addition of 50 wt% PEG-PLA dramatically reduced the ultrasound scattered intensity down to 1.8×10^3 a.u. The signal was finally just above background with 100% PEG-PLA (1.3×10^3 a.u.). The presence of PEG chains in the shell therefore considerably changes the capsules acoustic properties.

Ultrasound scattered intensity by pure PLA-C₆H₁₃ capsules (5.0×10^3 a.u.) was more than 4 times lower than pure PLA-C₈F₁₇ capsules, proving that the fluorinated chain strongly improves the capsule acoustic performance. This improvement may be correlated to an increase of PFOB encapsulation efficiency from 85% with PLA-C₆H₁₃ to 98% with PLA-C₈F₁₇ and a higher density owing to the fluorinated chain. Such finding was also observed with similar perfluorohexane (PFH) nanocapsules (PFH encapsulation efficiency increased from 4.0 to 9.5% between PLA-C₆H₁₃ and PLA-C₈F₁₇) (Picheth, 2017). Addition of 50 wt% PEG-PLA also strongly decreased the ultrasound scattered intensity of PLA-C₆H₁₃ capsules, confirming that PEGylation attenuates the ultrasound signal.

Triblock copolymers: C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ / PEG-PLA-PFMA₁₀ mixtures

Although pure C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ capsules led to a high ultrasound scattered intensity of 6.4×10^3 a.u., this value is much lower than with pure PLA-C₈F₁₇ capsules. Such result is surprising since we could expect the PFMA block, made of several C₈F₁₇ chains with a comb-like architecture, to induce a much higher density than a single C₈F₁₇ linear chain and favor a higher ultrasound response. Indeed, 5 mg of C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ contains a much higher quantity of C₈F₁₇ chains (1.76 μ mol) compared to 5 mg of PLA-C₈F₁₇ (0.32 μ mol). Nevertheless, we saw that these C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ capsules are not stable and tend to form aggregates after a few days, suggesting that they possess different surface properties, and maybe a different morphology, which could lower ultrasound scattering.

However, addition of 50 wt% PEG-PLA-PFMA₁₀ in these NCs does not reduce so much the ultrasound intensity, which remains around 5.6×10^3 a.u. This is very interesting because it appeared previously that addition of PEG chains probably attenuate ultrasound. Nevertheless, having 100% PFMA₁₀ block in the formulation seems to counterbalance the effect of 50% PEGylation, probably by an increase of density. The use of a mixture of C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ along with PEG-PLA-PFMA₁₀ is therefore judicious to find a proper balance between stealth and acoustic properties. The comb-like architecture of these polymers might also play a role, since we showed that it favors their adsorption at the PFOB/organic phase interface. A full characterization of these nanocapsules in terms of PFOB encapsulation efficiency and morphology should be performed to understand the contributions of each parameter.

Finally, 100% PEGylation still has a dramatic effect. As for pure PEG-PLA NCs, pure PEG-PLA-PFMA₁₀ NCs are poor ultrasound scatterers (intensity 1.3×10^3 a.u.). This means that at 50 mg polymer, addition of the PFMA₁₀ block in PEG-PLA does not improve the ultrasound properties of the capsules. In the 2nd chapter, we showed that pure PEG-PLA-PFMA₁₀ led to a higher ultrasound intensity but only at 20 mg polymer, and this was mainly attributed to the reduced shell thickness.

A lot of parameters (shell thickness, amount of PEG chains, amount of fluorinated chains, architecture of fluorinated chains, PFOB content, morphology) can therefore modify the capsules acoustic properties. Understanding clearly the contribution of each parameter is however extremely challenging. These parameters are summarized in Table 3. The amount of encapsulated PFOB and the presence of fluorinated chains appear particularly important, probably because they increase the capsule density.

Table 3: Summary of the parameters which could impact the ultrasound scattered intensity. For each parameter (each line), it goes from red to green when the parameter probably improves the acoustic response. Appear greener: higher hydrodynamic diameters, lower shell thicknesses, lower percentages of PEGylated polymer, higher percentages of fluorinated polymer related to higher quantity of C₈F₁₇ chains in 1 mL, higher PFOB encapsulation efficiency related to higher quantity of PFOB in 1 mL

	100% PLA-C ₆ H ₁₃	50% PLA-C ₆ H ₁₃ 50% PEG-PLA	100% PEG-PLA	100% PLA-C ₈ F ₁₇	50% PLA-C ₈ F ₁₇ 50% PEG-PLA	100% PEG-PLA	100% C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀	50% C ₆ H ₁₃ -PLA-PFMA ₁₀ 50% PEG-PLA-PFMA ₁₀	100% PEG-PLA-PFMA ₁₀
Ultrasound scattered intensity (x 10 ³ a.u.)	5.0	0.6	1.3	22.0	1.9	1.3	6.4	5.6	1.3
Mean hydrodynamic diameter (nm)	155	125	113	149	129	113	160	143	116
Mean thickness (nm)	ND	18.6	15.8	ND	17.4	15.8	ND	ND	15.5
wt% PEGylated polymer	0	50	100	0	50	100	0	50	100
wt% fluorinated polymer	0	0	0	100	50	0	100	100	100
PFOB encapsulation efficiency (%)	85%	86%	59%	98%	91%	59%	86%	53%	75%
Quantity of PFOB in 1 mL (μmol)	9.9	10.0	6.8	11.4	10.6	6.8	10.0	6.1	8.7
Quantity of C ₈ F ₁₇ chains in 1mL (μmol)	0.00	0.00	0.00	0.32	0.16	0.00	1.76	1.47	1.18
Main morphology									
	No fluorinated polymer			Linear fluorinated polymer			Comb-like fluorinated polymer		

4. Conclusion

In this study, we confirmed our hypothesis that PEGylation dramatically attenuates the ultrasound signal: addition of 50% PEG-PLA led to a signal just above background. Such phenomenon is however poorly understood and will be discussed in the General Discussion part.

Moreover, we confirmed that fluorination considerably improves the capsules acoustic response: pure PLA-C₈F₁₇ capsules yielded a much higher ultrasound signal than pure PLA-C₆H₁₃ capsules. The amount and architecture of fluorinated chains appear as important parameters. Indeed, nanocapsules of pure C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ with a comb-like architecture, in addition to the fact that they were not stable after one week, were also less efficient scatterers than PLA-C₈F₁₇ nanocapsules with a single linear chain.

Our initial goal was to increase PFOB nanocapsules echogenicity while keeping their stealth properties with PEG chains. Interestingly, NCs made from the mixture of C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ along with PEG-PLA-PFMA₁₀ could potentially present the best compromise between stealth and acoustic properties: compensating the 50% PEGylation by using 100% fluorination resulted in promising preliminary results. This topic deserves to be more deeply investigated and optimized. Indeed, experiments must be repeated because NCs with C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀ have been formulated only once. Finally, some other parameters such as the total polymer amount could also be varied to further improve the capsules performance as ultrasound contrast agent.

5. Acknowledgements

We thank Camille Dejean (BioCIS, Université Paris Saclay) for NMR experiments.

References

- Houvenagel, S., Picheth, G., Dejean, C., Brulet, A., Chenneviere, A., Couture, O., Huang, N., Moine, L., Tsapis, N., 2017. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. *Polym. Chem.* 8, 2559–2570.
- Jablonowski, L.J., Alfego, D., Andorko, J.I., Eisenbrey, J.R., Teraphongphom, N., Wheatley, M.A., 2016. Balancing stealth and echogenic properties in an ultrasound contrast agent with drug delivery potential. *Biomaterials* 103, 197–206.
- Jablonowski, L.J., Cochran, M.C., Eisenbrey, J.R., Teraphongphom, N.T., Wheatley, M.A., 2017. Shell Effects on Acoustic Performance of a Drug-delivery System Activated by Ultrasound. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* Accepted A.
- Li, H., Gu, W.Y., Li, L., Zhang, Y.M., Russell, T.P., Coughlin, E.B., 2013. Synthesis of Semicrystalline/Fluorinated Side-Chain Crystalline Block Copolymers and Their Bulk and Thin Film Nanoordering. *Macromolecules* 46, 3737–3745.
- Nijenhuis, A.J., Grijpma, D.W., Pennings, A.J., 1992. Lewis Acid-Catalyzed Polymerization of L-Lactide - Kinetics and Mechanism of the Bulk-Polymerization. *Macromolecules* 25, 6419–6424.
- Picheth, G., 2017. Synthesis and characterization of acoustic-sensitive perfluorinated microvesicles and nanocapsules for theranostic application. Universidade Federal Do Parana, Université Paris Saclay.
- Spasova, M., Mespouille, L., Coulembier, O., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I., Dubois, P., 2009. Amphiphilic poly(D- or L-lactide)-b-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) block copolymers: Controlled synthesis, characterization, and stereocomplex formation. *Biomacromolecules* 10, 1217–1223.
- Zhao, Y., Shuai, X., Chen, C., Xi, F., 2004. Synthesis of star block copolymers from dendrimer initiators by combining ring-opening polymerization and atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 37, 8854–8862.

Discussion générale

L'enjeu de cette thèse était de formuler des nanocapsules à la fois furtives et échogènes. Notre hypothèse initiale était que l'utilisation d'un polymère possédant une terminaison fluorée permettrait de favoriser l'ancrage du polymère autour de la goutte de PFOB, et que réduire la masse d'un tel polymère pour la formulation permettrait alors de former des nanocapsules à coques plus fines, donc plus compressibles, et plus échogènes. Nous avons élaboré deux stratégies reposant sur deux familles de polymères fluorés d'architectures différentes: les polymères diblocs linéaires PLA-C_xF_{2x+1} (x = 3, 6, 8, 11, 13) et les polymères triblocs en peigne PEG-PLA-PFMA_n (n = 5, 10, 20). Nous allons dans un premier temps comparer les propriétés de ces deux types de polymères et des nanocapsules formulées, et proposer des hypothèses pour expliquer les différences observées. Nous discuterons ensuite des paramètres qui influencent la réponse acoustique des nanocapsules, et qui démontrent que l'épaisseur des coques des capsules n'est pas le critère le plus important à prendre en compte.

1. La synthèse des polymères

Alors que la synthèse des PLA-C_xF_{2x+1} était simple et avait déjà été rapportée dans la littérature (Lee et al., 2001), la synthèse des polymères triblocs s'est révélée plus complexe.

Le choix du solvant pour l'ATRP

Afin de trouver les bonnes conditions pour l'ATRP du 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodécyl méthacrylate (FMA), des essais d'homopolymérisation (amorcée par du 2-bromoisobutyrate d'éthyle) avec un système CuBr/PMDETA/chloroforme avaient initialement été menés (Shunmugam et al., 2007). L'analyse RMN ¹H du solide formé, insoluble dans la plupart des solvants et finalement solubilisé dans du PFOB avec quelques gouttes de CDCl₃, confirmait que la polymérisation du FMA avait bien eu lieu. Cependant, en partant du macroamorceur PEG-PLA-Br, aucun signe de polymérisation du FMA n'était visible après 24h de réaction avec le système CuBr/PMDETA/chloroforme. La cyclohexanone, solvant souvent utilisé pour l'ATRP de méthacrylates fluorés (Dong et al., 2012; He et al., 2011; Jiang et al., 2013; Niu et al., 2014), s'est finalement révélée plus adaptée pour la polymérisation du FMA. Le solvant peut en effet avoir un impact important sur les constantes d'activation et de désactivation de l'ATRP, une polarité plus élevée ayant généralement pour effet d'augmenter la constante d'activation (Horn and Matyjaszewski, 2013). La polymérisation du FMA dans la cyclohexanone est donc possiblement favorisée par son caractère légèrement plus polaire que le chloroforme (polarités relatives de 0,281 et 0,259 respectivement) (Reichardt, 2003).

La synthèse du macroamorceur

La deuxième étape servant à former le macroamorceur PEG-PLA-Br à partir du PEG-PLA pourrait être optimisée afin d'augmenter le rendement (66%). En effet, nous nous sommes placés en très large excès de bromure de 2-bromo-2-méthylpropanoyle et de triéthylamine (35 équivalents par rapport au PEG-PLA) afin d'assurer l'estérification de toutes les chaînes (Spasova et al., 2009; Zhao et al., 2004). Cela nécessite de répéter les nombreuses étapes de purification, or l'étape de lavage permettant d'enlever les sels Et_3N^+ , Br^- engendre la perte d'une quantité non négligeable de produit puisque le PEG-PLA-Br se place à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Il pourrait donc être intéressant de diminuer le nombre d'équivalents de 2-bromo-2-méthylpropanoyle et de triéthylamine ou d'optimiser les étapes de purification.

