



HAL
open science

L'effet ouzo pour l'élaboration de nanocapsules hybrides (Hybridosomes®), l'encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciipitation et la radiothérapie

Clément Goubault

► To cite this version:

Clément Goubault. L'effet ouzo pour l'élaboration de nanocapsules hybrides (Hybridosomes®), l'encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciipitation et la radiothérapie. Matériaux. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1S036 . tel-03123655

HAL Id: tel-03123655

<https://theses.hal.science/tel-03123655v1>

Submitted on 28 Jan 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : Sciences des Matériaux

Par

Clément GOUBAULT

L'effet ouzo pour l'élaboration de nanocapsules hybrides (Hybridosomes[®]), l'encapsulation de composés hydrophobes par nanoprécipitation et la radiothérapie

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 4 Décembre 2020

Unité de recherche : Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR), UMR 6226

Rapporteurs avant soutenance :

François GANACHAUD
Sophie PINEL

Directeur de recherche, CNRS, IMP, INSA Lyon
Maître de conférences, CRAN, Université de Lorraine

Composition du Jury :

Présidente : Myrtil KAHN

Directrice de recherche, CNRS, LCC, Toulouse

Examineurs : François GANACHAUD
Myrtil KAHN
Rémy PEDEUX
Sophie PINEL

Directeur de recherche, CNRS, IMP, INSA Lyon
Directrice de recherche, CNRS, LCC, Toulouse
Chargé de recherche, INSERM, Université de Rennes 1
Maître de conférences, CRAN, Université de Lorraine

Dir. de thèse : Fabienne GAUFFRE
Co-enc. de thèse : Soizic CHEVANCE

Directrice de recherche, CNRS, ISCR, Université de Rennes 1
Maître de conférences, ISCR, Université de Rennes 1

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury, François Ganachaud, Myrtil Kahn, Rémy Pedoux et Sophie Pinel, qui ont accepté de juger ces travaux de thèse. Mes remerciements tout particuliers vont aux deux rapporteurs.

Cette thèse s'est déroulée à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR – UMR 6226), au sein de l'équipe Chimie Organique et Interfaces (COInt). Une partie importante des résultats a été obtenue sur la plateforme Biologie, santé, innovation technologique Biosit (UMS CNRS 3480, INSERM 018) que je remercie.

Je vous remercie chaleureusement, Fabienne et Soizic, pour votre encadrement pendant ces trois années. Merci à vous pour votre soutien permanent, nos discussions passionnantes et votre volonté que mon passage ici se réalise dans les meilleures conditions. Vous m'avez toujours laissé une grande liberté dans mes recherches, avec la possibilité de mettre en œuvre mes idées. J'ai beaucoup apprécié vous avoir toutes les deux en tant qu'encadrantes, avec parfois des visions différentes qui ont fait émerger de nouvelles idées. D'un point de vue humain, je n'aurais pas pu imaginer une meilleure entente entre nous. À tout moment vous m'avez laissé la possibilité de discuter en toute confiance. Merci à vous pour ces trois belles années qui m'ont appris beaucoup, qui m'ont fait évoluer et qui me guideront à l'avenir.

Je remercie toutes les personnes sans qui ces travaux ne se seraient pas déroulés si bien. En premier lieu, je remercie Myrtil Kahn (LCC, Toulouse) pour la participation au financement de la thèse, le développement et la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer, ainsi que pour les discussions très intéressantes que nous avons pu avoir. Merci à Fabien Delpech (LCPNO, Toulouse) pour le développement et la préparation des QD InP@ZnS. Merci à Marie-Bérangère Troadec et Hélène Jakobczyk (IGDR) pour les cultures de cellules Nalm-6 et les expérimentations de relargage in vivo. Je remercie Biosit pour son savoir-faire et le laboratoire commun Oncotrial, en particulier Ulrich Jarry et Mégane

Bostoën pour les cultures cellulaires et les expérimentations sur le glioblastome (injections, irradiations et prélèvements d'organes). Par ailleurs, Merci à Pierre-Antoine Éliat (Biosit, PRISM) pour les expérimentations IRM et de relaxométrie. Merci à vous pour votre expertise, votre gentillesse et pour tous ces moments agréables passés à s'occuper de nos petites souris. Merci à Agnès Burel et Aurélien Dupont (Biosit, MRic) pour la préparation des coupes et les observations TEM. Je remercie Stéphanie Dutertre (Biosit, MRic) pour les observations de microscopie confocale. Merci à Alain Fautrel et Roselyne Viel (Biosit, H2P2) pour l'histologie. Quant à l'ISCR, je remercie Olivier Mongin de nous avoir fourni le BODIPY ainsi que Franck Camerel et Mathieu Ciancone pour la préparation et la mise à disposition des liposomes. Merci Ludivine Rault (THEMIS) pour la TEM, Elsa Caytan pour la RMN et Bertrand Lefeuvre pour les dosages ICP-OES. Je remercie également Valérie Marchi pour l'accès au fluorimètre et à la DLS / Zetasizer.

Merci à toutes les personnes de l'étage, présentes au quotidien et qui ont supporté (parfois) mon côté râleur. Merci donc à Anna, Anne-Lise, Barbara, Clément, Déborah, Elsa, Jean-Luc, Jean-Pierre, Lucie, Ludo, Manu, Nico, Nicolas, Patrick, Pauline, Solène et Viknesh... sans oublier Étienne qui fait presque partie de notre couloir ! Un grand merci en particulier à vous, Nico et Lucie. J'ai adoré partager ces trois ans avec vous, avec toujours des bons moments, des soirées, des souvenirs, des confidences et des jeux intenses (avec qui vais-je jouer au Qwinto maintenant ?). Vous allez me manquer ! Et puis toi Déborah, mon acolyte de labo, qui a vite irradié l'équipe de ta bonne humeur. Je ne me lasse pas de nos discussions interminables, nos repas, brunch, soirées, nos sorties à Intermarché ☺ Un merci particulier aussi à toi Solène, avec ton sens de l'humour si affuté et ta connaissance sans faille des expressions et anecdotes en tout genre. Je n'oublie pas les personnes au-delà du couloir que j'ai pu côtoyer ou croiser régulièrement dans l'institut. Finalement, une pensée pour tous les doctorants avec qui j'ai pu profiter de ces trois années également à l'extérieur du labo (petite pensée pour le Nakama).

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont formé depuis le début et qui ont fait naître et ont entretenu mon attrait pour les sciences, avec une curiosité toujours

intacte. Je pense particulièrement à tous les enseignants qui ont partagé leur passion pour la chimie et les sciences en général jusqu'à aujourd'hui, ainsi que toutes les personnes qui m'ont accueilli lors des différents stages.

Bien sûr ce parcours m'a permis de faire plein de belles rencontres, que ce soit à l'IUT ou à l'ENSCR, en particulier Clément (le grand !), Delphine, Flo, Gauthier, Gwendo (j'adore nos échanges postaux) et Justine. Maintenant 6 ans (voir plus pour certains, n'est-ce pas les Poitevins) d'une amitié qui n'est pas prête de s'arrêter. Merci à vous pour votre bonne humeur, votre oreille attentive et pour nos retrouvailles qui font toujours du bien. J'ai hâte de fêter avec vous nos thèses respectives et de pouvoir reprendre nos vies comme avant. Merci à vous aussi, mes amis depuis toujours et certains un peu plus récents : Amina (presque 25 ans qu'on se supporte ! Il me tarde de retourner au soleil avec toi) & Anas, Florian, Marie-Alida & Maxime (Quel plaisir d'être votre témoin et de partager votre vie), Manon & Clément, Sandrine, Justine, Lucille & Flavien, Mélanie & Jérémy. Vous m'avez vu grandir et trouver peu à peu mon chemin dans la chimie. Merci pour votre soutien indéfectible. On ne se voit malheureusement pas assez, j'ai hâte de partir avec vous au bout du monde quand on pourra voyager à nouveau !

Finalement, je vous remercie vous, ma famille, ma sœur et sa petite famille (plus si petite que ça), pour votre accompagnement inconditionnel. Tout particulièrement, merci à vous, papa, maman, qui m'avez soutenu dans mes choix et guidé dans toutes les étapes qui m'ont mené jusqu'ici.

Je vous dédie cette thèse.

La rédaction et la soutenance ont eu lieu dans un contexte inédit et difficile pour tout le monde. Même si vous ne pouviez pas être présents physiquement, votre support à distance et par caméra interposée m'a été très précieux, Merci.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| A : Absorbance | FITC : Isothiocyanate de fluorescéine |
| AFM : Microscopie à force atomique | FON : Fluorescent Organic Nanoparticle |
| AgNP : Nanoparticule d'argent | GBM : Glioblastome multiforme |
| AIE : Agregation Induced Emission | GLY : Glycogène |
| AmB : Amphotéricine B | Gy : Gray |
| AuNP : Nanoparticule d'or | HA : Hyaluronic acid |
| AuNP : Nanobâtonnet d'or | HES : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine |
| BCP : Copolymère à bloc | IC : Intervalle de confiance |
| BHE : Barrière Hémato-Encéphalique | IPDI : Diisocyanate d'isophorone |
| BHT : Hydroxytoluène butylé | IR : Infrarouge |
| CoNP : Nanoparticule de cobalt | IR : Irradiation (chapitre IV) |
| CT : Computed tomography | IRM : Imagerie par résonance magnétique |
| DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole | P(LAMP-co-GMA) : poly(lipoic acid 2-hydroxy-3-(methacryloyloxy)-propyl ester-co-glycidyl methacrylate) |
| Ddt : Dodécane-thiol | λ : longueur d'onde |
| DEX : Dextran | λ_{em} : longueur d'onde d'émission |
| D_H : Diamètre hydrodynamique | λ_{exc} : longueur d'onde d'excitation |
| DLCA : Agrégation de clusters limitée par la diffusion | LbL : Layer-by-layer |
| DLS : Diffusion dynamique de la lumière | LSPR : Résonance plasmon de surface localisée |
| DMSO : Diméthylsulfoxyde | MPS : Mononuclear Phagocytic System |
| DOPA : Dopamine | MUL : 11-mercapto-1-undecanol |
| DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | NP : Nanoparticule |
| DVB : Divinylbenzène | NR : Nanobâtonnet |
| EtOH : Éthanol | NTA : Nanoparticle Tracking Analysis |
| Φ_{mass} : Fraction massique | OA : Octylamine |
| Φ_{mol} : Fraction molaire | OIA : Oléylamine |
| Φ_{vol} : Fraction volumique | OIAc : Acide oléique |
| FDA : Food and Drug Administration | PA : Photoacoustic imaging |

| | |
|--|--|
| PAA : Poly(acrylic acid) | PVP : Poly(vinyl pyrrolidone) |
| PC : Phosphatidylcholine | P(VS-VA)-g-PLGA : Poly(vinyl sulfonate-co-vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactide-co-glycolide) |
| PCL : Polycaprolactone | QD : Quantum dot |
| PDT : Photodynamic therapy | r₂ : Relaxivité transversale |
| PEI : Poly(éthylèneimine) | RMN : Résonance magnétique nucléaire |
| PEEGM : poly(N-[2-(α-D-mannopyranosyloxy)ethyl]) methacrylamide) | ROS : Reactive Oxygen Species |
| PEG : Poly(éthylène glycol) | RT : Radiothérapie |
| PEMM : Poly(N-[2-(2-ethoxy)ethyl(α-D-glucopyranoside)]) methacrylamide) | SERS : Surface Enhanced Raman Spectroscopy |
| PEO : Poly(ethylene oxide) = PEG | SFME : Surfactant-free microemulsion |
| PGA : Poly(glycolic acid) | SiNP : Nanoparticule de silice |
| pH_i : Point isoélectrique | SPION : Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle |
| PHPMA : Poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) | SPION : Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle |
| PLA : Poly(glutamic acid) | TBA : Tert-Butyl alcohol |
| PLGA : Poly(lactic-co-glycolic acid) | TEM : Transmission Electron Microscopy |
| PMMA : Poly(methyl methacrylate) | TEOS : Tetraethyl orthosilicate |
| PNIPAM : Poly(N-isopropylacrylamide) | T_g : Température de transition vitreuse |
| PO : Propylene oxide | THF : Tetrahydrofurane |
| PS : Polystyrene | TMZ : Témazolomide |
| PSVP : Poly(styrene-co-4-vinyl pyridine) | TOPO : Trioctylphosphine oxide |
| PTMC : poly(triméthylène carbonate) | TRITC : Tétraméthylrhodamine |
| PTT : Photothermic therapy | u.a. : Unité arbitraire |
| PTX : Paclitaxel | UV : Ultraviolet |
| PUL : Pullulane | VEGF : Vascular endothelial growth factor |

* **Hybridosomes®** : Le terme « hybridosomes » est une marque déposée. Par la suite, le symbole ® ne sera pas utilisé afin d'alléger la notation.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Avant-propos..... | 12 |
| Chapitre I – Introduction bibliographique..... | 14 |
| I.1. NANOPRECIPITATION & EFFET OUZO..... | 16 |
| I.1.1. LES DIFFERENTS PROCEDES DE NANOPRECIPITATION..... | 17 |
| I.1.1.1. <i>La nanoprécipitation par émulsion-évaporation.....</i> | 18 |
| I.1.1.2. <i>La nanoprécipitation par émulsion-diffusion.....</i> | 19 |
| I.1.1.3. <i>La nanoprécipitation par déplacement de solvant.....</i> | 20 |
| I.1.2. THEORIE DE LA NANOPRECIPITATION..... | 22 |
| I.1.2.1. <i>Mécanisme.....</i> | 22 |
| I.1.2.1.1. Sursaturation..... | 23 |
| I.1.2.1.2. Nucléation..... | 24 |
| I.1.2.1.3. Croissance et agrégation..... | 25 |
| I.1.2.2. <i>Stabilité des NP formées.....</i> | 25 |
| I.1.3. L’EFFET OUZO, UN CAS PARTICULIER DE DEPLACEMENT DE SOLVANT..... | 27 |
| I.1.3.1. <i>Application de l’effet ouzo à la formation de nanoparticules.....</i> | 31 |
| I.1.3.2. <i>Autres applications.....</i> | 33 |
| I.1.3.3. <i>Un effet ouzo inverse ?.....</i> | 34 |
| I.1.4. PARAMETRES INFLUENÇANT L’ELABORATION DE NANOSTRUCTURES PAR NANOPRECIPITATION ET EFFET OUZO..... | 34 |
| I.1.4.1. <i>Importance de l’ajout d’eau et du mélange.....</i> | 34 |
| I.1.4.1.1. Rapidité du mélange..... | 34 |
| I.1.4.1.2. Rapidité de l’ajout..... | 36 |
| I.1.4.2. <i>Soluté et solvant.....</i> | 37 |
| I.1.4.3. <i>Molécules à encapsuler.....</i> | 41 |
| I.1.4.4. <i>Stabilisation des particules / gouttes et nature du soluté.....</i> | 42 |
| I.1.4.5. <i>Influence de la température.....</i> | 45 |
| I.2. CAPSULES FORMEES PAR EFFET OUZO..... | 46 |
| I.2.1. CAPSULES POLYMERES..... | 46 |
| I.2.2. UTILISATION DE LA ZONE SFME..... | 48 |
| I.2.3. CAPSULES HYBRIDES POLYMERE/NANOPARTICULES INORGANIQUES : LES HYBRIDOSOMES®..... | 55 |
| I.3. AUTRES METHODES DE PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT DES NANOPARTICULES..... | 62 |
| I.3.1. NANOCAPSULES DERIVEES D’EMULSIONS DE PICKERING..... | 62 |
| I.3.2. ASSEMBLAGE DE NANOPARTICULES AUTOUR D’UN GABARIT SOLIDE..... | 66 |
| I.3.3. ASSEMBLAGE DE NANOPARTICULES AMPHIPHILES..... | 69 |
| I.3.3.1. <i>Nanoparticules amphiphiles modifiées par des homopolymères.....</i> | 70 |
| I.3.3.2. <i>Nanoparticules amphiphiles modifiées par des copolymères à bloc.....</i> | 71 |
| I.3.3.3. <i>Nanoparticules amphiphiles en présence de copolymères à bloc « libres ».....</i> | 76 |
| I.3.4. CHARGEMENT DE NANOPARTICULES DANS LA MEMBRANE DE LIPOSOMES OU DE POLYMERSOMES..... | 78 |
| I.4. APPORT DES CAPSULES DE NANOPARTICULES INORGANIQUES POUR LES APPLICATIONS BIOMEDICALES..... | 83 |
| I.4.1. IMPORTANCE DE LA TAILLE..... | 83 |

| | | |
|----------|---|----|
| I.4.2. | TOXICITE DES NP INORGANIQUES..... | 84 |
| I.4.3. | APPORT DES NP INORGANIQUES POUR LA THERAPIE ET LE DIAGNOSTIC..... | 85 |
| I.4.3.1. | <i>Nanoparticules plasmoniques (Au, Ag, Pt, Cu...)</i> | 86 |
| I.4.3.2. | <i>Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (SPION)</i> | 90 |
| I.4.3.3. | <i>Nanoparticules semi-conductrices (QD)</i> | 92 |
| I.5. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 94 |

Chapitre II – Effet ouzo et nanocapsules.....108

| | | |
|---------------|--|-----|
| II.1. | NANOPARTICULES UTILISEES POUR LA SYNTHESE DES NANOCAPSULES PAR EFFET OUZO..... | 110 |
| II.1.1. | NP D'OXYDE DE FER (SPION)..... | 110 |
| II.1.2. | NANOPARTICULES D'OR (AUNP)..... | 111 |
| II.1.3. | QUANTUM DOTS (QD)..... | 112 |
| II.1.3.1. | <i>QD CdSe@ZnS (société Cytodiagnosics)</i> | 112 |
| II.1.3.2. | <i>QD InP@ZnS</i> | 112 |
| II.2. | LE SYSTEME OUZO « EAU/THF/HYDROXYTOLUENE BUTYLE (BHT) » | 113 |
| II.2.1. | BHT..... | 113 |
| II.2.1.1. | <i>Rôle du BHT</i> | 113 |
| II.2.1.2. | <i>Dosage de la quantité de BHT dans le THF commercial</i> | 114 |
| II.2.2. | DIAGRAMME DE PHASE « EAU/THF/BHT »..... | 115 |
| II.2.3. | CARACTERISTIQUES DE TAILLE ET DE CONCENTRATION DU SYSTEME..... | 117 |
| II.2.3.1. | <i>Région avant le domaine ouzo</i> | 118 |
| II.2.3.2. | <i>Domaine ouzo</i> | 121 |
| II.3. | FABRICATION DE NANOCAPSULES COLLOÏDALES A PARTIR DU SYSTEME « EAU/THF/BHT » | 125 |
| II.3.1. | ROLE DES LIGANDS DES NANOPARTICULES DANS L'EFFET OUZO..... | 125 |
| II.3.1.1. | <i>Octylamine (OA)</i> | 126 |
| II.3.1.2. | <i>Acide oléique (OIAc)</i> | 127 |
| II.3.1.3. | <i>Octylamine (OA) + acide oléique (OIAc)</i> | 128 |
| II.3.1.4. | <i>Oléylamine (OIA)</i> | 129 |
| II.3.1.5. | <i>Résumé des domaines ouzo présents pour les différents solutés hydrophobes</i> | 130 |
| II.3.2. | ANALYSE DU PROCEDE DE FABRICATION DES NANOCAPSULES..... | 133 |
| II.3.2.1. | <i>Élimination du solvant</i> | 133 |
| II.3.2.2. | <i>Temps d'attente avant ajout du polymère et avant évaporation</i> | 134 |
| II.3.3. | REALISATION DES HYBRIDOSOMES..... | 136 |
| II.3.3.1. | <i>Quantum dots</i> | 136 |
| II.3.3.1.1. | Quantum dots (Cytodiagnosics)..... | 136 |
| II.3.3.1.1.1. | Influence de la quantité de QD et du polymère..... | 136 |
| II.3.3.1.1.2. | Propriétés de fluorescence..... | 138 |
| II.3.3.1.2. | Quantum dots InP@ZnS..... | 139 |
| II.3.3.1.2.1. | Diagrammes de phase et caractéristiques des objets obtenus..... | 140 |
| II.3.3.1.2.2. | Effet de taille..... | 144 |
| II.3.3.1.2.3. | Fluorescence..... | 145 |
| II.3.3.1.2.4. | Purification des hybridosomes par centrifugation..... | 147 |
| II.3.3.2. | <i>Nanoparticules d'or</i> | 148 |
| II.3.3.2.1. | Influence du polymère..... | 148 |
| II.3.3.2.2. | Influence de la quantité d'AuNP..... | 152 |
| II.3.4. | MELANGE DE NANOPARTICULES..... | 153 |
| II.3.5. | AJOUT DE PLUSIEURS COUCHES POLYMERIQUES AUTOUR DES CAPSULES (LBL)..... | 154 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| II.4. | NANO-OBJETS HYBRIDES SPION@SILICE | 155 |
| II.4.1. | INFLUENCE DE LA QUANTITE DE TEOS | 156 |
| II.4.2. | INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SOLUTION (ETHANOL + AMMONIAQUE) | 162 |
| II.5. | CONCLUSION | 165 |
| II.6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 167 |

Chapitre III – Utilisation de l’effet ouzo pour l’encapsulation par nanopréciptation.....170

| | | |
|---------------|---|------------|
| III.1. | PREAMBULE | 172 |
| III.2. | ENCAPSULATION DE COMPOSES HYDROPHOBES PAR NANOPRECIPITATION | 174 |
| III.2.1. | UTILISATION DU PROCEDE DE FABRICATION DES HYBRIDOSOMES POUR L’ENCAPSULATION | 174 |
| III.2.2. | FLUOROPHORE HYDROPHOBE CHOISI POUR L’ETUDE | 174 |
| III.2.3. | ÉTUDE DE LA NANOPRECIPITATION DU BODIPY | 176 |
| III.2.4. | ENCAPSULATION DANS LES HYBRIDOSOMES | 178 |
| III.2.4.1. | <i>Hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA</i> | 178 |
| III.2.4.1.1. | Présentation des hybridosomes | 178 |
| III.2.4.1.2. | Étude des capacités d’encapsulation | 180 |
| III.2.4.2. | <i>Hybridosomes SPION/BODIPY@PAA</i> | 184 |
| III.2.4.3. | <i>Influence de la quantité de NP</i> | 186 |
| III.3. | RELARGAGE DU CONTENU ENCAPSULE | 188 |
| III.3.1. | RELARGAGE DANS LES LIPOSOMES..... | 190 |
| III.3.2. | RELARGAGE DANS LES CELLULES..... | 194 |
| III.3.2.1. | <i>Relargage du BODIPY encapsulé</i> | 194 |
| III.3.2.2. | <i>Localisation de la coque des hybridosomes</i> | 195 |
| III.3.2.3. | <i>Résumé</i> | 198 |
| III.3.3. | RELARGAGE <i>IN VIVO</i> DANS LES SOURIS | 198 |
| III.4. | PERSPECTIVES D’ENCAPSULATION D’AUTRES MOLECULES | 203 |
| III.4.1. | MOLECULES ENVISAGEES | 203 |
| III.4.2. | AMPHOTERICINE B ET VORICONAZOLE..... | 205 |
| III.4.3. | TEMOZOLOMIDE | 208 |
| III.4.4. | PACLITAXEL | 209 |
| III.5. | CONCLUSION | 210 |
| III.6. | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 212 |
| III.7. | ARTICLE PUBLIE DANS <i>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE</i> | 214 |

Chapitre IV – Hybridosomes radiothérapeutiques pour le traitement du glioblastome.....226

| | | |
|--------------|---|------------|
| IV.1. | INTRODUCTION | 229 |
| IV.1.1. | DESCRIPTION ET TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME | 229 |
| IV.1.2. | AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE PAR L’UTILISATION DE NP RADIOSENSIBILISANTES | 230 |
| IV.2. | LES HYBRIDOSOMES POUR L’AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE GLIOBLASTOME | 231 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| IV.2.1. | HYBRIDOSOMES UTILISES POUR CETTE ETUDE | 232 |
| IV.2.1.1. | <i>Composition des hybridosomes</i> | 232 |
| IV.2.1.2. | <i>Intérêt de ces hybridosomes pour cette étude</i> | 233 |
| IV.2.2. | DELIVRANCE INTRACELLULAIRE DU CONTENU ENCAPSULE..... | 234 |
| IV.2.3. | ÉVALUATION DE L'EFFICACITE DES HYBRIDOSOMES POUR L'AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE..... | 235 |
| IV.2.3.1. | <i>Biodistribution des hybridosomes et de leur contenu</i> | 235 |
| IV.2.3.1.1. | Localisation de la coque de l'hybridosome..... | 237 |
| IV.2.3.1.2. | Localisation du contenu encapsulé..... | 241 |
| IV.2.3.2. | <i>Évaluation de l'effet radiothérapeutique</i> | 248 |
| IV.2.3.2.1. | Protocole | 248 |
| IV.2.3.2.2. | Résultats | 250 |
| IV.2.3.2.2.1. | Survie | 250 |
| IV.2.3.2.2.2. | Suivi des tumeurs par IRM et bioluminescence | 253 |
| IV.2.3.2.2.3. | Comparaison de l'IRM et de la bioluminescence | 257 |
| IV.2.3.2.2.4. | Un cas de survie très prolongée..... | 258 |
| IV.3. | PERSPECTIVES..... | 262 |
| IV.3.1. | QUANTITE D'AUNP | 262 |
| IV.3.2. | ENCAPSULATION DE COMPOSES ACTIFS | 263 |
| IV.3.3. | INCORPORATION DANS UN GEL POST-RESECTION | 264 |
| IV.4. | CONCLUSION | 265 |
| IV.5. | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 267 |
| V. | Partie expérimentale..... | 270 |
| VI. | Conclusion Générale..... | 298 |

AVANT-PROPOS

Cette thèse porte sur l'élaboration de nanocapsules hybrides à base de nanoparticules inorganiques et de polymère (**les hybridosomes®**). Le procédé se base sur l'effet ouzo, qui apporte en particulier un bon contrôle de la taille des nano-objets formés. Au fil de ce manuscrit, nous allons aborder en premier lieu les aspects fondamentaux qui régissent le procédé d'élaboration pour nous diriger ensuite vers des applications pour l'encapsulation et la radiothérapie.

Dans un premier temps, le chapitre bibliographique introductif exposera les fondements de la nanoprécipitation et de l'effet ouzo, ainsi que les différentes voies de préparation de capsules colloïdales (i.e. les capsules composés de nanoparticules). Une partie sera également consacrée aux propriétés apportées par les nanoparticules inorganiques.

Le chapitre II sera consacré à l'étude de l'effet ouzo, en particulier de notre système : « eau/THF/BHT ». Nous essaierons de comprendre les caractéristiques du système ainsi que les paramètres l'influençant. Un accent particulier sera mis sur l'influence des ligands présents sur les nanoparticules *via* l'étude de leur diagramme de phase. La fabrication des hybridosomes sera ensuite abordée, avec des nanoparticules de nature et de taille différentes. Nous finirons par une modification du procédé afin de préparer des assemblages d'oxydes de fer et de silice.

Le chapitre III sera axé autour de l'utilisation des hybridosomes pour l'encapsulation de composés hydrophobes par nanoprécipitation. Les performances du système ainsi que les paramètres influençant l'encapsulation seront présentés. Nous étudierons ensuite les propriétés de relargage, à la fois dans un milieu hydrophobe modèle (liposomes) mais aussi *in vitro* (cultures cellulaires) et *in vivo* après injection dans des souris.

Finalement, le chapitre IV sera l'occasion de traiter de l'utilisation des hybridosomes composés d'oxyde de fer et d'or pour l'amélioration de la radiothérapie du glioblastome. Cet axe sera évalué à travers une étude *in vivo* visant à améliorer la survie de souris porteuses de tumeurs cérébrales. En particulier, des résultats de bioluminescence, d'IRM et d'histologie seront exposés. Nous finirons par les perspectives avec des possibilités de synergie entre les propriétés des nanoparticules composant l'hybridosome et la molécule encapsulée.



Introduction :

Chapitre bibliographique

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| I.1. NANOPRECIPITATION & EFFET OUZO..... | 16 |
| I.1.1. LES DIFFERENTS PROCEDES DE NANOPRECIPITATION | 17 |
| I.1.1.1. <i>La nanoprécipitation par émulsion-évaporation</i> | 18 |
| I.1.1.2. <i>La nanoprécipitation par émulsion-diffusion</i> | 19 |
| I.1.1.3. <i>La nanoprécipitation par déplacement de solvant</i> | 20 |
| I.1.2. THEORIE DE LA NANOPRECIPITATION..... | 22 |
| I.1.2.1. <i>Mécanisme</i> | 22 |
| I.1.2.1.1. Sursaturation | 23 |
| I.1.2.1.2. Nucléation | 24 |
| I.1.2.1.3. Croissance et agrégation | 25 |
| I.1.2.2. <i>Stabilité des NP formées</i> | 25 |
| I.1.3. L'EFFET OUZO, UN CAS PARTICULIER DE DEPLACEMENT DE SOLVANT | 27 |
| I.1.3.1. <i>Application de l'effet ouzo à la formation de nanoparticules</i> | 31 |
| I.1.3.2. <i>Autres applications</i> | 33 |
| I.1.3.3. <i>Un effet ouzo inverse ?</i> | 34 |
| I.1.4. PARAMETRES INFLUENÇANT L'ÉLABORATION DE NANOSTRUCTURES PAR NANOPRECIPITATION ET EFFET OUZO..... | 34 |
| I.1.4.1. <i>Importance de l'ajout d'eau et du mélange</i> | 34 |
| I.1.4.1.1. Rapidité du mélange..... | 34 |
| I.1.4.1.2. Rapidité de l'ajout | 36 |
| I.1.4.2. <i>Soluté et solvant</i> | 37 |
| I.1.4.3. <i>Molécules à encapsuler</i> | 41 |
| I.1.4.4. <i>Stabilisation des particules / gouttes et nature du soluté</i> | 42 |
| I.1.4.5. <i>Influence de la température</i> | 45 |
| I.2. CAPSULES FORMEES PAR EFFET OUZO | 46 |
| I.2.1. CAPSULES POLYMERES | 46 |
| I.2.2. UTILISATION DE LA ZONE SFME | 48 |
| I.2.3. CAPSULES HYBRIDES POLYMERE/NANOPARTICULES INORGANIQUES : LES HYBRIDOSOMES® | 55 |
| I.3. AUTRES METHODES DE PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT DES NANOPARTICULES | 62 |
| I.3.1. NANOCAPSULES DERIVEES D'EMULSIONS DE PICKERING | 62 |
| I.3.2. ASSEMBLAGE DE NANOPARTICULES AUTOUR D'UN GABARIT SOLIDE..... | 66 |
| I.3.3. ASSEMBLAGE DE NANOPARTICULES AMPHIPHILES | 69 |
| I.3.3.1. <i>Nanoparticules amphiphiles modifiées par des homopolymères</i> | 70 |
| I.3.3.2. <i>Nanoparticules amphiphiles modifiées par des copolymères à bloc</i> | 71 |
| I.3.3.3. <i>Nanoparticules amphiphiles en présence de copolymères à bloc « libres »</i> | 76 |
| I.3.4. CHARGEMENT DE NANOPARTICULES DANS LA MEMBRANE DE LIPOSOMES OU DE POLYMERSOMES | 78 |
| I.4. APPORT DES CAPSULES DE NANOPARTICULES INORGANIQUES POUR LES APPLICATIONS BIOMEDICALES | 83 |
| I.4.1. IMPORTANCE DE LA TAILLE | 83 |
| I.4.2. TOXICITE DES NP INORGANIQUES..... | 84 |
| I.4.3. APPORT DES NP INORGANIQUES POUR LA THERAPIE ET LE DIAGNOSTIC..... | 85 |
| I.4.3.1. <i>Nanoparticules plasmoniques (Au, Ag, Pt, Cu...)</i> | 86 |
| I.4.3.2. <i>Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (SPION)</i> | 90 |
| I.4.3.3. <i>Nanoparticules semi-conductrices (QD)</i> | 92 |
| I.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 94 |

Dans ce chapitre, nous allons en premier lieu présenter la nanoprécipitation et les différentes méthodes de nanoprécipitation, ainsi que la théorie gouvernant la formation de nanoparticules par nanoprécipitation. Nous aborderons par la suite un cas particulier de nanoprécipitation : l'effet ouzo. Les paramètres à prendre en considération pour maîtriser ce phénomène seront exposés puis nous verrons des exemples de nanoparticules pleines et creuses (nanocapsules) fabriquées par effet ouzo. La présentation de l'élaboration de nanocapsules par effet ouzo nous permettra alors de nous intéresser aux hybridosomes, nanocapsules hybrides polymère/nanoparticules inorganiques développées lors de la thèse précédente (Flavien Sciortino), et qui font l'objet de cette thèse. Dans un second temps, nous présenterons les autres méthodes classiques de préparation de nanocapsules contenant des nanoparticules inorganiques dans leur paroi (les nanocapsules colloïdales). Nous appréhenderons ensuite les techniques se basant sur des émulsions (par exemple émulsions de Pickering), sur un gabarit solide, sur l'auto-association de nanoparticules amphiphiles et sur des polymersomes ou liposomes dont la membrane est chargée en nanoparticules. Nous aborderons finalement les nanoparticules inorganiques pour la théranostique (thérapeutique & diagnostic) ainsi que leurs propriétés pour les applications biomédicales.

I.1. Nanoprécipitation & Effet ouzo

La nanoprécipitation consiste à précipiter des composés hydrophobes sous l'effet d'un changement de la qualité de solvant. Avec l'ajout d'eau, la molécule hydrophobe se retrouve en mauvais solvant et précipite. Cette technique est applicable à un très grand nombre de molécules hydrophobes, par exemple des molécules organiques comme des médicaments, des principes actifs ou encore des polymères. Une partie importante du développement de la nanoprécipitation a d'ailleurs eu lieu avec les nanoparticules (NP) polymères. Cela tient au fait que les polymères sont très polyvalents, qu'ils ont la possibilité d'être naturels, biodégradables ou d'être modifiés chimiquement ou encore qu'ils sont non toxiques.^{1,2} En tant que précurseurs dans le domaine de la nanoprécipitation, Fessi et collaborateurs ont étudié des systèmes très variés mettant en jeu la nanoprécipitation de polymères, huiles, et principes actifs hydrophobes. Le brevet initial déposé en 1989 et les publications suivantes exposent ainsi une très large gamme de solvants et de polymère menant à la formation de nanoparticules (NP), avec déjà la possibilité d'encapsuler des principes actifs.³⁻⁶ Aussi, la nanoprécipitation d'une huile seule peut

être réalisée, par exemple pour la préparation d'une émulsion injectable contenant un principe actif hydrophobe.^{7,8}

La nanoprécipitation apparaît donc être un outil très utile pour la fabrication de NP à partir de composés hydrophobes.

I.1.1. Les différents procédés de nanoprécipitation

Les principales méthodes de nanoprécipitation^a de molécules hydrophobes (polymères, molécules organiques) sont schématisées en Figure 1. 1, sur la base du travail de synthèse de Horn et Rieger.¹⁰ Elles vont être décrites dans les paragraphes suivants.

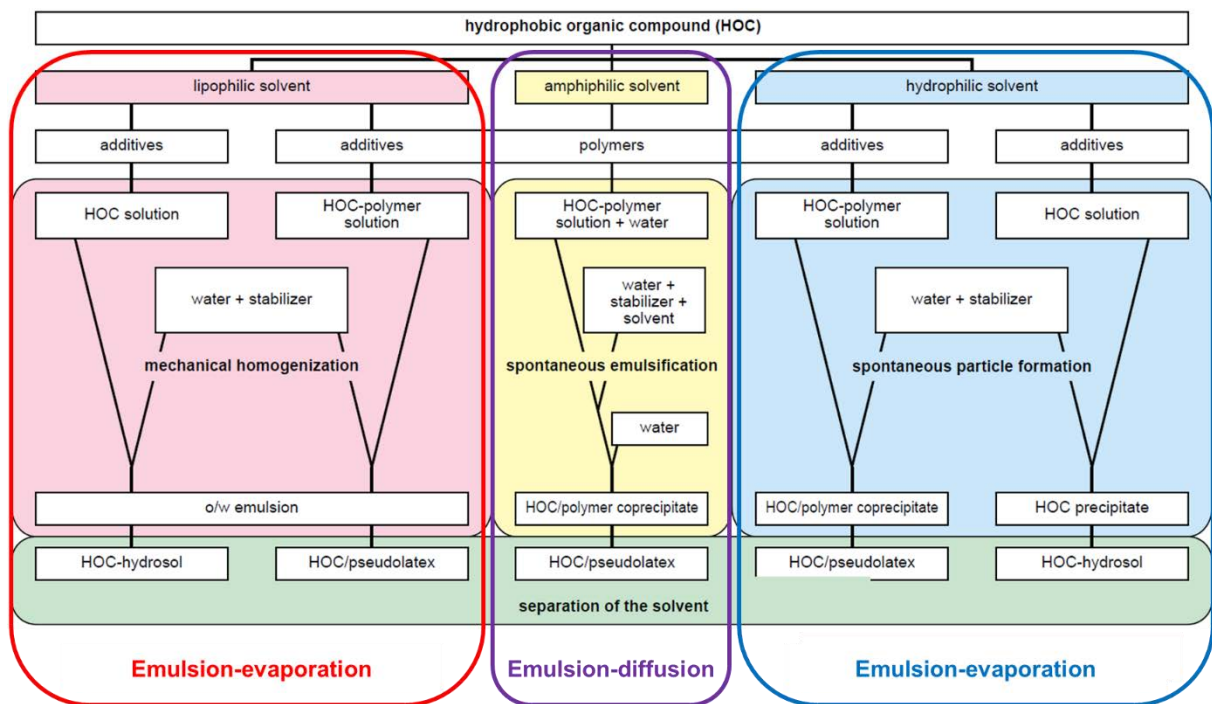


Figure 1. 1 – Méthodes de précipitation et de condensation pour la préparation de nanoparticules organiques (polymères hydrophobes et composés organiques hydrophobes). (adapté de ¹⁰)

^a Les trois techniques principales sont détaillées ici, mais d'autres techniques peuvent être envisagées. Pour plus d'information, se référer aux références ^{1,9-11}.

I.1.1.1. La nanoprécipitation par émulsion-évaporation

Il s'agit de la première méthode permettant la synthèse de NP à partir de polymère préformé et pour la nanoformulation de caroténoïdes, développée il y a environ 40 ans.¹² Elle consiste à dissoudre le polymère et/ou une molécule hydrophobe dans un solvant volatil non miscible à l'eau, par exemple le dichlorométhane ou le chloroforme. Un apport d'énergie intense est nécessaire pour obtenir une émulsion, en général grâce à une homogénéisation à très haute vitesse ou par sonication. Une molécule stabilisante préalablement incorporée dans la phase aqueuse est nécessaire pour maintenir l'émulsion. Une fois l'émulsion obtenue, le solvant est éliminé, le plus souvent par évaporation. L'évaporation permet la préparation de NP de polymère, de molécule hydrophobe ou encore de polymère + molécule hydrophobe. Il est possible d'utiliser cette technique avec des émulsions simples (huile, i.e. solvant, dans eau) ou doubles (eau dans huile dans eau), ces dernières pouvant permettre d'encapsuler des composés hydrophiles. La taille et la distribution en taille des NP obtenues sont dépendantes de la morphologie de l'émulsion initiale (donc de la technique d'homogénéisation) ainsi que de la concentration des composés hydrophobes. La toxicité des solvants est une limitation importante de ce procédé du fait de la difficile élimination totale lors de l'évaporation. Des alternatives avec des solvants plus acceptables ont été développées avec par exemple le cyclohexane, notamment pour les applications pharmaceutiques.¹⁰ La procédure générale de cette technique est résumée sur la **Figure 1. 2.**

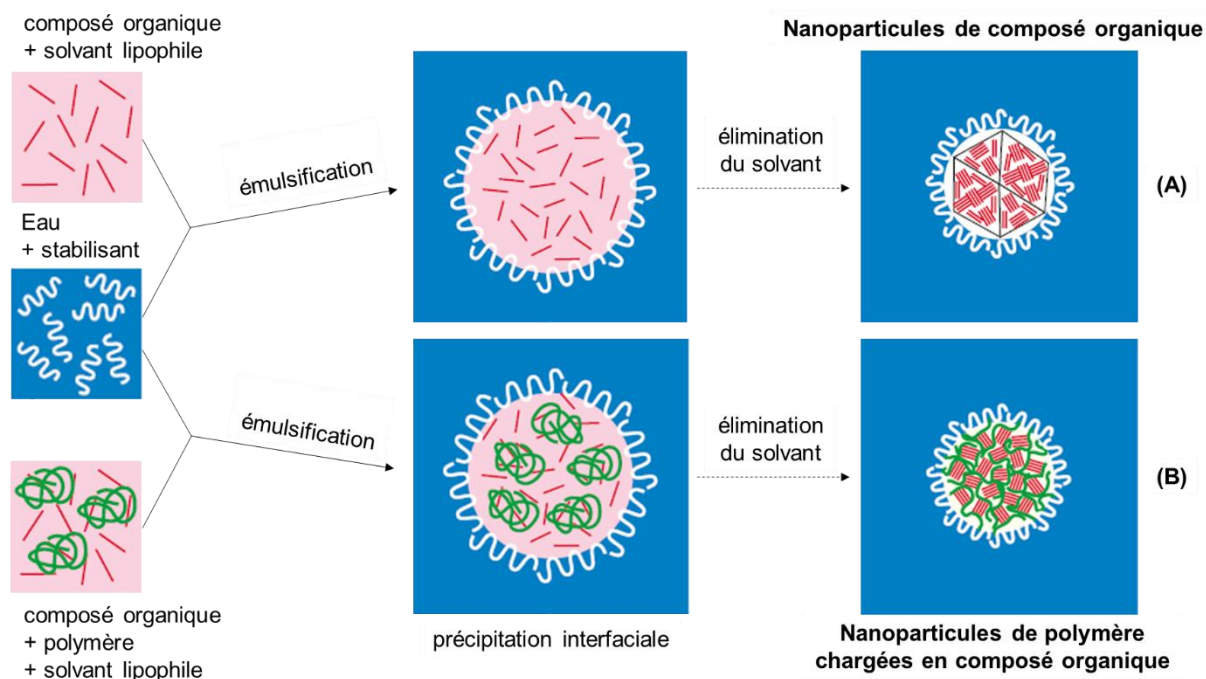


Figure 1. 2 – Principe de préparation de nanoparticules de molécule organique (A) ou de polymère hydrophobe + molécule organique (possible avec polymère seul) (B) par le procédé d’émulsion – évaporation. (adapté de ¹⁰)

I.1.1.2. La nanopréciipitation par émulsion-diffusion

Cette technique se différencie de la précédente par l’utilisation d’un solvant amphiphile qui a une certaine affinité avec l’eau, par exemple le carbonate de propylène, l’alcool benzylique ou l’acétate d’éthyle. La phase aqueuse est saturée en solvant et la phase organique est quant à elle saturée en eau. Une agitation intense est nécessaire pour émulsionner les deux phases, mais sans nécessité d’un apport en énergie très élevé comme pour la technique précédente. L’émulsion ainsi produite voit les phases dispersées et dispersantes en équilibre du fait de la saturation préalable de chaque phase. Cet équilibre est alors perturbé par l’ajout d’eau et le solvant contenu dans les gouttelettes de l’émulsion diffuse vers la phase continue, processus au cours duquel la limite de solubilité du composé hydrophobe est atteinte. Ainsi, la précipitation a lieu et les NP se forment. De manière très intéressante, chaque goutte de l’émulsion donne naissance à plusieurs nanoparticules,¹³ certainement *via* des fluctuations locales à l’interface huile/eau à cause de la diffusion du solvant. La procédure générale de cette technique est résumée en **Figure 1. 3**.

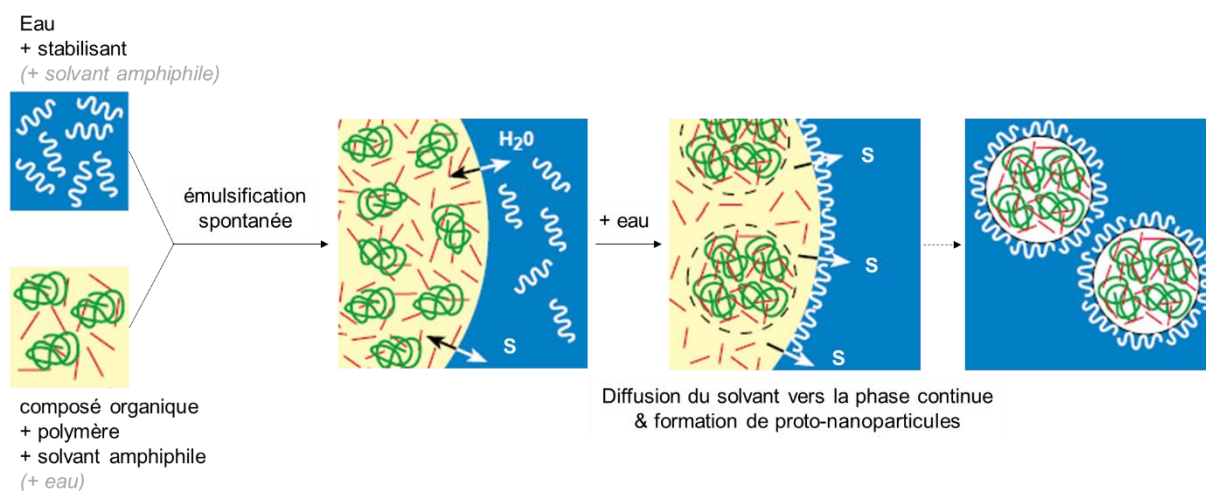


Figure 1. 3 – Principe de préparation de nanoparticules polymères chargées en molécules organiques (possible avec polymère seul) par le procédé d’émulsion – diffusion. Abréviation : solvant (S). (adapté de ¹⁰)

I.1.1.3. La nanoprécipitation par déplacement de solvant

C’est la méthode dont cette thèse fait l’objet. Cette technique a été publiée par Fessi *et al.* en 1989¹⁴ et brevetée dans les années suivantes.^{3,15} Le déplacement de solvant consiste à utiliser un mélange de deux solvants miscibles (en général un solvant polaire et l’eau). Les solvants couramment utilisés sont l’acétone, l’éthanol, le THF ainsi que l’isopropanol. Le solvant contient le composé hydrophobe à nanoprécipiter. Lorsque la phase organique est mélangée rapidement à une grande quantité d’eau, la sursaturation est rapidement atteinte et des NP de composé hydrophobe se forment spontanément sous l’effet du changement de qualité de solvant (cela sera détaillé plus loin). Par la suite, le solvant organique peut être éliminé, par exemple par évaporation. La **Figure 1. 4** présente un schéma général de la procédure de déplacement de solvant. Outre le terme de « déplacement de solvant » on peut trouver celui de « remplacement de solvant ».

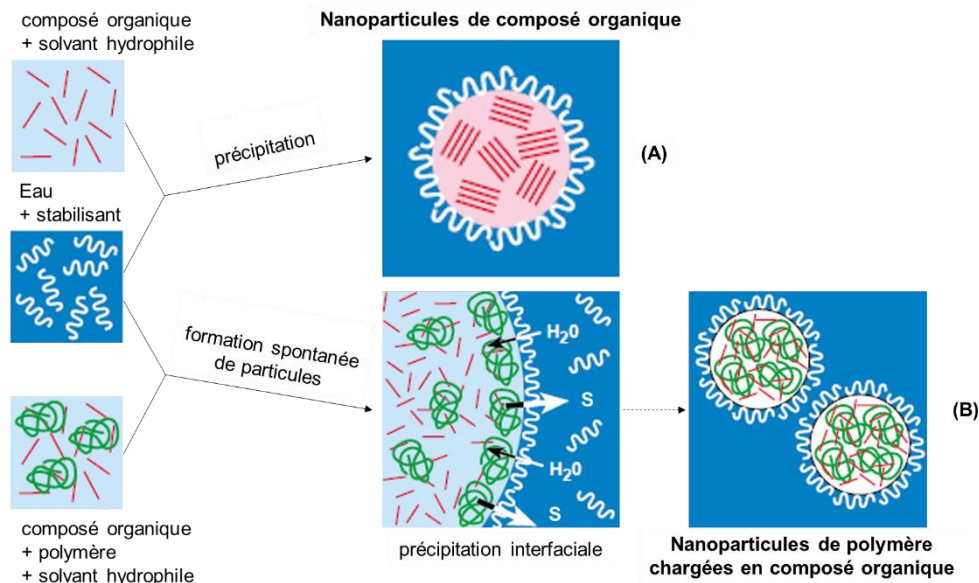


Figure 1. 4 – Schéma du procédé de préparation de nanoparticules polymériques par nanopréciptation. Abréviations : solvant (S). (adapté de ¹⁰)

Il s'agit d'une technique qui est utilisée depuis longtemps et qui permet d'élaborer des nanoparticules, avec la possibilité d'encapsuler un principe actif à l'intérieur. Dès les premiers travaux de Fessi *et al.*, des principes actifs sont encapsulés dans des nanoparticules polymères (par exemple Taxol, dexaméthasone, Vitamine K, progestérone, indométhacine). Cela place cette méthode de préparation de NP comme outil de choix dans le domaine pharmaceutique ou encore agroalimentaire, domaines nécessitant souvent l'encapsulation puis la délivrance de principe actif. De manière intéressante, des NP creuses, c'est-à-dire des nanocapsules, peuvent être obtenues en nanopréciptant de l'huile avec du polymère autour.^{10,16}

Il s'agit de l'une des techniques les plus simples et les plus rapides pour l'obtention de NP polymères et organiques. Les avantages et inconvénients de cette technique sont présentés dans le **Tableau 1. 1** ci-contre :¹⁶⁻¹⁹

Tableau 1. 1 – Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de la technique de nanoprécipitation par déplacement de solvant.

| Avantages | Inconvénients |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> > Méthode très simple et rapide > Grande variété de solvants utilisables en fonction du composé hydrophobe (notamment des solvants peu toxiques comme le DMSO, l'acétone, l'éthanol) > Adaptable à de très nombreux composés hydrophobes (polymères, composés organiques, huiles...) > Pas d'émulsion préalable nécessaire > Équipement simple | <ul style="list-style-type: none"> > Souvent, un tensioactif est utilisé pour stabiliser les nanoparticules formées. (pas tout le temps nécessaire, la surface des nanoparticules pouvant être stabilisée par répulsions électrostatiques grâce à l'adsorption d'ions ou aux chaînes polymériques (cf. suite du chapitre)). > Faibles quantités d'huile > Les caractéristiques des nanoparticules obtenues sont variables en fonction des conditions opératoires et la reproductibilité n'est pas évidente. La vitesse d'ajout d'eau dans la phase organique a notamment une très grande influence. > Nécessité d'utiliser deux solvants miscibles (l'eau et un solvant polaire miscible classiquement) |

I.1.2. Théorie de la nanoprécipitation

I.1.2.1. Mécanisme

Le mécanisme de la nanoprécipitation se base sur la réduction de la qualité du solvant ou le composé hydrophobe à nanoprécipiter. Nous discutons ici de la variation de qualité de solvant induite par l'ajout d'un non-solvant, mais celle-ci peut s'effectuer par d'autres méthodes comme une modification du pH, de la concentration en sel¹⁶ ou encore de la température²⁰. Tel que décrit par Martínez Rivas *et al.*¹⁶ et Joye et McClements,²¹ le mécanisme de nanoprécipitation peut se découper en 4 étapes : **(1) la sursaturation ; (2) la nucléation ; (3) la condensation ; (4) la coagulation / agrégation**. Ce mécanisme est schématisé en **Figure 1. 5**.

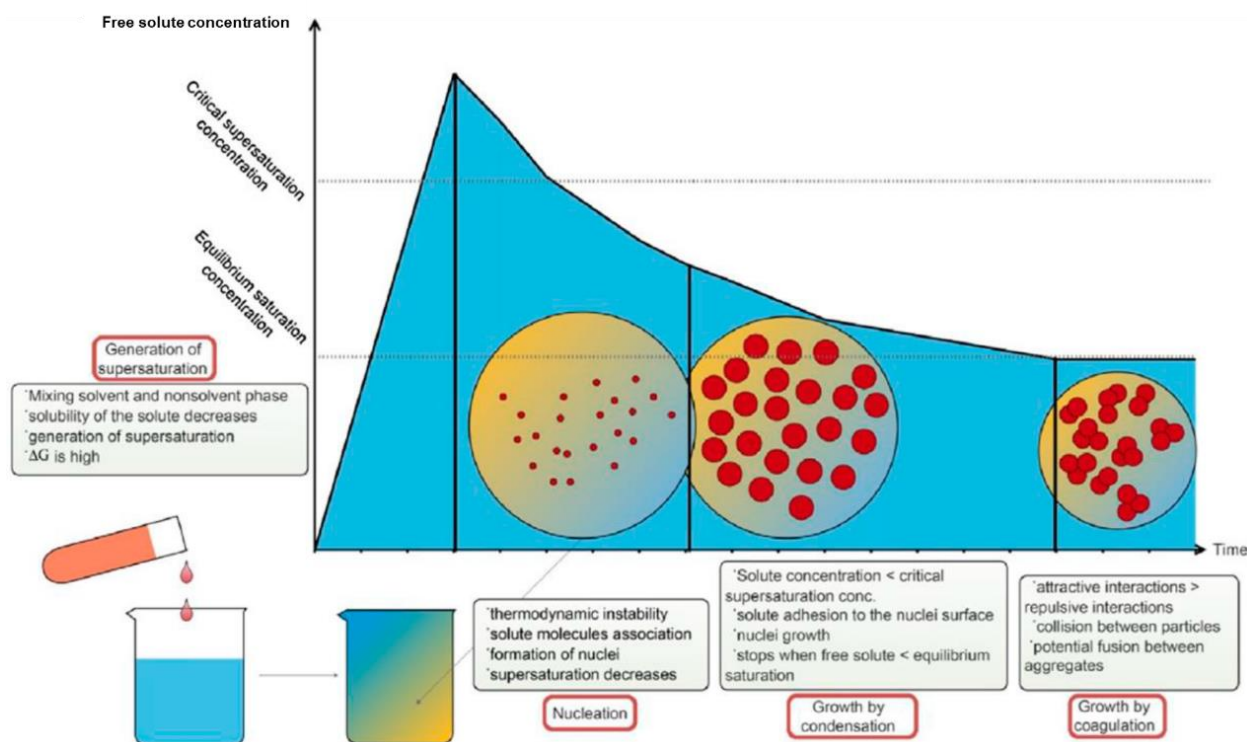


Figure 1.5 – Représentation schématique de la nanopréciptation par échange de solvant.¹⁶

1.1.2.1.1. Sursaturation

La première étape consiste à établir la sursaturation du soluté. Lors de l'ajout d'une quantité importante de mauvais solvant dans la solution organique contenant le soluté hydrophobe, la solubilité de celui-ci décroît soudainement. Ainsi, la quantité de soluté dissoute est supérieure à la concentration de saturation d'équilibre et le système est dans un état de **sursaturation**. Il est possible d'exprimer un ratio de sursaturation (S_r) de la manière suivante :

$S_r = \frac{C_s}{C_\infty}$ où C_s est la concentration de soluté et C_∞ est la concentration à l'équilibre dans le mélange. (La sursaturation est quant à elle égale à $C_s - C_\infty$.)

Ce ratio augmente fortement lors du changement de solvant étant donné que C_∞ diminue. À titre d'exemple, il est possible d'étudier et de prévoir l'amplitude de la sursaturation d'un système donné en réalisant sa courbe de sursaturation, dont un exemple est donné en **Figure 1.6**.²⁰ Cette figure représente le ratio de sursaturation S_r d'un composé très hydrophobe (Boscalid) en fonction de la proportion de solvant dans le mélange « eau/solvant », et ce pour deux concentrations (12 et 230 mg/mL). Quand la concentration d'eau augmente, C_∞ diminue, et donc la sursaturation augmente. Cette sursaturation n'augmente pas indéfiniment et dépend de la compétition en C_s et C_∞ . Ainsi, un maximum est atteint avec l'ajout d'eau puis la sursaturation diminue du fait de la

baisse très importante de C_s sous l'effet de l'importante dilution. Ainsi, la sursaturation d'un composé augmente avec sa concentration.

Si la concentration de la molécule hydrophobe est relativement faible et que la proportion de solvant est suffisamment élevée, il se peut même qu'il n'y ait pas de sursaturation. L'utilisation d'un soluté hydrophobe différent (à concentration de soluté identique) induit un comportement du système qui n'est pas le même, avec une sursaturation maximale qui n'est pas au même ratio solvant/anti-solvant suivant le soluté, ni de la même amplitude en fonction de la solubilité du composé hydrophobe.²⁰ À noter que des stratégies de modulation de l'hydrophobicité du soluté peuvent permettre de contourner les limitations imposées par la solubilité dans l'eau.²⁰

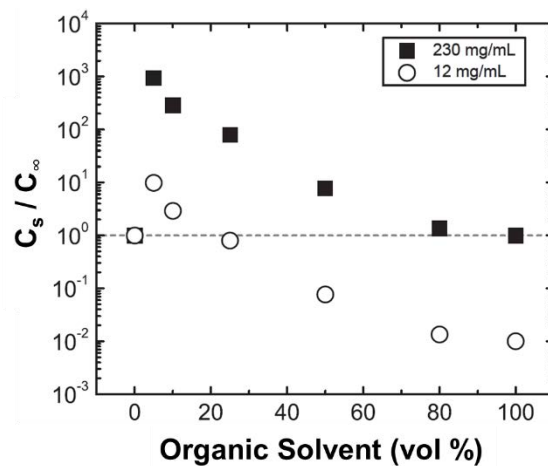


Figure 1. 6 – Ratio de sursaturation (C_s / C_∞) du Boscalid (BASF) en fonction de la proportion de solvant dans le mélange eau / solvant, pour différentes concentrations de Boscalid dans le mélange : 230 mg/mL (■) et 12 mg/mL (○).²⁰

I.1.2.1.2. Nucléation

Lorsque C_s atteint la valeur critique C_{crit} , la barrière d'énergie pour la formation des nuclei est dépassée et la **nucléation** a lieu. De nombreux nuclei se forment jusqu'à ce que la concentration en soluté soit inférieure à C_{crit} . Ces nuclei grossissent jusqu'à ce que C_s soit égale à C_∞ . L'importance de la sursaturation influe directement sur les NP obtenues. Lorsque la sursaturation augmente, à la fois les taux de nucléation et de croissance augmentent. Puis lorsque la sursaturation est très importante, un régime particulier se distingue où le taux de nucléation est très important comparé à la croissance : c'est le domaine de nucléation homogène.²⁰ De très nombreux nuclei sont formés puis subissent une croissance homogène. **Une sursaturation très importante est donc cruciale pour l'obtention d'une dispersion colloïdale peu polydisperse.**

I.1.2.1.3. Croissance et agrégation

Les nuclei poursuivent leur croissance *via* deux voies menant à la formation de nano-objets plus gros : la condensation et la coagulation (ou agrégation). Dans le cas de la **condensation**, la croissance se fait par incorporation de molécules individuelles dans la NP en formation. Cette condensation n'a lieu que quand $C_s > C_\infty$ (il faut un surplus de molécules dans le milieu par rapport à l'équilibre) et s'arrête si cette condition n'est plus remplie (avec le temps). Dans le même temps, les nanoparticules nouvellement formées subissent un phénomène de croissance par **coagulation**. En effet, les particules s'attirent et entrent en collision.^{16,20} Ces collisions dépendent bien entendu du nombre de particules présentes dans le milieu, de la taille et de l'agitation (par exemple thermique) entre autres. Ces deux voies de vieillissement sont résumées en **Figure 1. 7**.¹⁹

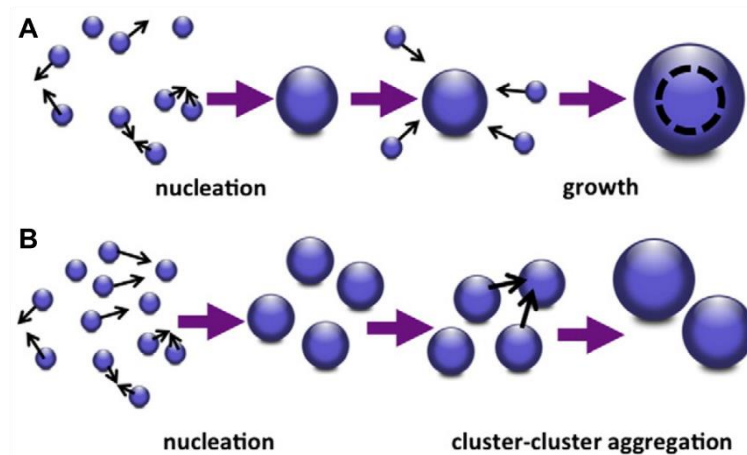


Figure 1. 7 – Représentation schématique des mécanismes de (A) nucléation croissance (condensation) et (B) agrégation cluster-cluster (coagulation).¹⁹

I.1.2.2. Stabilité des NP formées

Afin de stabiliser les NP vis-à-vis de l'agrégation, il est possible d'utiliser des agents stabilisants, par exemple des tensioactifs qui s'adsorbent sur les NP et permettent une répulsion électrostatique entre elles. On peut aussi mettre en place une répulsion stérique *via* l'adsorption de polymères. Les polymères peuvent eux aussi conférer des charges aux nanoparticules et ils ont l'avantage de présenter une concentration micellaire critique plus faible que les tensioactifs (ce qui permet d'en utiliser moins).²⁰ Qui plus est, ces polymères sont plus fortement adsorbés que d'autres espèces et offrent donc une meilleure protection de l'interface vis-à-vis de la coalescence. Les polymères trouvent par ailleurs leur intérêt pour ce qui est de la stabilisation des nanoparticules en milieu biologique. Par exemple, l'influence de la présence d'une couronne de

PEG autour des nano-objets est utilisée depuis longtemps, notamment dans le cas des liposomes dits «furtifs» qui sont moins bien reconnus par le corps humain (opsonisation).

À plus long terme, les particules peuvent subir le mûrissement d'Ostwald, phénomène au cours duquel les particules les plus grosses grossissent par transfert de masse à travers la solution depuis les plus petites particules.²⁰ Ce phénomène de fuite du contenu des plus petites particules s'explique par la différence de pression de Laplace entre l'intérieur et l'extérieur des gouttelettes d'émulsion par exemple. Cette différence de pression est inversement proportionnelle au rayon des gouttelettes et donc d'autant plus importante que celles-ci sont petites. L'influence du mûrissement d'Ostwald sur les NP inorganiques ou encore les émulsions a été étudiée largement, mais moins sur les particules organiques. Liu *et al.* ont ainsi étudié l'évolution de la taille de NP de β -carotène préparées par nanoprécipitation rapide dans un micro-mélangeur (nanoprécipitation flash).²² Ces particules présentent la particularité d'être stabilisées par un copolymère à bloc poly(styrène)-*bloc*-poly(éthylène oxyde) (PS-*b*-PEO) qui limite l'agrégation tout en permettant toujours le passage de petites molécules. Cela permet ainsi d'étudier spécifiquement le mûrissement d'Ostwald. La solubilité d'une particule de rayon R (C_R) dans le milieu est égale à $C_\infty \cdot e^{(A/R)}$. Les molécules dissoutes diffusent depuis les plus petites particules et alimentent alors les grosses particules qui grossissent en conséquence. Cet effet est particulièrement important pour les particules nanométriques, alors qu'il n'est pas observé pour les particules micrométriques. Le mûrissement d'Ostwald est ainsi dépendant (i) de la taille des nanoparticules, (ii) de la solubilité du composé nanoprécipité dans le milieu et (iii) de la polydispersité de la suspension colloïdale,¹⁹ comme vérifié expérimentalement et théoriquement en **Figure 1. 8**.²² Dans tous les cas, l'augmentation de taille est plus importante au début puis ralentit en raison de la disparition des plus petites particules et de la redistribution de la masse vers les NP en fonction de leur taille. Par ailleurs, en faisant varier le ratio « THF/eau », la solubilité du β -carotène dans le milieu est modulée, passant de 0,04 mM pour un ratio 6:120 (\diamond) à 1,67 mM pour un ratio 30:120 (\blacktriangle). Plus la solubilité dans le milieu est importante, plus le taux de croissance par mûrissement d'Ostwald est important, comme prédit. À noter que plus la distribution de taille est étroite (moins de différence de taille entre les particules), plus la dispersion est stable.

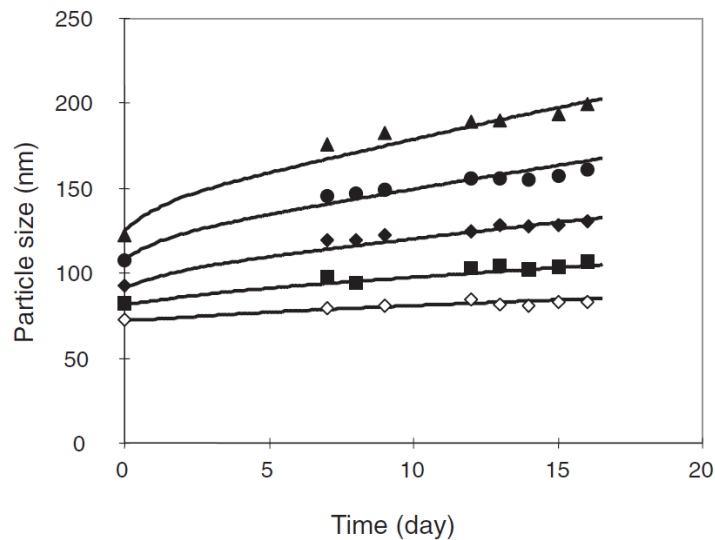


Figure 1. 8 – Évolution expérimentale de la taille moyenne d’une suspension colloïdale de nanoparticules de β -carotène stabilisées par PS-*b*-PEO, pour différents ratio THF/eau ((mL/min) / (mL/min)) dans les canaux du micro mélangeur) : 30:120 (▲), 24:120 (●), 18:120 (◆), 12:120 (■) et 6:120 (◇). Les données simulées sont indiquées par les courbes pour chaque ratio THF/eau. *La différence de taille au départ est due à des sursaturations différentes lors de la formation des nanoparticules.²²

1.1.3. L’effet ouzo, un cas particulier de déplacement de solvant

Bien que certainement utilisé depuis de nombreuses années, l’effet ouzo est un concept relativement récent. Même s’il est « naturellement » présent dans de nombreuses boissons alcoolisées, comme l’ouzo, le Pastis^{23–27} ou encore le limoncello,²⁸ la compréhension de ce phénomène a été progressive sur les vingt dernières années *via* l’étude d’une très grande variété de systèmes, avec un réel intérêt de la communauté scientifique (et pour la nanoprécipitation plus largement) (**Figure 1. 9 A**). Ce phénomène d’« émulsion spontanée » est nommé d’après la boisson alcoolisée grecque ouzo, dans laquelle des gouttelettes riches en alcool et en huile essentielle se forment spontanément dès l’ajout d’eau. L’ajout d’eau dans ces boissons se traduit donc visuellement par l’apparition d’un trouble (**Figure 1. 9 A B**).

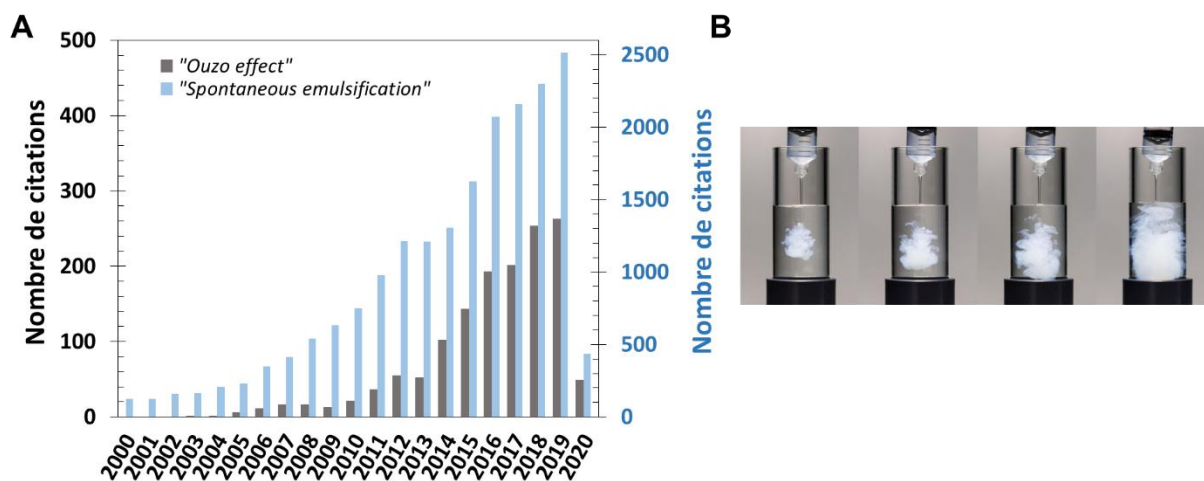


Figure 1. 9 – (A) Nouvelles citations d’articles répondant aux mots-clés « ouzo effect » et « spontaneous emulsification » sur les 20 dernières années (base de donnée Web Of Science ; consultée le 20/03/2020) (B) Photographies à différents temps lors d’ajout d’eau à de l’ouzo, avec l’apparition du trouble suite à la nucléation des gouttelettes.²⁹

La présence d’inhomogénéités de l’ordre de la centaine de nanomètres dans des systèmes de « eau/solvant » (avec ou sans soluté hydrophobe) est l’objet de questionnements scientifiques depuis longtemps. En particulier, dans une série d’études,^{30–32} Sedlák montre que ces inhomogénéités submicrométriques mais plus grosses que l’échelle moléculaire existent dans une très grande variété de systèmes soluté-solvant, notamment des solutés non ioniques (tels des solvants) dans l’eau. Ces inhomogénéités sont identifiées comme étant des objets réels (non des fluctuations) et discrets (non des phases bicontinues), avec pour certains systèmes des durées de vie paraissant infinies. De telles structures se retrouvent dans de très nombreux mélanges d’eau et de composés miscibles non ioniques, entre autres le tert-butanol (tertiary butyl alcohol – TBA), le tétrahydrofurane (THF), le dioxane, l’acétone ou encore l’éthanol.^{30–43} L’origine de ces inhomogénéités a longtemps été questionnée. Cet effet pourrait tout d’abord provenir de liaisons hydrogènes entre le soluté et le solvant.³² Par ailleurs, l’hypothèse tenace des nanobulles^{44,45} a par la suite été réfutée.^{36,37}

Le travail de Häbich *et al.* met en particulier l’accent sur le fait que les inhomogénéités obtenues en mélangeant de l’eau à des solvants organiques sont en réalité le résultat d’« impuretés » présentes dans le solvant.³⁶ Le caractère hydrophobe de ces « impuretés » joue un rôle majeur. Par exemple, pour le système « eau/TBA/oxyde de propylène (PO) », il faut une certaine quantité de PO pour que les inhomogénéités se forment, à cause de la solubilité relativement importante du PO dans l’eau (jusqu’à 40 %w).^{38,39} En revanche, seules des traces

suffisent quand le PO est remplacé par du cyclohexane (complètement immiscible avec l'eau).^{40,41} Un comportement similaire est observé dans le système « eau/THF/hydroxytoluène butylé (BHT) » où des traces de BHT mènent à l'obtention de structures d'environ 100 nm avec un cœur riche en BHT.³⁴ Le PO ainsi que le BHT sont présents comme « impuretés » dans le TBA et le THF, respectivement. Cet exemple du système « eau/THF/BHT » est très important pour nous puisque c'est précisément sur ce système que les travaux de cette thèse ont été réalisés.

En 2003, Vitale et Katz identifient pour la première fois l'effet ouzo, tout du moins sous cette appellation.⁴⁶ Les auteurs étudient le système « eau/éthanol/divinylbenzène (DVB) » sous un nouvel angle, visant à explorer une large gamme de concentrations en soluté hydrophobe (DVB). Le diagramme de phase est représenté sous la forme d'un pseudo-diagramme binaire avec les fractions massiques de solvant et de DVB en ordonnée et en abscisse, respectivement. L'axe des abscisses est dilaté en échelle logarithmique, ce qui permet de distinguer plus aisément les variations de comportement du système pour de très faibles quantités de DVB (Figure 1. 10). Ainsi, l'étude de ce système permet de mettre à jour une zone où une émulsion spontanée métastable se forme : **le domaine ouzo** (en gris sur la figure). Celui-ci se situe entre deux frontières caractéristiques du système : d'une part la binodale (i.e. la limite de solubilité du DVB dans le système eau / éthanol) et d'autre part la spinodale (i.e. la limite de stabilité thermodynamique du système). Nous reviendrons sur ces limites caractéristiques dans le chapitre II.

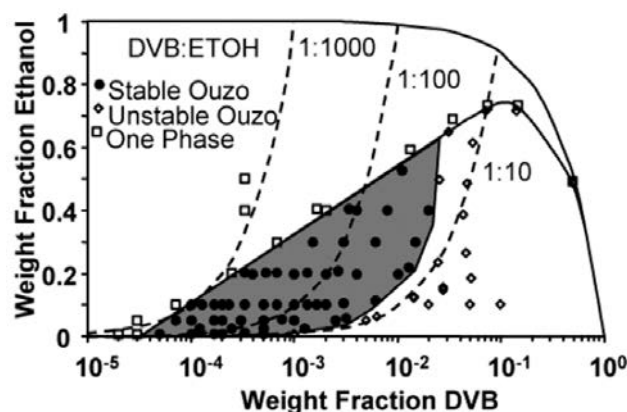


Figure 1. 10 – Représentation novatrice introduite par Vitale et Katz, avec représentation du système sur un diagramme pseudo-binaire et visualisation de la région ouzo (zone grise) par utilisation d'un axe logarithmique (ici, le système « eau/éthanol/divinylbenzène (DVB) »).⁴⁶

L'article de Vitale et Katz pose ainsi les bases des caractéristiques du système ouzo, qui n'est autre qu'un cas particulier de nanoprecipitation dans un domaine de composition étroit.

La formation de l'émulsion spontanée dans la région ouzo est dirigée par la sursaturation du composé hydrophobe suivant l'ajout d'une grande quantité d'eau, et ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieur. Il n'y a pas besoin d'utiliser des tensioactifs, les gouttelettes riches en solvant (sujet à débats) et en composé hydrophobe étant stabilisées par effets électrostatiques dus à l'adsorption d'ions (cf. partie I.1.4.4). La taille est suffisamment grande pour ralentir le mûrissement d'Ostwald (aussi limité par la faible polydispersité) et suffisamment petite pour limiter le crémage, d'autant plus que la densité de la phase dispersé est proche de celle de l'eau dans le cas d'une émulsion d'huile.⁴⁷

L'effet ouzo est donc séduisant pour élaborer des nanostructures facilement et sans apport d'énergie, notamment pour des applications où les tensioactifs ne sont pas souhaitables (par exemple dans le domaine pharmaceutique), avec un très bon contrôle de taille et de la polydispersité. Les avantages et inconvénients de cette méthode sont résumés dans le **Tableau 1. 2**.

Tableau 1. 2 – Résumé des avantages et inconvénients de l'effet ouzo pour la préparation de nanoparticules

| Avantages | Inconvénients |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> > Émulsion spontanée relativement stable > Pas de tensioactifs ou de stabilisants > Pas de grand apport d'énergie extérieur (il faut toutefois bien mélanger pour obtenir des tailles homogènes) > Pas d'émulsion préalable nécessaire > Matériel simple, peu onéreux et implémentation en flux continu possible > Nanoparticules de petite taille et faible polydispersité > Procédé universel, pour peu que le bon couple soluté hydrophobe / solvant miscible à l'eau soit trouvé | <ul style="list-style-type: none"> > Tout particulièrement, la très faible quantité de soluté hydrophobe qui se retrouve dans la particule finale. Ce phénomène n'a lieu qu'à très faible concentration initiale en soluté et avec une très faible concentration de phase dispersée. Il faut donc envisager des stratégies de concentration des dispersions colloïdales pour obtenir des concentrations élevées en principe actif. > Utilisation de solvants > Limité aux solutés hydrophobes / huiles (dans le cas de l'effet Ouzo classique dans l'eau) |

I.1.3.1. Application de l'effet ouzo à la formation de nanoparticules

Au niveau des systèmes ouzo clairement établis, nous pouvons citer les exemples récemment développés par Ganachaud *et al.* Par exemple, le système « PMMA/acétone ou THF/eau » est décrit, toujours *via* l'étude du diagramme de phase (cf. **Figure 1. 11**).⁴⁸ On retrouve les mêmes informations que celles décrites précédemment, à savoir la courbe binodale correspondant à la solubilité du polymère dans le milieu (lignes pleines) et la limite du domaine ouzo (lignes pointillées), au-delà de laquelle la population n'est plus homogène. Les différentes zones du diagramme sont utilisées pour fabriquer des NP par ajout très rapide de la phase organique dans la phase aqueuse. Seule la région ouzo permet d'obtenir des NP homogènes. La connaissance du domaine de composition correspondant à la zone ouzo permet donc de réaliser des NP avec les meilleures propriétés possibles en termes de polydispersité. L'effet ouzo est par ailleurs utilisé pour l'encapsulation de nanotubes de carbone dans une matrice PMMA pour la génération de films nanocomposites.^{49,50} Cette approche diagramme de phase n'est pas nouvelle^{4,51} mais devient la stratégie de base pour guider les explorations.

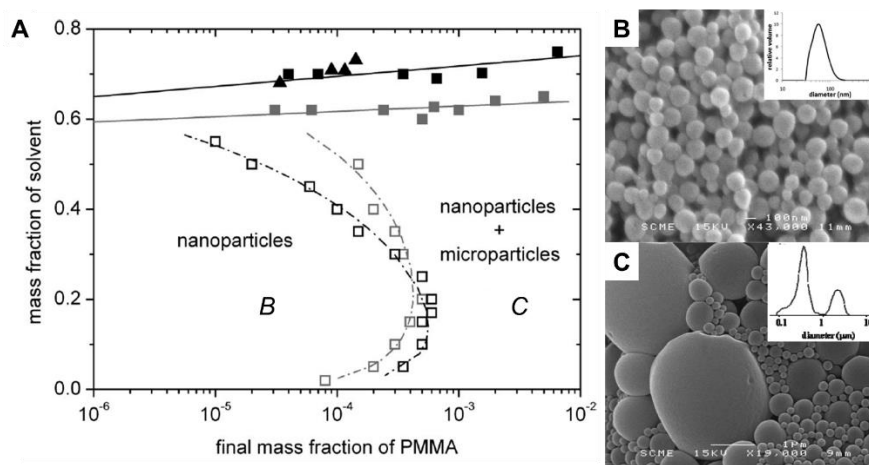


Figure 1. 11 – Diagramme de phase typique de systèmes présentant un domaine ouzo : PMMA / acétone (noir) ou THF (gris) / eau. Tous les points correspondent aux points expérimentaux. Les lignes pleines correspondent à la courbe binodale et les lignes pointillées à la limite de la région ouzo. Les images correspondent aux nanoparticules obtenues (B) dans le domaine ouzo ou (C) au-delà. (adapté de ⁴⁸)

Il a été démontré que des NP de polysaccharides hydrophobisés (estérifiés) peuvent être formées par nanoprécipitation d'un système « polysaccharides/acétone ou THF » dans l'eau.⁵² Les NP peuvent devenir fluorescentes par greffage ou encapsulation d'un fluorophore hydrophobe. Les polysaccharides sont intéressants en particulier en nanotechnologie, étant omniprésents naturellement et facilement modifiables chimiquement.

Il est aussi possible d'utiliser directement des solutés solides autres que des polymères. Par exemple, Couvreur *et al.* ont utilisé des terpénoïdes pour la synthèse de NP (se référer notamment à la revue¹⁹). Il s'agit toutefois d'un exemple assez complexe. Les auteurs ont développé une méthode se basant sur la liaison covalente d'un terpène (squalène) avec une molécule active, pour former une « pro-drogue » très hydrophobe qui peut être nanoprécipitée. Le squalène est un précurseur de la synthèse du cholestérol chez l'Homme. C'est ce qui est appelé la « squalénoylation ». Cette approche pro-drogue a aussi été appliquée pour coupler du squalène et de la gemcitabine,^{53,54} du paclitaxel⁵⁵ ou encore de la pénicilline G,⁵⁶ avec des biodisponibilités améliorées, parfois une activité thérapeutique améliorée et une diminution de la toxicité. Ces terpènes-drogues nanoprécipitent sans utilisation de tensioactifs et les NP obtenues ont des tailles de l'ordre de la centaine de nanomètres (tout à fait adaptées pour des injections intraveineuses à visée anti-cancer par exemple).