2. La conformation des polymères en solvant organique

Alors que les $\text{PLA-C}_x\text{F}_{2x+1}$ et le PEG-PLA se solubilisent presque instantanément en solvant organique de type chloroforme, dichlorométhane ou acétone, les polymères triblocs ont tendance à mousser et sont plus longs à solubiliser (quelques minutes). Bien qu'ils semblent parfaitement solubles à ~ 5 mg/mL dans le chloroforme, comme l'atteste la bonne visibilité des signaux en RMN ^1H et ^{19}F , les solutions à 25 mg/mL dans le chloroforme ou le dichlorométhane apparaissent en revanche plus troubles. L'augmentation de l'intensité diffusée en DLS témoigne en effet de la présence d'agrégats ou de micelles (chapitre 2). Ces observations confirment que les chaînes perfluorées du polymère tribloc, de par leur caractère à la fois hydrophobe et lipophile, ont tendance à s'associer et à former des domaines fluorés. Ces agrégats n'étant pas visibles en DLS avec les $\text{PLA-C}_x\text{F}_{2x+1}$, il semble que les deux familles de polymères ont des comportements associatifs différents. Ces différences se retrouvent en quelque sorte dans leur comportement à l'interface entre le PFOB et le dichlorométhane. En effet, nous avons vu dans le chapitre 2 que les polymères triblocs s'adsorbent à l'interface avec le PFOB (tension interfaciale diminuée de 1 mN/m), alors que les $\text{PLA-C}_x\text{F}_{2x+1}$ ne diminuent pas la tension interfaciale (Houvenagel et al., 2017). Comme ces polymères diffèrent de par plusieurs paramètres, plusieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer ces différences de comportement :

- (1) La différence de quantité de fluor : on voit dans le Tableau 1 que les polymères triblocs possèdent beaucoup plus d'atomes de fluor par chaîne que les $\text{PLA-C}_x\text{F}_{2x+1}$. Cependant, pour les mesures de tension interfaciale et de DLS nous nous sommes placés à 25 mg/mL de polymère. Les différences de quantité de fluor ramenées à 25 mg de polymère sont moindres compte tenu des masses molaires réelles des polymères (colonne de droite du Tableau 1), notamment si l'on compare le $\text{PLA-C}_{13}\text{F}_{27}$ (45 μmol de fluor) au PEG-PLA-PFMA₅

(64 μmol de fluor). Les différences sont en fait beaucoup plus marquées entre les trois polymères triblocs (on passe de 64 μmol de fluor pour $n = 5$ à 194 μmol pour $n = 20$) alors que les tensions interfaciales restent identiques (0,9-1 mN/m). Or il est possible de mesurer des valeurs très basses (0,01 mN/m) avec le Tracker utilisé. L'adsorption des polymères triblocs ne semble donc pas particulièrement favorisée par la plus forte quantité de fluor.

Tableau 1: Comparaison des tensions interfaciales mesurées à l'interface PFOB/dichlorométhane avec 25 mg/mL de chaque polymère, et des quantités de fluor présentes dans chaque polymère. La tension interfaciale entre le PFOB et le dichlorométhane seul est de 2.0 ± 0.3 mN/m.

	Tension interfaciale (mN/m)	Nombre d'atomes de fluor par chaîne de polymère	M_n^{RMN} (g/mol)	Quantité de fluor dans 25 mg de polymère (μmol)
PLA-C ₆ H ₁₃	1.9 ± 0.3			
PLA-C ₃ F ₇	1.7 ± 0.3	7	17500	10
PLA-C ₆ F ₁₃	1.7 ± 0.3	13	17000	19
PLA-C ₈ F ₁₇	2.2 ± 0.3	17	15500	27
PLA-C ₁₁ F ₂₃	1.8 ± 0.3	23	16500	35
PLA-C ₁₃ F ₂₇	2.2 ± 0.3	27	15000	45
PEG-PLA	2.0 ± 0.3			
PEG-PLA-PFMA ₅	0.9 ± 0.1	68	26700	64
PEG-PLA-PFMA ₁₀	0.9 ± 0.1	119	29700	100
PEG-PLA-PFMA ₂₀	1.0 ± 0.1	225	32900	194
C ₆ H ₁₃ -PLA-	1.0 ± 0.1	119	19900	149

(2) La présence du bloc de PEG : à l'image des tensioactifs fluorés (possédant une tête hydrophile polaire et une partie fluorée) qui abaissent fortement la tension interfaciale entre l'eau et les perfluorocarbures (Astafyeva et al., 2015), nous aurions pu imaginer que dans le cas des polymères triblocs, les chaînes hydrophiles de PEG s'associent et favorisent ainsi l'exclusion des chaînons fluorés. Cependant, dans le dichlorométhane, le PEG et le PLA sont tous deux bien solvatés (paramètres de solubilité d'Hansen δ_T de 22,9 pour le dichlorométhane (Sato et al., 2013), 22,0 pour le PLA et 24,0 pour le PEG (Adamska et al., 2016)), donc probablement sous forme de pelote statistique gonflée par le solvant. Par ailleurs, nous avons montré dans le chapitre 4 que le polymère contrôle C₆H₁₃-PLA-PFMA₁₀, ayant des chaînons fluorés pendants mais pas de bloc PEG, diminue aussi la tension interfaciale de 1 mN/m (Tableau 1). Ceci confirme que la présence du bloc de PEG ne favorise pas l'adsorption des polymères triblocs à l'interface avec le PFOB.

(3) La différence d'architecture de la partie fluorée : l'hypothèse la plus probable repose sur la différence entre la structure linéaire et la structure en peigne des parties fluorées. Les chaînons linéaires C₃F₇ à C₁₃F₂₇ sont probablement cachés au sein de la pelote de PLA, alors que la structure en peigne des polymères triblocs rend la partie fluorée plus volumineuse et plus rigide (Figure 1). Du fait de cette liberté conformationnelle réduite, le bloc fluoré serait

moins facilement caché dans la pelote et donc plus facilement exposé pour s'adsorber à l'interface avec le PFOB.

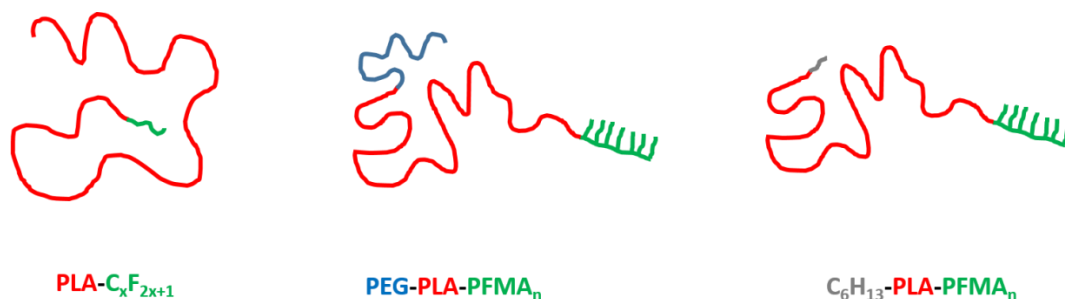


Figure 1: Représentation simplifiée de la conformation d'une chaîne polymère pour chaque famille de polymères, ainsi que le contrôle C_6H_{13} -PLA-PFMA₁₀

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser ces polymères par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) dans le dichlorométhane deutéré. Il pourrait également être intéressant de mesurer les temps de relaxation des atomes de fluor des polymères triblocs, en présence ou non du PFOB, afin d'étudier leur mobilité. Ceci a été fait lors de la thèse de Guilherme Picheth avec les PLA- C_xF_{2x+1} en présence ou non de PFH (Picheth, 2017), mais ces expériences sont difficiles à réaliser avec des chaînes de polymères longues par rapport aux extrémités fluorées.

3. La capacité des polymères à encapsuler le PFOB

Nous avons montré dans les deux premiers chapitres que les deux types de polymère permettent d'encapsuler plus efficacement le PFOB dans les nanocapsules. Le graphe en Figure 2 rassemble les résultats obtenus pour les nanocapsules formulées avec notre première stratégie (50% PLA- C_xF_{2x+1} 50% PLA-PEG), avec notre deuxième stratégie (100% PEG-PLA-PFMA_n), ainsi qu'avec des contrôles à base de 100% PLA- C_xF_{2x+1} . On voit que la présence du PEG réduit l'efficacité d'encapsulation du PFOB, notamment aux plus faibles masses de polymère. Il est cependant possible que les nanocapsules PEGylées résistent moins bien à la lyophilisation que les nanocapsules non-PEGylées, du fait de la tendance des chaînes de PEG à cristalliser lors de la congélation (De Jaeghere et al., 1999).

Avec les polymères triblocs PEG-PLA-PFMA_n, l'augmentation de l'efficacité d'encapsulation du PFOB par rapport au PEG-PLA non fluoré est cohérente avec la diminution de la tension interfaciale. Les interactions favorables entre les chaînes fluorées des polymères et le PFOB permettent de piéger plus de PFOB au sein de la capsule. L'efficacité d'encapsulation du PFOB est tout de même légèrement plus faible avec le polymère possédant le plus de chaînons fluorés pendants (PEG-PLA-PFMA₂₀) qu'avec les deux autres, quelle que soit la masse de polymère utilisée. Ceci pourrait provenir d'une certaine gêne stérique entre les chaînes fluorées (Oda et al.,

2015) dont nous discuterons également dans le paragraphe suivant, qui les empêcherait d'être toutes orientées vers le PFOB pour le piéger efficacement dans la capsule.

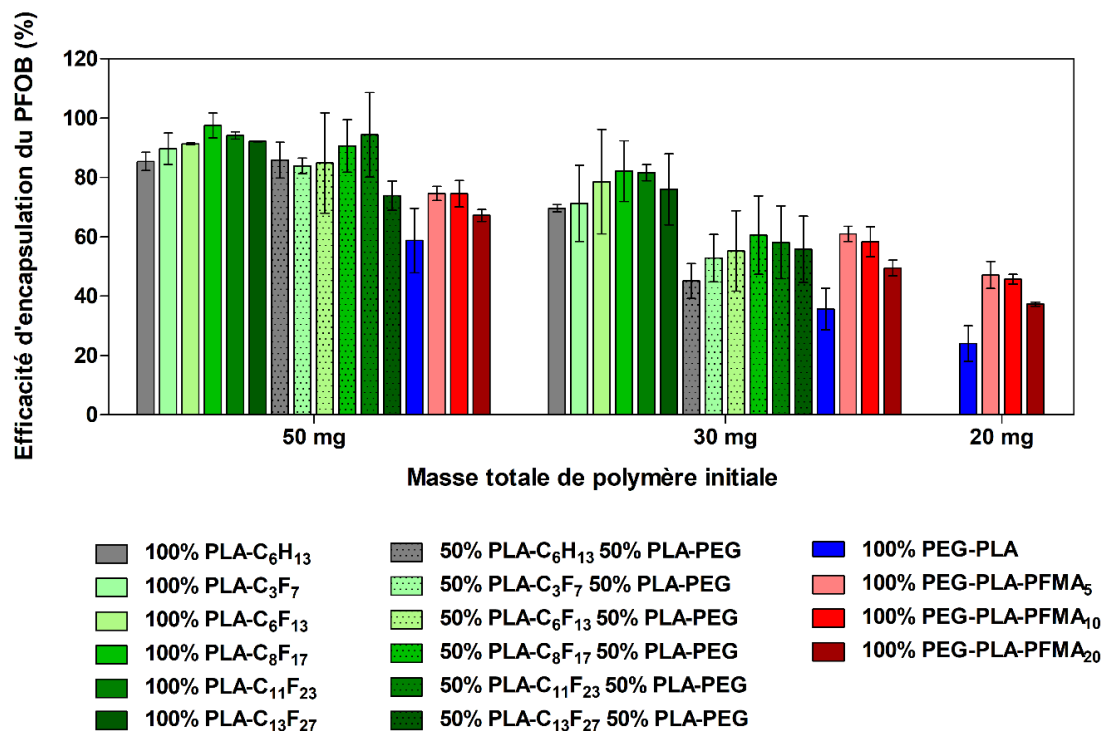


Figure 2: Comparaison de l'efficacité d'encapsulation du PFOB après lyophilisation des différentes formulations

Avec les PLA-C_xF_{2x+1}, que ce soit à 100% ou en mélange avec 50% de PLA-PEG, à 50 mg ou à 30 mg, la tendance est la même : l'efficacité d'encapsulation augmente avec la longueur de chaîne fluorée jusqu'à C₈F₁₇, ou jusqu'à C₁₁F₂₃ à 50 mg de mélange avec le PLA-PEG (Figure 2). Bien que la capacité de ces polymères à stabiliser l'interface PFOB/solvant n'ait pu être démontrée, la présence du chaînon fluoré linéaire a clairement une influence sur leur capacité à encapsuler efficacement le PFOB dans les capsules. De façon similaire, ces polymères ne réduisent pas la tension interfaciale à l'interface PFH/solvant et permettent pourtant de doubler l'efficacité d'encapsulation du PFH dans des nanocapsules 100% PLA-C_xF_{2x+1} (Picheth, 2017). Le processus d'évaporation de solvant est un processus dynamique pendant lequel des instabilités interfaciales transitoires peuvent survenir, notamment pendant l'étape finale de désolvation du polymère (Foster et al., 2010; Pisani et al., 2008a). Il est possible qu'au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, les solubilités de la chaîne de PLA et du chaînon fluoré diminuent à des vitesses différentes et que le chaînon fluoré finisse par s'orienter vers le PFOB. Ceci pourrait être plus ou moins favorisé selon la longueur de la chaîne, la longueur C₈F₁₇ semblant optimale. Nous avons effectivement vu dans le chapitre Travaux Antérieurs que des petits changements dans la structure ou longueur des chaînes fluorées peuvent en effet avoir des conséquences importantes sur le comportement des polymères en solution (Xu et al., 1997). Là encore, l'hypothèse de

l'encombrement stérique entre les chaînes fluorées pourrait expliquer la faible efficacité d'encapsulation obtenue avec la chaîne fluorée la plus longue C₁₃F₂₇. Oda et al. ont évoqué cet argument de gêne stérique dans une étude où des lipides sont modifiés par substitution d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène par des atomes de fluor pour accroître le taux d'encapsulation d'octafluoropropane dans des nanobulles (Oda et al., 2015). La substitution par deux fluors sur la même chaîne aliphatique permet de maximiser la quantité d'octafluoropropane encapsulé, alors que la modification par trois fluors mène à un faible taux d'encapsulation, comme si les lipides n'avaient pas tous la place de s'accommoder à l'interface avec l'octafluoropropane (Figure 3). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'architecture des chaînes est très importante puisque la substitution d'un atome de fluor sur chaque chaîne aliphatique du lipide n'entraîne aucune amélioration (Figure 3). Nos travaux sont toutefois très différents puisque les nanocapsules ne sont pas stabilisées par une fine couche organisée de lipides, mais par une coque solide formée de chaînes de polymère enchevêtrées qui se sont figées à la fin de l'évaporation du solvant. Il serait intéressant de faire des études de modélisations moléculaires afin de prédire les conformations en solvant des chaînes perfluorées des polymères. Les chaînes perfluorées sont très volumineuses (volume moyen des groupes CF₂ et CF₃ de l'ordre de 38 et 92 Å³ comparé à 27 et 54 Å³ pour les groupes CH₂ et CH₃ respectivement) (Krafft, 2001) et plusieurs études rapportent qu'elles adoptent une structure en hélice (Monde et al., 2006; Sato et al., 2016). Il est possible que ces structures en hélice soient différentes selon la longueur de chaîne et favorisent ainsi la ségrégation des chaînes de même longueur, comme par exemple les chaînes C₈F₁₇ entre elles et avec le PFOB (C₈F₁₇Br), et l'exclusion de chaînes plus longues telles que C₁₃F₂₇. Les modélisations moléculaires permettraient peut-être également de savoir ce qu'il advient de la conformation des chaînes perfluorées lorsqu'elles sont branchées et reliées par le squelette méthacrylate dans les PEG-PLA-PFMA_n.

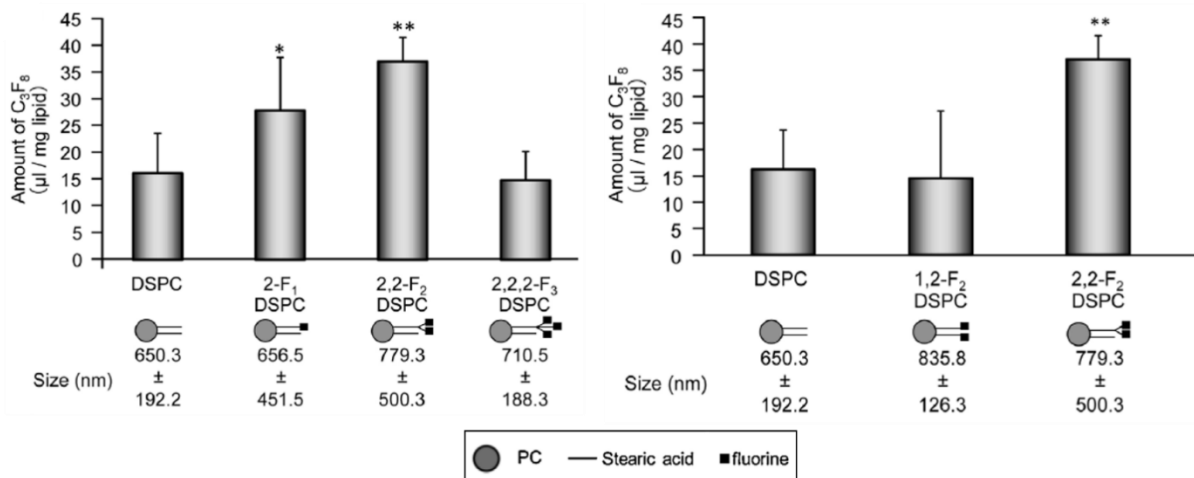


Figure 3: Taille et quantité d'octafluoropropane encapsulé dans des nanobulles stabilisées par des lipides modifiés avec 1, 2 ou 3 atomes de fluor selon les schémas. PC = phosphocholine (Oda et al., 2015)

4. Les morphologies obtenues

Alors que notre première stratégie (50% PLA- C_xF_{2x+1} / 50% PLA-PEG) a donné lieu à la formation de nanocapsules sphériques avec un cœur de PFOB centré comme pour les nanocapsules de 100% PLA-PEG, la deuxième stratégie a mené à la formation de nanocapsules à morphologies très variées (Figure 4).

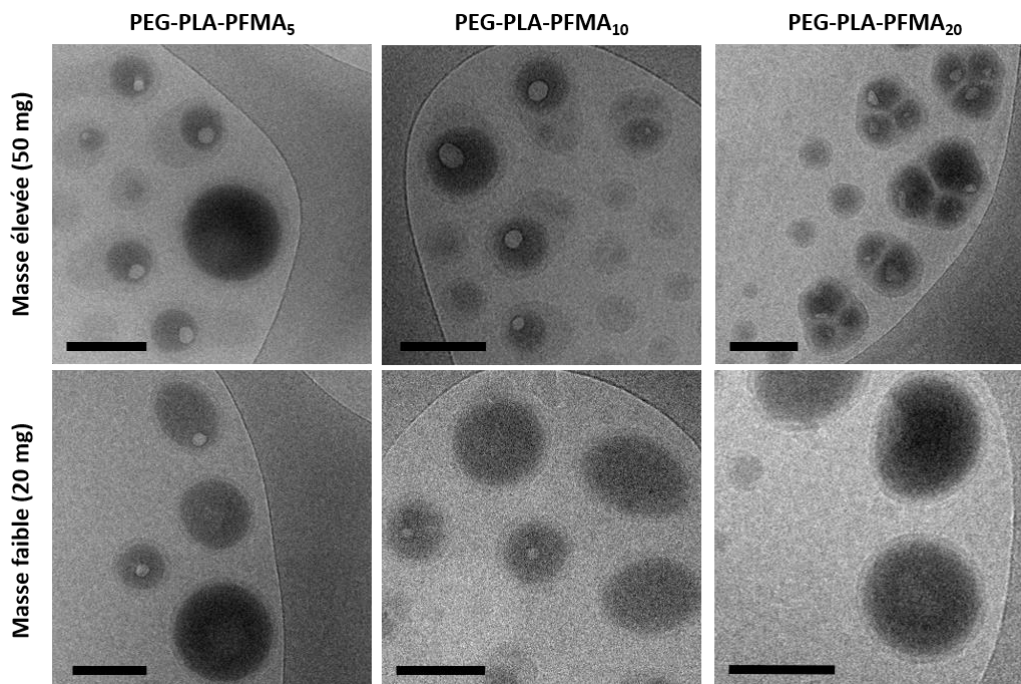


Figure 4: Images cryoTEM des nanocapsules formulées avec 50 mg (haut) ou 20 mg (bas) de polymère triblocs (chapitre 2)

Il est important de noter que les morphologies obtenues avec les polymères triblocs sont hétérogènes au sein d'un même échantillon, puisque les images de cryo-TEM montrent une coexistence de capsules sphériques ayant un cœur de PFOB centré avec des capsules à morphologies différentes (Figure 4). Certaines tendances ressortent tout de même. De manière générale, comparé au PEG-PLA non fluoré, les polymères triblocs entraînent la formation de nanocapsules à formes plus oblongues ou allongées. A masse élevée de PEG-PLA-PFMA₅, la morphologie dominante consiste en des capsules un peu allongées avec un cœur de PFOB sphérique non centré. Ce type de morphologie avait déjà été observé avec des nanocapsules de PLA-PEG-COOH (Figure 5). L'allongement était probablement favorisé par la nécessité pour toutes les chaînes hydrophiles de PEG-COOH d'être exposées vers la solution aqueuse alors qu'elles subissent des répulsions électrostatiques entre les fonctions COO⁻ déprotonées. Les chaînes sont donc probablement plus éloignées les unes des autres, ce qui entraîne une augmentation de l'aire totale et un allongement des capsules (Diou et al., 2014).

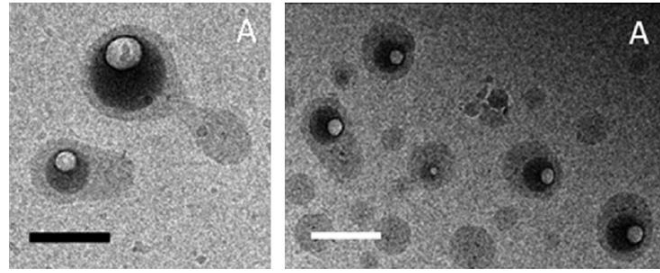


Figure 5: Images cryo-TEM de nanocapsules de PFOB/PLA-PEG-COOH (Diou et al., 2014)

Dans notre cas, le PEG utilisé possède une terminaison méthoxy et les nanocapsules de PLA-PEG non fluoré sont sphériques, donc l'allongement provient forcément de la présence du bloc fluoré. De plus, l'allongement ne peut provenir de la présence du PFOB puisque les nanoparticules formulées selon le même processus mais sans PFOB possèdent aussi des formes allongées et hétérogènes (Figure 6).

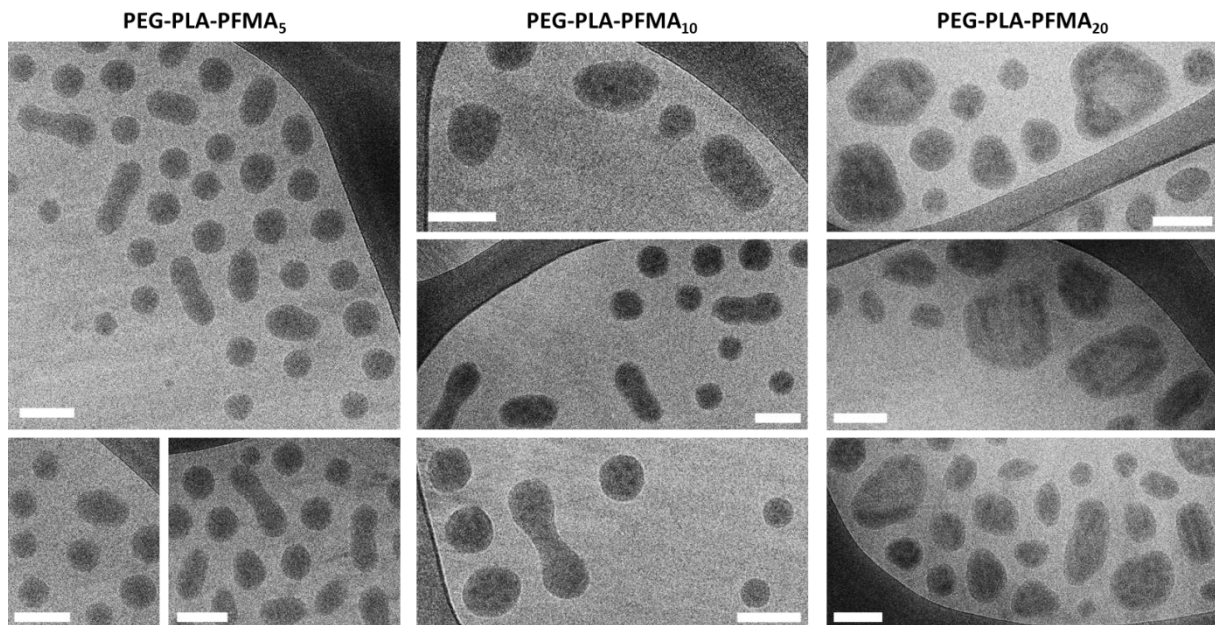


Figure 6: Images cryo-TEM de nanoparticules formulées sans PFOB avec 50 mg de polymère (barres d'échelle = 100 nm)

C'est donc l'ajout d'un troisième bloc fluoré incompatible et volumineux qui doit forcer les chaînes à adopter une certaine conformation qui mène à une augmentation de la surface totale et donc à un allongement. Zhou et al. ont observé un changement de morphologie similaire (de sphérique à ellipsoïdal) avec des micelles formées par des polymères triblocs à 1% dans l'eau (Zhou et al., 2003). Alors qu'un poly(éthylène glycol)-*b*-polystyrène-*b*-1,2-polybutadiène (appelé OSB) forme des micelles cœur-couronne sphériques dans lesquelles les blocs hydrophobes S et B sont mélangés de façon homogène au cœur de la micelle, la modification du bloc B par des chaînes C₆F₁₃ (OSF) entraîne la formation de micelles de forme plus ellipsoïdale avec un cœur fluoré, une coque de PS et une couronne de PEG. Ces structures ont été confirmées par des analyses en TEM, SAXS et SANS (Figure 7). Les auteurs attribuent cet allongement à la forte

incompatibilité entre le bloc S et le bloc F. En effet, l'analyse SAXS d'un polymère dibloc SF fondu avait précédemment montré qu'il adoptait une structure lamellaire et que le degré de ségrégation entre ces deux blocs était de 50, valeur bien supérieure au seuil théorique de 12 au-dessus duquel une séparation en microphases a lieu (Ren et al., 2002).