Ces NP de composé actif « pur » sont intéressantes dans des domaines variés, notamment biomédical. En imagerie médicale, la nanoprécipitation a été utilisée pour préparer des NP organiques fluorescentes (les FON).⁵⁷ Les NP obtenues en nanoprécipitant une solution organique de fluorophore dans l'acétone sont amorphes et stabilisées par des tensioactifs, lesquels sont réticulés pour renforcer la « coque » de la NP. À ce point, la fluorescence est bien plus importante qu'en solution dans le solvant : il s'agit d'un fluorophore avec une fluorescence induite par l'agrégation (agregation-induced emission – AIE). *Via* une étape de lyophilisation, le fluorophore confiné cristallise et gagne encore en intensité de fluorescence. Ces FONs ont été utilisées pour imager des tumeurs et cellules *in vivo*. On peut également citer le cas de NP de caroténoïdes comme le β -carotène¹⁰ ou de particules d'indométacine.³ Les NP de β -carotène enveloppées de gélatine présentent par exemple une couleur variable en fonction de leur taille et se révèlent utiles en tant que pigments. Pour une application de délivrance pour la nutrition animale, ces NP permettent un taux sanguin de β -carotène (pro-vitamine A) amélioré par rapport à des cristallites seuls.

À noter que des particules de silice peuvent également être obtenues par effet ouzo.⁵⁸⁻⁶⁰ L'effet ouzo a ici l'intérêt de permettre la préparation des particules de silice et l'encapsulation de molécules actives simultanément et en une seule étape. Ceci est particulièrement intéressant étant donné que les méthodes classiques consistent à fabriquer les NP de silice (SiNP) puis à les charger en drogue, ce qui nécessite des étapes supplémentaires. Il faut toutefois étudier les

molécules encapsulées car elle peuvent modifier le domaine ouzo et le devenir des nanoparticules formées (agrégation par exemple).⁵⁸ La méthode est adaptable pour modifier la surface des SiNP et envisager un greffage de molécules actives.⁵⁹ Par ailleurs, des SiNP mésoporeuses sans tensioactif organique ont été obtenues en deux étapes, ce qui n'a jamais été réussi en synthèse classique, typiquement avec la méthode Stöber.⁶¹ L'effet ouzo permet de synthétiser des SiNP sphériques avec un faible degré de condensation de la silice, puis la redispersion dans l'eau et un traitement léger ammoniacal mènent à l'obtention de mésopores, à cause de la fuite ou de la dissolution des espèces n'ayant pas réagi dans le réseau de silice peu polymérisé. Les SiNP obtenues sont contrôlées en termes de taille (diamètre entre 100 et 230 nm) et de mésoporosité (taille et volume des pores, aire surfacique).

I.1.3.2. Autres applications

L'effet ouzo est également étudié par d'autres groupes de recherche, notamment en ce qui concerne la physique des surfaces, en particulier les gouttes aux interfaces solide/liquide^{29,62} sous l'influence du changement de qualité de solvant.⁶³ Un des sujets d'étude est la fabrication de nanolentilles sur substrats hydrophobes, par dépôt et polymérisation de nano-gouttes de précurseur hydrophobe⁶⁴ ou encore par dissolution du substrat,⁶⁵ par exemple pour des applications optiques. Des modifications de surface visant à la formation de rugosités ont été reportées, ce qui peut s'avérer utile pour former des compartiments pour la croissance cellulaire, des réactions chimiques et la nucléation de cristaux photoniques.⁶⁶ L'évaporation de gouttes ouzo a été étudiée du point de vue des différentes phases d'évaporation et de la morphologie des gouttes (bien que l'évaporation soit un phénomène lent et n'induisant pas de sursaturation rapide).⁶⁷⁻⁷⁰ À noter également l'utilisation de l'évaporation d'une goutte ouzo contenant des NP de TiO₂ pour la formation de supraparticules poreuses (de l'ordre de la centaine de µm) dont la porosité est guidée par les gouttelettes d'huile.⁷¹ La nucléation et le dépôt de nanogouttes sur substrat ont par ailleurs été étudiés dans des cellules en flux.⁷²⁻⁷⁴ Le dépôt de gouttelettes hydrophobes a été principalement rapporté mais, de manière plus originale, il est aussi possible d'utiliser un système ouzo inverse pour générer des nanoparticules d'eau sur un substrat hydrophile.^{66,75}

I.1.3.3. Un effet ouzo inverse ?

L'effet ouzo inverse existe également, c'est-à-dire une émulsion de gouttelettes d'eau dans une phase continue organique.³ Cet effet a été peu reporté et seulement évoqué, par exemple des gouttelettes très riches en eau spontanément dispersées dans la zone riche en DVB (dans le système « DVB/solvant/eau »).⁴⁶ Cela implique que l'huile ou le soluté hydrophobe est en très grande quantité et que l'eau devient très minoritaire. Cela ne semble donc pas indiqué si l'huile est onéreuse. Toutefois, ce phénomène inverse peut permettre de nanoprécipiter (et éventuellement d'encapsuler) des composés hydrophiles, alors que l'effet ouzo classique ne s'applique qu'aux composés hydrophobes. C'est donc un moyen d'accéder à des émulsions inverses de manière contrôlée. Les NP obtenues par effet ouzo inverse sont dispersables dans le milieu organique (l'huile par exemple) mais pas dans l'eau, à moins qu'il y ait eu réticulation du polymère. En milieu aqueux, l'éventuel contenu hydrophile encapsulé sera relargué. Cet effet ouzo inverse est aussi démontré avec la formation de gouttelettes d'eau sur surface hydrophile (système riche en cyclohexane avec l'éthanol comme solvant).⁷⁵

I.1.4. Paramètres influençant l'élaboration de nanostructures par nanoprécipitation et effet ouzo

La détérioration de la qualité de solvant pour initier la nanoprécipitation doit être la plus rapide possible. Les conditions opératoires doivent permettre un haut taux de nucléation, qui est fortement dépendant d'une sursaturation importante et d'un taux de croissance faible.^{9,19} Il faut pour cela contrôler la rapidité de l'ajout d'eau et l'agitation pour aboutir à des conditions homogènes.

I.1.4.1. Importance de l'ajout d'eau et du mélange

I.1.4.1.1. Rapidité du mélange

L'influence de la rapidité du mélange des phases aqueuse et organique a été investiguée par plusieurs équipes. Cette rapidité de mélange impacte directement sur les propriétés des NP formées, que ce soit en termes de morphologie, polydispersité ou bien encore cristallinité.

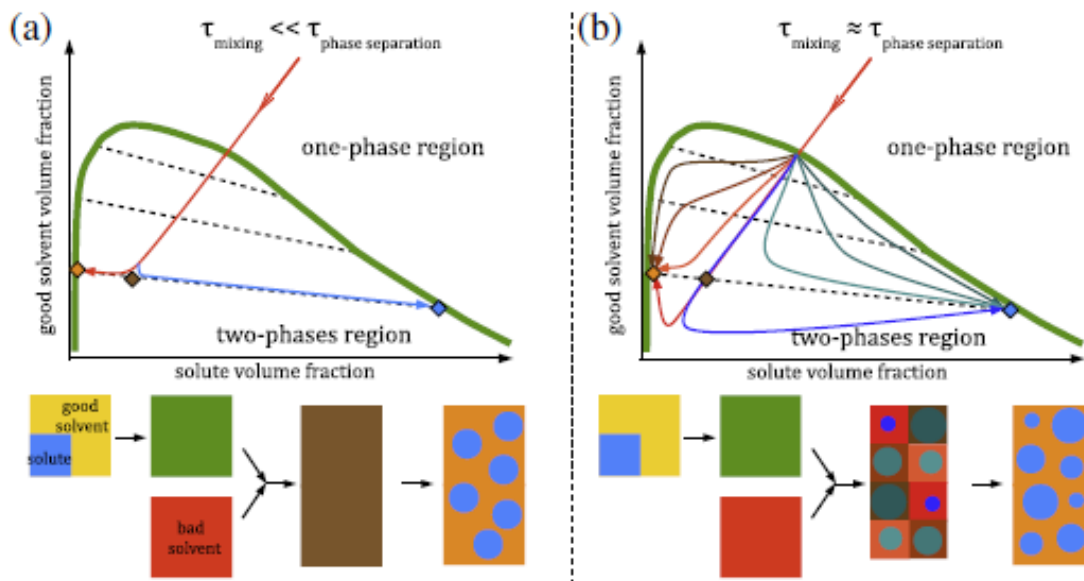


Figure 1. 12 – Diagrammes de phase d’un système ternaire soluté (bleu) / bon solvant (jaune) / mauvais solvant (rouge). Lors de l’ajout de mauvais solvant au mélange bon solvant / soluté, deux situations peuvent être rencontrées en fonction de la rapidité du mélange : **(a)** mélange rapide ; **(b)** mélange et séparation de phase simultanés, où la séparation a lieu à différents points de composition variée en fonction du temps.⁷⁶

Botet *et al.* ont étudié les phénomènes entrant en jeu dans l’établissement de systèmes monodisperses par effet ouzo d’un point de vue assez général.⁷⁶ L’importance du mélange est clairement abordée. Deux cas peuvent être distingués :

(a) quand le mélange est plus rapide que la séparation de phase (**Figure 1. 12 a**)

(b) quand le mélange et la séparation de phase ont lieu à la même échelle de temps (**Figure 1. 12 b**).

Quand le mélange est plus rapide que la séparation de phase, les concentrations locales sont les mêmes pour tous les nuclei formés, ce qui mène au final à un mélange homogène. Dans le cas d’un mélange et d’une séparation de phase simultanée, le système est hétérogène étant donné que de multiples conditions locales coexistent. La coalescence par mûrissement d’Ostwald est d’autant favorisée que les gouttelettes ou particules primaires sont de taille disparates. Ainsi, le système en (b) tend à former des objets plus gros. Bien que le mélange des différents constituants soit clairement un atout pour la fabrication de dispersions colloïdales homogènes, la majorité des systèmes rapportés dans la littérature fait pourtant appel à un mélange lent correspondant à la situation (b), typiquement une addition goutte à goutte.⁷⁶

I.1.4.1.2. Rapidité de l'ajout

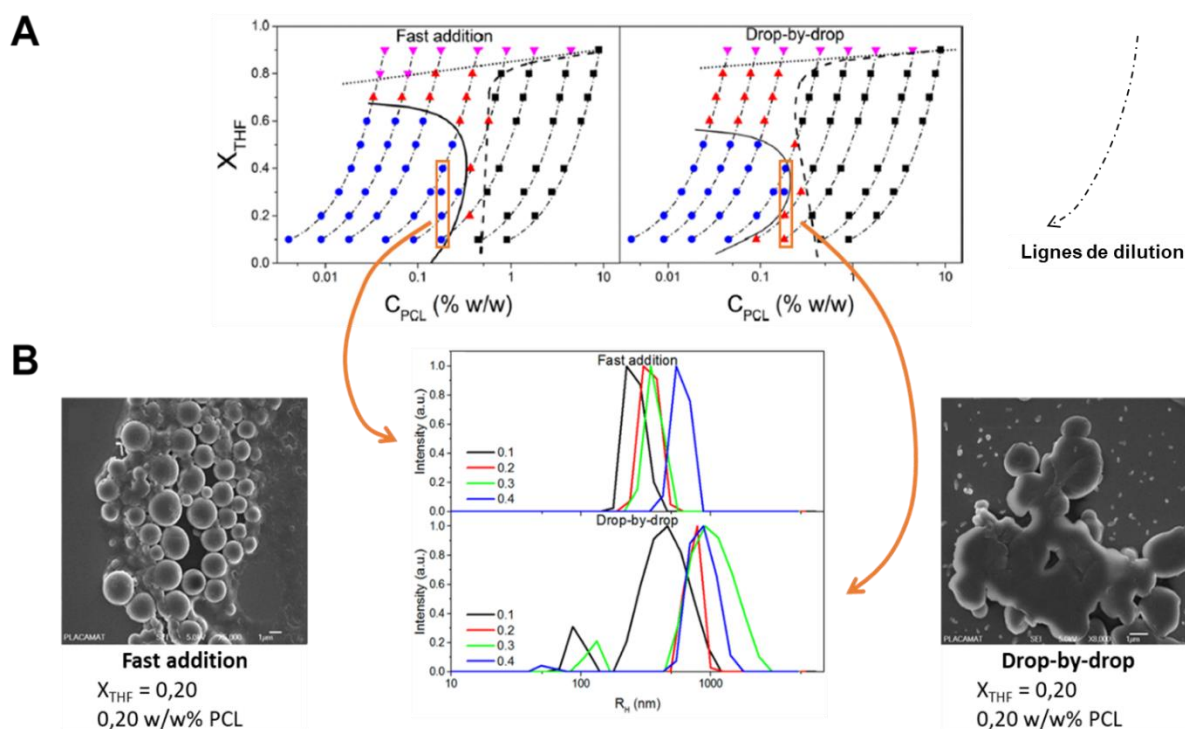


Figure 1. 13 – **(A)** Diagramme de phase du système Eau / THF / PCL 45 kDa réalisé par addition rapide (gauche) ou par ajout goutte à goutte (droite) en suivant les lignes de dilution pointillées de haut en bas. Les différentes zones sont visuellement déterminées : une zone limpide où le polymère est soluble (triangles roses), une zone de démixtion macroscopique (carrés noirs), une zone d'aspect laiteux (triangles rouges) où coexistent nano- et micro-particules, et finalement la zone ouzo bleutée avec des nanoparticules (ronds bleus). Les limites caractéristiques du système sont la binodale (ligne pointillée), la spinodale (ligne avec tirets) et la limite ouzo (ligne pleine). **(B)** Distribution de taille par DLS des nanoparticules obtenues à 10, 20, 30 ou 40 %vol de THF et 0,2 %w PCL. Les distributions de tailles correspondent aux points encadrés en orange dans la figure A. Les images de microscopie électronique à balayage (SEM) correspondent aux nanoparticules obtenues à 20 %vol THF et 0,20 %w de PCL par ajout rapide d'eau (gauche) ou goutte à goutte (droite). [adapté de ⁷⁷].

À titre d'exemple, Pucci *et al.* ont étudié l'influence de la rapidité de l'addition sur la nanopréciipitation de PCL (polycaprolactone), en l'absence de tensioactif (les NP sont stabilisées par les groupements –OH en bout de chaînes de polymère).⁷⁷ Deux méthodes de déplacement de solvant ont été mises en œuvre dans un mélange « eau/THF » : (i) une addition rapide d'eau à la solution organique (Fast addition – FA ; injection manuelle d'un seul coup à la seringue) ou (ii) un ajout goutte à goutte (drop-by-drop – DD ; 0,3 mL/min). Des différences significatives sont visibles suivant le procédé utilisé. Ainsi, il apparaît très clairement que la zone ouzo est plus étroite dans le cas d'un ajout d'eau goutte-à-goutte (**Figure 1. 13 A**). L'ajout rapide d'eau permet d'arriver directement et rapidement dans une zone où la quantité de THF est très faible. La sursaturation du polymère très importante s'établit ainsi quasi instantanément, ce qui mène à une nucléation

intense de très nombreux nuclei, aboutissant *in fine* à la formation de NP. Ces NP sont monodisperses et de petite taille (typiquement de l'ordre de 200 nm de diamètre hydrodynamique) (**Figure 1. 13 B**). Dans le cas d'un ajout goutte à goutte, il faut dans cette étude environ 10 s pour que la concentration finale soit atteinte. Le temps de mélange est bien plus élevé que le temps nécessaire à la précipitation du polymère (nucléation + agrégation/croissance). La zone « ouzo instable » (c'est-à-dire la zone comprise entre la binodale et la spinodale mais qui n'est pas dans la zone ouzo) est donc traversée au cours de l'ajout d'eau, ce qui laisse le temps pour la nucléation de particules plus grosses, par exemple des microparticules. Celles-ci peuvent ensuite croître au fur et à mesure que la fraction de THF diminue et que la sursaturation du polymère augmente. C'est ainsi qu'un ajout progressif d'eau se traduit par une population finale hétérogène contrairement à une addition rapide. À noter que cette zone ouzo instable entre la zone monophasique et la zone ouzo n'a pas été observée lors de nos manipulations sur le système « eau/THF/BHT » (cf. Chapitre II).

La nanoprecipitation flash, qui permet à la fois une addition et un mélange rapides, a été notamment étudiée par l'équipe de Prud'homme.^{78,79} Des micro-mélangeurs en flux permettent d'atteindre des taux de mélange très rapides par rapport à des mélangeurs statiques ou une agitation mécanique²⁰ et des temps de mélange extrêmement faibles (jusqu'à environ 5 ms), inférieurs au temps d'agrégation.⁸⁰ Ces micro-mélangeurs permettent ainsi d'obtenir des NP très homogènes puisque la nucléation se fait très rapidement. Sans micro-mélangeur, c'est-à-dire dans la majorité des cas, le temps de mélange n'est pas si faible et est supérieur au temps d'agrégation. Cela se traduit par une taille de nanoparticules dépendante de la concentration massique de polymère (relation en puissance 1/3).^{19,81} L'avantage est par ailleurs la production de particules en flux bien contrôlée, avec une montée en échelle facile.

I.1.4.2. Soluté et solvant

Le soluté hydrophobe joue bien sûr un rôle important dans l'établissement de l'émulsion et de ses caractéristiques. Dès les premières investigations, un effort a été fait pour comprendre et pouvoir prédire les propriétés finales de l'émulsion, notamment l'influence de la quantité de soluté hydrophobe sur la taille des gouttelettes.⁴⁶ En premier lieu on voit que, pour un ratio eau/solvant donné, la taille augmente avec la concentration de soluté hydrophobe (**Figure 1. 14 A**). À concentration de soluté identique, la taille augmente si la fraction de solvant organique augmente, du fait de la diminution de la sursaturation (la croissance est donc favorisée par

rapport à la nucléation).⁷⁷ Pour rationaliser, cette taille moyenne a été retracée en fonction du rapport de la concentration de soluté en excès par rapport à la concentration de solvant. La concentration de soluté en excès est en fait la sursaturation (comme définie précédemment). Il apparaît alors que **la taille des gouttelettes est principalement fonction du rapport « concentration de soluté en excès/concentration de solvant » (Figure 1. 14 B).**^{46,82,83} La taille finale obtenue ne dépend pas de la quantité finale de solvant comme on pourrait penser mais bien du rapport entre la quantité de soluté « en trop » qui ne peut être solubilisé, et la quantité de solvant. À une concentration en éthanol fixe, augmenter la concentration de soluté revient à augmenter ce ratio « excès de soluté/solvant » et donc à augmenter la taille.

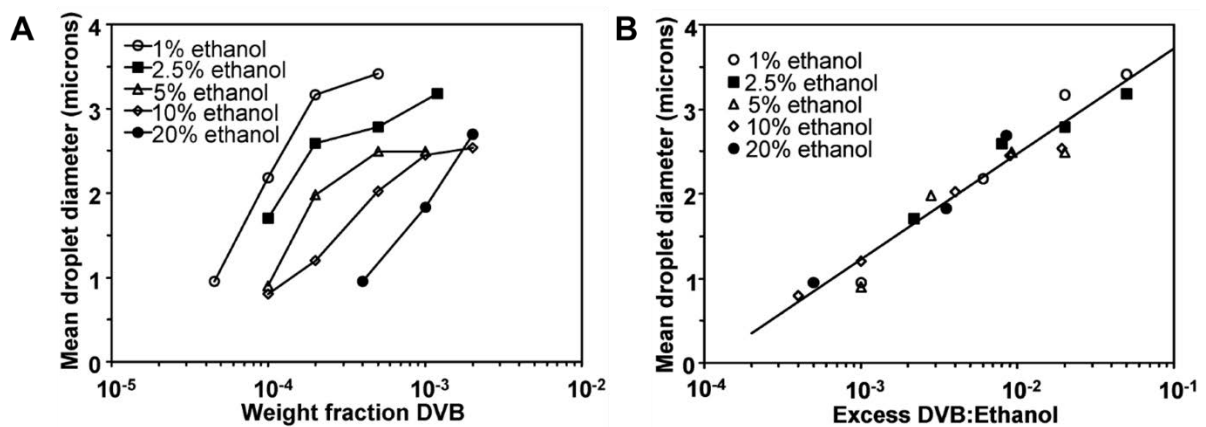


Figure 1. 14 – Évolution de la taille de l'émulsion ouzo obtenue dans le système eau / éthanol / DVB en fonction de la fraction volumique de DVB (A) et du rapport excès de DVB / éthanol (B).⁴⁶

La taille des NP polymères obtenues par nanopréciipitation évolue proportionnellement à la concentration de polymère à la puissance 1/3.^{48,52,82,83} Cela est compatible avec un mécanisme de nucléation agrégation, avec la formation de très petits nuclei de soluté qui s'agrègent ensuite. Le nombre de nuclei augmente linéairement avec la concentration de soluté initiale, tout comme le volume des particules agrégées. Ce mécanisme d'agrégation de clusters limitée par la diffusion (DLCA) mène à des NP monodisperses avec des tailles finales variant en fonction d'une loi puissance par rapport à la concentration de soluté, comme prédit par le modèle cinétique de Smoluchowski.

Il reste peu de solvant à la fin du procédé de fabrication des NP. Toutefois, son élimination complète est très difficile, étant donné que les NP obtenues, notamment polymères, sont gonflées de solvant.⁷⁷ Le solvant agit comme plastifiant du polymère.⁸⁴ Le solvant résiduel peut ainsi modifier les propriétés des NP et altérer leur bio-activité par exemple.⁸⁵ Il est ainsi important de

réussir à éliminer le plus de solvant à l'issue du procédé de préparation. Pour cela la zone ouzo est parfaitement indiquée, puisque le ratio solvant/eau y est particulièrement faible.

Le choix du solvant n'est pas sans incidence sur la taille des nanoparticules obtenues. On peut par exemple noter que les NP obtenues par nanoprécipitation sont d'autant plus petites que les solvants ont de l'affinité pour le non solvant, en l'occurrence l'eau. Ainsi, les solvants peuvent être classés en fonction du paramètre d'interaction solvant – eau (χ_{S-W}), défini comme suit :

$$\chi_{S-W} = \frac{V_S}{RT} (\delta_S - \delta_W)^2$$

où V_S est le volume molaire du solvant, R est la constante universelle des gaz et T est la température. δ_S et δ_W sont les paramètres de solubilité totaux du solvant et de l'eau, respectivement. Le paramètre de solubilité total représente les interactions entre espèces et est souvent utilisé justement pour évaluer la solubilité de deux composés (plus leurs δ sont proches plus ils sont solubles). Il peut être divisé en plusieurs composantes représentant les forces de dispersion (δ_d), la composante polaire (δ_p) et les liaisons hydrogènes (δ_h).⁶

On note que plus χ_{S-W} est petit, c'est-à-dire plus l'affinité du solvant pour l'eau est grande, plus les NP obtenues sont petites (**Figure 1. 15 A**) (à quantité de solvant identique bien entendu).^{6,82} Cela s'explique par une diffusion du solvant dans l'eau plus efficace et donc une nucléation plus homogène menant à des particules plus fines. Le paramètre d'interaction est donc tout à fait utile pour la sélection du bon couple solvant – non solvant, pour obtenir des NP de taille contrôlée par nanoprécipitation. Cette approche est également valable pour des mélanges de solvants où le paramètre d'interaction du mélange avec l'eau peut être considéré. Cette corrélation de l'affinité entre le solvant et le non solvant et la taille des NP se vérifie par ailleurs sur de multiples autres couples solvant – non solvant, l'eau n'étant pas forcément le non solvant.⁸⁶

Le choix du solvant peut décaler considérablement le domaine ouzo, vers les plus grandes fractions de polymère quand l'affinité du solvant pour le non solvant est importante, comme montré dans cet exemple sur le système « eau/solvant/PLGA », avec comme solvant le THF, le DMSO ou l'acétone (**Figure 1. 15 B**).^{82,87} Cela implique un ajustement de la quantité de polymère de manière importante pour retrouver des NP de caractéristiques semblables au niveau de la taille.

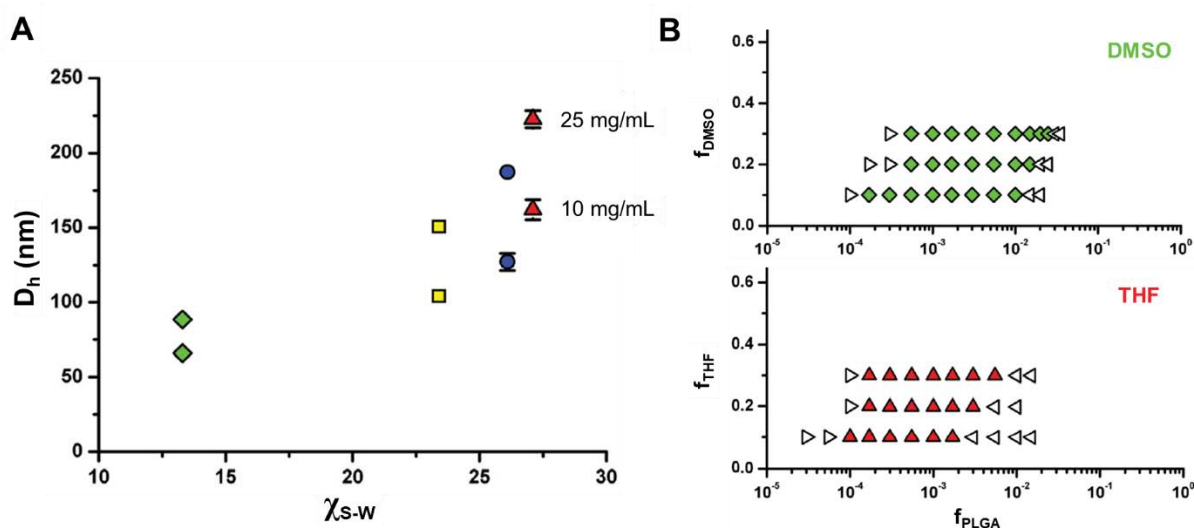


Figure 1. 15 – (A) Influence du paramètre d’interaction solvant – eau sur la taille des nanoparticules obtenues par effet ouzo avec différents solvants (DMSO (◊), acétone (■), 1,4-dioxane (●) ou THF (▲)) pour 10 ou 25 mg/mL de PLGA. Le ratio solvant : eau est fixé à 1 : 6. (B) Diagrammes de phases expérimentaux des systèmes « eau/solvant/PLGA » avec le DMSO ou le THF comme solvant (l’eau contient 0,1 w% de poloxamère). Les zones caractéristiques sont la région monophasique (▷) et diphasique (<) qui entourent le domaine ouzo (◊ et ▲). (adapté de ⁸²)

Au-delà de l’affinité du solvant avec l’eau, il faut par ailleurs faire attention à celle du solvant avec le soluté hydrophobe. Dans le cas du système « eau/solvant/DVB (huile) », des gouttelettes plus grosses sont par exemple obtenues dans le cas de l’utilisation d’acétonitrile à la place d’éthanol ou de DMSO.⁴⁶ Comparativement aux deux autres solvants, l’acétonitrile a pourtant un coefficient de diffusion dans l’eau supérieur et une viscosité plus faible. On pourrait donc s’attendre à une diffusion de l’acétonitrile dans l’eau plus rapide menant à une sursaturation plus homogène, et donc à des gouttelettes plus petites. Or, les auteurs pointent du doigt le coefficient de partage entre l’huile (DVB) et l’eau. En effet, alors que le DMSO et l’éthanol préfèrent grandement l’eau à l’huile (coefficients de partage eau/huile de 6,9 et 6,8 pour le DMSO et l’éthanol, respectivement), l’acétonitrile se partage équitablement entre les deux (coefficient de partage eau/huile de 1,0). L’affinité de l’acétonitrile est ainsi quasi identique entre la phase dispersée et la phase dispersante, ce qui se traduit par plus d’eau dans les gouttes, et donc des gouttes plus grosses.

I.1.4.3. Molécules à encapsuler

L'effet ouzo peut bien entendu être utilisé pour l'encapsulation de composés hydrophobes. C'est un des objets de cette thèse (cf. Chapitre III). Le composé hydrophobe à encapsuler peut être seul et induire lui-même l'effet ouzo. Une autre configuration est de garder le composé induisant initialement l'effet ouzo, par exemple une huile, et de rajouter la molécule que l'on veut encapsuler, et qui nanoprécipite avec de l'huile, c'est-à-dire dans la capsule. L'ajout d'une molécule à encapsuler peut donc potentiellement modifier le diagramme de phase de nanoprécipitation, ainsi que les objets obtenus.

L'ajout d'une molécule à encapsuler peut par exemple modifier la localisation du domaine ouzo dans le diagramme de phase. Beck-Broichsitter *et al.* ont par exemple étudié le système « eau/acétone/poly(vinyl sulfonate-co-vinyl alcohol)-*graft*-poly(D,L-lactide-co-glycolide) (P(VS-VA)-*g*-PLGA) », en présence ou non d'une molécule hydrophile thérapeutique modèle, le salbutamol.⁸³ Il s'agit d'un exemple très particulier n'ayant pas un caractère général. La plupart du temps, l'encapsulation par effet ouzo s'applique aux molécules hydrophobes, précédemment incorporées dans le solvant. Ici la molécule hydrophile est dans la phase aqueuse, le polymère étant lui dans l'acétone. Une autre particularité de ce système est que le polymère et le salbutamol sont chargés respectivement négativement et positivement. Étant donné leurs charges opposées, le polymère et le salbutamol peuvent ainsi se complexer, ceci ayant pour effet d'augmenter la solubilité dans l'eau et de décaler le domaine ouzo vers les plus grandes quantités de polymère (pour une quantité donnée de solvant) (**Figure 1. 16 A**). On retrouve bien ce qui a été mentionné précédemment au niveau de la taille : en présence du polymère seul, la taille des nanoparticules obtenues suit une loi puissance en fonction de la quantité de polymère dans la solution avec une pente de 1/3 (**Figure 1. 16 B**, ligne bleue). Cette évolution suivant une loi puissance est conservée en présence de salbutamol (**Figure 1. 16 B**, ligne orange). L'influence de la présence de molécules supplémentaires dans le système est donc à prendre en considération et à caractériser systématiquement. À noter aussi que la présence d'un contenu encapsulé amphiphile peut modifier le mécanisme (nucléation et croissance vs nucléation et agrégation) en raison des interactions électrostatiques, hydrophobes et de π -stacking.⁵⁸

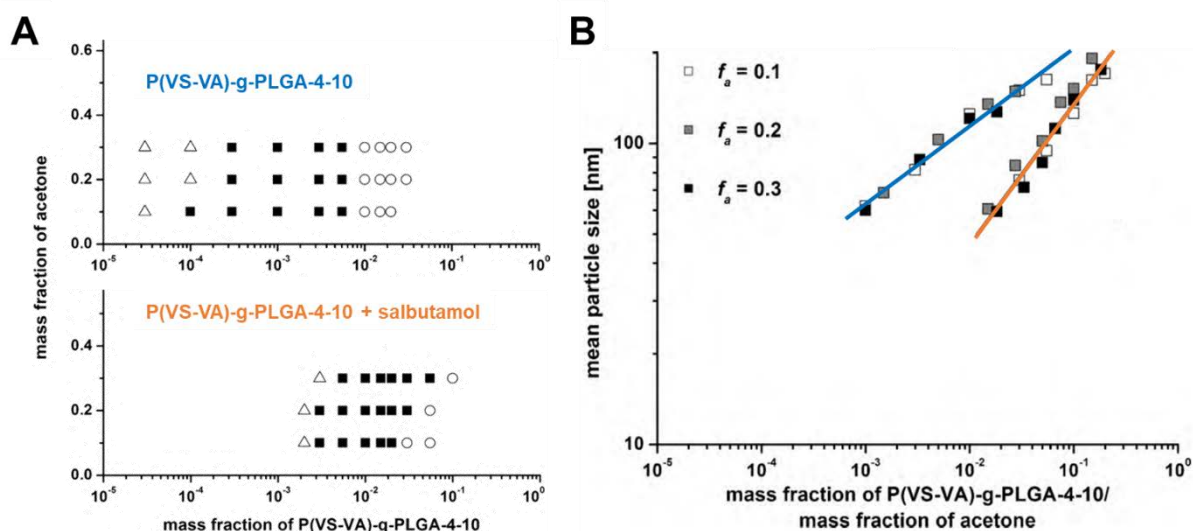


Figure 1.16 – (A) Diagramme de phase des systèmes eau / acétone / P(VS-VA)-g-PLGA-4-10 sans (haut) ou avec (bas) 5 %w salbutamol. Les zones caractéristiques sont la zone visuellement monophasique (Δ), le domaine ouzo (\blacksquare), et la zone instable avec formation de précipités (\circ). **(B)** Représentation log-log de l'évolution de la taille des particules en fonction du rapport des fractions massiques de polymère sur celle d'acétone, sans (bleu) ou avec salbutamol (orange). Pour chaque type de particules (avec ou sans salbutamol), plusieurs fractions de solvant ont été testées (0,1, 0,2 et 0,3). Les régressions linéaires des valeurs expérimentales sont représentées par les droites, sans (bleu) ou avec salbutamol (orange). (adapté de ⁸³)

I.1.4.4. Stabilisation des particules / gouttes et nature du soluté

Bien souvent, la stabilité des colloïdes est apportée par des molécules spécifiques qui diminuent l'énergie interfaciale : les tensioactifs. La présence de tensioactifs n'est pas forcément nécessaire dans le cas de la nanoprécipitation et de l'effet ouzo (même s'il y a beaucoup d'exemples en présence de tensioactif).

La formation et le devenir des NP dans le cas de la nanoprécipitation s'expliquent par un phénomène de nucléation – agrégation limité par la diffusion (DLCA). Dans le cas de l'étude de Lannibois *et al.*, en présence de tensioactifs non ioniques, l'agrégation s'arrête lorsque la surface est saturée en tensioactifs, comme empoisonnée.⁸⁴ Les charges se repoussent alors et l'agrégation s'arrête. Mais même en l'absence de tensioactifs, les ions présents dans l'environnement (comme les OH^-) s'adsorbent à la surface d'où la charge négative qui permet de stopper la coalescence.⁸⁸ Plus la quantité d'ions présente est importante, plus la coalescence est stoppée tôt. En conséquence, la taille est plus petite, la polydispersité plus faible et la stabilité de l'émulsion améliorée.⁸⁹ De plus, les phénomènes de charges aux interfaces hydrophobes dans l'eau sont extrêmement sensibles. Ainsi, des traces d'acides gras sur lesquelles les OH^- s'adsorbent peuvent expliquer les charges négatives en surface des gouttes d'hexadécane.⁹⁰ Dans le cas de

l'hexadécane purifié, l'adsorption des ions n'est plus aussi importante, donc la charge négative en surface également. Cela montre que les ions ne s'adsorbent donc pas directement sur l'interface hydrophobe mais plutôt sur des acides gras présents à l'état de traces dans l'huile. De manière intrigante, la nanoprécipitation de polymères solides donne des particules dont la taille n'est pas influencée par la présence et la quantité de tensioactif.⁴⁷ En revanche, dans le cas des huiles, la présence de tensioactif mène à des gouttes plus petites.⁸⁴ Pour comprendre ce phénomène, du polymère (PMMA ou PS) a été nanoprécipité par effet ouzo, en présence ou non de tensioactif.⁹¹ Pour ce qui est des particules polymères, la taille est toujours la même qu'il y ait du tensioactif ou non, ce qui est attribué à l'adsorption très rapide des ions à la surface du polymère. En revanche pour l'huile, des gouttes plus grandes sont obtenues sans tensioactif, c'est-à-dire que le tensioactif s'adsorbe maintenant plus vite que les ions à la surface de la gouttelette d'huile (les gouttes étaient micrométriques dans l'étude de Vitale et Katz⁴⁶). La différence de taille entre les gouttes d'huile et les NP polymériques obtenues par effet ouzo est donc expliquée par l'adsorption, et donc l'arrêt de coalescence, beaucoup plus rapide dans le cas du polymère. Cette différence de taille entre soluté solide et soluté liquide avait déjà été observée auparavant.⁸⁴ De manière très intéressante, les auteurs montrent qu'à pH relativement neutre (i.e. 6 – 9) ce sont majoritairement des ions bicarbonates (HCO_3^-) qui s'adsorbent aux interfaces hydrophobes. Les autres ions présents en solution peuvent bien entendu s'adsorber. Il faut ainsi prendre soin de surveiller la carbonatation de l'eau (soit naturellement présente ou provenant du CO_2 de l'atmosphère) lorsque l'on considère l'étude de telles interfaces hydrophobes.

La stabilité colloïdale de NP polymères préparées dans ces conditions sans tensioactif peut être apportée grâce aux groupements chargés à leur surface. Ces groupements ionisés peuvent provenir des polymères, particulièrement au niveau des fonctions chimiques polaires présentes en bout de chaîne. Il est admis que ces groupements se retrouvent plus ou moins à l'interface NP/eau et donnent une stabilité colloïdale par répulsion électrostatique.^{77,79} Dans le cas d'un mélange très rapide dans le domaine ouzo (mélange des deux phases d'un seul coup, typiquement ajout d'une grande quantité d'eau dans la phase organique), il a été montré que la taille des NP correspond à un mécanisme de coalescence des nuclei originaux, lequel est limité par les répulsions électrostatiques dues aux charges de surface.⁹² Cette approche explique la faible polydispersité des particules obtenues, car les répulsions électrostatiques sont plus importantes entre deux grandes particules qu'entre une petite et une grande. L'aire surfacique, et donc les

répulsions ioniques, sont d'autant plus grandes que la particule est grande. La taille augmente en fonction du temps d'autant plus que les interactions répulsives sont faibles (**Figure 1. 17 A**). La polydispersité diminue à l'inverse de la racine carrée du temps jusqu'à se stabiliser pour tous les échantillons (**Figure 1. 17 B**). C'est une explication à la lente évolution et la faible polydispersité observée dans le domaine métastable.

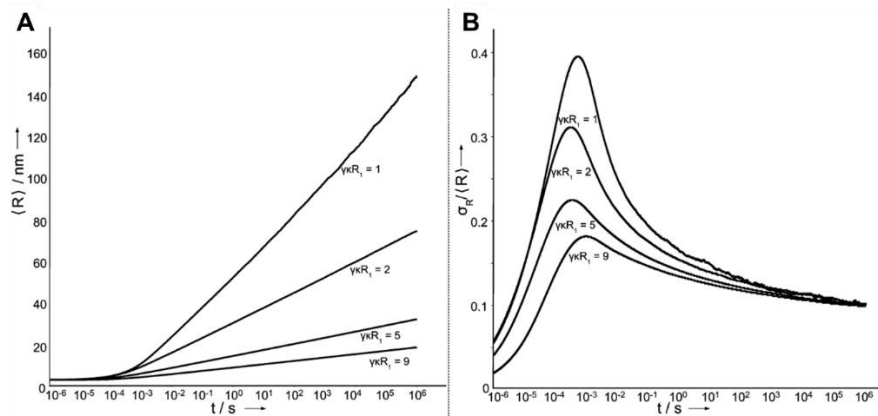


Figure 1. 17 – Évolution de la taille moyenne (**A**) et de la polydispersité (**B**) en fonction du temps pour différentes magnitudes de répulsions électrostatiques (correspondant au paramètre $\gamma k R_1$). La taille montre une évolution logarithmique en fonction du temps d'autant plus faible que les répulsions sont importantes. La polydispersité est peu influencée par les répulsions à partir de quelques secondes et diminue à l'inverse de la racine carrée du temps.⁹²

Il est possible de montrer l'importance des groupements en bout de chaînes de polymère pour la stabilité des particules polymères en utilisant des polymères avec des terminaisons différentes, ionisables (PMMA-COOH) ou non (PMMA-H ou PMAA-butyl). La stabilité colloïdale est alors clairement imputable à la présence des groupes ionisables en surface.^{93,94} Leur remplacement progressif par des groupements non ionisables se traduit par une augmentation de la taille des NP obtenues (la croissance s'arrête quand suffisamment de charges se trouvent en surface et stabilisent la particule⁹⁴) et, *in fine*, par une déstabilisation et la formation d'agrégats. La vitesse de l'ajout d'eau influence cette stabilisation colloïdale induite par les groupements ionisables en surface. En effet, suivant la vitesse, plus ou moins de polymère ionisable se retrouve en surface et donc les NP sont plus ou moins stabilisées. Ces résultats montrent l'importance capitale des groupements ionisables dans la charge de surface des NP polymères et par là même pour leur stabilité par répulsions électrostatiques, ainsi que l'importance de la rapidité de l'ajout sur le résultat obtenu pour des mélanges de polymère de masses moléculaires différentes.

I.1.4.5. Influence de la température

La température peut également influencer les caractéristiques de l'émulsion obtenue si elle est utilisée pendant l'étape de déplacement de solvant.⁴⁶ En effet, la solubilité du soluté hydrophobe est fonction de la température. Ainsi, une température plus élevée augmente la solubilité de l'huile dans la phase continue (mélange d'eau et de solvant) et il y a donc moins d'excès d'huile disponible pour la formation de gouttelettes, ce qui se traduit par des gouttelettes plus petites qu'à une température plus faible. Si la solution à plus haute température est refroidie lentement, la solubilité baisse mais pas assez rapidement pour former de nouvelles gouttes. L'excès d'huile à nouveau présent dans la phase continue diffuse alors uniformément dans les gouttelettes. Cela veut dire que toutes les gouttes reçoivent la même quantité d'huile en plus et donc les petites gouttelettes grossissent proportionnellement plus que les grosses : la distribution de taille devient plus étroite.

Si l'utilisation d'une température élevée peut-être judicieuse lors de la phase de mélange rapide des différents composants, elle ne l'est pas une fois l'émulsion établie, où elle va favoriser la déstabilisation. En effet, une température plus élevée (tout comme la polydispersité¹⁹) favorise le mûrissement d'Ostwald.

Cette influence néfaste de la chaleur a été étudiée dans des boissons traditionnelles, par exemple le Pastis (ou la température a été variée entre 10 et 38°C)²³ : la température joue un rôle très important en augmentant la taille des gouttelettes et en accélérant la démixtion. Il faut donc garder à l'esprit que la température doit être surveillée principalement pour améliorer la conservation de l'émulsion dans le temps plutôt que pour en modifier les caractéristiques, surtout qu'elle joue sur de multiples paramètres (par exemple la viscosité, le coefficient de diffusion, la solubilité etc...).

I.2. Capsules formées par effet ouzo

Comme vu jusqu'alors, effet ouzo et nanopréciptation ont permis d'accéder à de nombreuses nanostructures, mais qui pour la plupart se révèlent pleines (que l'on peut appeler nanosphères). Quelques exemples, plus rares, montrent la possibilité d'élaborer des sphères creuses. Celles-ci ont l'intérêt de rendre disponible un grand volume interne pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes dans le cœur de la capsule. Par ailleurs, le rapport principe actif/excipient est plus grand comparé à des particules pleines (nanosphères). La capsule protège le contenu encapsulé de facteurs de dégradation extérieurs.^{9,11,95}

I.2.1. Capsules polymères

La préparation de nanocapsules creuses est possible par effet ouzo. Il y a plusieurs voies pour y accéder,⁴⁷ parmi lesquelles la précipitation spontanée de polymère préformé,¹⁵ la polymérisation spontanée⁹⁶ ou encore la polycondensation spontanée à l'interface entre phase dispersée et dispersante⁹⁷⁻⁹⁹. Nous nous intéressons principalement aux capsules à base d'espèces préformées. Il s'agit d'un effet ouzo avec une huile, dans lequel le polymère se dépose autour des gouttes pour former les capsules. Depuis le tout début du développement de la nanopréciptation par déplacement de solvant par Fessi *et al.*, la synthèse de nanocapsules a été explorée.^{14,15} Des nanoparticules de polymères variés avec du benzoate de benzyle (excipient pharmaceutique courant) et encapsulant des médicaments ont ainsi été préparées. De manière très intéressante, si le benzoate de benzyle est remplacé par un solvant volatile ou par de l'huile (typiquement le miglyol) des nanocapsules sont obtenues.

Une méthodologie pour la fabrication de nanocapsules polymériques par effet ouzo a été développée par l'équipe de F. Ganachaud.¹⁰⁰ Cette technique se base sur un système « eau/acétone/hexadécane/glycopolymère ». L'élaboration des nanocapsules consiste à adsorber le polymère à la surface des gouttelettes formées par effet ouzo, puis à réticuler le polymère pour renforcer la coque de la capsule. Cette méthode est simple et rapide. La méthodologie repose sur la superposition des diagrammes de phase du polymère et de l'huile dans les mélanges « eau/solvant ». Un diagramme de phase composite représentant le système global est ainsi établi (**Figure 1. 18 A**). Les capsules se forment lorsque que le polymère est insoluble dans le système (fraction massique d'acétone > 0,65) et en présence de gouttelettes d'huile (en-dessous de la binodale) (zone f et e, **Figure 1. 18 A**). La zone f présente la particularité d'être à la fois dans le domaine ouzo et au-dessus de la limite de point de trouble du polymère. En se plaçant dans cette

zone et en réticulant le polymère, il est possible de figer les gouttelettes pour fabriquer des nanocapsules monodisperses de l'ordre de 100 nm de diamètre (**Figure 1. 18 B**).

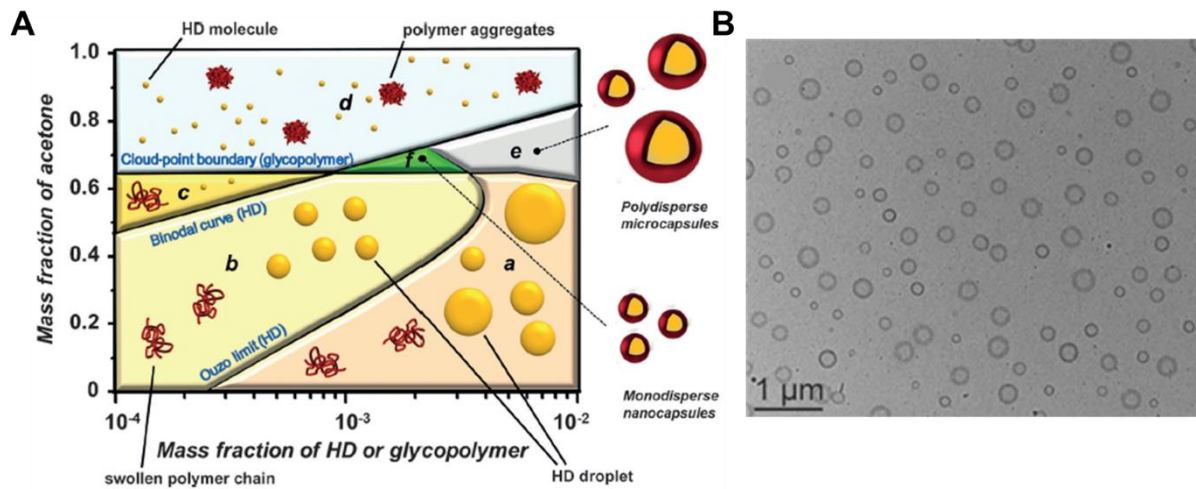


Figure 1. 18 – (A) Diagramme de phase typique d'un système eau / acétone / huile / glycopolymère, avec les différents types d'objets formés dans chaque zone. (B) Image TEM des nanocapsules obtenues dans le domaine f après réticulation de la coque de polymère.¹⁰⁰

L'intérêt de l'approche présentée ici est de pouvoir anticiper avec précision le type d'objets obtenus en fonction de la concentration des différents composants du système. C'est donc un outil très utile pour l'exploration de tout nouveau système. À noter que le système présenté ici permet par ailleurs d'encapsuler un composé d'intérêt, par exemple un fluorophore comme le pyrène qui est incorporé dans le solvant au départ. Il est ainsi possible d'élaborer des nanocapsules fluorescentes. La coque de polymère peut quant à elle servir de plateforme pour greffer divers composants en surface des capsules, par exemple une molécule d'intérêt ou encore des NP inorganiques (telles que des nanoparticules d'or ou d'oxyde de fer). La même stratégie est employée dans un autre article en utilisant cette fois du miglyol® à la place de l'hexadécane, toujours dans un mélange « eau/acétone ».¹⁰¹ Le mode opératoire est semblable et permet d'encapsuler un antibiotique (la fluméquine) de la même manière que le pyrène précédemment, ainsi que de greffer des nanoparticules de cobalt magnétiques en surface, le tout pour des applications antibactériennes.

Le domaine ouzo est donc tout à fait adapté pour la préparation de capsules polymères, pouvant encapsuler ou non un composé hydrophobe, avec une taille contrôlée et une faible polydispersité. De plus, il permet d'encapsuler tout le composé hydrophobe introduit dans le système (efficacité d'encapsulation très élevée).

Toutefois, la zone ouzo est très étroite et parfois difficile à utiliser. Par ailleurs, les capsules sont obtenues en « figeant » une émulsion métastable, qui par définition voit sa taille augmenter en fonction du temps. La reproductibilité peut donc être un problème en fonction du temps d'attente avant la réticulation du polymère par exemple. D'autre part, dans les systèmes étudiés jusqu'à présent, l'utilisation de la région ouzo pour l'élaboration de nanocapsules est possible quand il y a superposition entre la zone ouzo et la zone où le polymère précipite. Cela n'est pas toujours le cas. Pour contourner ces différents obstacles, une autre zone du diagramme de phase peut être utilisée : la **zone SFME** (« surfactant-free microemulsion »), où la microémulsion est thermodynamiquement stable.

I.2.2. Utilisation de la zone SFME

Les SFME sont un cas particulier de microémulsions. Les microémulsions sont des dispersions transparentes visuellement monophasiques de deux composés non miscibles (tels l'eau et l'huile), peu visqueuses et thermodynamiquement stables. Elles ont été pour la première fois décrites en 1943 par Hoar et Schuman.¹⁰² Ces microémulsions présentent une microstructure unique et ont des propriétés solubilisantes excellentes menant à des applications en tant que microréacteurs (enzymatiques, chimiques), la délivrance de médicaments,¹⁰³ etc. Toutefois, afin de stabiliser la très importante interface entre les deux phases, un tensioactif est nécessaire, la plupart du temps en grande proportion (> 10 %w).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Smith *et al.* décrivent pour la première fois en 1977 l'existence de telles nanostructurations en l'absence de tensioactif mais en présence d'un troisième composant, un amphi-solvant.¹⁰⁷ Celui-ci a de l'affinité pour les deux premiers composés, qui ne sont pas compatibles entre eux (système « eau /2-propanol/hexane »). Cette molécule amphiphile organique augmente la solubilité de l'hexane dans l'eau, tout en ne créant pas de micelles.

Ces nouveaux systèmes sont baptisés **microémulsions sans tensioactif, ou SFME**. L'absence de tensioactif est particulièrement intéressante pour des applications où ils sont indésirables, comme le domaine pharmaceutique par exemple. Toutefois, très peu de travaux se sont portés sur ces systèmes originaux, jusqu'aux années récentes et notamment les recherches de Kunz *et al.*, en particulier sur le système « eau/éthanol/n-octanol », étudié largement.¹⁰⁴ D'autres systèmes comme « eau/1-propanol/hexane »,¹⁰⁸ « eau/éthanol/benzène »,¹⁰⁹ « eau/n-propanol/acide oléique »¹¹⁰ ou encore « eau/2-propanol/*para*-menthan-3,8-diol »¹¹¹ ont été étudiés. Dans le même esprit, Marcus *et al.* ont montré que certaines formulations utilisées par l'industrie des

parfums correspondaient au domaine de formation des SFME.¹¹² Plus récemment, une multitude de systèmes sans tensioactif ont été abordés théoriquement pour évaluer l'influence des liaisons hydrogène dans la formation de nanostructures dans les SFME : il apparaît que les liaisons hydrogène renforcent la nanostructuration, bien qu'elles ne soient pas impérativement nécessaires.¹¹³ Même des systèmes sans eau ont été investigués avec des solvants eutectiques profonds.¹¹⁴ La formation de ces microémulsions sans tensioactif, thermodynamiquement stables, s'explique par un minimum d'énergie libre sous l'effet d'une compétition entre les forces de solvation (hydratation), les interactions attractives (van der Waals) et l'entropie de mélange.¹¹⁵ Juste avant le domaine ouzo et dans la zone SFME, des nanostructures de l'ordre de la dizaine voire de la centaine de nanomètres et diffusant la lumière sont détectées : c'est le domaine « pré-ouzo ».¹⁰⁴ Il faut toutefois noter que les SFME sont très sensibles à la température. Des petites variations de température peuvent induire des changements radicaux de nanostructuration et donc de taille de gouttelettes.¹⁰⁶ Par ailleurs, les SFME peuvent se montrer très sensible à l'ajout d'additifs tels que des électrolytes. Par exemple, l'ajout de sel mène à l'augmentation de taille des agrégats pré-ouzo (salting-out de l'éthanol, dans le système « eau/éthanol/1-octanol »).¹¹⁶ De par leurs propriétés et leur absence de tensioactif, les SFME sont utilisées pour diverses applications telles que des réactions enzymatiques,¹¹⁷ chimiques ou encore la synthèse de NP. La revue de Hou et Xu en dresse un panorama.¹¹⁸

L'équipe de F. Ganachaud a ainsi poursuivi l'utilisation des systèmes précédemment présentés ou analogues, en explorant le domaine SFME, avant la région ouzo. Le système « eau/acétone/huile (hexadécane ou miglyol) » a été exploité cette fois-ci à des fractions massiques très faibles, en se plaçant avant la binodale.¹⁰⁵ Cette zone a été jusque-là désignée comme étant la « région monophasique », jusqu'à la prise de conscience de l'existence de SFME dans cette région. En utilisant toujours la même stratégie de caractérisation du diagramme de phase de chaque composant, il a été possible d'obtenir des gouttelettes (puis des capsules) très peu polydisperses et de taille contrôlée.

Commençons d'abord par la caractérisation de la région SFME. La taille des gouttes dans la zone SFME présente un comportement tout particulier (**Figure 1. 19 A**), contrairement au domaine ouzo où, pour rappel, la taille des gouttes est fonction du rapport « excès d'huile/solvant ». La taille est fixe à fraction de solvant donnée, même si la quantité d'huile varie. Ainsi, **dans le domaine SFME, il semble que toute l'huile ne se trouve pas dans les gouttes** (sans quoi la

taille augmenterait quand la quantité d'huile augmente) mais qu'elle se partage entre la phase dispersée et continue. En effet, l'huile a encore une bonne solubilité dans le mélange « eau/acétone » étant donné qu'on est au-dessus de la binodale. Ce comportement peut expliquer pourquoi cette zone apparaît transparente, étant donné l'absence de différence d'indice de réfraction entre la phase dispersée et la phase continue. Il s'ensuit donc que la concentration en huile dans les gouttes, et *a fortiori* dans les futures capsules, est très faible étant donné les très faibles fractions massiques globales et la partition de l'huile en phase dispersée et phase continue. Il s'agit d'un comportement complètement différent de la zone ouzo.

De manière très intéressante, la taille des gouttes évolue proportionnellement à la quantité de solvant : plus il y a d'acétone plus les gouttes sont grandes (évolution linéaire en échelle semi-Log) (**Figure 1. 19 B**). Les tailles obtenues varient de l'ordre de la vingtaine de nanomètres à presque 200 nm. Cette région est donc particulièrement utile pour l'élaboration de nanostructures de taille contrôlée et de petite taille. Il faut également noter que la taille des gouttelettes formées n'évolue pas en fonction du temps, ce qui confirme le caractère thermodynamiquement stable du domaine SFME (**Figure 1. 19 C**). La présence des gouttes stables et de taille contrôlée se fait sur une large gamme de proportion de solvant, bien moins restreinte que pour la zone ouzo. Ainsi, il est possible d'envisager l'utilisation des gouttes dans une très grande région du diagramme de phase, avec potentiellement une grande région où le polymère est capable de précipiter. Il faut toutefois garder à l'esprit que les quantités de composé hydrophobe utilisées dans ce domaine SFME sont très faibles, encore plus que dans le domaine ouzo, ce qui peut être problématique suivant l'application visée.

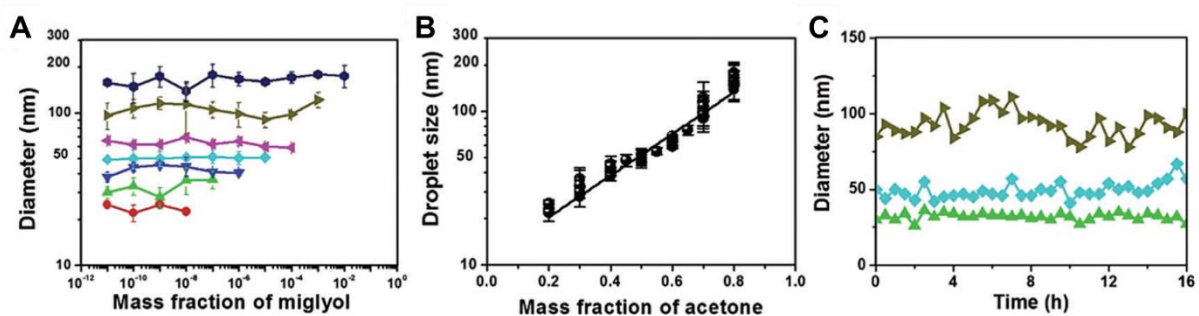


Figure 1. 19 – (A) Évolution de la taille des gouttelettes dans le domaine SFME (diamètre hydrodynamique déterminé par DLS) en fonction de la fraction massique en huile (miglyol) et d'acétone. (B) Relation semi-logarithmique entre le diamètre hydrodynamique et la fraction massique d'acétone. (C) Évolution du diamètre hydrodynamique en fonction du temps. Fraction massique d'acétone : 0,2 (●), 0,3 (▲), 0,4 (▼), 0,5 (◆), 0,6 (◀), 0,7 (▶), 0,8 (●). (adapté de ¹⁰⁵).

Une fois l'émulsion initiale caractérisée, il est possible de l'utiliser pour la fabrication de nanocapsules, par adsorption de polymère à la surface des gouttes selon la stratégie développée par le groupe de F. Ganachaud présentée précédemment. Un exemple avec deux glycopolymères (PEMM et PEEGM, cf. liste des abréviations) dans le système « eau/acétone/huile (miglyol ou hexadécane) » est présenté en **Figure 1. 20**. La coque polymère est réticulée comme précédemment expliqué (avec IPDI). Il y a une parfaite corrélation entre la taille des gouttelettes originelles et celle des capsules finales. Cela prouve bien que les gouttelettes servent de modèle, de gabarit pour l'élaboration des nanocapsules. Le contrôle de l'émulsion initiale est donc l'outil privilégié pour maîtriser la morphologie des nano-objets finaux. Similairement à ce qui a été présenté dans le domaine ouzo, il est possible d'encapsuler un composé hydrophobe s'il se trouve au départ dans la phase organique (ici, la camptothécine). Il est par ailleurs possible de co-précipiter un polymère d'intérêt en même temps que le polymère de base (ici un PEG-acide folique) pour donner à la capsule finale de nouvelles caractéristiques.

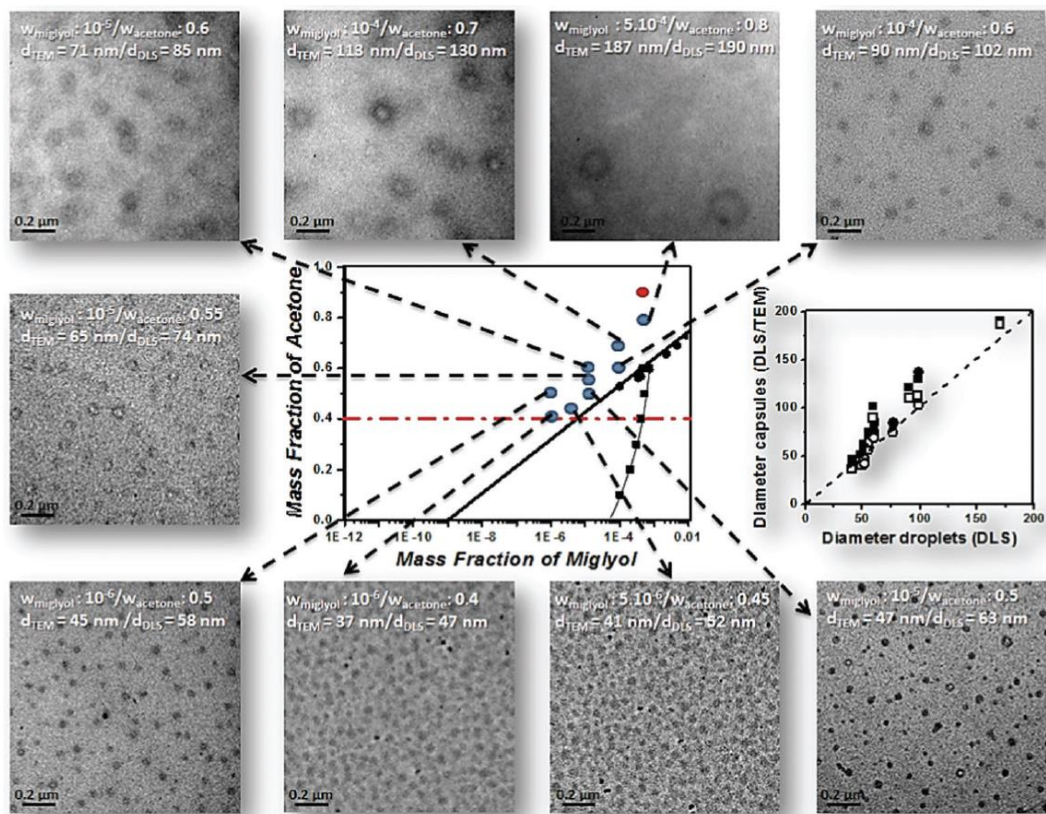


Figure 1. 20 – Élaboration de nanocapsules dans le domaine SFME, pour le système eau / acétone / Miglyol. Les images TEM sont réalisées pour différentes compositions dans le domaine SFME avec le polymère PEMM, et contiennent les informations de taille des capsules obtenues (mesurée par DLS et TEM). Les lignes caractéristiques sur le diagramme de phase sont : la ligne de point de trouble du PEMM (ligne rouge pointillée), la binodale du système eau / acétone / Mygliol (ligne noire épaisse) et la limite ouzo (ligne noire

fine). Le graphique à droite représente les diamètres obtenus par DLS (symboles pleins) et par TEM (symboles vides) pour les capsules élaborées avec le PEMM (■) ou le PEEGM (●).¹⁰⁵

La présence et l'utilisation du domaine SFME trouve tout son intérêt lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser la région ouzo, notamment quand la région où le polymère précipite ne coïncide pas avec le domaine ouzo de l'huile. Par exemple, il est impossible d'utiliser le poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) (PHPMA) pour élaborer des nanocapsules dans le domaine ouzo du système « eau/acétone/hexadécane », étant donné que le polymère a besoin de beaucoup d'acétone pour précipiter (autour de 80 %w en acétone ou plus suivant la masse molaire du polymère) (**Figure 1. 21**).¹¹⁹ Pour pallier cela, il est possible de choisir une composition comprise dans le SFME pour faire les capsules. Les nano-objets obtenus sont peu polydisperses, à l'image des gouttes originelles, avec une taille aux environs de 200 nm pour les trois polymères considérés. La taille est relativement identique étant donné que la fraction d'acétone est très proche (comme vu précédemment, la quantité de solvant est le facteur déterminant la taille dans le domaine SFME). Bien que l'utilisation du SFME contraint souvent à utiliser une quantité d'huile très faible, dans ce cas la quantité d'huile est aussi importante que ce qui pourrait être obtenu dans le domaine ouzo (ici une fraction massique de 7.10^{-4}) en raison de la quantité d'acétone très importante. À noter également que l'acétone peut être évaporé après l'élaboration des nanocapsules, ce qui mène à une légère augmentation de la taille des objets (200 nm → 250 nm), du fait du gonflement de la coque de la nanocapsule par l'eau.

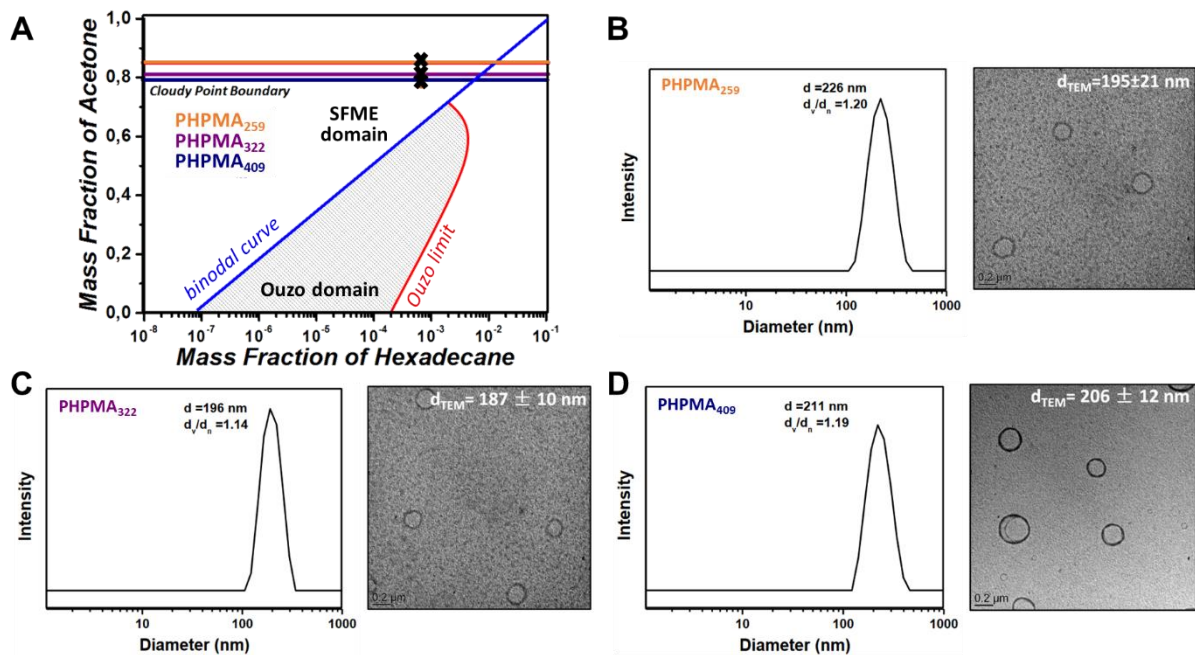


Figure 1. 21 – (A) Diagramme du système eau / acétone / hexadécane représentant les domaines SFME et ouzo, délimités par la ligne binodale et la limite ouzo. Les lignes de point de trouble des trois polymères sont indiquées le PHPMA₂₅₉ (orange), le PHPMA₃₂₂ (violet) et le PHPMA₄₀₉ (bleu). Les croix représentent les compositions pour l’élaboration des nanocapsules à partir de chacun des polymères en présence de réticulant (IPDI), avec l’analyse de taille par DLS et TEM pour le PHPMA₂₅₉ **(B)**, le PHPMA₃₂₂ **(C)** et le PHPMA₄₀₉ **(D)**. (adapté de ¹¹⁹)

L’utilisation judicieuse du diagramme de phase permet ainsi de fabriquer des structures innovantes telles que des capsules avec plusieurs couches de polymères (précipitation séquentielle de plusieurs polymères) ou bien avec une couche de polymère mixte (précipitation simultanée de plusieurs polymères), afin d’obtenir les propriétés désirées, pour moduler la porosité par exemple ¹²⁰. **La connaissance minutieuse du diagramme de phase est l’outil garantissant l’élaboration de tels objets sophistiqués.** La **Figure 1. 22 A** résume parfaitement la polyvalence de cette approche, permettant de comprendre et d’anticiper les structures obtenues pour n’importe quelle composition. On retrouve la synthèse de ce qui a été présenté jusqu’alors, à savoir que la taille dans le domaine SFME augmente quand la fraction de solvant augmente, et reste identique quand la quantité d’huile varie. Pour ce qui est de la zone ouzo, la taille augmente quand la fraction d’huile augmente.

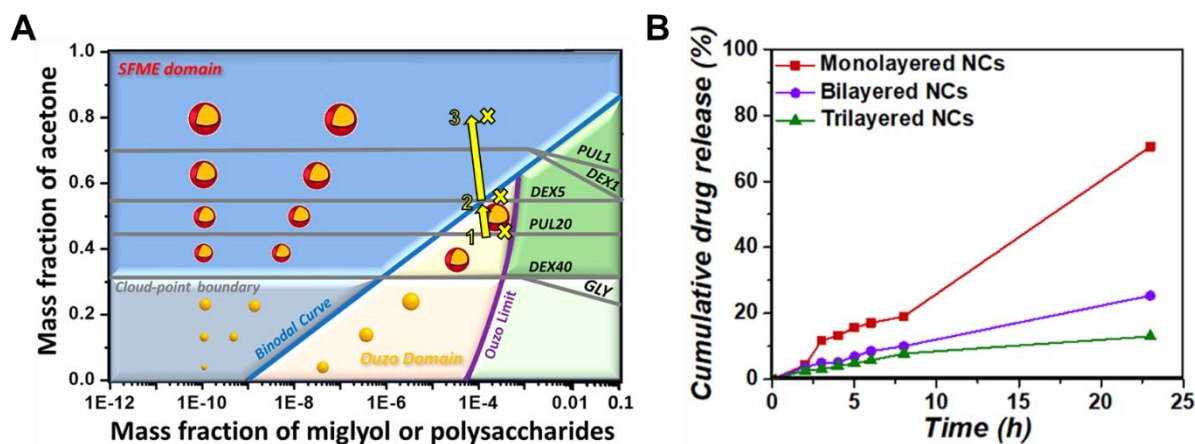


Figure 1. 22 – (A) Diagramme de phase synthétique des différents domaines présents dans le système eau / acétone / Miglyol ainsi que les lignes de point de trouble de différents polymères. En suivant les flèches jaunes et en utilisant successivement les concentrations de Miglyol et acétone correspondant aux croix en présence de réticulant, il est possible de synthétiser différents objets avec différents polymères : (1) nanocapsules monocouches (GLY + HA), (2) nanocapsules bicouches (GLY + HA / DEX5), (3) nanocapsules tricouches (GLY + HA / DEX5 / PUL1). **(B)** Profil de relargage de la camptothécine en fonction du nombre de couches des nanocapsules. Abréviations : glycogène (GLY), acide hyaluronique (HA), dextran 5 kg/mol (DEX5), pullulan 1 kg/mol (PUL1). (adapté de ¹²⁰)

Les domaines ouzo et SFME sont ici utilisés tous les deux afin d'exploiter des polymères hydrophiles qui n'ont pas la même affinité avec le solvant.¹²⁰ En se déplaçant le long des flèches jaunes (**Figure 1. 22 A**), il est possible par dilutions successives avec de l'acétone d'élaborer des nanocapsules avec plusieurs couches, la seule contrainte étant de réticuler et de diluer le système avant de faire précipiter le nouveau polymère. Cette approche permet de faire des objets avec une coque plus ou moins épaisse, ce qui est utile pour moduler le profil de composés encapsulés et éviter le phénomène de « burst release », c'est-à-dire un relargage très rapide d'une importante quantité de principe actif (**Figure 1. 22 B**). Cet exemple démontre toute la puissance de l'effet ouzo (aussi dans la zone SFME) pour la préparation de nanostructures de manière contrôlée.

I.2.3. Capsules hybrides polymère/nanoparticules inorganiques : les Hybridosomes®

Les NP inorganiques sont d'un intérêt tout particulier pour de très nombreuses applications, notamment les applications biomédicales et c'est pourquoi il est particulièrement intéressant de pouvoir élaborer des nanocapsules contenant ces NP inorganiques. Nous discuterons plus en détail des NP inorganiques pour la théranostique dans la partie IV.

Il n'existe toutefois dans la littérature que peu d'exemples de nanocapsules fabriquées par effet ouzo et comprenant des NP inorganiques dans leur coque. Parmi ces exemples, Ganachaud *et al.* ont démontré la possibilité de modifier les nanocapsules précédemment présentées afin de greffer des NP inorganiques, par exemple des nanoparticules d'or (AuNP), d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION)¹⁰⁰ ou des nanoparticules magnétiques de cobalt (CoNP)¹⁰¹ afin d'apporter les propriétés des NP aux capsules. Pour obtenir ces nanocapsules « modifiées », il est nécessaire de procéder à une étape supplémentaire une fois les nanocapsules « nues » préparées (c'est-à-dire avec seulement une coque de polymère). Le greffage sur les nanocapsules est effectué en faisant réagir des AuNP, SPION ou des CoNP aminées sur les groupements réactifs du polymère présent dans la coque, c'est-à-dire des fonctions isocyanates (dans le cas ici des AuNP et SPION aminées) ou *via* l'ouverture d'un cycle époxyde (dans le cas des CoNP). Ces voies de préparation de nanocapsules polymère/NP présentent néanmoins l'inconvénient de faire appel à plusieurs étapes.

Notre équipe à l'ISCR a mis au point depuis plusieurs années un procédé de fabrication de nanocapsules novateur, menant à la formation de nanocapsules hybrides composées d'une coque mixte de polymère et de NP inorganiques : les **Hybridosomes®**. Ce procédé a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2015¹²¹ et d'une publication en 2016¹⁰⁰. Il a par la suite donné lieu à plusieurs articles mettant en jeu les hybridosomes (*vide infra*). Ce procédé a été initié par les travaux de thèse de Gérald Casterou¹²² puis développé par ceux de Flavien Sciortino¹²³.

Ce procédé utilise l'effet ouzo pour élaborer des nanocapsules monodisperses (classiquement autour de 100 nm de diamètre hydrodynamique) de manière reproductible et très simple (**Figure 1. 23**).

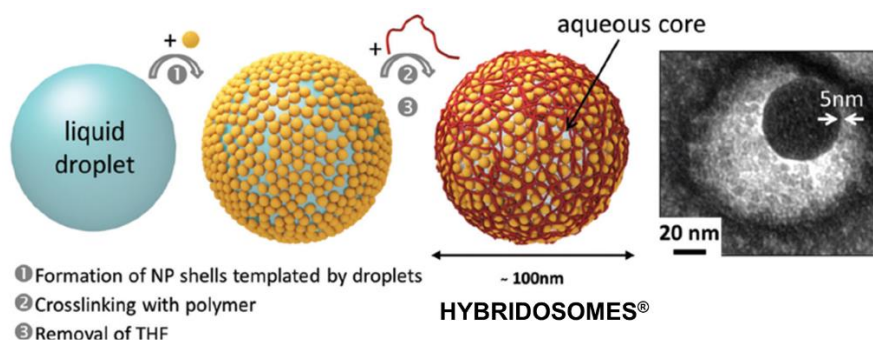


Figure 1. 23 – Procédé de fabrication des hybridosomes et observation TEM avec coloration négative d'un hybridosome dont la coque est rompue ([unités acide acrylique] = 2,25 mM ; [Fe] = 12,5 µg/mL).¹²⁴

La procédure de fabrication des hybridosomes se compose de 3 étapes simples :

1. En premier lieu, une grande quantité d'eau est ajoutée à une solution de THF contenant des NP inorganiques hydrophobes de l'ordre de 5 nm de diamètre (typiquement SPION, AuNP, quantum dots (QD) etc...). Il en résulte la formation spontanée d'une émulsion par effet ouzo, avec des gouttelettes d'un diamètre de l'ordre de 100 nm. L'effet ouzo est ici induit par la sursaturation du BHT, molécule hydrophobe présente dans le THF commercial en tant que conservateur. Ainsi l'émulsion se compose de gouttelettes riches en BHT et en solvant.³⁴ Le rôle du BHT dans la formation de l'émulsion ouzo dans le cas des hybridosomes sera discuté plus en détail dans le chapitre suivant. Les NP hydrophobes initialement présentes dans le THF migrent à l'interface eau/THF, c'est-à-dire à la surface des gouttelettes et stabilisent ces dernières. À ce moment, une multitude de gouttelettes dont la surface est recouverte de NP se trouvent dispersées dans l'eau.
2. Un polymère hydrophile est ensuite ajouté, typiquement du poly(acide acrylique) (PAA) ou un copolymère à bloc poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide acrylique) (PEG-PAA). Un échange de ligand a alors lieu entre les ligands des NP et le polymère (fonctions acides). Le polymère stabilise ainsi la coque de NP autour des gouttelettes (**Figure 1. 24**).

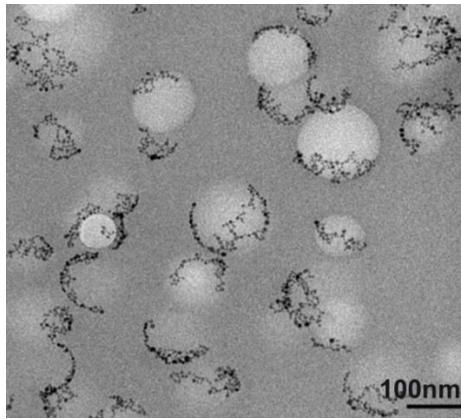


Figure 1. 24 – Images par microscopie électronique à transmission (TEM) de gouttelettes entourées de SPION stabilisées par du polymère (PAA 450k). Volontairement, la quantité de SPION introduite est très faible (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour mettre en évidence la localisation des nanoparticules à la surface des gouttelettes.¹²⁵

3. Le solvant présent dans les gouttelettes est éliminé (classiquement par évaporation ou dialyse). *In fine*, il ne reste que l’empreinte de la gouttelette, c’est-à-dire la coque hybride de NP et de polymère, qui forme une nanocapsule avec un cœur aqueux. La coque est poreuse et permet de faire rentrer de l’eau à l’intérieur de la capsule une fois que le cœur organique est évaporé.

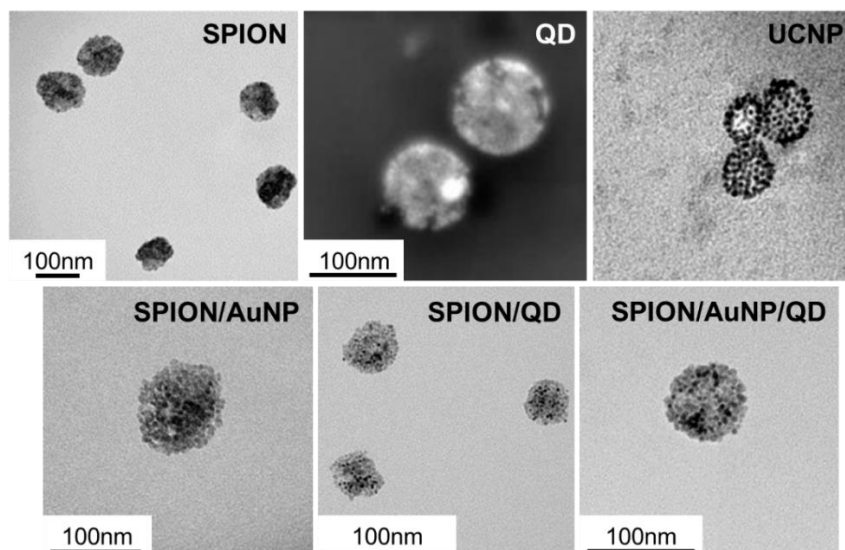


Figure 1. 25 – Observations par microscopie électronique à transmission ou à balayage (image au centre en haut) d’hybridosomes réalisés avec différents types de nanoparticules, ou mélanges de celles-ci. UCNP = upconverting nanoparticle.

Le procédé de fabrication des hybridosomes est donc un procédé rapide et simple menant à la formation de capsules monodisperses d’un diamètre hydrodynamique de l’ordre de 100 nm, et présentant une coque hybride NP / polymère ainsi composé d’eau et de BHT. Il reste au final très

peu de solvant organique, étant donné son élimination lors de la phase d'évaporation ou de dialyse. **La présence d'un cœur majoritairement aqueux (comportant également du BHT) au sein d'un objet parfaitement dispersable dans l'eau est une différence majeure par rapport à toutes les nanocapsules présentées jusqu'ici, lesquelles conservent souvent leur cœur organique à la fin.** En effet, des calculs préliminaires indiquent que le BHT ne représente qu'une partie du volume des hybridosomes. Au vu du caractère poreux de la coque, le reste du volume interne est certainement principalement aqueux.

De manière très intéressante, la composition de la coque est très polyvalente en termes de NP inorganique. Cette modularité de la composition permet d'obtenir des propriétés finales très variées (**Figure 1. 25**). Par ailleurs, il n'y a pas besoin de synthétiser des polymères à façon car des polymères commerciaux tels que le PAA sont efficaces pour stabiliser les capsules.

Les propriétés des hybridosomes ont été étudiées, notamment en ce qui concerne leurs propriétés d'élasticité.¹²⁴ Des expérimentations de compression osmotique et d'indentation par microscopie à force atomique (AFM) ont montré que ces nano-objets sont poreux (porosité de l'ordre de 4 kDa PEG, c'est-à-dire ~2 nm) et élastiques (module d'Young de l'ordre du MPa).¹²⁴ Ces valeurs de module d'Young sont du même ordre de grandeur que celles que l'on retrouve dans la littérature pour des capsules de polyélectrolytes multicouches au-dessus de la température de transition vitreuse (T_g). Comme on peut le voir sur la **Figure 1. 26**, les nano-objets peuvent être comprimés puis revenir à leur taille initiale (avec éventuellement un peu d'agrégation). Ces hybridosomes semblent ainsi intéressants pour des applications où ils pourraient être soumis à des contraintes mécaniques, par exemple lors du passage dans de petits vaisseaux sanguins.