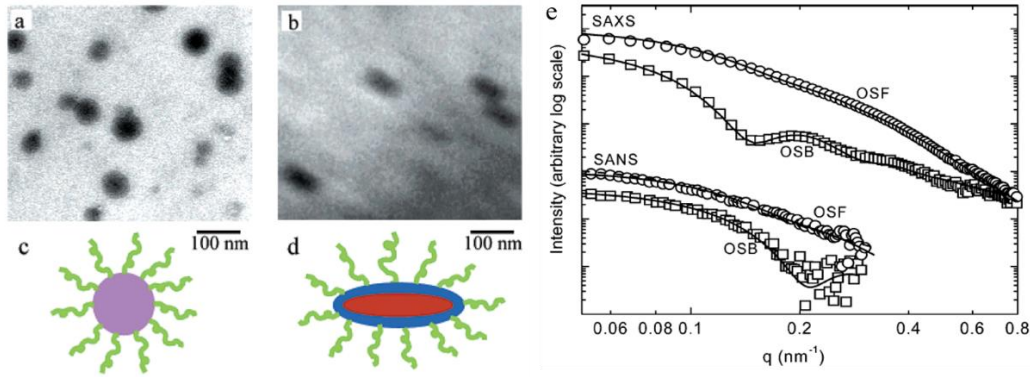


Figure 7: Images TEM des micelles formées à 1% dans l'eau avec le polymère OSB non fluoré (a) et le polymère OSF fluoré (b), illustrations schématiques de ces micelles d'OSB (c) et d'OSF (d), courbes d'intensité SAXS et SANS de ces deux types de micelles, ajustées avec des modèles de sphère (SANS OSB), d'ellipsoïdes (SANS et SAXS OSF) et de Pederson (SAXS OSB) (Zhou et al., 2003)

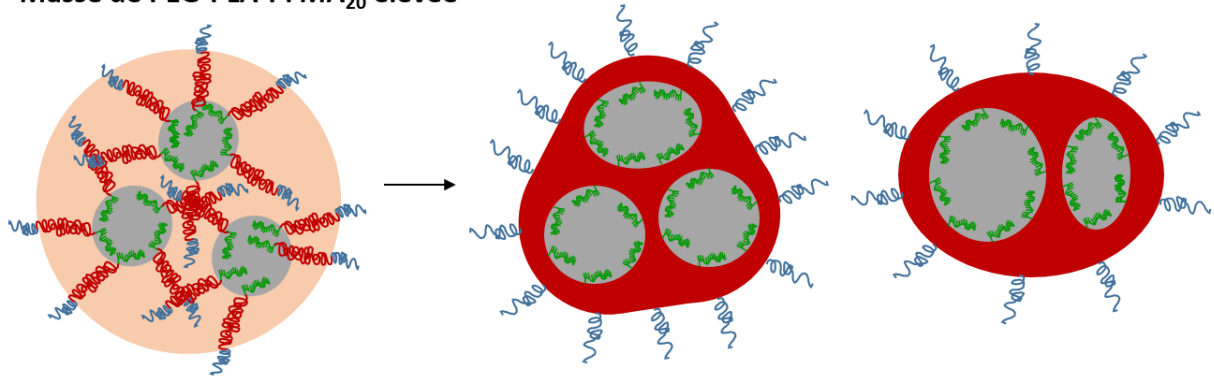
En observant les résultats de SANS (Figure 7e), on note que les courbes ont des allures très différentes entre le polymère fluoré et le polymère non fluoré, et qu'elles ont été ajustées avec des modèles différents (une sphère pour le polymère non fluoré et une ellipsoïde pour le polymère fluoré) (Zhou et al., 2003). Dans nos travaux, l'allure des courbes de SANS des capsules de PEG-PLA-PFMA_n ne différaient pas aussi clairement de celles des capsules de PEG-PLA (chapitre 2). En outre, les essais d'ajustements avec un modèle de vésicule ellipsoïdale donnaient de moins bons résultats qu'avec le modèle de vésicule choisi. Ceci démontre que nos échantillons de capsules de PEG-PLA-PFMA_n sont hétérogènes et que les capsules un peu allongées ou ellipsoïdales coexistent avec une quantité non négligeable de capsules sphériques, comme observé sur les images de TEM et de cryo-TEM (Figure 4). Cette polydispersité peut s'expliquer par le fait que le processus d'évaporation de solvant est un processus dynamique à la fin duquel les chaînes de polymère sont figées sans avoir atteint un état d'équilibre, parfois juste au moment où des instabilités interfaciales interviennent.

Les images cryo-TEM des nanoparticules formulées sans PFOB mettent en évidence la présence de zones plus sombres à l'intérieur des particules, correspondant à des domaines formés par la ségrégation des chaînes perfluorées (Figure 6), comme observé dans les nombreuses études de Marc Hillmyer et Timothy Lodge (Berlepsch et al., 2009; Kubowicz et al., 2005; Marsat et al., 2011; Skrabania et al., 2010, 2009). Ces domaines sont plus facilement visibles avec le polymère le plus riche en chaînons fluorés (PEG-PLA-PFMA₂₀) qu'avec le PEG-PLA-PFMA₁₀, et à peine visibles avec le PEG-PLA-PFMA₅ (Figure 6). De façon similaire, ce type de domaine était visible dans les nanocapsules à masse élevée de PEG-PLA-PFMA₁₀ en plus du cœur de PFOB non centré,

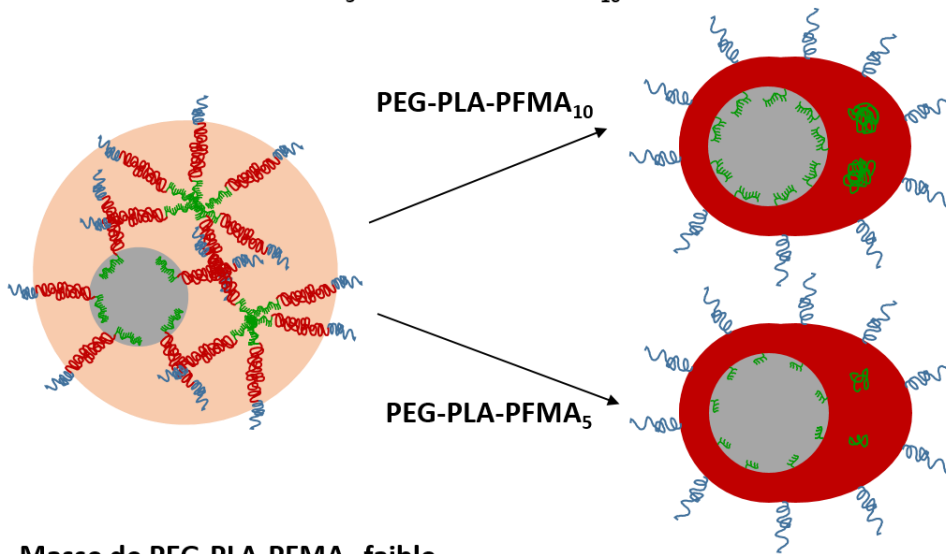
mais à peine distinguable dans les nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₅ (Figure 4). A masse élevée de PEG-PLA-PFMA₂₀, ces domaines très riches en chaînes perfluorées sont capables de piéger du PFOB et de donner lieu à la formation de capsules à plusieurs cœurs de PFOB. On peut les distinguer par leur couleur noire extrêmement foncée et par la présence du ménisque blanc dû à la perte de volume du PFOB lors de la congélation (Figure 4).

A faible masse de polymère tribloc, quel que soit le nombre de chaînons fluorés présents dans le polymère, la majorité des capsules ne possèdent pas ces domaines additionnels riches en chaînes fluorées en plus du cœur de PFOB, ou bien plusieurs cœurs de PFOB dans la même capsule. Elles possèdent essentiellement un cœur unique de PFOB et une épaisseur homogène et fine autour de ce cœur. Certaines ne sont pas complètement sphériques, mais leur morphologie est à distinguer des capsules allongées obtenues à forte masse de PEG-PLA-PFMA₅ et PEG-PLA-PFMA₁₀ : ces dernières possèdent un cœur de PFOB sphérique non centré alors que les capsules à faible masse de polymère légèrement ellipsoïdales possèdent un cœur de PFOB non sphérique qui suit la forme de la coque (Figure 4). Cette observation nous laissait penser initialement que ces capsules étaient facilement déformables. La diminution de l'épaisseur moyenne d'après les études de SANS allait également dans ce sens (chapitre 2). Cependant, les résultats d'AFM nous ont montré que ces capsules sont au contraire très rigides (chapitre 3). L'allongement de ces capsules à faible masse de polymère semble donc aussi provenir de l'incompatibilité entre le bloc PLA et le bloc PFMA rigide, qui doit pousser les chaînes à adopter une conformation menant à une augmentation de la surface totale. Comme la phase organique est moins concentrée en polymère, les chaînes perfluorées du polymère sont probablement moins ségréguées entre elles et auront sûrement plus tendance à se répartir uniquement autour de la goutte de PFOB plutôt que de former des domaines fluorés additionnels d'un côté de la capsule et stabiliser le cœur de PFOB de l'autre côté de la capsule. Ces mécanismes hypothétiques menant à la formation de toutes ces morphologies sont illustrés en Figure 8.

Masse de PEG-PLA-PFMA₂₀ élevée



Masse de PEG-PLA-PFMA₅ ou PEG-PLA-PFMA₁₀ élevée



Masse de PEG-PLA-PFMA_n faible

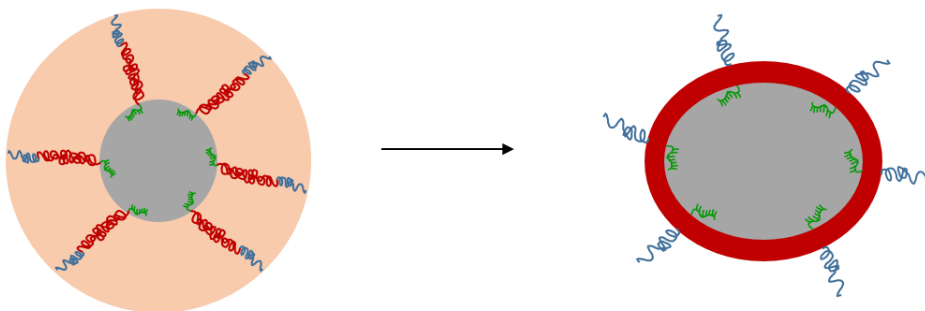


Figure 8: Représentation schématique simplifiée des différents mécanismes menant à la formation des morphologies variées (en plus de capsules sphériques à cœur de PFOB centré non représentées ici)

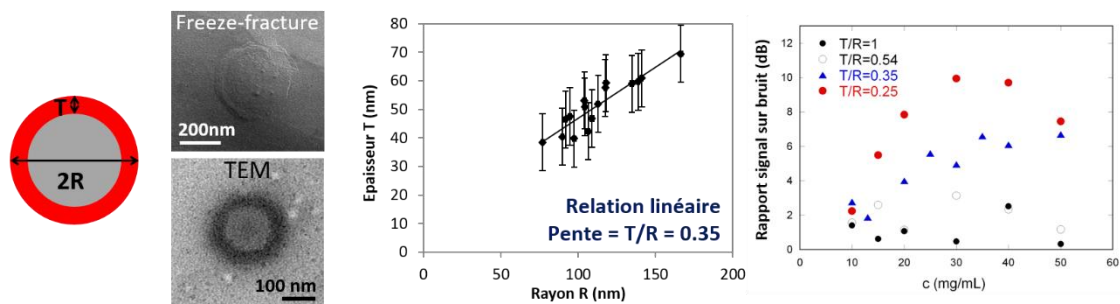
5. Les paramètres influençant la réponse ultrasonore des capsules

5.1. Notre hypothèse initiale : diminuer le rapport épaisseur sur rayon

Comparaison PLGA / PLGA-PEG

Lors de la thèse d'Emilia Pisani, il avait été montré que les microcapsules et nanocapsules de PLGA/PFOB possédaient une relation linéaire entre leur rayon R et l'épaisseur T (thickness) de leur coque. Ainsi au sein d'un échantillon de capsules ayant une certaine polydispersité en taille, les capsules plus grandes ont des coques plus épaisses. Un échantillon peut alors être caractérisé par un unique rapport T/R , qui correspond à la pente de la courbe $T=f(R)$ obtenue par des mesures sur des images de microscopie électronique (Figure 9A). Par ailleurs, ce rapport T/R est aisément modulable en faisant varier les proportions de PLGA et de PFOB dans la formulation. A quantité de PFOB constante, diminuer la quantité de polymère permet de diminuer le ratio T/R (Pisani et al., 2006), ce qui permet d'augmenter la compressibilité et l'échogénicité des capsules (Pisani et al., 2008b). En revanche, ces corrélations n'étaient plus valables lorsque le PLGA a été remplacé par le PLGA-PEG lors de la thèse d'Odile Diou. Le rapport T/R reste constant autour de 0,44-0,48 quelle que soit la quantité de PLGA-PEG utilisée (Diou et al., 2016) et les capsules ne donnent aucun signal ultrasonore. L'hypothèse initiale de ces travaux de thèse était que cette faible échogénicité provenait essentiellement du rapport T/R élevé. Notre objectif était donc de réduire ce rapport T/R pour augmenter la compressibilité et l'échogénicité des capsules, tout en gardant le PEG pour la furtivité.