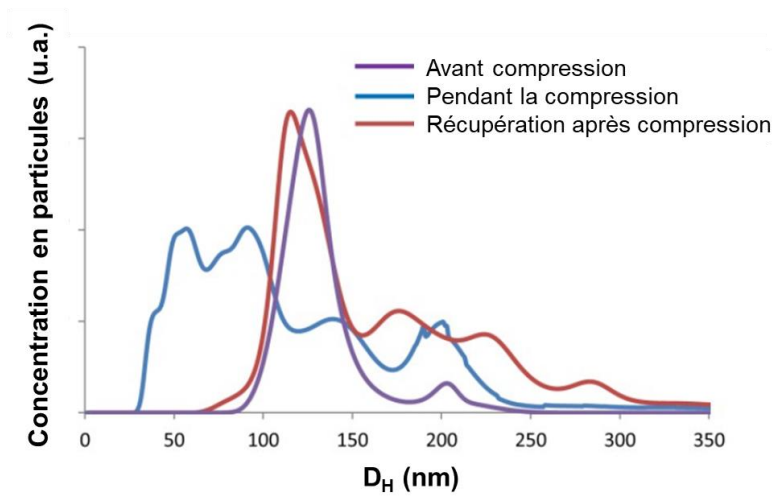


Figure 1. 26 – Distribution de tailles d'hybridosomes® SPION avant compression, pendant compression osmotique (PEG 10k, 150 g/L) et après séparation magnétique et lavage.¹²⁴

Les hybridosomes sont très robustes. Ils sont stables en dispersion aqueuse à pH neutre pendant plusieurs mois. Ils présentent un point isoélectrique (pH_i) caractéristique dépendant du polymère employé pour la stabilisation de la coque. Ainsi, avec du PAA ou PEG-PAA, un pH_i entre 4 et 4,5 a été déterminé grâce à la mesure du potentiel zéta (mesure nous donnant une idée de l'état de charge de surface des nanocapsules). Ce point isoélectrique correspond à celui de l'acide acrylique. Les fonctions $-COOH$ sont donc bien responsables de la stabilisation des objets, avec en dessous du pH_i une protonation des acides carboxylique menant à la déstabilisation/destruction des objets. En effet, en plus du rôle de ligand maintenant la cohésion des nanoparticules dans la coque, les fonctions acides ionisées (carboxylates) permettent aux nanocapsules de se repousser électrostatiquement et d'éviter l'agrégation.

Un des grands avantages des hybridosomes est de posséder une coque de NP inorganiques. Par exemple, les hybridosomes composés d'une coque de SPION ont été étudiés pour leurs propriétés magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Du fait du couplage des SPION entre elles dans la coque, les propriétés magnétiques se sont vues améliorées. Ainsi, la relaxivité transversale r_2 des nano-objets est de l'ordre de $270 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est comparable à une référence commerciale (FeraSpin XXL ; $r_2 = 307 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Les hybridosomes sont ainsi intéressants pour une utilisation en IRM, comme mis en avant lors de la thèse précédente.¹²⁵ Après injection intraveineuse *in vivo* dans des souris, les hybridosomes sont rapidement internalisés dans le foie (prise en charge par les macrophages au vu de la taille relativement importante des hybridosomes) et permettent de conférer un contraste négatif en IRM. On peut donc ainsi voir

plus facilement une tumeur ainsi que la vascularisation hépatique, ce qui facilite l'imagerie (**Figure 1. 27**).

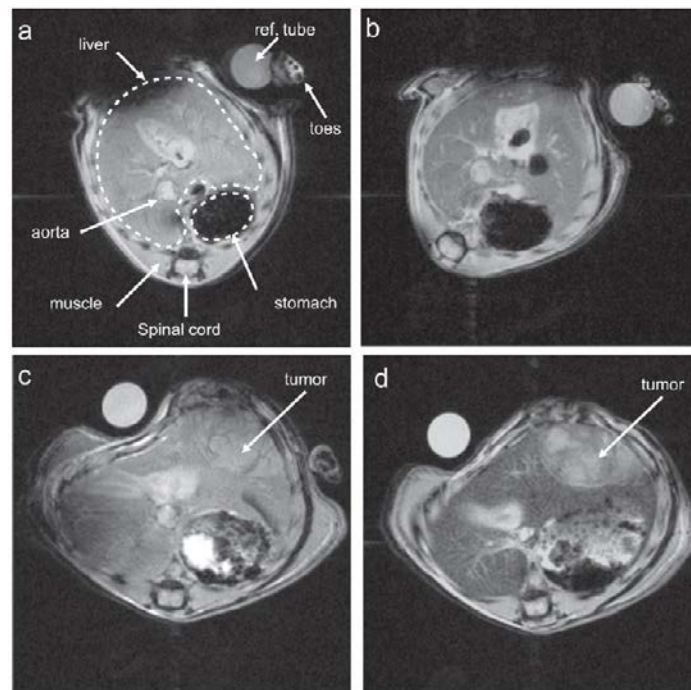


Figure 1. 27 – Images par résonance magnétique pondérée T_2^* d'une souris saine (a, b) et portant une tumeur du foie (c, d). L'acquisition est réalisée avant (a, c) ou 30 min (b, d) après injection intraveineuse d'hybridosomes SPION/AuNP (0,5 à 0,9 mg/kg).¹²⁵ L'accumulation des hybridosomes dans le foie induit un hyposignal. La tumeur, peu vascularisée, ressort par différence de contraste.

Au-delà des applications biomédicales, les hybridosomes ont été engagés dans d'autres applications lors de la thèse précédente. Par exemple, des films d'hybridosomes ont été préparés par chimie électro-click.¹²⁶ Les capsules fonctionnalisées par un polymère alcyne (PAA-C≡CH) forment un film par réaction avec un linker homo-bifonctionnel présentant des groupements azides (N₃-PEG-N₃) en présence d'un catalyseur généré électrochimiquement (Cu(I)) (**Figure 1. 28 A**). Les films obtenus conservent les propriétés des nano-objets initiaux et sont déstabilisables par différents stimuli, par exemple le pH ou encore un stimulus électrochimique. Qui plus est, le même procédé a été utilisé pour fabriquer des nanocapsules ou nanosphères solides de clusters de molybdène (**Figure 1. 28 B**).¹²⁷ Ces nanocapsules et nanosphères présentent une activité catalytique très intéressante pour le craquage de l'eau, c'est-à-dire la production de dioxygène ou de dihydrogène par électrolyse de l'eau.

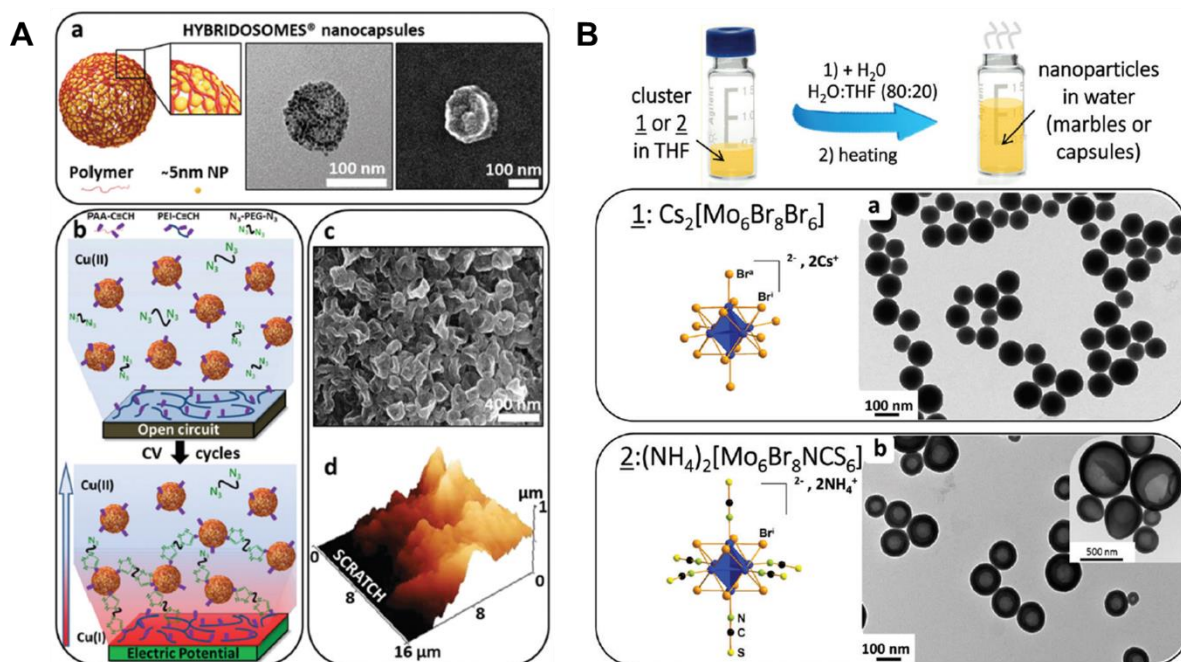


Figure 1. 28 – (A) Préparation de films d'hybridosomes par chimie électro-click : (a) Présentation des hybridosomes utilisés schématiquement ainsi que microscopie électronique à transmission et à balayage. (b) Procédé électro-click de fabrication du fim. (c, d) Image SEM d'un film d'hybridosomes à l'état solide et reconstruction 3D du profil d'épaisseur du film par AFM. **(B)** Procédé de fabrication de nano-assemblages de clusters de molybdène par effet ouzo. Images TEM des nano-objets obtenus avec différents clusters : (a) nanosphères ou (b) nanocapsules. (adapté de ^{126,127})

À noter que la modification des nanocapsules a été envisagée. Cette modification consiste à greffer des anticorps (ou autres fonctions actives) à la surface en utilisant les groupements fonctionnels libre du polymère. Cette modification permettrait de cibler préférentiellement certaines cibles biologiques ou bien de greffer des fonctions chimiques à la surface des hybridosomes, pour en faire des nanoplateformes pour diverses applications. Toutefois, nous ne sommes toujours pas parvenus à l'heure actuelle à modifier les nanocapsules de cette manière de façon optimale.

Ces nanocapsules, présentant une coque de NP/polymère ainsi qu'un cœur disponible pour l'encapsulation, semblent donc être des outils idéaux pour des applications très variées, notamment à visée théranostique. Lors de la thèse précédente, une preuve de concept a été réalisée concernant l'encapsulation de composés hydrophobes dans la cavité interne des hybridosomes (molécule hydrophobe certainement nanoprécipitée + eau), en l'occurrence un fluorophore de la famille des BODIPY. Cela sera amplement vérifié et développé dans cette thèse.

I.3. Autres méthodes de préparation de nanocapsules contenant des nanoparticules

Les hybridosomes ne sont pas les seules nanocapsules contenant des NP, autrement appelées capsules colloïdales. La revue de Bollhorst *et al.*¹²⁸ constitue un bon point de départ pour dresser un panorama des différentes méthodes menant à la formation de telles structures. La **Figure 1. 29** présente les différentes techniques développées pour la fabrication de capsules colloïdales. Ces techniques sont développées ci-après.

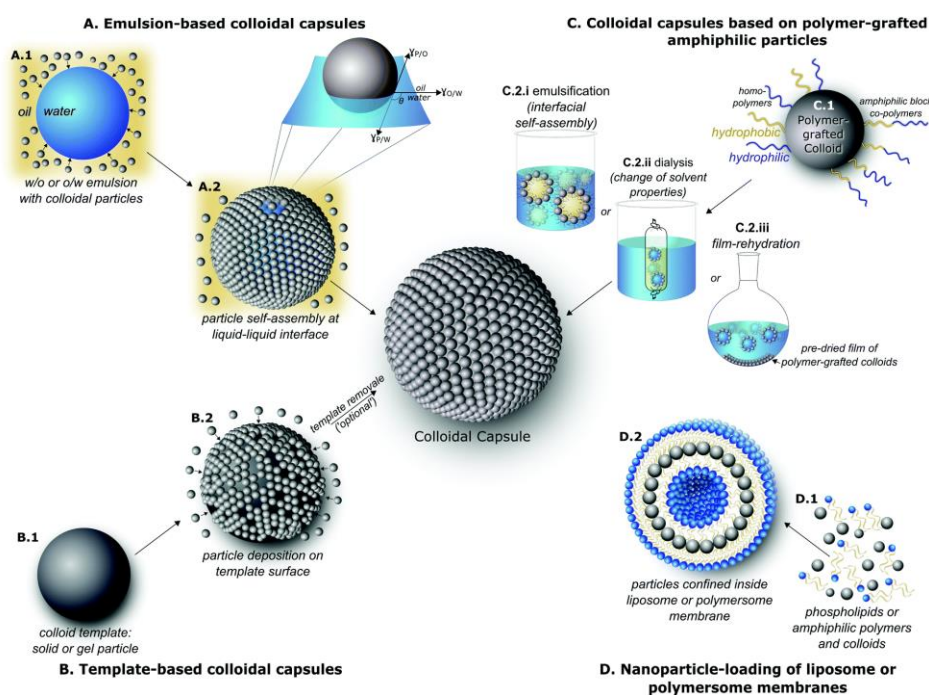


Figure 1. 29 – Schéma des différentes voies d'accès aux nanocapsules colloïdales.¹²⁸

I.3.1. Nanocapsules dérivées d'émulsions de Pickering

La formation de nanocapsules à partir de NP peut être réalisable autour des gouttes d'une émulsion. En effet, à l'instar des tensioactifs et/ou des polymères, il est possible de stabiliser les émulsions avec des particules solides : c'est ce que l'on appelle des émulsions de Pickering.¹²⁹ De tels systèmes stabilisés par des particules solides, que ce soit des émulsions directes ou inverses, ont été intensément étudiés, en particulier par l'équipe de Binks. Parmi ses travaux, on peut citer l'étude de l'influence de la mouillabilité,¹³⁰ de la taille et de la forme de ces particules^{131,132} sur le type d'émulsion de Pickering obtenu et leur stabilité. Des études ont aussi été rapportées sur des mousses stabilisées par des particules solides, c'est-à-dire des émulsions air dans eau.¹³³⁻¹³⁵ Il faut toutefois noter que ces diverses études ont toujours concerné des gouttes micrométriques. Ces

travaux pionniers ne sont donc pas détaillés ici et nous nous concentrons sur ce qui a pu être fait à l'échelle submicrométrique.

Les exemples à l'échelle nano sont bien plus restreints et constituent un défi.¹²⁸ En effet, du fait de l'utilisation de NP plus petites (de l'ordre de la dizaine de nanomètres ou moins), l'enthalpie d'adsorption des NP à la surface des gouttelettes est très faible et est inférieure à l'agitation thermique, ce qui peut mener à la désorption des NP de l'interface.^{136,137} Par ailleurs, comme déjà mentionné précédemment, plus les gouttelettes d'émulsion sont petites plus la pression de Laplace est grande, et donc plus les gouttelettes sont sujettes au mûrissement d'Ostwald. La stabilisation d'émulsions composées de gouttes de 20 à 200 nm avec des petites NP est donc difficile à obtenir. D'autant plus que la génération de nano-émulsions est ardue et nécessite un apport d'énergie conséquent.

Parmi les premiers exemples à l'échelle nano qui existent, Ziener *et al.* sont parvenus à la fabrication de nanocapsules *via* la stabilisation de miniémulsions d'hexadécane ($< 1\mu\text{m}$) par des NP de silice (SiNP).¹³⁸ En bref, une solution aqueuse de SiNP et du THF contenant un copolymère (PSVP) et une huile (HD) sont mélangés. Du fait de la diffusion du THF dans la phase continue, le polymère se sépare de l'huile et crée une couche autour de la gouttelette d'huile. Les NP s'adsorbent alors à la surface des capsules par interactions électrostatiques. Afin d'obtenir des capsules nanométriques, il est nécessaire d'utiliser la sonication pour préparer une émulsion très fine. Cette approche se rapproche de l'effet ouzo tel que nous avons pu le voir précédemment, la formation de l'émulsion n'étant possible que grâce à la présence d'un composé très hydrophobe (hexadécane) et à la diffusion du solvant dans l'eau. Une quantité de copolymère croissante semble induire une augmentation de la taille des capsules. Une quantité d'hexadécane plus importante mène à des capsules plus nombreuses à la paroi plus fine. Le pH a bien entendu une influence étant donné la nature ionisable du polymère. L'émulsification et la stabilité des capsules semblent meilleures avec l'acétone qu'avec le THF, ce qui rejoint les considérations évoquées dans la première partie de ce chapitre (cf. partie I.1.4.2). La même approche a été utilisée pour la fabrication de nanocapsules composée de SiNP¹³⁹ ou d'un mélange de SiNP et de TiO₂,¹⁴⁰ mais en polymérisant le copolymère *in situ* à partir de monomères et d'amorceur présents dans l'hexadécane.

Une grande partie des nanocapsules colloïdales préparées à partir d'émulsions ont été rapportées par Rotello *et al.* Par exemple, ils ont utilisé des émulsions directes d'acide linoléique dans l'eau pour assembler des coques d'AuNP.¹³⁷ Une première étape de fabrication de l'émulsion dans une solution d'AuNP-arginine a lieu puis cette émulsion est mise en contact avec une solution contenant encore plus d'AuNP. Instantanément, les particules s'adsorbent à la surface des gouttelettes grâce à l'interaction carboxylate-arginine entre l'acide linoléique et les AuNP-arginine. Ces capsules sont stables dans le milieu tampon mais se dégradent sous 3 h dans un milieu de culture. Leur stabilité peut être améliorée en ajoutant une protéine chargée négativement : la transferrine. Cet ajout convertit les répulsions entre AuNP en interactions attractives stabilisant l'objet. Ainsi, les nanoparticules sont doublement stabilisées. Toutefois, il faut bien veiller à présenter un certain ratio NP/gouttelettes pour réussir la préparation des nanocapsules par ce procédé (l'optimisation est donc nécessaire).

Il est aussi possible de préparer des émulsions de Pickering inverses, lesquelles nécessitent également l'utilisation d'énergie, sonication ou Ultra-Turrax par exemple. Bollhorst *et al.* ont utilisé les miniémulsions inverses pour préparer des colloïdosomes à partir de SiNP ou d'alumine dans le système eau / décane.¹⁴¹ Des colloïdosomes stables sont obtenus en utilisant des lipides comme tensioactifs (acide stéarique chargé - ou octadécylamine chargée +) et des nanoparticules de même charge (silice chargée - et alumine chargée +). L'hypothèse est que les lipides chargés se positionnent à l'interface huile / eau. Quand les NP s'adsorbent à cette même interface, les répulsions électrostatiques de surface entre les NP sont atténuées par les lipides qui agissent comme un électrolyte. Si des lipides et des NP de charges opposées sont utilisés, l'association n'est pas du tout contrôlée et des agrégats se forment rapidement. Le procédé est simple à mettre en œuvre et implique une étape de sonification (auto-association en colloïdosomes) puis une étape de centrifugation (lavage des espèces libres restantes et transfert des capsules dans l'eau tout en préservant leur stabilité) (**Figure 1. 30 A**). Des nanocapsules mixtes SiNP et NP d'alumine peuvent ainsi être obtenues, avec contrôle de l'arrangement, de la compacité et donc de la porosité de la coque (**Figure 1. 30 B**). La nature des particules utilisées (taille, forme) permet de moduler l'organisation de la coque et donc potentiellement sur la capacité de relargage de molécules encapsulées. Ces deux types de capsules (à base de SiNP ou de NP d'alumine), de par leurs charges opposées, peuvent encapsuler des molécules chargées positivement ou négativement. Cette approche de synthèse a aussi été appliquée à la fabrication de nanocapsules

à partir de nanodiamants¹⁴² ou d'un mélange de SPION et de NP fluorescentes, par exemple pour des applications théranostiques.¹⁴³

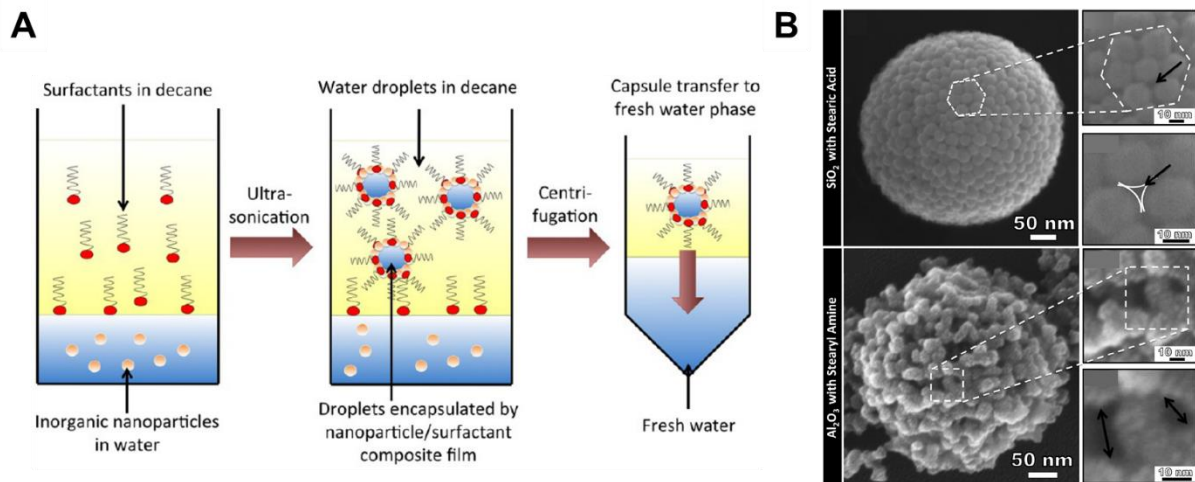


Figure 1. 30 – (A) Schéma de principe du procédé de fabrication de colloïdosomes par association de NP et de lipides de même charge dans une miniémulsion inverse. **(B)** Images MEB des capsules obtenues et visualisation de l'organisation au sein de la coque : colloïdosomes de NP de silice (haut) et d'alumine (bas).¹⁴¹

Plus récemment des nanocapsules de diamètres inférieurs à 100 nm ont été préparées par auto-association de très petites NP de métaux nobles à la surface d'émulsions de PVP (ligand des NP) en milieu basique.¹⁴⁴ La stratégie consiste à préparer des particules très petites avec la PVP comme ligand. En milieu basique, les liaisons hydrogène entre la PVP et l'eau sont défavorisées, ce qui se traduit par une solubilité diminuée et ainsi la formation d'une émulsion de PVP dans l'eau. Cette émulsion est stabilisée par les NP, qui servent ensuite comme semences pour la croissance de NP plus grandes. Le cœur de PVP peut ensuite être enlevé par lavages pour laisser place à une capsule colloïdale creuse (**Figure 1. 31 A**). Ces capsules ont des tailles inférieures à 100 nm, pouvant même descendre jusqu'à 30 nm de diamètre. La stabilité des NP à l'interface eau/huile est possible au vu de l'interaction PVP-NP, malgré leur taille très petite et donc l'instabilité aux interfaces inhérente. Cette approche est très flexible et permet de produire des nanocapsules composées de NP de métaux ou d'alliages si la croissance est réalisée avec un autre métal (**Figure 1. 31 B**). Cela ouvre ainsi la voie à des applications catalytiques et optiques originales.

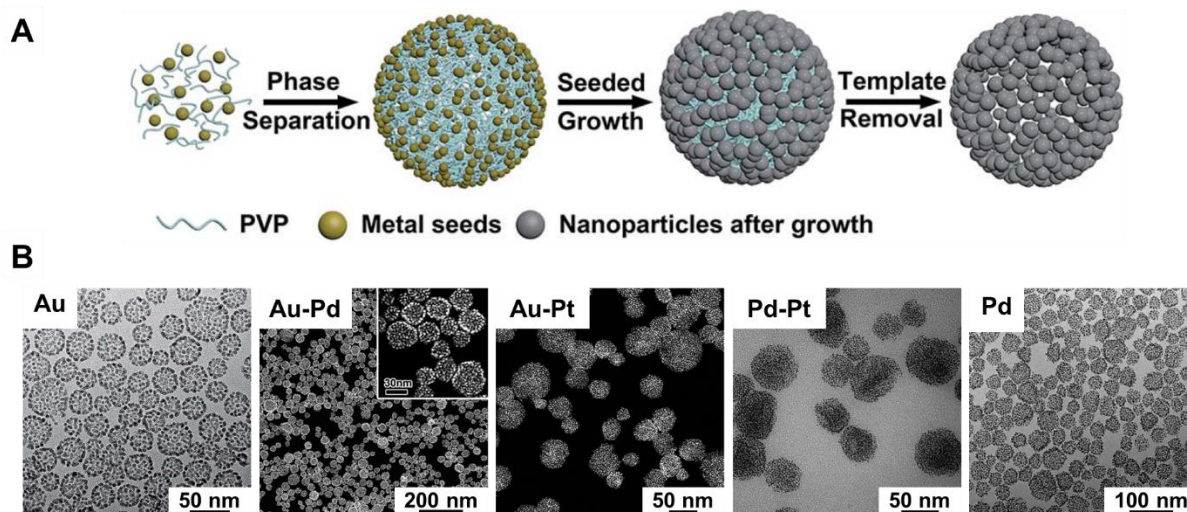


Figure 1. 31 – (A) Schéma de principe de la formation de capsules colloïdales par croissance de NP à partir de NP primaires à la surface d’émulsions de PVP. **(B)** Microscopie électronique (HAADF-STEM ou TEM) de nanocapsules colloïdales mono- ou bimétalliques obtenues par cette approche. (adapté de ¹⁴⁴)

1.3.2. Assemblage de nanoparticules autour d’un gabarit solide

Un support solide peut être utilisé à la place de gouttelettes d’émulsion pour assembler des NP. Il s’agit donc de l’adsorption de NP sur une autre NP solide de plus grande taille. F. Caruso a étudié longuement ce type d’assemblages autour des années 2000. La stratégie comporte plusieurs étapes, résumées en **Figure 1. 32**. Elle consiste tout d’abord à adsorber des polyélectrolytes à la surface de NP polymères (typiquement du polystyrène – PS) de plusieurs centaines de nm. Par exemple dans les premiers travaux de Caruso sur ce sujet, les latex de PS utilisés font 640 nm de diamètre et le polymère est un polycation.^{145,146} Suite à l’adsorption, le support est donc chargé positivement, ce qui permet alors l’adsorption de SiNP chargées négativement (25 nm de diamètre). Ainsi, la surface de l’assemblage passe alternativement d’une charge positive à une charge négative, en fonction des ajouts successifs de polycation et de SiNP (similairement au layer-by-layer, LbL).¹⁴⁷ L’avantage est de pouvoir moduler l’épaisseur de la coque et le nombre de couches de NP en fonction du nombre de cycles « ajout NP + ajout polyélectrolyte ». L’étape finale consiste à enlever le support polystyrène soit par dissolution dans le THF, ce qui donne une nanocapsule hybride de silice et de polymère, soit par calcination, auquel cas à la fois le PS et le polymère sont éliminés pour donner une nanocapsule composée uniquement de NP de silice. Au final, cette stratégie permet de moduler la taille de la coque et celle de l’objet en général, qui dépend de la taille du latex de départ. C’est une approche plutôt universelle qui permet d’utiliser de nombreux polyélectrolytes et NP inorganiques. En effet, cette technique a été appliquée pour la fabrication de capsules creuses de nanoparticules

magnétiques,^{148,149} d’AuNP,¹⁵⁰ d’oxydes métalliques autres que la silice comme du TiO₂,¹⁵¹ des NP de laponite¹⁵¹ ou encore des quantum dots (QD).¹⁵² On peut même se servir de cette technique pour former des capsules uniquement avec des polymères, en n’adsorbant successivement que des polymères de charges opposées.¹⁵³ Les nanocapsules finales restent néanmoins relativement grandes, souvent d’au moins 500 nm de diamètre.

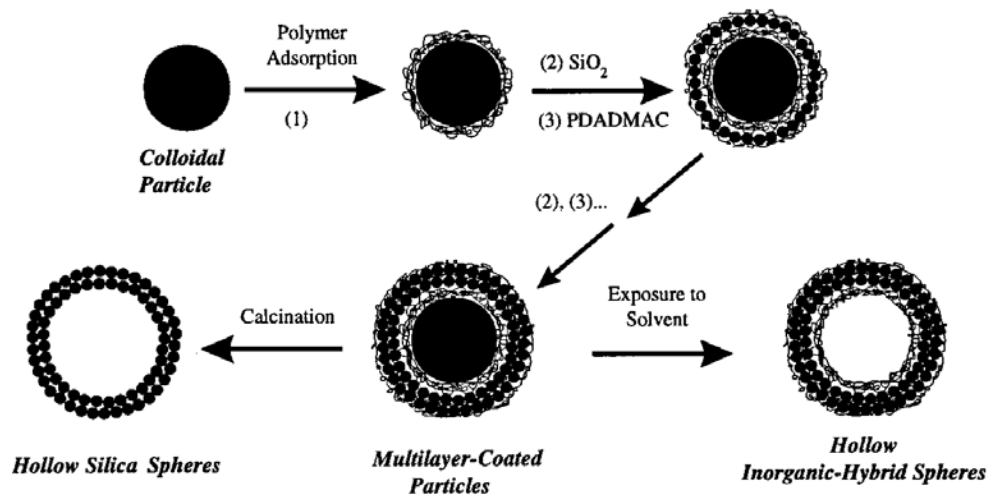


Figure 1. 32 – Schéma de principe du procédé de fabrication de nanocapsules colloïdales inorganiques ou hydrides (NP + polymère) par assemblage électrostatique layer-by-layer (LbL) autour d’un latex de polystyrène.¹⁴⁵

La NP support peut bien entendu être d’une autre nature que le PS. En particulier, les SiNP ont été largement utilisées.^{154–156} Tout comme les latex précédemment décrits, les SiNP ont l’avantage (i) d’être facilement disponibles à grande échelle avec une taille et dispersion de taille bien contrôlées, (ii) d’être commerciales ou facilement synthétisables et (iii) de présenter une élimination facile pour mener à des capsules creuses.¹⁵⁷ Un exemple original de l’utilisation d’un gabarit de silice est l’élaboration de nanocapsules de NP de métaux nobles (Pt et Pd) entourées de graphène (**Figure 1. 33**).¹⁵⁸ Les NP de métaux nobles sont synthétisées *in situ* à partir de précurseurs à la surface des SiNP préalablement rendue positives. Les particules de silice enrobées de métaux nobles sont alors mises en contact avec de l’oxyde de graphène qui s’adsorbe puis est réduit. Finalement une capsule creuse peut être obtenue en dissolvant le cœur de silice (soude concentrée). Cette stratégie, bien que comportant de multiples étapes, est facile à mettre en œuvre et permet d’obtenir des particules de tailles diverses en fonction des NP de silice utilisées au départ.

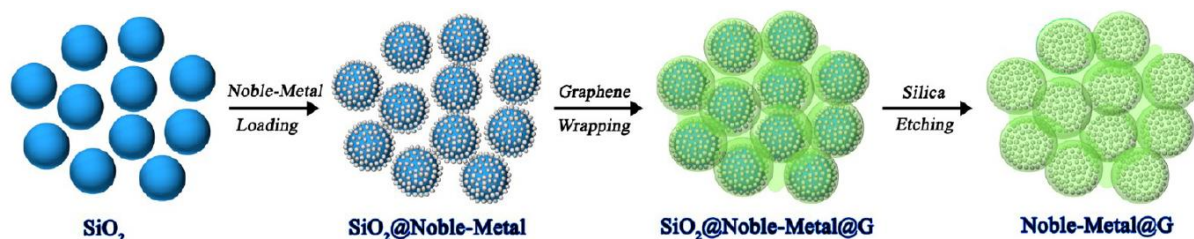


Figure 1.33 – Schéma du procédé d’élaboration de nanocapsules de NP de métaux nobles (Pt, Pd) et de graphène autour de NP de silice.¹⁵⁷

De plus, le support solide peut être une vésicule préformée, que ce soit un polymersome (membrane de copolymère à bloc) ou un liposome (bicouche lipidique). Par exemple, la stabilisation externe de liposomes avec des NP de PS a été montrée.¹⁵⁹ L’incorporation directe de NP dans la membrane de tels objets sera développée dans la suite de ce chapitre (cf. partie I.3.4).

Par ailleurs, il est possible d’utiliser des microgels comme gabarits pour la fabrication des nanocapsules. Par exemple, des nanobâtonnets d’or (chargés positivement) ont pu être assemblés à la surface de microgels de PNIPAM (chargés négativement) par interactions électrostatiques.^{160,161} L’objet obtenu, composé d’une couche de nanobâtonnets d’or, a ainsi la particularité de pouvoir varier en taille en fonction de la température et du pH (**Figure 1.34**). Les nanobâtonnets d’or se retrouvent donc à des distances différentes les uns des autres en fonction de l’état du microgel, ce qui se traduit par des propriétés optiques qui varient permettant par exemple d’utiliser ces objets pour mesurer des variations très fines de pH.

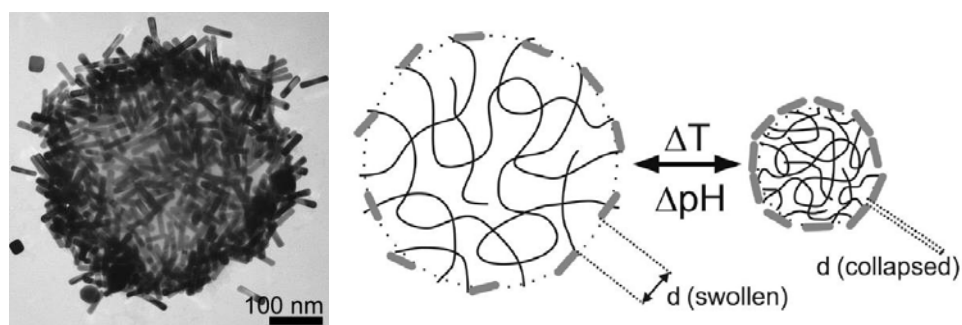


Figure 1.34 – Image TEM de nanobâtonnets d’or adsorbés à la surface d’un microgel de PNIPAM et représentation schématique de l’effet de gonflement/dégonflement en fonction de stimuli externes (température et pH). Ces variations d’organisation se traduisent par une modification des distances inter-NP.^{160,161}

Pour finir, Nakamura *et al.* ont travaillé sur l'adsorption d'AuNP autour de fullerènes déjà associés en vésicule¹⁶². Des anions de fullerènes amphiphiles (par exemple des fullerènes avec des chaînes fluorées) s'associent spontanément en bicouches pour former des vésicules dans l'eau, puis des AuNP s'adsorbent dessus pour créer une deuxième couche. Ainsi des nanocapsules de très petite taille (~30 nm de diamètre) et très robustes sont obtenues. La taille des nanoparticules peut être augmentée *in situ* par croissance à partir des NP déjà adsorbées. La partie suivante va justement traiter de l'assemblage de nanoparticules amphiphiles en nanocapsules.

I.3.3. Assemblage de nanoparticules amphiphiles

Les exemples illustrant cette voie de synthèse sont très nombreux. L'élaboration des nanocapsules repose ici sur l'utilisation de NP dont la surface est greffée de polymères, homopolymères hydrophobes ou hydrophiles ou copolymères à bloc amphiphiles. Trois méthodes permettent l'association de telles nanoparticules amphiphiles sous la forme de vésicules (**Figure 1. 29 C**) :¹²⁸

1. Une émulsification huile dans eau suivie de l'évaporation du solvant organique.
2. La dialyse du solvant contre l'eau (changement de composition de solvant).
3. La réhydratation de film préalablement séché.

Ces voies d'accès peuvent en particulier s'apprécier à travers les revues de Nie^{163,164} et Song^{165,166} ainsi que des exemples de leur travaux, que nous allons développer ci-après.

I.3.3.1. Nanoparticules amphiphiles modifiées par des homopolymères

De nombreuses publications de Song *et al.* portent sur la fonctionnalisation d'AuNP avec des homopolymères.¹⁶⁷ La stratégie consiste en deux étapes. En premier lieu, l'homopolymère hydrophile (typiquement le PEG) et l'amorceur de polymérisation, tous les deux thiolés, sont greffés sur la surface de la nanoparticule par liaisons Au-S. Dans un second temps, la croissance des chaînes hydrophobes depuis l'amorceur greffé en surface de la NP est réalisée en présence de monomère hydrophobe (polymérisation amorcée à la surface). La **Figure 1. 35 A** schématise cette voie d'accès aux NP amphiphiles fonctionnalisées par des homopolymères hydrophiles et hydrophobes. Différentes chaînes polymères hydrophobes ont ainsi pu être synthétisées depuis la surface des NP par polymérisation radicalaire¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ et par ouverture de cycle pour générer des polymères biodégradables.¹⁷¹ Il est aussi possible de greffer à la fois les chaînes hydrophiles et hydrophobes préformées par liaison covalentes Au-S.^{172,173} Des vésicules peuvent ensuite être préparées, par exemple par réhydratation de film ou émulsion-évaporation, avec la possibilité d'encapsuler un composé hydrophile. Des images TEM de nanovésicules obtenues par Song *et al.* grâce à cette stratégie sont visibles en **Figure 1. 35 B**.

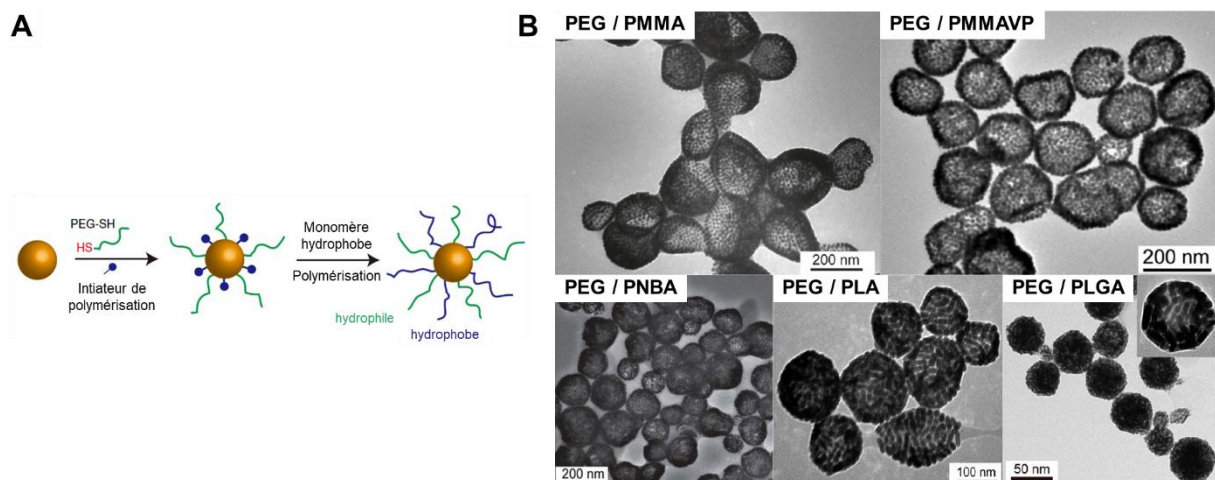


Figure 1. 35 – (A) Représentation schématique de la préparation de NP amphiphiles avec des homopolymères à la surface des NP. La synthèse comporte deux étapes : (i) co-greffage de l'homopolymère hydrophile et de l'amorceur de polymérisation, (ii) polymérisation des chaînes hydrophobes par polymérisation par transfert d'atomes (ATRP) ou par ouverture de cycle (ROP). (B) Images TEM de nanocapsules colloïdales formées à partir de nanoparticules amphiphiles présentant des homopolymères hydrophiles et hydrophobes en surface. (adapté de ^{167-171,173})

I.3.3.2. Nanoparticules amphiphiles modifiées par des copolymères à bloc

Les premières structures creuses par auto-organisation de NP amphiphiles concernaient des nanoparticules modifiées par des copolymères à bloc et non des homopolymères. Elles ont été rapportées par Zubarev *et al.* en 2006¹⁷⁴ et Nie *et al.* en 2007.¹⁷⁵ En greffant un copolymère à bloc PS-*b*-PEG (chaîne polymère coudée, « en forme de V ») à des nanoparticules d'or ou d'argent très petites (2 nm), Zubarev *et al.* sont parvenus à obtenir des structures tubulaires par réorganisation des NP suite à l'ajout d'eau dans la solution de THF puis dialyse. Nie *et al.* ont utilisé quant à eux des nanobâtonnets d'or hydrophiles dont les deux extrémités longitudinales étaient greffées de chaînes de PS. Ainsi, le nanobâtonnet modifié se présente comme une entité ABA, à savoir bloc hydrophobe – bloc hydrophile – bloc hydrophobe. Ces nanobâtonnets d'or modifiés permettent d'accéder à de multiples structures par ajout d'eau à la solution organique (THF ou DMF), dont des nanocapsules de plusieurs centaines de nanomètres. L'apparition de telles structures s'explique par la diminution de la solubilité des domaines hydrophobes lors de l'ajout d'eau. Étant donné l'association qui s'opère entre les régions hydrophobes, les vésicules obtenues possèdent une couche de polymère dense qui permet l'encapsulation efficace de principes actifs.¹²⁸

La grande variété des travaux dans ce domaine peut être abordée en particulier à travers les travaux de Nie *et al.* Des nanocapsules ont pu être obtenues par diverses méthodes, en particulier la réhydratation de film¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ et le changement de composition de solvant par ajout d'une grande quantité d'eau dans le mélange organique et/ou dialyse,¹⁷⁹⁻¹⁸¹ ou en microfluidique.¹⁸² Un exemple par émulsification-évaporation du solvant a aussi été rapporté.¹⁸³ Il s'agit la plupart du temps de nanoparticules d'or modifiées par des polymères à bloc amphiphiles, souvent du PS-*b*-PEO, bien que le PCL-*b*-PEO ait aussi été utilisé pour mener à des vésicules biodégradables.¹⁸⁰ Toutes ces nanocapsules à base d'AuNP sont généralement élaborées dans l'optique d'applications plasmoniques (décalage de la bande plasmon sous l'effet du couplage des AuNP), SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), pour l'encapsulation et le relargage contrôlés, la bioimagerie, la thérapie (thérapie photodynamique par exemple) ou encore pour la captation et la détection de polluants (cf. dernière partie de ce chapitre).

Les structures nanométriques obtenues par ces méthodes sont très variées, de l'agrégat de NP à la vésicule, en passant par des structures tubulaires ou des micelles. Il apparaît que la nature des structures obtenues à l'issue de l'auto-association dépend principalement du ratio entre les

domaines hydrophiles et hydrophobes, c'est-à-dire la taille relative des deux blocs, ainsi que de la taille des NP, que ce soit pour la réhydratation de film,¹⁷⁶ le changement de qualité du solvant (typiquement ajout d'eau et/ou dialyse)¹⁸¹ ou l'émulsion-évaporation.¹⁸³ Par exemple, la **Figure 1. 36** présente le diagramme de phase des différentes structures obtenues lors de l'ajout d'eau à une solution organique comprenant les AuNP-PS-*b*-PEO, en fonction de la taille des AuNP et de la masse molaire du bloc hydrophobe.¹⁸¹ Afin de comprendre les multiples structures obtenues, la déformabilité de ces AuNP amphiphiles se révèle être cruciale : (i) pour des petits blocs PS, les PEO ne peuvent pas se redistribuer et les AuNP ne peuvent donc s'agréger qu'en petits clusters. (ii) si les blocs PS sont suffisamment grands, les NP sont globalement plus déformables et les PEO peuvent efficacement se redistribuer en surface (le point d'ancrage sur la NP reste fixe mais la chaîne polymère se repositionne) pour *in fine* mener à la formation de vésicules.

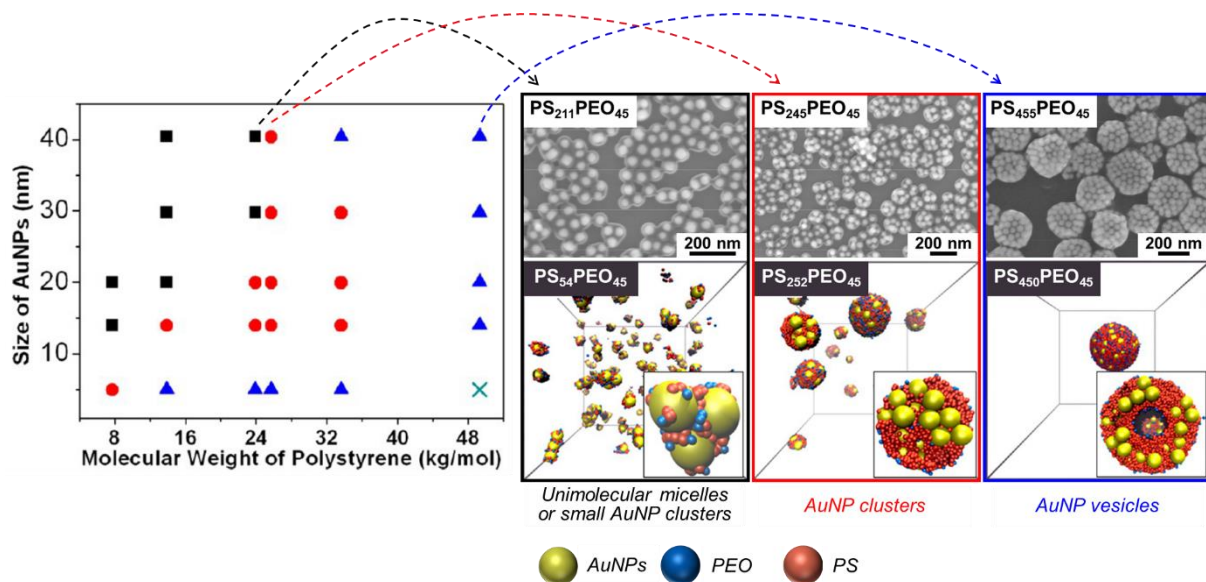


Figure 1. 36 – Diagramme de phase expérimental de l'auto-organisation d'AuNP amphiphiles suite à l'ajout d'eau dans la solution organique. La taille des AuNP et la masse molaire des blocs PS sont variées, tout en conservant des blocs hydrophiles de 45 unités monomères. Les images MEB des structures obtenues pour des AuNP de 40 nm sont présentées à droite du graphique. Lorsque la taille du bloc PS augmente, des transitions de phase sont observées entre des « micelles » de nanoparticules uniques (■), puis des clusters de plusieurs particules (●) et finalement des vésicules (▲). À noter que des précipités (×) peuvent apparaître pour des très petites AuNP et de très grands blocs PS. Les résultats des simulations sont présentés en dessous des images MEB, montrant une bonne correspondance avec les résultats expérimentaux et le même type de transitions de phase. (adapté de ¹⁸¹)

La fabrication des nanocapsules à partir de nanoparticules amphiphiles a par ailleurs été démontrée dans des dispositifs microfluidiques, par exemple pour des nano bâtonnets d'or modifiés par du PS-*b*-PEO (AuNR-PS-*b*-PEO) dans un système « THF/eau ».¹⁸² Plus précisément, la puce microfluidique dispose d'un canal où circule du THF, dans lequel se trouvent les NP,

entouré de deux canaux où circule de l'eau. La modification du flux hydrodynamique permet d'atteindre des assemblages hors-équilibre. Cela permet de varier à la fois les structures obtenues (micelles, vésicules ou structures en forme de disques) ainsi que leur taille. Les vésicules présentées dans cet article sont pour la plupart « géantes » mais il est possible de diminuer la taille des vésicules jusqu'à 500 nm en augmentant le débit de THF à débit d'eau constant. Cette approche a l'avantage de permettre la formation des nanostructures en continu et de pouvoir contrôler leur morphologie et leur taille.

La densité de greffage des chaînes polymères en surface des NP joue bien entendu un rôle dans l'auto-association. Ceci a pu être démontré avec des AuNP-PS-*b*-PEO présentant différentes densités de greffage δ .^{179,184} Sous l'effet d'ajout d'un peu d'eau à la solution de NP dans le THF, des chaînes ou bien des films d'AuNP se forment. L'apparition d'une structure ou de l'autre dépend de δ et des interactions majoritaires. Ainsi, à δ importante, la distance entre particules est importante (les chaînes polymères sont longues) : les attractions de van der Waals (vdW) sont faibles et les répulsions stériques importantes. Toutefois, les interactions hydrophobes entre chaînes sont fortes et permettent l'association des particules par les côtés, menant typiquement à des films 2D (**Figure 1. 37 A**). Lorsque δ est faible, les NP peuvent être plus proches et les interactions attractives de vdW sont plus intenses et permettent l'association de deux NP. Les chaînes polymères se réorganisent alors avec une moindre densité au point de contact des NP. Ainsi de suite, des chaînes 1D se forment, avec la fusion des AuNP au niveau de leur point de contact (**Figure 1. 37 B**). Lorsque plus d'eau est rajoutée encore, des vésicules se forment du fait de l'incompatibilité croissante des NP amphiphiles avec le milieu. Ces vésicules possèdent ainsi une paroi composée de NP régulièrement espacées ou de chaînes de NP, respectivement. Dans le cas des chaînes de vésicules, la grande proximité spatiale induit un fort couplage plasmonique menant à une absorption dans le proche IR.

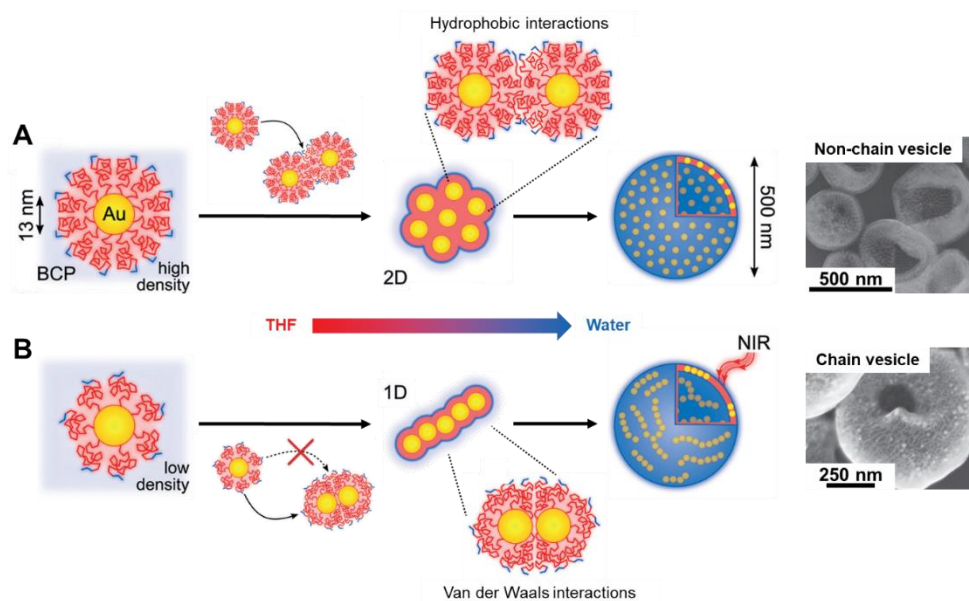


Figure 1. 37 – Mécanisme de formation de **(A)** films 2D ou de **(B)** chaînes 1D d’AuNP amphiphiles en fonction de la densité de greffage des BCPs et sous l’effet du changement de qualité de solvant. Avec un ajout d’eau plus important, ces assemblages s’organisent en vésicules présentant une paroi avec des NP régulièrement espacées ou sous forme de chaînes, respectivement. (adapté de ^{179,184})

Par ailleurs, le groupe de Nie a aussi été en mesure de préparer des nanocapsules colloïdales à partir d’AuNP amphiphiles grâce à la méthode d’émulsification-évaporation.¹⁸³ Les AuNP amphiphiles dans le solvant sont émulsifiées dans l’eau en présence de tensioactif. Une fois le solvant évaporé, des nanocapsules se forment (>500 nm). Différents types d’assemblages peuvent ainsi être préparés en fonction de la taille des NP et de la longueur du bloc hydrophobe, comme vu précédemment. Les vésicules plasmoniques avec la plus grande sensibilité et efficacité SERS sont obtenues pour les plus grosses particules et la plus grande longueur de blocs hydrophobes. Les blocs hydrophobes peuvent servir pour la captation de molécules organiques.

À noter qu’il est aussi possible de modifier des NP avec des **copolymères triblocs**, par exemple des NP de CdS modifiées par le PS-*b*-PAA-*b*-PMMA.¹⁸⁵ Le PAA est lié de manière covalente à la NP, qui se retrouve donc recouvert de chaînes de PS et de PMMA. Le PMMA est par la suite hydrolysé pour mener à des groupements PAA. Ces groupes hydrophiles ionisables sont responsables des diverses organisations observées (dont des vésicules) en faisant varier les interactions électrostatiques, par exemple en utilisant du sel. Cette approche « ionique » mène à des structures complexes avec un très bon contrôle. Le même genre de comportement où le polymère se fixe sur l’AuNP grâce au bloc du milieu est rapporté avec le PEO-*b*-P(LAMP-co-GMA)-*b*-PS.¹⁸⁶

Pour finir, les travaux de Niikura *et al.* portant sur des AuNP modifiées par des ligands semi-fluorés sont intéressants car ils permettent l'organisation de NP sous forme de vésicules en ajoutant seulement un tout petit peu d'eau : l'auto-organisation a lieu spontanément dans le solvant organique (THF ou dioxane par exemple) lors de l'échange de ligand. Ces ligands se composent d'une partie alkylthiolée en contact avec l'AuNP, une partie intermédiaire tétraéthylène glycol fluoré et finalement une partie vers l'extérieur oligo(éthylène glycol),^{187,188} glucose¹⁸⁹ ou bien encore acide carboxylique.¹⁹⁰ La modulation de la terminaison du polymère permet par exemple d'accéder à des structures de type «coquille/jaune d'œuf» lorsque le glucose est employé (**Figure 1. 38**) avec la ségrégation des deux populations d'AuNP de tailles différentes : les grosses AuNP au centre et les petites en périphérie. L'utilisation d'acides carboxyliques permet quant à elle de moduler les interactions électrostatiques entre AuNP.

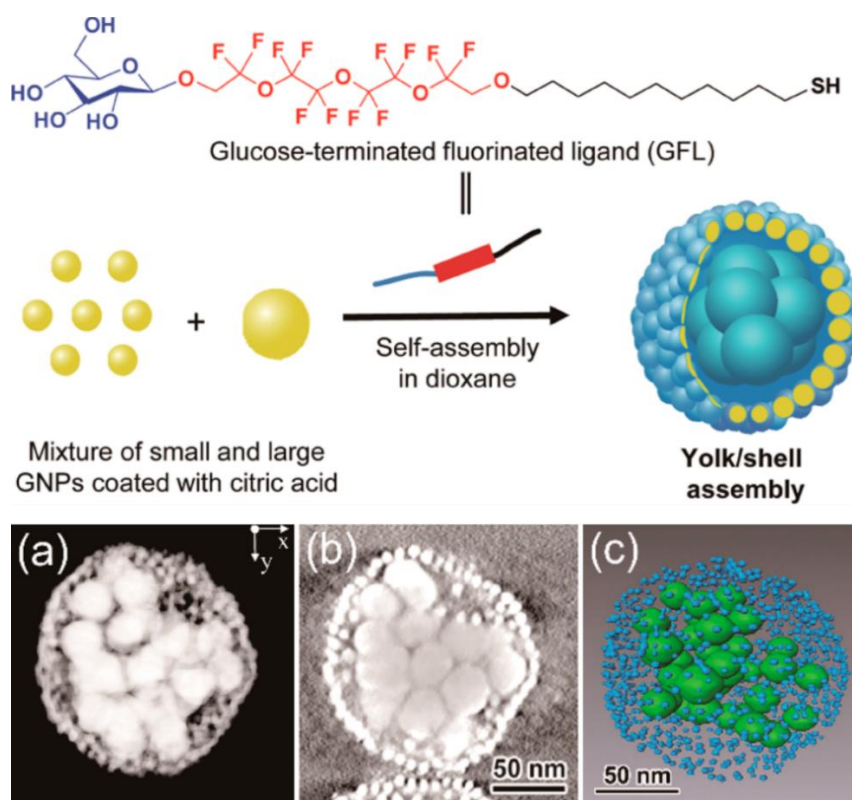


Figure 1. 38 – Schéma de principe de l'association d'AuNP de tailles différentes en structures «coquille/jaune d'œuf» en présence de GFL dans le dioxane. **(a)** Reconstruction TEM 3D des assemblages obtenus avec des AuNP de 5 nm et de 30 nm. **(b)** Coupe au milieu de l'assemblage. **(c)** Représentation schématique de la position des différentes AuNP à partir de la reconstruction 3D.¹⁸⁹

I.3.3.3. Nanoparticules amphiphiles en présence de copolymères à bloc « libres »

Un cas intéressant est aussi celui de l'auto-association de NP amphiphiles en présence de copolymères à bloc (BCP) libres. Dans une publication de 2014, Nie *et al.* explorent le co-assemblage d'AuNP amphiphiles (AuNP-HS-PS-*b*-PEO) et de BCP libre (PS-*b*-PEO). Cet assemblage est provoqué par l'ajout d'eau à un mélange d'AuNP amphiphiles et de BCP dans le THF suivie d'une dialyse.¹⁹¹ Des nanocapsules colloïdales diverses sont obtenues en fonction notamment de la taille des AuNP et de la taille des blocs des BCPs libres et ceux greffés sur les AuNP. Des structures hétérogènes se forment, telles que des vésicules à patches ou encore des vésicules Janus (**Figure 1. 39**). Ces multiples structures ainsi obtenues sont en grande partie contrôlées par l'entropie. En effet, les nanoparticules amphiphiles et les BCP libres s'organisent en domaines différents afin de donner plus de liberté aux chaînes polymères et ainsi maximiser l'entropie conformationnelle. Ce sont ensuite les effets de tailles des différents blocs qui dirigent la formation de telle ou telle structure. La concentration en AuNP permet quant à elle d'ajuster le taux de recouvrement des vésicules par les AuNP. Au niveau des NP elles-mêmes, on peut voir que des NP portant de très longues chaînes polymères ont une mobilité fortement réduite, ce qui mène à la formation de vésicules où les NP sont distribuées uniformément dans la membrane. Cette stratégie est très intéressante pour contrôler précisément les structures obtenues en termes de morphologie et d'arrangement des NP dans la paroi grâce à de multiples paramètres modifiables (taille des NP, rigidité, longueur des copolymères utilisés, etc).

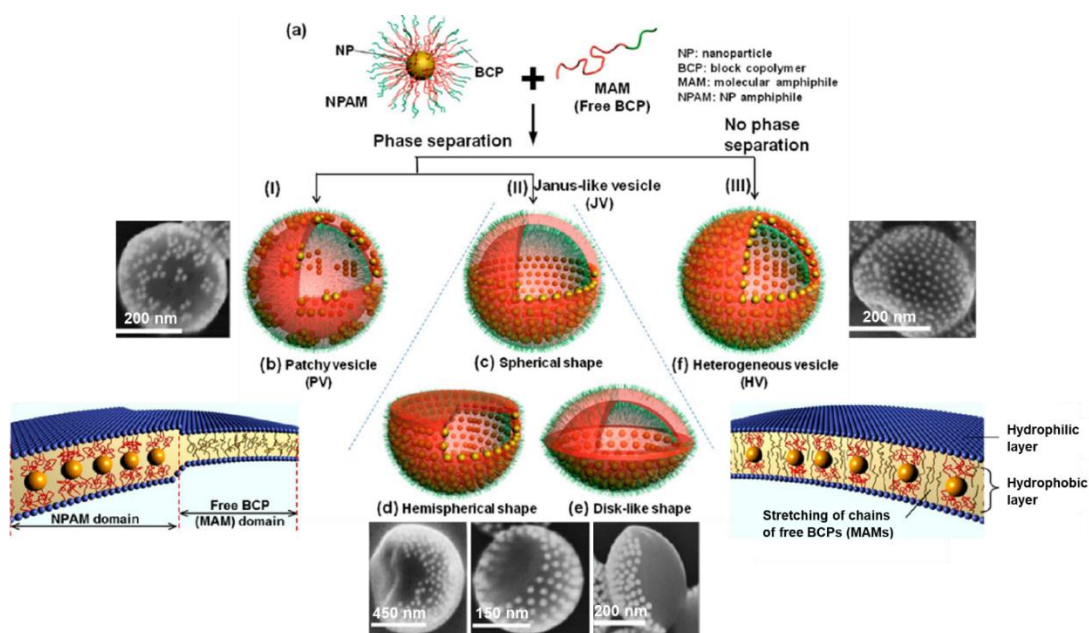


Figure 1. 39 – Représentation schématique des différentes structures obtenues par (a) le co-assemblage de nanoparticules amphiphiles (NPAM) et de copolymère à bloc libre (MAM) dans une solution eau/THF (75 %vol THF). Les images MEB de chaque assemblage sont par ailleurs présentées. La séparation de phase entre NPAM et MAM (I et II) conduit à la formation de nanocapsules présentant des domaines ségrégués de NPAM d’une part et de MAM d’autre part avec des morphologies diverses : (b) vésicules à patches, (c) vésicules Janus sphériques, (d) hémisphériques ou bien (e) en forme de disque. Si la séparation de phase n’a pas lieu (III), des vésicules hétérogènes sont obtenues avec une distribution uniforme de NPAM dans la paroi (f). (adapté de ¹⁹¹)

Au-delà des AuNP, d’autres NP peuvent être utilisées, comme les SPION, par exemple, des SPION modifiées par du DOPA-PS-*b*-PEO en présence de PS-*b*-PAA libre.¹⁹² Les PAA ont la particularité de présenter une forte affinité pour les oxydes de fer. Lorsque les SPION-BCP sont exposées à l’eau, elles se réorganisent pour favoriser le contact du PEG avec l’eau et la protection des groupements hydrophobes au milieu de la paroi vésiculaire et ainsi diminuer l’énergie interfaciale : des vésicules avec une seule couche de NP sont obtenues. Quand du PS-*b*-PAA est ajouté, il peut venir se greffer sur les SPION grâce à l’affinité entre les acides carboxyliques et l’oxyde de fer. Ce sont plutôt les groupements PS des PS-*b*-PAA qui se disposent vers l’extérieur et qui renforcent donc le caractère hydrophobe des SPION. Le contact entre les groupements PEG et l’eau est toujours favorisé. La taille du domaine hydrophobe dans la membrane augmente ainsi et des parois de deux voire plus de couches de NP sont observées. Le rapport massique entre la quantité de BCP libre et de SPION-BCP permet donc de moduler l’épaisseur de paroi obtenue (**Figure 1. 40**). L’assemblage des SPION dans la coque de la vésicule induit une augmentation de la magnétisation globale de la vésicule et de la relaxivité transversale r_2 , d’autant plus importante que le nombre de couches dans la paroi est importante.

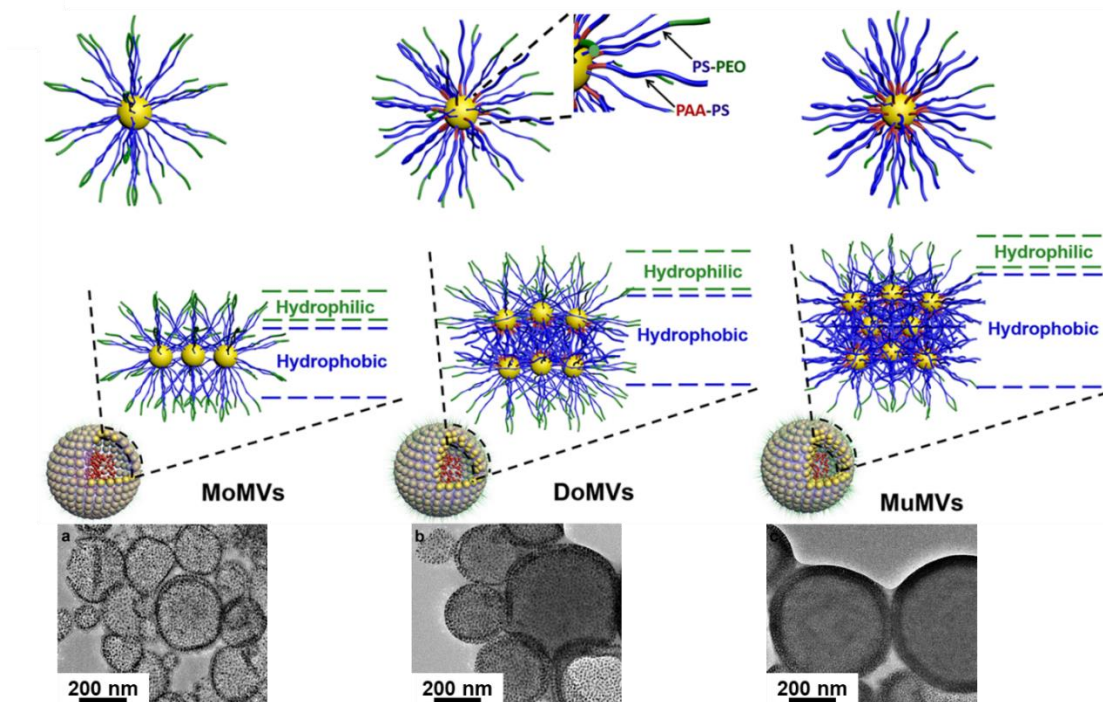


Figure 1. 40 – Structure des vésicules magnétiques avec une couche (MoMVs), deux couches (DoMVs) ou plusieurs (>2) couches (MuMVs) de SPION dans la coque pour différents ratio massiques BCP / SPION sous l’effet des interactions entre les SPION-BCP et le PS-*b*-PAA libre. Un exemple d’image TEM est présenté pour chaque type de vésicules. (adapté de ¹⁹²)

I.3.4. Chargement de nanoparticules dans la membrane de liposomes ou de polymersomes

À la fin de la partie précédente, des vésicules formées en présence de copolymères à bloc et de NP amphiphiles ont été présentées. Il s’agit finalement d’une sorte de polymersomes colloïdaux mais avec des nanoparticules amphiphiles. Ici nous allons aborder les polymersomes et liposomes comportant des NP non modifiées. Des exemples variés peuvent être trouvés dans la littérature. Les liposomes et polymersomes sont deux types de vésicules qui se différencient par la nature de leur paroi, composée de phospholipides ou de polymère à bloc, respectivement. Ces structures ont l’avantage intrinsèque de pouvoir encapsuler des composés hydrophiles dans la cavité interne de la vésicule mais aussi des composés hydrophobes dans la membrane. La **Figure 1. 41** présente deux exemples de polymersomes et de liposomes encapsulant des NP inorganiques dans leur membrane.

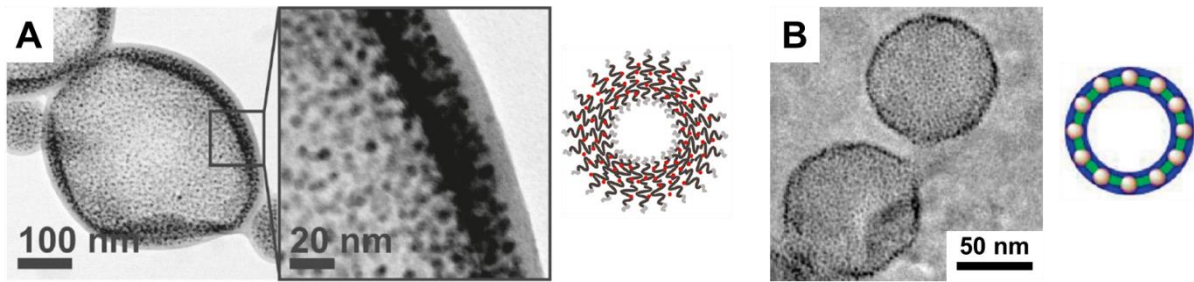


Figure 1. 41 – Exemples de polymersomes et liposomes dont la membrane est chargée en nanoparticules. **(A)** Image de microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) et représentation schématique de polymersomes PS-*b*-PAA chargés en SPION – acide oléique. **(B)** Image cryoTEM et représentation schématique de liposomes (phosphatidylcholine) chargés en AuNP – dodécane-thiol (< 2nm). (adapté de ¹⁹³ et ¹⁹⁴)

Bien qu'initialement des polymersomes magnétiques aient été fabriqués par encapsulation des NP directement dans le cœur aqueux, l'incorporation de NP dans la paroi des polymersomes a aussi été étudiée, notamment par Lecommandoux *et al.* Des polymersomes magnétiques ont ainsi été préparés par incorporation de NP de maghémite d'environ 5 nm dans une paroi de copolymère à bloc PTMC-*b*-PGA.¹⁹⁵ Cette synthèse consiste en la nanoprécipitation du polymère et des NP initialement présentes dans le DMSO. Cette voie de synthèse par ajout d'eau au solvant organique, suivi d'une dialyse contre l'eau, est celle typiquement employée pour ce genre d'objets. D'autres exemples de vésicules existent avec des membranes mixtes de SPION et de copolymère PB-*b*-PGA.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Nous pouvons également citer les travaux de Park *et al.* En premier lieu, cette équipe a réussi la synthèse de particules polymères cœur – coquille à partir de nanoparticules alkyles (QD-TOPO ou SPION-acide oléique) en présence de PS-*b*-PAA.^{199,200} Pour les deux types de NP, une structure avec un cœur et une coque polymères se forme, avec les NP à l'interface entre le cœur et la coque (c'est-à-dire entre les deux blocs du PS-*b*-PAA). *A contrario*, en utilisant des SPION-PS, les NP sont incorporées partout dans l'assemblage de polymère, sans localisation préférentielle.²⁰¹ En effet, les groupements PS ont une affinité avec le polymère (ici les blocs PS) plus importante que les groupements alkyl. Cette étude démontre par ailleurs que la quantité et la taille des NP joue un rôle pour l'obtention de structures bien définies. Des polymersomes comprenant des NP de part et d'autre de la membrane polymère ont pu être formés en co-assemblant des AuNP-MUL (11-mercapto-1-undécanol) principalement hydrophobes et du PS-*b*-PAA ou PEO-*b*-PLA.²⁰² Le MUL est principalement hydrophobe mais le groupement alcool tend à avoir un peu d'affinité avec l'eau, ce qui explique le placement des AuNP de part et d'autre de la membrane, c'est-à-

dire à l'interface eau/compartiment hydrophobe. Des vésicules avec des parois composées de multicouches de NP sont alors formées.^b

Une étude supplémentaire sur l'assemblage de SPION-acide oléique en présence de PEG-*b*-PS en présence d'eau dans différents solvants (DMF, THF, dioxane) montre l'influence des NP, des polymères et des solvants sur la nature des objets obtenus.¹⁹³ Les interactions solvant-polymère et NP-polymère expliquent la morphologie des objets obtenus ainsi que l'arrangement des NP. Ainsi, si le solvant (dans lequel le polymère et les NP sont dispersés au départ) est un bon solvant pour les NP et le polymère (par exemple le THF), des micelles sont formées suite à l'ajout d'eau, il n'y a pas de ségrégation entre les particules et le polymère (**Figure 1. 42 A ii**). Dans le cas d'un solvant avec une interaction entre le solvant et le bloc PS faible (par exemple le DMF), des structures cœur-coquille sont formées, avec la ségrégation du PS et des NP, comme ce qui a été décrit précédemment (**Figure 1. 42 A i**). Si le solvant utilisé est cette fois-ci du dioxane, un mélange de micelles et de polymersomes est formé (**Figure 1. 42 A ii et iii**). La proportion de micelles et de polymersomes dépend de la longueur du bloc hydrophobe dans le copolymère et de la concentration en NP. Notamment, une plus grande concentration en nanoparticules induit une augmentation du volume hydrophobe et donc une transition des micelles vers les polymersomes. En effet, le polymère devient plus symétrique en termes de volume occupé par les deux blocs et tend à former des vésicules. On comprend donc ainsi que la longueur des deux blocs (et donc leur volume) influe aussi sur le type de structure obtenue en présence de NP. L'augmentation de la concentration en NP se traduit en même temps par une augmentation de la rigidité des vésicules. De plus, l'influence de la taille des NP (SPION-acide oléique en présence de PS-*b*-PAA) a été explorée plus en détail.²⁰⁴ Plus la taille des NP est grande, plus la proportion de polymersomes obtenus par rapport aux micelles est importante, l'incorporation de grandes NP dans la membrane de vésicules étant entropiquement favorisée. Par ailleurs, il est montré que la taille des NP détermine la taille des polymersomes. En effet, la bicouche des polymersomes est asymétrique, dans le sens où les blocs hydrophile et hydrophobe de chaque chaîne ne sont pas aussi contraints. Ainsi dans la couche extérieure, le PAA a plutôt un volume relatif plus important que celui du bloc PS « comprimé vers l'intérieur ». C'est l'inverse pour la couche interne, où le PAA a un volume relatif plus restreint que celui du PS. Les NP hydrophobes tendent donc à se

^b Bien que cela n'entre pas dans le cadre des polymersomes, ces mêmes AuNP-MUL peuvent être assemblées directement en vésicules sans besoin de gabarit grâce au réarrangement des ligands principalement hydrophobes suite à l'ajout d'eau.²⁰³

placer dans le bloc PS ayant le plus d'espace libre, c'est-à-dire dans la couche interne de la membrane (**Figure 1. 42 B**). La localisation préférentielle des NP dans cette couche interne fait que le volume du bloc PS de la couche interne augmente lorsque la taille des NP augmente. Cela se traduit par une courbure qui augmente et donc une taille de polymersomes plus faible. La taille des NP est donc un outil pour faire varier la taille des capsules colloïdales obtenues.

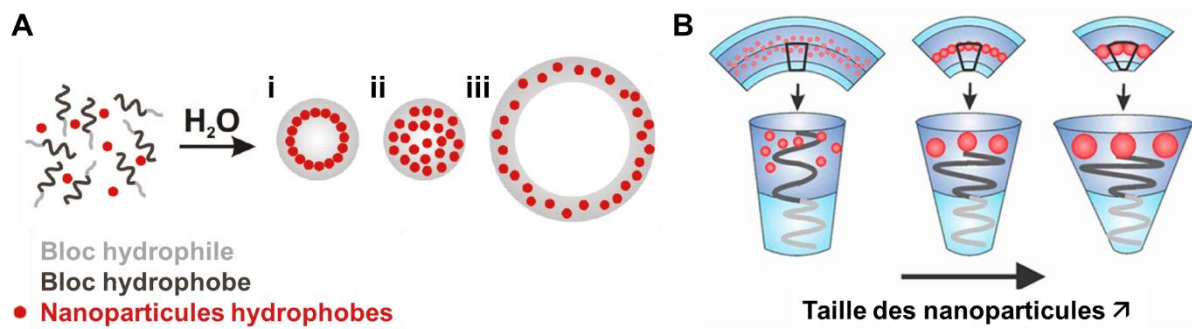


Figure 1. 42 – (A) Différents types d'assemblages copolymères amphiphiles/nanoparticules hydrophobes obtenus lors de l'ajout d'eau à une solution organique : structure cœur-coquille (i), micelle (ii) ou polymersome (iii). Les objets obtenus varient en fonction du solvant utilisé : DMF → cœur-coquille ; THF → micelles ; dioxane → mélange de micelles et de polymersomes (adapté de ¹⁹³). **(B)** Influence de la taille des NP sur la taille des polymersomes. Plus les NP sont grandes, plus elles augmentent le volume hydrophobe, ce qui a pour effet de courber la vésicule et donc d'en diminuer la taille.²⁰⁴

Au-delà des polymersomes, la membrane des liposomes peut aussi incorporer des NP. Cette membrane se compose d'une bicouche de phospholipides. Ce type d'objets a été fabriqué et caractérisé pour la première fois par Bangham en à partir de la fin des années 1960.^{205,206} Les liposomes sont développés depuis de nombreuses années et ont prouvé leur intérêt en particulier dans le domaine pharmaceutique.²⁰⁷

Au vu de leur histoire, les liposomes s'imposent donc comme des outils de premier choix pour des applications biomédicales. Pour ces applications, les NP peuvent apporter des propriétés supplémentaires intéressantes. L'incorporation de NP d'oxyde de fer a été étudiée pour les propriétés magnétiques. Par exemple, des SPION de 5 nm de diamètre ont pu être incorporées dans des liposomes de DSPC et de PEG-PE.²⁰⁸ La méthode consiste à former un film sec contenant tous les composants puis à le réhydrater et à extruder le mélange pour obtenir les liposomes finaux. Ceux-ci comportent au final une membrane lipidique avec des NP incorporées. Les NP induisent localement une déformation qui se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la

membrane. Les NP ne sont incorporées que si elles possèdent des ligands très fortement ancrés et une taille inférieure à 6,5 nm.²⁰⁹ Cette observation sur l'importance de la taille a également été vérifiée avec des QD CdSe stabilisés par l'oxyde de triéthylphosphine : les QD de 5 nm étaient intégrés à la membrane lipidique alors que ceux de 8 nm ne l'étaient pas.²¹⁰ La formation de liposomes avec des SPION dans la membrane lipidique a par ailleurs été réalisée sans réhydratation de film mais en ajoutant de l'eau à une solution de chloroforme contenant tous les composants, suivi de l'évaporation du solvant à pression réduite.²¹¹ Il est également possible d'incorporer des SPION dans la membrane lipidique en empruntant une autre voie à partir de liposomes préformés.²¹² Ceux-ci sont mis en présence de SPION stabilisés par un mélange de ligand (acide oléique) et de tensioactif (qui assure leur stabilité dans l'eau). En présence du tensioactif, les liposomes se désagrègent et des SPION individuelles recouvertes de ligand, de tensioactif et de lipides sont obtenues. Il suffit alors de dialyser pour éliminer petit à petit le tensioactif et induire la reformation des bicouches lipidiques et *in fine* des liposomes « Janus » présentant des paquets de SPION à un pôle du liposome. L'avantage est cette fois de pouvoir accommoder dans la membrane des clusters de SPION (lesquels se sont formés lors de la dialyse) jusqu'à 60 nm et donc de dépasser la limite des 6,5 nm possible pour l'incorporation dans la membrane. Cette agrégation des NP dans la membrane apporte des caractéristiques singulières, par exemple un meilleur effet de contraste IRM. Des liposomes chargés en AuNP ont aussi été obtenus par ces approches de réhydratation de film et de dialyse en présence de tensioactifs^{194,213} ainsi qu'en CO₂ supercritique.²¹⁴ On peut également noter la préparation de liposomes chargés en NP d'argent.²¹⁵ Toutefois, on connaît encore peu l'influence de la présence des NP sur la stabilité et les propriétés des bicouches lipidiques.

I.4. Apport des capsules de nanoparticules inorganiques pour les applications biomédicales

Pour finir ce chapitre introductif, nous allons aborder rapidement l'apport des nanoparticules inorganiques pour diverses applications biomédicales, en particulier pour l'imagerie et la thérapie, sans oublier les considérations liées à leur taille et leur toxicité.

I.4.1. Importance de la taille

Une très grande partie des travaux entrepris avec des nanocapsules colloïdales de NP inorganiques portent sur des applications biomédicales. Pour ce domaine d'application, l'attention doit en premier lieu porter sur une caractéristique des NP : leur taille. Celle-ci doit être précisément contrôlée car c'est un paramètre clé influant sur la biodistribution des NP et l'accumulation préférentielle dans certains organes. En effet, la taille influence l'élimination des NP, en particulier l'adsorption par les protéines du sang (c'est l'étape d'opsonisation) qui permet par la suite une prise en charge par les macrophages. L'accumulation plus ou moins importante dans le foie et les reins est dépendante de la taille. Globalement, on peut dire que les NP de très petite taille (< 5 nm) sont éliminées rapidement par les reins, alors que les particules de taille supérieure à 10 nm sont capturées par les cellules phagocytiques et finissent principalement dans le foie.^{216,217} Bien sûr, l'état de surface (par exemple la présence d'une couronne de PEG autour de la NP empêchant l'opsonisation), la présence de groupements chimiques spécifiques de ciblage ou encore la forme jouent sur la pharmacocinétique des NP.^{218,219}

Par ailleurs, le devenir des NP et des assemblages de NP dans les tumeurs et dépendant de l'effet EPR (Enhanced Retention and Permeation effect).²²⁰ Cet effet permet à des NP relativement grosses de pouvoir s'infiltrer dans les tissus tumoraux, alors que ce n'est pas le cas dans les tissus sains. En effet, les tissus tumoraux subissent une croissance très rapide qui induit la formation de nombreux nouveaux vaisseaux (angiogenèse) de manière archaïque et de défauts vasculaires. La paroi des vaisseaux sanguins se retrouve donc plus perméable, avec plus de distance entre les cellules endothéliales. Ainsi, des NP entre 20 et 200 nm peuvent s'accumuler préférentiellement dans ces tumeurs. C'est le ciblage passif. De plus, il y a souvent une absence de vaisseaux lymphatiques fonctionnels dans les tumeurs,²²¹ de l'hypertension locale limitant la convection et une matrice extracellulaire dense limitant la diffusion, ce qui renforce la rétention dans les tumeurs.^{222,223} L'effet EPR est un phénomène très séduisant et qui a été mis à contribution dans la majorité des travaux visant à l'accumulation de NP dans des tumeurs. Ainsi, l'objet idéal semble

avoir une taille inférieure à 200 nm et supérieure à la dizaine de nanomètres, pour pouvoir circuler suffisamment longtemps et ne pas s'infiltrer également entre les cellules endothéliales saines. Il faut toutefois souligner que, malgré l'engouement qu'il a suscité, l'effet EPR est efficace chez les rongeurs mais pas ou très peu chez l'homme. Il reste toutefois très cité dans les travaux scientifiques.^{222,224}

I.4.2. Toxicité des NP inorganiques

La toxicité des NP inorganiques peut être non négligeable, par exemple lorsqu'elles contiennent du cadmium, comme beaucoup de QD (de nombreuses références sont disponibles dans la revue²¹⁷). La toxicité provient principalement des ions Cd^{2+} qui sont relargués et mènent à la formation de radicaux libres. Le relargage et donc la toxicité peuvent être diminués en ajoutant une couche de protection (par exemple ZnS ou silice) autour du QD. Une couche de silice autour des quantum rods (QR) a par exemple montré une quasi absence de toxicité. L'inconnue réside dans la durée de protection de cette couche superficielle, sachant que la couche de ZnS se dégrade dans les cellules. Le cadmium semble donc s'accumuler dans le corps et les effets à long terme ne sont pas connus, bien qu'aucune toxicité n'ait été relevée même *in vivo* chez les macaques.²²⁵ Le ligand de surface peut également induire une toxicité.

Pour ce qui est des AuNP, elle apparaissent relativement peu toxiques.²²⁶ Toutefois, la taille joue sur la toxicité. Ainsi, les AuNP < 5 nm sont plus toxiques que celles > 15 nm. Des petites AuNP peuvent par exemple entrer dans le noyau des cellules.^{217,227} Par ailleurs, des AuNP avec des ligands de surface cationiques (amines) sont toxiques, contrairement aux anioniques (acides carboxyliques).^{228,229} De manière générale la toxicité des AuNP est toutefois faible.

Finalement, les SPION sont souvent considérées comme biocompatibles et sans toxicité, y compris pour des formulations commerciales.²³⁰ Toutefois, la taille ainsi que la chimie de surface influent sur leur élimination et leur toxicité.²³¹ Les plus petites SPION s'accumulent plus dans les cellules *in vitro* et montrent une toxicité à haute dose. Les SPION recouvertes de PEG ne montrent pas de toxicité *in vivo* sur des souris, tout comme les SPION-albumine, alors que c'est le cas pour les SPION recouvertes de PEI.^{231,232} Les SPION-PEI sont chargées positivement et s'agrègent rapidement dans le plasma. Leur internalisation cellulaire est plus importante que les SPION-PEG et leur toxicité est attribuée à l'influence du PEI dans la cassure de la membrane cellulaire (menant à la mort nécrotique) et de la membrane mitochondriale (menant à la mort apoptotique). La

toxicité des SPION-PEI envers les macrophages et les cellules cancéreuses est importante, même à faible concentration.²³¹ La cytotoxicité n'apparaît qu'au bout de 48h quand le cœur de la particule commence à se décomposer, avec une augmentation notable de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui semble être la source principale de toxicité des SPION. La taille et la chimie de surface sont donc des éléments clés pour la toxicité.

I.4.3. Apport des NP inorganiques pour la thérapie et le diagnostic

Que ce soit pour l'imagerie ou la thérapie (ou les deux), les NP inorganiques sont des alliées de choix dans le domaine biomédical. Ces applications peuvent être particulièrement illustrées par quelques types de NP inorganiques très répandues : les NP plasmoniques, les NP magnétiques et les NP semi-conductrices.^{217,226,233,234}

Il est utile de décrire rapidement quelques techniques d'imagerie où les NP inorganiques sont utilisées. Par exemple, l'**imagerie optique** utilise le contraste optique (diffusion, absorption, luminescence) pour sonder l'environnement et effectuer un diagnostic, mais aussi pour aider à la chirurgie.²¹⁷ Bien qu'elles sont développées depuis longtemps et qu'elles présentent une résolution spatiale importante, ces techniques sont cantonnées à l'exploration superficielle *in vivo* du fait de l'atténuation du signal dans les tissus (*vide infra*).²³⁴ **La tomodensitométrie (CT)** repose quant à elle sur l'absorption de RX par les tissus, avec naturellement peu de contraste des tissus mous. La tomodensitométrie est toutefois aujourd'hui une des techniques de diagnostic les plus utilisées. L'utilisation d'éléments lourds (iode, or) est bienvenue afin d'améliorer le contraste. L'**imagerie photoacoustique (PA)** consiste pour sa part à détecter les ondes de pression ultrasonique créées suite à l'échauffement local induit par une irradiation lumineuse (dans le proche infrarouge).²³⁵ Il est possible de faire de l'imagerie étant donné que les ultrasons ne se déplacent pas de la même manière suivant les tissus qu'ils traversent. Bien que les tissus présentent naturellement un contraste photoacoustique, il y a souvent peu de différence de contraste entre les tissus sains et malades. Il faut donc utiliser des agents de contraste photoacoustique, par exemple des AuNP, des QD ou encore des colorants organiques absorbant dans le proche IR. Cette technique d'imagerie est très récente et en cours de développement. Contrairement aux techniques précédentes, **la spectrométrie Raman exaltée par la surface (SERS)** s'appuie sur les propriétés des particules plasmoniques.²³⁶ Il s'agit d'une amélioration de la spectroscopie Raman qui utilise la diffusion inélastique des photons. Cette diffusion inélastique est cependant naturellement très faible et la sensibilité peut être améliorée en faisant du SERS,

c'est-à-dire en augmentant le signal Raman en présence de NP plasmoniques. Les NP sont indispensables pour permettre une sensibilité suffisante pour des applications *in vivo*. Finalement, **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)** est une technique très répandue de diagnostic reposant sur la relaxation des protons de l'eau contenue dans les différents organes dans un champ magnétique. Elle nécessite bien souvent l'utilisation d'agents de contraste afin d'améliorer la détection des zones d'intérêt, les tumeurs par exemple. Ces agents apportent un contraste positif (typiquement gadolinium) ou négatif (oxydes de fer).

Au niveau des techniques thérapeutiques, nous pouvons distinguer la **thérapie photothermique (PTT)**, qui repose sur la création de chaleur par irradiation lumineuse, de la **thérapie photodynamique (PDT)** qui consiste en la photoactivation d'un sensibilisateur chimique (une molécule organique) menant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), néfastes pour les cellules.²³⁷ La PTT est ainsi un traitement par la chaleur alors que la PDT est un traitement chimique. La PDT ne provient ainsi pas à proprement dire d'une propriété des NP mais elle est intéressante à aborder car souvent couplée avec des systèmes composés de NP (pour faire à la fois PDT et PTT, pour permettre le ciblage tumoral etc...)²³⁸ De plus, **l'hyperthermie magnétique** est la faculté de certaines NP magnétiques (les SPION par exemple) à produire de la chaleur grâce à des relaxations par résonance ferromagnétique lors de l'application d'un champ magnétique alternatif.^{239,240} De la même manière que pour la PTT, les cellules sont « tuées » par la chaleur. Pour finir, la **radiothérapie** est la méthode standard de traitement du cancer, couplée à la chimiothérapie. Elle consiste à bombarder la zone à traiter avec un faisceau de rayon X afin de bloquer la progression de la tumeur. Elle peut être améliorée en utilisant localement des éléments chimiques lourds absorbant bien les RX (comme l'or), pour augmenter l'effet local de dose. Nous y reviendrons dans le chapitre IV.

Les techniques présentées ici sont plus ou moins répandues. Ainsi, certaines techniques font partie de la prise en charge standard des patients, à savoir la tomodensitométrie, l'IRM ou encore la radiothérapie. D'autres techniques telles que l'imagerie photoacoustique, la SERS, la PTT ou bien la PDT sont beaucoup plus confidentielles et exploratoires.

I.4.3.1. Nanoparticules plasmoniques (Au, Ag, Pt, Cu...)

Les NP plasmoniques sont composées de métaux nobles, en particulier d'or, d'argent (AgNP) et de platine (PtNP) (ou encore le Pd et l'Al entre autres²³⁶). Ces NP présentent un pic d'absorption

caractéristique correspondant à une résonance plasmon de surface localisée (LSPR) intense. Il s'agit d'une oscillation collective des porteurs de charge libres à la surface des NP lorsque les fréquences de la lumière incidente et des porteurs de charge entrent en résonance.^{217,241} De manière très intéressante, ce pic d'absorption plasmonique peut être modulé *via* des modifications des NP, en termes de taille, de morphologie ou encore de comportement collectif (typiquement une association sous forme de coque de NP ou une agrégation). La **Figure 1. 43** illustre cet effet dans le cas d'AuNP de différentes morphologies. Classiquement, la longueur d'onde du pic plasmonique augmente avec une augmentation (i) de la taille des AuNP sphériques, (ii) du rapport d'aspect (longueur/largeur) des AuNRs (**Figure 1. 43 a**), (iii) de l'épaisseur des nanocoques d'or (**Figure 1. 43 b**) ou encore (iv) du pourcentage d'or des nanocages d'or (**Figure 1. 43 c**). Cela se traduit visuellement par une variation de la couleur de la suspension. La composition des NP induit elle aussi des variations de position du pic plasmonique avec, des plus faibles aux plus grandes longueurs d'ondes, les AgNP, les AuNP sphériques, les AuNR et les NP de chalcogénure de cuivre (**Figure 1. 43 d**). De manière intéressante, il est possible d'obtenir des pics de longueur d'onde intermédiaires en mixant plusieurs éléments, par exemple des NP mixtes Au–Ag. Il est aussi intéressant de moduler la position du pic de résonance plasmonique en agrégeant des petites NP plutôt que d'utiliser directement des grosses NP. En effet, une fois l'agrégat détruit les petites NP sont plus facilement excrétées du corps.¹⁸⁴

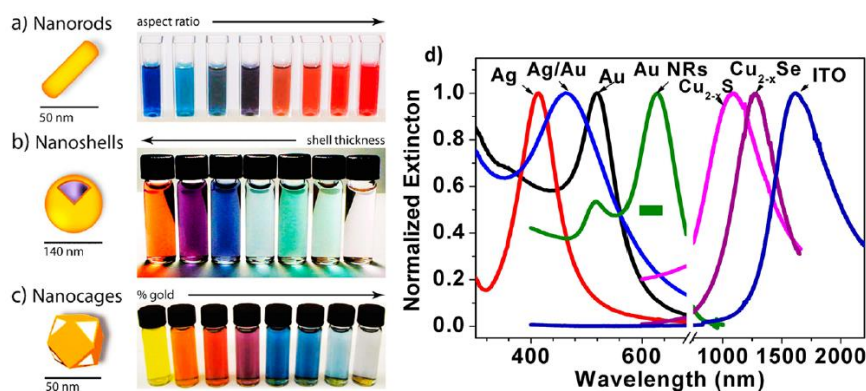


Figure 1. 43 – Relation entre la morphologie / composition de différents types de NP plasmoniques et leur résonance plasmonique de surface. **(a)** Influence du rapport d'aspect d'AuNR. **(b)** Influence de l'épaisseur de la couche d'or de nanocoques d'or. **(c)** Influence de la teneur en or de nanocages d'or. **(d)** Évolution de l'absorbance de NP plasmoniques en fonction de leur composition. Abréviations : nanobâtonnets d'or (AuNR), oxyde d'indium et d'étain (ITO).²¹⁷

Cette propriété de modulation de la longueur d'onde d'absorption des NP est très utile pour des applications *in vivo* (par exemple pour de la thérapie photothermique), où le choix de la

longueur d'onde d'excitation n'est pas anodin. En effet, le pic LSPR des AuNP est classiquement localisé dans le visible (500 – 550 nm). Dans cette gamme de longueurs d'onde, les tissus biologiques ainsi que le sang absorbent et diffusent beaucoup la lumière. Ainsi, il est difficile d'exciter efficacement les AuNP qui sont localisées profondément sous la surface de la peau, par exemple dans une tumeur (**Figure 1. 44**). Toutefois, une zone de moindre absorbance existe à des longueurs d'onde plus élevées (700 – 2500 nm). En prenant en compte l'eau et les lipides, qui absorbent pour des longueurs d'onde au-delà de 950 nm, une zone de « transparence » biologique apparaît entre 650 et 900 nm où la lumière pénètre mieux, c'est-à-dire dans le proche infrarouge (IR).^{242,243} Par ailleurs, la diffusion est inversement proportionnelle à λ^4 . Nous avons donc intérêt à nous positionner aux grandes longueurs d'onde. Ainsi, les AuNP (et autres NP plasmoniques) peuvent être utilisées de manière efficace dans le proche IR en modulant leurs caractéristiques.

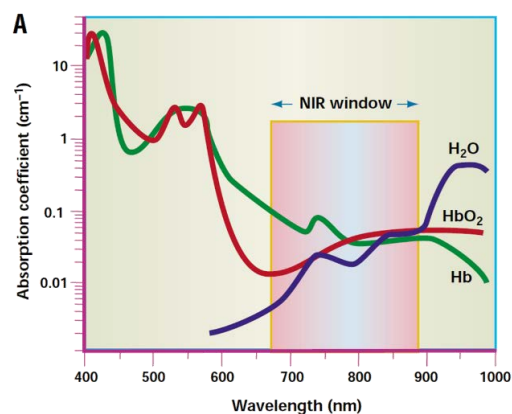


Figure 1. 44 – Coefficients d'absorption de l'hémoglobine (Hb), de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂) et de l'eau pour des longueurs d'onde entre 400 et 1000 nm. Une zone de moindre absorption biologique (« la fenêtre de transparence ») est visible entre 650 et 900 nm.²⁴³

Ces nanoparticules plasmoniques présentent des propriétés variées pour l'imagerie et la thérapie, en particulier de cancers, par exemple en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie CT, de fluorescence, l'imagerie PA, SERS²³⁶ ou encore pour la PTT.^{234,244–247} Par exemple, les AuNP peuvent être utilisées pour faire de la PTT en créant de la chaleur à partir de la lumière absorbée, et ce très rapidement (autour de la picoseconde).²²⁶ Ce qui est particulièrement intéressant est de combiner plusieurs propriétés dans le même nano-objet. Pour reprendre un exemple de nanocapsules colloïdales déjà présenté, Nie *et al.* ont préparé des nanocapsules d'AuNP avec un photo sensibilisateur (la chlorine e6 (Ce6), une colorant hydrophobe) encapsulé dans la cavité (**Figure 1. 45 A**).¹⁷⁸ Ces structures permettent de faire à la fois de la PTT, de la PDT avec la

photoactivation du Ce6, de l'imagerie de fluorescence (également grâce au Ce6) et de l'imagerie photoacoustique. L'irradiation est possible dans le proche IR grâce au couplage plasmonique dans la coque de l'objet qui décale le pic d'absorbance vers les plus grandes longueurs d'onde (Figure 1. 45 B). L'accumulation dans la tumeur *in vivo* permet de faire de l'hyperthermie (Figure 1. 45 C) (dont l'efficacité est extrêmement faible quand les AuNP ne sont pas associées) et de suivre la tumeur grâce à une augmentation de l'intensité photoacoustique (Figure 1. 45 D). Ce genre d'objet est très intéressant car il permet de multiples applications pour une même injection.

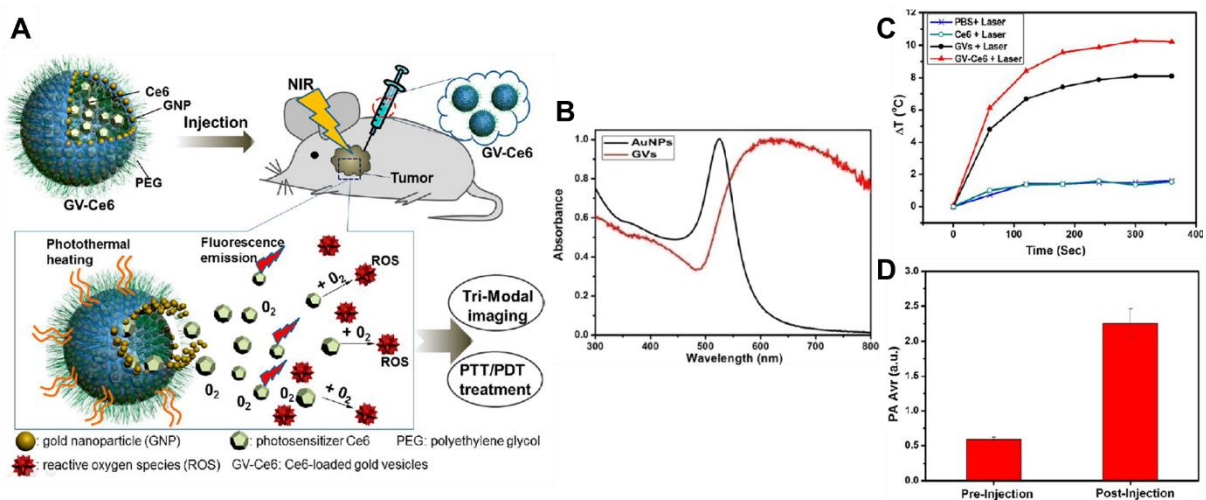


Figure 1. 45 – (A) Schéma de principe du traitement avec capsules d'AuNP (GNP) / PEO-*b*-PS encapsulant du Ce6 (GV-Ce6). Sous l'effet d'une irradiation dans le proche IR, les AuNP s'échauffent et permettent la libération du Ce6 fluorescent, lui-même ensuite photo-activé pour donner des espèces réactives de l'oxygène (ROS). (B) Absorbance des AuNP individuelles et des capsules d'AuNP. (C) Augmentation de température en fonction du temps lors de l'irradiation lumineuse, pour du PBS, le Ce6, les vésicules d'AuNP vides (GVs) et les vésicules contenant le Ce6 (GV-Ce6). (D) Intensité photoacoustique avant et après injection systémique de GV-Ce6. (adapté de ¹⁷⁸)

Pour rester sur les exemples de Nie *et al.*, nous pouvons aussi citer des nanocapsules pour l'imagerie PA¹⁷⁹, la PTT/fluorescence¹⁸¹ ou encore la PTT/imagerie PA.¹⁸⁰

D'autre part, les AuNP sont connues pour augmenter l'effet de la radiothérapie.^{248–250} En effet, malgré les améliorations « matérielles » pour mieux cibler la zone à irradier et protéger les tissus sains environnants, la dose administrée est limitée pour éviter les effets secondaires. Une trop forte focalisation du faisceau peut par ailleurs exclure une partie des cellules tumorales en périphérie de la tumeur et compromettre le succès du traitement.²⁵¹ C'est pourquoi l'utilisation de composés radio-sensibilisants qui s'accumulent ou sont injectés dans la tumeur est intéressante. L'or est un très bon absorbeur de RX et permet de déposer une dose plus importante du faisceau de RX au niveau de la tumeur.²⁵² L'injection d'AuNP améliore ainsi l'efficacité de la

radiothérapie sans augmenter le rayonnement de RX reçu par le patient. Nous nous intéresserons particulièrement à cet aspect dans le dernier chapitre de cette thèse. À noter que les AuNP peuvent aussi produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous faisceau ionisant.²⁵³ Les ROS sont produits sans radiation par contact de l'oxygène à la surface des AuNP mais ce phénomène est renforcé sous irradiation.²⁴⁹

Finalement, les AgNP possèdent des propriétés antibactériennes intrinsèques. Ainsi des AgNP ont été incorporées dans des polymersomes en association avec un antibiotique pour le traitement d'infections antibio-résistantes.²⁵⁴ Ces propriétés antibactériennes proviennent de la capacité des AgNP à modifier la structure des membranes bactérienne et à augmenter leur perméabilité, ainsi qu'aux ions argent qui peuvent induire la formation de ROS.

I.4.3.2. Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (SPION)

Les propriétés des nanoparticules d'oxyde fer superparamagnétiques sont intéressantes pour des applications biomédicales et ont été largement explorées.¹⁹² Qui plus est, les SPION sont biocompatibles. Comme mentionné précédemment, les SPION peuvent être utilisées en imagerie par résonance magnétique en tant qu'agent de contraste négatif, pour provoquer une hyperthermie localisée sous l'effet d'un champ magnétique alternatif ou encore pour induire un guidage magnétique¹⁹² permettant une plus grande accumulation dans la tumeur.²⁵⁵ La séparation cellulaire magnétique a aussi été étudiée²⁵⁶.

Les SPION peuvent agir en tant qu'agent de contraste négatif (T_2) car elles réduisent le temps de relaxation spin-spin des protons et induisent donc une diminution du signal IRM.²⁵⁷ Pour illustrer leur utilisation en tant qu'agent de contraste, nous pouvons reprendre l'exemple des hybridosomes présenté en début de ce chapitre.¹²⁵ L'intérêt de la formulation sous forme d'agrégat ou d'hybridosomes est de coupler les NP entre elles pour augmenter considérablement leur effet de contraste (avec une efficacité comparable à un agent de contraste commercial). Par exemple, l'association de plusieurs nanoparticules de magnétite autour d'une NP de silice mésoporeuse résulte en un magnétisme d'ensemble qui augmente l'effet de contrat négatif : la relaxivité transverse r_2 est bien plus élevée que celle des SPION individuelles (**Figure 1. 46 A**).²⁵⁸

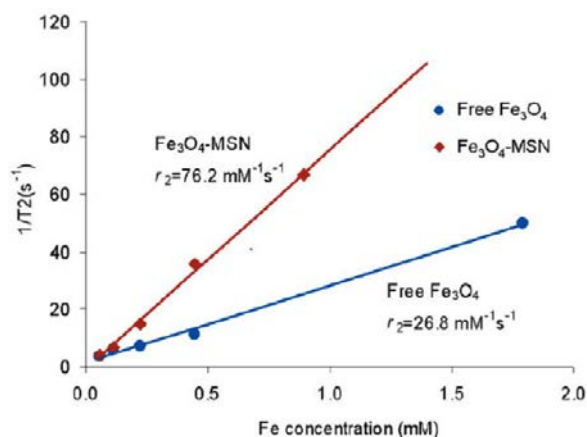


Figure 1. 46 – Augmentation du signal IRM avec l’organisation des SPION autour de NP de silice (Fe₃O₄-MSN). L’inverse du temps de relaxation transverse (1/T₂) est tracé en fonction de la concentration en fer, pour les SPION seules (« Free Fe₃O₄ ») et les nano-objets (« Fe₃O₄-MSN »). La pente des droites correspond à la relativité transverse r_2 , qui traduit l’efficacité de l’agent de contraste T₂.²⁵⁸

En ce qui concerne l’hyperthermie magnétique, l’avantage est double : permettre le traitement de tumeurs ainsi qu’induire le relargage contrôlé grâce à la dégradation de l’objet sous l’effet de la chaleur. Les SPION utilisées sont plus grosses que celles utilisées pour l’IRM. Un exemple pour illustrer cela est, pour reprendre ce qui a été présenté précédemment, celui des polymersomes¹⁹⁵ et liposomes²⁰⁸ chargés en SPION. Ces objets contenant des SPION peuvent encapsuler des principes actifs, en l’occurrence dans ces articles la doxorubicine ou la calcéine, respectivement. Ils peuvent être guidés dans un gradient de champ magnétique et leur accumulation est suivie grâce à l’effet de contraste qui éteint le signal IRM, ceci à une concentration subnanomolaire. De plus, une augmentation de température induite sous champ alternatif permet d’augmenter la perméabilité de la membrane et de provoquer le relargage contrôlé du contenu encapsulé.

L’hyperthermie magnétique a pour avantage d’être plus efficace sur les tissus tumoraux, la distribution de température étant homogène et le transfert de chaleur plus élevé que dans les tissus sains.²³⁹ Il est admis qu’il faut atteindre une température de 40–42 °C pour induire des dégradations des tissus et des cellules. Des températures > 42°C induisent la nécrose et des dommages irréversibles aux cellules.²²⁶ Toutefois, il est intéressant de pouvoir localiser précisément les SPION (par guidage magnétique ou ciblage) au niveau de la zone à traiter pour limiter encore plus les effets non désirés, en particulier la dégradation de tissus sains. L’hyperthermie magnétique a été utilisée *in vivo* en pré-clinique mais également chez l’homme, avec par exemple l’évaluation clinique de l’hyperthermie magnétique de SPION couplée à la

radiothérapie classiquement appliquée pour le traitement du glioblastome multiforme. Ce type de cancer fera l'objet de développements dans le dernier chapitre de cette thèse. Il en ressort que le traitement combiné « hyperthermie + radiothérapie légère » mène à une survie plus importante que pour les traitements conventionnels en cas de récurrence de la tumeur.²⁵⁹ L'avantage de l'utilisation des SPION par rapport aux AuNP est de ne pas nécessiter d'excitation lumineuse pour l'hyperthermie, et donc la difficulté de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques n'est plus un obstacle.

Les SPION sont par ailleurs connues pour générer des ROS (peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyl et hydroperoxyl, anion superoxyde) sous un rayon ionisant permettant d'augmenter le stress oxydatif.^{248,253} Elles ont donc un intérêt pour la radiothérapie.

I.4.3.3. Nanoparticules semi-conductrices (QD)

Pour finir, les QD sont des nanocristaux de semi-conducteurs de très petite taille (≤ 10 nm) qui présentent un confinement spatial des excitons (paire électron – trou) dans les 3 dimensions menant à des niveaux d'énergie discrets dans les bandes de valence et de conduction.²¹⁷ Le comportement est différent de celui du matériau macroscopique. La différence d'énergie entre le plus haut état occupé de la bande de valence et le plus bas état libre de la bande de conduction détermine la longueur d'onde d'émission. Plus la taille de la NP est grande, plus cette différence d'énergie est petite, et donc plus la longueur d'onde de fluorescence est élevée. La taille des QD permet donc de moduler leur fluorescence. Il en est de même pour la composition. En effet, la longueur d'onde d'émission des QD Cd_xSe_y est proportionnelle à celle des composés purs pondérés par leur proportion dans le mélange. En conséquence, les QD ont été intensément étudiés et de nombreuses combinaisons de semi-conducteurs existent (CdS, CdSe, CdTe, ZnS, InP...), souvent avec une couche de passivation autour pour préserver un maximum de luminescence. En plus d'être très robustes, les QD présentent donc une luminescence très variable en fonction de leur composition et de leur taille (de l'UV à l'IR), avec une émission très étroite et symétrique.²³³ Ce sont des outils de choix pour l'imagerie de fluorescence, en particulier dans le proche IR pour l'étude d'échantillons biologiques.²⁶⁰

Après cette introduction bibliographique, nous allons aborder la compréhension de la formation d'émulsions grâce à l'effet ouzo, et leur utilisation pour la préparation de nanocapsules (chapitre II). Nous étudierons ensuite les possibilités d'encapsulation de composés hydrophobes dans les hybridosomes par effet ouzo (chapitre III). Finalement, nous présenterons le potentiel radiosensibilisant des hybridosomes comportant à la fois des SPION et des AuNP (chapitre IV).

I.5. Références bibliographiques

1. Rao, J. P. & Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 36, 887–913 (2011).
2. Lu, X.-Y., Wu, D.-C., Li, Z.-J. & Chen, G.-Q. Polymer Nanoparticles. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 104, 299–323 (2011).
3. Fessi, C., Devissaguet, J.-P., Puisieux, F. & Thies, C. Process for the Preparation of Dispersible Colloidal Systems of a Substance in the Form of Nanoparticles, Brevet US5118528 (A) (1992)
4. Stainmesse, S., Orecchioni, A.-M., Nakache, E., Puisieux, F. & Fessi, H. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid & Polymer Science* 273, 505–511 (1995).
5. Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P. & Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *International Journal of Pharmaceutics* 146, 233–238 (1997).
6. Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research* 21, 1428–1439 (2004).
7. Yu, W. *et al.* A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics* 89, 139–146 (1993).
8. Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. & Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 241–251 (2004).
9. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385, 113–142 (2010).
10. Horn, D. & Rieger, J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. *Angewandte Chemie International Edition* 40, 4330–4361 (2001).
11. Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. & Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2, 8–21 (2006).
12. Vanderhoff, J. W., El-Aasser, M. S. & Ugelstad, J. Polymer emulsification process, Brevet US4177177 (A) (1979).
13. Quintanar-Guerrero, D., Alléman, E., Doelker, E. & Fessi, H. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Polymer Science* 275, 8 (1997).
14. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55, R1–R4 (1989).
15. Fessi, H., Puisieux, F. & Devissaguet, J.-P. Process for preparing a colloidal and disperse system in the shape of nanocapsules, Brevet EP0274961 (A1) (1988)
16. Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. A., Fessi, H. & Elaissari, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 532, 66–81 (2017).

17. Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N. & Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews* 42, 1147–1235 (2013).
18. Vauthier, C. & Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 26, 1025–1058 (2009).
19. Lepeltier, E., Bourgaux, C. & Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 71, 86–97 (2014).
20. D’Addio, S. M. & Prud’homme, R. K. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 417–426 (2011).
21. Joye, I. J. & McClements, D. J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology* 34, 109–123 (2013).
22. Liu, Y., Kathan, K., Saad, W. & Prud’homme, R. K. Ostwald Ripening of β -Carotene Nanoparticles. *Physical Review Letters* 98, 036102 (2007).
23. Grillo, I. Small-angle neutron scattering study of a world-wide known emulsion: Le Pastis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 225, 153–160 (2003).
24. Carteau, D., Bassani, D. & Pianet, I. The “Ouzo effect”: Following the spontaneous emulsification of trans-anethole in water by NMR. *Comptes Rendus Chimie* 11, 493–498 (2008).
25. Carteau, D., Pianet, I., Brunerie, P., Guillemat, B. & Bassani, D. M. Probing the Initial Events in the Spontaneous Emulsification of *trans*-Anethole Using Dynamic NMR Spectroscopy. *Langmuir* 23, 3561–3565 (2007).
26. Scholten, E., van der Linden, E. & This, H. The Life of an Anise-Flavored Alcoholic Beverage: Does Its Stability Cloud or Confirm Theory? *Langmuir* 24, 1701–1706 (2008).
27. Sitnikova, N. L., Sprik, R., Wegdam, G. & Eiser, E. Spontaneously Formed *trans*-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* 21, 7083–7089 (2005).
28. Chiappisi, L. & Grillo, I. Looking into Limoncello: The Structure of the Italian Liquor Revealed by Small-Angle Neutron Scattering. *ACS Omega* 3, 15407–15415 (2018).
29. Lohse, D. & Zhang, X. Surface nanobubbles and nanodroplets. *Reviews of Modern Physics* 87, 981–1035 (2015).
30. Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids: I. Light Scattering Characterization. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 4329–4338 (2006).
31. Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids: II. Kinetics of the Formation and Long-Time Stability. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 4339–4345 (2006).
32. Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids. III. Correlation with Molecular Properties and Interactions. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 13976–13984 (2006).
33. Yang, C., Li, W. & Wu, C. Laser Light-Scattering Study of Solution Dynamics of Water/Cycloether Mixtures. *Journal of Physical Chemistry B* 108, 11866–11870 (2004).
34. Li, Z. *et al.* Large-Scale Structures in Tetrahydrofuran–Water Mixture with a Trace Amount of Antioxidant Butylhydroxytoluene (BHT). *Journal of Physical Chemistry B* 115, 7887–7895 (2011).

35. Bunkin, N. F. *et al.* Droplet-like heterogeneity of aqueous tetrahydrofuran solutions at the submicrometer scale. *Journal of Chemical Physics* 145, 184501 (2016).
36. Häbich, A., Ducker, W., Dunstan, D. E. & Zhang, X. Do Stable Nanobubbles Exist in Mixtures of Organic Solvents and Water? *Journal of Physical Chemistry B* 114, 6962–6967 (2010).
37. Sedláč, M. & Rak, D. Large-Scale Inhomogeneities in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids: Supramolecular Structures or Nanobubbles? *Journal of Physical Chemistry B* 117, 2495–2504 (2013).
38. Sedláč, M. & Rak, D. On the Origin of Mesoscale Structures in Aqueous Solutions of Tertiary Butyl Alcohol: The Mystery Resolved. *Journal of Physical Chemistry B* 118, 2726–2737 (2014).
39. Subramanian, D., Klauda, J. B., Collings, P. J. & Anisimov, M. A. Mesoscale Phenomena in Ternary Solutions of Tertiary Butyl Alcohol, Water, and Propylene Oxide. *Journal of Physical Chemistry B* 118, 5994–6006 (2014).
40. Subramanian, D., Boughter, C. T., Klauda, J. B., Hammouda, B. & Anisimov, M. A. Mesoscale inhomogeneities in aqueous solutions of small amphiphilic molecules. *Faraday Discussions* 167, 217 (2013).
41. Subramanian, D. & Anisimov, M. A. Phase behavior and mesoscale solubilization in aqueous solutions of hydrotropes. *Fluid Phase Equilibria* 362, 170–176 (2014).
42. Subramanian, D., Ivanov, D. A., Yudin, I. K., Anisimov, M. A. & Sengers, J. V. Mesoscale Inhomogeneities in Aqueous Solutions of 3-Methylpyridine and Tertiary Butyl Alcohol. *Journal of Chemical & Engineering Data* 56, 1238–1248 (2011).
43. Subramanian, D. & Anisimov, M. A. Resolving the Mystery of Aqueous Solutions of Tertiary Butyl Alcohol. *Journal of Physical Chemistry B* 115, 9179–9183 (2011).
44. Jin, F., Ye, J., Hong, L., Lam, H. & Wu, C. Slow Relaxation Mode in Mixtures of Water and Organic Molecules: Supramolecular Structures or Nanobubbles? *Journal of Physical Chemistry B* 111, 2255–2261 (2007).
45. Jin, F., Li, J., Ye, X. & Wu, C. Effects of pH and Ionic Strength on the Stability of Nanobubbles in Aqueous Solutions of α -Cyclodextrin. *Journal of Physical Chemistry B* 111, 11745–11749 (2007).
46. Vitale, S. A. & Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”. *Langmuir* 19, 4105–4110 (2003).
47. Ganachaud, F. & Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* 6, 209–216 (2005).
48. Aubry, J., Ganachaud, F., Cohen Addad, J.-P. & Cabane, B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries. *Langmuir* 25, 1970–1979 (2009).
49. Lucas, P. *et al.* Finest nanocomposite films from carbon nanotube-loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles obtained by the Ouzo effect. *Soft Matter* 7, 5528–5531 (2011).
50. Lucas, P., Ganachaud, F., Aubry, J. & Vaysse, M. Nanocomposite Materials and Method for Making Same by Nano-Precipitation, Brevet WO2010040218 (A1) (2010).
51. Kim, J. Y., Lee, H. K., Baik, K. J. & Kim, S. C. Liquid-liquid phase separation in polysulfone/solvent/water systems. *Journal of Applied Polymer Science* 65, 2643–2653 (1998)
52. Aschenbrenner, E. *et al.* Using the Polymeric Ouzo Effect for the Preparation of Polysaccharide-Based Nanoparticles. *Langmuir* 29, 8845–8855 (2013).

53. Couvreur, P. *et al.* Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics. *Nano Letters* 6, 2544–2548 (2006).
54. Couvreur, P. *et al.* Discovery of New Hexagonal Supramolecular Nanostructures Formed by Squalenoylation of an Anticancer Nucleoside Analogue. *Small* 4, 247–253 (2008).
55. Caron, J. *et al.* Improving the Antitumor Activity of Squalenoyl-Paclitaxel Conjugate Nanoassemblies by Manipulating the Linker between Paclitaxel and Squalene. *Advanced Healthcare Materials* 2, 172–185 (2013).
56. Sémiramoth, N. *et al.* Self-Assembled Squalenoylated Penicillin Bioconjugates: An Original Approach for the Treatment of Intracellular Infections. *ACS Nano* 6, 3820–3831 (2012).
57. Yan, X. *et al.* General and Scalable Approach to Bright, Stable, and Functional AIE Fluorogen Colloidal Nanocrystals for in Vivo Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces* 10, 25154–25165 (2018).
58. Chiu, S.-J., Lin, C.-Y., Chou, H.-C. & Hu, T.-M. Silica Ouzo Effect: Amphiphilic Drugs Facilitate Nanoprecipitation of Polycondensed Mercaptosilanes. *Langmuir* 32, 211–220 (2016).
59. Chiu, S.-J., Wang, S.-Y., Chou, H.-C., Liu, Y.-L. & Hu, T.-M. Versatile Synthesis of Thiol- and Amine-Bifunctionalized Silica Nanoparticles Based on the Ouzo Effect. *Langmuir* 30, 7676–7686 (2014).
60. Hollamby, M. J., *et al.* Porous ‘Ouzo-effect’ silica–ceria composite colloids and their application to aluminium corrosion protection. *Chemical Communications* 48, 115–117 (2011).
61. Chen, Z. *et al.* A non-surfactant self-templating strategy for mesoporous silica nanospheres: beyond the Stöber method. *Nanoscale* 12, 3657–3662 (2020).
62. Zhang, X. H. & Ducker, W. Interfacial Oil Droplets. *Langmuir* 24, 110–115 (2008).
63. Zhang, X. H. & Ducker, W. Formation of Interfacial Nanodroplets through Changes in Solvent Quality. *Langmuir* 23, 12478–12480 (2007).
64. Peng, S., Xu, C., Hughes, T. C. & Zhang, X. From Nanodroplets by the Ouzo Effect to Interfacial Nanolenses. *Langmuir* 30, 12270–12277 (2014).
65. Wang, Y., *et al.* Formation of Polystyrene Microlenses via Transient Droplets from the Ouzo Effect for Enhanced Optical Imaging. *Journal of Physical Chemistry C* 123, 14327–14337 (2019).
66. Wang, Y., Zeng, B., Li, X. & Zhang, X. Sequential Evaporation-Induced Formation of Polymeric Surface Microdots via Ouzo Effect. *Advanced Materials Interfaces* 6, 1900002 (2019).
67. Tan, H. *et al.* Self-wrapping of an ouzo drop induced by evaporation on a superamphiphobic surface. *Soft Matter* 13, 2749–2759 (2017).
68. Tan, H. *et al.* Evaporation-triggered microdroplet nucleation and the four life phases of an evaporating Ouzo drop. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 8642–8647 (2016).
69. Diddens, C. *et al.* Evaporating pure, binary and ternary droplets: thermal effects and axial symmetry breaking. *Journal of Fluid Mechanics* 823, 470–497 (2017).
70. Tan, H. *et al.* Microdroplet nucleation by dissolution of a multicomponent drop in a host liquid. *Journal of Fluid Mechanics* 870, 217–246 (2019).
71. Tan, H., Wooh, S., Butt, H.-J., Zhang, X. & Lohse, D. Porous supraparticle assembly through self-lubricating evaporating colloidal ouzo drops. *Nature Communications* 10, 1–8 (2019).
72. Zeng, B., Wang, Y., Zhang, X. & Lohse, D. Solvent Exchange in a Hele–Shaw Cell: Universality of Surface Nanodroplet Nucleation. *Journal of Chemical Chemistry C* 123, 5571–5577 (2019).

73. Dyett, B. *et al.* Growth dynamics of surface nanodroplets during solvent exchange at varying flow rates. *Soft Matter* 14, 5197–5204 (2018).
74. Yu, H., Rump, M., Maheshwari, S., Bao, L. & Zhang, X. Growth of nanodroplets on a still microfiber under flow conditions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20, 18252–18261 (2018).
75. Lu, Z., Xu, H., Zeng, H. & Zhang, X. Solvent Effects on the Formation of Surface Nanodroplets by Solvent Exchange. *Langmuir* 31, 12120–12125 (2015).
76. Botet, R. & Roger, K. How do interactions control droplet size during nanoprecipitation? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 22, 108–112 (2016).
77. Pucci, C., Cousin, F., Dole, F., Chapel, J.-P. & Schatz, C. Impact of the Formulation Pathway on the Colloidal State and Crystallinity of Poly- ϵ -caprolactone Particles Prepared by Solvent Displacement. *Langmuir* 34, 2531–2542 (2018).
78. Saad, W. S. & Prud'homme, R. K. Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today* 11, 212–227 (2016).
79. Zhang, C., Pansare, V. J., Prud'homme, R. K. & Priestley, R. D. Flash nanoprecipitation of polystyrene nanoparticles. *Soft Matter* 8, 86–93 (2012).
80. Johnson, B. K. & Prud'homme, R. K. Mechanism for Rapid Self-Assembly of Block Copolymer Nanoparticles. *Physical Review Letters* 91, 118302 (2003).
81. Stepanyan, R., Lebouille, J. G. J. L., Slot, J. J. M., Tuinier, R. & Stuart, M. A. C. Controlled Nanoparticle Formation by Diffusion Limited Coalescence. *Physical Review Letters* 109, 138301 (2012).
82. Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J. & Couvreur, P. Solvent selection causes remarkable shifts of the "Ouzo region" for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Nanoscale* 7, 9215–9221 (2015).
83. Beck-Broichsitter, M., Rytting, E., Lebhardt, T., Wang, X. & Kissel, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the "ouzo region" upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 244–253 (2010).
84. Lannibois, H., Hasmy, A., Botet, R., Chariol, O. A. & Cabane, B. Surfactant Limited Aggregation of Hydrophobic Molecules in Water. *Journal de Physique II* 7, 319–342 (1997).
85. Lepeltier, E. *et al.* Influence of the nanoprecipitation conditions on the supramolecular structure of squalenoyled nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 96, 89–95 (2015).
86. Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 24, 67–75 (2005).
87. Beck-Broichsitter, M. Stability-limit "Ouzo region" boundaries for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* 511, 262–266 (2016).
88. Wu, Y., Li, Q., Deng, F., Liang, X. & Liu, H. Solvent Effect on ζ Potential at an Aqueous/Oil Interface in Surfactant-Free Emulsion. *Langmuir* 30, 1926–1931 (2014).
89. Ma, A., Xu, J. & Xu, H. Impact of Spontaneously Adsorbed Hydroxide Ions on Emulsification via Solvent Shifting. *Journal of Physical Chemistry C* 118, 23175–23180 (2014).
90. Roger, K. & Cabane, B. Why Are Hydrophobic/Water Interfaces Negatively Charged? *Angewandte Chemie International Edition* 51, 5625–5628 (2012).

91. Yan, X. *et al.* Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *Journal of Physical Chemistry Letters* 9, 96–103 (2018).
92. Roger, K., Botet, R. & Cabane, B. Coalescence of Repelling Colloidal Droplets: A Route to Monodisperse Populations. *Langmuir* 29, 5689–5700 (2013).
93. Roger, K., Eissa, M., Elaissari, A. & Cabane, B. Surface Charge of Polymer Particles in Water: The Role of Ionic End-Groups. *Langmuir* 29, 11244–11250 (2013).
94. Roger, K. & Cabane, B. Uncontaminated Hydrophobic/Water Interfaces Are Uncharged: A Reply. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 12943–12945 (2012).
95. Anton, N., Benoit, J.-P. & Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release* 128, 185–199 (2008).
96. Gallardo, M. *et al.* Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics* 100, 55–64 (1993).
97. Montasser, I., Fessi, H., Briançon, S. & Lieto, J. New approach of the Preparation of Nanocapsules by an Interfacial Polycondensation Reaction. *Polymer Bulletin* 50, 169–174 (2003).
98. Montasser, I., Fessi, H., Briançon, S. & Lieto, J. Procédé de préparation de particules colloïdales sous forme de nanocapsules, Brevet WO0168235 (A1) (2001).
99. Bouchemal, K. *et al.* Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* 269, 89–100 (2004).
100. Yan, X. *et al.* Simple but Precise Engineering of Functional Nanocapsules through Nanoprecipitation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6910–6913 (2014).
101. Yan, X. *et al.* Brilliant glyconanocapsules for trapping of bacteria. *Chemical Communications* 51, 13193–13196 (2015).
102. Hoar, T. P. & Schulman, J. H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. *Nature* 152, 102–103 (1943).
103. Kogan, A. & Garti, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science* 123–126, 369–385 (2006).
104. Klossek, M. L., Touraud, D., Zemb, T. & Kunz, W. Structure and Solubility in Surfactant-Free Microemulsions. *ChemPhysChem* 13, 4116–4119 (2012).
105. Yan, X. *et al.* Modular construction of single-component polymer nanocapsules through a one-step surfactant-free microemulsion templated synthesis. *Chemical Communications* 53, 1401–1404 (2017).
106. Zhang, Y., Chen, X. & Liu, X. Temperature-Induced Reversible-Phase Transition in a Surfactant-Free Microemulsion. *Langmuir* 35, 14358–14363 (2019).
107. Smith, G. D., Donelan, C. E. & Barden, R. E. Oil-continuous microemulsions composed of hexane, water, and 2-propanol. *Journal of Colloid and Interface Science* 60, 488–496 (1977).
108. Zoumpantioti, M., Stamatidis, H., Papadimitriou, V. & Xenakis, A. Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane–1-propanol–water surfactantless microemulsion systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 47, 1–9 (2006).
109. Song, F., Xu, J. & Hou, W. G. Surfactant-free oil/water and bicontinuous microemulsion composed of benzene, ethanol and water. *Chinese Chemical Letters* 21, 880–883 (2010).
110. Xu, J., Yin, A., Zhao, J., Li, D. & Hou, W. Surfactant-Free Microemulsion Composed of Oleic Acid, n-Propanol, and H₂O. *Journal of Physical Chemistry B* 117, 450–456 (2013).

111. Drapeau, J. *et al.* Effective Insect Repellent Formulation in both Surfactantless and Classical Microemulsions with a Long-Lasting Protection for Human Beings. *Chemistry & Biodiversity* 6, 934–947 (2009).
112. Marcus, J., Klossek, M. L., Touraud, D. & Kunz, W. Nano-droplet formation in fragrance tinctures. *Flavour and Fragrance Journal* 28, 294–299 (2013).
113. Hahn, M. *et al.* Ab initio prediction of structuring/mesoscale inhomogeneities in surfactant-free microemulsions and hydrogen-bonding-free microemulsions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 21, 8054–8066 (2019).
114. Fischer, V., Marcus, J., Touraud, D., Diat, O. & Kunz, W. Toward surfactant-free and water-free microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 453, 186–193 (2015).
115. Zemb, T. N. *et al.* How to explain microemulsions formed by solvent mixtures without conventional surfactants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 4260–4265 (2016).
116. Marcus, J. *et al.* Influence of additives on the structure of surfactant-free microemulsions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17, 32528–32538 (2015).
117. Xenakis, A., Zoumpantioti, M. & Stamatis, H. Enzymatic reactions in structured surfactant-free microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 22, 41–45 (2016).
118. Hou, W. & Xu, J. Surfactant-free microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 25, 67–74 (2016).
119. Yan, X. *et al.* Nanoprecipitation of PHPMA (Co)Polymers into Nanocapsules Displaying Tunable Compositions, Dimensions, and Surface Properties. *ACS Macro Letters* 6, 447–451 (2017).
120. Yan, X. *et al.* Programmable Hierarchical Construction of Mixed/Multilayered Polysaccharide Nanocapsules through Simultaneous/Sequential Nanoprecipitation Steps. *Biomacromolecules* 20, 3915–3923 (2019).
121. Gauffre, F., Sciortino, F., Casterou, G., Kahn, M. & Chevance, S. Assemblies of Hydrophobic Nanoparticles in an Aqueous Medium, Brevet FR3045408 (A1) (2017).
122. Casterou, G. Conception de nouveaux agents de contraste à base d'assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer pour l'imagerie par résonance magnétique. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1 (2015).
123. Sciortino, F. Nouveau procédé d'élaboration de nanocapsules inorganiques et hybrides (Hybridosomes®) : des films multifonctionnels aux applications biomédicales. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1 (2017).
124. Sciortino, F. *et al.* Structure and elasticity of composite nanoparticle/polymer nanoshells (hybridosomes®). *Soft Matter* 13, 4393–4400 (2017).
125. Sciortino, F. *et al.* Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* 2, 796–799 (2016).
126. Sciortino, F. *et al.* Electro-click construction of hybrid nanocapsule films with triggered delivery properties. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20, 2761–2770 (2018).
127. Sciortino, F. *et al.* The Ouzo effect to selectively assemble molybdenum clusters into nanomarbles or nanocapsules with increased HER activity. *Chemical Communications* 54, 13387–13390 (2018).
128. Bollhorst, T., Rezwan, K. & Maas, M. Colloidal capsules: nano- and microcapsules with colloidal particle shells. *Chemical Society Reviews* 46, 2091–2126 (2017).
129. Pickering, S. U. CXCVI.—Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 91, 2001–2021 (1907).

130. Binks, B. P. & Lumsdon, S. O. Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-Free Emulsions. *Langmuir* 16, 8622–8631 (2000).
131. Ashby, N. P. & Binks, B. P. Pickering emulsions stabilised by Laponite clay particles. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2, 5640–5646 (2000).
132. Binks, B. P. & Lumsdon, S. O. Pickering Emulsions Stabilized by Monodisperse Latex Particles: Effects of Particle Size. *Langmuir* 17, 4540–4547 (2001).
133. Du, Z. *et al.* Outstanding Stability of Particle-Stabilized Bubbles. *Langmuir* 19, 3106–3108 (2003).
134. Binks, B. P. & Horozov, T. S. Aqueous Foams Stabilized Solely by Silica Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 3722–3725 (2005).
135. Binks, B. P. & Murakami, R. Phase inversion of particle-stabilized materials from foams to dry water. *Nature Materials* 5, 865–869 (2006).
136. Lin, Y., Skaff, H., Emrick, T., Dinsmore, A. D. & Russell, T. P. Nanoparticle Assembly and Transport at Liquid-Liquid Interfaces. *Science* 299, 226–229 (2003).
137. Yang, X.-C. *et al.* Drug Delivery Using Nanoparticle-Stabilized Nanocapsules. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 477–481 (2011).
138. Schrade, A., Cao, Z., Landfester, K. & Ziener, U. Preparation of Raspberry-like Nanocapsules by the Combination of Pickering Emulsification and Solvent Displacement Technique. *Langmuir* 27, 6689–6700 (2011).
139. Cao, Z., Schrade, A., Landfester, K. & Ziener, U. Synthesis of raspberry-like organic–inorganic hybrid nanocapsules via pickering miniemulsion polymerization: Colloidal stability and morphology. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49, 2382–2394 (2011).
140. Chen, K., Zhou, S., Yang, S. & Wu, L. Fabrication of All-Water-Based Self-Repairing Superhydrophobic Coatings Based on UV-Responsive Microcapsules. *Advanced Functional Materials* 25, 1035–1041 (2015).
141. Bollhorst, T. *et al.* Synthesis Route for the Self-Assembly of Submicrometer-Sized Colloidosomes with Tailorable Nanopores. *Chemistry of Materials* 25, 3464–3471 (2013).
142. Maas, M., Bollhorst, T., Zare, R. N. & Rezwan, K. Diamondosomes: Submicron Colloidosomes with Nanodiamond Shells. *Particle & Particle Systems Characterization* 31, 1067–1071 (2014).
143. Bollhorst, T. *et al.* Bifunctional Submicron Colloidosomes Coassembled from Fluorescent and Superparamagnetic Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* 54, 118–123 (2015).
144. Zhang, L. *et al.* Self-assembly of noble metal nanoparticles into sub-100 nm colloidosomes with collective optical and catalytic properties. *Chemical Science* 8, 6103–6110 (2017).
145. Caruso, F., Caruso, Rachel. A. & Möhwald, H. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating. *Science* 282, 1111–1114 (1998).
146. Caruso, F., Caruso, R. A. & Möhwald, H. Production of Hollow Microspheres from Nanostructured Composite Particles. *Chemistry of Materials* 11, 3309–3314 (1999).
147. Caruso, F. & Möhwald, H. Preparation and Characterization of Ordered Nanoparticle and Polymer Composite Multilayers on Colloids. *Langmuir* 15, 8276–8281 (1999).
148. Caruso, F., Susha, A. S., Giersig, M. & Möhwald, H. Magnetic Core–Shell Particles: Preparation of Magnetite Multilayers on Polymer Latex Microspheres. *Advanced Materials* 11, 950–953 (1999).
149. Caruso, F., Spasova, M., Susha, A., Giersig, M. & Caruso, R. A. Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach. *Chemistry of Materials* 13, 109–116 (2001).

150. Liang, Z., Susha, A. & Caruso, F. Gold Nanoparticle-Based Core–Shell and Hollow Spheres and Ordered Assemblies Thereof. *Chemistry of Materials* 15, 3176–3183 (2003).
151. Caruso, R. A., Susha, A. & Caruso, F. Multilayered Titania, Silica, and Laponite Nanoparticle Coatings on Polystyrene Colloidal Templates and Resulting Inorganic Hollow Spheres. *Chemistry of Materials* 13, 400–409 (2001).
152. Rogach, A. *et al.* Nano- and Microengineering: 3-D Colloidal Photonic Crystals Prepared from Sub- μ m-sized Polystyrene Latex Spheres Pre-Coated with Luminescent Polyelectrolyte/Nanocrystal Shells. *Advanced Materials* 12, 333–337 (2000).
153. Caruso, F. Hollow Capsule Processing through Colloidal Templating and Self-Assembly. *Chemistry – A European Journal* 6, 413–419 (2000).
154. Wu, H. *et al.* Preparation of hollow capsule-stabilized gold nanoparticles through the encapsulation of the dendrimer. *Journal of Colloid and Interface Science* 302, 142–148 (2006).
155. Ji, Q. *et al.* Flake-Shell Capsules: Adjustable Inorganic Structures. *Small* 8, 2345–2349 (2012).
156. Xia, C. & Alshareef, H. N. Self-templating Scheme for the Synthesis of Nanostructured Transition-Metal Chalcogenide Electrodes for Capacitive Energy Storage. *Chemistry of Materials* 27, 4661–4668 (2015).
157. Lou, X. W. (David), Archer, L. A. & Yang, Z. Hollow Micro-/Nanostructures: Synthesis and Applications. *Advanced Materials* 20, 3987–4019 (2008).
158. Lou, X., Wu, P., Zhang, A., Zhang, R. & Tang, Y. General Self-Assembly Route toward Sparsely Studied Noble-Metal Nanocrystals inside Graphene Hollow Sphere Network for Ultrastable Electrocatalyst Utilization. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7, 20061–20067 (2015).
159. Zhang, L. & Granick, S. How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles). *Nano Letters* 6, 694–698 (2006).
160. Karg, M., Pastoriza-Santos, I., Pérez-Juste, J., Hellweg, T. & Liz-Marzán, L. M. Nanorod-Coated PNIPAM Microgels: Thermoresponsive Optical Properties. *Small* 3, 1222–1229 (2007).
161. Karg, M. *et al.* Multiresponsive Hybrid Colloids Based on Gold Nanorods and Poly(NIPAM-co-allylactic acid) Microgels: Temperature- and pH-Tunable Plasmon Resonance. *Langmuir* 25, 3163–3167 (2009).
162. Gorgoll, R. M., Tsubota, T., Harano, K. & Nakamura, E. Cooperative Self-Assembly of Gold Nanoparticles on the Hydrophobic Surface of Vesicles in Water. *Journal of the American Chemical Society* 137, 7568–7571 (2015).
163. Liu, Y., Liu, Y., Yin, J.-J. & Nie, Z. Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymer-Tethered Nanoparticles: a New Approach to Nanoscale Design of Functional Materials. *Macromolecular Rapid Communications* 36, 711–725 (2015).
164. Yi, C., Zhang, S., Webb, K. T. & Nie, Z. Anisotropic Self-Assembly of Hairy Inorganic Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research* 50, 12–21 (2017).
165. Song, J., Huang, P., Duan, H. & Chen, X. Plasmonic Vesicles of Amphiphilic Nanocrystals: Optically Active Multifunctional Platform for Cancer Diagnosis and Therapy. *Accounts of Chemical Research* 48, 2506–2515 (2015).
166. Song, J., Niu, G. & Chen, X. Amphiphilic-Polymer-Guided Plasmonic Assemblies and Their Biomedical Applications. *Bioconjugate Chemistry* 28, 105–114 (2017).
167. Song, J., Huang, P. & Chen, X. Preparation of plasmonic vesicles from amphiphilic gold nanocrystals grafted with polymer brushes. *Nature Protocols* 11, 2287–2299 (2016).

168. Song, J. *et al.* Plasmonic Vesicles of Amphiphilic Gold Nanocrystals: Self-Assembly and External-Stimuli-Triggered Destruction. *Journal of the American Chemical Society* 133, 10760–10763 (2011).
169. Song, J., Zhou, J. & Duan, H. Self-Assembled Plasmonic Vesicles of SERS-Encoded Amphiphilic Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Traceable Intracellular Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 134, 13458–13469 (2012).
170. Song, J. *et al.* Photolabile plasmonic vesicles assembled from amphiphilic gold nanoparticles for remote-controlled traceable drug delivery. *Nanoscale* 5, 5816–5824 (2013).
171. Song, J., Pu, L., Zhou, J., Duan, B. & Duan, H. Biodegradable Theranostic Plasmonic Vesicles of Amphiphilic Gold Nanorods. *ACS Nano* 7, 9947–9960 (2013).
172. Song, J. *et al.* Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles with Enhanced Tumor Accumulation and Fast Excretion from the Body for Cancer Therapy. *Advanced Materials* 27, 4910–4917 (2015).
173. Song, J. *et al.* Sequential Drug Release and Enhanced Photothermal and Photoacoustic Effect of Hybrid Reduced Graphene Oxide-Loaded Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles for Cancer Therapy. *ACS Nano* 9, 9199–9209 (2015).
174. Zubarev, E. R., Xu, J., Sayyad, A. & Gibson, J. D. Amphiphilicity-Driven Organization of Nanoparticles into Discrete Assemblies. *Journal of the American Chemical Society* 128, 15098–15099 (2006).
175. Nie, Z. *et al.* Self-assembly of metal–polymer analogues of amphiphilic triblock copolymers. *Nature Materials* 6, 609–614 (2007).
176. He, J., Liu, Y., Babu, T., Wei, Z. & Nie, Z. Self-Assembly of Inorganic Nanoparticle Vesicles and Tubules Driven by Tethered Linear Block Copolymers. *Journal of the American Chemical Society* 134, 11342–11345 (2012).
177. He, J. *et al.* Near-infrared light-responsive vesicles of Au nanoflowers. *Chemical Communications* 49, 576–578 (2013).
178. Lin, J. *et al.* Photosensitizer-Loaded Gold Vesicles with Strong Plasmonic Coupling Effect for Imaging-Guided Photothermal/Photodynamic Therapy. *ACS Nano* 7, 5320–5329 (2013).
179. Liu, Y. *et al.* Folding Up of Gold Nanoparticle Strings into Plasmonic Vesicles for Enhanced Photoacoustic Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* 54, 15809–15812 (2015).
180. Huang, P. *et al.* Biodegradable Gold Nanovesicles with an Ultrastrong Plasmonic Coupling Effect for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 13958–13964 (2013).
181. He, J. *et al.* Self-Assembly of Amphiphilic Plasmonic Micelle-Like Nanoparticles in Selective Solvents. *Journal of the American Chemical Society* 135, 7974–7984 (2013).
182. He, J. *et al.* Hydrodynamically Driven Self-Assembly of Giant Vesicles of Metal Nanoparticles for Remote-Controlled Release. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 2463–2468 (2013).
183. Huang, X. *et al.* Controllable self-assembled plasmonic vesicle-based three-dimensional SERS platform for picomolar detection of hydrophobic contaminants. *Nanoscale* 10, 13202–13211 (2018).
184. Bishop, K. J. M. Hierarchical Self-Assembly for Nanomedicine. *Angewandte Chemie International Edition* 55, 1598–1600 (2016).
185. Guo, Y., Harirchian-Saei, S., Izumi, C. M. S. & Moffitt, M. G. Block Copolymer Mimetic Self-Assembly of Inorganic Nanoparticles. *ACS Nano* 5, 3309–3318 (2011).

186. Hu, J., Wu, T., Zhang, G. & Liu, S. Efficient Synthesis of Single Gold Nanoparticle Hybrid Amphiphilic Triblock Copolymers and Their Controlled Self-Assembly. *Journal of the American Chemical Society* 134, 7624–7627 (2012).
187. Niikura, K. *et al.* Gold Nanoparticles Coated with Semi-Fluorinated Oligo(ethylene glycol) Produce Sub-100 nm Nanoparticle Vesicles without Templates. *Journal of the American Chemical Society* 134, 7632–7635 (2012).
188. Niikura, K., Iyo, N., Matsuo, Y., Mitomo, H. & Ijiro, K. Sub-100 nm Gold Nanoparticle Vesicles as a Drug Delivery Carrier enabling Rapid Drug Release upon Light Irradiation. *ACS Applied Materials & Interfaces* 5, 3900–3907 (2013).
189. Wei, J. *et al.* Yolk/Shell Assembly of Gold Nanoparticles by Size Segregation in Solution. *Journal of the American Chemical Society* 138, 3274–3277 (2016).
190. Wei, J. *et al.* Size-Defined Cracked Vesicle Formation via Self-Assembly of Gold Nanoparticles Covered with Carboxylic Acid-Terminated Surface Ligands. *Langmuir* 34, 12445–12451 (2018).
191. Liu, Y. *et al.* Entropy-Driven Pattern Formation of Hybrid Vesicular Assemblies Made from Molecular and Nanoparticle Amphiphiles. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2602–2610 (2014).
192. Yang, K. *et al.* Cooperative Assembly of Magneto-Nanovesicles with Tunable Wall Thickness and Permeability for MRI-Guided Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 140, 4666–4677 (2018).
193. Hickey, R. J., Haynes, A. S., Kikkawa, J. M. & Park, S.-J. Controlling the Self-Assembly Structure of Magnetic Nanoparticles and Amphiphilic Block-Copolymers: From Micelles to Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* 133, 1517–1525 (2011).
194. Rasch, M. R. *et al.* Hydrophobic Gold Nanoparticle Self-Assembly with Phosphatidylcholine Lipid: Membrane-Loaded and Janus Vesicles. *Nano Letters* 10, 3733–3739 (2010).
195. Sanson, C. *et al.* Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *ACS Nano* 5, 1122–1140 (2011).
196. Lecommandoux, S., Sandre, O., Chécot, F., Rodriguez-Hernandez, J. & Perzynski, R. Magnetic Nanocomposite Micelles and Vesicles. *Advanced Materials* 17, 712–718 (2005).
197. Lecommandoux, S., Sandre, O., Chécot, F., Rodriguez-Hernandez, J. & Perzynski, R. Self-assemblies of magnetic nanoparticles and di-block copolymers: Magnetic micelles and vesicles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 300, 71–74 (2006).
198. Lecommandoux, S., Sandre, O., Chécot, F. & Perzynski, R. Smart hybrid magnetic self-assembled micelles and hollow capsules. *Progress in Solid State Chemistry* 34, 171–179 (2006).
199. Sanchez-Gaytan, B. L. *et al.* Interfacial Assembly of Nanoparticles in Discrete Block-Copolymer Aggregates. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 9235–9238 (2007).
200. Hickey, R. J. *et al.* Morphological Transitions of Block-Copolymer Bilayers via Nanoparticle Clustering. *Small* 6, 48–51 (2010).
201. Kamps, A. C. *et al.* Nanoparticle-Directed Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers. *Langmuir* 26, 14345–14350 (2010).
202. Hickey, R. J., Luo, Q. & Park, S.-J. Polymersomes and Multicompartment Polymersomes Formed by the Interfacial Self-Assembly of Gold Nanoparticles and Amphiphilic Polymers. *ACS Macro Letters* 2, 805–808 (2013).

203. Hickey, R. J., *et al.* Directional Self-Assembly of Ligand-Stabilized Gold Nanoparticles into Hollow Vesicles through Dynamic Ligand Rearrangement. *Langmuir* 31, 4299–4304 (2015).
204. Hickey, R. J. *et al.* Size-Controlled Self-Assembly of Superparamagnetic Polymersomes. *ACS Nano* 8, 495–502 (2014).
205. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13, 238–IN27 (1965).
206. Johnson, S. M., Bangham, A. D., Hill, M. W. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 233, 820–826 (1971).
207. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2, 751–760 (2007).
208. Amstad, E. *et al.* Triggered Release from Liposomes through Magnetic Actuation of Iron Oxide Nanoparticle Containing Membranes. *Nano Letters* 11, 1664–1670 (2011).
209. Reimhult, E. Nanoparticle-triggered release from lipid membrane vesicles. *New Biotechnology* 32, 665–672 (2015).
210. Gopalakrishnan, G. *et al.* Multifunctional Lipid/Quantum Dot Hybrid Nanocontainers for Controlled Targeting of Live Cells. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 5478–5483 (2006).
211. Chen, Y., Bose, A. & Bothun, G. D. Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. *ACS Nano* 4, 3215–3221 (2010).
212. Bonnaud, C. *et al.* Insertion of Nanoparticle Clusters into Vesicle Bilayers. *ACS Nano* 8, 3451–3460 (2014).
213. Von White, G., Chen, Y., Roder-Hanna, J., Bothun, G. D. & Kitchens, C. L. Structural and Thermal Analysis of Lipid Vesicles Encapsulating Hydrophobic Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 6, 4678–4685 (2012).
214. An, X., Zhang, F., Zhu, Y. & Shen, W. Photoinduced drug release from thermosensitive AuNPs-liposome using a AuNPs-switch. *Chemical Communications* 46, 7202 (2010).
215. Bothun, G. D. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. *Journal of Nanobiotechnology* 6, 13 (2008).
216. Choi, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* 25, 1165–1170 (2007).
217. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Reviews* 116, 2826–2885 (2016).
218. Albanese, A., Tang, P. S. & Chan, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review Biomedical Engineering*. 14, 1–16 (2012).
219. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Andresen, T. L. Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 52, 481–503 (2012).
220. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research* 46, 6387–6392 (1986).
221. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 136–151 (2011).
222. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release* 244, 108–121 (2016).

223. Prabhakar, U. *et al.* Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology. *Cancer Research* 73, 2412–2417 (2013).
224. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* 1, 16014 (2016).
225. Ye, L. *et al.* A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nature Nanotechnology* 7, 453–458 (2012).
226. Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. *Pharmaceutical Research* 28, 237–259 (2011).
227. Pan, Y. *et al.* Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* 3, 1941–1949 (2007).
228. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. & Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry* 15, 897–900 (2004).
229. Wang, S. *et al.* Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters* 463, 145–149 (2008).
230. Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R. & Doak, S. H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* 1, 5358 (2010).
231. Feng, Q. *et al.* Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Reports* 8, 2082 (2018).
232. Abakumov, M. A. *et al.* Toxicity of iron oxide nanoparticles: Size and coating effects. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 32, e22225 (2018).
233. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release* 155, 344–357 (2011).
234. Ehlerding, E. B., Grodzinski, P., Cai, W. & Liu, C. H. Big Potential from Small Agents: Nanoparticles for Imaging-Based Companion Diagnostics. *ACS Nano* 12, 2106–2121 (2018).
235. Zackrisson, S., van de Ven, S. M. W. Y. & Gambhir, S. S. Light In and Sound Out: Emerging Translational Strategies for Photoacoustic Imaging. *Cancer Research* 74, 979–1004 (2014).
236. Wilson, A. J. & Willets, K. A. Surface-enhanced Raman scattering imaging using noble metal nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 5, 180–189 (2013).
237. Shibu, E. S., *et al.* Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 15, 53–72 (2013).
238. Kim, H. & Lee, D. Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles. *Polymers* 10, 961 (2018).
239. Gamarra, L. *et al.* Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *International Journal of Nanomedicine* 591 (2011) doi:10.2147/IJN.S14737.
240. Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R. & Hadjipanayis, C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. *International Journal of Hyperthermia* 34, 1316–1328 (2018).
241. Link, S. & El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry* 19, 409–453 (2000).
242. Smith, A. M., Mancini, M. C. & Nie, S. Second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechnology* 4, 710–711 (2009).
243. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology* 19, 316–317 (2001).

244. Yamada, M., Foote, M. & Prow, T. W. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7, 428–445 (2015).
245. Curry, T., Kopelman, R., Shilo, M. & Popovtzer, R. Multifunctional theranostic gold nanoparticles for targeted CT imaging and photothermal therapy. *Contrast Media & Molecular Imaging* 9, 53–61 (2014).
246. Deng, H. *et al.* Theranostic Self-Assembly Structure of Gold Nanoparticles for NIR Photothermal Therapy and X-Ray Computed Tomography Imaging. *Theranostics* 4, 904–918 (2014).
247. Cabral, R. M. & Baptista, P. V. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14, 1041–1052 (2014).
248. Kwatra, D., Venugopal, A. & Anant, S. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational Cancer Research* 2, 330–342–342 (2013).
249. Her, S., Jaffray, D. A. & Allen, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews* 109, 84–101 (2017).
250. Haume, K. *et al.* Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nano* 7, 8 (2016).
251. Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60, 977–985 (2008).
252. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine & Biology* 49, N309–N315 (2004).
253. Abdul Rashid, R. *et al.* Radiosensitization effects and ROS generation by high Z metallic nanoparticles on human colon carcinoma cell (HCT116) irradiated under 150 MeV proton beam. *OpenNano* 4, 100027 (2019).
254. Geilich, B. M. *et al.* Silver nanoparticle-embedded polymersome nanocarriers for the treatment of antibiotic-resistant infections. *Nanoscale* 7, 3511–3519 (2015).
255. Thomas, R., Park, I.-K. & Jeong, Y. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 15910–15930 (2013).
256. Durgadas, C. V., Sharma, C. P. & Sreenivasan, K. Fluorescent and superparamagnetic hybrid quantum clusters for magnetic separation and imaging of cancer cells from blood. *Nanoscale* 3, 4780–4787 (2011).
257. Wang, Y.-X. J., *et al.* Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology* 11, 2319–2331 (2001).
258. Lee, J. E. *et al.* Uniform Mesoporous Dye-Doped Silica Nanoparticles Decorated with Multiple Magnetite Nanocrystals for Simultaneous Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 132, 552–557 (2010).
259. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* 103, 317–324 (2011).
260. Diagaradjane, P. *et al.* Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Expression In vivo: Pharmacokinetic and Biodistribution Characterization of a Bioconjugated Quantum Dot Nanoprobe. *Clinical Cancer Research* 14, 731–741 (2008).



Effet ouzo et nanocapsules

SOMMAIRE

| | | |
|---------------|--|------------|
| II.1. | NANOPARTICULES UTILISEES POUR LA SYNTHESE DES NANOCAPSULES PAR EFFET OUZO..... | 110 |
| II.1.1. | NP D'OXYDE DE FER (SPION)..... | 110 |
| II.1.2. | NANOPARTICULES D'OR (AUNP)..... | 111 |
| II.1.3. | QUANTUM DOTS (QD)..... | 112 |
| II.1.3.1. | QD CdSe@ZnS (société Cytodiagnosics)..... | 112 |
| II.1.3.2. | QD InP@ZnS..... | 112 |
| II.2. | LE SYSTEME OUZO « EAU/THF/HYDROXYTOLUENE BUTYLE (BHT) » | 113 |
| II.2.1. | BHT..... | 113 |
| II.2.1.1. | Rôle du BHT..... | 113 |
| II.2.1.2. | Dosage de la quantité de BHT dans le THF commercial..... | 114 |
| II.2.2. | DIAGRAMME DE PHASE « EAU/THF/BHT »..... | 115 |
| II.2.3. | CARACTERISTIQUES DE TAILLE ET DE CONCENTRATION DU SYSTEME..... | 117 |
| II.2.3.1. | Région avant le domaine ouzo..... | 118 |
| II.2.3.2. | Domaine ouzo..... | 121 |
| II.3. | FABRICATION DE NANOCAPSULES COLLOÏDALES A PARTIR DU SYSTEME « EAU/THF/BHT » | 125 |
| II.3.1. | ROLE DES LIGANDS DES NANOPARTICULES DANS L'EFFET OUZO..... | 125 |
| II.3.1.1. | Octylamine (OA)..... | 126 |
| II.3.1.2. | Acide oléique (OIAc)..... | 127 |
| II.3.1.3. | Octylamine (OA) + acide oléique (OIAc)..... | 128 |
| II.3.1.4. | Oléylamine (OIA)..... | 129 |
| II.3.1.5. | Résumé des domaines ouzo présents pour les différents solutés hydrophobes..... | 130 |
| II.3.2. | ANALYSE DU PROCEDE DE FABRICATION DES NANOCAPSULES..... | 133 |
| II.3.2.1. | Élimination du solvant..... | 133 |
| II.3.2.2. | Temps d'attente avant ajout du polymère et avant évaporation..... | 134 |
| II.3.3. | REALISATION DES HYBRIDOSOMES..... | 136 |
| II.3.3.1. | Quantum dots..... | 136 |
| II.3.3.1.1. | Quantum dots (Cytodiagnosics)..... | 136 |
| II.3.3.1.1.1. | Influence de la quantité de QD et du polymère..... | 136 |
| II.3.3.1.1.2. | Propriétés de fluorescence..... | 138 |
| II.3.3.1.2. | Quantum dots InP@ZnS..... | 139 |
| II.3.3.1.2.1. | Diagrammes de phase et caractéristiques des objets obtenus..... | 140 |
| II.3.3.1.2.2. | Effet de taille..... | 144 |
| II.3.3.1.2.3. | Fluorescence..... | 145 |
| II.3.3.1.2.4. | Purification des hybridosomes par centrifugation..... | 147 |
| II.3.3.2. | Nanoparticules d'or..... | 148 |
| II.3.3.2.1. | Influence du polymère..... | 148 |
| II.3.3.2.2. | Influence de la quantité d'AuNP..... | 152 |
| II.3.4. | MELANGE DE NANOPARTICULES..... | 153 |
| II.3.5. | AJOUT DE PLUSIEURS COUCHES POLYMERIQUES AUTOUR DES CAPSULES (LBL)..... | 154 |
| II.4. | NANO-OBJETS HYBRIDES SPION@SILICE..... | 155 |
| II.4.1. | INFLUENCE DE LA QUANTITE DE TEOS..... | 156 |
| II.4.2. | INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SOLUTION (ETHANOL + AMMONIAQUE)..... | 162 |
| II.5. | CONCLUSION..... | 165 |
| II.6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 167 |

Dans ce deuxième chapitre, nous allons étudier l'utilisation de l'effet ouzo pour la fabrication de nanocapsules composées de NP inorganiques et de polymère, les **hybridosomes**. La première partie de ce chapitre va porter sur les aspects fondamentaux du système ouzo que nous utilisons, à savoir le système « eau/THF/hydroxytoluène butylé (BHT) ». À travers l'étude du diagramme de phase ainsi que les mesures de taille et de concentration, le but est de comprendre comment se comporte le système en fonction de sa composition. Nous aborderons ensuite l'élaboration des nanocapsules, en étudiant tout d'abord l'influence des ligands des NP sur l'effet ouzo, puis celle des conditions d'élaboration. Nous présenterons finalement une adaptation de l'effet ouzo à la fabrication de particules comportant un cœur de NP d'oxyde de fer et une couche externe de silice (SPION@SiO₂).

II.1. Nanoparticules utilisées pour la synthèse des nanocapsules par effet ouzo

Afin de préparer les hybridosomes, nous utilisons l'effet ouzo en présence de NP inorganiques, dont les caractéristiques propres permettent de moduler les propriétés des hybridosomes finalement obtenus. Ces NP sont toutes hydrophobes et peuvent être redispersées dans le THF. Afin de ne pas y faire référence plus tard, les lignes suivantes présentent brièvement les différentes NP utilisées. Le chapitre V (partie expérimentale) en présentera une description plus détaillée.

II.1.1. NP d'oxyde de fer (SPION)

Les SPION utilisées sont des NP de maghémite (γ -Fe₂O₃) d'un diamètre de $4,2 \pm 1,7$ nm déterminé par TEM (cf. histogrammes partie expérimentale). La synthèse de ces SPION a été développée par Myrtil Kahn (LCC, Toulouse).¹ Il s'agit d'une hydrolyse contrôlée d'un précurseur organométallique de fer (II) – [(Fe{N(SiMe₃)₂})₂]₂ – en présence de ligand stabilisant qui fait aussi office de solvant. Ce ligand a varié au cours de cette thèse. Dans la thèse précédente (F. Sciortino), des SPION stabilisées par une alkylamine ont été utilisées (2 eq d'octylamine pour 1 eq de Fe pour la synthèse). Dans notre cas, nous avons utilisé dans la majeure partie de cette thèse un même lot de SPION stabilisées par un mélange acide – amine (2 eq octylamine / 1 eq acide oléique). Cette modification du ligand a été décidée suite à des difficultés pour obtenir les hybridosomes (avec des synthèses en principe identiques à celles utilisées par F. Sciortino). La question de la nature des ligands des NP est d'une grande importance et fera l'objet d'une partie dans ce chapitre.

Dans notre cas, les SPION sont intéressantes pour le magnétisme qu'elles confèrent aux hybridosomes. Ainsi, elles sont utiles dans les applications biomédicales comme agent de contraste IRM ou pour évaluer leur biodistribution.² Cette utilisation en imagerie a déjà été validée par notre équipe lors de la thèse de Flavien Sciortino, comme introduit dans le chapitre précédent.^{3,4} D'un point de vue pratique, elles permettent de purifier les objets obtenus par séparation magnétique sur un aimant permanent.

II.1.2. Nanoparticules d'or (AuNP)

Nous avons aussi utilisé des AuNP. Les AuNP hydrophobes disponibles commercialement sont bien souvent stabilisées par des ligands thiols, très stables. C'est ce type d'AuNP qui a été utilisé lors de la thèse de Flavien Sciortino, avec le dodécane-thiol (ddt) comme ligand. Cependant F. Sciortino n'avait pas réussi à élaborer des hybridosomes à partir des AuNP-ddt uniquement. Notre hypothèse était alors que ces ligands étaient difficilement remplaçables par le polymère, du fait de leur fort ancrage à la surface des AuNP. Ces AuNP-ddt ont tout de même permis d'accéder à des hybridosomes mixtes SPION/AuNP. Dans l'optique de pouvoir plus facilement faire l'échange de ligand, nous avons utilisés des AuNP-oléylamine (AuNP-OIA).

Des AuNP-OIA hydrophobes d'un diamètre d'environ 10 nm ont ainsi finalement été synthétisées selon la littérature⁵ (détails dans le chapitre V). En bref, il s'agit de la réduction d'un sel d'or – $\text{HAuCl}_4, 3 \text{H}_2\text{O}$ – dans l'oléylamine, qui joue à la fois le rôle de ligand et de réducteur à 150°C. Les AuNP-oléylamine obtenues ont un diamètre de $9,8 \pm 2,3$ nm déterminé par TEM (cf. histogramme partie expérimentale). Ces AuNP sont la base de tous les travaux suivants comportant des AuNP.

Les AuNP ont notamment attiré notre attention pour des applications biomédicales,⁶ mais elles sont aussi intéressantes dans d'autres domaines, notamment la catalyse⁷ ou encore des applications plasmoniques. Les applications biomédicales justifient tout à fait l'assemblage sous forme de capsules pour l'accès à des plateformes polyvalentes, permettant par exemple la chimiothérapie *via* l'encapsulation d'un principe actif et la radiothérapie grâce aux AuNP.

II.1.3. Quantum dots (QD)

Nous avons aussi utilisé un autre type de NP : les QD. Comme évoqué en introduction, ces NP semi-conductrices ont l'avantage de présenter un pic d'émission étroit et d'être très modulables en fonction de leur nature chimique et/ou de leur taille. Ces NP sont particulièrement intéressantes pour les applications biomédicales en imagerie et diagnostic,⁸ sous réserve de maîtriser leur toxicité, mais aussi dans des domaines très variés tels que les diodes électroluminescentes ou encore l'énergie photovoltaïque, le stockage d'énergie, l'informatique etc. Dans notre cas, nous nous intéressons aux QD, pour leur fluorescence.

Nous avons utilisé deux types de QD, composés de CdSe@Zns ou d'InP@ZnS.

II.1.3.1. QD CdSe@ZnS (société Cytodiagnosics)

Les premiers QD utilisés sont produits par la société Cytodiagnosics Inc. Ils sont constitués de Cd_xSe_{1-x}@ZnS, avec un diamètre de l'ordre de 6 nm peu importe la longueur d'onde d'émission. C'est donc la variation de composition qui permet la modulation de fluorescence. L'avantage pour nous est qu'ils sont disponibles avec de nombreuses longueurs d'onde d'émission, entre 450 et 665 nm. Nous ferons d'ailleurs référence à ces NP sous le nom de « QD Cytodiagnosics X nm », en référence à leur longueur d'onde d'émission. Ces NP sont stabilisées par l'acide oléique et sont donc hydrophobes, avec une bonne solubilité dans le toluène mais aussi dans le THF. Le fabricant indique un rendement quantique >40%, quel que soit le QD.

II.1.3.2. QD InP@ZnS

Les autres QD utilisés sont des QD InP@ZnS non commerciaux, développés par F. Delpech (LCPNO, Toulouse).⁹ Ces QD à base d'indium et de phosphore ont l'avantage d'être moins toxiques que d'autres QD comportant des éléments tels que de cadmium ou encore le plomb. Ces QD sont préparés en deux étapes. En premier lieu la formation d'InP@acide palmytique à partir d'un complexe d'indium amidinate – In(amid)₃ – et d'un précurseur de phosphore – P(SiMe₃)₃ – en présence d'acide palmytique. Ces QD InP sont finalement recouverts d'une couche de ZnS et stabilisés par l'oléylamine. Plus de détails sur ces QD sont disponibles dans la partie expérimentale.