A: PLGA nanocapsules



B: PLGA-PEG nanocapsules

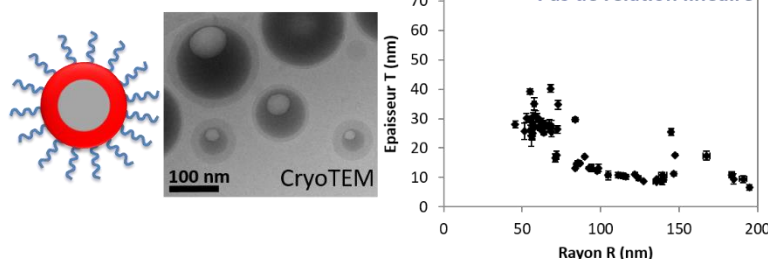


Figure 9: Comparaison des relations entre l'épaisseur de la coque et le rayon des nanocapsules de PLGA (A) et de PLGA-PEG (B), et évolution du signal ultrasonore en fonction du rapport T/R pour le PLGA (A). Les épaisseurs et rayons ont été mesurés sur des images de TEM pour les NCs de PLGA (Pisani et al., 2006) et sur des images de cryo-TEM pour les NCs de PLGA-PEG.

Le rapport T/R des nanocapsules de PLGA-PEG avait en fait été déterminé par SANS (Diou et al., 2016) et correspond donc au rapport d'une épaisseur moyenne sur un rayon moyen. En traçant la courbe $T=f(R)$ à partir des images de microscopie électronique, nous avons réalisé qu'il n'y a pas de relation linéaire entre T et R (Figure 9B). Il y a ainsi des petites capsules avec une coque épaisse et des grandes capsules à coque fine. Avec le PLGA-PEG, il n'est donc plus possible de caractériser un échantillon par un ratio T/R valable pour toutes les capsules de l'échantillon, et de contrôler ce ratio pour moduler la compressibilité des capsules. La présence du PEG modifie donc considérablement le comportement du polymère et entraîne des instabilités interfaciales lors du processus d'évaporation de solvant, qui rendent le contrôle du rapport T/R difficile.

Comparaison PLGA-PEG / PLA-PEG

Nous pensions initialement pouvoir éviter ces instabilités interfaciales grâce à la présence des chaînons fluorés dans les polymères. Or il se trouve que rien qu'en passant du PLGA-PEG commercial au PLA-PEG synthétisé, bien qu'il n'y ait toujours pas de relation linéaire entre T et R (Figure 10), l'épaisseur moyenne est déjà fortement réduite (de 21,5-22 nm avec le PLGA-PEG à 14,5-16 nm avec le PLA-PEG d'après les mesures de SANS). Nous avons en effet choisi de synthétiser des polymères à base de PLA du fait de la difficulté à synthétiser du PLGA à cause de la réactivité bien supérieure du glycolide comparé au lactide (Qian et al., 2011). Cette différence d'épaisseur entre le PLGA-PEG et le PLA-PEG provient peut-être de la différence de masse molaire du bloc hydrophobe (45000 g/mol pour le PLGA-PEG commercial contre 20000 g/mol pour le PLA-PEG), ou de la présence du glycolide plus hydrophile, pouvant entraîner des comportements différents en solution.

En revanche, cette diminution d'épaisseur n'a pas permis d'augmenter l'échogénicité des capsules de PLA-PEG par rapport aux capsules de PLGA-PEG : dans les deux cas, quelle que soit la masse de polymère utilisée, aucun rehaussement du contraste n'était visible avec le montage utilisé dans le chapitre 1.

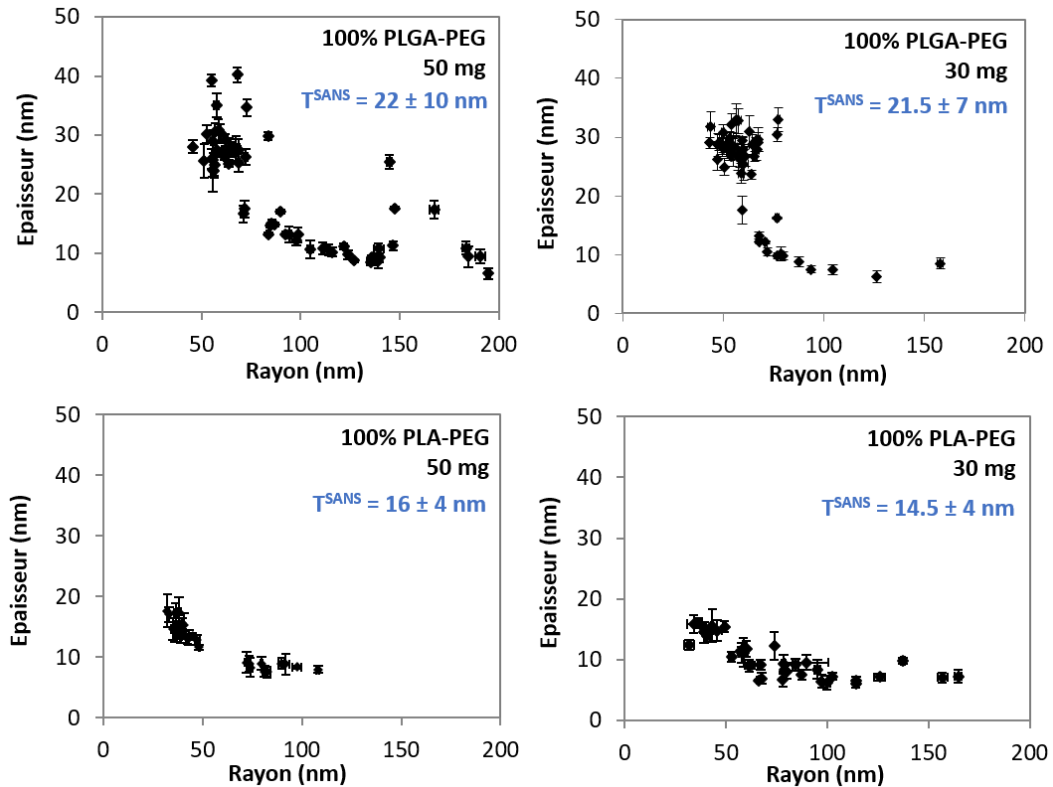


Figure 10: Evolution de l'épaisseur avec le rayon pour les nanocapsules de PLGA-PEG et PLA-PEG (mesures réalisées sur les images de cryoTEM, et comparaison avec la valeur d'épaisseur moyenne mesurée en SANS). Pour chaque capsule, 2 mesures de diamètre et 4 mesures d'épaisseur sont réalisées, et les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de ces valeurs.

Polymères fluorés

Avec nos deux stratégies utilisant les polymères fluorés, nous ne sommes pas parvenus à retrouver une relation linéaire entre l'épaisseur et le rayon comme pour les nanocapsules de PLGA, que nous aurions pu contrôler pour moduler la compressibilité des capsules. En revanche, nous avons réussi à diminuer l'épaisseur moyenne jusqu'à 11 nm (chapitre 2). Lorsque l'on récapitule les résultats d'intensité ultrasonore diffusée en fonction de l'épaisseur des coques, on se rend compte qu'il n'y a pas d'augmentation de l'intensité avec la diminution de l'épaisseur jusqu'à 14 nm (Figure 11). Ce n'est que pour des épaisseurs moyennes inférieures à 14 nm que l'intensité est plus importante. Dans nos travaux, l'épaisseur des coques ne peut donc pas être un critère exclusif pour contrôler l'échogénicité. Par exemple, des nanocapsules de PLGA possédant des épaisseurs de l'ordre de 40 nm présentaient une échogénicité satisfaisante (Pisani et al., 2008b) alors que des nanocapsules PEGylées d'épaisseur moyenne 14 nm ne donnaient presque aucun signal (Houvenagel et al., 2017). Nous nous sommes donc intéressés à l'influence d'autres paramètres, notamment la présence des chaînes de PEG.

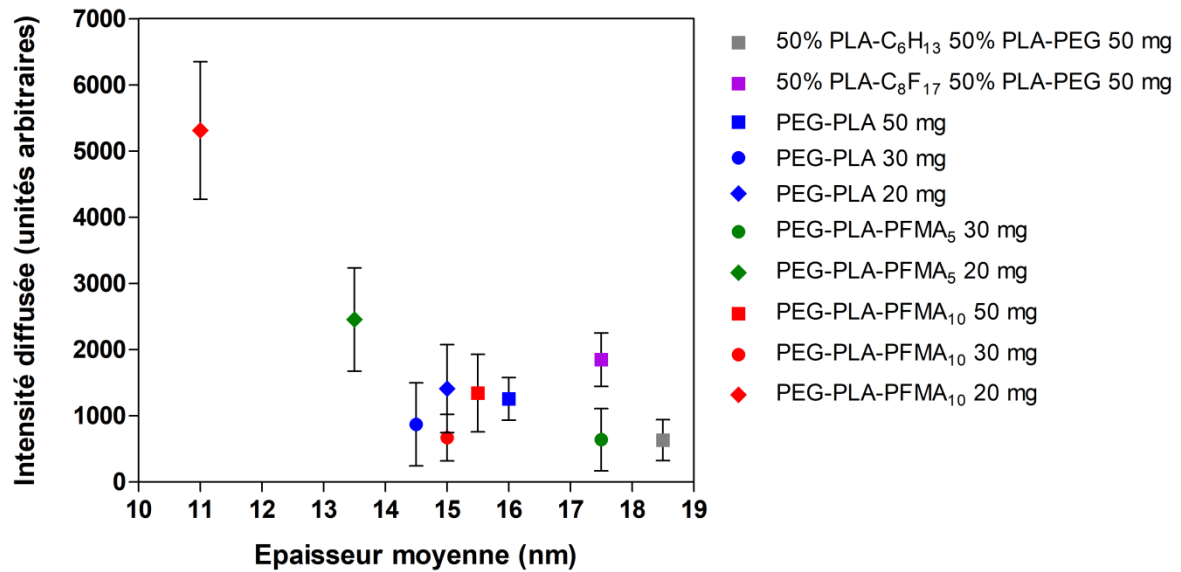


Figure 11: Evolution de l'intensité ultrasonore diffusée en fonction de l'épaisseur moyenne de la coque des nanocapsules mesurée par SANS. Les mesures ont été faites avec le montage des chapitres 2, 3 et 4, avec des nanocapsules redispersées à une concentration finale en polymère de 5 mg/mL

5.2. La présence du PEG

Les résultats du chapitre 4 ont démontré que la présence du PEG a pour effet de considérablement diminuer l'intensité ultrasonore diffusée, mais il est difficile d'expliquer exactement pourquoi. Très peu d'études s'intéressent à l'influence du PEG sur la réponse acoustique d'agents de contraste à coques polymères, et les conclusions diffèrent d'une étude à l'autre. Étonnamment, un article a rapporté que des microbulles d'air stabilisées par du PLGA-PEG engendrent un rehaussement du contraste ultrasonore *in vitro* à 1,5 MHz bien plus important que des microbulles de PLA ou de PLGA (intensité de 34% avec le PLGA-PEG contre 15% et 18% avec le PLA et le PLGA respectivement) (Sanna et al., 2011). Cependant, ceci peut éventuellement s'expliquer par leur diamètre moyen plus élevé (presque 4 μm comparé à 3 μm pour les autres) ou par leur surface irrégulière et alvéolaire (Figure 12). Par ailleurs, le PEG utilisé est de plus faible masse molaire (3000 g/mol) que dans nos travaux (5000 g/mol), pouvant éventuellement expliquer une influence moindre sur la réponse ultrasonore.

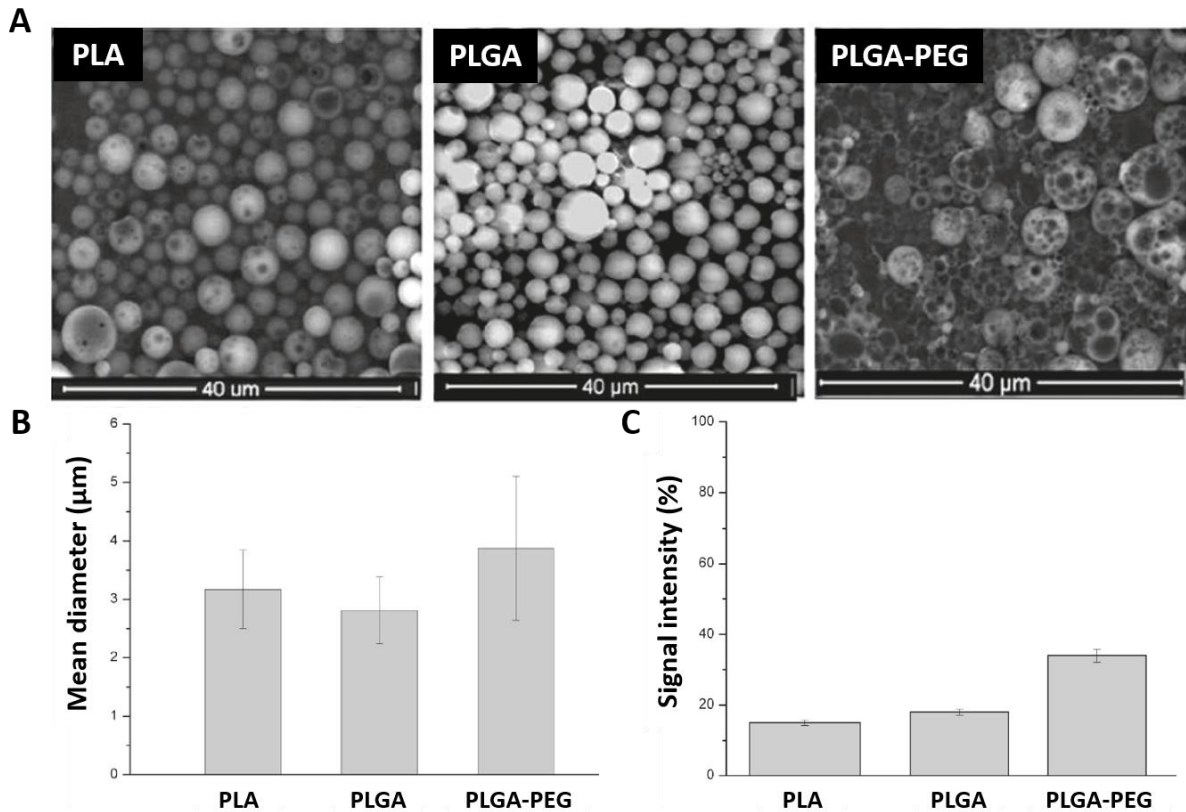
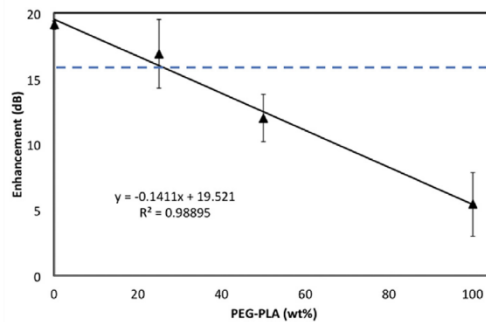


Figure 12: Comparaison des propriétés de microbulles d'air de PLA, PLGA ou PLGA-PEG: images de microscopie électronique à balayage (A), diamètre moyen (B) et intensité ultrasonore rétrodiffusée *in vitro* à 1,5 MHz (C) (Sanna et al., 2011)

En revanche, l'étude de Jablonowski et al. démontre nettement que l'addition de PEG dans des microbulles de PLA diminue considérablement leur échogénicité (Jablonowski et al., 2016). Les auteurs comparent deux techniques de PEGylation : ajout de proportions croissantes de PEG-PLA (masse molaire du PEG de 5000 g/mol) ou incorporation d'un phospholipide PEGylé (masse molaire du PEG de 2000 g/mol). Ainsi par exemple, lorsque l'on ajoute 1 wt% de PEG-PLA dans la formulation, il faut doubler la concentration en microbulles pour atteindre le rehaussement maximal (~18 dB). En ajustant les doses, un rehaussement satisfaisant (> 16 dB) peut cependant être obtenu jusqu'à 15 wt% de PEG-PLA (Figure 13). L'incorporation du phospholipide PEGylé a des conséquences plus importantes : l'échogénicité est diminuée de moitié en passant de 1 à 2 wt% de lipide PEGylé dans la formulation (Figure 13). Par ailleurs, la PEGylation rend les microbulles moins persistantes sous le faisceau ultrasonore, suggérant une fragilité accrue des coques PEGylées (Figure 13). Enfin, la fréquence de résonance des microbulles augmente avec des pourcentages croissants de PLA-PEG : elle passe de 4,5 MHz avec 0, 1 ou 2 wt% de PEG-PLA, à 7,8 MHz avec 5 ou 10 wt% de PEG-PLA. Les auteurs attribuent cela à la coque probablement plus épaisse et probablement moins élastique des microbulles contenant une plus forte proportion de PEG-PLA. Il est en revanche difficile de trouver des explications à l'atténuation du signal ultrasonore par les chaînes de PEG. Il est possible que les différences de tailles et de

morphologies aient une influence. Dans cette étude, les microbulles PEGylées sont en effet plus petites (diamètres moyens entre 1,06 et 2,17 μm) que leurs analogues non-PEGylées (2,41 μm), et sont moins sphériques et plus hétérogènes en structure (Jablonowski et al., 2016).



	Initial dB enhancement (Dose in $\mu\text{g/ml}$)	Maximum dB enhancement (Dose in $\mu\text{g/ml}$)	US half-life at low MI (min)	US half-life at high MI (min)
Unmodified MB	16.45 \pm 0.63 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	18.30 \pm 0.25 (7.5 $\mu\text{g/ml}$)	>15	3
1 wt% PEG-PLA MB	13.63 \pm 0.67 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	18.35 \pm 0.58 (13.5 $\mu\text{g/ml}$)	>15	4
2 wt% PEG-PLA MB	12.67 \pm 1.00 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	18.09 \pm 0.56 (13.5 $\mu\text{g/ml}$)	>15	3
5 wt% PEG-PLA MB	13.14 \pm 0.67 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	18.85 \pm 0.44 (15 $\mu\text{g/ml}$)	>15	4
10 wt% PEG-PLA MB	11.15 \pm 1.36 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	15.46 \pm 1.15 (15 $\mu\text{g/ml}$)	13	3
15 wt% PEG-PLA MB	10.88 \pm 0.81 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	17.00 \pm 0.54 (15 $\mu\text{g/ml}$)	7	3
0.2 wt% LipidPEG MB	13.13 \pm 1.01 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	16.49 \pm 0.54 (9 $\mu\text{g/ml}$)	>15	3
1 wt% LipidPEG MB	10.19 \pm 0.98 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	16.71 \pm 0.83 (13.5 $\mu\text{g/ml}$)	4	2
2 wt% LipidPEG MB	5.58 \pm 0.46 (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	8.08 \pm 0.50 (13.5 $\mu\text{g/ml}$)	1	1

Figure 13: Graphe montrant l'influence de l'addition de PEG-PLA sur l'échogénicité *in vitro* des microbulles à 5 MHz (haut) et tableau rassemblant les propriétés acoustiques des différentes microbulles testées (bas)

L'influence du PEG sur le signal ultrasonore a aussi été étudiée par Hosny et al., mais dans le cas de microbulles lipidiques (Hosny et al., 2013). L'ajout d'une quantité croissante de PEG40-stearate dans la formulation entraîne une diminution de la viscosité de la coque et résulte en une diminution de l'intensité ultrasonore diffusée. Dans une autre étude sur des microbulles, la présence d'une enveloppe composée uniquement de Pluronic F-68, qui contient des chaînes de PEG, diminue considérablement les amplitudes vibrationnelles des microbulles (Ando et al., 2016). En revanche, les auteurs attribuent cette diminution d'échogénicité à une augmentation de la viscosité de la coque, ce qui va en sens contraire des observations de l'étude précédente. La présence du Pluronic entraîne aussi une diminution de l'élasticité, qui se voit par les rayons de résonance plus faibles des microbulles stabilisées par le Pluronic comparé aux microbulles sans Pluronic. Ceci est assez étonnant parce que les microbulles enveloppées dans des tensioactifs et lipides tels que Levovist® et Sonazoid® ont des rayons de résonance plus grands que les microbulles sans enveloppe du fait d'une augmentation de l'élasticité (Ando et al., 2016). La présence du Pluronic engendre donc des comportements différents comparés aux microbulles classiques stabilisées par des lipides ou des tensioactifs. De manière plus générale, le PEG semble entraîner des changements considérables des propriétés élastiques des ACUs. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés aux propriétés mécaniques des nanocapsules.

5.3. Les propriétés mécaniques

Les mesures d'indentation en AFM (chapitre 3) ont montré que les nanocapsules PEGylées sont plus rigides (module d'Young E de l'ordre de 500 MPa pour les NCs de PEG-PLA) que les nanocapsules non-PEGylées ($E \sim 240$ MPa pour les NCs de PLA-C₆H₁₃). Le module d'Young peut nous donner qualitativement une indication de la compressibilité des nanocapsules, qui est l'inverse du module d'élasticité isostatique (« bulk modulus » B), lui-même une sorte d'extension du module d'Young dans les trois dimensions. Il semble donc que la présence de PEG diminue la compressibilité des nanocapsules, et donc diminue leur réponse acoustique.

En revanche, les mesures d'indentation ont aussi montré que les nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ possèdent un module d'Young bien plus élevé ($E \sim 2,1$ GPa) que les nanocapsules de PEG-PLA, signe d'une compressibilité plus faible, alors qu'elles augmentent plus efficacement le signal ultrasonore diffusé. Ceci montre que les propriétés mécaniques (élasticité, compressibilité) ne constituent pas non plus un critère exclusif pour prédire la réponse acoustique des nanocapsules. L'augmentation du signal ultrasonore avec le polymère fluoré provient d'une autre raison.

5.4. La densité

Comme évoqué dans le chapitre Travaux Antérieurs, les ACUs peuvent rehausser le contraste en imagerie ultrasonore par plusieurs mécanismes : soit par leur capacité à rétrodiffuser les ultrasons de par leur forte différence d'impédance acoustique avec le milieu, soit par des fluctuations de volume importantes (résonance) engendrant une réponse non-linéaire, soit par leur destruction qui génère un signal ultrasonore riche en composantes non-linéaires. Ces deux derniers mécanismes sont rarement observés avec des ACUs de taille nanométrique encapsulant des perfluorocarbures liquides à points d'ébullition élevés. Lors de cette thèse, nous n'avons effectivement pas détecté de réponse non-linéaire avec les nanocapsules. L'augmentation du signal ultrasonore provient donc essentiellement de la différence d'impédance acoustique entre les nanocapsules et l'eau. L'efficacité de l'interaction de l'onde ultrasonore avec l'ACU peut alors être décrite par sa section efficace de diffusion :

$$SCS = \frac{4\pi}{9} k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_d - 3\rho}{2\rho_d + \rho} \right)^2 \right]$$

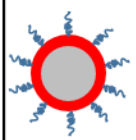
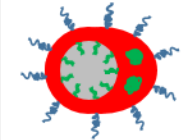
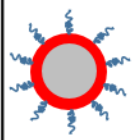
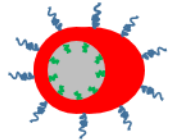
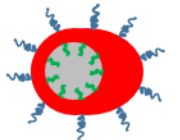
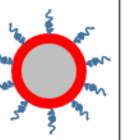
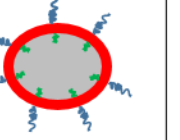
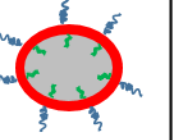
où k est le vecteur de l'onde incidente, R est le rayon de l'ACU, κ_d et κ sont les compressibilités de l'ACU et du milieu respectivement, ρ_d et ρ les densités de l'ACU et du milieu respectivement (De Jong et al., 1991). Les critères dont nous avons parlé dans les paragraphes précédents (l'épaisseur de la coque, la présence du PEG et les propriétés mécaniques) sont en fait tous reliés à la compressibilité de la capsule. Or on voit que la densité a également une influence importante

sur la section efficace de diffusion. Nous pensons donc que l'augmentation du signal ultrasonore avec les nanocapsules à base de polymère fluoré est favorisée par l'augmentation de la densité de la capsule due à la présence de chaînes perfluorées. Les chaînes perfluorées sont effectivement très denses (la densité du méthacrylate fluoré est $1,59 \text{ g/cm}^3$). Par ailleurs, ces chaînes fluorées permettent d'accroître l'efficacité d'encapsulation du PFOB, lui-même très dense (densité $1,93 \text{ g/cm}^3$), ce qui augmente d'avantage la densité de la capsule. Pour pouvoir distinguer la contribution de chaque paramètre (présence et quantité de chaînes fluorées versus quantité de PFOB), il faudrait analyser la réponse ultrasonore de nanoparticules formulées avec les polymères fluorés sans PFOB.

5.5. La morphologie

Bien qu'on ait vu plus haut que l'épaisseur n'était pas un critère essentiel pour prédire la réponse acoustique des nanocapsules, la morphologie des nanocapsules semble tout de même avoir une importance. En effet, les résultats obtenus avec 100% de PEG-PLA-PFMA_n (Tableau 2), montrent que les formulations préparées à base de 30 mg de PEG-PLA-PFMA₅ et de PEG-PLA-PFMA₁₀ n'engendrent quasiment pas de signal ultrasonore alors qu'elles possèdent une quantité importante de PFOB encapsulé et de chaînons fluorés, tout comme les formulations analogues à 20 mg qui elles possèdent une forte réponse acoustique. La morphologie non-symétrique avec le cœur de PFOB non-centré et une épaisseur plus importante et plus hétérogène est peut-être à l'origine de cette diminution du signal ultrasonore. Ce type de morphologie diminue peut-être encore considérablement la compressibilité des capsules, qui est déjà très faible même pour les nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ à 20 mg qui possède un cœur de PFOB centré et une épaisseur homogène et fine (chapitre 3).