Nous avons à notre disposition deux QD, que nous appellerons QD1 et QD2. Leurs caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 2. 1** ci-dessous :

Tableau 2. 1 – Caractéristiques des deux QD InP@ZnS utilisés.

| | D^{TEM} (nm) | $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm) | $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm) | Largeur à mi-hauteur (nm) |
|-----|-----------------------|--|---|---------------------------|
| QD1 | 3 – 4 | 508 | 575 | 58 |
| QD2 | 5 – 6 | 572 | 635 | 68 |

II.2. Le système ouzo « eau/THF/hydroxytoluène butylé (BHT) »

Le système « eau/THF/BHT » n’a jamais été spécialement utilisé ni étudié dans le contexte d’effet ouzo. Des travaux avaient quand même déjà mis en évidence l’existence de nanostructures liées à la présence de BHT, en particulier les travaux de Sedlák *et al.* (cf. chapitre I). Pour nous, son utilisation n’était pas intentionnelle au départ, le BHT se trouvant dans certaines qualités de THF en tant qu’antioxydant. Au fur et à mesure de notre compréhension du système « eau/THF commercial » pour l’élaboration d’assemblage de NPs, la question du BHT s’est posée. Dans cette première partie, nous allons aborder l’importance du BHT pour la formation d’un domaine ouzo. Puis nous explorerons plus en détails les caractéristiques et le comportement du système à différentes compositions.

II.2.1. BHT

II.2.1.1. Rôle du BHT

Afin d’étudier le rôle du BHT, nous avons réalisé plusieurs mélanges « eau/THF ». Le THF est soit un « THF pur » sans BHT, ou le « THF avec BHT » qui est du THF pur additionné de BHT. Nous les avons ensuite analysés par DLS (**Figure 2. 1**). Le mélange « eau/THF (sans BHT) » ne présente pas de structures nanométriques particulières (les toutes petites structures – < 1 nm – sont en dessous de la limite de détection de l’appareil et peuvent n’avoir aucune signification physique). En revanche, en présence de BHT, des objets de l’ordre de la centaine de nanomètre sont présents (diamètre hydrodynamique moyen de 190 nm en nombre). **Le BHT est donc clairement un composant nécessaire à la formation de gouttelettes dans le mélange « eau / THF ».**

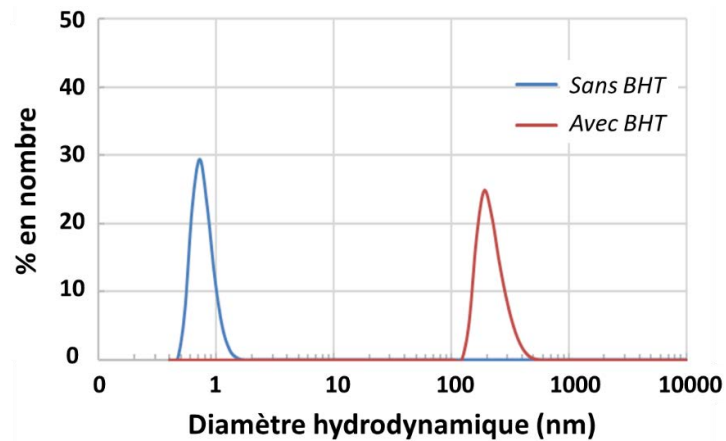


Figure 2. 1 – Distributions de tailles du système eau/THF sans BHT (bleu) et avec BHT (rouge) obtenues par DLS. Le ratio volumique eau/THF est de 75:25.

II.2.1.2. Dosage de la quantité de BHT dans le THF commercial

Étant donné l'utilité du BHT dans l'établissement de l'effet ouzo, il est important de doser la quantité de BHT dans le THF commercial dont nous disposons (THF VWR GPR Rectapur). Le dosage est fait par spectrométrie UV à 278 nm, notre spectromètre présentant pour ce composé une sensibilité de l'ordre du ppm (mg/kg) (Figure 2. 2). La concentration en BHT dans le THF commercial est déterminée à 318 ± 10 ppm, soit $1,28 \pm 0,04$ mM.

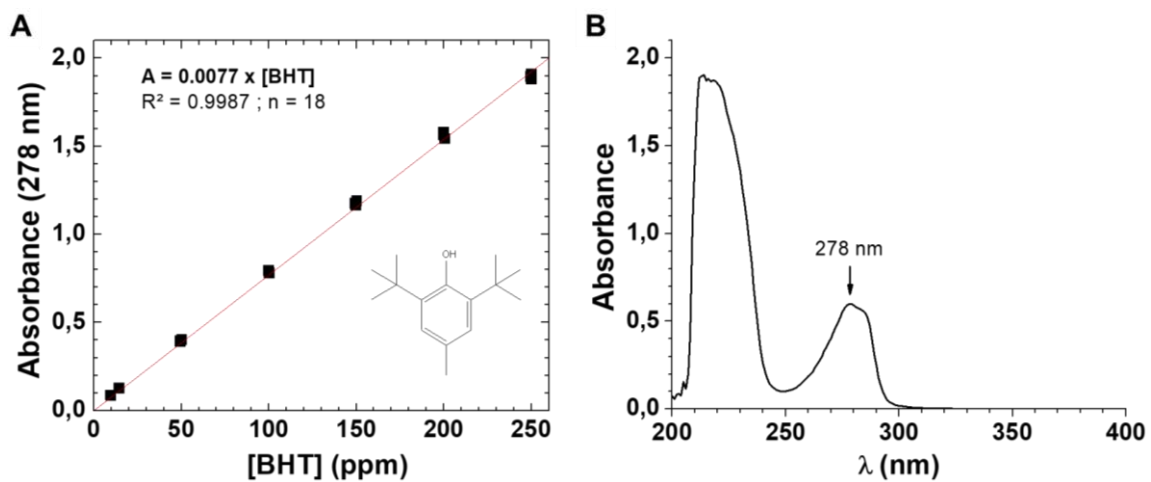


Figure 2. 2 – Dosage du BHT présent dans le THF commercial par spectrométrie UV. (A) Courbe d'étalonnage. (B) Spectres d'absorbance du THF commercial dilué 4 fois avec du THF pur.

Dans les conditions expérimentales classiques de fabrication des hybridosomes, les fractions volumiques, massiques et molaires des constituants du système sont données dans le **Tableau 2. 2** ci-dessous :

Tableau 2. 2 – Fractions volumique (ϕ_v), massique (ϕ_{mass}) et molaire (ϕ_{mol}) des différents constituants du système eau / THF / BHT dans les conditions expérimentales classiques pour la fabrication d'hybridosomes.

| | Eau | THF | BHT |
|---|------|------|---------------------|
| Fraction volumique (Φ_v) | 0,75 | 0,25 | $6,7 \cdot 10^{-5}$ |
| Fraction massique (Φ_m) | 0,77 | 0,23 | $7,3 \cdot 10^{-5}$ |
| Fraction molaire (Φ_{mol}) | 0,93 | 0,07 | $7,2 \cdot 10^{-6}$ |

$$\begin{aligned} \rho_{eau} &= 0,997 & M_{eau} &= 18 \text{ g/mol} \\ \rho_{THF} &= 0,889 & M_{THF} &= 72 \text{ g/mol} \\ \rho_{BHT} &= 1,048 & M_{BHT} &= 220,4 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

II.2.2. Diagramme de phase « eau/THF/BHT »

Afin de comprendre le comportement du système « eau/THF/BHT », nous avons réalisé son diagramme de phase à température ambiante (25°C). Le THF utilisé est le THF « pur », exempt de BHT. Des quantités variables de BHT y sont ajoutées. La première évaluation de l'état du système se fait visuellement : transparent (monophasique), trouble stable (ouzo) ou trouble à tendance de démixage (rapidement diphasique). La **Figure 2. 3** présente le diagramme de phase ainsi réalisé, avec des photos de quelques compositions. **Un domaine ouzo se situe entre le domaine monophasique et le domaine diphasique.**¹⁰ Sans revenir sur ce qui a été dit dans le chapitre introductif, le domaine ouzo est délimité par deux frontières thermodynamiques, à savoir la binodale et la spinodale. La binodale, qui apparaît sous la forme d'une droite en échelle semi-logarithmique, représente les compositions pour les lesquelles deux phases distinctes peuvent coexister, c'est-à-dire où les potentiels chimiques de tous les composants sont identiques dans les deux phases. Ainsi, la binodale marque le passage entre la zone où le monophasique est thermodynamiquement favorable et la zone où la séparation de phase est thermodynamiquement favorable.¹¹ La spinodale représente quant à elle la frontière entre la métastabilité du monophasique et son instabilité, frontière au-delà de laquelle le système subit une décomposition spinodale.¹¹ La spinodale est atteinte lorsque la dérivée seconde de l'enthalpie libre de mélange par rapport à la composition est nulle.

Ce système ouzo « eau/THF/BHT » n’a jamais été décrit dans le détail et son établissement nous permet de comprendre où nous nous situons lors des préparations d’hybridosomes. La croix bleue sur la **Figure 2. 3** représente cette composition habituelle. On remarque que **les conditions habituelles se situent en tout début de domaine ouzo**. La connaissance de ce diagramme nous permet d’envisager la gamme de compositions qu’il est possible d’utiliser pour la fabrication des capsules.

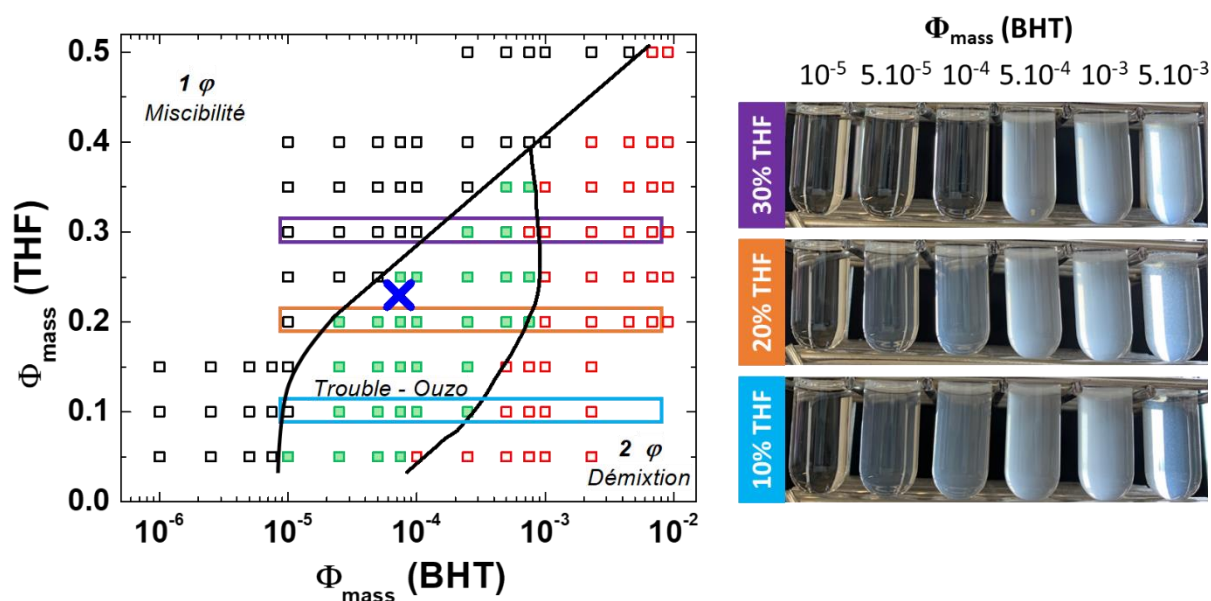


Figure 2. 3 – Diagramme de phase du système « eau/THF/BHT ». Les différents domaines sont déterminés visuellement : un domaine monophasique transparent (□), un domaine trouble « ouzo » (■) et un domaine rapidement diphasique ou présentant des gouttelettes d’huile macroscopiques (◻). Les lignes sont un guide visuel pour délimiter le domaine ouzo. La composition correspondant au THF commercial pour une préparation classique d’hybridosomes (cf. Tableau 2. 2) est indiquée par la croix bleue. Les photos de certains échantillons réalisés autour de la zone ouzo sont présentées à droite du graphique.

Cette évaluation visuelle a été confrontée théoriquement au modèle COSMO-RS (*COnductor like Screening MOdel for Real Solvents*).^{12,13} Il s’agit d’une approche basée sur le calcul de la densité de charge des molécules par mécanique quantique. Cette densité de charge peut ensuite être utilisée pour calculer le potentiel chimique des molécules dans le milieu voulu (solvant ou mélange de solvant). Ainsi, il est possible de remonter à de nombreuses propriétés, comme la solubilité dans un mélange de solvant. Ce travail a été effectué avec le logiciel COSMOthermX19. La limite de solubilité du BHT dans le mélange « eau/THF » est présentée en **Figure 2. 4 A**. La solubilité dans l’eau pure est déterminée à $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, ce qui correspond à la littérature ($2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$)¹⁴ et nous permet donc de valider le modèle. La solubilité dans le mélange utilisé pour la préparation des hybridosomes ($\Phi_{\text{mass}}(\text{BHT}) = 0,23$) est quant à elle de $6,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, ce

qui est équivalent à une fraction massique de $1,5 \cdot 10^{-4}$. La fraction massique effectivement présente lors de la préparation des hybridosomes étant de $7,3 \cdot 10^{-5}$ (cf. **Tableau 2. 2**), nous ne devrions donc pas nous trouver en sursaturation sur la base des seuls calculs COSMO-RS. On remarque toutefois que la valeur expérimentale est très proche de celle calculée par COSMO-RS. Expérimentalement, les échantillons sont troubles et se situent donc bien dans la région ouzo. La **Figure 2. 4 B** superpose le diagramme de phase visuel précédent et la ligne de solubilité théorique. Les binodales expérimentale et théorique ne se superposent pas exactement mais le modèle ne prend pas en compte tous les paramètres. Il faut en priorité se baser sur le diagramme expérimental pour la suite des expérimentations, tout en gardant bien à l'esprit que la composition classique pour la préparation des hybridosomes se situe dans une zone à la limite de la région ouzo.

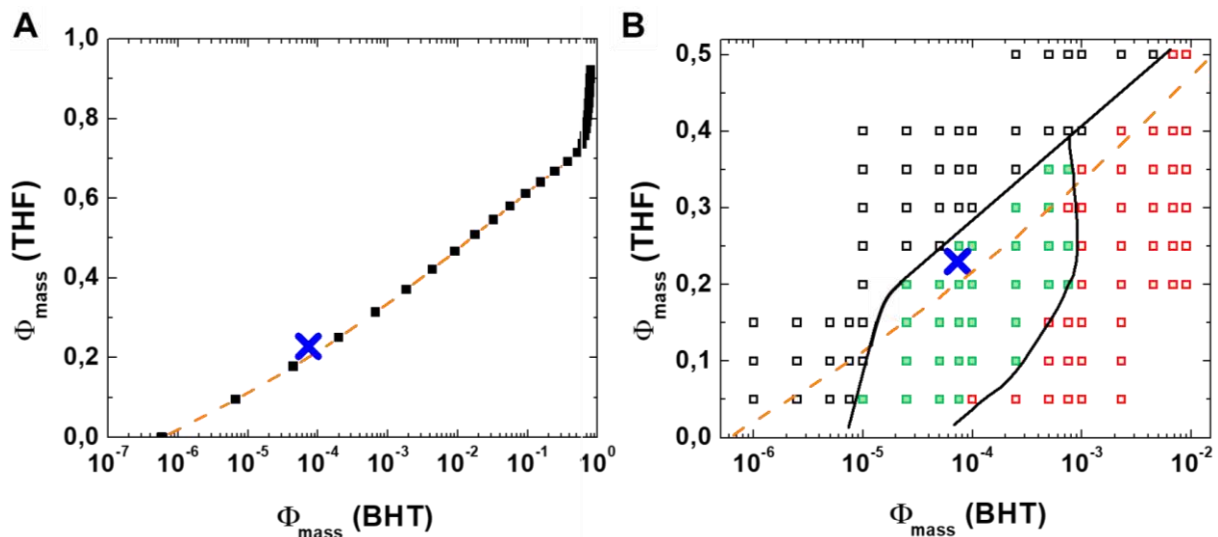


Figure 2. 4 – (A) Courbe de solubilité théorique du BHT dans le mélange eau/THF calculée par COSMO-RS. (B) Superposition du diagramme de phase visuel du système « eau/THF/BHT » (tel que présenté sur la figure précédente) et de la courbe de solubilité théorique.

II.2.3. Caractéristiques de taille et de concentration du système

Afin de caractériser plus en détail le système, le NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) a été utilisé pour suivre la taille des gouttelettes ainsi que leur concentration, à la fois dans le domaine monophasique précédant le domaine ouzo (i.e. pour des fractions massiques en BHT inférieures à l'apparition du trouble ouzo) et dans le domaine ouzo lui-même. Le NTA est une technique d'analyse de tailles de particules nanométriques (typiquement entre 10 et 1000 nm) *via* le suivi du déplacement de leurs tâches de diffusion et l'analyse du mouvement Brownien. Plusieurs vidéos des taches de diffusion sont enregistrées puis analysées en prenant en compte la viscosité du

mélange « eau/THF » utilisé.¹⁵ Cette méthode présente l'intérêt de suivre les particules uniques et d'offrir une distribution en taille fidèle. Elle permet d'accéder au diamètre hydrodynamique ainsi qu'à la concentration en particules.

II.2.3.1. Région avant le domaine ouzo

En premier lieu, nous avons étudié les variations de taille et de concentration dans le domaine monophasique précédant le domaine ouzo, en fonction des quantités de BHT et de THF. Les résultats sont présentés en **Figure 2. 5**. Deux lignes de compositions ont été effectuées, une horizontale à fraction de THF constante ($\Phi_{\text{mass}}(\text{THF}) = 0,3$) avec variation de la fraction en BHT ($\Phi_{\text{mass}}(\text{BHT})$ entre 10^{-12} et 10^{-6}), et une ligne de compositions verticale à fraction de BHT constante ($\Phi_{\text{mass}}(\text{BHT}) = 10^{-6}$) avec variation de la fraction de THF ($\Phi_{\text{mass}}(\text{THF})$ entre 0,1 et 0,5).

En ce qui concerne l'évolution en fonction de la fraction de BHT (ligne horizontale, **Figure 2. 5 A**), on remarque que le diamètre hydrodynamique est relativement stable ou diminue légèrement. Ainsi, **la quantité de soluté hydrophobe n'influence pas la taille des gouttelettes formées pour les faibles fractions de BHT**. Cela correspond à ce qui a pu être observé par ailleurs sur le système « eau/acétone/miglyol ».¹⁶ De façon notable, **la concentration en gouttelettes est stable sur 6 ordres de grandeur**. Pour ce qui est de l'évolution en fonction de la fraction de solvant (ligne verticale, **Figure 2. 5 B**), on remarque que **le diamètre hydrodynamique augmente légèrement lorsque la fraction de THF augmente**. Cette augmentation est toutefois beaucoup plus ténue que ce qui a été déjà observé, si on compare à nouveau avec le système « eau/acétone/miglyol ».¹⁶ L'information inédite est que **la concentration augmente également en fonction de la fraction de THF**. Bien que les valeurs de concentration ne soient pas précises (l'intégralité des gouttelettes n'est pas détectée et, en l'absence de tensioactif, l'échantillon ne peut pas être dilué pour avoir une vidéo idéale), elles ont toutes été obtenues avec des paramètres d'acquisition et d'analyse semblables. Ainsi, il est raisonnable de dire que la concentration en gouttelettes augmente avec la fraction de THF.

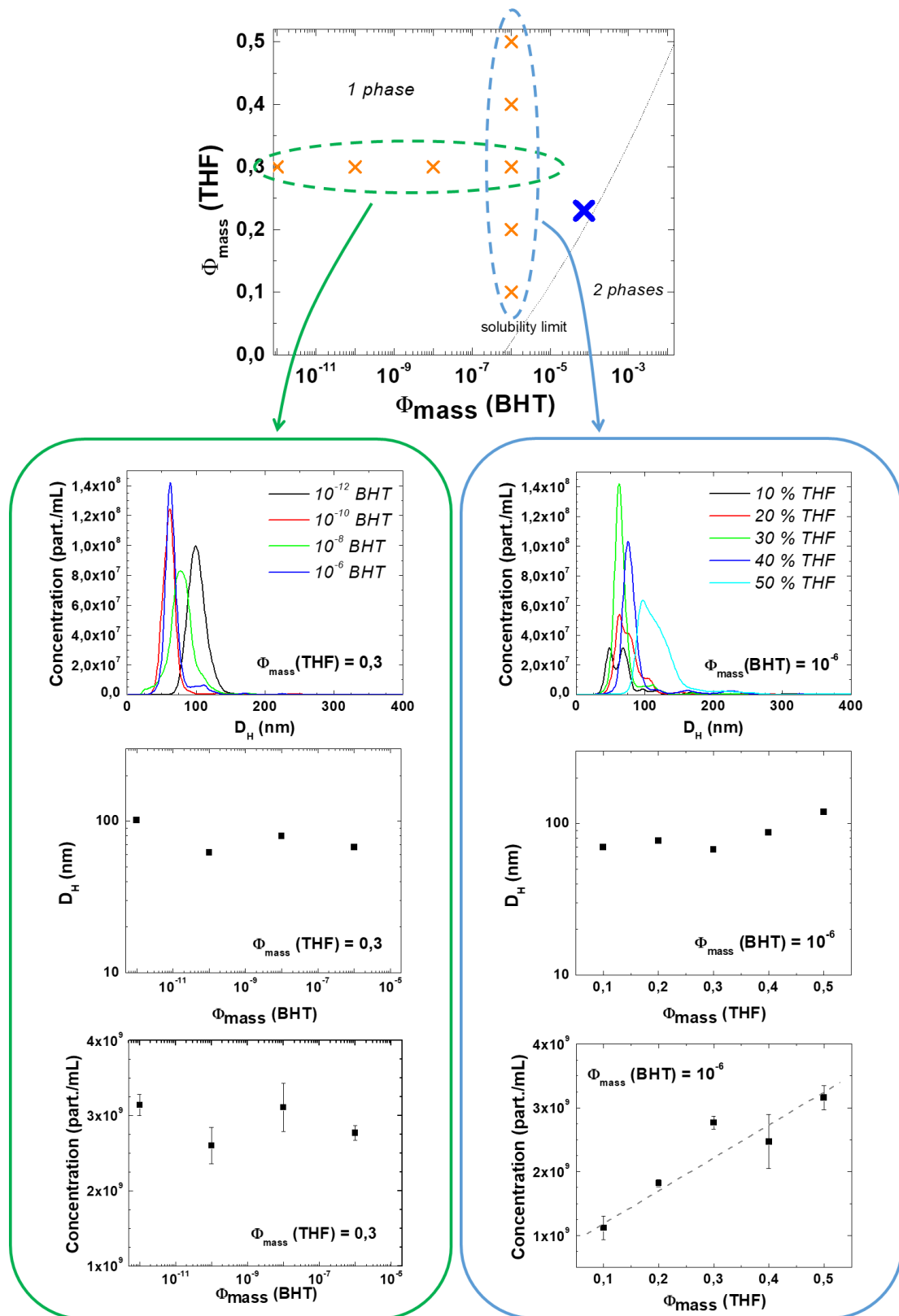


Figure 2. 5 – Exploration de la région monophasique précédant le domaine ouzo par NTA, à fraction massique de BHT constante (bleu) et à fraction massique de THF constante (vert). Les distributions de taille, les diamètres hydrodynamiques et les concentrations des compositions symbolisées par les croix orange sont présentées. La croix bleue représente la composition utilisée habituellement pour la préparation des hybridosomes. Pour tous les graphiques présents dans ce chapitre et les chapitres suivants, l'incertitude sur les D_H et les concentrations est calculée à partir de trois enregistrements NTA de 60s (détails en partie V).

Pour essayer de comprendre cette augmentation de concentration en phase dispersée lorsque la quantité de THF augmente, nous avons estimé la fraction volumique de gouttes en intégrant la distribution de taille obtenue avec le NTA (Figure 2. 6). Ainsi, à fraction de BHT constante, la fraction volumique des gouttes est plutôt constante lorsque la quantité de THF varie (entre 10 et 50% massiques). On observe aussi une certaine augmentation de fraction volumique de goutte lorsqu'il y a beaucoup de THF. De manière très intéressante, cette fraction de gouttes est **du même ordre de grandeur que la fraction en BHT**. Il semblerait donc que la majorité de l'huile se trouve dans les gouttes, avec certainement un gonflement par le solvant à haute fraction en THF. Dans tous les cas, le volume représenté par les gouttes est très faible par rapport à la quantité de THF. La phase continue est donc principalement composée du mélange « eau/THF » de départ (ce sont d'ailleurs ces valeurs de viscosité de mélanges « eau/THF » qui ont été utilisées pour les calculs).

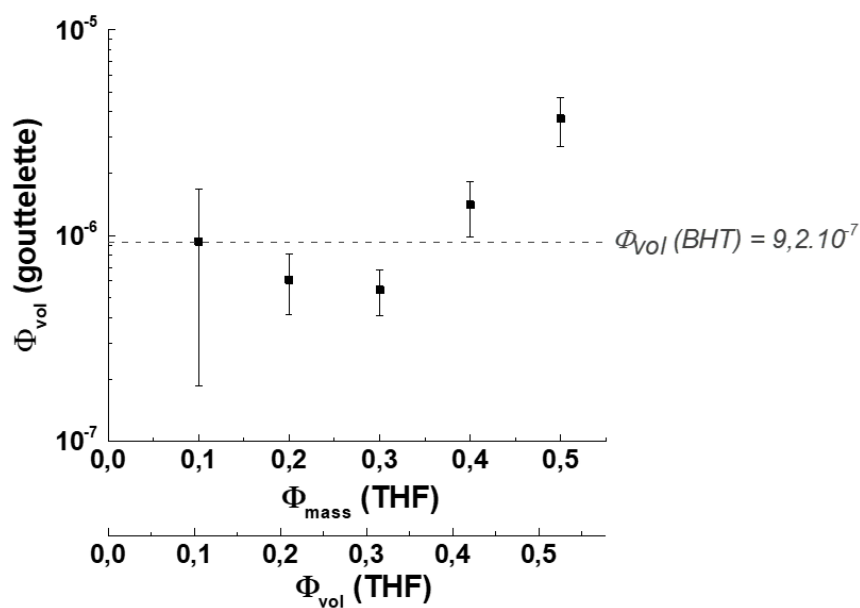


Figure 2. 6 – Évolution de la fraction volumique représentée par les gouttes avec la variation de fraction en THF. La fraction en BHT est de 10^{-6} massique, soit $9,2 \cdot 10^{-7}$ volumique. Pour tous les graphiques présents dans ce chapitre et les chapitres suivants, l'incertitude sur les fractions volumiques est calculée à partir des distributions de tailles déterminées par 3 mesures NTA de 60s (détails en partie V).

Le comportement observé à ces petites fractions en BHT ressemble au domaine SFME (*surfactant-free microemulsion*) introduit dans le premier chapitre. Bien que l'origine de ce domaine ne soit pas clairement établie, il est sûr que les nanostructures présentes ne proviennent pas d'une nucléation suite à une sursaturation comme dans le domaine ouzo, étant donné que les concentrations en BHT sont bien inférieures à la limite de solubilité dans le milieu. La

structuration pourrait notamment provenir de la densité de charge en groupements hydroxyles, les répulsions électrostatiques favorisant la formation de structures un peu à l'image de micelles.¹⁷ Le BHT présente justement un groupement hydroxyle qui pourrait conforter cette hypothèse SFME.

II.2.3.2. Domaine ouzo

Nous avons aussi étudié la zone où le système entre dans le domaine ouzo, à 10, 20 et 30 % massiques en THF (**Figure 2. 7 A**). La première information est que **dans le domaine ouzo la taille moyenne des gouttes augmente quand la quantité de BHT augmente**, et ce pour les trois fractions massiques en THF considérées. Une sorte de « cassure » est visible entre des $\Phi_{\text{mass}}(\text{BHT})$ 10^{-5} et $5 \cdot 10^{-5}$. Cela correspond à l'apparition du domaine ouzo. La cassure semble apparaître plus tardivement dans le cas d'une fraction en THF de 0,3 (points bleus), en accord à nouveau avec le diagramme de phase (**Figure 2. 3**). Cette approche par diffusion de la lumière peut permettre de détecter plus tôt l'apparition du trouble par rapport à une évaluation visuelle.

À noter que seule une petite partie du domaine ouzo peut être étudiée en raison de la forte turbidité et donc de l'importante diffusion en NTA lorsque la quantité de BHT augmente. Cela limite l'utilisation du NTA. Le NTA permet toutefois de bien voir l'apparition du domaine trouble. En ce qui concerne la concentration en gouttelettes, le NTA ne permet pas de donner de valeurs exactes. En effet, plusieurs aspects sont à prendre en considération, à savoir :

- En l'absence de tensioactif, les échantillons ne peuvent pas être dilués sinon leur composition varie.
- Il faut donc jouer sur d'autres paramètres, en particulier les paramètres d'acquisition vidéo du NTA, et tout particulièrement la puissance du laser (« camera level »). La baisse de l'intensité de laser permet de pallier l'augmentation de lumière diffusée (qui peut provenir de l'augmentation de la taille, de la concentration ou encore de l'indice de réfraction des gouttelettes (et donc de leur composition)). La diminution de l'intensité du laser permet ainsi d'avoir une vidéo analysable (i.e. pas trop de taches de diffusion et bien définies, sans bruit de fond trop important). Cependant, cette diminution masque une partie des objets diffusants qui ne sont ainsi pas comptabilisés.

Les valeurs de concentration en gouttelettes ne sont donc pas fiables de manière absolue mais une tendance peut être soulignée : **dans le domaine ouzo, la concentration en gouttelettes augmente lorsque la fraction en BHT augmente (Figure 2. 7 B)**, malgré la diminution de l'intensité du laser (« camera level »). Ces observations confirment celles précédemment faites quant à l'augmentation de la taille des gouttelettes dans le domaine ouzo en fonction de la fraction en BHT.¹⁶ **Les gouttelettes pourraient donc être majoritairement composées de soluté hydrophobe**, ou du moins plus que dans le domaine SFME.

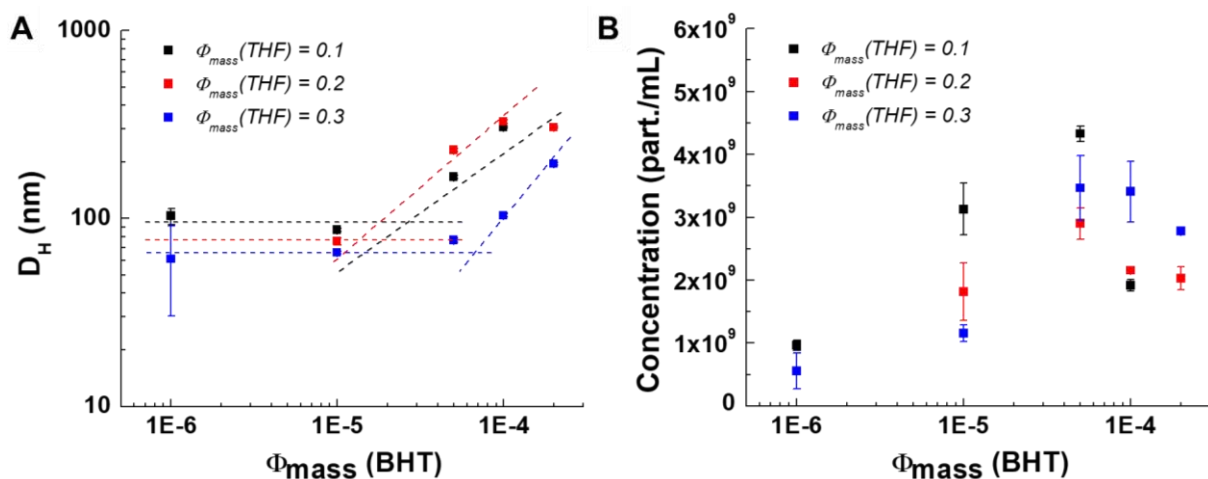


Figure 2. 7 – Étude du système « eau/THF/BHT » au niveau de la zone d'apparition du domaine ouzo (cf. Figure 2. 3) par NTA. Évolution du diamètre hydrodynamique (A) et de la concentration (B) des gouttelettes présentes dans le système en fonction de de la fraction massique en BHT et pour différentes fractions massiques de THF.

À noter que la littérature a fait état de structures de l'ordre de 100 nm de diamètre avec un cœur de BHT et une coquille composée d'un mélange « eau/THF » comprenant entre 23 et 30 % massiques en THF (pour un système « D₂O/THF/BHT » composé globalement de 16% et 2,3.10⁻⁶ massiques de THF et de BHT, respectivement).¹⁸ Il semblerait ainsi que les gouttelettes observées ne soient pas uniquement composées de BHT mais aussi du mélange « eau/solvant », avec plus de solvant que dans la phase continue.

Pour finir, nous avons étudié plusieurs compositions en fonction du temps. Ces échantillons contiennent tous 25% massique de THF et des fractions massiques en BHT variables : deux compositions se situent dans le domaine monophasique avant la région ouzo (Φ_{mass}(BHT) = 10⁻⁶ et 10⁻⁵) et une composition est dans le domaine ouzo (Φ_{mass}(BHT) = 10⁻⁴). L'objectif est de voir l'évolution de la taille et de la concentration afin d'obtenir des informations sur la stabilité des gouttes et donc éventuellement des réponses sur l'appartenance ou non au domaine SFME

(thermodynamiquement stable). La **Figure 2. 8** résume les diamètres hydrodynamiques moyens **(A)** ainsi que les concentrations en gouttelettes **(B)**. On retrouve les informations précédentes, c'est-à-dire que **la taille est plus importante dans la zone ouzo qu'avant celle-ci, tout comme la concentration**, même si l'effet est plus ténu. De manière intéressante, **la taille est relativement stable sur les 9 h d'observation, et ce pour tous les échantillons**. On voit une petite augmentation de taille dans les premières heures mais sans grande amplitude. La stabilité de la taille dans le temps est quelque chose d'attendu pour le domaine SMFE thermodynamiquement stable. Les fluctuations au début peuvent correspondre à l'établissement et du système. En revanche, la région ouzo est métastable et on devrait voir une augmentation de taille en fonction du temps, même faible. Il est probable que la gamme de temps étudiée est trop courte. Au niveau de la concentration, il y a aussi des fluctuations au début mais c'est relativement stable, avec une concentration légèrement plus élevée dans le domaine ouzo (rouge).

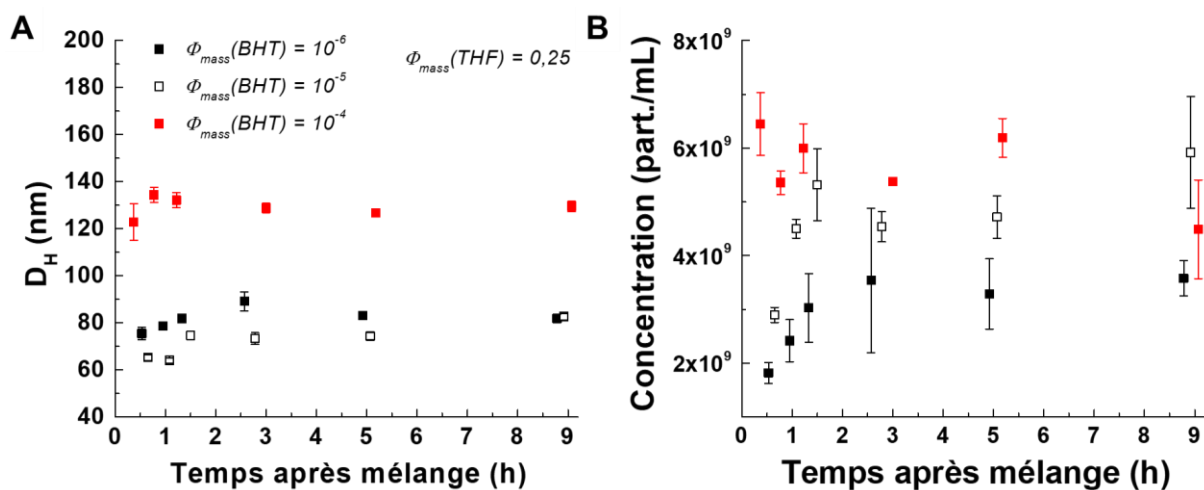


Figure 2. 8 – Évolution dans le temps de la taille et de la concentration des gouttelettes dans les mélanges « eau/THF/BHT » comportant une fraction massique en BHT de 10^{-6} (■), 10^{-5} (□) ou 10^{-4} (■). Les deux premières compositions se situent avant le domaine ouzo et la troisième est dans la région ouzo.

Afin de mieux comparer, nous pouvons transformer ces diamètres et concentrations en volume de phase dispersée. Ceux-ci sont reportés sur la **Figure 2. 9**. **Le volume de gouttes dans la zone ouzo est plus important que dans la zone « SFME »**. Les deux compositions avant la zone ouzo ont strictement le même volume de gouttes. **Le volume de gouttes est stable dans le temps** pour toutes les compositions. Pour les deux compositions situées avant la zone ouzo, la fraction volumique de goutte est de l'ordre de 1 à 2.10^{-6} (cf. Tableau 2.9 ci-dessous). La fraction volumique représentée par le BHT est quant à elle de l'ordre de 9.10^{-7} ($\phi_{mass}(BHT) = 10^{-6}$) et de 9.10^{-6} ($\phi_{mass}(BHT) = 10^{-5}$). **Le volume de la phase dispersée et celui représenté par le BHT sont**

donc très proches dans le « SFME ». On note toutefois qu'entre ces deux points, situés avant le domaine ouzo, le volume occupé par le BHT est multiplié par 10 alors que le volume des gouttes mesuré est sensiblement le même. Il semblerait donc que dans le domaine SFME le volume de gouttes ne soit pas fixé par le volume BHT mais par autre chose. Cela rejoint les observations précédentes. Concernant la composition dans la zone ouzo, la fraction volumique de gouttes est de l'ordre de 10^{-5} alors que celle de BHT est 10 fois plus élevée. Cela pourrait aller dans le sens de gouttelettes majoritairement chargées en BHT, avec toutefois une partie du BHT qui ne se retrouve pas dans les gouttelettes.

Encore une fois, ces analyses de volumes sont délicates, notamment dans la zone ouzo où la concentration est sous-estimée du fait des réglages nécessaires au NTA à cause de la concentration importante en particules. À titre informatif, les concentrations présentées jusqu'ici sont en général de l'ordre de 10^9 - 10^{10} particules/mL. Lorsque l'on étudie des hybridosomes, la concentration est plutôt de l'ordre de 10^{11} (cf. suite du chapitre). Ici, nous sous-évaluons donc probablement la concentration d'un ou deux ordres de grandeur. Les concentrations en valeur absolue sont donc délicates à exploiter.

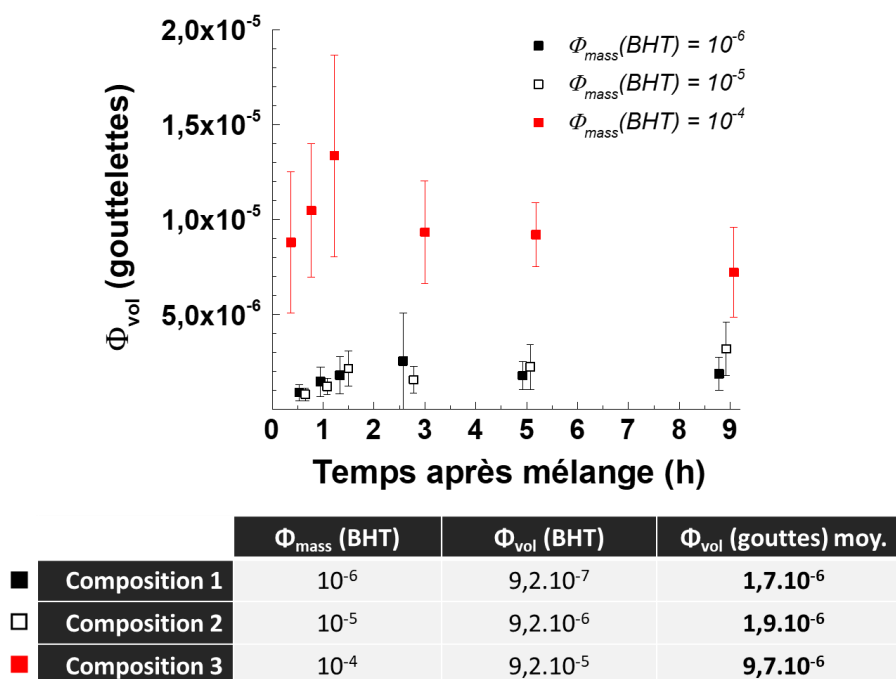


Figure 2. 9 – Évolution des fractions volumiques de gouttelettes des 3 points étudiés en fonction du temps. Les mélanges sont réalisés à 25 %w THF. Le tableau synthétise les fractions massique et volumique en BHT ainsi que la fraction volumique moyenne de gouttes pour chaque échantillon.

II.3. Fabrication de nanocapsules colloïdales à partir du système « eau/THF/BHT »

Le système « eau/THF/BHT » décrit jusqu'ici a été utilisé pour la fabrication de nanocapsules hybride NP/polymère. La figure suivante schématise les étapes de fabrication des hybridosomes et les points que nous allons étudier dans la suite de ce chapitre :

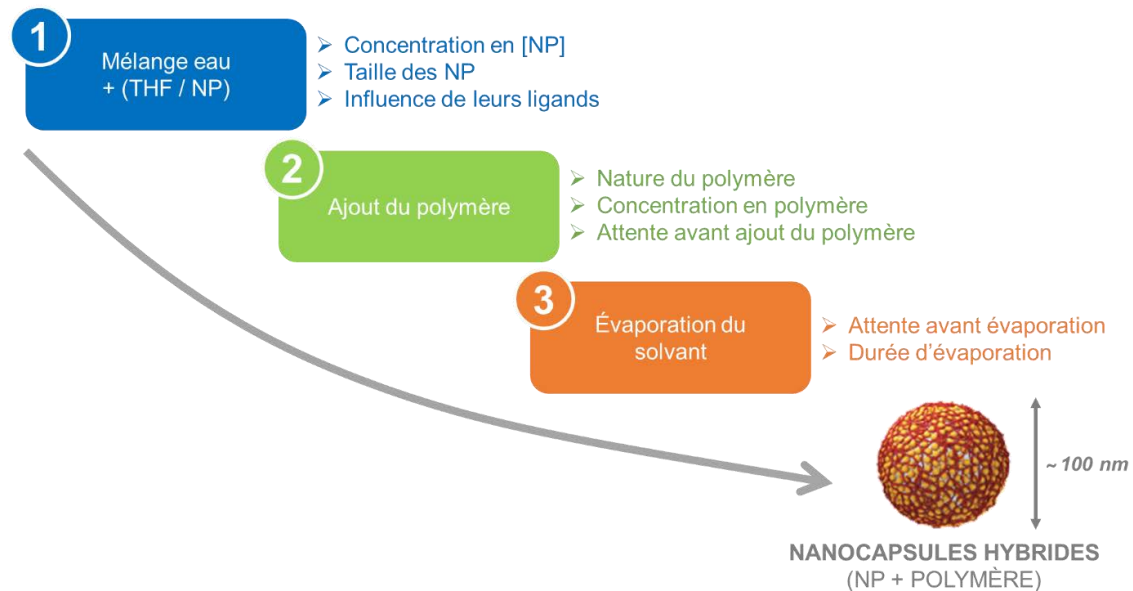


Figure 2. 10 - Schéma des principales étapes du procédé de préparation des hybridosomes, avec les points étudiés dans la suite du chapitre.

II.3.1. Rôle des ligands des nanoparticules dans l'effet ouzo

Plusieurs indices nous incitent à envisager une influence des ligands des NP lors de la fabrication des hybridosomes. En effet, nous avons pu remarquer qu'un mélange « eau/THF (sans BHT)/NP » permet parfois la formation de gouttelettes et l'élaboration de capsules. Ce phénomène a été observé dans le cadre de QD, de SPION ou bien d' AuNP (comme nous le verrons plus tard). Nous savons pourtant qu'un mélange « eau/THF pur » ne donne lieu à la formation d'aucune nanostructure. Il semblerait donc que les NP et leurs ligands jouent un rôle.

Cette réflexion sur les ligands découle également de notre utilisation des SPION. La thèse précédente (F. Sciortino) a développé l'élaboration d'hybridosomes à partir de SPION@octylamine. Toutefois, j'ai eu des difficultés à reproduire ces préparations au début de ma thèse, l'obtention d'hybridosomes n'étant pas garantie en fonction des lots de SPION utilisés. Deux lots avec le même ligand pouvaient même donner des résultats différents. Ainsi, l'idée que les ligands (leur nature et leur concentration) pourraient avoir un rôle sur le procédé de fabrication

des hybridosomes a pris forme. Nous avons donc établi les diagrammes de phase des différents ligands utilisés dans le système « eau/THF pur ». Le but est de déterminer si ces ligands peuvent générer un domaine ouzo et le cas échéant dans quelle gamme de compositions.

II.3.1.1. Octylamine (OA)

Le premier ligand étudié est l'octylamine (OA). Il est présent à la surface des SPION. Nous ne savons toutefois pas quelle est la quantité qui pourrait être « libre » en solution et interférer avec le système. La **Figure 2. 11** présente le diagramme de phase du système « eau/THF pur/OA ». Un domaine ouzo est présent, pour de faibles quantités de THF ($\Phi_{\text{mass}}(\text{THF}) < 0,15$) et fortes fractions d'OA ($\Phi_{\text{mass}}(\text{OA}) > 10^{-3}$). Toutefois, ces proportions en THF sont très éloignées de celles que nous utilisons ($\Phi_{\text{mass}}(\text{THF}) = 0,23$; ligne bleue). Ainsi, l'OA seule ne permet pas de former un domaine dans nos conditions de composition eau/THF.

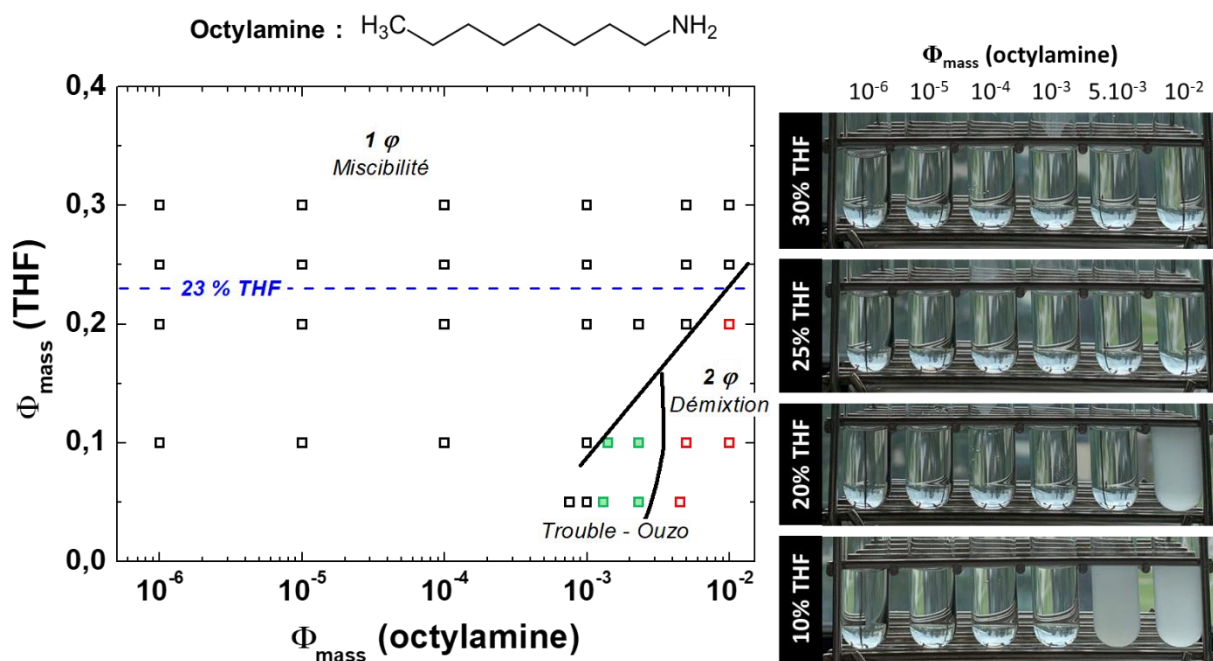


Figure 2. 11 – Diagramme de phase du système « eau/THF pur/octylamine ». Les différents domaines sont déterminés visuellement : un domaine monophasique transparent (□), un domaine trouble « ouzo » (■) et un domaine diphasique ou présentant des gouttelettes d'huile macroscopiques (◻). Les observations sont faites dans les 20 minutes suivant la préparation des différentes compositions. Les lignes sont un guide visuel pour délimiter les domaines. Expérimentalement, le système est classiquement composé de 23% massique en THF, avec une composition en octylamine inconnue (ligne bleue). Les photos des échantillons réalisés sont présentées à droite du graphique.

II.3.1.2. Acide oléique (OIAc)

Les SPION de deuxième génération sont élaborés dans un mélange d'OA et d'acide oléique (OIAc). Ce nouveau lot de SPION a été synthétisé à la suite de problèmes de reproductibilité rencontrés avec les SPION@OA. La proportion d'OA et d'OIAc (en se basant sur les proportions de synthèse des SPION) est d'1 équivalent d'OA pour 0,5 équivalent d'OIAc, ce qui correspond à un ratio massique OA/OIAc de 48:52.

En premier lieu si l'on regarde juste l'OIAc, on remarque que son comportement dans le système « eau/THF » diffère complètement de celui de l'octylamine (Figure 2. 12). Un grand domaine ouzo existe sur une large plage de fractions de THF et de BHT. **Il est donc possible qu'à 23 % massique en THF (ligne bleue) les molécules d'OIAc « libres » induisent la formation d'un domaine ouzo**, si leur concentration correspond à celle du domaine ouzo. Ainsi, l'OIAc favorise la formation d'un domaine ouzo et peut faciliter l'obtention des capsules.

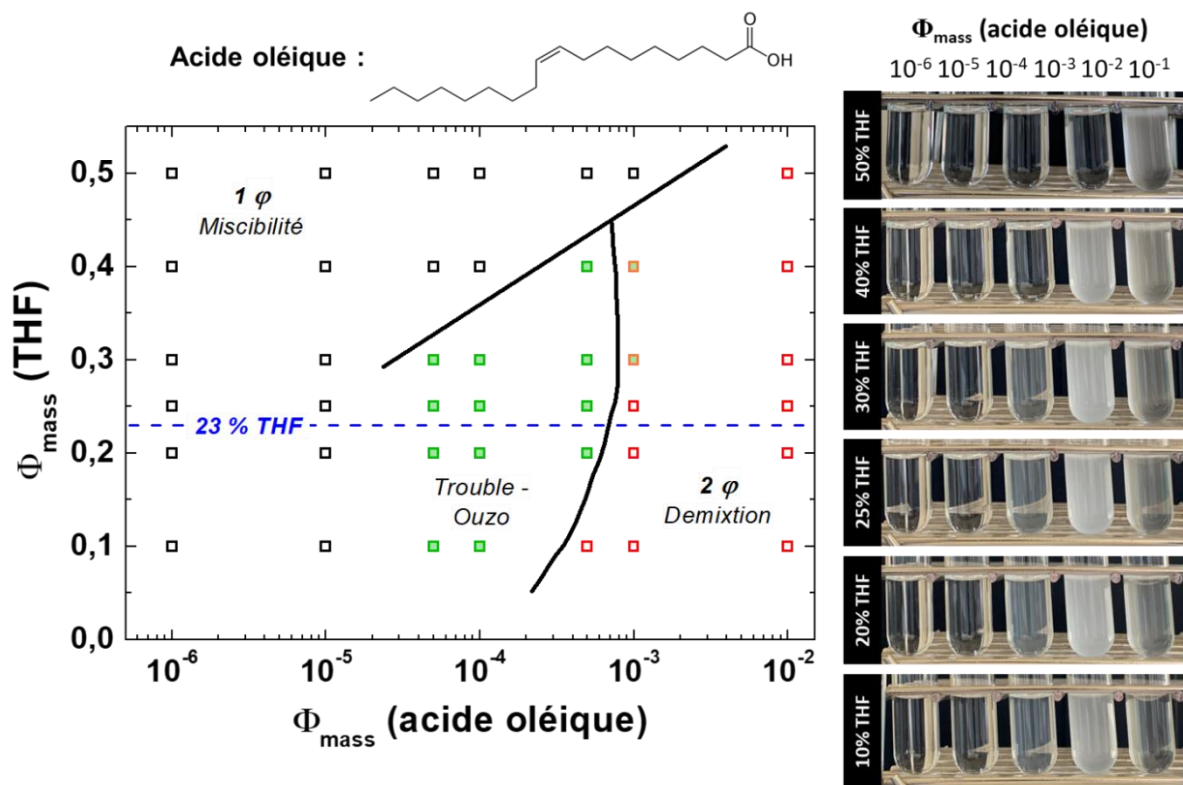


Figure 2. 12 – Diagramme de phase du système eau / THF (sans BHT) / acide oléique. Les différents domaines sont déterminés visuellement : un domaine monophasique transparent (\square), un domaine trouble « ouzo » (\blacksquare) et un domaine diphasique ou présentant des gouttelettes d'huile macroscopiques (\square). Un doute persiste sur certaines compositions (échantillons diphasique ou non ?) (\blacksquare). Les observations sont faites dans les 20 minutes suivant la préparation des différentes compositions. Les lignes sont un guide visuel pour délimiter les domaines. Expérimentalement, le système est classiquement composé de 23% massique en THF, avec une composition en acide oléique inconnue (ligne bleue). Les photos des échantillons réalisés sont présentées à droite du graphique.

II.3.1.3. Octylamine (OA) + acide oléique (OIAc)

Il est intéressant de regarder le mélange (OA + OIAc) pour comprendre leur comportement lorsqu'ils coexistent. Le diagramme de phase du système « eau/THF/(OA + OIAc 48:52) » a donc été réalisé (**Figure 2. 13**). Alors qu'il n'y avait qu'un tout petit domaine ouzo sans intérêt pour nous avec l'OA seule, il y a ici un grand domaine ouzo décalé vers les plus grandes fractions de ligands par rapport à l'OIAc seul. La région ouzo (OA + OIAc) se trouve ainsi entre celle de l'OA et de l'OIAc. **Le système (OA + OIAc) se comporte donc très différemment des deux ligands seuls et présente un domaine ouzo exploitable à 23% de THF.** Cela pourrait expliquer en partie la plus grande facilité à faire des hybridosomes avec les SPION@OA+OIAc.

Ce décalage de zone par rapport à l'OA seule et l'OIAc seul ne semble pas être juste une superposition de deux domaines ouzo. Il semblerait qu'une nouvelle espèce se forme. En effet, la mise en contact de l'OA et de l'OIAc produit de la chaleur, des vapeurs et le mélange devient jaune. La caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C , et notamment la DOSY ^1H (diffusion ordered spectroscopy), permet de montrer l'existence d'un équilibre acido-basique lors du mélange OA + OIAc (spectres représentés en partie expérimentale). Les deux molécules existent sous la forme neutre et ionisée, en équilibre rapide. Les formes ionisées s'associent en une paire d'ions ammonium-carboxylate, ce qui mène à un coefficient de diffusion apparent plus faible (plus grosse entité qui diffuse moins vite) comparé aux molécules individuelles. De telles paires d'ions ammonium-carboxylate entre un acide et une amine avait déjà été rapporté précédemment dans le cas de NP de ZnO stabilisées par la dodécylamine et l'acide laurique.¹⁹

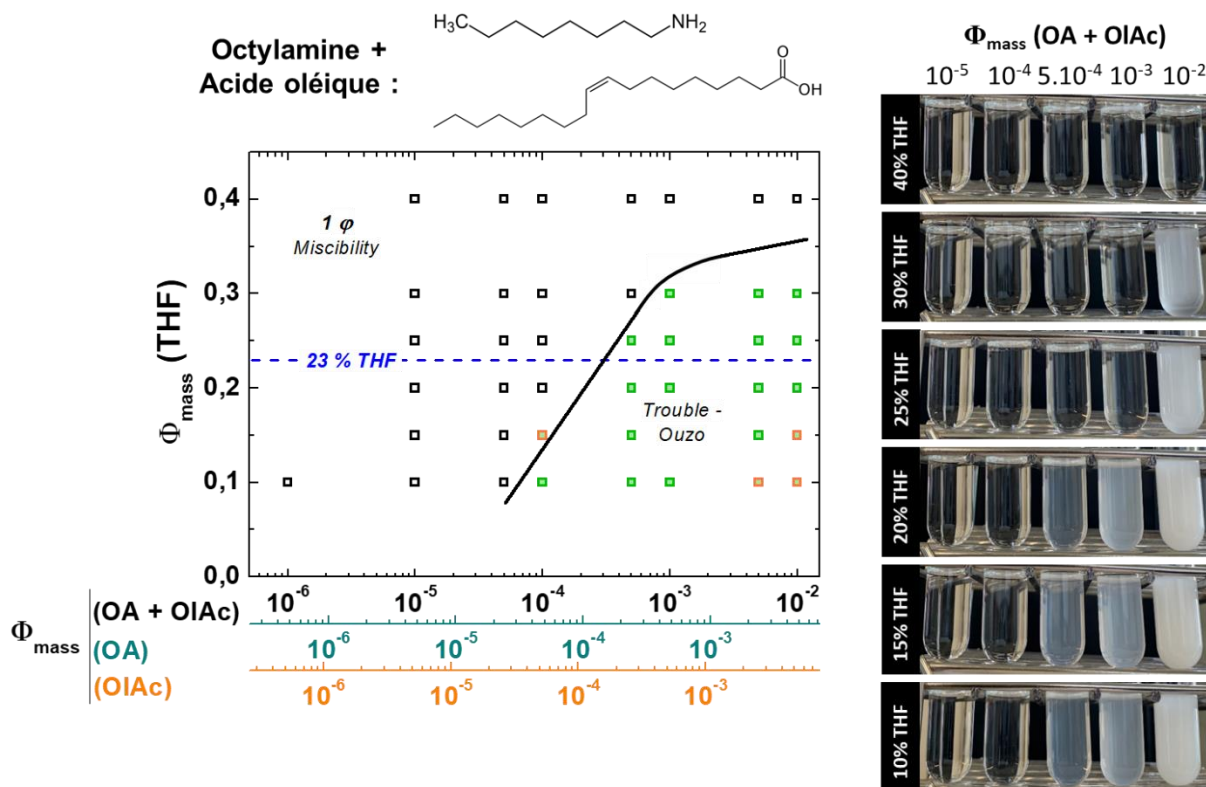


Figure 2. 13 – Diagramme de phase du système « eau/THF pur/(OA+OIAc) ». Les différents domaines sont visuellement déterminés : un domaine monophasique transparent (□) et un domaine trouble « ouzo » (■). Un doute persiste sur certaines compositions (échantillon translucide ou trouble ?) (■). Les observations sont faites dans les 20 minutes suivant la préparation des différentes compositions. Les lignes sont un guide visuel pour délimiter les domaines. Expérimentalement, le système est classiquement composé de 23% massique en THF, avec une composition en OA + OIAc inconnue (ligne bleue). Les photos des échantillons réalisés sont présentées à droite du graphique.

II.3.1.4. Oléylamine (OIA)

L'oléylamine (OIA) est le dernier ligand utilisé, en particulier sur les AuNP que nous avons synthétisées mais également sur les QD InP@ZnS. Il s'agit de l'équivalent aminé de l'acide oléique. Cette molécule est couramment utilisée dans la synthèse des NP, en particulier d'or, grâce à ses propriétés tensioactives et réductrices, à la possibilité de l'utiliser comme solvant de synthèse et à son affinité pour les surfaces d'or.²⁰ Tout comme l'OIAc, **l'OIA présente un grand domaine ouzo dans le système « eau/THF » (Figure 2. 14) et peut donc faciliter l'obtention des nanocapsules.**

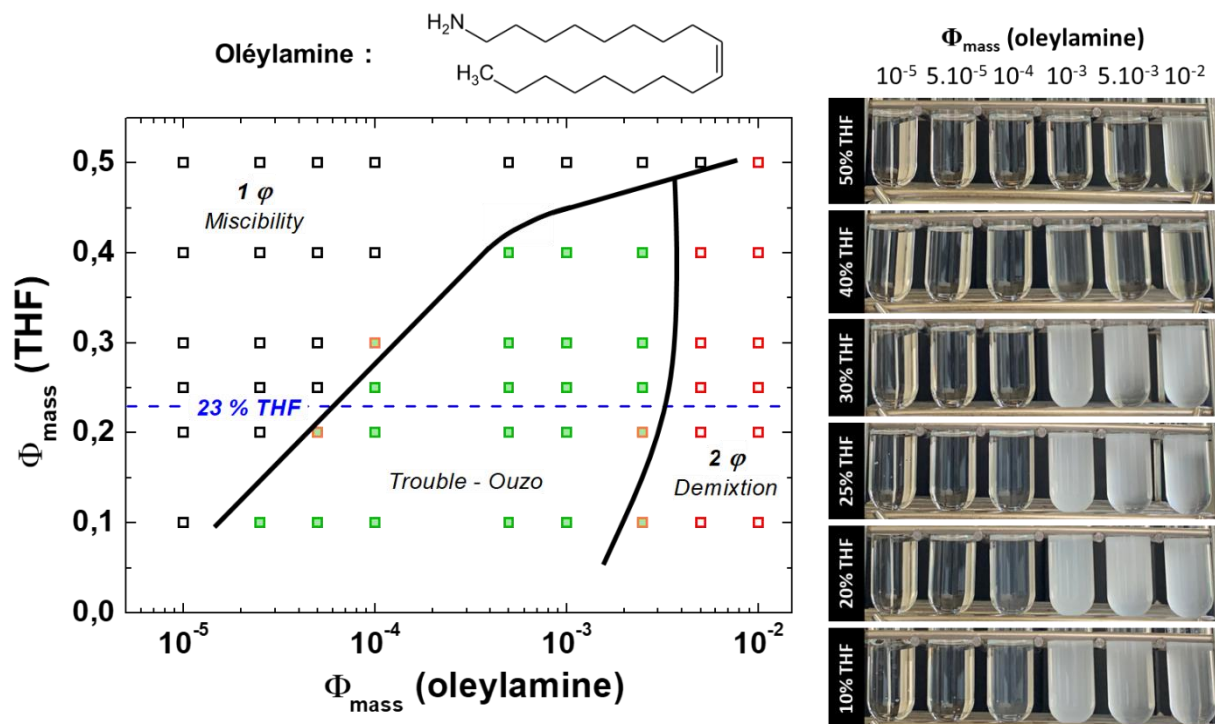


Figure 2. 14 – Diagramme de phase du système « eau/THF pur/oléylamine ». Les différents domaines sont déterminés visuellement : un domaine monophasique transparent (\square), un domaine trouble « ouzo » (\blacksquare) et un domaine diphasique ou présentant des gouttelettes d’huile macroscopiques (\blacksquare). Un doute persiste sur certaines compositions (\blacksquare). Les observations sont faites dans les 20 minutes suivant la préparation des différentes compositions. Les lignes sont un guide visuel pour délimiter les domaines. Expérimentalement, le système est classiquement composé de 23% massique en THF, avec une composition en oléylamine inconnue (ligne bleue en tirets). Les photos des échantillons réalisés sont présentées à droite du graphique.

II.3.1.5. Résumé des domaines ouzo présents pour les différents solutés hydrophobes

La **Figure 2. 15** résume la localisation des domaines ouzo pour les différents solutés hydrophobes dans le système « eau/THF ». On peut voir que dans les conditions classiques de réalisation des hybridosomes (ligne horizontale bleue), le système « eau / THF / OA » ne peut former de gouttelettes. Toutefois, pour tous les autres ligands – OIAc, OA + OIAc et OIA – un domaine ouzo conséquent est présent, en particulier à 23 % massique en THF. **Il est donc possible qu’expérimentalement les NP comportant ces ligand(s) (OIAc, OIAc + OA ou OIA) influencent le comportement du système et favorise la formation d’un domaine ouzo, si la concentration en ligand « libre » correspond à celle de leur domaine ouzo.** De manière intéressante, les domaines ouzo de l’OIAc et de l’OIA sont assez proches et coïncident plutôt bien avec celui du BHT. Les deux molécules possèdent la même chaîne grasse, avec toutefois des fonctions différentes. On voit aussi que la région ouzo du mélange OA + OIAc vient s’intercaler entre ceux de l’OA et de l’OIAc comme indiqué précédemment.

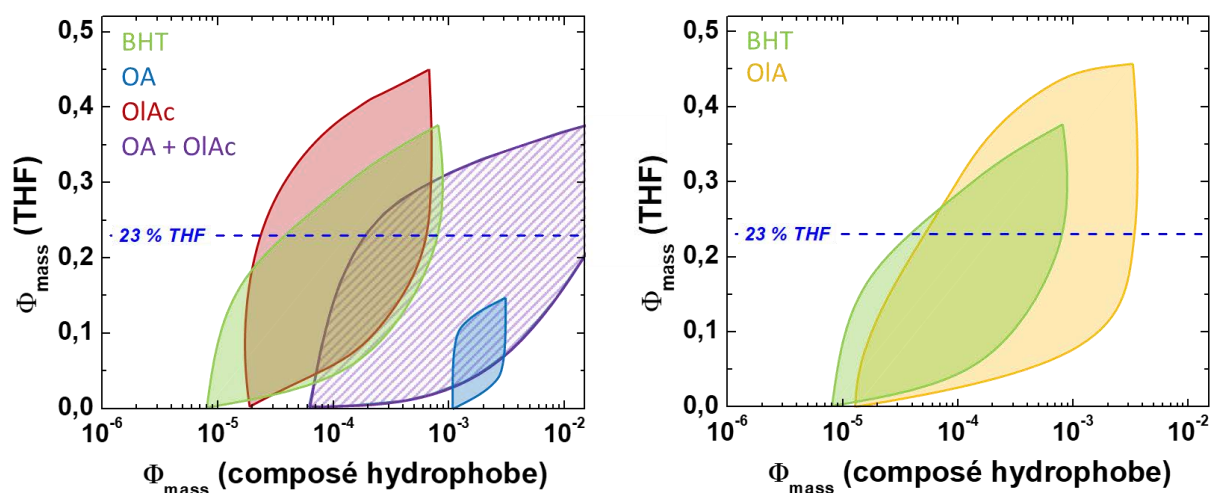


Figure 2. 15 – Localisation du domaine ouzo des systèmes « eau/THF pur/composé hydrophobe » pour les différents composés hydrophobes : *octylamine* (OA), l'*acide oléique* (OIAc), l'*oléylamine* (OIA) ou le *mélange* (OA + OIAc). Dans le cas (OA + OIAc), la fraction est celle du mélange. **Gauche** : ligands des SPION et QD CdSe/ZnS ; **Droite** : ligand des AuNP et QD InP/ZnS. Le diagramme de référence du **BHT** est reporté sur les deux figures.

Ces résultats montrent l'importance qu'il faut porter aux différentes molécules hydrophobes susceptibles de présenter un domaine ouzo et de modifier l'obtention des gouttes de façon contrôlée. La détermination de la teneur en ligand des différentes NPs serait intéressante pour mieux comprendre les variabilités parfois observées. Bien que la composition exacte ne soit pas connue, il est possible de l'évaluer à partir des réactifs introduits lors de la synthèse.

Pour ce qui est de la combinaison OA / OIAc pour les SPION, 1 mmol d'OA et 0,5 mmol d'OIAc sont utilisés pour la synthèse. Les fractions massiques d'OA et d'OIAc dans une préparation classique à 0,23 % massique de THF seraient donc au grand maximum de $8,3 \cdot 10^{-5}$ et de $9,1 \cdot 10^{-5}$, respectivement. Ces valeurs coïncident avec le domaine ouzo de l'OIAc et sont à la limite du domaine ouzo du mélange (OA + OIAc) (**Figure 2. 15 A**). Ces fractions massiques sont toutefois probablement bien plus faibles que cela du fait des pertes lors de la redispersion des SPION dans le THF (une partie du film de SPION sec ne se redisperse pas bien dans le THF et des agrégats de SPION sédimentent rapidement). À noter que cette approche à partir des quantités introduites pour la synthèse n'est peut-être pas pertinente s'il faut plutôt considérer l'espèce créée lors de la mise en contact de l'OA et de l'OIAc (dont nous ignorons la concentration).

Quant aux AuNP-OIA, la synthèse se fait directement dans une très grande quantité d'OIA. Après précipitation suite à l'ajout d'éthanol et centrifugation, les AuNPs purifiées peuvent être redispersées dans le THF. Il peut toutefois rester une quantité relativement conséquente d'OIA

avec les NP. Nous ne pouvons pas statuer actuellement sur la concentration en oléylamine dans la dispersion d'AuNPs. Il faudrait par exemple un dosage HPLC.

Les régions ouzo sont reliées à la solubilité des ligands dans l'eau. Ainsi, une molécule plus soluble dans l'eau aura un domaine ouzo décalé vers les plus grandes fractions de ligand et les plus faibles fractions de solvant. La **Figure 2. 16** présente les valeurs de solubilité dans l'eau et de LogP des différents ligands. Le LogP est le logarithme du coefficient de partage octanol / eau. Plus il est élevé, plus la molécule en question a tendance à aller préférentiellement dans l'octanol. C'est donc un indicateur de lipophilicité. L'oléylamine et l'acide oléique sont identiques en termes de chaîne grasse. Cela pourrait éventuellement expliquer la proximité entre leur domaine ouzo. L'octylamine est quant à elle beaucoup plus soluble que les autres ligands et voit donc son domaine ouzo très décalé vers les grandes fractions de ligand. Cette solubilité est liée à la structure des molécules, les grandes chaînes (OIA et OIAc) étant bien moins solubles dans l'eau que les courtes chaînes (OA). On voit ici que **la nature de la tête polaire (acide ou amine) a peu d'influence sur les limites du domaine ouzo, par rapport à la longueur de la chaîne alkyle.**

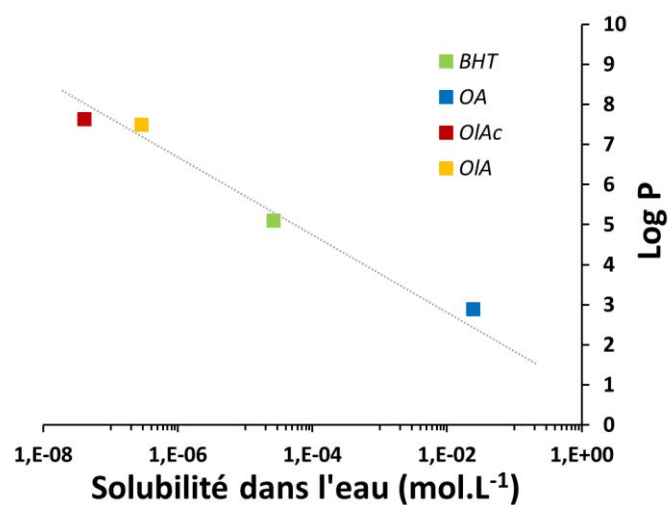


Figure 2. 16 – Log P en fonction de la solubilité dans l'eau à 25°C des ligands étudiés. La droite pointillée est un guide visuel. Les valeurs données sont calculées avec les plugins KOWWIN et WSKOWWIN du logiciel EPI Suite (US EPA).²¹

II.3.2. Analyse du procédé de fabrication des nanocapsules

II.3.2.1. Élimination du solvant

Comme indiqué précédemment, la fabrication des hybridosomes par effet ouzo repose sur l'utilisation de NP hydrophobes de nature variée et de polymère.^{4,22-24} Une fois le mélange « eau/THF/BHT/NP » préparé et le polymère ajouté, le solvant doit être éliminé, soit par évaporation ou dialyse contre l'eau.

En général, cette élimination du THF se fait par évaporation. Nous avons ainsi suivi l'évaporation du THF dans le temps par RMN ¹H. Plus précisément, nous avons utilisé un mélange de THF et de D₂O (25:75 vol.) avec du triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSP-d4) comme molécule de référence hydrophile pour la quantification. Le rapport d'intégration entre le TSP-d4 et le THF permet de suivre l'évaporation du THF en fonction du temps (**Figure 2. 17**). Il apparaît qu'au bout de 15 h, seules des traces de THF restent (0,02 % de la quantité initiale), avec une élimination totale à 21 h. Lors de la réalisation des hybridosomes en routine, **une mise à évaporer en fin de journée jusqu'à la fin de matinée suivante est donc tout à fait adaptée pour éliminer correctement le THF**. Le détail de la caractérisation par RMN ¹H est visible dans la partie expérimentale.

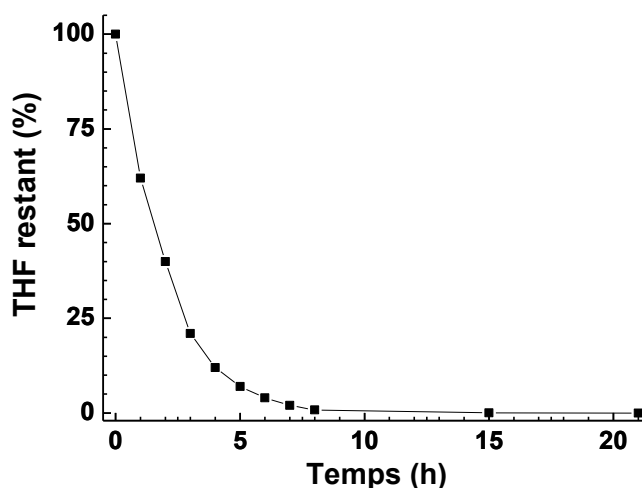


Figure 2. 17 – Évolution de la quantité de THF restante dans un échantillon D₂O / THF / BHT en fonction du temps lors de l'évaporation à 40°C. La quantité de THF est déterminée grâce à une référence interne (TSP-d4).

II.3.2.2. Temps d'attente avant ajout du polymère et avant évaporation

Le temps d'attente à partir du mélange des différents composants jusqu'à l'ajout du polymère est également important. Notre hypothèse est que le polymère « fige » le système en se fixant aux NP et en réticulant la coque des nanocapsules. Le moment où il est ajouté est donc important, en fonction de la rapidité d'évolution des gouttelettes. Afin de déterminer cette influence du temps d'ajout du polymère, nous avons réalisé des hybridosomes en ajoutant le polymère à différents temps après le mélange des composants. À la fois la distribution de taille (**Figure 2. 18 A**) et le diamètre moyen (**Figure 2. 18 B**) des hybridosomes sont plutôt semblables, peu importe le temps d'attente avant l'ajout du polymère (entre 0 et 23 h). Toutefois, on peut remarquer un léger décalage des distributions de taille vers les plus grandes tailles lorsque ce temps d'attente augmente avec, semble-t-il, l'apparition de deux populations. Les travaux antérieurs ont montré que la taille des gouttelettes varie durant les 30 premières minutes suivant le mélange des composants puis se stabilise. Cela peut expliquer l'écart de taille observé lorsque le polymère est directement ajouté à la suite du mélange (0 h ; $D_H = 97$ nm) ou à quelques heures (1 – 6 h ; $D_H = 120$ nm). **En tout état de cause, le temps d'attente avant ajout du polymère ne joue pas drastiquement sur la taille des objets obtenus.** Dans les conditions habituelles de synthèse des hybridosomes, un temps d'attente de 7h est appliqué avant l'ajout du polymère.

Attention toutefois, ces distributions de tailles, et notamment la valeur absolue des diamètres hydrodynamiques, ne peuvent pas être prises pour des vérités générales étant donné qu'elles varient en fonction de nombreux paramètres, comme la taille des NP et la quantité de polymère utilisée. Comme précédemment décrit,^{3,22} la taille des objets suit deux régimes, un à faible concentration en NP, avec une taille plus faible et où la distribution en taille est plutôt dirigée par le polymère, et un régime à concentration en NP plus importante, où les objets sont plus gros et où l'équilibre est plutôt dirigé par la présence des NP. **La délimitation entre ces deux régimes se situait à une concentration** en fer aux alentours de 10 µg/mL, soit **de l'ordre de 10^{13} NP/mL** (étude faite avec SPION Fe₂O₃@OA de 5,5 nm de diamètre). Dans le cas présent, la concentration en NP InP@ZnS de 3,5 nm est de 50 µg/mL soit de l'ordre de 10^{14} NP/mL, ce qui correspond au deuxième régime à forte concentration en NP. Par ailleurs, une augmentation de la concentration en NP peut entraîner une augmentation de la densité des objets et de l'épaisseur de la paroi, qui est classiquement composé d'une monocouche de NP.^{4,22}

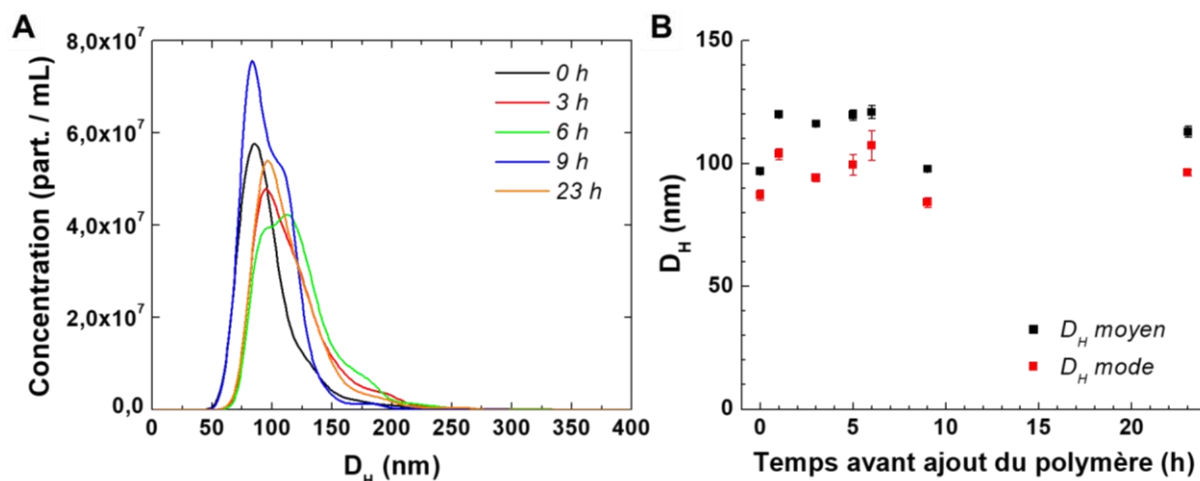


Figure 2. 18 – Influence du temps d’attente avant l’ajout du polymère sur la taille d’hybridosomes QD1@PEG-PAA. (A) Distributions de taille et (B) diamètres hydrodynamique (moyens et modes), déterminés par NTA. Les hybridosomes sont dilués 50x.

Un autre aspect à regarder est le temps d’attente avant la mise à évaporation du THF, suite à l’ajout du polymère (Figure 2. 19). On remarque ici que ce temps n’a que très peu d’influence sur la taille des objets obtenus. On note quand même un possible élargissement de la distribution à partir de 6 h. Cela confirme le fait que **l’ajout du polymère permet de « figer » les gouttelettes tapissées de NP**. Dans les conditions habituelles de préparation des hybridosomes, la mise à évaporer se fait immédiatement après l’ajout du polymère.

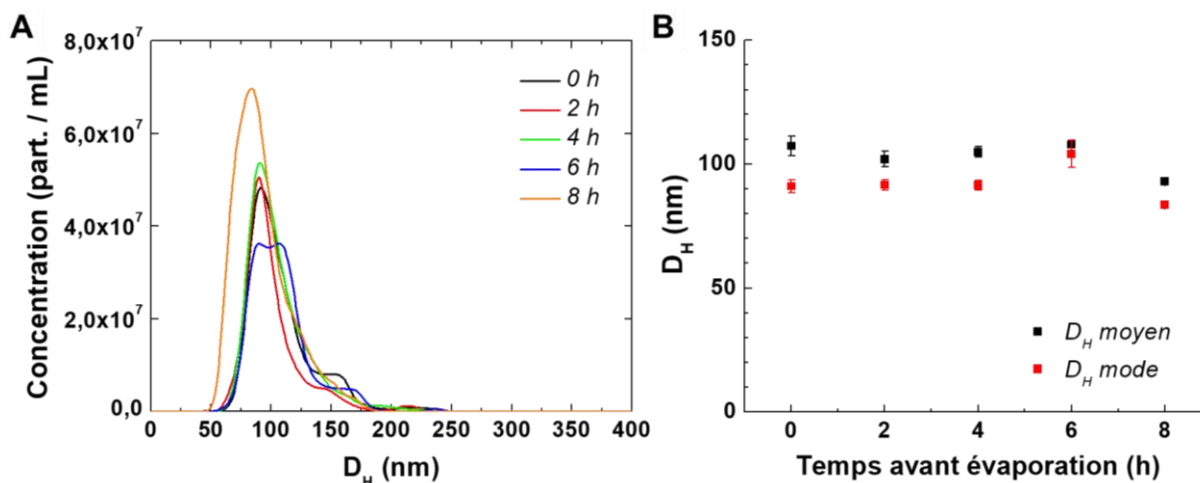


Figure 2. 19 – Influence du temps d’attente avant évaporation sur la taille des hybridosomes QD1@PEG-PAA. (A) Distributions de taille et (B) diamètres hydrodynamique (moyens et modes), déterminés par NTA. L’ajout du polymère est fait à 1 h. Les hybridosomes sont dilués 50x.