Tableau 2: Tableau récapitulatif des caractéristiques des nanocapsules formulées à base de 100% PEG-PLA-PFMA_n. Pour chaque paramètre, l'échelle de couleurs va du rouge au vert dans le sens d'un effet améliorant probablement la réponse acoustique des nanocapsules : apparaîtront ainsi plus verts : les épaisseurs faibles, les efficacités d'encapsulation élevées, les quantités élevées de PFOB ramenées à 1 mL de suspension, et les quantités élevées de chaînons C₈F₁₇ dans 1 mL de suspension

	100% PEG-PLA 50 mg	100% PEG-PLA-PFMA ₁₀ 50 mg	100% PEG-PLA 30 mg	100% PEG-PLA-PFMA ₅ 30 mg	100% PEG-PLA-PFMA ₁₀ 30 mg	100% PEG-PLA 20 mg	100% PEG-PLA-PFMA ₅ 20 mg	100% PEG-PLA-PFMA ₁₀ 20 mg
Intensité ultrasonore diffusée (x 10 ³ a.u.)	1,3	1,3	0,9	0,6	0,7	1,4	2,5	5,3
Épaisseur moyenne (nm)	15,8	15,5	14,5	17,5	15	15	13,5	11
Efficacité d'encapsulation du PFOB (%)	59%	75%	36%	61%	58%	24%	47%	46%
Quantité de PFOB dans 1 mL (µmol)	6,8	8,7	6,9	11,8	11,3	7,0	13,7	13,3
Quantité de chaînons C ₈ F ₁₇ dans 1 mL (µmol)	0,00	1,18	0,00	0,75	1,18	0,00	0,75	1,18
Morphologie								

5.6. Conclusion sur les critères influençant la réponse acoustique

Nous pouvons donc conclure que dans le cas de notre système de nanocapsules, la performance acoustique peut être améliorée par :

- Une augmentation de la compressibilité, elle-même favorisée par :
 - Une faible proportion de PEG
 - Une morphologie cœur-coque avec une épaisseur fine
- Une augmentation de la densité, elle-même favorisée par :
 - Une quantité élevée de PFOB encapsulé
 - Une quantité importante de chaînes fluorées

Concernant le premier critère (la faible proportion de PEG), il aurait été intéressant d'optimiser le pourcentage de PEG pour la préparation des nanocapsules de manière à trouver le bon compromis entre l'échogénicité et la furtivité. Cependant, lors de tous nos essais de formulation des nanocapsules avec de faibles pourcentages de PLA-PEG (5%, 10%, 25%), nous nous sommes heurtés au problème de la formation de microparticules et d'agrégats plutôt que de nanocapsules avec de faibles pourcentages de PEG (chapitre 4). Nous aurions pu penser que ces objets se forment du fait de la nécessité pour les chaînes de PEG de s'orienter vers la phase aqueuse, créant ainsi de l'interface (Pisani et al., 2009). Néanmoins, les formulations à pourcentages de PLA-PEG plus élevés (50% et 100%) forment des nanocapsules de façon satisfaisante, alors qu'elles possèdent plus de chaînes de PEG qui auraient besoin de créer encore plus d'interface. Dans l'étude de Jablonowski et al., l'indice de polydispersité (PDI) des microbulles de PLA augmente fortement avec l'augmentation de la proportion de PLA-PEG : il passe de 0,184 pour les microbulles de PLA à 0,308 à 1 wt% de PLA-PEG, 0,232 à 2 wt%, 0,293 à 5 wt%, 0,357 à 10 wt%, jusqu'à 0,501 à 15 wt%, mais aucune explication n'est proposée (Jablonowski et al., 2016). L'addition de faibles pourcentages de PLA-PEG a donc un impact considérable sur la formation de microbulles ou de nanocapsules, pour des raisons qui restent à éclaircir.

Pour pouvoir appréhender la contribution de chacun des critères cités ci-dessus, il faudrait :

- (1) Mesurer la densité et les propriétés mécaniques des polymères seuls
- (2) Mesurer la densité, les propriétés mécaniques, et la compressibilité des nanoparticules formulées avec ces polymères sans PFOB
- (3) Mesurer la densité, les propriétés mécaniques, et la compressibilité des nanocapsules de PFOB

Par ailleurs, il est important de noter que les expériences d'ultrasons ont été réalisées en redispersant les nanocapsules à une concentration fixe en polymère (5 mg/mL). Il est donc possible que le nombre de capsules soit différent selon les formulations, et que cela ait une

influence non-négligeable sur l'intensité ultrasonore diffusée. N'ayant pas la densité des polymères fluorés, nous ne pouvons cependant pas calculer exactement le nombre de particules dans chaque formulation. Il apparaît donc d'autant plus nécessaire de mesurer la densité des polymères, et il pourrait également être intéressant de mesurer expérimentalement le nombre de particules dans chaque formulation.

Enfin, il faut également noter que les expériences d'AFM ont été réalisées à température ambiante, alors que les expériences d'ultrasons ont été réalisées à 37°C dans l'objectif initial de se rapprocher des conditions physiologiques. Les températures de transition vitreuse des polymères sont différentes (52 °C pour PLA-C₆H₁₃, 13 °C pour PEG-PLA, et 20 °C pour PEG-PLA-PFMA₁₀). Il est donc possible que les propriétés mécaniques des nanocapsules de PEG-PLA-PFMA₁₀ mesurées en AFM à température ambiante soient en fait différentes de ce que l'on mesurerait à 37°C, et cela pourrait éventuellement expliquer l'absence de corrélation, mise en évidence dans le chapitre 3, entre les propriétés mécaniques et les propriétés acoustiques.

6. Les pistes d'amélioration de notre système en tant qu'ACU

Les nanocapsules que nous avons développées dans le chapitre 2, à base de 20 mg de PEG-PLA-PFMA₁₀, constituent une base intéressante pour le développement d'ACUs de taille nanométrique et furtifs. Ces nanocapsules présentent une réponse acoustique augmentée par rapport aux nanocapsules de PEG-PLA, mais qui reste bien inférieure à celle des microbulles Sonovue® et qui nécessite d'être améliorée davantage. Nous avons essayé dans le chapitre 4 de diminuer la proportion de PEG tout en gardant autant de bloc fluoré, mais il faudra essayer de diminuer les quantités de polymère pour améliorer la réponse ultrasonore des nanocapsules. Une autre option intéressante pour améliorer la performance acoustique des nanocapsules serait de remplacer le PFOB par un perfluorocarbure de plus faible point d'ébullition tel que le PFH. Ce dernier pourrait ainsi être vaporisé et générer des microbulles fortement échogènes. Des résultats préliminaires prometteurs lors de la thèse de Guillaume Picheth avaient montré que les polymères triblocs s'adsorbent aussi à l'interface entre le PFH et le chloroforme (Picheth, 2017).

Par ailleurs, une autre limitation des nanocapsules développées est leur polydispersité élevée (PDI ~ 0,35) et l'hétérogénéité des morphologies obtenues. Nous avons vu que l'allongement des capsules provient de la présence du bloc fluoré incompatible et volumineux qui pousse les chaînes à adopter une conformation augmentant l'aire de surface totale. Il pourrait être intéressant de synthétiser des polymères en peigne avec des chaînons fluorés plus courts que C₈F₁₇, et trouver la longueur et le nombre de chaînons fluorés optimaux permettant de stabiliser

l'interface sans engendrer de morphologies trop allongées et hétérogènes. Ceci permettrait également d'améliorer la solubilité des polymères en solvant organique.

Enfin, bien que ces polymères fluorés ni leurs produits de dégradation n'induisent aucune cytotoxicité *in vitro* après 72h d'incubation, il se peut que les produits de dégradation s'accumulent dans l'organisme et induisent alors une toxicité sur le long terme. L'utilisation de chaînons fluorés plus courts que C_8F_{17} serait là encore intéressante puisqu'elle favoriserait des temps de rétention plus courts (Riess, 2009).

Références

- Adamska, K., Voelkel, A., Berli, A., 2016. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis The solubility parameter for biomedical polymers — Application of inverse gas chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127, 202–206.
- Ando, Y., Tabata, H., Sanchez, M., Cagna, A., Koyama, D., Krafft, M.P., 2016. Microbubbles with a Self-Assembled Pluronic Shell and a Fluorocarbon Inner Gas. *Langmuir* 32, 12461–12467.
- Astafyeva, K., Somaglino, L., Desgranges, S., Berti, R., Patinote, C., Langevin, D., Lazeyras, F., Salomir, R., Polidori, A., Contino-Pépin, C., Urbach, W., Taulier, N., 2015. Perfluorocarbon nanodroplets stabilized by fluorinated surfactants: characterization and potentiality as theranostic agents. *J. Mater. Chem. B* 3, 2892–2907.
- Berlepsch, H. v., Böttcher, C., Skrabania, K., Laschewsky, A., 2009. Complex domain architecture of multicompartment micelles from a linear ABC triblock copolymer revealed by cryogenic electron tomography. *Chem. Commun.* 2290.
- De Jaeghere, F., Allemann, E., Leroux, J.C., Stevels, W., Feijen, J., Doelker, E., Gurny, R., 1999. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: Influence on physical stability and in vitro cell uptake. *Pharm. Res.* 16, 859–866.
- De Jong, N., Ten Cate, F.J., Lancée, C.T., Roelandt, J.R.T.C., Bom, N., 1991. Principles and recent developments in ultrasound contrast agents. *Ultrasonics* 29, 324–330.
- Diou, O., Brulet, A., Pehau-Arnaudet, G., Morvan, E., Berti, R., Astafyeva, K., Taulier, N., Fattal, E., Tsapis, N., 2016. PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide: Mechanism of formation, influence of polymer concentration on morphology and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 146, 762–769.
- Diou, O., Fattal, E., Delplace, V., Mackiewicz, N., Nicolas, J., Meriaux, S., Valette, J., Robic, C., Tsapis, N., 2014. RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 170–177.
- Dong, X., He, L., Wang, N., Liang, J.-Y., Niu, M.-J., Zhao, X., 2012. Diblock fluoroacrylate copolymers from two initiators: synthesis, self-assembly and surface properties. *J. Mater. Chem.* 22, 23078.
- Foster, T., Dorfman, K.D., Ted Davis, H., 2010. Giant biocompatible and biodegradable PEG-PMCL vesicles and microcapsules by solvent evaporation from double emulsion droplets. *J. Colloid Interface Sci.* 351, 140–150.
- He, G., Zhang, G., Hu, J., Sun, J., Hu, S., Li, Y., Liu, F., Xiao, D., Zou, H., Liu, G., 2011. Low-fluorinated homopolymer from heterogeneous ATRP of 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate mediated by copper complex with nitrogen-based ligand. *J. Fluor. Chem.* 132, 562–572.
- Horn, M., Matyjaszewski, K., 2013. Solvent Effects on the Activation Rate Constant in Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 46, 3350–3357.
- Hosny, N.A., Mohamedi, G., Rademeyer, P., Owen, J., Wu, Y., Tang, M.-X., Eckersley, R.J., Stride, E., Kuimova, M.K., 2013. Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9225–9230.
- Houvenagel, S., Picheth, G., Dejean, C., Brulet, A., Chenneviere, A., Couture, O., Huang, N., Moine, L., Tsapis, N., 2017. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. *Polym. Chem.* 8, 2559–2570.
- Jablonowski, L.J., Alfego, D., Andorko, J.I., Eisenbrey, J.R., Teraphongphom, N., Wheatley, M.A., 2016. Balancing stealth and echogenic properties in an ultrasound contrast agent with drug delivery potential. *Biomaterials* 103, 197–206.
- Jiang, B., Zhang, L., Shi, J., Zhou, S., Liao, B., Liu, H., Zhen, J., Pang, H., 2013. Synthesis, characterization and bulk properties of well-defined poly(hexafluorobutyl methacrylate)-block-poly(glycidyl methacrylate) via consecutive ATRP. *J. Fluor. Chem.* 153, 74–81.
- Krafft, M.P., 2001. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 209–228.
- Kubowicz, S., Baussard, J.F., Lutz, J.F., Thünemann, A.F., Von Berlepsch, H., Laschewsky, A., 2005. Multicompartment micelles formed by self-assembly of linear ABC triblock copolymers in aqueous medium. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 5262–5265.
- Lee, W.K., Losito, I., Gardella, J.A., Hicks, W.L., 2001. Synthesis and surface properties of fluorocarbon end-capped biodegradable polyesters. *Macromolecules* 34, 3000–3006.
- Marsat, J.N., Heydenreich, M., Kleinpeter, E., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., Laschewsky, A., 2011. Self-assembly into multicompartment micelles and selective solubilization by hydrophilic-lipophilic-fluorophilic block copolymers. *Macromolecules* 44, 2092–2105.