II.3.3. Réalisation des hybridosomes

Les informations présentées dans cette partie proviennent d'expériences réalisées avec les différents QD et les AuNP-oléylamine. Nous n'avons pas utilisé les SPION afin d'éviter les interactions magnétiques qui peuvent ajouter de la complexité au système. Les SPION vont être particulièrement utilisées dans les deux chapitres axés sur les propriétés d'encapsulation et l'application au glioblastome.

II.3.3.1. Quantum dots

Les QD sont des NP d'intérêt pour nous puisqu'ils nous permettent d'accéder à des particules fluorescentes, très utiles dans les applications biologiques par exemple. Par ailleurs, elles sont très pertinentes afin d'étudier notre système d'élaboration de nanocapsules avec des NP de tailles variées. Les deux types de QD (présentés au début du chapitre) ont des tailles entre 3 et 6 nm. Avec les SPION et les AuNP, nous balayons donc une gamme de taille de NP entre 3 et 10 nm. Par ailleurs, à taille égale, les QD peuvent être intéressants par rapport aux SPION pour l'étude de leur comportement à l'interface des gouttes puisque l'on s'affranchit des éventuelles interactions magnétiques entre NP.

II.3.3.1.1. Quantum dots (Cytodiagnosics)

II.3.3.1.1.1. *Influence de la quantité de QD et du polymère*

Dans un premier temps, nous avons regardé l'influence de la quantité de QD sur la formation des gouttelettes tapissées de NP, que nous appellerons NP-shell (**Figure 2. 20**). **Plus la quantité de QD est importante, plus la taille des NP-shell est faible.** On note également que **la taille se stabilise très rapidement (moins de 20 minutes) après une légère augmentation dans les premières minutes.** Cela confirme les observations précédemment faite quant au temps d'attente avant l'ajout du polymère. Lors des préparations d'hybridosomes habituelles, l'ajout de polymère ne se fait jamais aussi rapidement et le système est donc toujours stable en taille. La diminution de taille en fonction de la concentration en QD peut s'expliquer par un effet stabilisant des NP à l'interface, qui permettent de réduire la tension interfaciale, comme dans le cas des émulsions de Pickering. Ainsi, des objets plus petits peuvent être formés, c'est-à-dire présentant globalement plus de surface.

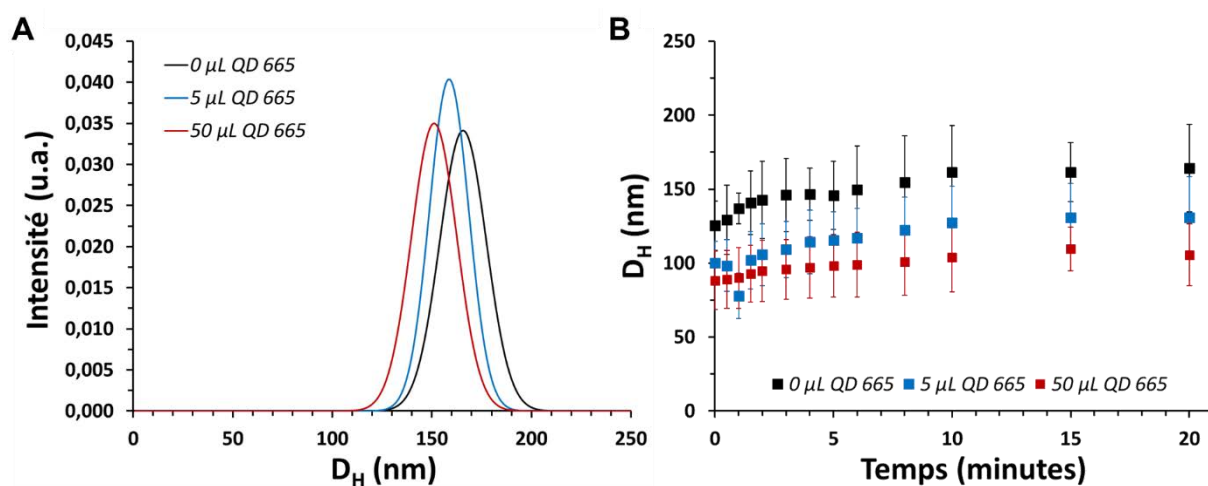


Figure 2. 20 – Analyse de NP-shell de QD Cytodiagnostics 665 nm par DLS dans le mélange eau / THF (avec BHT). **(A)** Distribution de taille en fonction de la quantité de QD utilisée dans le mélange. **(B)** Évolution de la taille moyenne en fonction du temps, pour différentes quantités de QD. Un ajout de 50 μL de QD équivaut à une concentration dans l'échantillon analysé en DLS de 186 $\mu\text{g Cd/mL}$ et 66 $\mu\text{g Se/mL}$.

De plus, nous avons pu remarquer que **le nombre d'hybridosomes est plus important lorsque la concentration en NP augmente**. Cela sous-entend une influence des NP sur l'effet ouzo. Si les NP tapissent l'interface de gouttelettes préexistantes, il devrait toujours y avoir la même concentration d'hybridosomes peu importe la quantité de NP introduites dans le système. Une hypothèse pourrait être que la présence de plus de NP induit la formation de plus de gouttelettes, et donc plus de nanocapsules à la fin. Une augmentation de la quantité de NP implique la présence de plus de ligand pouvant générer la formation de gouttelettes ouzo. Une autre hypothèse pourrait être que seule une fraction des gouttelettes est stabilisée par des particules et les gouttelettes sans NP disparaissent lors de l'évaporation. Une augmentation de la concentration mènerait à plus de gouttes stabilisées et donc plus d'hybridosomes au final.

Ces QD ont été engagés dans la préparation d'hybridosomes, soit avec du PAA_{450k} ou du PEG_{2k}-PAA_{7k}. Les hybridosomes sont obtenus avec succès (**Figure 2. 21**), et ils sont d'autant plus nombreux que la quantité de QD est importante. Les hybridosomes sont bien présents et semblent avoir une coque parfois pas totalement recouverte de NP (cf. images TEM). Il se pourrait donc qu'il faille encore augmenter la quantité de QD pour obtenir des hybridosomes bien recouverts par les NP. On note tout de même qu'il y a beaucoup de capsules bien formées.

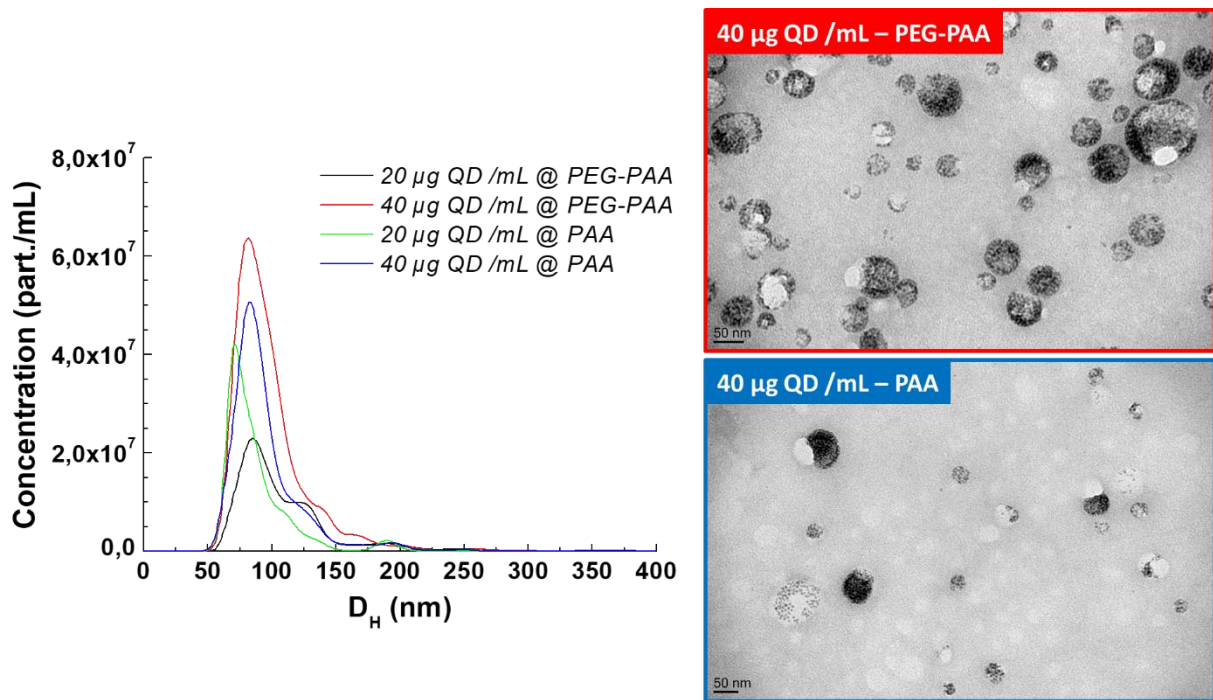


Figure 2. 21 – (A) Distributions de taille d'hybridosomes préparés à partir de QD Cytodiagnosics ($\lambda_{em} = 630$ nm), avec différentes concentrations de QD (20 ou 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et stabilisés par différents polymères (PEG_{2k}-PAA_{7k} ou PAA_{450k}). **(B)** Images TEM des hybridosomes réalisés avec 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QD et avec du PEG-PAA (rouge) ou du PAA (bleu). Les hybridosomes sont dilués 50x.

II.3.3.1.1.2. Propriétés de fluorescence

La fluorescence des NP de semi-conducteurs varie avec le milieu environnant. Les QD ont une certaine propension à perdre en intensité au contact de l'eau à cause de défauts locaux de surface, appelés pièges de surface, menant à des désexcitations non radiatives.²⁵ La présence d'eau peut également mener à la formation d'oxyde et hydroxydes, du moins pendant la synthèse, qui altèrent la surface irrémédiablement⁹. Pour pallier cela, la stratégie communément employée consiste à faire croître une couche de semi-conducteur avec une plus grande bande interdite et repousser les défauts vers l'extérieur.

La fluorescence de ces hybridosomes a été suivie sur plusieurs semaines afin d'évaluer l'inhibition de fluorescence en milieu aqueux. La **Figure 2. 22 A** présente les spectres d'émission d'hybridosomes comportant des QD émettant à 630 nm et stabilisés par du PAA sur presque deux mois. Le spectre est semblable sur la période étudiée, avec semble-t-il un très léger décalage de l'émission maximale vers les plus petites longueurs d'onde (toutefois très faible, de 625 à 622 nm). L'intensité à 630 nm a été normalisée en fonction de la puissance de la lampe d'excitation (référence pyranine) puis exprimée en fonction de l'intensité initiale pour effectuer le suivi dans le temps (**Figure 2. 22 B**). De manière très intéressante, la fluorescence des hybridosomes dans

l'eau est relativement stable dans le temps, avec des pertes d'intensité de fluorescence de l'ordre de 50 à 60 % sur 7 semaines. Ce comportement est valable à la fois pour les hybridosomes stabilisés par le PAA et le PEG-PAA. Ces objets sont donc intéressants pour réaliser de la fluorescence en milieu aqueux, avec des émissions variées suivant le QD choisi.

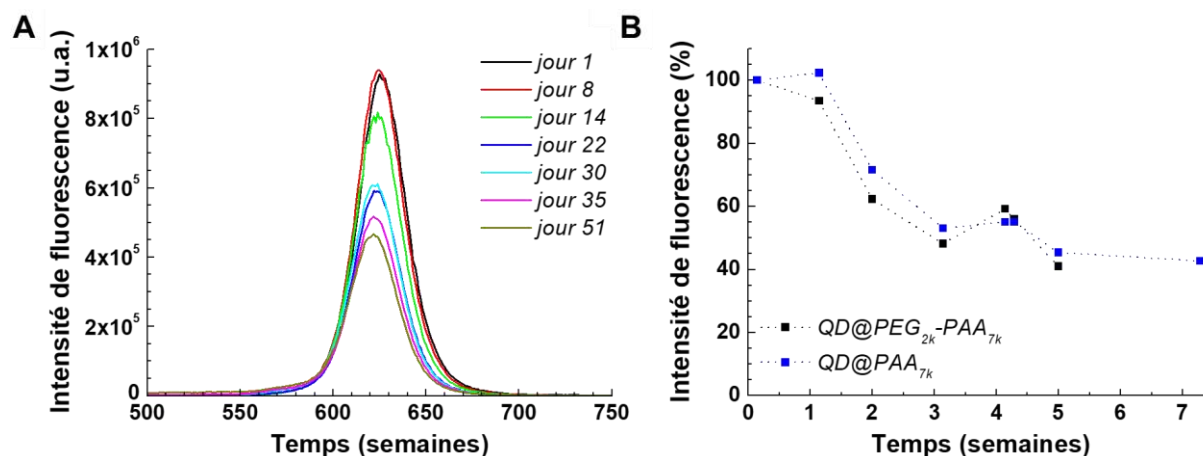


Figure 2. 22 – Propriétés de fluorescence d'hybridosomes préparés avec des QD Cytodiagnostic ($\lambda_{em} = 630$ nm) (A) Spectres de fluorescence d'hybridosomes QD@PEG-PAA en fonction du temps. (B) Évolution de la fluorescence d'hybridosomes QD@PEG-PAA (noir) et QD@PAA (bleu). $\lambda_{exc} = 400$ nm.

Des objets contenant à la fois des QD et un fluorophore encapsulé (BODIPY) ont par ailleurs été fabriqués avec succès. En conséquence, ces objets mixtes présentent à la fois une coque fluorescente (QD) et un cœur fluorescent (BODIPY). Cette caractéristique sera par la suite utilisée pour suivre le devenir à la fois de la coque et du cœur par fluorescence, notamment pour l'étude *in vitro* de l'internalisation des hybridosomes dans les cellules (cf. Chapitre III).

II.3.3.1.2. Quantum dots InP@ZnS

Ces QD ont été utilisés pour la préparation d'hybridosomes sans BHT dans le THF. Ces expérimentations ont été faites en début de thèse avant l'utilisation systématique du BHT. Nous cherchions à voir si nous pouvions obtenir des hybridosomes sans BHT. Les diagrammes de phases ainsi que les caractéristiques de tailles et de morphologie des objets obtenus sont présentés ci-après pour les deux QD1 et QD2. Ces QD sont stabilisés par l'oléylamine.

II.3.3.1.2.1. Diagrammes de phase et caractéristiques des objets obtenus

Les diagrammes de phase réalisés dans le système « eau/THF pur/QD1 ou QD2 » sont présentés en **Figure 2. 23 A** et **B**, respectivement. Le suivi visuel, par exemple la présence d'agrégat après évaporation, ainsi que le suivi de la taille et de la concentration par NTA et TEM permettent d'évaluer les compositions utilisables pour la fabrication de capsules à partir de ces QD. La concentration massique en QD a été variée entre 25 et 75 µg/mL et le ratio de THF entre 25 et 35 % volumiques. La concentration en nombre de QD par mL peut être estimée à partir des volumes, sachant que les QD1 et QD2 font respectivement environ 3,5 et 5,5 nm de diamètre, avec un cœur d'InP et une coque de ZnS de 0,5 nm. Ainsi à volume égal il y a un peu plus de QD1 étant donné leur petite taille. Les concentrations de QD1 sont estimées entre $1,3 \cdot 10^{14}$ et $3,9 \cdot 10^{14}$ NP/mL, et celles de QD2 entre $3,2 \cdot 10^{13}$ et $9,6 \cdot 10^{13}$ NP/mL.

Globalement, des objets dont les caractéristiques font penser à des hybridosomes, sont obtenus à 25% vol en THF et ceci peu importe le QD utilisé (et donc peu importe la taille des NP). Les signaux NTA (**Figure 2. 23, droite**) traduisent bien cela, avec de belles distribution relativement monodisperses à 25% de THF, puis au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de THF, les concentrations sont moins importantes et les pics de distribution de taille plus larges. On note qu'à 25% de THF avec le QD1 nous retrouvons le comportement vu précédemment, où la taille diminue quand la quantité de QD augmente. L'obtention d'hybridosomes même en l'absence de BHT peut probablement s'expliquer par l'effet des ligands, ici l'oléylamine (comme vu précédemment, l'oléylamine favorise la formation d'un domaine ouzo et donc potentiellement la formation des hybridosomes).

Le fait que l'obtention des hybridosomes ne dépende pas de la taille des NP et que l'on puisse les obtenir avec de toutes petites NP conforte notre vision de la formation des hybridosomes. Notre hypothèse actuelle est que **l'adsorption des NP à l'interface des gouttelettes ouzo est une sorte de nanopréciipitation, irréversible**. Cela permet même à de toutes petites NP – hydrophobes – de se mettre à l'interface et de ne plus la quitter. L'autre hypothèse serait une sorte d'émulsion de Pickering. Toutefois, les émulsions de Pickering sont très difficiles à obtenir avec des petites NP. Comme déjà mentionné, l'enthalpie d'adsorption de ces petites NP à l'interface est inférieure à l'agitation thermique et elles sont donc sujettes à désorption.^{26,27} La stabilisation avec des NP de taille inférieure à 10 nm est compliquée. On voit dans notre cas que cela fonctionne très bien, même avec des QD de 3 nm par exemple.

Des études complémentaires sont d'ailleurs en cours et tendraient à montrer que les NP ne sont pas mobiles une fois associées en NP-shell. En effet, nous n'avons observé aucun échange lorsque deux échantillons de NP-shell différents sont mélangés. Cela conforte l'idée d'une nanoprécipitation des NP à l'interface des gouttelettes.

La présence de nanocapsules a par ailleurs été confirmée par TEM sur les échantillons formés à 25% de THF, avec les QD1 (**Figure 2. 24**) et les QD2 (**Figure 2. 25**). **Les objets formés sont sphériques et ressemblent aux hybridosomes habituellement obtenus.** Même si les images TEM ne sont pas statistiquement valables, il semblerait que la concentration en objets déposés sur les grilles augmente avec la concentration en QD au départ. On remarque par ailleurs qu'il y a assez de QD pour tapisser toute la surface des hybridosomes. À noter que ces images correspondent à des échantillons non purifiés et il peut y avoir des restes de polymère non associé aux NP sur la grille.

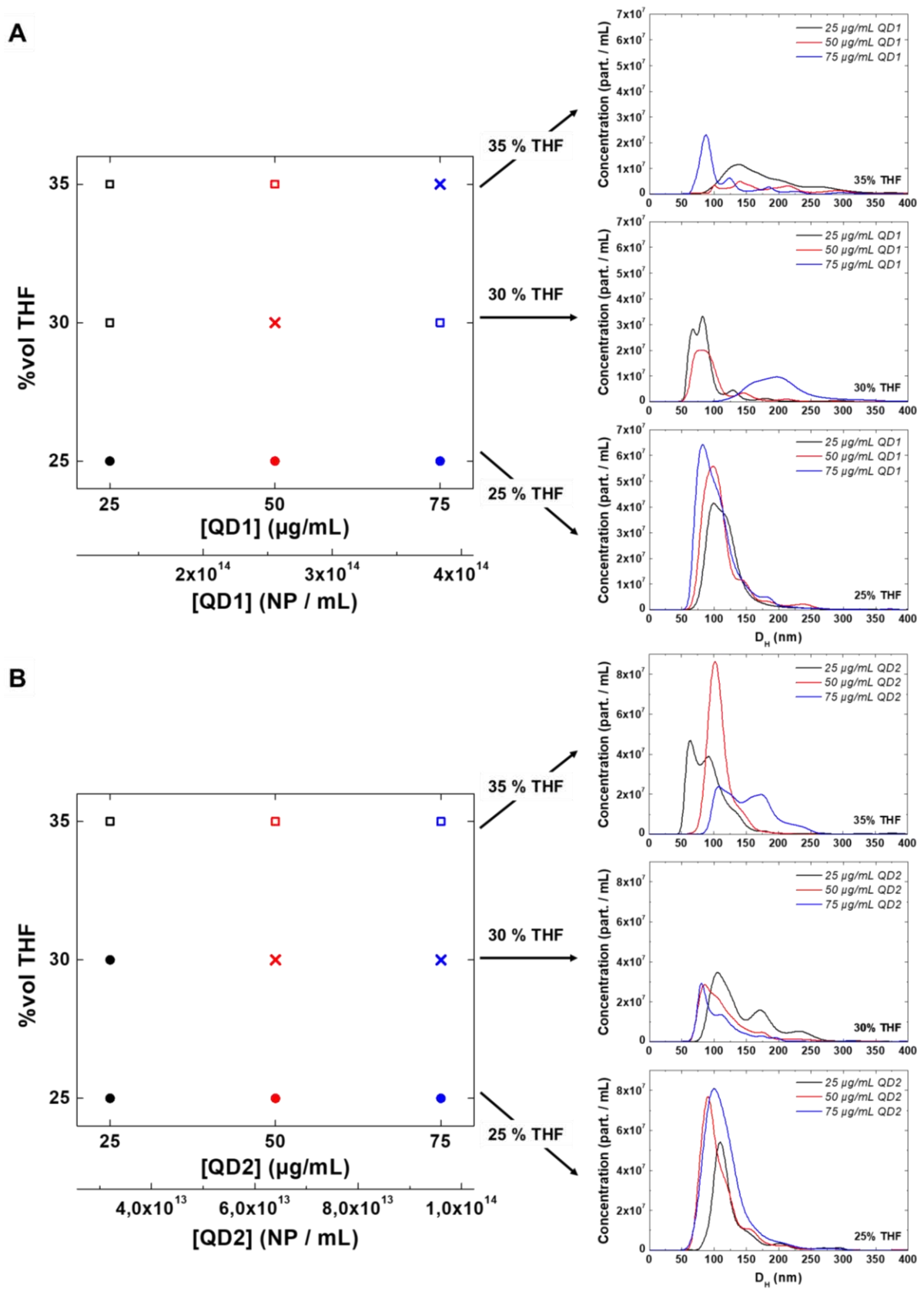


Figure 2. 23 – Diagramme de phase du système « eau/THF/QD1 (A) et QD2 (B) ». Les zones décrivent l’obtention d’hybridosomes ou non : hybridosomes obtenus (●), incertain (□), pas d’hybridosomes (✕). À droite, les distributions de taille des structures obtenues à 25%, 30% et 35% vol en THF et pour différentes concentrations en QD (25, 50 et 75 µg/mL) sont présentées. Les hybridosomes sont dilués 50x pour le NTA.

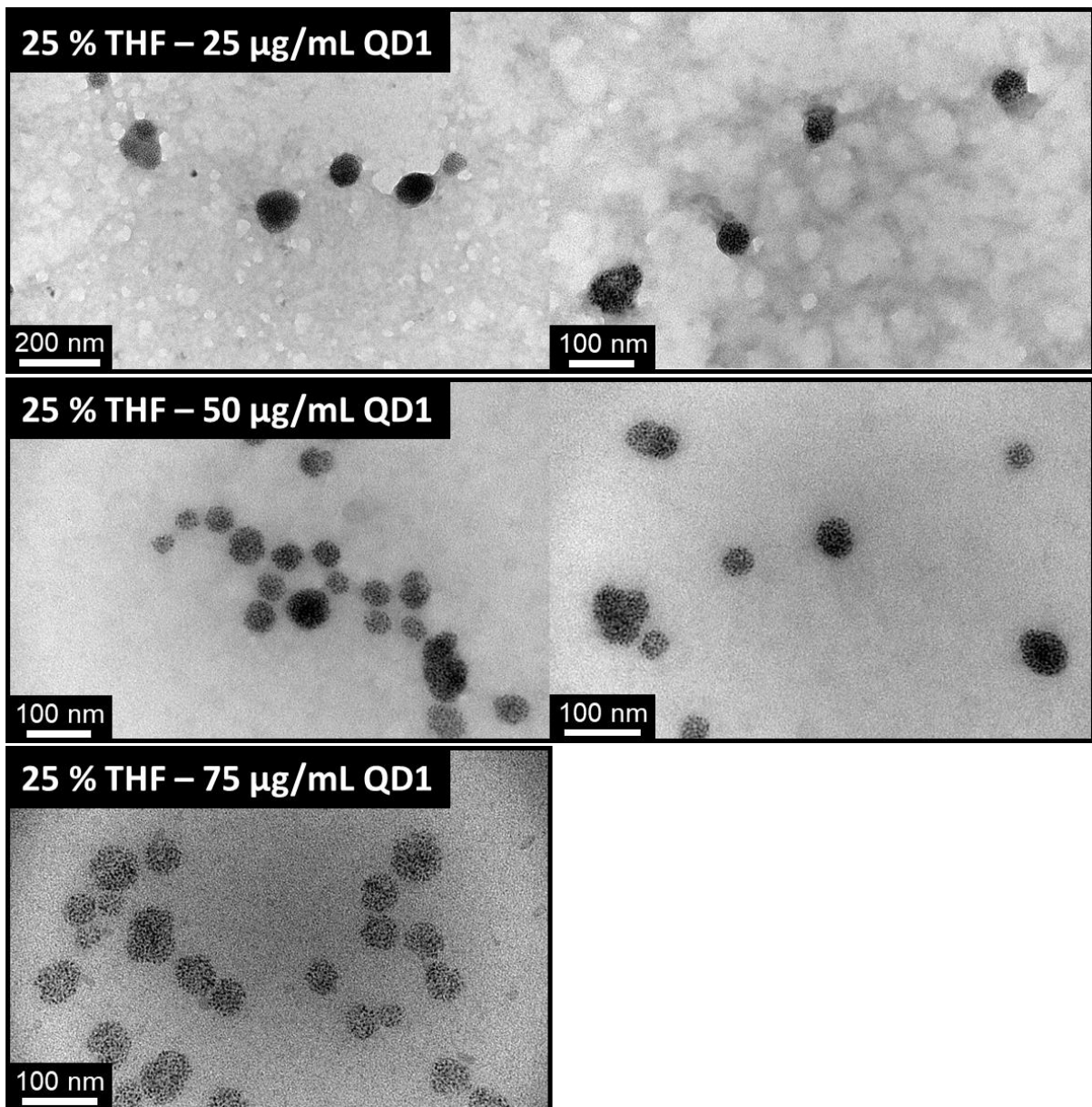


Figure 2. 24 – Image TEM des hybridosomes obtenus à 25% de THF pour différentes quantités de QD1 : 25 µg/mL (haut), 50 µg/mL (milieu) et 75 µg/mL (bas).

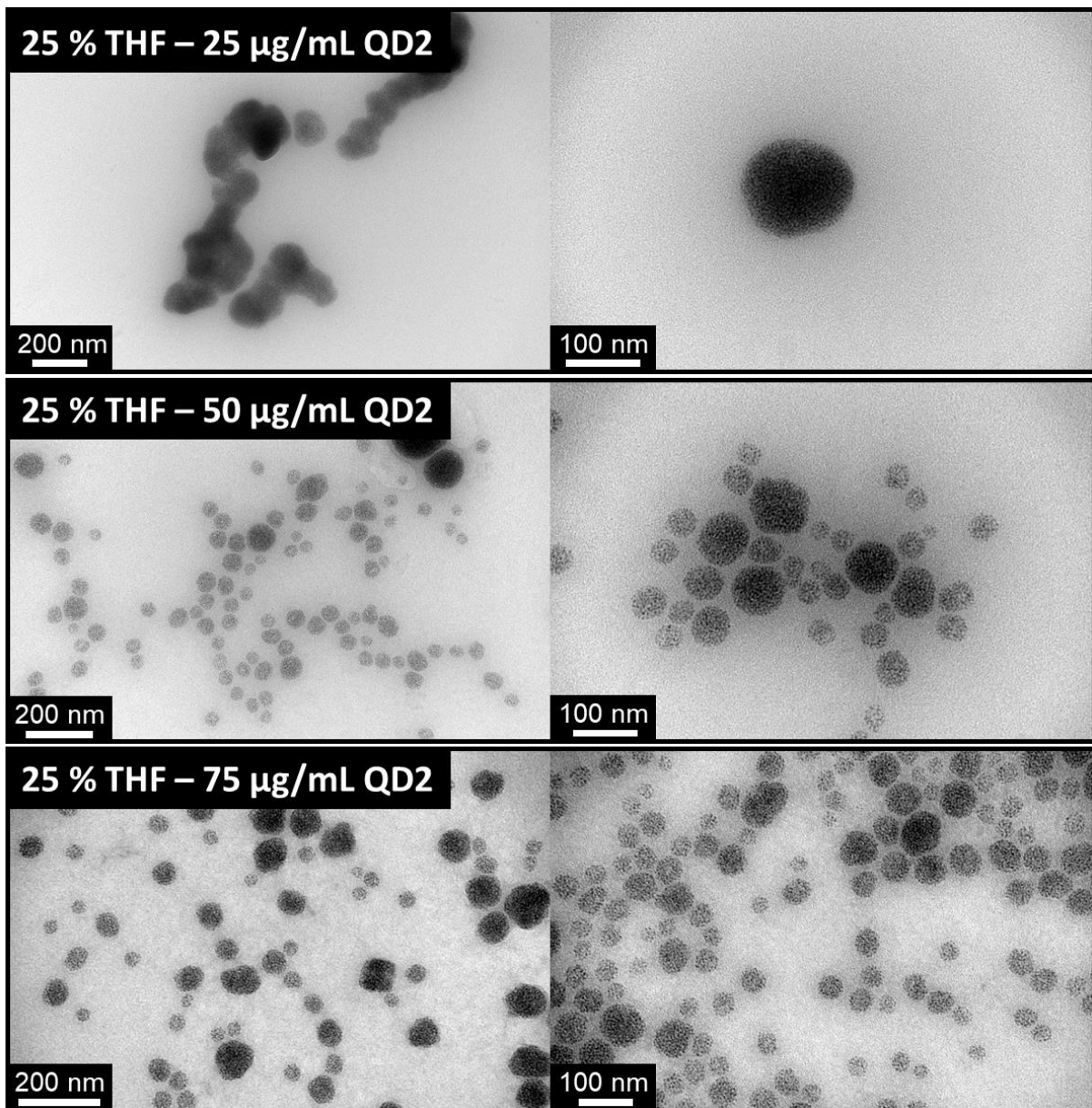


Figure 2. 25 – Image TEM des hybridosomes obtenus à 25% de THF pour différentes quantités de QD2 : 25 µg/mL (**haut**), 50 µg/mL (**milieu**) et 75 µg/mL (**bas**).

II.3.3.1.2.2. Effet de taille

Nous pouvons comparer les tailles moyennes des hybridosomes (**Figure 2. 26 A**) et les concentrations dans la dispersion (**Figure 2. 26 B**) pour les deux QD et pour une proportion de THF de 25%. En règle générale, **la taille des hybridosomes est relativement stable entre 25 et 75 µg de QD/mL, et ceci pour les deux QD**. Le mode de la distribution de taille, qui n'est pas représenté ici, suit le même comportement. Il semble que pour le plus petit QD (QD1), la taille diminue légèrement quand la concentration en QD augmente (cela est conforme à ce que nous avons observé précédemment). L'évolution de la concentration en objets suit une tendance plus

claire : la concentration en hybridosomes formés augmente avec la quantité de QD, avec une augmentation plus rapide pour le plus gros QD (QD2). Ce phénomène, déjà observé lors de la préparation d'hybridosomes avec des SPION, est surprenant. En effet, si les capsules se forment « autour » des gouttelettes d'ouzo, leur nombre devrait être constant, avec éventuellement une densité en NP variable. La concentration des NP et leurs ligands jouent donc un rôle dans l'établissement de l'effet ouzo et sur le nombre d'hybridosomes formés.

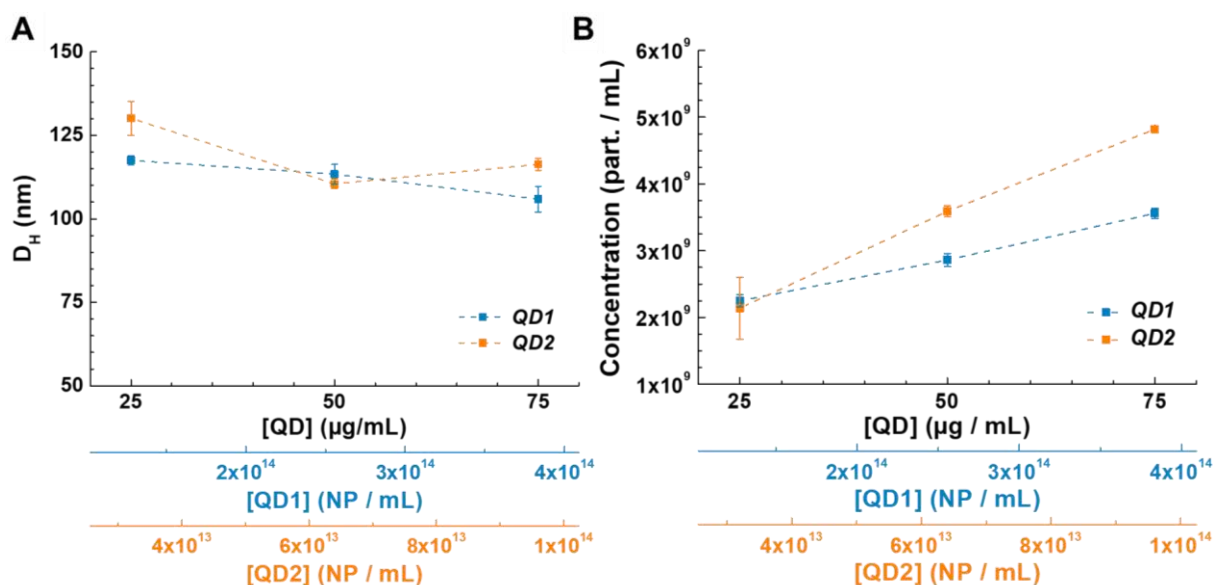


Figure 2. 26 – Comparaison de (A) la taille moyenne et de (B) la concentration en hybridosomes obtenus avec les QD1 et QD2 à 25% de THF pur. Les données sont obtenues par NTA.

II.3.3.1.2.3. Fluorescence

Nous avons suivi la fluorescence des QD InP@ZnS, dans différents environnements : dans le THF (bon solvant), dans le mélange « eau/THF » 75:25 (mélange de fabrication des hybridosomes) et dans les hybridosomes dispersés dans l'eau (QD@PEG-PAA) (**Figure 2. 27 A & B**). Nous avons par ailleurs suivi l'intensité de fluorescence des hybridosomes en fonction du temps (**Figure 2. 27 C**).

On observe que le maximum d'émission de fluorescence subit un décalage vers le rouge lors du changement de solvant, du THF vers le mélange « eau/THF ». Ce décalage est présent pour les deux QD, avec respectivement un décalage de λ_{\max} de 564 à 583 nm pour le QD1 et de 616 à 626 nm pour le QD2. Ce déplacement est en lien avec l'augmentation de polarité du solvant. Il n'y a par ailleurs pas de variation d'intensité lors du passage dans le milieu « eau/THF ». Il n'y a pas de différence notable non plus entre l'allure du spectre dans le mélange « eau/THF » (où il y

a déjà 75 %vol d'eau) et celui des hybridosomes dispersés dans l'eau. Cela signifie que l'association des NP en hybridosomes, par exemple le changement de ligand des QD lors de l'ajout du polymère, ne modifie pas les propriétés d'émission des QD. Des hybridosomes avec des propriétés d'émission semblables à celle des QD individuels peuvent être obtenus. En remarque, on voit que le QD1 est légèrement plus luminescent que le QD2.

Au niveau du suivi dans le temps (**Figure 2. 27 C**), la **fluorescence des hybridosomes@PEG-PAA est stable sur deux semaines dans l'eau**. Classiquement, les QD ont tendance à perdre en luminescence en fonction du temps lorsqu'ils se retrouvent au contact de l'eau en raison de pièges de surface ou bien de la labilité des ligands de surface. Dans notre cas, la surface protégée par du ZnS permet d'obtenir ce très bon comportement, ce qui est très encourageant pour des applications dans l'eau, par exemple biomédicales.

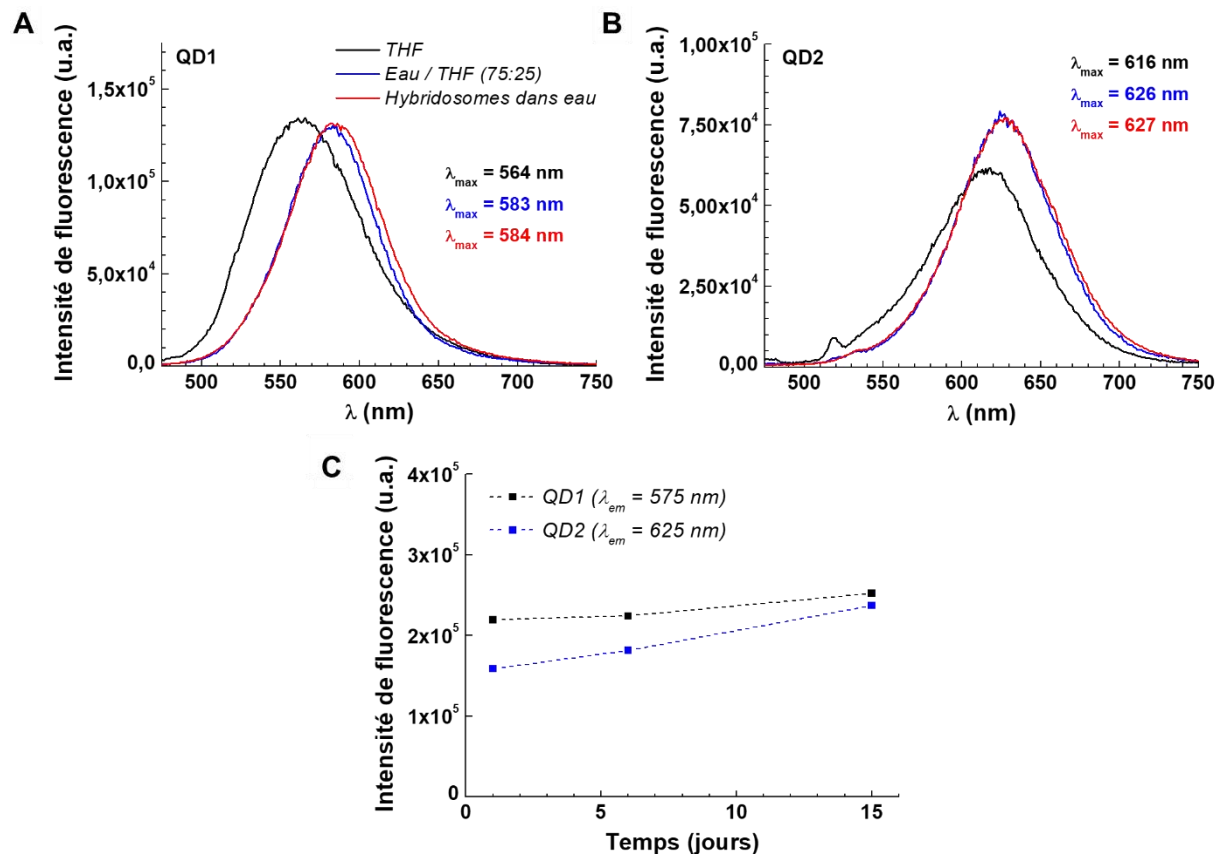


Figure 2. 27 – Propriétés de fluorescence des QD1 et QD2. Spectres d'émission des **(A)** QD1 et **(B)** QD2 dans différents environnements : THF (noir), mélange eau / THF 75 :25 (bleu) et dans les hybridosomes@PEG-PAA dans l'eau (rouge). **(C)** Évolution temporelle de la fluorescence des hybridosomes dans l'eau. Pour toutes les mesures, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$. La pyranine est la référence pour la normalisation.

En résumé, l'utilisation des QDs InP@ZnS pour la préparation d'hybridosomes permet d'accéder à des nano-objets présentant une fluorescence à 585 et 625 nm, relativement constante dans l'eau (au moins sur deux semaines) et sans perte de luminescence par rapport aux QD individuels dans le THF.

II.3.3.1.2.4. Purification des hybridosomes par centrifugation

Du fait de l'absence de propriétés magnétiques, la purification de la suspension de nano-objets préparés à partir de QD ne peut se faire par aimantation. La centrifugation est donc employée. Typiquement, les suspensions d'hybridosomes sont centrifugées pendant 20 minutes à 6000 rpm (= 3500 rcf) et à 20°C. Après centrifugation, le culot se redisperse facilement dans l'eau. Afin de quantifier les pertes lors de la purification, nous avons étudié la distribution de taille des hybridosomes faits de QD1 et QD2. Un exemple de distribution de taille de la dispersion d'hybridosomes avant et après centrifugation est donné en **Figure 2. 28**. Cette figure présente également les images TEM avant et après centrifugation, lesquelles montrent une conservation de la morphologie des nanocapsules. De plus, nous n'observons pas de NP individuelles. Les pertes moyennes lors de la centrifugation sont inférieures à 30% en termes de concentration (avec en moyenne sur les 6 échantillons testés, 77 % d'échantillon récupéré après centrifugation) et avec une distribution de taille relativement semblable. La centrifugation est donc adaptée pour purifier les hybridosomes fabriqués à partir de NP non magnétiques.

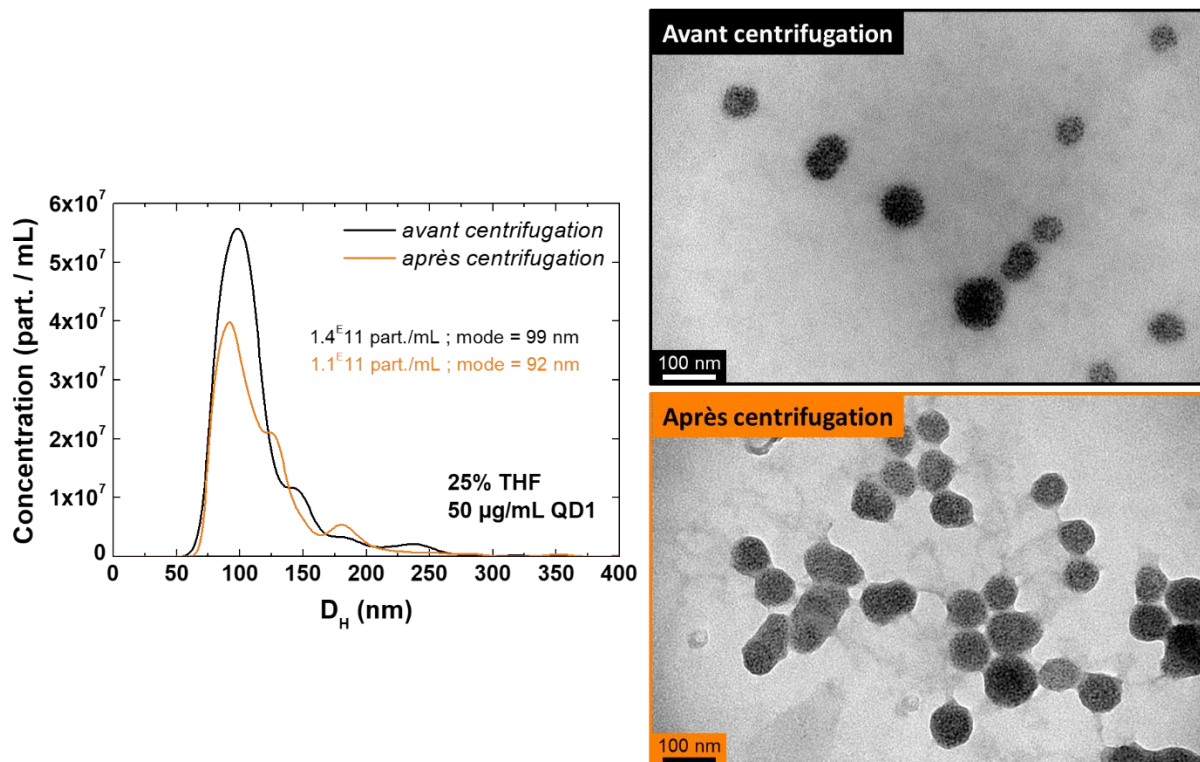


Figure 2. 28 – Distribution de tailles d’hybridosomes QD1@PEG-PAA (25 % THF ; 50 μ g/mL QD ; QD1) avant et après centrifugation. À droite, les images TEM correspondant aux objets avant et après centrifugation. Les dispersions sont dilués 50x pour le NTA.

II.3.3.2. Nanoparticules d’or

II.3.3.2.1. Influence du polymère

Pour réaliser les hybridosomes, l’objectif est de réussir à remplacer le ligand, en l’occurrence l’oléylamine. Il faut donc un polymère avec des groupements présentant suffisamment d’affinité avec les AuNP, par exemple un polymère présentant des fonctions azotées. Plusieurs polymères ont été testés, à savoir : PAA_{450k}, PEG_{2k}-PAA_{7k}, PVP (10k, 55k, 360k et 1300k), poly-L-lysine_{400k}, polyéthylèneimine (PEI_{60k}) ou poly(allylamine) (450k). La structure de ces polymères est présentée en **Figure 2. 29**. Nous avons réalisé des préparations d’hybridosomes avec les différents polymères puis nous avons étudié leur spectre d’absorbance ainsi que leur distribution de taille (**Figure 2. 30 A&B**). Le spectre d’absorbance est utile pour suivre le pic plasmon, qui est susceptible d’évoluer après l’assemblage.

Le spectre d’absorbance des différents échantillons est toujours relativement semblable, avec un très léger décalage vers les plus grandes longueurs d’ondes du pic plasmon. Ce décalage est toutefois très faible, de l’ordre de la vingtaine de nanomètres (le pic plasmon de la référence – AuNP dans THF – est à 522 nm et au maximum le pic se décale vers 545 nm – pour le PEI,

poly(allylamine) et poly-L-Lysine). Ce décalage a d'ailleurs déjà été observé en ajoutant simplement de l'eau dans la dispersion d'AuNP dans le THF. Il ne semble donc pas y avoir de couplage plasmonique. Cependant, les distributions de taille sont monodisperses, avec un diamètre hydrodynamique autour de 75 – 100 nm. Cela correspond tout à fait aux caractéristiques des hybridosomes. **Il semblerait donc y avoir formation d'hybridosomes.** Ceci est intéressant puisque ces échantillons ont été réalisés avec seulement du THF pur, sans BHT. Encore une fois, l'OIA peut induire la formation de gouttelettes ouzo et certainement permettre la formation d'hybridosomes. La réalisation d'hybridosomes sans utilisation de BHT semble donc possible et nécessitera par la suite des études plus approfondies.

On ne sait pas avec certitude si les structures obtenues sont bien des hybridosomes, c'est-à-dire des nanocapsules. En effet, alors que les objets sont très beaux en NTA, ils sont très difficiles à imager en TEM. Il y a comme une sorte de débobinage du polymère et les AuNP s'écrasent sur la grille TEM. À titre d'exemple, la **Figure 2. 30 C** présente les images TEM de l'échantillon avec le PEI. Des assemblages semblent bien exister mais s'écrasent sur la grille, alors que d'autres assemblages (à droite) ressemblent plus à des agrégats denses. Les images nous laissent penser que les NP sont globalement assez éloignées, sauf pour les structures agrégées, ce qui explique l'absence de couplage plasmonique. D'une manière générale, le couplage plasmonique est observé lorsque deux NP sont à une distance inférieure à leur taille.²⁸ Dans notre cas, il faut donc rapprocher les particules à moins de 10 nm pour espérer voir un phénomène intéressant. De plus, on observe des structures sphériques avec un faible recouvrement par les NP. Il est donc possible que la concentration en AuNP (50 μ L de dispersion d'AuNP, soit de l'ordre de $1,6 \cdot 10^{14}$ AuNP/mL) soit trop faible pour former convenablement les hybridosomes.

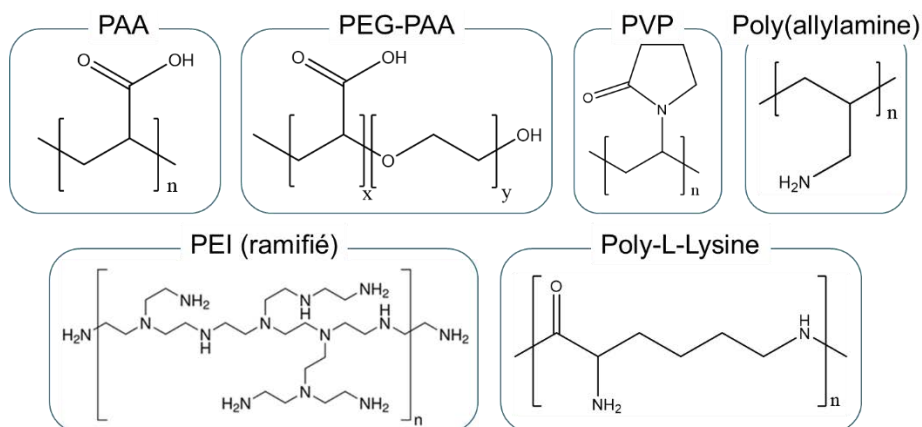


Figure 2. 29 – Structures des différents polymères testés pour stabiliser des hybridosomes avec les AuNP. Les groupements azotés présentent tout particulièrement une affinité intéressante pour les surfaces d’or.

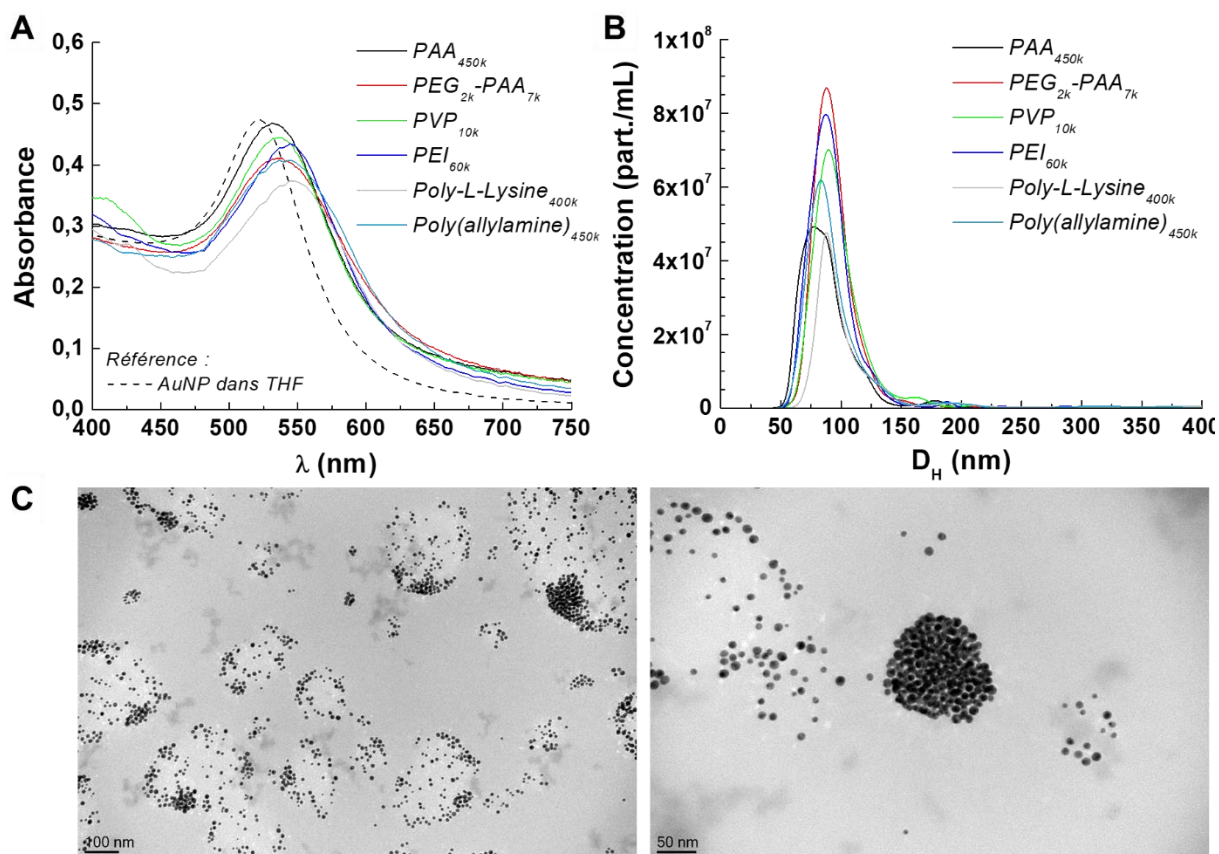


Figure 2. 30 – (A) Spectres d’absorption et (B) analyse de taille (NTA) d’échantillons d’AuNP-oléylamine stabilisées par différents polymères, après évaporation. (C) Images TEM de l’échantillon AuNP@PEI_{60k}. Le volume d’AuNP est de 50 μ L, soit au final de l’ordre de $1,6 \cdot 10^{14}$ AuNP/mL. Les concentrations en polymère sont les suivantes : PAA (2,5 mM unités AA), PEG-PAA (2,5 mM unités AA), PVP (2,5 mM amines), PEI (11,6 mM amines), Poly-L-Lysine (0,8 mM amines), Poly(allylamine) (2,6 mM amines). Les échantillons sont dilués 50x pour le NTA.

Nous avons également voulu étudier l'influence de la longueur du polymère sur les structures obtenues. Pour cela, nous avons préparé des hybridosomes avec de la PVP de plusieurs poids moléculaires : 10k, 55k, 360k et 1300k. La **Figure 2. 31** présente les analyses de taille, à la fois en termes de distributions de taille **(A)**, de tailles et concentrations **(B)** – et d'images TEM **(C)**. Plus la longueur de chaîne augmente, plus la taille moyenne augmente, avec toujours une bonne dispersité. De plus, la concentration est globalement stable. Cette augmentation de taille des nano-objets quand la longueur de chaîne du polymère augmente peut s'expliquer par le fait qu'une chaîne plus grande peut lier plus de NP entre elles. Encore une fois, la TEM ne permet pas de visualiser les objets correctement, les structures ne semblant pas résister au séchage sur la grille (**Figure 2. 31 C**).

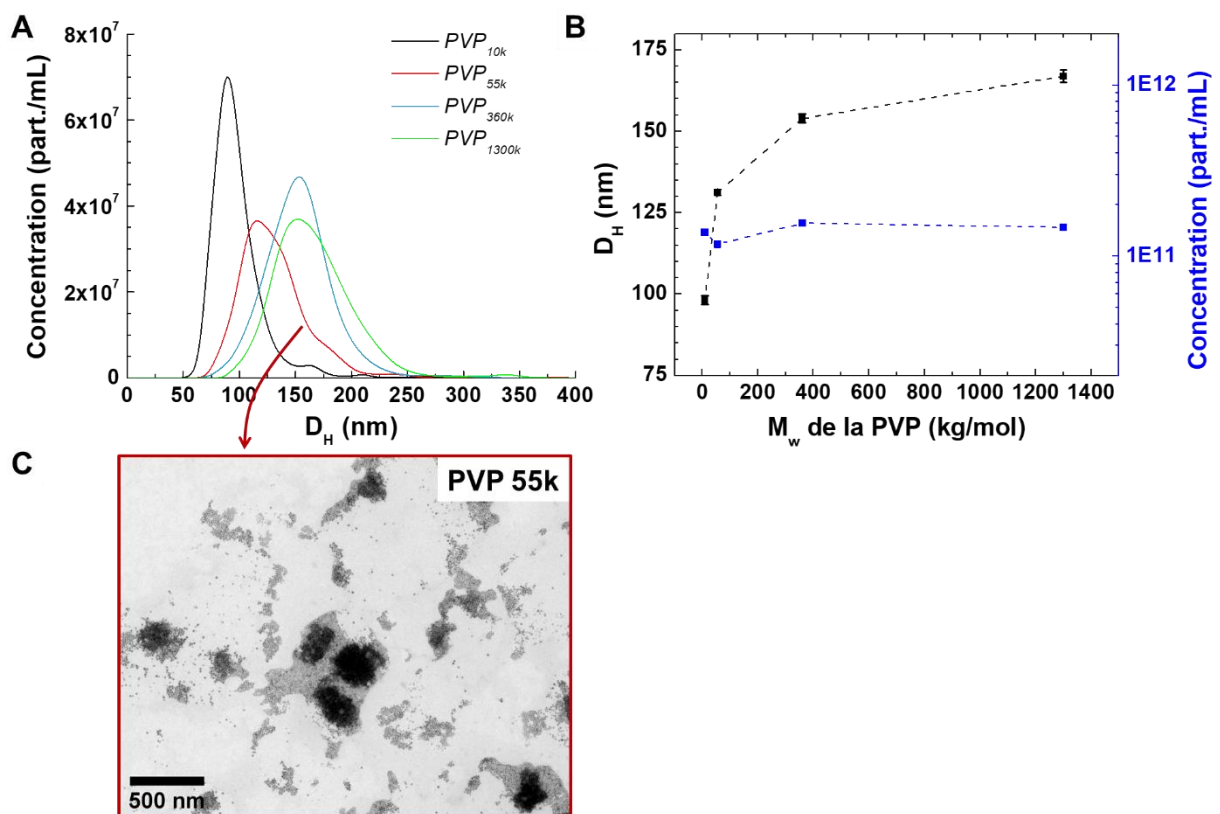


Figure 2. 31 – (A) Distributions de tailles et (B) diamètres hydrodynamiques moyens et concentrations de nanostructures formées à partir d'AuNP stabilisées par de la PVP de masse moléculaire variée (10k, 55k, 360k et 1300k). (C) Images TEM des AuNP@PVP_{55k}. Les échantillons sont dilués 50x pour le NTA.

II.3.3.2.2. Influence de la quantité d'AuNP

Nous avons également étudié l'influence de la quantité d'AuNP sur les nano-objets formés. Nous avons fait cette étude avec le PAA_{450k} comme polymère. Nous avons varié la concentration en AuNP-oléylamine en ajoutant des quantités de dispersion d'AuNP différentes suivant les échantillons. En se basant sur la concentration en or de notre dispersion d'AuNP (31 µg Au/mL) et en connaissant la taille des AuNP ($9,8 \pm 2,3$ nm), nous estimons la concentration en NP dans les échantillons entre $8 \cdot 10^{13}$ et $8 \cdot 10^{14}$ AuNP/mL. Par ailleurs, nous avons également utilisé du THF pur et du THF commercial avec BHT.

La **Figure 2. 32** présente les résultats des analyses NTA et TEM des différents échantillons. En ce qui concerne le diamètre hydrodynamique, on remarque deux comportements différents selon la présence ou non de BHT (**Figure 2. 32 A**). En présence de BHT, la taille est globalement plus élevée qu'en l'absence de BHT. Par ailleurs, alors que la taille est stable en fonction de [AuNP] en présence de BHT, celle-ci augmente lorsqu'il n'y a pas de BHT. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en présence de BHT, la taille des gouttelettes est régie par l'effet ouzo induit par le BHT et la taille ne dépend pas de la concentration en NP. D'un autre côté quand il n'y a pas de BHT, les gouttelettes se forment sous l'effet des AuNP (et de leurs ligands) et on voit une augmentation de la taille lorsque la concentration en NP augmente. Sans BHT, il y a donc certainement une influence de l'oléylamine des AuNP. Il est intéressant de noter que les hybridosomes sont obtenus dans les deux cas, qu'il y ait du BHT ou non. La concentration en nano-objets est relativement stable que ce soit avec ou sans BHT (**Figure 2. 32 B**).

La taille des hybridosomes reste toujours constante peu importe la quantité d'AuNP (en présence de BHT). Ceci n'est pas en phase avec ce que nous avons observé dans la partie précédente, à savoir une diminution de la taille quand la concentration en NP augmente. Toutefois, cela est observé dans le mélange « eau/THF » avant évaporation. L'hypothèse ici est que la coque des hybridosomes se rétracte lors de l'évaporation, ce qui mène à des hybridosomes de taille semblable.

De plus, les objets formés à la plus grande concentration d'AuNP et avec 25 ou 30% de THF (avec BHT) ont été imagées par TEM (**Figure 2. 32 C**). Les nanostructures formées ressemblent à ce que nous recherchons pour des hybridosomes. Les objets ont toujours une certaine difficulté à tenir sur la grille mais on voit clairement des assemblages bien sphériques, comportant de

nombreuses particules. Cela fonctionne également à 30% de THF, avec toutefois les AuNP qui tapissent moins bien la surface des objets.

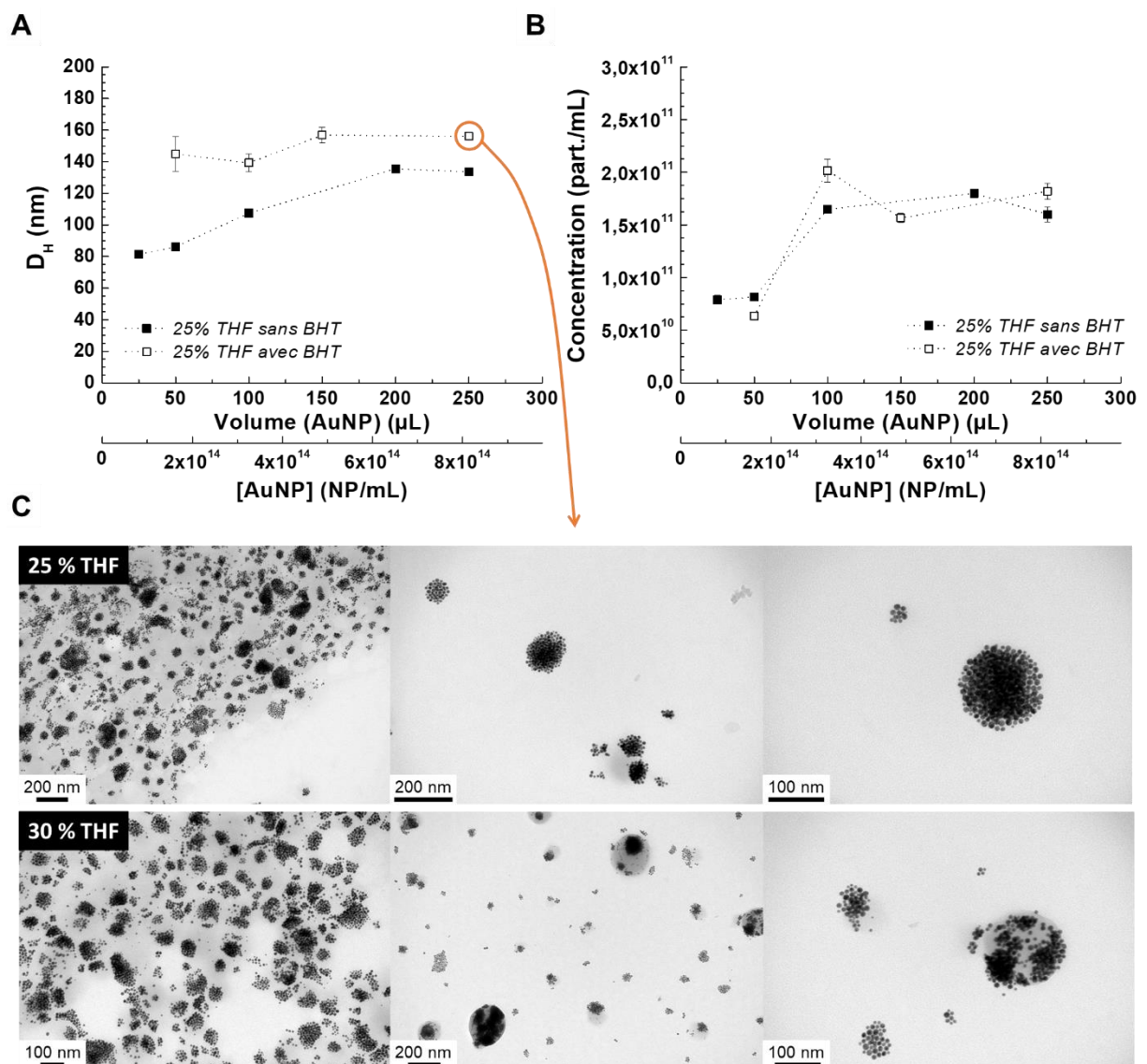


Figure 2.32 – Images TEM d’AuNP@PAA_{450k} (2,5 mM d’unités acides) réalisés à 25 % (A) et 30 % (B) de THF comportant du BHT. (C) Observations TEM des objets formés avec 250 μL d’AuNP, à 25% ou 30% de THF commercial.

II.3.4. Mélange de nanoparticules

Il est également possible de mélanger plusieurs NP. En particulier, nous avons développé des nanocapsules mixtes SPION/AuNP. C’est sur ce genre d’objets que se base le dernier chapitre de cette thèse portant sur l’amélioration de la radiothérapie grâce aux hybridosomes SPION/AuNP pour le traitement du glioblastome. Nous aborderons donc cela plus en détails dans le chapitre IV.

II.3.5. Ajout de plusieurs couches polymériques autour des capsules (LbL)

Au-delà de la nature des NPs utilisées, il est possible de jouer sur la coque polymérique. Une approche layer-by-layer (LbL) a été testée sur des hybridosomes SPION@PEG-PAA. Des couches successives de polyélectrolytes chargés soit positivement, soit négativement, sont déposées à la surface de la capsule. Il s'agit du PEG-PAA (chargé négativement) et du PEI (chargé positivement ; $M_n = 60 \text{ kg/mol}$). Le suivi de la charge apparente de surface peut être réalisé en mesurant le potentiel Zeta (ζ), qui permet également d'évaluer la stabilité colloïdale : la suspension est admise comme étant stable quand $|\zeta| \geq 25 \text{ mV}$. Ce suivi a été effectué pour les différentes couches successives de polymère (**Figure 2. 33**). On remarque l'**inversion du potentiel ζ à chaque étape**, ceci traduisant bien le dépôt de chaque nouvelle couche de polymère. Ce comportement est réalisé sur au moins 6 couches successives. Les propriétés de l'objet, notamment mécaniques et de perméabilité de la paroi, devraient être modifiées par ces ajouts de polymère. Ces aspects n'ont pas encore été étudiés et représentent une perspective intéressante.

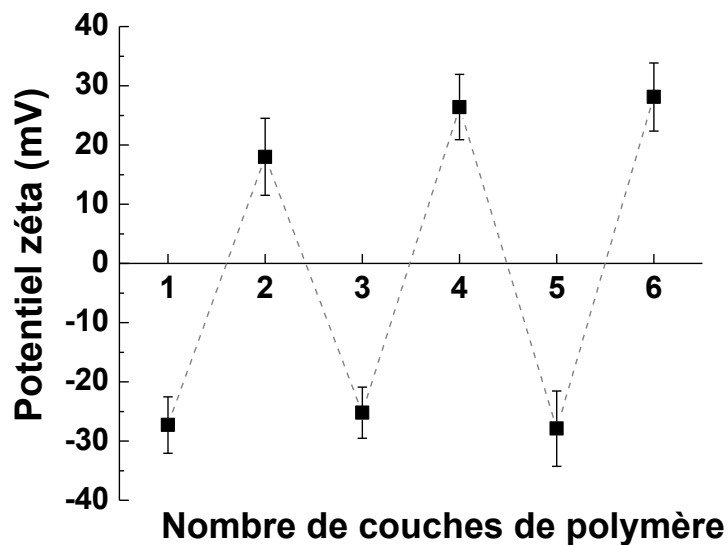


Figure 2. 33 – Évolution du potentiel Zeta d'hybridosomes SPION@PEG-PAA (1^{ère} couche de polymère = PEG-PAA initialement présent sur la capsule) en fonction des ajouts successifs de poly électrolytes chargés négativement (PEG-PAA) et positivement (PEI). L'incertitude sur trois mesures est représentée.

Nous avons entrepris la caractérisation de ces objets par NTA mais ils ont tendance à s'agréger dans le bas du tube lors de la centrifugation, et à ne pas se redisperser. Il est possible qu'une partie du polymère soit enlevée lors de la centrifugation et du prélèvement du surnageant. On constate toutefois que la taille augmente avec le nombre de couches. Une diminution de la concentration est également observée. Il faudrait étudier ces aspects plus en détail car l'approche LbL est séduisante pour moduler les propriétés des hybridosomes.

II.4. Nano-objets hybrides SPION@silice

Un autre type d'objet peut être préparé sur le même modèle que les hybridosomes : des nanocapsules composées d'une couche de silice et d'un cœur comportant des NP, par exemple des SPION. La silice est un matériau qui a fait l'objet de nombreux développements, dans le biomédical notamment, principalement à travers des structures mésoporeuses aptes à encapsuler et à délivrer des principes actifs.²⁹⁻³¹ Par ailleurs, des objets mésoporeux comportant des NP magnétiques ont été développés, en particulier pour l'hyperthermie, l'IRM ou encore la délivrance de principe actif.³²⁻³⁵

Ici, le procédé de préparation des hybridosomes est adapté en présence de précurseur de silice, l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS), d'éthanol et d'ammoniaque. Il s'agit donc d'une voie de synthèse de silice sol-gel classique. Deux solutions sont préparées indépendamment avant d'être mélangées, puis le TEOS est ajouté. Il s'agit de la solution 1 dite « NP-shell » (composition : eau/THF (avec BHT)/SPION) et de la solution 2 dite « solution éthanolique » (éthanol + ammoniaque 32%). La solution 1 correspond en fait à une préparation habituelle pour élaborer des hybridosomes mais sans ajout de polymère. Une fois le TEOS ajouté, les échantillons deviennent rapidement opalescents voire troubles pour les quantités de TEOS les plus importantes. 2 h après la préparation des solutions 1 et 2, celles-ci sont mélangées puis le TEOS est ajouté immédiatement avec un léger mélange au vortex. Le tout est mis à évaporer une nuit à 40°C (comme pour des hybridosomes). À l'issue de l'évaporation, les nano-objets peuvent être purifiés par aimantation. Le schéma suivant récapitule le procédé :

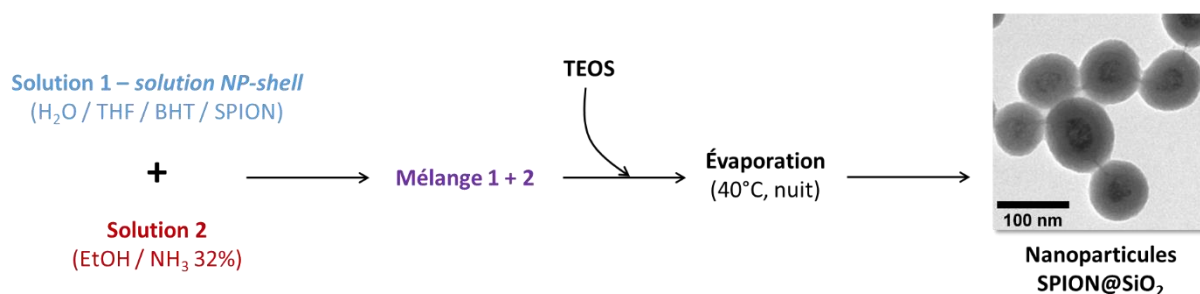


Figure 2. 34 – Schéma de principe de la préparation d'assemblages SPION@SiO₂ via le procédé dérivé de celui de fabrication des hybridosomes par effet ouzo.

Ces nouveaux objets ont été étudiés par NTA et TEM afin d'obtenir des informations sur la distribution de taille de la suspension, la morphologie ainsi que l'épaisseur de la coquille de silice.

II.4.1. Influence de la quantité de TEOS

Le premier paramètre considéré dans l'étude de ces nanoparticules à base de SPION et de silice est la quantité de précurseur de silice. Nous avons fait varier la quantité de TEOS pour un 1 mL entre 0,5 et 20 μL de TEOS (entre 2,25 et 90 μmol). Pour toutes les compositions, nous utilisons 500 μL de solution 1 et 500 μL de solution 2, soit au final les proportions suivantes : 37,5% vol eau, 12,5% vol THF, 42,9% vol d'EtOH et 7,1% vol d'ammoniaque à 32%. Les échantillons sont ensuite étudiés en NTA et en TEM.

La **Figure 2. 35** présente les résultats obtenus par NTA (entre 2,5 et 20 μL TEOS / mL) et TEM (entre 0,5 et 7,5 μL TEOS / mL). En TEM, nous ne présentons que les petites quantités de TEOS étant donné que l'observation des grosses structures n'est pas aisée du fait de la couche de silice importante.

En premier lieu, les informations obtenues par NTA sont les suivantes : **Lorsque la quantité de TEOS introduite dans le système augmente, les nanostructures obtenues sont de plus en plus grosses (Figure 2. 35 A & B)**. La distribution de taille est quant à elle relativement monodisperse, avec une dispersion (largeur du pic) qui s'élargit avec l'augmentation de la quantité de TEOS. En ce qui concerne la concentration en particules, la tendance est plus difficile à percevoir et **la concentration est relativement constante en fonction de la quantité de TEOS, toujours autour de $2 \text{ à } 6 \cdot 10^{11}$ particules/mL**. Cela se traduit visuellement par des suspensions de plus en plus troubles, laiteuses quand la quantité de précurseur de silice augmente. À des quantités de TEOS supérieures à 7,5 $\mu\text{L/mL}$, les suspensions sédimentent même sans aimantation, ce qui confirme la taille importante des nano-objets.

En plus des informations obtenues par NTA, la microscopie électronique à transmission nous permet d'investiguer la morphologie des nanostructures formées (**Figure 2. 35 C & D**). Ainsi, il s'agit de **nanostructures de type cœur/coquille SPION@SiO₂, bien sphériques et régulières**. Malgré un contraste qui n'est pas toujours optimal du fait de la taille de la couche de silice (notamment pour les couches épaisses), le traitement et l'analyse des images TEM nous permet de voir que les SPION se trouvent au cœur avec une coquille de silice à l'extérieur. Par ailleurs, des structures déformées ou en forme de haricot sont visibles aux très faibles quantités de précurseur (cf. **Figure 2. 35 D** à 0,5 μL TEOS/mL, par exemple), contrairement aux structures quasi sphériques obtenues avec beaucoup de TEOS. Sur ces petits objets, il semble y avoir une fracture

qui fait penser à une rupture mécanique. Cela peut être dû à une épaisseur de couche de silice insuffisante qui ne permet pas de stabiliser le cœur de SPION, qui se retrouve ainsi déformé lors de l'évaporation du solvant ou lors du séchage sur la grille de TEM. Il n'est d'ailleurs pas possible de déterminer si les SPION dans le cœur sont organisées autour d'une cavité (comme dans les hybridosomes) ou non, ou bien si du THF résiduel et/ou de la silice sont présents. Il n'est en effet pas évident que le solvant puisse s'échapper de la coque de silice lors de l'évaporation ou que la condensation de la silice se cantonne à l'extérieur des NP-shells initiales.

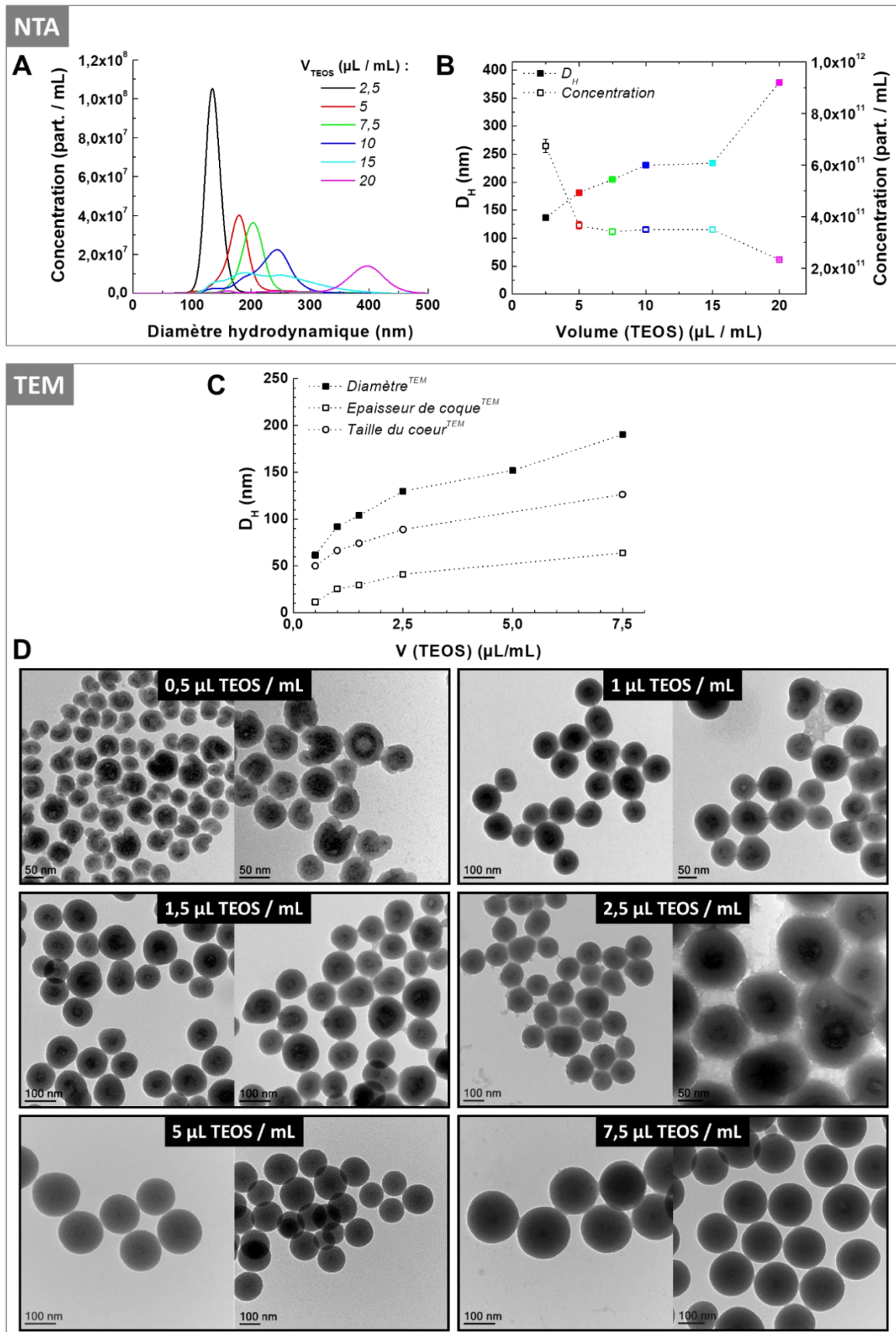


Figure 2. 35 – Caractérisation des nano-objets SPION@SiO₂. **NTA**: (A) dispersions de taille / (B) diamètres hydrodynamiques moyens et concentrations. **TEM**: (C) diamètre géométrique, épaisseur de coquille et taille du cœur de SPION / (D) Images des objets obtenus.

Nous avons par ailleurs mesuré les caractéristiques géométriques de ces nano-objets SPION@SiO₂ à partir des images TEM (**Figure 2. 35 C**). À la fois **le diamètre, l'épaisseur de coquille et la taille du cœur augmentent avec la quantité de TEOS**. Ces résultats ainsi que les valeurs des diamètres sont cohérentes avec celles du NTA. De manière intéressante, le cœur semble être comme « comprimé » lorsque les épaisseurs de silice sont faibles. L'évolution de l'épaisseur de coquille n'est pas linéaire avec la quantité de TEOS mais nous pouvons la traduire en un volume moyen de coquille. Celui-ci évolue linéairement avec la quantité de précurseur introduite (**Figure 2. 36**). Ainsi, toute la quantité de TEOS engagée semble donc réagir pour former des nanoparticules.

Nous avons par ailleurs calculé le nombre d'objets total théorique à partir du volume de TEOS total et du volume d'une coquille. Le nombre de particules attendu varie peu avec la concentration en TEOS et est de l'ordre de 10¹² à 10¹³ particules/mL. Ce chiffre est plus important que celui obtenu par NTA (**Figure 2. 35 B**) (qui est de l'ordre de 10¹¹ particules/mL). Ainsi, **le nombre de particules effectivement mesuré est inférieur à la concentration totale théorique**. Cela s'explique par le fait que la concentration déterminée par NTA est celle de l'échantillon purifié par aimantation. Il ne contient donc pas toutes les particules formées, notamment celles ne contenant pas de SPION, s'il y en a. On observe en effet que certains surnageants sont encore troubles après aimantation et contiennent des nano-objets, objets qui ne sont donc pas comptabilisés dans la valeur de concentration. Ces résultats mènent à deux hypothèses :

- Une partie du TEOS n'est pas utilisée pour faire des objets contenant des SPION. Cette hypothèse se traduirait par des particules uniquement composées de silice et qui ne seraient pas aimantées. Ceci expliquerait qu'on ne les retrouve pas en NTA pour la mesure de concentration.
- Le calcul du nombre de particules est fait sur le volume moyen de coquille déterminé par TEM. Si ce volume est plus grand en réalité, alors la concentration théorique en objet diminue, pour un volume de TEOS identique. Ainsi, cette différence entre concentration effectivement observée et théorique pourrait indiquer dans une certaine mesure la présence de silice également dans le cœur des objets.