- Monde, K., Miura, N., Hashimoto, M., Taniauchi, T., Inabe, T., 2006. Conformational analysis of chiral helical perfluoroalkyl chains by VCD. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6000–6001.
- Niu, M., He, L., Liang, J., Pan, A., Zhao, X., 2014. Effect of side chains and solvents on the film surface of linear fluorosilicone pentablock copolymers. *Prog. Org. Coatings* 77, 1603–1612.
- Oda, Y., Suzuki, R., Mori, T., Takahashi, H., Natsugari, H., Omata, D., Unga, J., Uruga, H., Sugii, M., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F., Hashida, M., Maruyama, K., 2015. Development of fluorosilicone lipid-based nanobubbles for efficiently containing perfluoropropane. *Int. J. Pharm.* 487, 64–71.
- Picheth, G., 2017. Synthesis and characterization of acoustic-sensitive perfluorinated microvesicles and nanocapsules for theranostic application. Universidade Federal Do Parana, Université Paris Saclay.
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V., Tsapis, N., 2008a. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 326, 66–71.
- Pisani, E., Ringard, C., Nicolas, V., Raphael, E., Rosilio, V., Moine, L., Fattal, E., Tsapis, N., 2009. Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG. *Soft Matter* 5, 3054–3060.
- Pisani, E., Tsapis, N., Galaz, B., Santin, M., Berti, R., Taulier, N., Kurtisovski, E., Lucidarme, O., Ourevitch, M., Doan, B.T., Beloeil, J.C., Gillet, B., Urbach, W., Bridal, S.L., Fattal, E., 2008b. Perfluorooctyl Bromide Polymeric Capsules as Dual Contrast Agents for Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 18, 2963–2971.
- Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., Fattal, E., 2006. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir* 22, 4397–4402.
- Qian, H., Wohl, A.R., Crow, J.T., MacOsko, C.W., Hoyer, T.R., 2011. A strategy for control of “random” copolymerization of lactide and glycolide: Application to synthesis of PEG- b -PLGA block polymers having narrow dispersity. *Macromolecules* 44, 7132–7140.
- Reichardt, C., 2003. Solvents and Solvents Effects in Organic Chemistry, 3rd, Wiley-VCH. ed.
- Ren, Y., Lodge, T.P., Hillmyer, M.A., 2002. Effect of selective perfluoroalkylation on the segregation strength of polystyrene-1,2-polybutadiene block copolymers. *Macromolecules* 35, 3889–3894.
- Riess, J.G., 2009. Highly fluorinated amphiphilic molecules and self-assemblies with biomedical potential. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 294–304.
- Sanna, V., Pintus, G., Bandiera, P., Anedda, R., Punzoni, S., Sanna, B., Migaleddu, V., Uzzau, S., Sechi, M., 2011. Development of Polymeric Microbubbles Targeted to Prostate-Specific Membrane Antigen as Prototype of Novel Ultrasound Contrast Agents. *Mol. Pharm.* 8, 748–757.
- Sato, H., Yajima, T., Yamagishi, A., 2016. Helical Inversion of Gel Fibrils by Elongation of Perfluoroalkyl Chains as Studied by Vibrational Circular Dichroism. *Chirality* 28, 361–364.
- Sato, S., Gondo, D., Wada, T., Kanehashi, S., Nagai, K., 2013. Effects of various liquid organic solvents on solvent-induced crystallization of amorphous poly(lactic acid) film. *J. Appl. Polym. Sci.* 129, 1607–1617.
- Shunmugam, R., Smith, C.E., Tew, G.N., 2007. ATRP Synthesis of ABC Lipophilic–Hydrophilic–Fluorophilic Triblock Copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 45, 2601–2608.
- Skrabania, K., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., Laschewsky, A., 2010. Synthesis of ternary, hydrophilic-lipophilic-fluorophilic block copolymers by consecutive RAFT polymerizations and their self-assembly into multicompartiment micelles. *Macromolecules* 43, 271–281.
- Skrabania, K., Laschewsky, A., Berlepsch, H. V., Böttcher, C., 2009. Synthesis and micellar self-assembly of ternary hydrophilic- lipophilicfluorophilic block copolymers with a linear PEO chain. *Langmuir* 25, 7594–7601.
- Spasova, M., Mespouille, L., Coulembier, O., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I., Dubois, P., 2009. Amphiphilic poly(D- or L-lactide)-b-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) block copolymers: Controlled synthesis, characterization, and stereocomplex formation. *Biomacromolecules* 10, 1217–1223.
- Xu, B., Li, L., Yekta, A., Masoumi, Z., Kanagalingam, S., Winnik, M.A., Zhang, K., Macdonald, P.M., Menchen, S., 1997. Synthesis, Characterization, and Rheological Behavior of Polyethylene Glycols End-Capped with Fluorocarbon Hydrophobes. *Langmuir* 13, 2447–2456.
- Zhao, Y., Shuai, X., Chen, C., Xi, F., 2004. Synthesis of star block copolymers from dendrimer initiators by combining ring-opening polymerization and atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 37, 8854–8862.
- Zhou, Z., Li, Z., Ren, Y., Hillmyer, M.A., Lodge, T.P., 2003. Micellar shape change and internal segregation induced by chemical modification of a tryptych block copolymer surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10182–10183.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de montrer que l'utilisation de polymères à terminaisons fluorées constitue une voie intéressante pour formuler des agents de contraste à la fois furtifs et échogènes. Dans une première partie, la fonctionnalisation de polymères avec des chaînons perfluorés linéaires a permis d'accroître l'efficacité d'encapsulation du PFOB, mais n'a pas permis de réduire l'épaisseur de la coque des nanocapsules. La réponse ultrasonore des nanocapsules fluorées était cependant légèrement améliorée par rapport aux nanocapsules de PLA-PEG. Dans une deuxième partie, l'utilisation de polymères triblocs possédant un bloc hydrophile de PEG pour la furtivité, un bloc hydrophobe de PLA pour former une coque solide dégradable, et un bloc composé de chaînons perfluorés pendants, a considérablement modifié les propriétés des nanocapsules. Nous avons montré que la structure en peigne du bloc fluoré favorise son adsorption à l'interface PFOB/solvant et entraîne la formation de nanocapsules à morphologies très variées. Les nanocapsules possédant un cœur de PFOB centré et une épaisseur moyenne réduite engendrent ainsi une amélioration importante du signal ultrasonore, qui reste toutefois bien moindre par rapport aux microbulles utilisées en clinique. En revanche, le troisième chapitre a montré que cette amélioration du signal n'était pas due à une augmentation de la compressibilité de ces capsules, qui se sont au contraire révélées très rigides du fait de la présence des chaînes perfluorées. L'amélioration du signal provient probablement d'une augmentation de la densité de la capsule, grâce à la présence des chaînes perfluorées et à la quantité élevée de PFOB encapsulé. La morphologie centrée des capsules, avec une épaisseur homogène, semble être aussi un critère nécessaire pour favoriser ce rehaussement du signal ultrasonore. Nous avons également montré que la PEGylation augmente la rigidité des nanocapsules et atténue considérablement leur réponse ultrasonore. La dernière partie a alors montré que l'utilisation de polymères fluorés permet de contrebalancer cette atténuation de la réponse acoustique, et qu'il faut optimiser les quantités de polymère fluoré et les quantités de polymère PEGylé et fluoré pour trouver le meilleur compromis entre la furtivité et l'échogénicité des nanocapsules. Ces travaux auront donc permis de comprendre que de nombreux paramètres influencent la réponse acoustique d'un tel système. Pour pouvoir appréhender la contribution de chaque paramètre, il faudrait repartir d'une caractérisation des polymères seuls en termes de propriétés mécaniques et de densité, puis d'une caractérisation des nanoparticules formulées avec ces polymères sans PFOB, avant de s'intéresser à la formulation des nanocapsules avec le PFOB. L'utilisation d'un perfluorocarbure de plus faible point d'ébullition comme le PFH pourrait à l'avenir permettre d'améliorer davantage la réponse acoustique des nanocapsules. Bien que le niveau de contraste atteint lors de cette thèse soit loin du niveau des ACUs commerciaux, les nanocapsules fluorées possèdent des avantages certains de par leur petite taille et leur furtivité qui favoriseront leur accumulation dans les tumeurs. En outre, elles pourraient, à terme, encapsuler un anti-cancéreux qui serait libérable sous l'action des ultrasons.

Titre : Synthèse de polyesters fluorés pour la formulation de nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores

Mots clés : Nanocapsules, polyesters fluorés, agents de contraste, perfluorocarbures, ultrasons

Résumé : Nous avons synthétisé des polymères possédant des terminaisons fluorées afin de formuler des nanocapsules comme agents de contraste ultrasonores (ACUs) pour l'imagerie des tumeurs. Ces nanocapsules sont composées d'un cœur de bromure de perfluorooctyle (PFOB), un liquide perfluoré biocompatible et échogène, et d'une coque polymère possédant trois blocs d'affinités différentes. Le bloc hydrophile de polyéthylène glycol (PEG) présent en surface des nanocapsules permet de prolonger leur temps de circulation dans le compartiment sanguin et de favoriser leur accumulation dans les tumeurs par l'effet de perméabilité et de rétention accrue. Le bloc hydrophobe de polylactide (PLA) permet de générer une coque dégradable plus stable que les membranes de lipides ou de tensioactifs qui composent les ACUs utilisés en clinique. Finalement, la terminaison fluorée permet de favoriser l'ancrage du polymère autour de la goutte de liquide perfluoré et d'augmenter l'échogénicité des nanocapsules. Deux stratégies différentes ont été développées pour introduire ce bloc fluoré. La première consistait à synthétiser un PLA terminé par un chaînon fluoré linéaire court (C_3F_7 à $C_{13}F_{27}$) et à le mélanger à un polymère dibloc PLA-PEG pour formuler les nanocapsules. Nous avons montré que l'efficacité d'encapsulation du PFOB augmente avec la longueur de chaîne fluorée jusqu'à C_8F_{17} . La deuxième stratégie consistait à synthétiser directement un polymère tribloc composé des trois parties PEG, PLA et fluorée sur la même chaîne, la partie fluorée étant constituée

de 4 à 15 chaînons C_8F_{17} pendants (structure en peigne). Des mesures de tension interfaciale ont montré que ces polymères triblocs s'adsorbent à l'interface PFOB/solvant organique et encapsulent le PFOB plus efficacement que le PLA-PEG non fluoré. La morphologie des capsules est fortement influencée par le nombre de chaînons fluorés présents dans le polymère et par la quantité de polymère utilisée lors de la formulation. Une masse élevée du polymère contenant 15 chaînons fluorés favorisera ainsi la formation de nanocapsules possédant plusieurs cœurs de PFOB. La diminution de la quantité de polymère fluoré a finalement permis de produire des capsules avec un seul cœur, une coque fine, et de forme légèrement ellipsoïdale. Ces capsules diffusent les ultrasons plus efficacement que les capsules de PLA-PEG non fluoré. Alors que la présence de chaînes de PEG atténue considérablement la réponse acoustique des capsules, l'addition des chaînons fluorés permet de contrebalancer cet effet. Cette amélioration provient de plusieurs paramètres : l'augmentation de la quantité de PFOB encapsulé, l'augmentation de la densité de la capsule, et la diminution de l'épaisseur de la coque des capsules. Par ailleurs, les polymères fluorés et leurs produits de dégradation n'induisent pas de cytotoxicité in vitro comparé à leurs analogues non fluorés. Ces nanocapsules apparaissent donc comme des agents de contraste prometteurs pour permettre de mieux visualiser les tumeurs par échographie.

Title : Synthesis of fluorinated polyesters for nanocapsules formulation as ultrasound contrast agents

Keywords : Nanocapsules, fluorinated polyesters, contrast agents, perfluorocarbons, ultrasound

Abstract : We have synthesized polymers with fluorinated end chains to formulate nanocapsules as ultrasound contrast agents (UCAs) for tumor imaging. These nanocapsules are composed of a core of perfluorooctyl bromide (PFOB), a biocompatible and echogenic perfluorinated liquid, and a polymeric shell made of three blocks of different affinities. The hydrophilic block of poly(ethylene glycol) (PEG) at the surface of the nanocapsules allows increasing their circulation time in the blood and promoting their accumulation into tumors by the enhanced permeation and retention effect. The hydrophobic block of polylactide (PLA) allows generating a degradable shell with higher stability as compared to the surfactant- and lipid-based membranes of commercialized UCAs. Finally, the fluorinated block favors the wetting of the polymer around the perfluorinated liquid and improves the nanocapsules echogenicity. Two different strategies have been developed to introduce this fluorinated part. The first one consisted in synthesizing a PLA terminated by a short linear fluorinated chain (from C_3F_7 to $C_{13}F_{27}$) and mixing it with a PLA-PEG diblock polymer to formulate the nanocapsules. The encapsulation efficiency of PFOB was found to increase with the fluorinated chain length up to C_8F_{17} . The second strategy consisted in synthesizing directly a triblock polymer composed of the three parts (PEG, PLA and fluorinated) on same chain, the fluorinated part

consisting of 4 to 15 pendant C_8F_{17} chains (with a comb-like structure). Interfacial tension measurements showed that these triblock polymers adsorb at the PFOB/organic solvent interface and encapsulate PFOB more efficiently than non-fluorinated PLA-PEG. The capsules morphology was strongly influenced by the number of fluorinated chains and the amount of polymer used for formulation. Formulation with a high quantity of the polymer containing 15 fluorinated pendants thus favored the formation of nanocapsules with several PFOB cores. Decreasing the fluorinated polymer quantity then allowed producing capsules with a single core, a thin shell, and a slightly ellipsoidal shape. These capsules were more efficient ultrasound scatterers than non-fluorinated PLA-PEG capsules. While the presence of PEG chains considerably attenuates the capsules acoustic response, addition of fluorinated chains seems to counterbalance this effect. Such improvement arises from several contributions: a higher encapsulated PFOB content, a higher density due to the presence of fluorinated chains, and a lower shell thickness. Furthermore, the fluorinated polymers and their degradation products did not induce any in vitro cytotoxicity as compared to their non-fluorinated analogues. These nanocapsules therefore appear as promising UCAs for tumor imaging.