La question de l'épaisseur de la coquille est intéressante, le comportement des nano-objets formés étant probablement différent suivant cette épaisseur. Par exemple, la perméabilité des

couches de silices très fines est un aspect qu'il serait intéressant d'évaluer (protection de principe actif encapsulé), tout comme leurs propriétés de résistance mécanique ou encore la rapidité de leur dégradation chimique. Nous n'avons pour le moment étudié aucun de ces aspects.

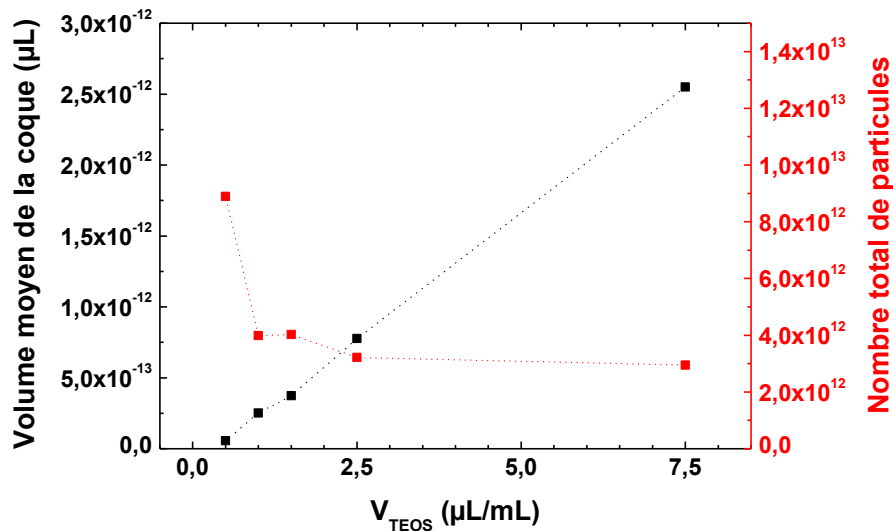


Figure 2. 36 – Volume moyen de la coquille et nombre de particules total estimé calculés à partir des mesures effectuées par TEM, en fonction de la quantité de précurseur de silice dans le système.

Pour finir, nous avons cherché à déterminer si tous les objets possédaient ou non des SPION dans leur cœur. Il semblerait que ce ne soit pas le cas étant donné que l'aimantation ne permet pas de récupérer toutes les nanostructures de l'échantillon, le surnageant restant blanchâtre. En plus des échantillons purifiés par aimantation présentés précédemment, nous avons aussi imagé par TEM les surnageants après aimantation (Figure 2. 37). Il apparaît que **la majorité des objets observés possèdent des SPION dans leur cœur, à la fois sur l'échantillon purifié et dans le surnageant**. Ainsi, même avec la présence des SPION, les deux aimantations de 24 h ne suffisent pas pour attirer toutes les SPION@SiO₂. Peut-être que la présence de la silice modifie les propriétés d'aimantation des SPION, même couplées au sein d'un nano-objet. Il y a par ailleurs beaucoup plus de « déchets » sur les grilles des surnageants, comme des « voiles » sur le fond de la grille qui pourrait être un excès de silice : l'hypothèse précédemment émise stipulant que tout le TEOS réagit pour former des capsules est probablement fautive.

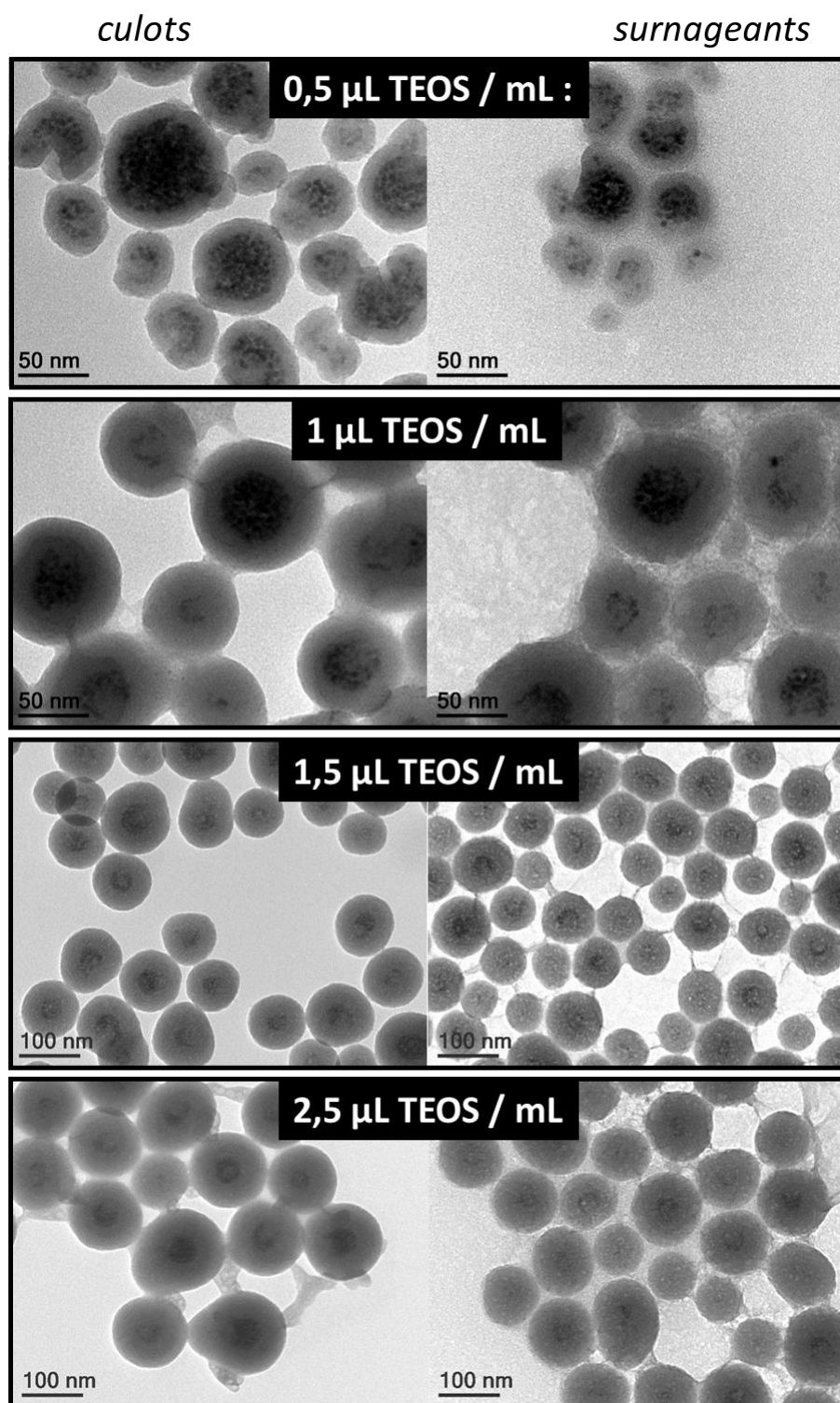


Figure 2. 37 – Images TEM de SPION@SiO₂ après deux aimantations de 24 h, pour différentes quantités de précurseur de silice dans le système. À gauche les échantillons purifiés et à droite leur surnageant.

II.4.2. Influence de la quantité de solution (éthanol + ammoniacque)

Tous les échantillons précédemment décrits ont été préparés avec la même quantité d'éthanol et d'ammoniacque. Ici, nous avons varié le rapport solution (éthanol+ammoniacque)/solution de NP-shell (eau/THF/SPION), en gardant la même quantité de précurseur de silice (2,5 μL TEOS/mL). La préparation des échantillons est réalisée de la même manière que précédemment. Le **Tableau 2. 3** récapitule les différentes compositions.

Tableau 2. 3 – Composition des différents échantillons préparés pour évaluer l'influence du ratio solution NP-shell (eau / THF / SPION) vs solution 2 (éthanol / ammoniacque).

| | V (solution 1) (μL) | V (solution 2) (μL) | %vol (eau) | %vol (NH_3 32%) | %vol (THF) | %vol (EtOH) |
|---|----------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------------|------------|-------------|
| 1 | 500 | 500 | 37,5 | 7,1 | 12,5 | 42,9 |
| 2 | 600 | 400 | 45 | 5,7 | 15 | 34,3 |
| 3 | 700 | 300 | 52,5 | 4,3 | 17,5 | 25,7 |
| 4 | 800 | 200 | 60 | 2,9 | 20 | 17,1 |
| 5 | 900 | 100 | 67,5 | 1,4 | 22,5 | 8,6 |

En rouge, la composition correspondant aux expériences présentées précédemment

Solution 1 « solution NP-shell » : eau / THF (75 : 25 % vol) / SPION

Solution 2 : éthanol / ammoniacque 32% massique (6 : 1 vol)

Les nanoparticules formées ont été imagées par TEM pour déterminer leur taille et l'épaisseur de la coque (**Figure 2. 38**). On remarque que la taille des SPION@SiO_2 obtenues, tout comme l'épaisseur de coque, augmentent avec la proportion d'éthanol dans le système (et donc avec l'augmentation de la quantité d'ammoniacque, et la diminution de la proportion d'eau et de THF).

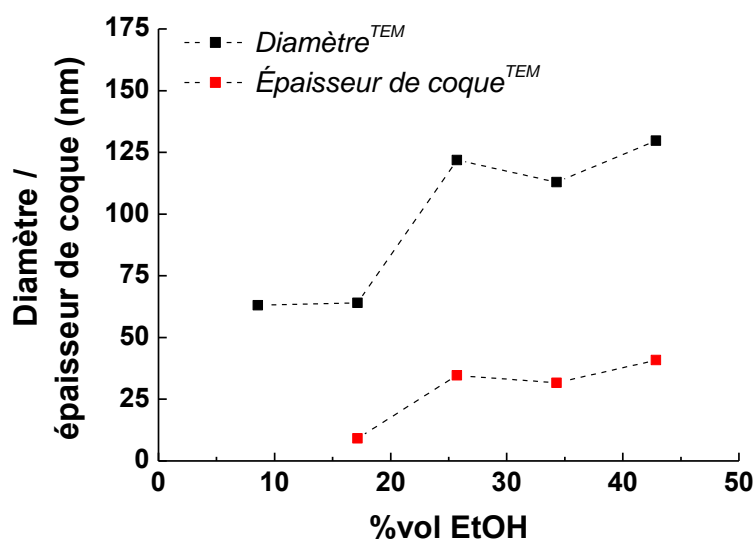


Figure 2. 38 – Influence du ratio de solution (éthanol + ammoniacque) dans le système sur la taille des nano-objets SPION@SiO_2 obtenus et sur l'épaisseur de leur coquille. La quantité de TEOS est de 2,5 μL de TEOS/mL de préparation.

Pour les quantités d'éthanol et donc d'ammoniaque importantes ($> 20\%$ EtOH ; $> 4\%$ NH_3 32%), on retrouve des particules bien sphériques telles que décrites précédemment, avec un cœur de SPION bien visible (**Figure 2. 39**). Sur ces images TEM, les SPION@SiO_2 semblent parfois fusionner légèrement ou présenter des dépôts de silice, mais il faut garder à l'esprit que ces images TEM correspondent à des échantillons qui n'ont pas été purifiés par aimantation (par défaut de temps). Pour les plus faibles quantités d'éthanol, les coques sont très difficilement mesurables, étant très fines ou alors peut-être même inexistantes (par exemple à 9% EtOH). La morphologie des objets obtenus est d'ailleurs très différente en dessous de 20 % d'éthanol, où des objets déformés sont présents (un peu comme à faible quantité de TEOS dans la partie précédente). Ainsi, des objets en forme de haricots sont visibles, composés principalement des SPION et une très faible couche de silice. Dans ces conditions, les quantités d'éthanol et d'ammoniaque sont très faibles et la dilution de la solution 1 (NP-shell) est faible. On retrouve même des objets ressemblant à des hybridosomes. La couche de silice est probablement lente à se former, ce qui peut expliquer que la structure n'est pas figée très rapidement par la condensation de la silice, et même l'éventuelle absence de coquille.

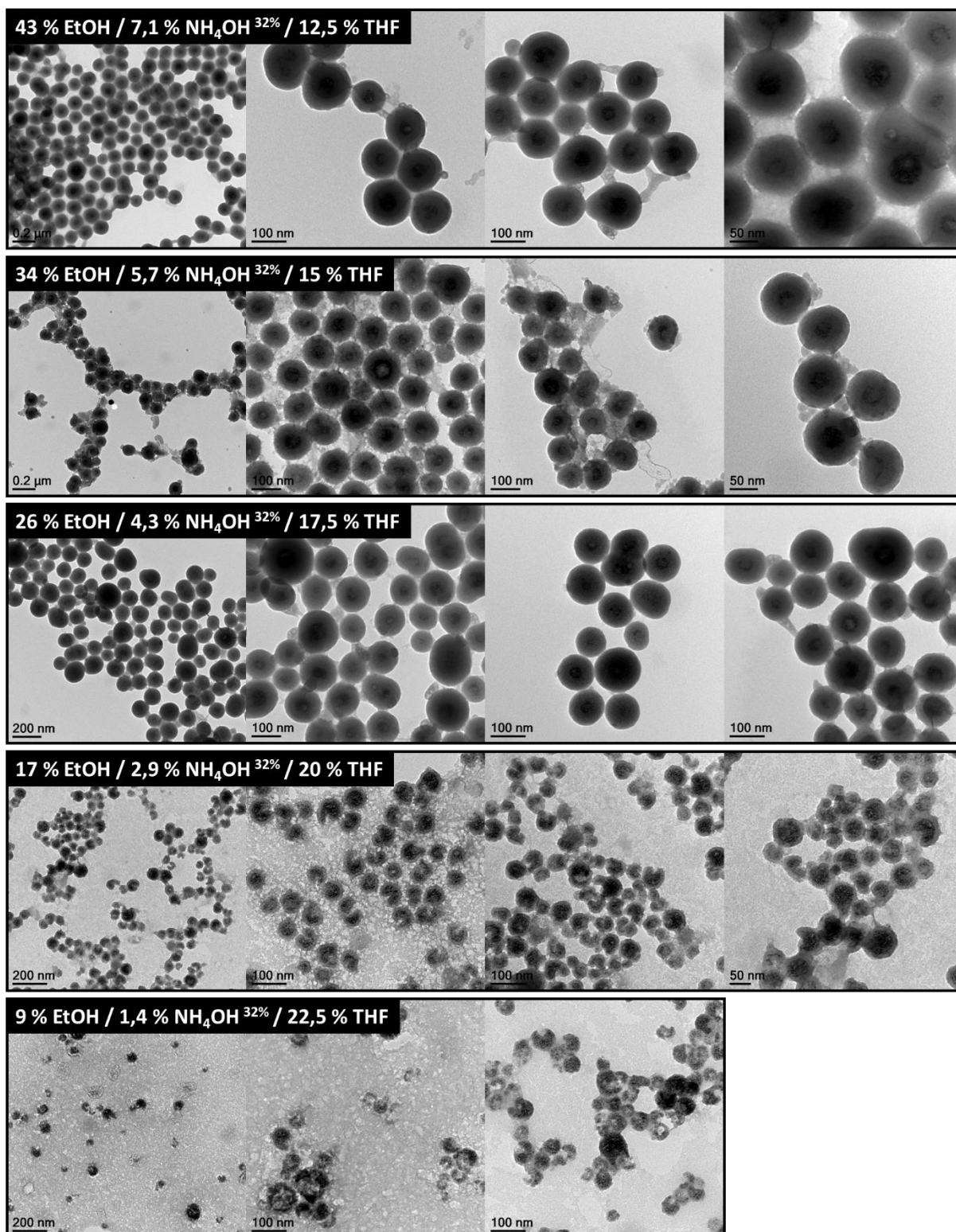


Figure 2. 39 – Images TEM des structures obtenues pour différentes compositions. La quantité de TEOS utilisée est toujours de 2,5 μ L/mL. Les échantillons imagés n’ont pas été purifiés.

II.5. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons dans un premier temps étudié le système « eau/THF/BHT ». Nous avons pour la première fois établi le diagramme de phase de ce système. Il apparaît que **le BHT est un élément indispensable à la formation de gouttelettes ouzo**. La composition que nous utilisons pour la préparation des nanocapsules est bien dans le domaine ouzo mais est en fait très proche de la frontière avec le monophasique. Il faut donc garder en tête que de petites variations de composition peuvent peut-être induire une modification des caractéristiques de gouttelettes et *in fine* des objets préparés. Nous avons également analysé diverses compositions dans le domaine monophasique et dans la région ouzo.

Le domaine monophasique semble correspondre à une SFME (*surfactant-free microemulsion*), avec des tailles et concentrations en gouttes constantes en fonction de la quantité de BHT. À concentration constante en BHT et lorsque la quantité de THF varie, la taille ainsi que la concentration des gouttes semblent augmenter légèrement. Globalement, le volume représenté par les gouttes est constant dans ce domaine SFME et ne dépend pas du BHT ; il dépend éventuellement un peu de la quantité de solvant lorsqu'il y a beaucoup de THF. Les tailles et concentrations des gouttes présentes dans la zone monophasique sont donc relativement constantes. **Dans le domaine ouzo, la taille des gouttes et leur concentration augmente avec la fraction de composé hydrophobe** et les gouttelettes pourraient être principalement composées de BHT. Bien que le domaine SFME soit thermodynamiquement stable et la zone ouzo métastable, aucune évolution de taille majeure n'a été constatée sur une période de 8h et le comportement entre les deux domaines est plutôt similaire. Une chose est sûre, les gouttes sont plus grosses et plus nombreuses dans le domaine ouzo comparé au SFME.

Nous avons ensuite abordé l'influence des ligands des NP sur le système en étudiant leurs diagrammes de phase. **Tous les ligands étudiés** (octylamine, acide oléique, oléylamine et mélange (octylamine + acide oléique)) **présentent un domaine ouzo dans le mélange « eau/THF »**. Parmi les différents ligands, l'octylamine présente la plus petit chaîne alkyle et possède la meilleure solubilité dans l'eau : le domaine ouzo est donc étroit et décalé vers les fractions de soluté plus importantes et les plus faibles fractions en THF. Ainsi, le domaine ouzo de l'octylamine se situe hors des conditions expérimentales de réalisation des hybridosomes. **Les autres ligands ont des chaînes beaucoup plus longues et présentent de grands domaines ouzo**, au moins aussi grands que celui du BHT. Par ailleurs, les compositions expérimentales sont

susceptibles de croiser ces domaines ouzo. Ainsi, les NP possédant ces grands ligands (oléylamine, acide oléique et mélange (octylamine + acide oléique)) peuvent induire un effet ouzo et favoriser la formation des gouttes. Il s'agit d'un point d'attention à garder en tête pour la fabrication d'hybridosomes. En particulier, l'existence d'un domaine ouzo grâce à l'oléylamine et à l'acide oléique peut expliquer la formation d'hybridosomes en l'absence de BHT.

Nous avons finalement préparé des hybridosomes à partir de NP variées, précisément des AuNP et des QD. Par ailleurs, les hybridosomes à base de SPION seront longuement utilisés dans les deux chapitres suivants. Divers paramètres ont été étudiés. En premier lieu, le délai avant l'ajout du polymère ainsi qu'avant évaporation n'ont pas particulièrement d'importance sur les hybridosomes obtenus. De plus, **la taille des hybridosomes semble diminuer quand la concentration en NP augmente** (même si cet effet n'est pas très marqué), **alors que la concentration en hybridosomes augmente**. Des objets avec des bonnes propriétés de fluorescence conservées dans le temps sont obtenus avec les QD. Nous avons finalement exploré l'adaptation du procédé des hybridosomes à la préparation de particules SPION@SiO₂, avec une épaisseur de coque ajustable en fonction de la quantité de précurseur de silice. Il s'agit de résultats préliminaires méritant plus de développements dans le futur.

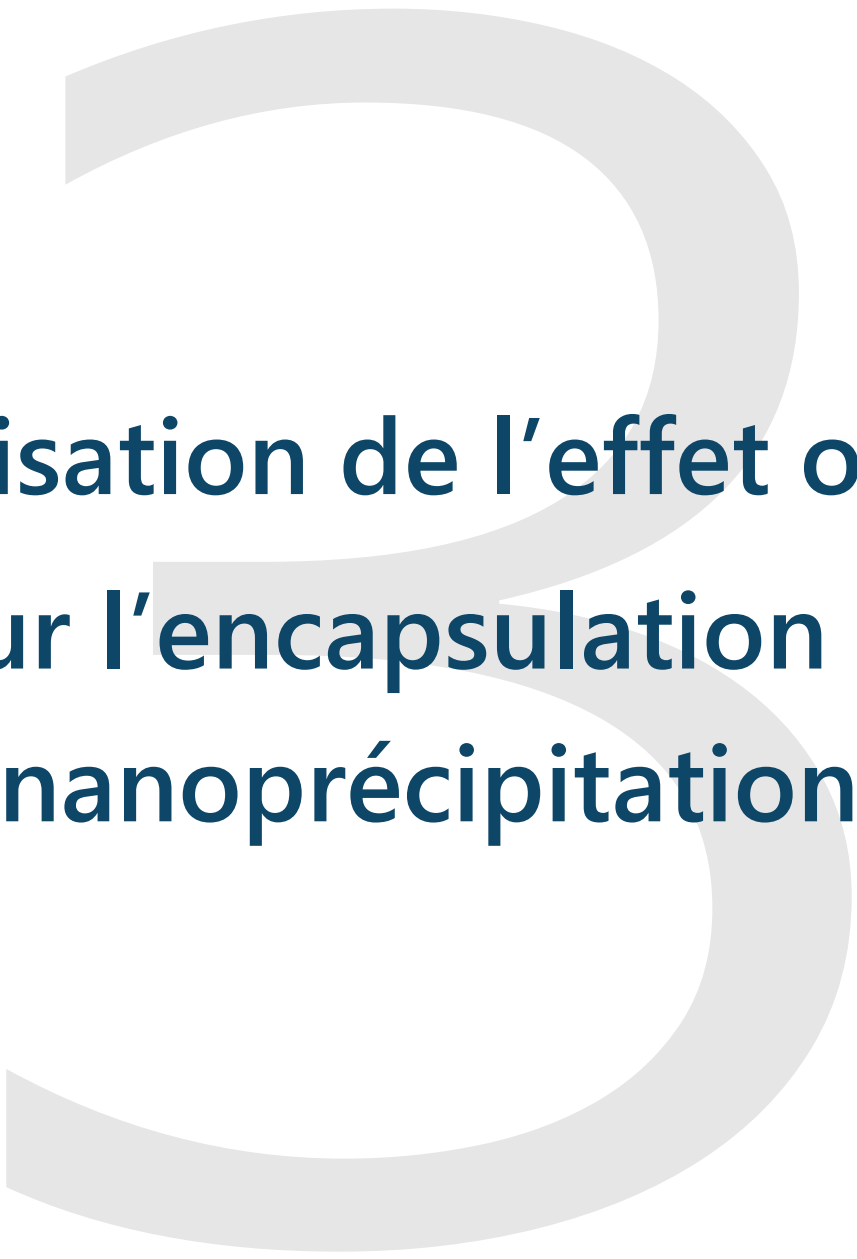
Les deux chapitres à venir vont traiter de l'utilisation des hybridosomes SPION et SPION/AuNP pour deux applications :

- L'encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciptation, avec des concentrations internes et des rendements d'encapsulation très élevés.
- Le potentiel des hybridosomes SPION/AuNP pour la radiothérapie du glioblastome, avec en perspectives la possibilité de coupler radiothérapie et chimiothérapie grâce aux propriétés des hybridosomes.

II.6. Références bibliographiques

1. Casterou, G. *et al.* Improved Transversal Relaxivity for Highly Crystalline Nanoparticles of Pure γ -Fe₂O₃ Phase. *Chemistry – A European Journal* 21, 18855–18861 (2015).
2. Na, H. B., Song, I. C. & Hyeon, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* 21, 2133–2148 (2009).
3. Sciortino, F. Nouveau procédé d'élaboration de nanocapsules inorganiques et hybrides (Hybridosomes®) : des films multifonctionnels aux applications biomédicales. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1 (2017).
4. Sciortino, F. *et al.* Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* 2, 796–799 (2016).
5. Liu, S., Chen, G., Prasad, P. N. & Swihart, M. T. Synthesis of Monodisperse Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles with Tunable Size and Surface Plasmon Resonance Frequency. *Chemistry of Materials* 23, 4098–4101 (2011).
6. Sasidharan, A. & Monteiro-Riviere, N. A. Biomedical applications of gold nanomaterials: opportunities and challenges: Biomedical application of gold nanomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7, 779–796 (2015).
7. Thompson, D. T. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today* 2, 40–43 (2007).
8. David Wegner, K. & Hildebrandt, N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chemical Society Reviews* 44, 4792–4834 (2015).
9. Baquero, E. A. *et al.* Synthesis of Oxide-Free InP Quantum Dots: Surface Control and H₂-Assisted Growth. *Chemistry of Materials* 29, 9623–9627 (2017).
10. Vitale, S. A. & Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”. *Langmuir* 19, 4105–4110 (2003).
11. Work, W. J., Horie, K., Hess, M. & Stepto, R. F. T. Definition of terms related to polymer blends, composites, and multiphase polymeric materials (IUPAC Recommendations 2004). *Pure and Applied Chemistry* 76, 1985–2007 (2004).
12. Klamt, A. Conductor-like Screening Model for Real Solvents: A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *Journal of Physical Chemistry* 99, 2224–2235 (1995).
13. Klamt, A., Jonas, V., Bürger, T. & Lohrenz, J. C. W. Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *Journal of Physical Chemistry A* 102, 5074–5085 (1998).
14. Inui, H., Itoh, K., Matsuo, M. & Miyamoto, J. Studies on biodegradation of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) in the environment part-III Biodegradability of BHT with activated sludge. *Chemosphere* 8, 383–391 (1979).
15. Das, B., Nath Roy, M. & Hazra, D. K. Densities and viscosities of the binary aqueous mixtures of tetrahydrofuran and 1,2-dimethoxyethane at 298, 308 and 318 K. *Indian Journal of Chemical Technology* 1, 93–97 (1994).
16. Yan, X. *et al.* Modular construction of single-component polymer nanocapsules through a one-step surfactant-free microemulsion templated synthesis. *Chemical Communications* 53, 1401–1404 (2017).
17. Zemb, T. N. *et al.* How to explain microemulsions formed by solvent mixtures without conventional surfactants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 4260–4265 (2016).

18. Li, Z. *et al.* Large-Scale Structures in Tetrahydrofuran–Water Mixture with a Trace Amount of Antioxidant Butylhydroxytoluene (BHT). *Journal of Physical Chemistry B* 115, 7887–7895 (2011).
19. Champouret, Y., Spataro, G., Coppel, Y., Gauffre, F. & Kahn, M. L. Nanocrystal–ligand interactions deciphered: the influence of HSAB and pK_a in the case of luminescent ZnO. *Nanoscale Advances* 2, 1046–1053 (2020).
20. Mourdikoudis, S. & Liz-Marzán, L. M. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chemistry of Materials* 25, 1465–1476 (2013).
21. US EPA. 2020. *Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11*. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
22. Sciortino, F. *et al.* Structure and elasticity of composite nanoparticle/polymer nanoshells (hybridosomes®). *Soft Matter* 13, 4393–4400 (2017).
23. Sciortino, F. *et al.* Electro-click construction of hybrid nanocapsule films with triggered delivery properties. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20, 2761–2770 (2018).
24. Gauffre, F., Sciortino, F., Casterou, G., Kahn, M. & Chevance, S. Assemblies of Hydrophobic Nanoparticles in an Aqueous Medium, Brevet FR3045408 (A1) (2017).
25. Giansante, C. & Infante, I. Surface Traps in Colloidal Quantum Dots: A Combined Experimental and Theoretical Perspective. *Journal of Physical Chemistry Letters* 8, 5209–5215 (2017).
26. Lin, Y., Skaff, H., Emrick, T., Dinsmore, A. D. & Russell, T. P. Nanoparticle Assembly and Transport at Liquid-Liquid Interfaces. *Science* 299, 226–229 (2003).
27. Yang, X.-C. *et al.* Drug Delivery Using Nanoparticle-Stabilized Nanocapsules. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 477–481 (2011).
28. Liz-Marzán, L. M. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* 22, 32–41 (2006).
29. Barbé, C. *et al.* Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System. *Advanced Materials* 16, 1959–1966 (2004).
30. Tang, F., Li, L. & Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced Materials* 24, 1504–1534 (2012).
31. Grün, M., Lauer, I. & Unger, K. K. The synthesis of micrometer- and submicrometer-size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41. *Advanced Materials* 9, 254–257 (1997).
32. Tao, C. & Zhu, Y. Magnetic mesoporous silica nanoparticles for potential delivery of chemotherapeutic drugs and hyperthermia. *Dalton Transactions* 43, 15482–15490 (2014).
33. Julián-López, B. *et al.* Mesoporous maghemite–organosilica microspheres: a promising route towards multifunctional platforms for smart diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry* 17, 1563–1569 (2007).
34. Martín-Saavedra, F. M. *et al.* Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomaterialia* 6, 4522–4531 (2010).
35. Yu, X. & Zhu, Y. Preparation of magnetic mesoporous silica nanoparticles as a multifunctional platform for potential drug delivery and hyperthermia. *Science and Technology of Advanced Materials* 17, 229–238 (2016).



Utilisation de l'effet ouzo pour l'encapsulation par nanoprécipitation

SOMMAIRE

| | | |
|---------------|---|------------|
| III.1. | PREAMBULE..... | 172 |
| III.2. | ENCAPSULATION DE COMPOSES HYDROPHOBES PAR NANOPRECIPITATION | 174 |
| III.2.1. | UTILISATION DU PROCEDE DE FABRICATION DES HYBRIDOSOMES POUR L'ENCAPSULATION | 174 |
| III.2.2. | FLUOROPHORE HYDROPHOBE CHOISI POUR L'ETUDE | 174 |
| III.2.3. | ÉTUDE DE LA NANOPRECIPITATION DU BODIPY | 176 |
| III.2.4. | ENCAPSULATION DANS LES HYBRIDOSOMES | 178 |
| III.2.4.1. | <i>Hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA</i> | 178 |
| III.2.4.1.1. | Présentation des hybridosomes | 178 |
| III.2.4.1.2. | Étude des capacités d'encapsulation..... | 180 |
| III.2.4.2. | <i>Hybridosomes SPION/BODIPY@PAA</i> | 184 |
| III.2.4.3. | <i>Influence de la quantité de NP</i> | 186 |
| III.3. | RELARGAGE DU CONTENU ENCAPSULE..... | 188 |
| III.3.1. | RELARGAGE DANS LES LIPOSOMES..... | 190 |
| III.3.2. | RELARGAGE DANS LES CELLULES..... | 194 |
| III.3.2.1. | <i>Relargage du BODIPY encapsulé</i> | 194 |
| III.3.2.2. | <i>Localisation de la coque des hybridosomes</i> | 195 |
| III.3.2.3. | <i>Résumé</i> | 198 |
| III.3.3. | RELARGAGE <i>IN VIVO</i> DANS LES SOURIS | 198 |
| III.4. | PERSPECTIVES D'ENCAPSULATION D'AUTRES MOLECULES | 203 |
| III.4.1. | MOLECULES ENVISAGEES | 203 |
| III.4.2. | AMPHOTERICINE B ET VORICONAZOLE..... | 205 |
| III.4.3. | TEMOZOLOMIDE | 208 |
| III.4.4. | PACLITAXEL | 209 |
| III.5. | CONCLUSION | 210 |
| III.6. | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 212 |
| III.7. | ARTICLE PUBLIE DANS <i>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE</i> | 214 |

III.1. Préambule

L'encapsulation est une problématique majeure pour la délivrance de composés toxiques, instables ou peu solubles en nanomédecine, mais aussi pour le domaine cosmétique et pour l'agroindustrie.¹⁻⁶ Il existe de nombreux systèmes d'encapsulation, parmi lesquels les particules polymères, les micelles, les liposomes et polymersomes, les NP de silice, les nanogels et les nanoparticules lipidiques solides, entre autres.⁷⁻¹⁴ Le choix de la technologie d'encapsulation est dirigé à la fois par l'application et par les propriétés du contenu encapsulé, notamment sa nature hydrophile ou hydrophobe.

Les composés hydrophobes sont pour la plupart encapsulés dans des particules polymères, dans le cœur de nanoparticules lipidiques solides ou de micelles polymères. Les composés hydrophiles sont quant à eux plutôt formulés dans des nanogels et des liposomes. La majorité des études s'est focalisée jusqu'alors sur la pharmacocinétique et l'efficacité thérapeutique des médicaments encapsulés. Toutefois, encapsuler de grandes quantités avec un rendement élevé reste aujourd'hui un défi et une belle perspective pour l'encapsulation, par exemple afin de réduire les pertes en principe actif ou pour diminuer la proportion d'excipient.

Les liposomes sont particulièrement utilisés pour l'encapsulation de composés hydrophiles. L'approche la plus simple pour encapsuler est l'encapsulation *passive* : les liposomes sont formés à partir de la réhydratation d'un film lipidique dans un tampon contenant la molécule hydrophile à encapsuler. Ainsi, les concentrations internes et externes sont similaires et limitées par la solubilité de la molécule dans le tampon. Bien qu'elle soit facile et pratique, cette méthode de fabrication mène à de faibles efficacités d'encapsulation et à beaucoup de principe actif non encapsulé (qui a besoin d'être éliminé). L'encapsulation d'un principe actif hydrophobe est possible, mais c'est assez marginal. Elle se fait par incorporation de la molécule hydrophobe avec les lipides avant séchage du film lipidique, puis réhydratation de film. Dans ce cas, il n'y a pas de pertes. L'encapsulation *active* permet quant à elle d'encapsuler en grande quantité. L'exemple emblématique en est le Doxil®, la première formulation liposomale approuvée par la FDA en 1995, qui contient un sel de doxorubicine nanoprécipité. Le chargement en doxorubicine dans le liposome pré-formé est réalisé *via* un gradient de pH transmembranaire. La précipitation dans le liposome produit un effet de puits à l'intérieur du liposome permettant d'attirer encore plus de doxorubicine.^{15,16} Le sel de doxorubicine nanoprécipité est très peu soluble et permet donc de limiter le relargage hors du liposome. L'aspect nanoprécipité est un paramètre très important

concernant les caractéristiques de relargage. Cette encapsulation active a été appliquée à d'autres composés tels que la ciprofloxacine, la vincristine, le topotécan et l'irinotécan en utilisant des gradients variés.¹⁶ Mais il est important de garder à l'esprit que cette méthode est compliquée à mettre en œuvre et qu'elle ne s'applique qu'aux composés à la fois amphiphiles et acides (ou basiques).

Une méthode est particulièrement intéressante pour l'encapsulation des composés hydrophobes : la co-précipitation de polymère et de principe actif. C'est une stratégie directe pour encapsuler ces molécules dans des nanoparticules polymères.¹⁷ Dans la pratique, le polymère et le soluté hydrophobe sont dissous dans un solvant organique miscible à l'eau, typiquement l'acétone, l'éthanol ou le THF. Cette solution est ensuite rapidement diluée avec une grande quantité d'eau pour nanoprécipiter. Dans les bonnes conditions, ce procédé peut générer des particules polymères chargées en composé hydrophobe, et de diamètre entre 50 et 300 nm, avec une très faible dispersion.^{9,18} Toutefois, le principal inconvénient est la quantité importante d'excipient par rapport au principe actif.

Une méthode basée sur l'effet ouzo est donc très séduisante car elle permet de cumuler la rapidité et la simplicité d'une méthode par nanoprécipitation avec l'obtention de particules de composé hydrophobe « pur ». La forme nanoprécipitée de la molécule permet de modifier ses propriétés, par exemple de fluorescence ou de biodistribution. Cela peut être un atout suivant l'application visée. Nous allons dans ce chapitre étudier les performances d'encapsulation d'un fluorophore hydrophobe (BODIPY) dans les hybridosomes. Après présentation et étude de la nanoprécipitation de cette molécule, nous discuterons des rendements d'encapsulation et des concentrations internes dans les hybridosomes. Dans un second temps, nous aborderons les propriétés de relargage du contenu encapsulé, à la fois dans un modèle *in vitro* mais aussi *in vivo*. Nous aborderons pour finir les perspectives en termes de molécules à encapsuler pour différentes applications biomédicales.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Controlled Release*. Cette publication est jointe en fin de chapitre.

III.2. Encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciptation

III.2.1. Utilisation du procédé de fabrication des hybridosomes pour l'encapsulation

La stratégie d'encapsulation est simple et ne représente aucune étape supplémentaire. La seule modification apportée au procédé d'élaboration des hybridosomes est l'ajout de la molécule à encapsuler dans la phase organique au départ (**Figure 3. 1**). Le seul prérequis est que **la molécule à encapsuler doit être hydrophobe**. Ainsi, à l'issue du procédé, la molécule hydrophobe se retrouve piégée dans l'hybridosome. Nous utiliserons toujours dans ce chapitre le THF commercial contenant du BHT tel que présenté dans le chapitre précédent.

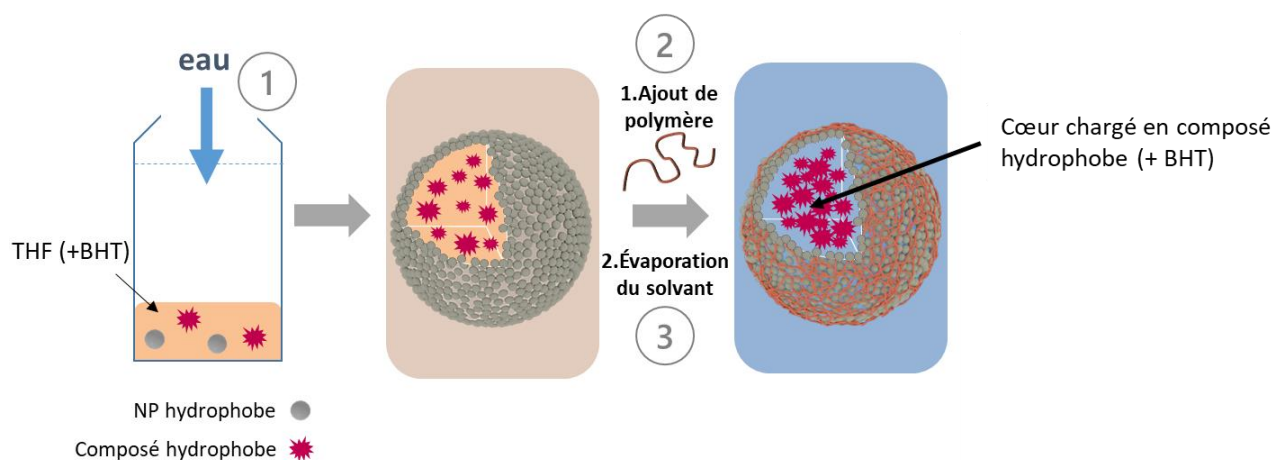


Figure 3. 1 – Représentation schématique du procédé d'encapsulation d'un composé hydrophobe dans les hybridosomes.

Dans notre système, le BHT, les NP ainsi que le composé à encapsuler sont hydrophobes et en solution dans le THF au départ. Lors de l'ajout d'eau, le composé le moins soluble dans l'eau devrait précipiter en premier. Le composé que l'on veut encapsuler pourrait donc certainement modifier l'effet ouzo induit par le BHT. L'ajout d'eau est très rapide, instantané, ce qui permet peut-être de limiter les effets de différence de solubilité, les deux composés se trouvant simultanément dans leur zone de précipitation. Il est donc important d'étudier la molécule hydrophobe à encapsuler ainsi que les hybridosomes produits en sa présence. Ces aspects sont présentés dans les paragraphes suivants.

III.2.2. Fluorophore hydrophobe choisi pour l'étude

Pour étudier les performances d'encapsulation de notre système, nous avons utilisé un fluorophore hydrophobe. Cette molécule fait partie de la famille des bore-dipyrrométhènes, ou BODIPY. Par la suite, nous ferons toujours référence à cette molécule sous le nom de BODIPY.

Elle nous est fournie par O. Mongin (ISCR, Rennes).¹⁹ Il s'agit d'un intermédiaire de réaction qui n'est en général pas utilisé en tant que tel, le 4,4-Difluoro-8-(4-triméthylsilyléthynylphényl)-1,3,5,7-tetraméthyl-2,6-diéthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, dont la structure est présentée en **Figure 3. 2**.

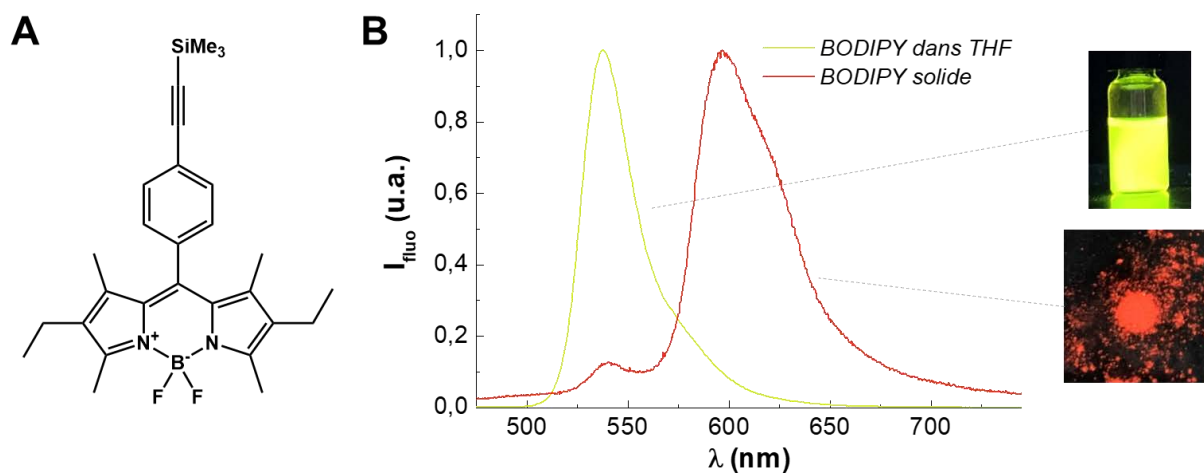


Figure 3. 2 – (A) Formule du BODIPY utilisé pour l'évaluation des propriétés d'encapsulation des hybridosomes. (B) Spectres de fluorescence normalisés du BODIPY dissous dans le THF ($\lambda_{exc} = 400$ nm) et sous la forme solide ($\lambda_{exc} = 365$ nm). Les photos à droite sont prises sous excitation UV à 380 nm.

Ce fluorophore est très intéressant pour nous car il conserve de la luminescence à l'état solide, comme nous pouvons le voir sur la **Figure 3. 2**. La fluorescence du BODIPY dans un bon solvant, tel que le THF, et celle du composé solide (en poudre) sont très différentes. Un décalage de la bande d'émission principale vers les plus grandes longueurs d'onde est observé. Le BODIPY permet donc de « sonder » son environnement. Nous pouvons ainsi utiliser le BODIPY et suivre son état au cours des différentes étapes du procédé, notamment dans les hybridosomes, où l'état du composé encapsulé peut jouer sur le relargage.

Par ailleurs, ce fluorophore est extrêmement hydrophobe, plus hydrophobe même que le BHT. En effet, des calculs avec le modèle COSMO-RS permettent de déterminer une solubilité dans l'eau du BODIPY inférieure à $0,1 \text{ nmol.L}^{-1}$, alors qu'elle est $\sim 3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le BHT. Dans le mélange « eau/THF » 75/25 vol. (pour la préparation des hybridosomes), ces solubilités sont de $1,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$, respectivement. Ainsi, la solubilité du BODIPY est 100 à 1000 fois plus faible que celle du BHT. Il serait donc possible que le BODIPY participe à la formation des gouttelettes ouzo, étant donné qu'il précipite avant le BHT lors de l'ajout d'eau. Encore une fois,

étant donné l'ajout instantané de toute l'eau, il est possible que les deux composés précipitent simultanément.

III.2.3. Étude de la nanoprécipitation du BODIPY

Nous avons dans un premier temps étudié la nanoprécipitation du fluorophore en l'absence de NP. Le BODIPY est solubilisé dans le THF, puis l'eau est ajoutée. Après évaporation et centrifugation, le BODIPY nanoprécipité peut être étudié. La **Figure 3. 3** présente la distribution de taille des objets suite à la nanoprécipitation ainsi que les spectres de fluorescence du BODIPY à différentes étapes du procédé. Les nano-objets issus de la nanoprécipitation du BODIPY sont monodisperses avec un diamètre hydrodynamique de 132 ± 4 nm (**Figure 3. 3 A**). En ce qui concerne la fluorescence, les deux spectres d'émission dans le THF et dans le système « eau/THF » (75/25 vol.) sont très similaires, avec une bande principale à 538 nm (**Figure 3. 3 B**). Cela suggère que le BODIPY est soluble dans les deux cas. Nous ne savons toutefois pas si à cette étape le BODIPY est présent dans la phase continue (mélange « eau/THF ») ou dans les gouttelettes ouzo. La dispersion de BODIPY nanoprécipité présente quant à elle deux bandes d'émission larges à 555 et 620 nm (courbe rouge sur la figure). Ce décalage vers le rouge de la bande principale (538 → 555 nm) et l'apparition d'une émission à plus faible énergie sont attribués à la forme nanoprécipitée du fluorophore.^{20,21} Ce spectre de la forme nanoprécipitée est la référence pour déterminer par la suite la forme sous laquelle le BODIPY est encapsulé dans les hybridosomes.

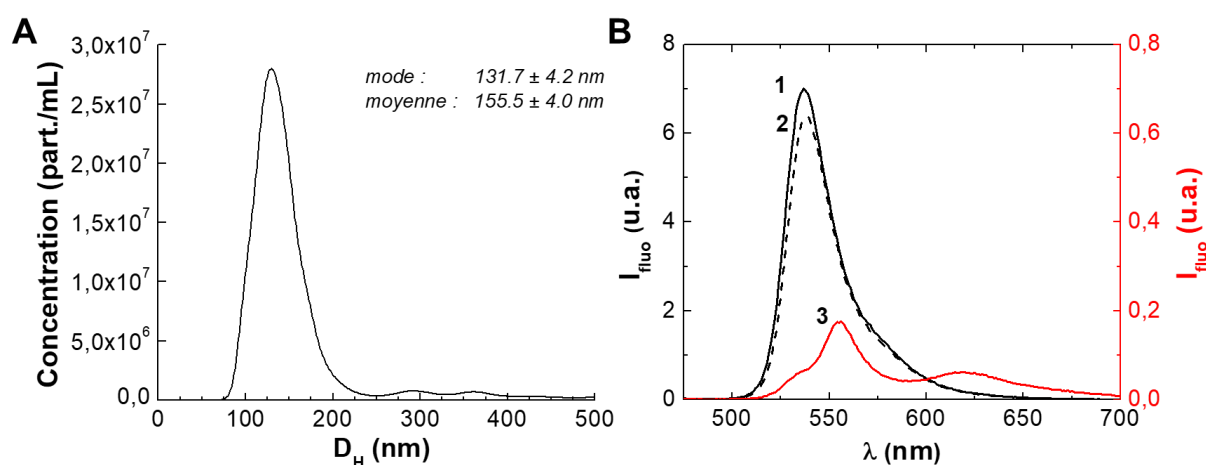


Figure 3. 3 – (A) Distribution de taille du BODIPY nanoprécipité dans l'eau. (B) Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm) du BODIPY dans différents environnements : BODIPY dissous dans le THF (1), dans le mélange « eau/THF » (75/25 vol.) (2) et BODIPY nanoprécipité dans l'eau (3).

L'efficacité de la nanopréciptation a par ailleurs été caractérisée. Pour cela, nous avons varié les concentrations de BODIPY dans le mélange entre 10 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Le THF est ensuite évaporé puis les échantillons sont centrifugés. La quantité de BODIPY est déterminée par spectrométrie UV-visible à 526 nm dans le culot et le surnageant (voir partie expérimentale). Le rendement de nanopréciptation par rapport à la quantité de BODIPY totale dans le système ainsi que la concentration résiduelle dans le surnageant peuvent ainsi être calculés (**Figure 3. 4 A**). De manière très intéressante, le rendement de nanopréciptation diminue lorsque la quantité totale de BODIPY diminue. **La concentration dans le surnageant est quant à elle toujours de l'ordre de 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.** Ainsi, la quasi-totalité du composé hydrophobe nanopréciptite lors de l'évaporation du THF, avec seulement 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ qui restent dans le surnageant. Nous avons calculé la solubilité dans le mélange « eau/THF » entre 0 et 100% d'eau grâce à COSMO-RS et nous retrouvons une valeur de solubilité dans le mélange 75/25 du même ordre de grandeur, en l'occurrence 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Figure 3. 4 B**). Ainsi, ces 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ correspondent au BODIPY solubilisé dans la phase continue avant évaporation. Ce graphique nous apporte également une information sur la solubilité du BODIPY dans l'eau pure, à savoir <0,1 nmol.L^{-1} . Cela confirme l'extrême hydrophobicité du BODIPY que nous utilisons.

Ce comportement (concentration dans le surnageant toujours identique) pourrait s'expliquer de la manière suivante. Dans le mélange « eau/THF » (75/25), le BODIPY reste sous forme liquide, comme l'indique son spectre d'émission de fluorescence (**Figure 3. 3 B**). Sa répartition entre la phase dispersée (gouttelettes) et la phase continue doit être régie par un coefficient de partage. La concentration dans la phase continue augmente donc avec la concentration totale (tant que le volume de phase dispersée reste constant). Pour rappel, les deux phases sont d'une part les gouttelettes ouzo et d'autre part la phase continue, dont la composition est très proche du mélange « eau/THF » 75/25 (la fraction de gouttes est négligeable par rapport à la fraction totale de THF). Lors de l'évaporation du THF, la solubilité du BODIPY diminue drastiquement dans la phase continue (cf. **Figure 3. 4 B**). Cela peut induire la formation de NP dans la phase continue, et/ou alimenter la phase dispersée en BODIPY. Dans tous les cas, lors de la nanopréciptation, la concentration résiduelle de BODIPY dans la phase continue se fixe alors à une valeur égale à limite de solubilité dans le mélange « eau/THF » (75/25), ce qui correspond au résultat observé (**Figure 3. 4 A**).

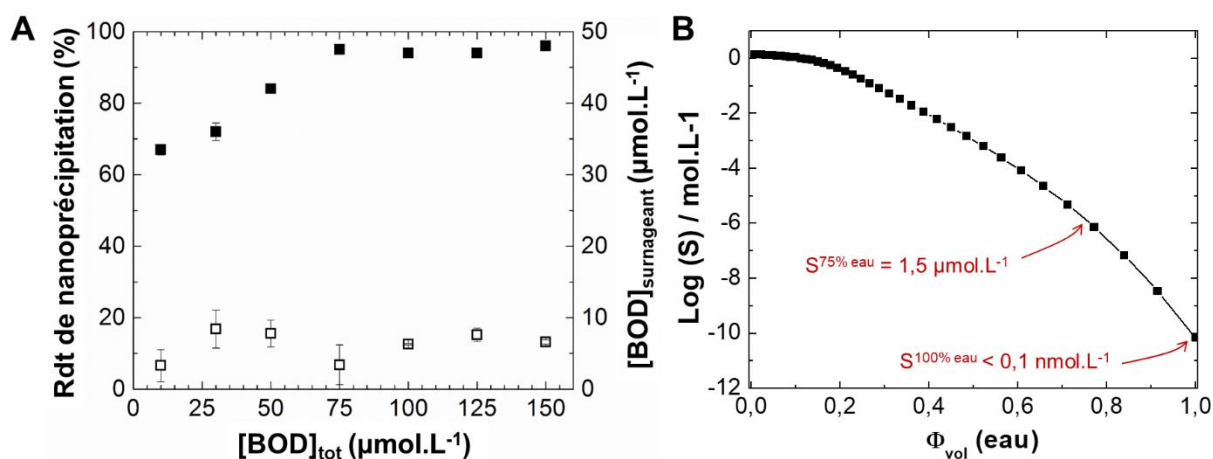


Figure 3. 4 – (A) Rendement de nanoprécipitation du BODIPY dans l'eau (■) et concentration résiduelle en BODIPY dans le surnageant après centrifugation (□). (B) Limite de solubilité du BODIPY dans le système « eau/THF » calculé par COSMO-RS. Les barres d'erreur correspondent à la déviation par rapport à la régression linéaire.

III.2.4. Encapsulation dans les hybridosomes

III.2.4.1. Hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA

III.2.4.1.1. Présentation des hybridosomes

Nous avons ensuite élaboré des hybridosomes chargés en BODIPY et comportant une coque de SPION. Les propriétés magnétiques des SPION sont mises à profit ici pour séparer par aimantation les hybridosomes et le BODIPY non-encapsulé (BODIPY nanodispersé). Les hybridosomes obtenus après purification présentent une dispersion peu polydisperse. Des exemples de la distribution des diamètres hydrodynamiques et d'imagerie TEM sont présentés en **Figure 3. 5. La présence du BODIPY dans les hybridosomes semble induire une légèrement augmentation de la taille.** La distribution de taille n'est globalement pas modifiée dans son allure générale mais elle est décalée de 10 nm vers les plus grandes tailles. Le BODIPY pourrait avoir tendance à faire grossir les hybridosomes en modifiant le système ouzo ou bien parce que les objets se rétractent moins lors de l'évaporation quand il y a du BODIPY dans le coeur. En tout cas, la présence de BODIPY n'empêche pas la bonne formation des hybridosomes, dont la présence est confirmée en TEM. Nous parlerons plus tard de l'influence de la concentration en BODIPY sur le nombre d'hybridosomes formés.

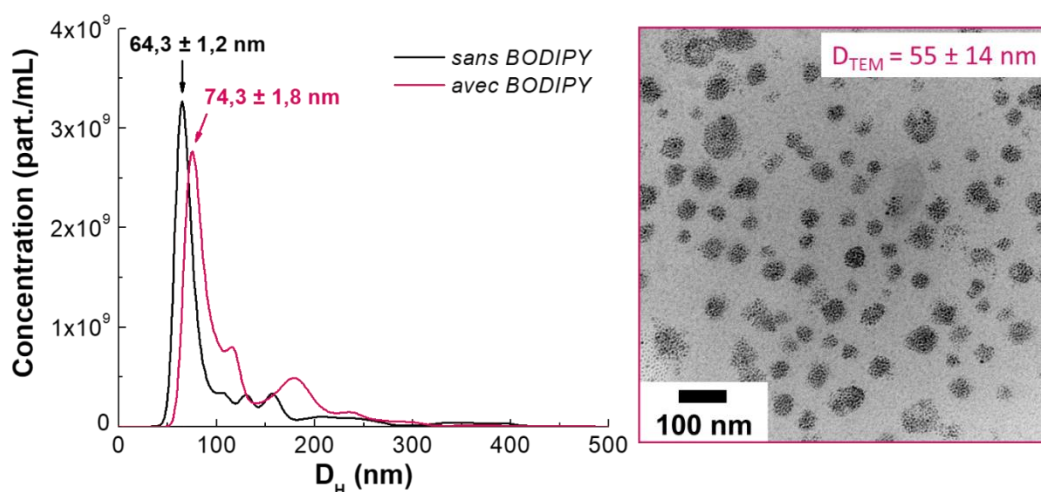


Figure 3. 5 – Distribution de taille d'hybridosomes SPION@PEG_{2k}-PAA_{7k} sans (courbe noire) ou avec (courbe rose) BODIPY. À droite, image TEM des hybridosomes avec BODIPY ([BODIPY] = 50 µmol.L⁻¹).

Nous avons par ailleurs suivi les propriétés de fluorescence des hybridosomes chargés en BODIPY. La **Figure 3. 6** présente l'absorbance ainsi que la fluorescence du BODIPY à différentes étapes du procédé de fabrication des hybridosomes. La figure de droite (fluorescence) est identique à la Figure 3. 3, avec en plus le spectre d'émission des hybridosomes chargés en BODIPY (afin de faciliter la comparaison avec les courbes précédemment présentées). Au niveau de l'absorbance (**Figure 3. 6 A**), il n'y a pas de différence majeure entre les différents environnements. On note toutefois un léger décalage de la longueur d'onde d'absorption maximale lors de la nanoprecipitation et de l'encapsulation dans les hybridosomes (de 526 nm à 530 nm (BODIPY nanoprecipité) et 535 nm (BODIPY dans les hybridosomes)). Par ailleurs, la remontée pour les petites longueurs d'onde est due à un effet de diffusion de la lumière par les hybridosomes. Le BODIPY encapsulé dans les hybridosomes présente une fluorescence très similaire à celle du BODIPY nanoprecipité dans l'eau (courbe 3 vs courbe 4) (**Figure 3. 6 B**). **Cela suggère que le BODIPY est encapsulé dans les hybridosomes sous forme nanoprecipitée.** Toutefois, le pic d'émission à 555 nm est plus prédominant comparé au BODIPY nanoprecipité dans l'eau. Cela pourrait s'expliquer par une fraction de BODIPY piégé et solubilisé dans les groupements PEG du PEG-PAA. On note par ailleurs que le BODIPY nanoprecipité (que ce soit directement dans l'eau ou dans les hybridosomes) présente une intensité d'émission de l'ordre de 10% de celle dans le THF sous forme soluble. Cette intensité plus faible est toutefois suffisante pour les utilisations en microscopie confocale, comme nous le verrons plus tard.

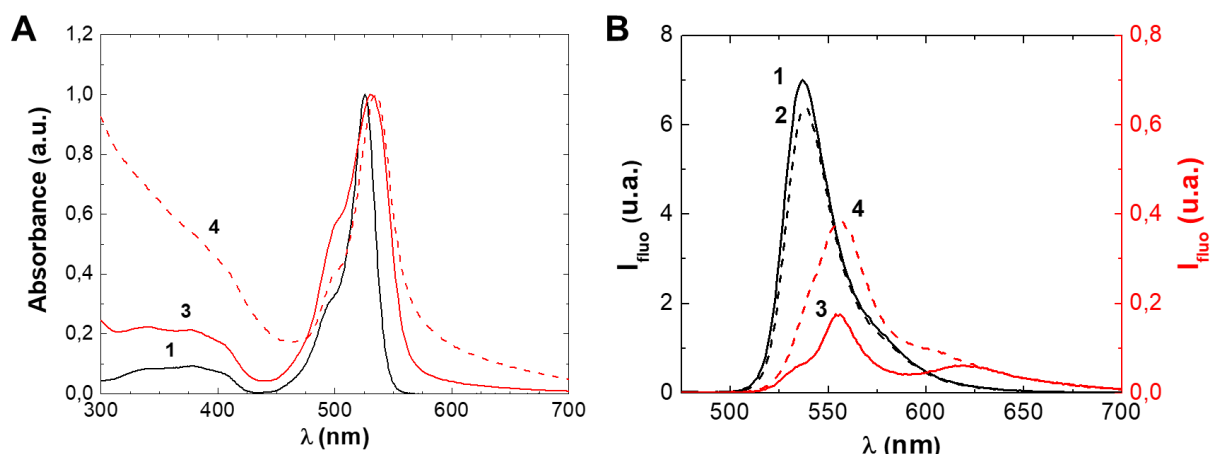


Figure 3. 6 – (A) Spectres d’absorbance et **(B)** d’émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 400$ nm) du BODIPY dans différents environnements : dans THF (1), dans eau/THF 75/25 vol. (2), BODIPY nanoprecipité dans l’eau (3) et BODIPY encapsulé dans des hybridosomes (4).

III.2.4.1.2. Étude des capacités d’encapsulation

Afin d’évaluer les capacités d’encapsulation du BODIPY dans les hybridosomes SPION@PEG-PAA, nous avons réalisé une série d’échantillons comportant entre 10 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BODIPY. Après purification, les hybridosomes obtenus sont caractérisés, en premier lieu d’un point de vue taille et concentration par NTA. Pour toutes les concentrations de BODIPY, les dispersions de tailles des hybridosomes sont toujours relativement monodisperses, avec un mode principal entre 50 et 100 nm (**Figure 3. 7 A**). Le diamètre hydrodynamique moyen semble toutefois augmenter légèrement avec la quantité de BODIPY, mais cet effet est faible. D’autre part, la concentration en hybridosomes est constante à environ 2.10^{11} hybridosomes/mL (**Figure 3. 7 C**). La fraction volumique représentée par les hybridosomes est par conséquent elle aussi relativement constante, entre 0,02 et 0,03 % (**Figure 3. 7 D**). Ainsi, **la taille et la concentration des hybridosomes sont plutôt constantes, peu importe la concentration en BODIPY totale dans le système** (entre 10 et 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Cela n’est pas étonnant étant donné que la fraction massique de BODIPY (entre $4,9.10^{-6}$ et $7,4.10^{-5}$) est plus faible ou égale à la fraction de BHT ($7,3.10^{-5}$).

Des essais sont d’ailleurs en cours pour étudier la possibilité de faire des hybridosomes sans BHT, c’est-à-dire uniquement avec le BODIPY pour jouer le rôle de l’huile. Il est probable que la taille et la concentration des hybridosomes soient alors dépendantes de la quantité de BODIPY.

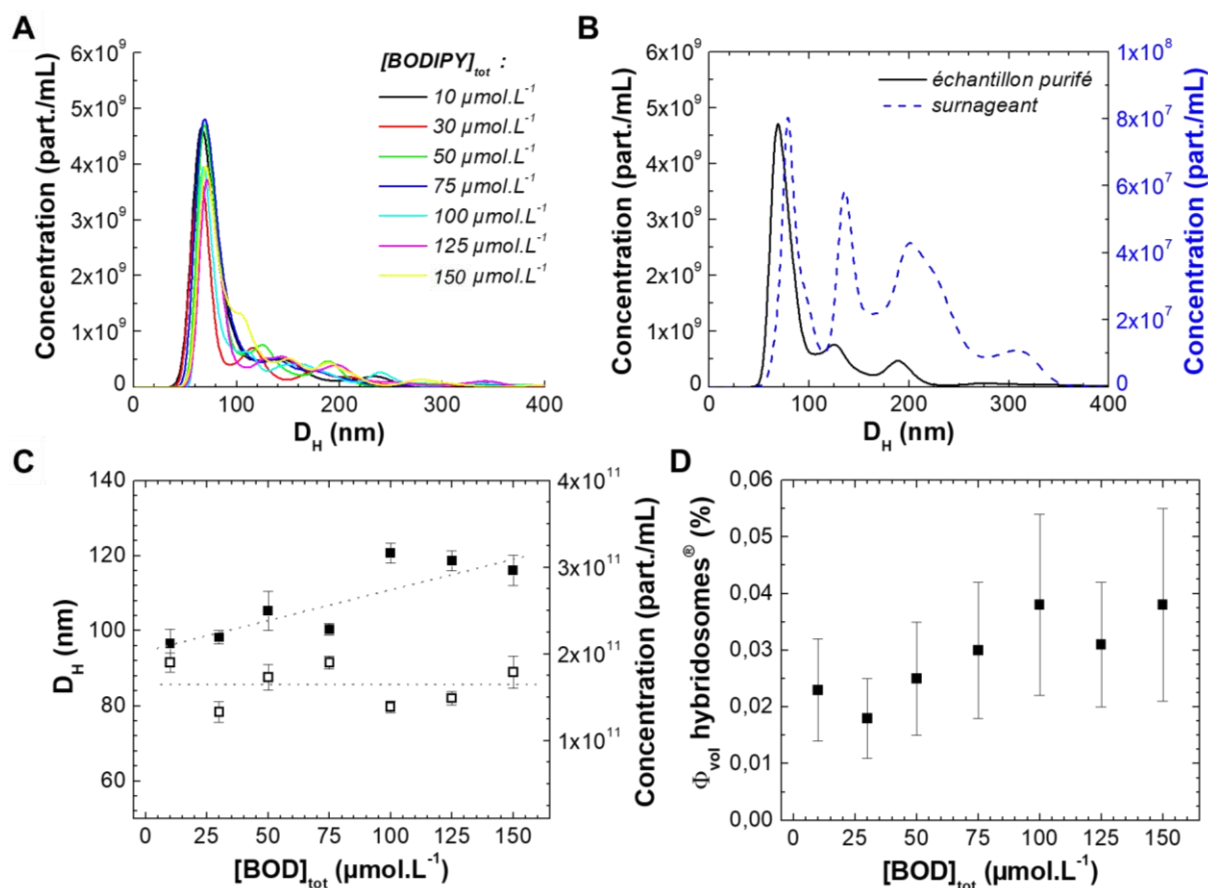


Figure 3. 7 – Caractérisation des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA. La concentration totale en BODIPY ajoutée dans le système au début de la préparation est entre 10 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. **(A)** Distribution de taille. **(B)** Comparaison des distributions de taille d'un échantillon purifié par aimantation et de son surnageant ($[BODIPY] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **(C)** Évolution de diamètre hydrodynamique moyen (■) et de la concentration en objets (□) en fonction de la concentration totale en BODIPY dans le système. **(D)** Évolution de la fraction volumique représentée par les hybridosomes.

Nous pouvons par ailleurs également évaluer l'efficacité d'encapsulation dans les hybridosomes. Le rendement d'encapsulation est calculé par spectrométrie UV-visible des échantillons purifiés à 535 nm. Sachant que nous avons par ailleurs déterminé la fraction volumique d'hybridosomes grâce au NTA, nous pouvons estimer une concentration en BODIPY interne dans les hybridosomes. Ces résultats sont présentés en **Figure 3. 8**. **Les taux d'encapsulation sont très élevés et semblent indépendant de la quantité initiale de BODIPY (~88%)**. Les pertes et la variabilité sont en partie attribuables aux 2 étapes d'aimantation pour la purification. On retrouve d'ailleurs dans le surnageant des objets plus gros (cf. **Figure 3. 7 B**), ce qui est plutôt en faveur de la présence dans le surnageant de BODIPY nanoprecipité. De manière très intéressante, la concentration interne dans les hybridosomes est très élevée, **entre 0,04 et 0,35 mol.L⁻¹ (entre ~ 20 et 170 g.L⁻¹)** pour les échantillons testés. Nous pouvons imaginer

atteindre des concentrations encore plus élevées, en incorporant plus de BODIPY au départ. Ces concentrations correspondent à ~ 20000 à 450000 molécules de BODIPY/hybridosome.

| A [BOD] _{tot} (μmol.L ⁻¹) | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 |
|---|---|---|---|--|--|--|---|
| Rendement d'encapsulation | 91 % | 85 % | 92 % | 94 % | 81 % | 86 % | 90 % |
| [BOD]_{encaps} (μmol.L⁻¹) | 9 | 25 | 46 | 71 | 81 | 108 | 135 |
| (mg.L⁻¹) | 4 | 12 | 22 | 34 | 38 | 51 | 64 |
| Nombre d'Hybrid./mL^(a) | 1,9.10¹¹ ±1,1.10¹⁰ | 1,3.10¹¹ ±1,2.10¹⁰ | 1,7.10¹¹ ±1,5.10¹⁰ | 1,9.10¹¹ ±7,7.10⁹ | 1,4.10¹¹ ±7,1.10⁹ | 1,5.10¹¹ ±8,1.10⁹ | 1,8.10¹¹ ±1,8.10¹⁰ |
| Fraction volumique interne (%)^(a) | 0,023 | 0,018 | 0,025 | 0,030 | 0,038 | 0,031 | 0,038 |
| [BOD]_{interne} (mol.L⁻¹) | 0,04 | 0,14 | 0,18 | 0,24 | 0,21 | 0,35 | 0,35 |
| (g.L⁻¹) | 19 | 67 | 87 | 112 | 101 | 165 | 169 |
| Nombre de molécules/Hybrid. | 2,3.10⁴ | 1,2.10⁵ | 1,6.10⁵ | 2,2.10⁵ | 3,5.10⁵ | 4,4.10⁵ | 4,5.10⁵ |

[BOD]_{tot} : Concentration totale de BODIPY incorporée au départ

[BOD]_{encaps} : Concentration de BODIPY encapsulé dans la dispersion d'hybridosomes dans l'eau

[BOD]_{interne} : Concentration de BODIPY dans le volume interne des hybridosomes

Hybrid. = hybridosome

^(a) Déterminé par NTA

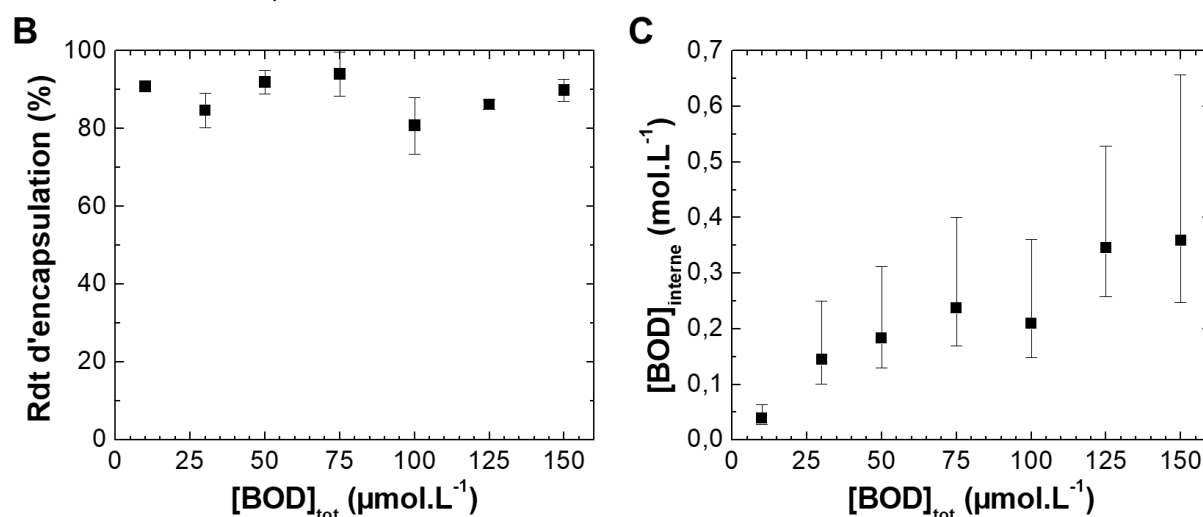


Figure 3. 8 – Étude de l'encapsulation de BODIPY dans les hybridosomes SPION@PEG-PAA. **(A)** Tableau récapitulatif des résultats. **(B)** Rendement d'encapsulation et **(C)** concentration interne en BODIPY dans les hybridosomes en fonction de la concentration totale en BODIPY. Les barres d'erreur des rendements d'encapsulation correspondent à la déviation par rapport à la régression linéaire. L'incertitude sur les concentrations internes est calculée à partir de l'incertitude sur les fractions volumiques d'hybridosomes, déterminée à partir des mesures de D_H par NTA (3 enregistrements de 60s).

Deux points concernant les résultats précédents méritent d'être discutés plus longuement. En premier lieu, on note que le taux d'encapsulation est toujours le même, peu importe la quantité de BODIPY initiale. Contrairement au rendement de nanopréciptation, où tout le BODIPY nanoprécipté était récupéré par centrifugation puis dosé, nous ne mesurons ici que ce qui a nanoprécipté à l'extérieur des hybridosomes composés de SPION (étant donné la purification par aimantation). Ainsi, le rendement d'encapsulation est déterminé par l'équilibre liquide-liquide avant évaporation. Il est possible de montrer qu'un équilibre liquide-liquide mène à un rendement d'encapsulation constant. En effet, le coefficient de partition K est défini de la manière suivante :

$$(1) \quad K = \frac{[BODIPY]_{int}}{[BODIPY]_{ext}}$$

Où $[BODIPY]_{int}$ et $[BODIPY]_{ext}$ sont les concentrations en BODIPY dans la phase dispersée (intérieur des gouttes) et la phase continue (extérieur des gouttes), respectivement.

Le rendement d'encapsulation (RE) est défini par l'équation suivante :

$$(2) \quad RE = \frac{[BODIPY]_{int} \times V_{int}}{[BODIPY]_{int} \times V_{int} + [BODIPY]_{ext} \times V_{ext}}$$

Où V_{int} et V_{ext} sont les volumes de phase dispersée et de phase continue, respectivement.

La combinaison des équations (1) et (2) mène à la formule suivante :

$$(3) \quad RE = \frac{[BODIPY]_{int} \times V_{int}}{[BODIPY]_{int} \times V_{int} + \frac{1}{K} [BODIPY]_{int} \times V_{ext}} = \frac{V_{int}}{V_{int} + \frac{1}{K} V_{ext}}$$

Nous avons vu précédemment que la fraction de phase dispersée est relativement constante lorsque la concentration en BODIPY varie (cf. **Figure 3. 7 C**). **Ainsi, le rendement d'encapsulation est constant du fait de l'équilibre liquide-liquide avant évaporation, peu importe la quantité de BODIPY présente.** Cela montre en outre que la quantité de BODIPY dans la phase continue avant évaporation est très faible.

Par ailleurs, nous avons vu que le procédé de fabrication des hybridosomes permet d'encapsuler des composés hydrophobes à des concentrations très élevées à l'intérieur des hybridosomes. La concentration globale dans la dispersion est faible (entre 9 et 135 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) mais le composé hydrophobe n'est nanoprécipté que dans un très faible volume, dans les hybridosomes. Cela se traduit mathématiquement par une très forte concentration interne (cf.

Figure 3. 8). Les hybridosomes peuvent ainsi potentiellement délivrer des quantités très élevées de principe actif très localement, ce qui permet de limiter la dose globale administrée et donc les effets secondaires. Ces concentrations exceptionnelles sont possibles étant donné la forme nanoprécipitée du BODIPY. À titre de comparaison dans le Doxil[®], où le composé est également encapsulé sous forme nanoprécipitée, la concentration dans les liposomes n'atteint « que » 0.05 à 0.1 mol.L⁻¹.^{15,22-24} Par ailleurs, rappelons que la préparation du Doxil[®] est compliquée et ne s'applique qu'aux composés hydrophiles amphiphiles et acides (ou basiques), comme déjà vu. **Au contraire, notre procédé s'applique à tout composé très hydrophobe, il est simple à mettre en œuvre et l'encapsulation par nanoprécipitation a l'avantage d'être réalisée en même temps que l'élaboration des hybridosomes.**

III.2.4.2. Hybridosomes SPION/BODIPY@PAA

Nous avons par ailleurs effectué la même étude sur des hybridosomes stabilisés par un autre polymère, le PAA_{450k} (**Figure 3. 9**). Comme pour le PEG-PAA, des hybridosomes semblables en termes de distribution de taille sont obtenus, quelle que soit la quantité totale de BODIPY. Le diamètre hydrodynamique moyen semble augmenter un peu lors qu'il y a plus de BODIPY (entre 96 et 116 nm, pour une [BOD]_{tot} entre 10 et 150 μmol.L⁻¹). Malgré tout, la concentration en hybridosomes reste constante, tout comme la fraction volumique d'hybridosomes au vu de l'incertitude sur celle-ci.

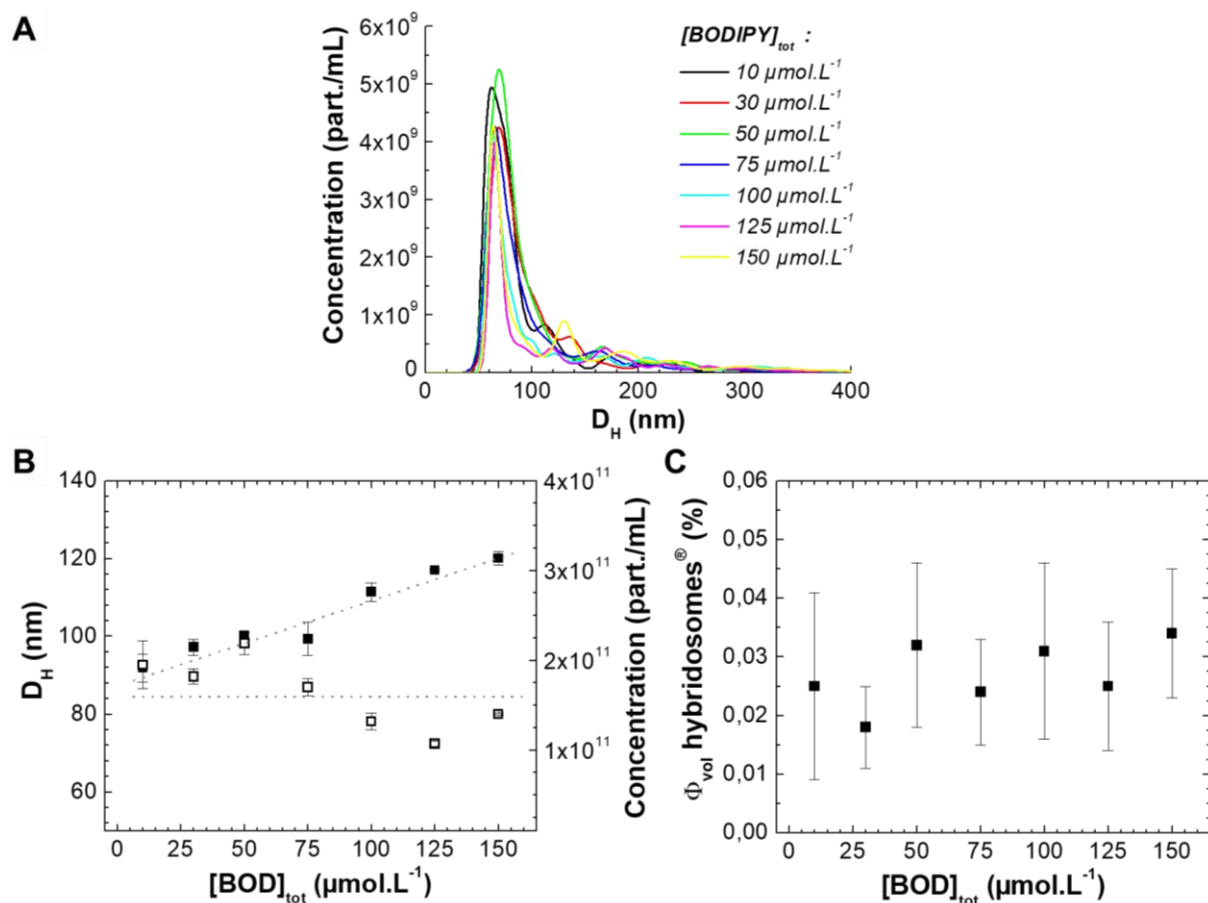


Figure 3. 9 – Caractérisation des hybridosomes SPION/BODIPY@PAA. La concentration totale en BODIPY ajoutée dans le système au début de la préparation est entre 10 et 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. **(A)** Distribution de taille. **(B)** Évolution de diamètre hydrodynamique moyen (■) et de la concentration en objets (□) en fonction de la concentration totale en BODIPY dans le système. **(C)** Évolution de la fraction volumique représentée par les hybridosomes.

Nous avons fait la même étude de rendement d'encapsulation sur ces hybridosomes (**Figure 3. 10**). Le comportement est semblable à celui observé avec le PEG-PAA, i.e. un rendement d'encapsulation constant sur toute la gamme de concentration de BODIPY étudiée. L'équilibre liquide-liquide avant évaporation est donc ici aussi ce qui guide l'encapsulation. La différence majeure entre les hybridosomes stabilisés par le PAA et le PEG-PAA est le rendement d'encapsulation. Alors qu'il était d'environ 88% dans le cas du PEG-PAA, **le rendement d'encapsulation moyen dans les hybridosomes SPION/BODIPY@PAA est de l'ordre de 70%**. Dans le cas des hybridosomes stabilisés par le PEG-PAA, notre hypothèse est que le BODIPY n'est pas complètement présent sous sa forme nanoprécipitée et qu'une partie est solubilisée dans les chaînes PEG du polymère. En tout état de cause, ce rendement d'encapsulation reste très élevé et correspond à des concentrations internes dans les hybridosomes comprises **entre 0,03 et 0,32 mol.L⁻¹ (entre ~15 et 153 g.L⁻¹)**, soit de **~24000 à 460000 molécules de BODIPY/hybridosome**.

| A [BOD] _{tot} (μmol.L ⁻¹) | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 |
|--|---|--|---|--|--|--|--|
| Rendement d'encapsulation | 78 % | 65 % | 71 % | 73 % | 67 % | 63 % | 72 % |
| [BOD] _{encaps} (μmol.L ⁻¹) (mg.L ⁻¹) | 8 4 | 19 9 | 36 17 | 55 26 | 67 32 | 78 37 | 108 51 |
| Nombre d'Hybrid./mL^(a) | 2,0.10 ¹¹ ±2,7.10 ¹⁰ | 1,8.10 ¹¹ ±8,6.10 ⁹ | 2,2.10 ¹¹ ±1,2.10 ¹⁰ | 1,7.10 ¹¹ ±9,4.10 ⁹ | 1,3.10 ¹¹ ±9,1.10 ⁹ | 1,1.10 ¹¹ ±3,1.10 ⁹ | 1,4.10 ¹¹ ±1,4.10 ⁹ |
| Fraction volumique interne (%)^(a) | 0,025 | 0,018 | 0,032 | 0,024 | 0,031 | 0,025 | 0,034 |
| [BOD] _{interne} (mol.L ⁻¹) (g.L ⁻¹) | 0,03 15 | 0,11 52 | 0,11 53 | 0,23 108 | 0,22 102 | 0,31 149 | 0,32 153 |
| Nombre de molécules/Hybrid. | 2,4.10 ⁴ | 6,4.10 ⁴ | 9,8.10 ⁴ | 1,9.10 ⁵ | 3,0.10 ⁵ | 4,4.10 ⁵ | 4,6.10 ⁵ |

[BOD]_{tot} : Concentration totale de BODIPY incorporé au départ

[BOD]_{encaps} : Concentration de BODIPY encapsulé dans la dispersion d'hybridosomes dans l'eau

[BOD]_{interne} : Concentration de BODIPY dans le volume interne des hybridosomes

Hybrid. = hybridosome®

^(a) Déterminé par NTA

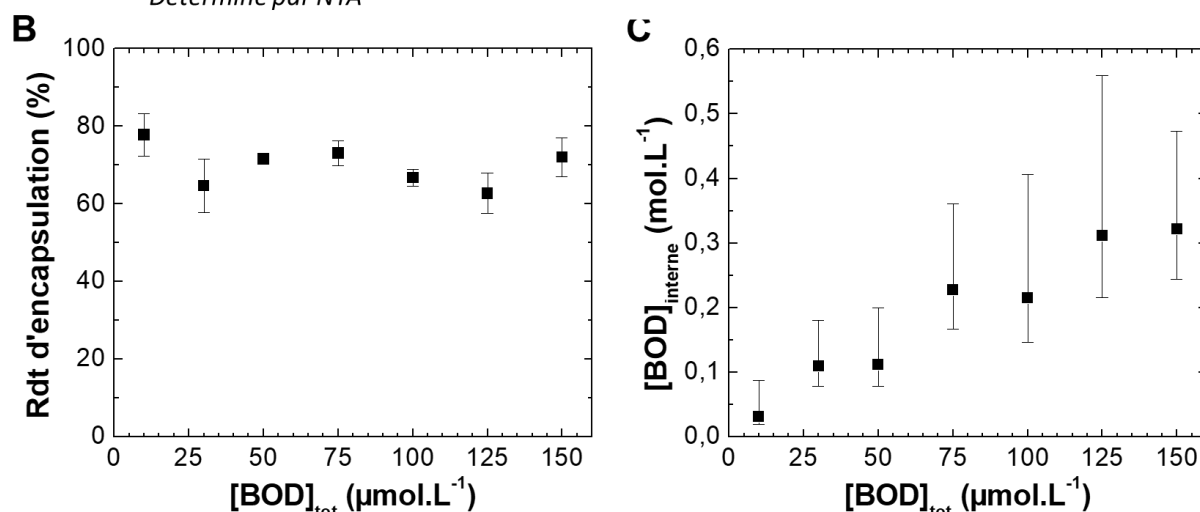


Figure 3. 10 – Étude de l'encapsulation de BODIPY dans les hybridosomes SPION@PAA. **(A)** Tableau récapitulatif des résultats. **(B)** Rendement d'encapsulation et **(C)** concentration interne en BODIPY dans les hybridosomes en fonction de la concentration totale en BODIPY. Les barres d'erreur des rendements d'encapsulation correspondent à la déviation par rapport à la régression linéaire. L'incertitude sur les concentrations internes est calculée à partir de l'incertitude sur les fractions volumiques d'hybridosomes, déterminée à partir des mesures de D_H par NTA (3 enregistrements de 60s).

III.2.4.3. Influence de la quantité de NP

Nous nous sommes aussi intéressés à la relation entre la quantité de NP et le taux d'encapsulation. Pour cela, nous avons préparé trois gammes d'hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA en variant les concentrations de BODIPY comme précédemment, et en modulant la quantité de SPION. La quantité de SPION des trois gammes est respectivement de 10, 28 ou 45 μg/mL de Fe₂O₃. Cela correspond à des concentrations de 5,3.10¹³, 1,5.10¹⁴ et

$2,4 \cdot 10^{14}$ NP/mL. Cette gamme correspond à des variations de concentrations autour de la concentration classiquement utilisée.

Nous avons tout d'abord comparé 3 échantillons avec la même quantité de BODIPY ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) mais avec des quantités de SPION différentes. On note en premier lieu que **l'augmentation de la quantité de SPION ne modifie pas la distribution en taille (Figure 3. 11 A)**. Cela se traduit par un diamètre hydrodynamique moyen plutôt constant pour les 3 échantillons. En revanche, **la concentration en hybridosomes augmente linéairement avec la concentration en SPION (Figure 3. 11 B)**. En prenant en compte cette augmentation de concentration, on voit que **la fraction volumique représentée par les hybridosomes augmente elle aussi en fonction de la concentration en SPION (Figure 3. 11 C)**. Nous avons déjà observé cet effet dans le chapitre précédent : **plus il y a de NP dans le système, plus il y a d'hybridosomes *in fine***. Cela peut venir de l'effet tensioactif des NP, qui permet d'augmenter la quantité totale d'interface. Cependant, comme les ligands des SPION sont assez labiles, on ne peut pas non plus exclure leur influence sur l'augmentation du nombre d'hybridosomes.

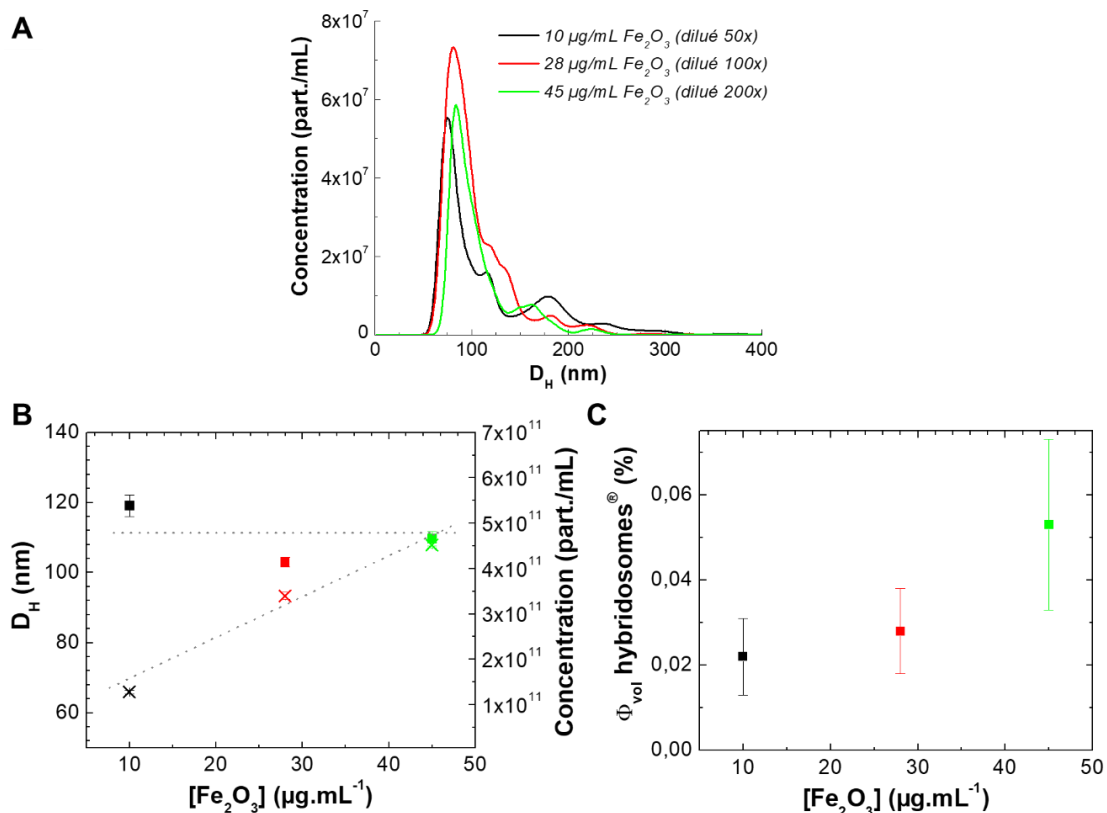


Figure 3. 11 – Caractérisation des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA pour différentes concentrations de SPION. **(A)** Distributions de taille. **(B)** Évolution des diamètres hydrodynamiques moyens (■) et de la concentration en objets (×) en fonction de la concentration totale en SPION dans le système. **(C)** Évolution de la fraction volumique représentée par les hybridosomes.

Le rendement d'encapsulation du BODIPY a été déterminé pour les trois gammes avec des quantités de SPION différentes (**Figure 3. 12**). **Le rendement d'encapsulation est constant, entre 80 et 90%, quelle que soit la concentration en SPION.** Nous pouvons imaginer que le BODIPY se localise au moins en partie dans les chaînes grasses des ligands présents à la surface des SPION. Quand la quantité de SPION augmente, le rendement est constant alors que le nombre d'hybridosomes® augmente : il doit donc y avoir moins de BODIPY par hybridosome. Il y a donc un compromis à trouver entre le nombre d'hybridosomes au total et la quantité de BODIPY pour chaque objet. Les différentes concentrations de SPION utilisées sont toutefois assez proches et il serait intéressant d'observer ce qu'il se passe avec une variation plus grande (au moins un facteur 10).

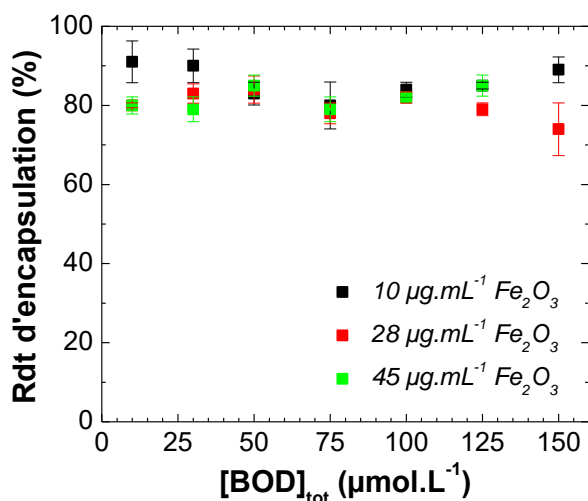


Figure 3. 12 – Efficacité d'encapsulation des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA en fonction de la quantité totale de BODIPY dans le système, pour différentes quantités de SPION.

III.3. Relargage du contenu encapsulé

Nous avons jusqu'à présent montré que les hybridosomes sont capables d'encapsuler des molécules hydrophobes sous forme nanoprécipitée avec d'excellents rendement d'encapsulation et avec des concentrations internes exceptionnelles. Dans le cas d'applications biomédicales, le contenu encapsulé est destiné à être relargué. Nous allons donc étudier ici les propriétés de relargage hors des hybridosomes.

Lors de travaux précédents, notre groupe a montré que la coque des hybridosomes est poreuse (taille des pores ~4 nm).²⁵ On peut donc s'attendre à ce que le contenu encapsulé soit relargué à travers ces pores. Toutefois, dans le cas de molécules très hydrophobes telles que le BODIPY (solubilité dans l'eau < 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹) il n'y pas de relargage dans l'eau pure. Il est en

revanche raisonnable de penser que le relargage dans un environnement hydrophobe est possible. Nous allons donc étudier dans cette partie le relargage du BODIPY hors des hybridosomes dans un milieu hydrophobe modèle : les liposomes. Par ailleurs, le comportement de l'hybridosome et de son contenu sera suivi en présence de cultures cellulaires. Finalement, nous regarderons le relargage suite à injection dans du matrigel® ou suite à une injection intraveineuse dans des souris.

Dans le cadre de ces études, plusieurs types d'hybridosomes sont utilisés. Dans tous les cas, ils sont stabilisés par du PEG_{2k}-PAA_{7k}. Ces différents objets sont les suivants :

- Hybridosomes SPION/BODIPY : ces objets sont chargés en BODIPY fluorescent (fluorescence orange quand nanoprecipité et verte en bon solvant). Ils servent à suivre le relargage du BODIPY.
- Hybridosomes QD/BODIPY : en plus du cœur fluorescent, ces objets ont une coque fluorescente grâce à l'utilisation de QD (QD de la société Cyodiagnosics de couleurs variées). Ces hybridosomes permettent aussi de suivre à la fois la fluorescence du cœur et de la paroi de l'hybridosome. N'étant pas couverts de SPION, ces objets sont purifiés par centrifugation.
- Hybridosomes QD : seule la paroi de l'hybridosome est fluorescente.

La **Figure 3. 13** ci-dessous schématise ces différents objets.

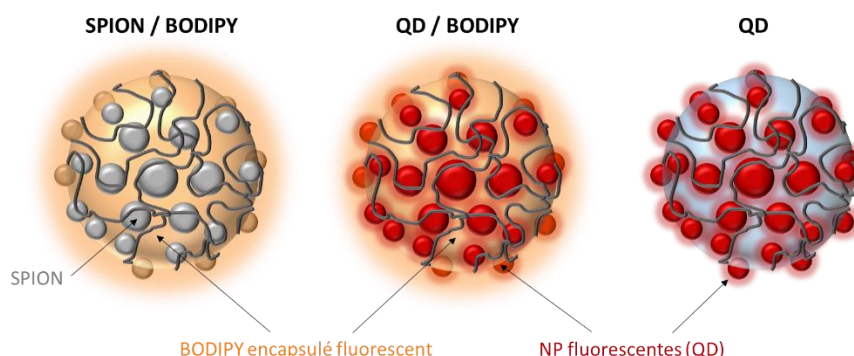


Figure 3. 13 – Représentation des différents hybridosomes PEG-PAA utilisés pour les études de relargage. Le schéma n'est pas à l'échelle, la dimension des NP est exagérée par rapport à celle de l'hybridosome.

III.3.1. Relargage dans les liposomes

Nous avons tout d'abord étudié le relargage du BODIPY dans un environnement hydrophobe modèle composé de liposomes. Leur composition massique est la suivante : 90% de PC d'œuf (PC : L- α -phosphatidylcholine) et 10% de PEG₂₀₀₀-DSPE (DSPE : 1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) ($Z_{av} = 72 \pm 0,8$ nm ; PDI = 0,235). Nous remercions F. Camerel et M. Ciancone (ISCR, Rennes) pour la préparation et la mise à disposition de ces liposomes. Lors de la mise en contact des hybridosomes chargés en BODIPY et des liposomes, on observe une augmentation importante de la fluorescence ainsi qu'un décalage du maximum d'émission vers les plus grandes énergies (**Figure 3. 14 A**). Cela est dû au transfert du BODIPY dans la membrane des liposomes, avec au final un spectre de fluorescence proche de celui du BODIPY dans le THF (cf. Figure 3. 3 B). Le schéma ci-dessous (**Figure 3. 14 B**) présente ce qu'il se passe lors de la mise en contact des dispersions d'hybridosomes chargés en BODIPY et de liposomes, avec les changements d'émission de fluorescence observés. Le BODIPY passe de la forme encapsulée nanoprécipitée (fluorescence orange) à la forme soluble dans la membrane lipidique (fluorescence verte intense).

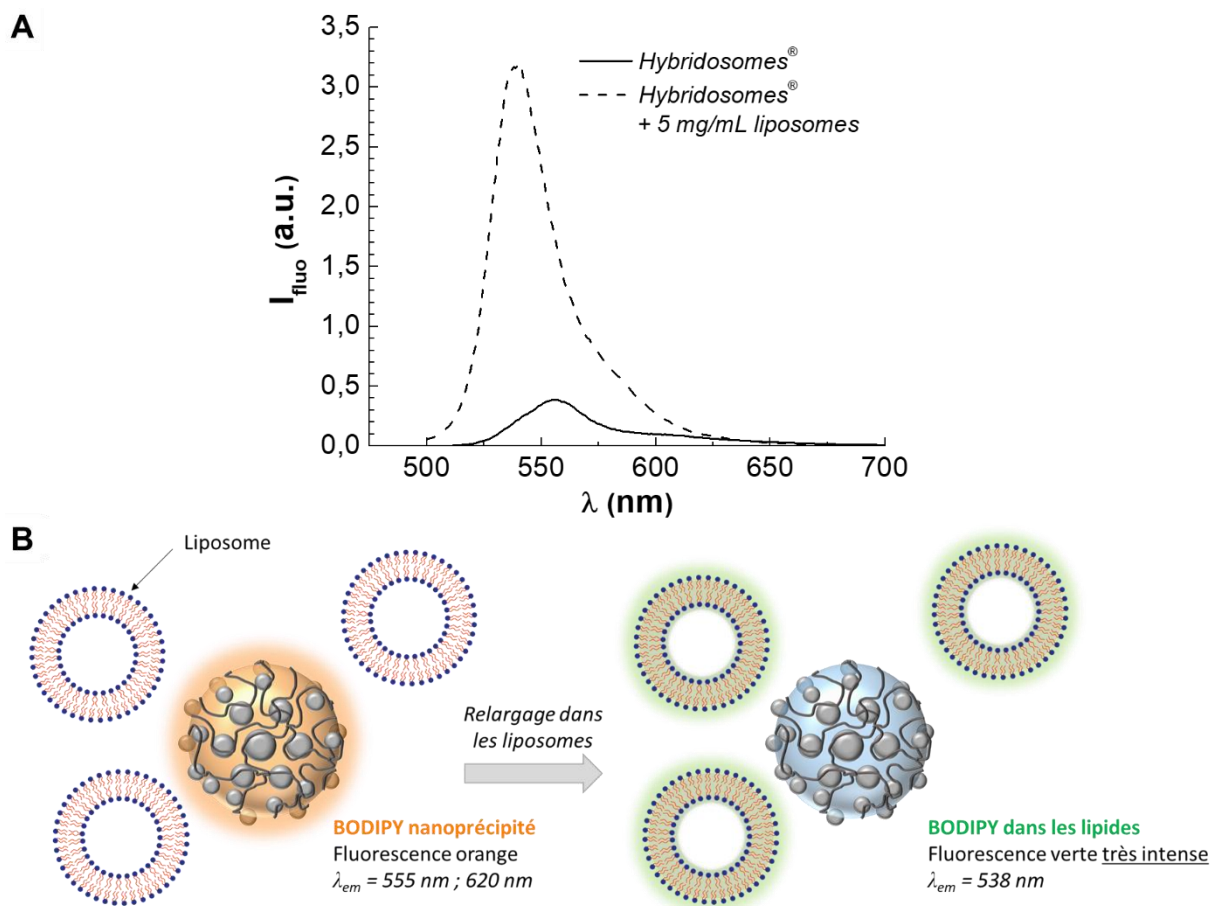


Figure 3. 14 – (A) Spectre d'émission fluorescence des hybridosomes chargés en BODIPY dans l'eau, en l'absence (trait plein) et en présence (tirets) de liposomes (5 mg lipides /mL). $\lambda_{exc} = 400$ nm. **(B)** Schéma du relargage du BODIPY depuis les hybridosomes vers les liposomes et changements de fluorescence associés.

Ainsi, nous avons suivi dans le temps la fluorescence verte à la suite de la mise en contact avec les liposomes (concentrations en lipides de 2, 5 et 8 mg.mL⁻¹). La concentration en hybridosomes est toujours la même. Nous avons également testé le relargage dans du sérum de veau foetal à la place des liposomes afin de mimer ce qu'il pourrait se passer *in vivo*. Finalement, le transfert du BODIPY nanodispersé dans l'eau, c'est-à-dire nanoprécipité en l'absence de NP, a été étudié dans les liposomes. La **Figure 3. 15** présente l'évolution de la fluorescence verte de tous ces échantillons à courte (1 jour) et longue (8 jours) échelle de temps. Première information importante, la quantité de BODIPY (fluorescence verte) transférée dans les liposomes augmente en fonction du temps. Par ailleurs, plus la concentration en lipides est importante, plus la quantité de fluorophore extraite l'est aussi. Cela indique que **le transfert du BODIPY depuis les hybridosomes vers les liposomes est dirigé par la solubilité du BODIPY dans la membrane**. On voit également sur la **Figure 3. 15 A** que la cinétique de solubilisation du BODIPY nanoprécipité (carrés rouges) est peu différente de celle du BODIPY encapsulé dans les

hybridosomes (carrés bleus). Ainsi, dans le cas présent le relargage n'est pas limité par le transport à travers la paroi des hybridosomes, ce qui confirme le caractère poreux des hybridosomes. Il est probable qu'un hybridosome avec plusieurs couches de polymère présente une cinétique de relargage plus lente. Nous n'avons toutefois pas encore testé cet aspect.

En revanche, dans le sérum de veau foetal, seule une petite fraction du BODIPY est solubilisée, pendant les premiers jours, probablement dans les protéines de transport. La concentration en protéines dans le sérum est de 30 à 45 mg.mL⁻¹ (données techniques fabricant), principalement de l'albumine de sérum bovin (ou BSA). Il est démontré que la sérum albumine présente des domaines hydrophobes.^{26,27} La quantité de domaines hydrophobes offerts dans notre expérience ne semble toutefois pas suffisante pour extraire une grande quantité de BODIPY. Dans le cadre d'une application *in vivo*, il est probable que la quantité de BODIPY extraite soit bien plus importante étant donné la circulation et le renouvellement du sérum.

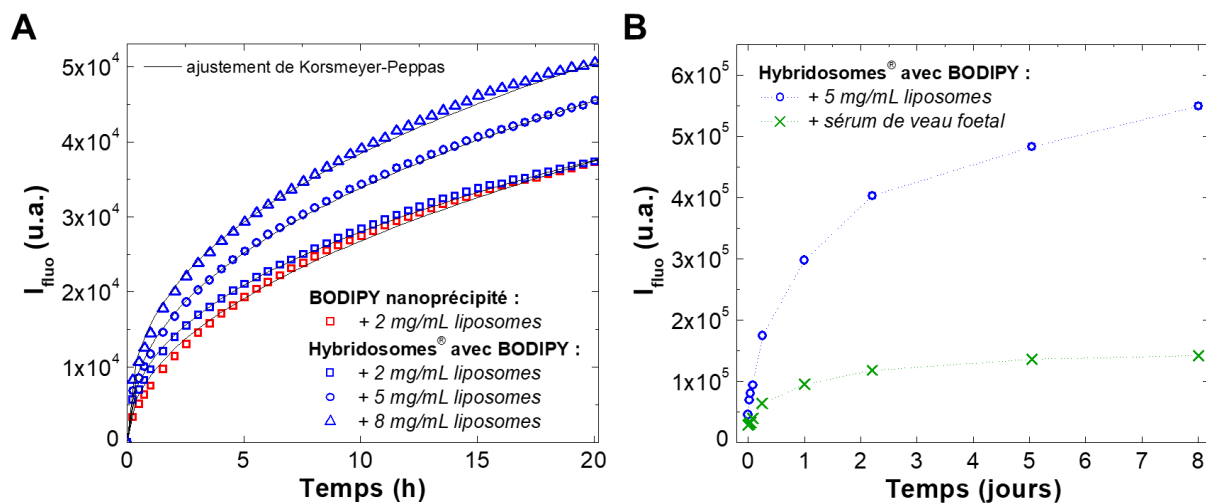


Figure 3.15 – Relargage du BODIPY en fonction du temps. **(A)** Transfert des hybridosomes chargés en BODIPY vers les liposomes (lipides : 2 (□), 5 (○), 8 (△) mg.mL⁻¹) et transfert du BODIPY nanoprécipité vers les liposomes (lipides : 2 mg.mL⁻¹) (□) ; lignes noires : ajustement par l'équation empirique $f = k.t^n$. $\lambda_{exc} = 485 \pm 6$ nm ; $\lambda_{em} = 520 \pm 5$ nm **(B)** Transfert à grande échelle de temps du BODIPY encapsulé dans des hybridosomes vers les liposomes (○, lipid: 5 mg.mL⁻¹) et le sérum de veau foetal (×). $\lambda_{exc} = 480$ nm ; $\lambda_{em} = 537$ nm.

Les mesures cinétiques peuvent être ajustées de manière satisfaisante avec le modèle semi-empirique de Korsmeyer-Peppas ($f = k.t^n$).²⁸⁻³⁰ Ce modèle est classiquement utilisé pour décrire le relargage d'une matrice polymérique, par exemple un hydrogel.²⁸ Il est défini de la manière suivante :

$$M_i = M_{tot} \times K \times t^n$$

Où M_i est la quantité relarguée au cours d'un temps t_i , M_{tot} est la quantité totale de BODIPY, K est la constante prenant en compte les caractéristiques géométriques du système, n l'exposant de relargage et t le temps (h). Ce modèle est appliqué à nos données expérimentales avec la fonction suivante :

$$\text{Intensité de fluorescence} = k \times t^n$$

Le **Tableau 3. 1** résume les constantes obtenues suite à l'ajustement des courbes cinétiques expérimentales. Suivant la valeur de n , plusieurs mécanismes de relargage sont impliqués. Dans le cas d'une sphère : diffusion de Fick ($n = 0,43$), transport anormal non-Fickien ($0,43 < n < 1$) et relargage d'ordre zéro ($n = 1$). Dans notre cas, les valeurs d'ajustement des cinétiques avec le modèle de Korsmeyer-Peppas donnent des valeurs de n proches de 0,43. Ces résultats suggèrent fortement que **l'étape limitante du relargage dans les liposomes est un procédé diffusif**. Certaines valeurs sont inférieures à 0,43 mais cela signifie quand même que le mécanisme est dirigé par la diffusion dans le cas d'une sphère.³¹

Tableau 3. 1 – Paramètres déterminés à partir de l'ajustement des cinétiques expérimentales avec le modèle de Korsmeyer-Peppas.

| | [liposomes] (mg.mL ⁻¹) | k | n | R ² |
|---|------------------------------------|-------------|----------------------|----------------|
| Bodipy nanoprécipité | 2 | 8815 ± 164 | 0,483 ± 0,007 | 0,99558 |
| BODIPY nanoprécipité dans les hybridosomes | 2 | 10582 ± 112 | 0,423 ± 0,004 | 0,998 |
| | 5 | 12692 ± 110 | 0,426 ± 0,003 | 0,99868 |
| | 8 | 15632 ± 234 | 0,391 ± 0,006 | 0,99526 |

Un plateau est atteint pour chaque quantité de liposomes, d'autant plus important que la quantité de lipides est grande. Mais ce plateau suggère qu'un ajout supplémentaire de liposomes pourrait mener à encore plus de relargage. Il semble donc y avoir un réservoir de BODIPY important dans les hybridosomes, ce qui est cohérent avec la capacité d'encapsulation très importante. Nous n'avons pas réussi à quantifier la proportion de BODIPY relargué mais c'est une piste qu'il faudra adresser ultérieurement.

III.3.2. Relargage dans les cellules

Dans un second temps, nous avons regardé le comportement des hybridosomes chargés en BODIPY en présence de cultures cellulaires. Nous cherchons à la fois à connaître le devenir du BODIPY et de la coque des nano-objets.

III.3.2.1. Relargage du BODIPY encapsulé

Pour l'étude du relargage, nous avons notamment utilisé la lignée cellulaire GL261. Il s'agit d'un modèle de gliome murin fréquemment utilisé.³² Cette lignée cellulaire est d'importance puisqu'elle constitue le cœur du travail effectué sur le glioblastome qui sera présenté dans le chapitre IV. Il est donc intéressant de voir comment les hybridosomes se comportent avec ces cellules. Les cellules GL261 sont incubées avec des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA pendant 2h, en l'absence de marquage spécifique. Les cellules sont ensuite imagées par microscopie confocale (**Figure 3. 16**). Nous suivons donc ici la fluorescence du BODIPY uniquement.

Des spots verts intenses sont clairement visibles à l'intérieur des cellules. Nous attribuons ces spots à du BODIPY internalisé, probablement dans des espaces confinés tels que des lysosomes. En plus de ces spots intenses, tout le cytoplasme des cellules est fluorescent dans le vert de manière diffuse. Aucun spot n'est observé dans le noyau. Par ailleurs, une fluorescence orange est visible, co-localisée avec la fluorescence verte. Cela confirme la signature spectrale du BODIPY, avec les deux émissions caractéristiques. Toutefois, certains points fluorescents orange à l'extérieur des cellules semblent montrer peu de fluorescence verte. Il pourrait s'agir de BODIPY très agrégé, par exemple dans le milieu de culture (le BODIPY solide présentant une fluorescence dans le rouge). En tout cas, ces résultats montrent qu'**après 2 h d'incubation le fluorophore est majoritairement internalisé par les cellules et relargué dans le cytoplasme**. Il est aussi intéressant de noter que le fluorochrome semble absent des noyaux. En complément, nous avons également observé l'internalisation du BODIPY dans d'autres lignées, à savoir Nalm 6 (lymphocytes malins exprimant CD19), U87 (cellules cancéreuses de glioblastome humain) et HEK (cellules embryonnaires de rein humaines).

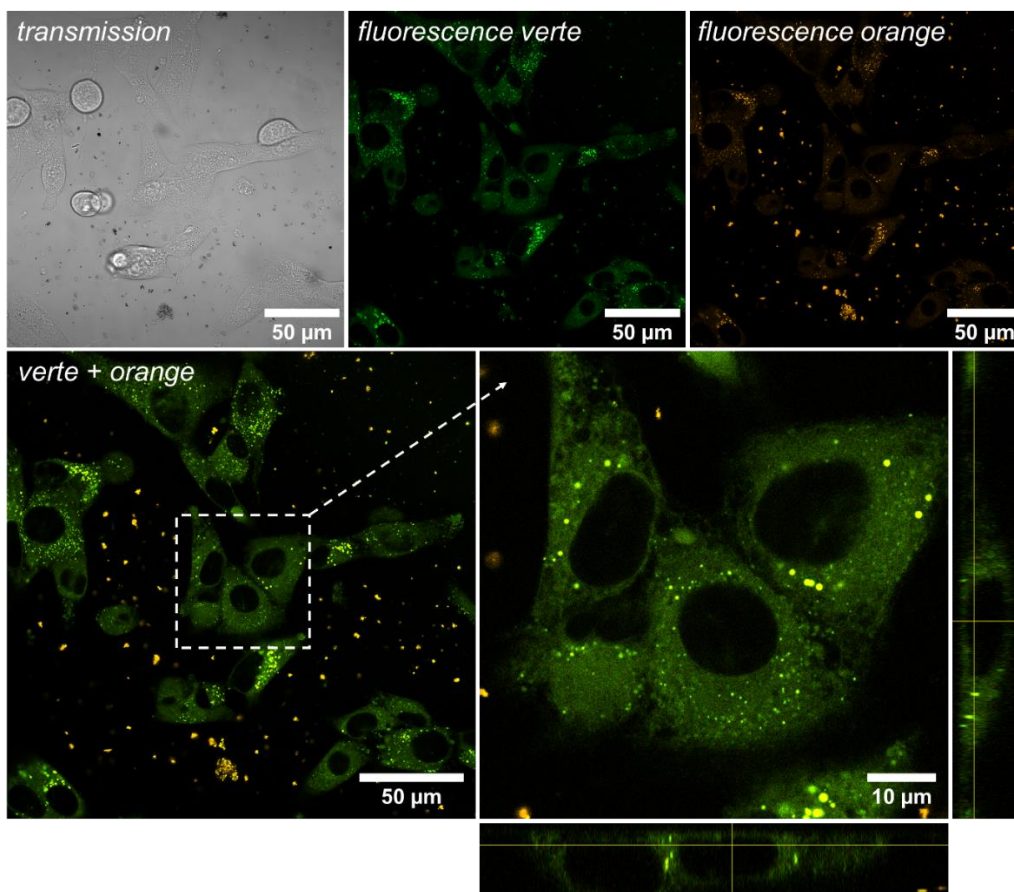


Figure 3. 16 – Imagerie de fluorescence confocale de cellules GL261 après incubation pendant 2 h avec des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA. En haut, de gauche à droite : image en lumière transmise, canal de fluorescence vert ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 517 - 544 \text{ nm}$) et canal de fluorescence orange ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 579 - 624 \text{ nm}$). En bas : Image composite des canaux de fluorescence verte et orange. L'image à droite est un zoom de la région encadrée avec plusieurs images sur l'axe Z, avec les vues orthogonales XZ et XY.

Ces résultats nous permettent également d'attester de la non-toxicité des hybridosomes SPION/BODIPY vis-à-vis de cette lignée cellulaire. Lors de travaux précédents, notre groupe avait déjà montré que les hybridosomes à base de SPION ne sont pas toxiques, notamment envers la lignée cellulaire HEK.³³

III.3.2.2. Localisation de la coque des hybridosomes

L'expérience précédente conclut à l'internalisation du BODIPY dans le cytoplasme. Le relargage de BODIPY hydrophobe à partir de NP inorganiques dans le cytosol des cellules a déjà été rapporté. Il peut avoir lieu en l'absence de l'internalisation des NP grâce à une diffusion à travers la membrane.³⁴ Il est possible que le BODIPY ait de l'affinité pour certains compartiments cellulaires hydrophobes, ce qui déplace l'équilibre de manière à faire entrer le BODIPY dans les cellules, alors qu'il pourrait rester dans la membrane (comme dans le cas des liposomes

précédemment étudié). L'entrée du fluorophore dans la cellule pourrait aussi avoir lieu par transport actif. Par ailleurs, l'internalisation des nano-objets dans les cellules dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Lors de l'étude précédente, l'utilisation de SPION ne nous permettait pas de suivre la localisation de la coque des hybridosomes. C'est pourquoi nous avons réalisé des manipulations avec cette fois-ci des hybridosomes composés de QD, fluorescents. Nous avons incubé ces hybridosomes avec différentes lignées cellulaires. Il faut savoir que l'internalisation dans les cellules dépend de la lignée cellulaire. Par exemple, les cellules phagocytiques sont connues pour internaliser les particules d'une taille supérieure à 50 nm.³⁵ Ici, nous avons utilisé les lignées Nalm-6, la lignée 501-Mel (mélanocytes) et U87. Les hybridosomes utilisés sont composés de QD bleus ($\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) ou rouges ($\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$). L'imagerie confocale est réalisée après 24 h d'incubation (**Figure 3. 17**).

On remarque que les QD, et donc la coque des hybridosomes, semblent rester à l'extérieur des cellules, ou tout du moins au niveau de la membrane cellulaire. Nous avons aussi marqué la membrane en vert (**Figure 3. 17 C**). Il semblerait que les QD soient très majoritairement co-localisés avec la membrane ou à proximité de celle-ci. Les QD ne sont par ailleurs pas internalisés dans les noyaux. Ainsi, **la coque des hybridosomes semble ne pas être internalisée dans les cellules.**

On note également que les cellules sont parfois en mauvais état suite à l'incubation avec les hybridosomes composés de QD. Cela se traduit par des cellules très rondes entrées en apoptose, c'est-à-dire en train de mourir (pour des lignées n'étant pas ronde au départ), des cellules constellées de cratères ou encore des cellules poly-nucléiques. La toxicité provient certainement des QD, en particulier du cadmium. Cette mauvaise forme des cellules a été rencontrée sur les lignées HEK en particulier.

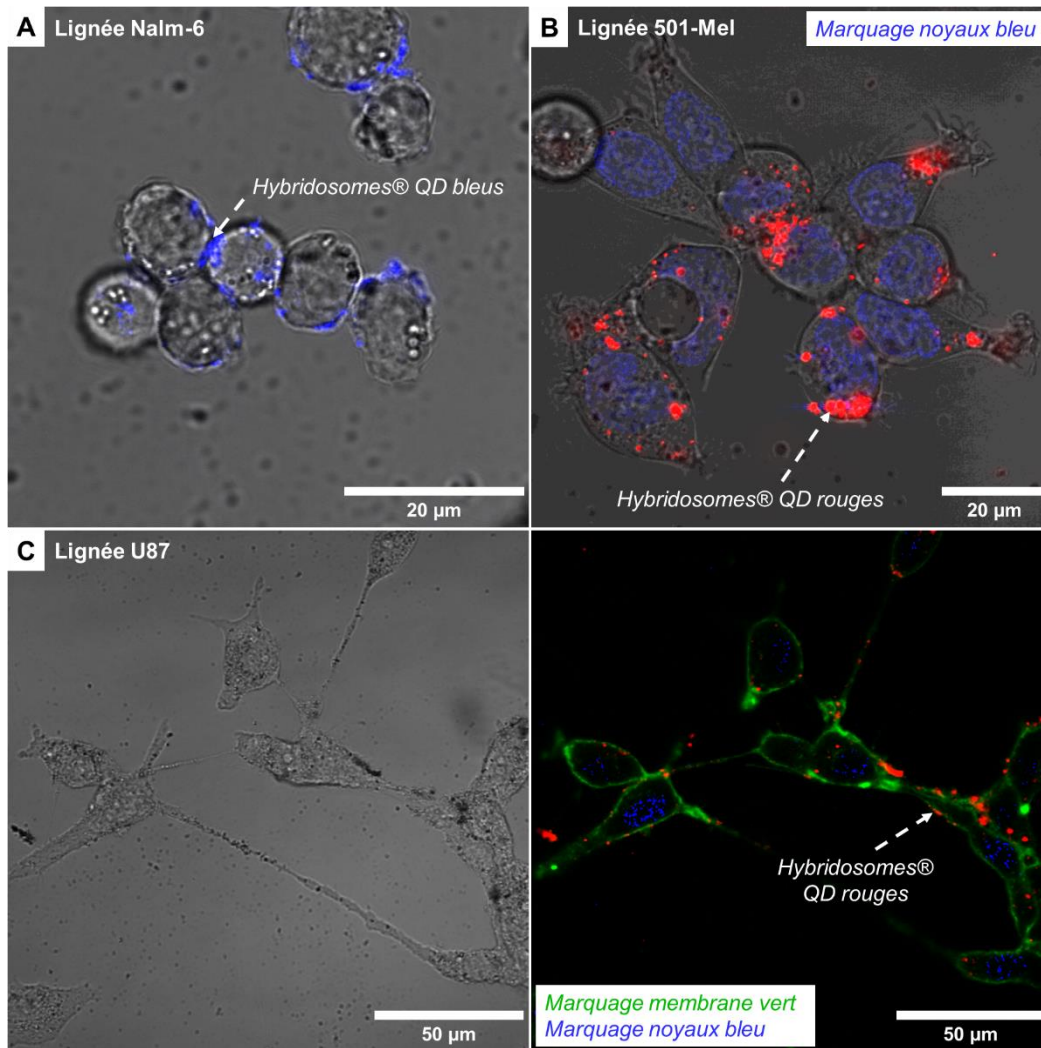


Figure 3. 17 – Suivi de la localisation de la coque des hybridosomes par imagerie de fluorescence confocale, après incubation avec différentes lignées cellulaires. **(A)** Incubation de cellules Nalm-6 avec des hybridosomes QD bleus@PEG-PAA. **(B)** Incubation de cellules 501-Mel avec des hybridosomes QD rouges@PEG-PAA, avec marquage du noyau en bleu (Hoechst). **(C)** Incubation de cellules U87 avec des hybridosomes QD rouges@PEG-PAA, avec marquage du noyau en bleu (Hoechst) et de la membrane en vert (WGA). L'image en lumière transmise et les canaux de fluorescence sont dissociés pour plus de clarté. $t_{\text{incubation}} = 24 \text{ h}$; QD bleus : $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. QD rouges : $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$. Hoechst : $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. WGA : $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 - 550 \text{ nm}$.

III.3.2.3. Résumé

Pour résumer, le comportement des hybridosomes chargés en BODIPY peut être décrit de la manière suivante. En premier lieu, le composé hydrophobe encapsulé semble être relargué dans le compartiment cellulaire, potentiellement dans des lysosomes (nous n'avons pas plus de détails sur ce point dans l'état actuel de nos recherches). Cela se traduit par une fluorescence verte intense (spots) mais aussi diffuse dans le cytoplasme. À noter que le BODIPY n'est pas observé dans le noyau. D'autre part, la coque de l'hybridosome lui-même semble rester à l'extérieur de la cellule, en s'accumulant au niveau de la membrane cellulaire. Il n'est donc pas internalisé. Ainsi, nous pouvons imaginer un mécanisme de relargage faisant intervenir le passage du BODIPY de l'hybridosome vers le domaine hydrophobe de la membrane cellulaire, puis l'internalisation par endocytose. Nous n'avons à l'heure actuelle pas d'explication quant au relargage du BODIPY dans le cytoplasme alors qu'il pourrait rester dans la membrane cellulaire. Des compartiments plus hydrophobes ou présentant plus d'affinité avec le BODIPY doivent être présents dans le cytoplasme. La **Figure 3. 18** résume ce mécanisme proposé.

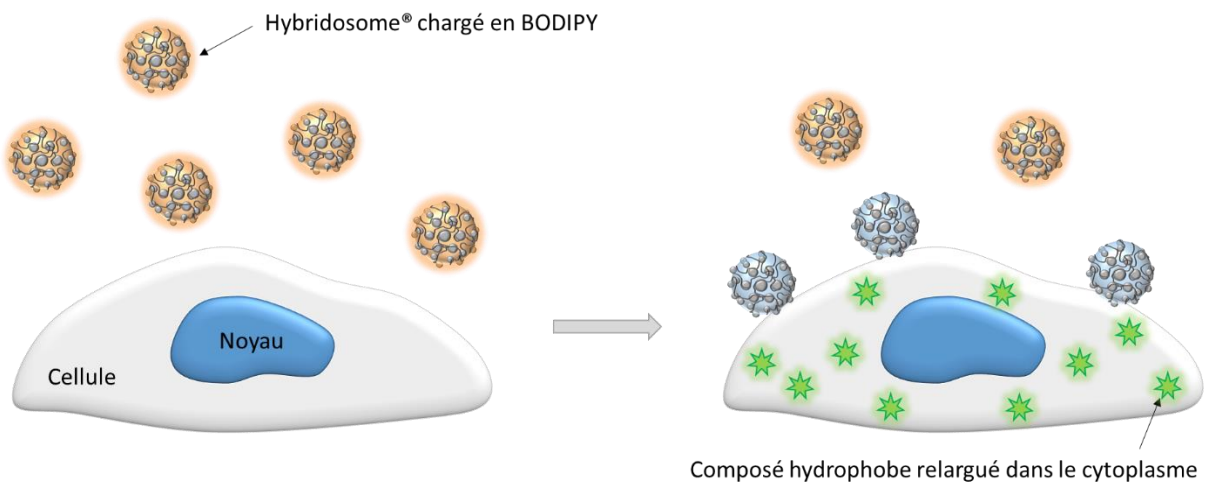


Figure 3. 18 – Schéma du relargage du contenu encapsulé dans des hybridosomes dans les cellules.

III.3.3. Relargage *in vivo* dans les souris

Finalement, nous avons voulu étudier le relargage *in vivo*. Pour cela, nous utilisons les hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA, lesquels sont injectés dans des souris *via* deux modes différents : l'injection dans du matrigel® avec de cellules Nalm-6 (mime de tumeur sous-cutanée) et l'injection intraveineuse systémique. Pour ces études, nous remercions M.-B. Trodec et H. Jakobczyk (IGDR, Rennes) (cultures cellulaires et injections).

En premier lieu, nous avons injecté les hybridosomes dans du matrigel® comportant des cellules Nalm-6. Plus précisément, les cellules Nalm-6 sont des cellules lymphoblastiques malignes, couramment utilisées comme modèle de leucémie aigüe lymphoblastique.³⁶ Les souris sont préparées en amont avec l'injection de matrigel® et de cellules, puis nous attendons 9 jours de croissance cellulaire (cf. partie expérimentale). Au bout des 9 jours, les hybridosomes sont injectés et la fluorescence du BODIPY dans le vert est suivie en fonction du temps sur un bioimageur. Le suivi est réalisé sur 2 semaines. À la fois la taille (**Figure 3. 19 A**) et l'intensité (**Figure 3. 19 B**) de la zone fluorescente augmentent sur la période suivie. La fluorescence semble cantonnée à proximité du point d'injection, du moins sur le temps étudié. Plusieurs études ont montré que, contrairement aux composés moléculaires, les NP injectées en intratumoral restent proches du site d'injection à cause de leur incapacité à migrer efficacement à travers la matrice extracellulaire.³⁷⁻³⁹ Comme nous venons de montrer, le contenu de l'hybridosome est facilement relargué dans un environnement lipophile. Qui plus est, la fluorescence verte est fortement atténuée par les tissus biologiques et ne peut être suivie qu'à proximité de la surface du corps, en l'occurrence proche de la peau. Ainsi, **l'étalement de la zone fluorescente à plusieurs millimètres du site d'injection est probablement dû au relargage du BODIPY puis à sa diffusion dans la peau.**

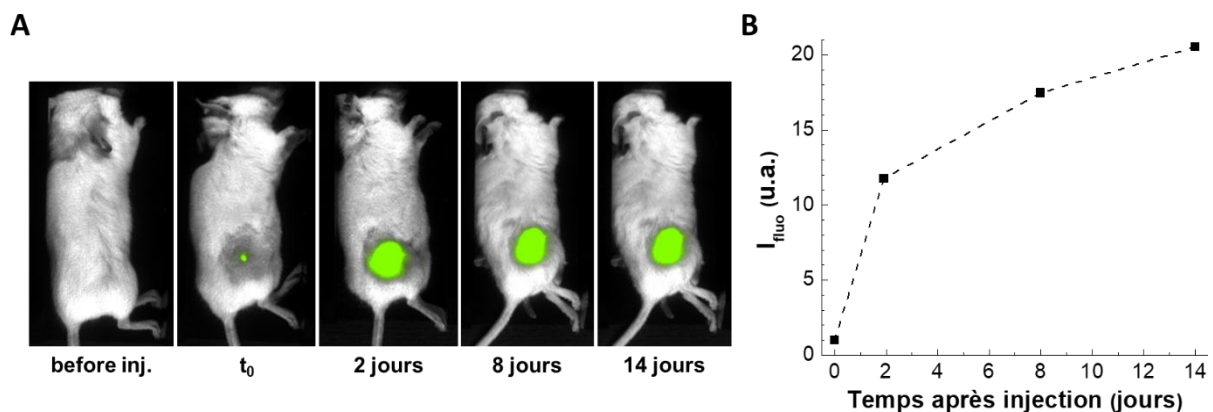


Figure 3. 19 – (A) Bioimagerie de fluorescence *in vivo* d'une souris après injection d'hybridosomes chargés en BODIPY dans du matrigel® contenant des cellules Nalm6 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$). **(B)** Évolution de l'intensité de fluorescence mesurée à partir des images présentées en (A).

Dans un second temps, nous avons injecté les hybridosomes à une souris *via* une injection intraveineuse, plus précisément une injection rétro-orbitale. La souris est suivie pendant 5 jours au biomageur. La **Figure 3. 20** présente les images de fluorescence **(A)** de la souris ainsi que l'intensité de fluorescence **(B)** sur la durée d'étude. **La fluorescence apparaît progressivement**

sur les 5 jours, sur toute la souris, avec une augmentation de l'intensité en fonction du temps. Il s'agit à nouveau probablement d'un relargage et d'une accumulation du BODIPY dans les tissus gras sous-cutanés. À noter, la présence de fluorescence au niveau de l'œil, c'est-à-dire le site d'injection, dès 50 minutes.

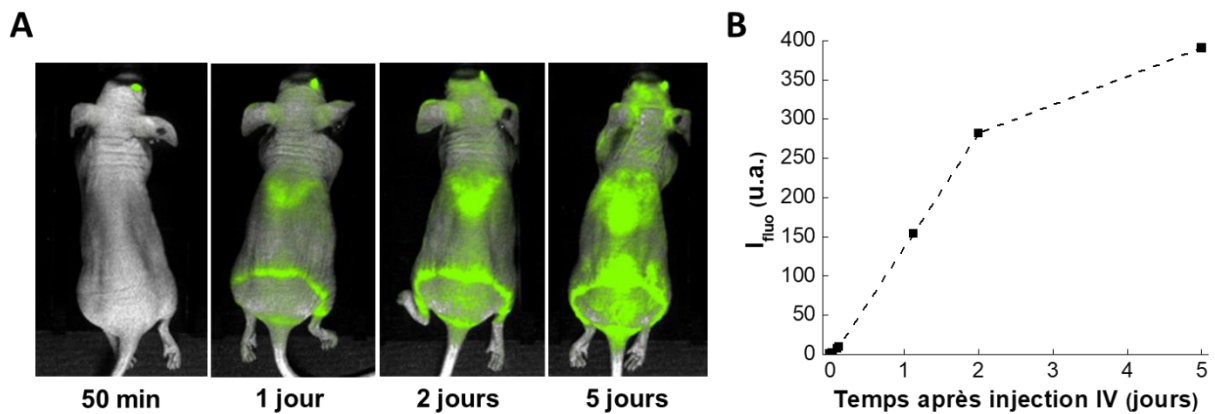


Figure 3. 20 – (A) Bioimagerie de fluorescence *in vivo* d'une souris après injection intraveineuse (rétro-orbitaire) d'hybridosomes chargés en BODIPY ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$). **(B)** Évolution de l'intensité de fluorescence mesurée à partir des images présentées en (A).

À l'issue des 5 jours, nous avons prélevé la peau de la souris et nous l'avons observée au bioimageur (**Figure 3. 21 A**). La fluorescence est bien localisée au niveau de la peau. Comme nous l'avons dit, l'hypothèse est que la fluorescence provient du BODIPY relargué et accumulé dans la graisse sous-cutanée, qui diffuse ensuite dans la peau. Mais il pourrait également y avoir accumulation d'hybridosomes chargés en BODIPY. Nous avons donc prélevé une coupe de peau qui a subi une coloration de Perls (H2P2, Biosit, Rennes) (**Figure 3. 21 B**). Cette coloration au bleu de Prusse met en évidence la présence d'ions Fe^{3+} (coloration bleue). On remarque clairement la présence de zone bleues, très nombreuses, qui pourraient suggérer la présence de fer, et donc d'hybridosomes. On sait en revanche par IRM que les hybridosomes à base de SPION sont capturés par les macrophages du foie et de la rate 30 minutes après injection systémique.³³ Il est donc peu probable que des hybridosomes continuent de circuler au bout de 5 jours et s'accumulent dans la peau. Cette observation Perls sur la peau est à prendre avec précaution étant donné que nous n'avons pas d'observation d'un tissu contrôle : la présence de fer pourrait très bien être naturelle.

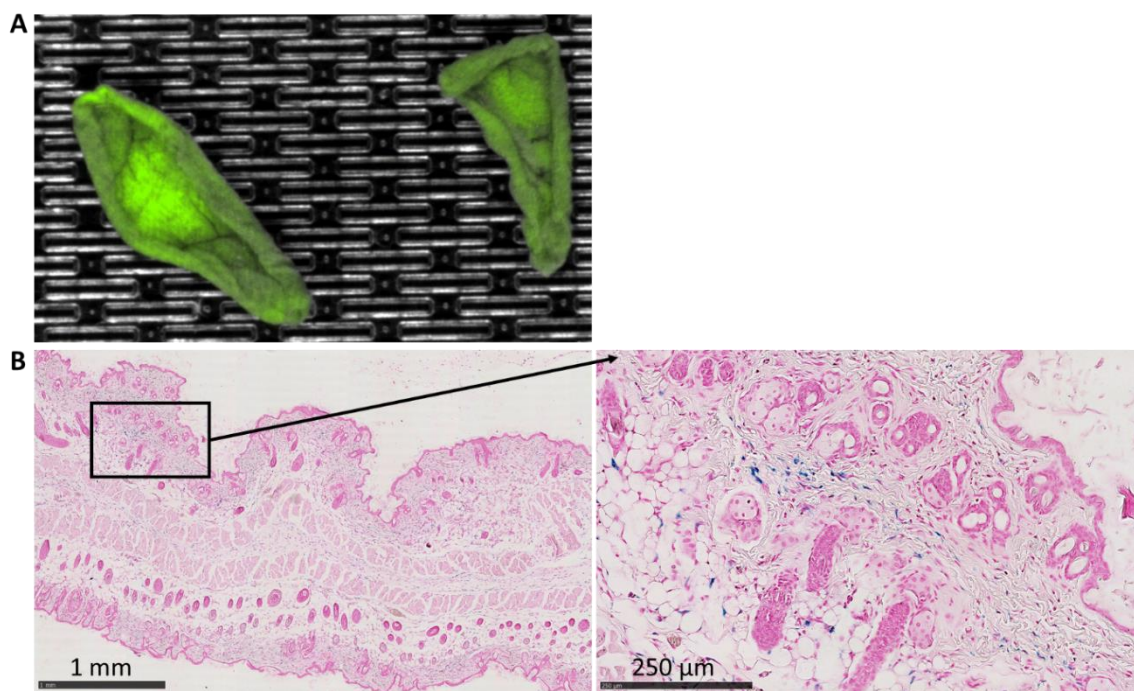


Figure 3. 21 – (A) Bioimagerie de fluorescence *ex vivo* de fragments de peau de la souris ayant reçu l'injection intraveineuse d'hybridosomes chargés en BODIPY ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$). (B) Microscopie d'une coupe d'un fragment de peau présenté en (A) avec coloration de Perls. L'image de droite est un zoom de la zone encadrée.

En complément, nous avons observé des coupes de foie et de rate 24 h après injection intraveineuse par microscopie électronique en transmission (**Figure 3. 22**). Comme indiqué par les flèches sur la figure, **des nanostructures d'environ 100 nm de diamètre et présentant un fort effet de contraste sont détectées, à la fois dans le foie et dans la rate**. Au vu des résultats précédemment publiés,³³ il est raisonnable d'identifier ces structures comme étant des hybridosomes internalisés. Dans le foie, ces hybridosomes internalisés sont retrouvés dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer (macrophages). Dans la rate, ils sont observés uniquement dans les macrophages connectés aux cellules endothéliales et non dans les lymphocytes de la pulpe rouge. A l'intérieur des cellules, les NP sont majoritairement localisées dans des compartiments vésiculaires et ne diffusent pas dans le cytoplasme. Cela suggère que les hybridosomes sont capturés par le système de dégradation cellulaire.

Sachant que les hybridosomes s'accumulent dans le foie très rapidement au cours de la première heure d'injection,³³ il est surprenant de voir une fluorescence croissante au cours des 5 jours. L'hypothèse d'un relargage rapide dans la circulation sanguine, suivi de l'accumulation lente dans la graisse sous-cutanée n'est pas très crédible. En effet, les études *in vitro* dans les liposomes (présentées précédemment) ne montrent qu'une faible dissolution du BODIPY dans le sérum. Par

ailleurs, les molécules relarguées dans la circulation sanguine devraient être rapidement éliminées par excrétion rénale. Plus probablement, cela résulte d'une prise en charge par le système phagocytaire mononucléé (Mononuclear Phagocytic System – MPS).⁴⁰ En effet, dans le cas de formulations de NP de composés hydrophobes, les NP peuvent être en premier lieu captées par le MPS, puis s'accumuler principalement dans les macrophages du foie (cellules de Kupffer) et de la rate.^{41,42} Ces NP sont présentes dans des lysosomes dans les cellules. Du fait de leur nature lipophile, elles peuvent passer la membrane lysosomale et finalement sortir de la cellule. Cela se traduit par un profil pharmacocinétique avec une circulation prolongée.

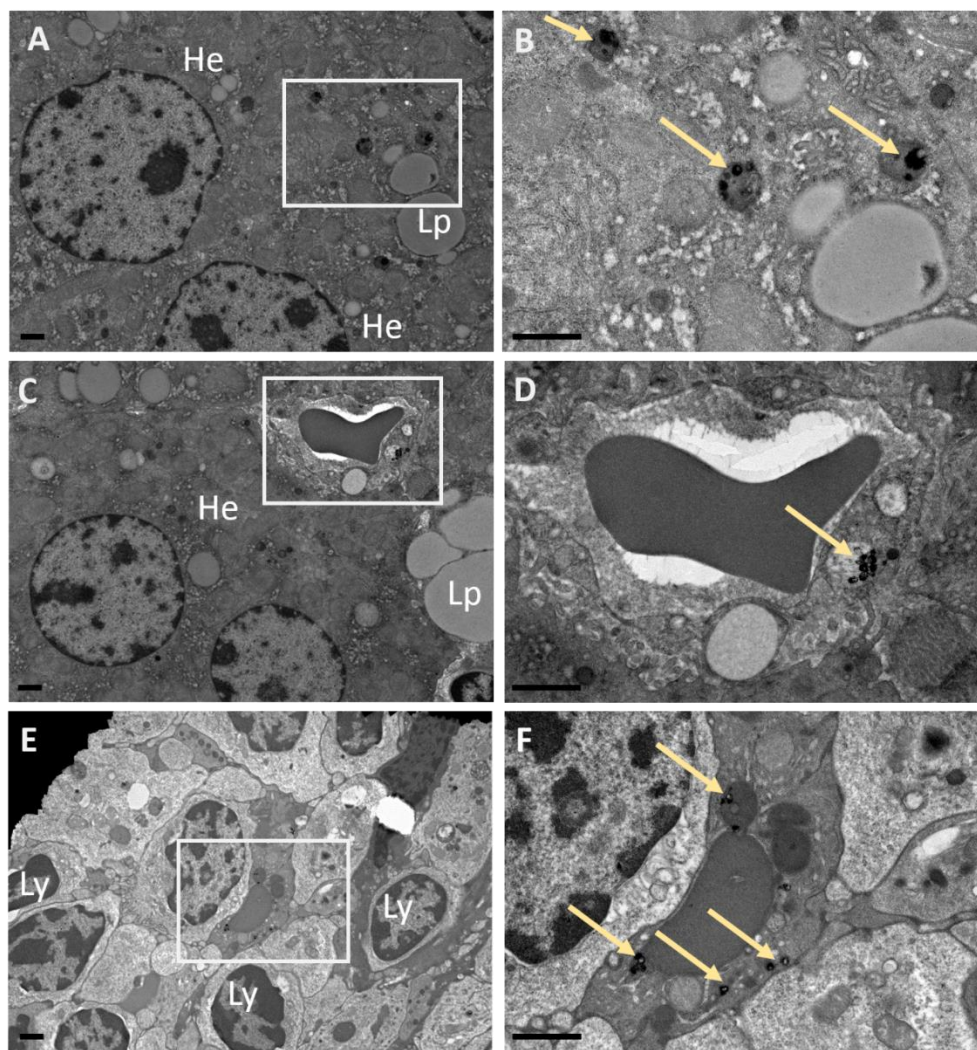


Figure 3. 22 – Images de microscopie électronique en transmission du foie (A, B, C & D) et de la rate (E & F) de souris 24 h après injection intraveineuse d'hybridosomes composés de SPION. Les images A, C & E présentent l'architecture cellulaire à faible zoom. Les images B, D & F correspondent aux zones encadrées des images A, C & E, respectivement. Les flèches jaunes indiquent la présence de nanoparticules dans les cellules. Abréviations : Hépatocyte (He), Globule lipidique (Lp) et Lymphocyte (Ly). Échelle : 1 μm.

III.4. Perspectives d'encapsulation d'autres molécules

En plus du BODIPY pour étudier notre système, nous avons envisagé l'encapsulation d'autres molécules dans les hybridosomes afin de transposer leurs très bonnes performances d'encapsulation à des molécules d'intérêt thérapeutique. Cette courte partie présente quelques essais ainsi que des pistes de réflexion. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être consolidés.

III.4.1. Molécules envisagées

Nous avons en particulier ciblé des molécules antifongiques (**amphotéricine B** (AmB) et **voriconazole**) et anticancéreuses (**témozolomide** (TMZ) et **paclitaxel** (PTX)). Leurs structures sont présentées ci-contre (**Figure 3. 23**). Une application des antifongiques est le traitement de la Leishmaniose viscérale. Il s'agit d'une pathologie causée par le parasite *Leishmania* qui colonise principalement les macrophages du foie et de la rate. Il n'existe jusqu'à présent aucun traitement vraiment efficace. De manière intéressante, nous avons vu précédemment que les hybridosomes s'accumulent dans le foie et la rate après injection systémique : ils semblent donc très pertinent pour une application anti-leishmaniose. L'encapsulation de ces antifongiques est prometteuse étant donné la faible solubilité dans l'eau de l'AmB et du voriconazole. Par ailleurs, nous pourrions profiter des propriétés antifongiques de l'hybridosome lui-même, s'il est composé de NP d'argent par exemple. Il est également envisageable de cibler certains types cellulaires participant à la résistance de la maladie,⁴³ par exemple en modifiant la surface de l'hybridosome. L'AmB offre un large spectre d'action mais induit une toxicité rénale. Cette toxicité est diminuée avec la formulation liposomale (AmBisome®) mais la stabilité n'est pas optimale et l'efficacité d'encapsulation faible.⁴⁴ Le voriconazole semble aussi présenter une activité intéressante contre la leishmaniose.⁴⁵

Pour ce qui est des molécules anticancéreuses (en particulier le témozolomide), leur encapsulation permettrait de produire des hybridosomes multipotents, avec une activité chimiothérapeutique et une activité provenant de la coque de NP, par exemple les AuNP pour la radiothérapie. Cet axe radiothérapie sera développé dans le chapitre suivant.

L'encapsulation de médicaments dans les hybridosomes pourrait donc être une voie d'amélioration des traitements, de par la forte capacité d'encapsulation de composés hydrophobes et la synergie éventuelle entre les propriétés de l'hybridosome en lui-même et son contenu.

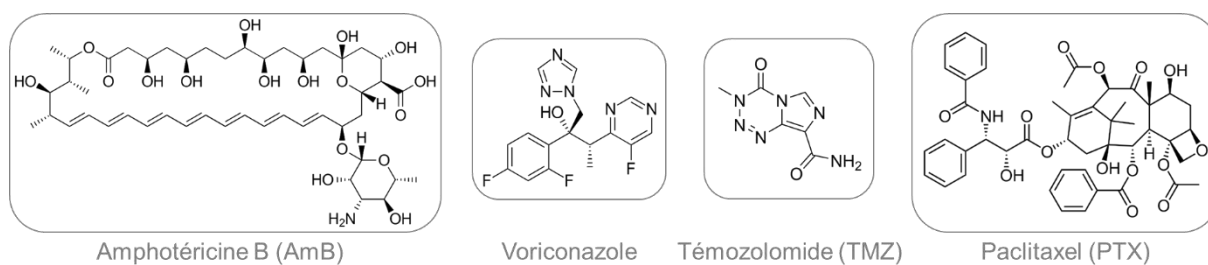


Figure 3. 23 – Structures des molécules à activité biologique envisagées pour l’encapsulation dans les hybridosomes.

Le tableau suivant présente les solubilités de ces molécules dans l’eau, dans le THF ou encore dans le mélange « eau/THF » lorsqu’elles sont disponibles. Pour certaines, un calcul COSMO-RS a été possible. Les valeurs sont comparées à celles du BODIPY. Il apparaît à première vue que le TMZ peut être difficile à encapsuler, étant donné sa forte solubilité dans l’eau, qui est par ailleurs supérieure à celle dans le THF. Le TMZ va donc se retrouver préférentiellement dans l’eau lors du mélange du THF avec l’eau. Le voriconazole et l’AmB semblent être des candidats sérieux. Le paclitaxel est pour sa part la molécule qui semble être la plus proche du BODIPY en termes de solubilité. Nous présentons par la suite quelques résultats préliminaires sur l’encapsulation de chaque molécule.

Tableau 3. 2 – Solubilité dans l’eau, le THF et le mélange eau/THF (75/25 %vol) de différentes molécules envisagées pour l’encapsulation dans les hybridosomes. Certaines valeurs ne sont pas disponibles.

| | BODIPY | Amphotéricine B | Voriconazole | Témazolomide | Paclitaxel |
|--|------------------------|------------------------|--|--------------|------------------------|
| Solubilité dans l’eau (mol.L⁻¹) | < 10 ⁻¹⁰ * | < 1.10 ⁻⁴ △ | 8,7.10 ⁻⁴ * 2.10 ⁻³ [1] | 0,6 * | 10 ⁻¹¹ * |
| Solubilité dans eau/THF 75/25 (%vol) (mol.L⁻¹) | 1,5.10 ⁻⁶ * | / | / | / | 1,8.10 ⁻⁷ * |
| Solubilité dans le THF (mol.L⁻¹) | > 1 * | Insoluble | 0,13 * | 0,076 * | 0,15 * |

* Calculé avec le modèle COSMO-RS

△ Donnée PubChem

[1] Y.-J. Wu, in *Progress in Heterocyclic Chemistry*, eds. G. W. Gribble and J. A. Joule, Elsevier, 2012, vol. 24, pp. 1–53.

III.4.2. Amphotéricine B et Voriconazole

L'AmB n'est pas soluble dans le THF (tests réalisés au laboratoire) et le voriconazole semble être soluble dans le THF au vu du tableau précédent. Toutefois, nous n'avions à disposition qu'un échantillon de voriconazole dissous dans le DMSO. Ainsi, nous ne pouvons pas utiliser le THF comme à l'habitude. Il s'agit pourtant du solvant avec lequel le comportement de notre système est établi et maîtrisé. Une possibilité serait de prendre un bon solvant des molécules à encapsuler, par exemple le DMSO, et d'étudier le système ouzo avec ce solvant. Cela demande beaucoup de temps et n'a pas fait l'objet d'un développement conséquent lors de cette thèse. L'utilisation de DMSO pour la fabrication de nanocapsules ouzo est actuellement en cours dans le cadre d'une autre thèse au sein de notre groupe. Le changement de solvant pour le DMSO est toutefois une piste à étudier, le THF n'est pas le solvant idéal pour les tests biologiques et les applications cliniques. Cette considération de solvant plus ou moins acceptable fait l'objet de recommandations de la FDA, laquelle catégorise les solvants en 3 classes : ceux à éviter (classe 1), ceux à limiter (classe 2) et finalement les solvants considérés comme les moins toxiques (classe 3). Le THF se situe dans la classe 2 et n'est donc pas un solvant idéal. Même s'il est très peu ou pas présent à la fin du procédé, son remplacement par un solvant plus acceptable serait bienvenu. Parmi les solvants de la classe 3, nous pouvons citer le DMSO, l'éthanol et l'acétone. Toutefois, l'utilisation du DMSO soulève un autre problème pour nous qui est l'utilisation des SPION. En effet, les SPION que nous utilisons actuellement ne sont pas dispersables dans le DMSO et précipitent immédiatement.

Nous avons donc tenté de faire des hybridosomes chargés en AmB ou en voriconazole en utilisant le même système « eau/THF/BHT » mais en ajoutant la molécule à encapsuler dans un minimum de DMSO (variant entre 3 et 55 μL suivant la concentration voulue et la molécule). Une gamme est également réalisée avec le BODIPY dans un minimum de DMSO pour faire une référence et comparer par rapport à l'habitude. Etant donné que le DMSO ne peut pas être évaporé facilement comme le THF, nous avons décidé de l'éliminer pendant les étapes d'aimantation. Lors du changement de la phase continue avec de l'eau pure, le DMSO contenu dans les hybridosomes devrait diffuser, comme en dialyse. Les distributions de taille ainsi que les diamètres moyens des objets obtenus sont présentés en **Figure 3. 24 A&B**. Des nano-objets sont formés, dont la distribution peut faire penser à celle des hybridosomes. Théoriquement, la majorité du DMSO est parti lors de la purification, toutefois on voit que la distribution de taille

des hybridosomes avec BODIPY est moins belle qu'à l'habitude. Il se pourrait que l'ajout du DMSO (en quantités qui peuvent être non négligeables, jusqu'à 20% du volume de phase organique) perturbe le système ouzo. Les quelques observations en TEM n'ont pas permis de montrer la présence d'hybridosomes. On note toutefois que la taille moyenne des objets est relativement stable, avec une augmentation pour le BODIPY, comme ce qui avait été vu en début de ce chapitre.

Il est possible de doser l'AmB par spectrométrie UV-visible, avec plusieurs bandes d'absorption entre 250 et 500 nm (**Figure 3. 24 C**). Nous avons regardé l'absorbance des hybridosomes avec différentes concentrations en AmB. Il semble que les échantillons purifiés ne montrent pas les bandes d'absorptions caractéristiques de l'AmB, même à la plus forte concentration théorique de $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Figure 3. 24 D**). Seule la diffusion de la lumière causée par les hybridosomes est visible. Ces premiers résultats ne sont donc pas très encourageants.

Le voriconazole absorbe à plus faible longueur d'onde, en dessous de 270 nm, ce qui est proche de la limite de notre appareil. Nous avons donc fait des tests en HPLC et il semble qu'il soit possible de doser le voriconazole à 254 nm. Nous n'avons toutefois pas encore fait de tests de dosage sur les hybridosomes. En effet, nous devons d'abord trouver une méthode de purification afin d'éliminer les NP qui pourraient être délétères pour la colonne de l'HPLC. Plus d'investigations sur l'encapsulation du voriconazole méritent d'être effectuées, sachant que la distribution de taille des objets obtenus est très encourageante.

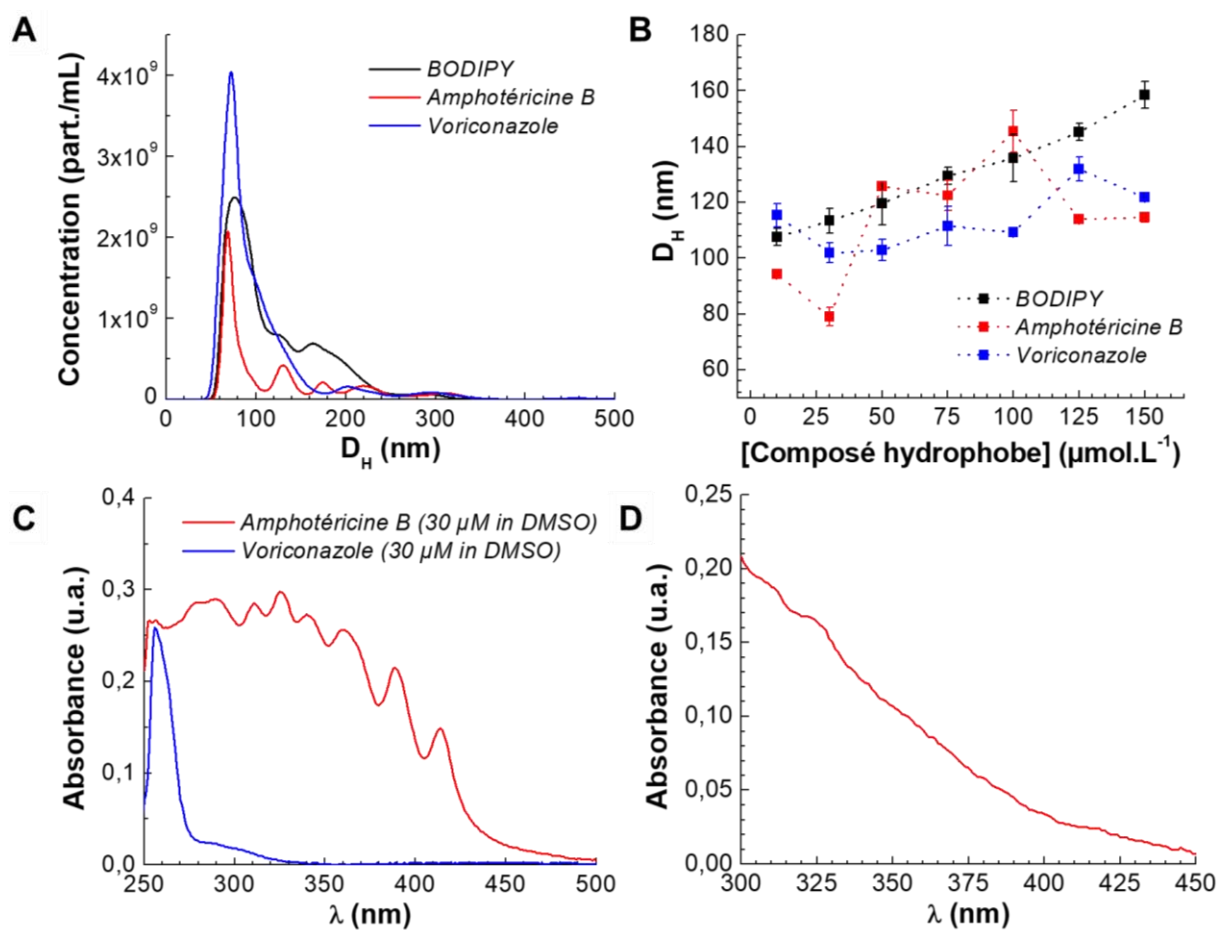


Figure 3. 24 – Distribution de tailles **(A)** et diamètres moyens **(B)** des nano-objets obtenus en présence de BODIPY, d’AmB et de voriconazole (concentration de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en adaptant le procédé de fabrication de hybridosomes avec un minimum de DMSO pour solubiliser les molécules à encapsuler. **(C)** Spectres d’absorption UV-visible de solution d’AmB et de voriconazole dans le DMSO. **(D)** Spectre d’absorption UV-visible d’un échantillon purifié contenant théoriquement $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d’AmB.

III.4.3. Témzolomide

L'avantage du TMZ est qu'il est soluble dans le THF : nous avons réussi à le dissoudre à hauteur de 3 mmol.L⁻¹. Grâce à cette solubilité dans le THF, nous pouvons faire la même préparation qu'à l'habitude, comme si nous encapsulions le BODIPY. Après purifications magnétiques, nous avons mesuré les spectres d'absorbance (**Figure 3. 25**). **Il semblerait que la majorité du TMZ se retrouve dans le surnageant et ne soit pas encapsulée dans les hybridosomes.** Comme déjà dit, la solubilité du TMZ dans l'eau est beaucoup trop importante (0,6 mol.L⁻¹) et il est probable qu'il ne soit pas confiné dans les gouttelettes ouzo. D'autant plus que la solubilité dans l'eau est plus importante que dans le THF (cf. Tableau 3. 2). Par ailleurs, le TMZ se dégrade au contact de l'eau à pH neutre ou basique. Cette dégradation est bénéfique puisqu'elle mène à la formation de l'agent alkylant qui confère son activité chimiothérapeutique au témzolomide. En revanche, le contact prolongé du TMZ avec l'eau pourrait mener à une diminution de l'activité de la formulation. Dans l'éventualité où des hybridosomes seraient formés avec du TMZ, il ne serait peut-être pas très pertinent de procéder à la préparation longtemps avant l'utilisation. Au vu de ces premiers résultats, l'encapsulation de TMZ dans les hybridosomes ne semble pas très réaliste.

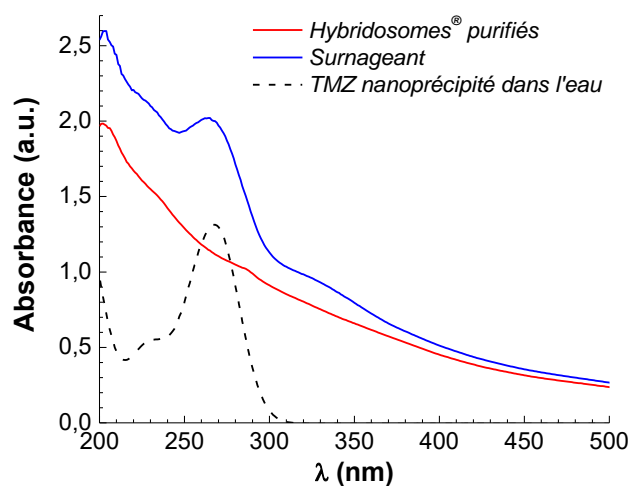


Figure 3. 25 – Spectres d'absorbance de la dispersion d'hybridosomes SPION@PEG-PAA préparés en présence de TMZ (**spectre rouge**), du surnageant obtenu lors de la purification magnétique (**spectre bleu**) et du TMZ nanoprécipité dans l'eau (**spectre noir pointillé**).

III.4.4. Paclitaxel

Le paclitaxel est lui aussi soluble dans le THF. Nous avons pu calculer sa solubilité dans l'eau (10^{-11} mol.L⁻¹) ainsi que celle dans le mélange « eau/THF » 75/25 ($1,8 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹) avec le modèle COSMO-RS. La solubilité du paclitaxel est comparée à celles du BHT et du BODIPY en **Figure 3. 26 A**. Il apparaît que la limite de solubilité du paclitaxel dans l'eau est proche de celle du BODIPY, quoique un peu inférieure. Il est donc raisonnable de penser que le paclitaxel reste confiné dans les gouttes ouzo et a un comportement proche de celui du BODIPY. Un diagramme de phase du système « eau/THF pur/paclitaxel » a aussi été réalisé (**Figure 3. 26 B**). Il ne semble pas y avoir de zone ouzo. Des essais sont actuellement en cours dans notre groupe pour encapsuler le paclitaxel. Il semblerait toutefois qu'il ait tendance à cristalliser rapidement lors du mélange « eau/THF », menant à la formation de grandes aiguilles, visibles à l'œil nu. **Dans tous les cas, le paclitaxel est la molécule avec le comportement le plus proche de celui du BODIPY, avec une très faible solubilité dans l'eau et une solubilité dans le THF très importante.** Il s'agit d'un composé prometteur pour l'encapsulation par effet ouzo. Des recherches complémentaires doivent donc être entreprises.

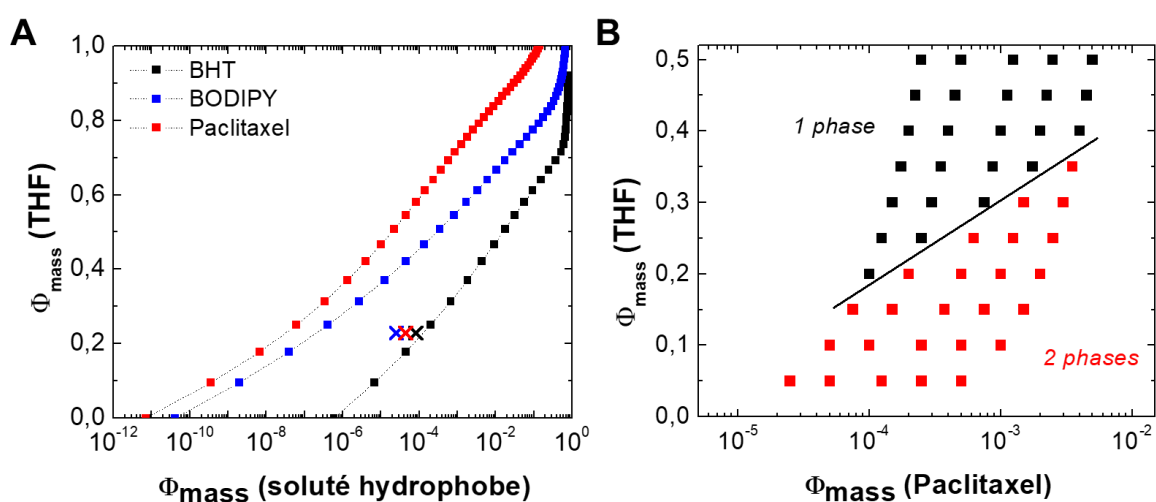


Figure 3. 26 – (A) Limites de solubilité du BHT, du BODIPY et du paclitaxel dans le mélange eau/THF. **(B)** Diagramme de phase du système eau/THF/paclitaxel. Le diagramme est déterminé visuellement tout de suite après préparation des mélanges.

III.5. Conclusion

Nous avons abordé dans ce chapitre les performances d'encapsulation des hybridosomes ainsi que les caractéristiques du contenu encapsulé. Il apparaît de manière claire que le procédé d'élaboration des hybridosomes permet la **formation de nanocapsules chargées en composé hydrophobe (BODIPY), avec d'excellents rendements d'encapsulation** (~90% avec le PEG-PAA) **et des concentrations internes dans les hybridosomes exceptionnelles** (170 g.L⁻¹, et potentiellement plus !). Ces performances hors norme sont possibles grâce à la nature **nanoprécipitée** du contenu encapsulé, en l'occurrence le BODIPY. La présence de BODIPY dans les hybridosomes ne modifie pas drastiquement leur taille ni la concentration en objets. Il semblerait seulement qu'une augmentation de la concentration encapsulée mène à une légère augmentation de la taille.

De manière intéressante, même sous forme nanoprécipitée, le fluorophore que nous avons employé conserve sa luminescence et une signature spectrale bien particulière. Ces atouts nous ont permis d'étudier le relargage hors des hybridosomes, à la fois *in vitro* et *in vivo*. ***In vitro*, la molécule hydrophobe encapsulée peut se libérer en présence de liposomes et aller se loger dans les compartiments lipidiques hydrophobes.** Cela se traduit par une fluorescence verte qui croît avec le temps. Le relargage est limité par la quantité de lipides, ce qui prouve encore une fois qu'il y a beaucoup de BODIPY dans le cœur des objets. Les cinétiques peuvent être ajustées correctement avec le modèle de Korsmeyer-Peppas et démontrent un phénomène de relargage limité par la diffusion. Il n'y a pas de différence significative entre le relargage du BODIPY nanodispersé dans l'eau et celui du BODIPY encapsulé dans les hybridosomes, ce qui traduit le caractère poreux des objets. Finalement, le relargage dans le sérum de veau foetal ne permet pas d'extraire beaucoup de BODIPY, probablement de par la faible quantité de domaines hydrophobes disponibles.

Le relargage dans les cellules a été étudié *via* l'incubation d'hybridosomes avec des cellules. Ces hybridosomes possédaient un cœur fluorescent (BODIPY) et/ou une coque fluorescente (QD), permettant de suivre la localisation du cœur et de la coque. **Le contenu hydrophobe est clairement relargué et internalisé dans les cellules**, probablement dans les lysosomes, **sans jamais aller dans le noyau. La coque n'est quant à elle pas internalisée et très probablement adsorbée au niveau de la membrane.** Le relargage pourrait donc se faire *via* un transfert depuis l'hybridosome vers la membrane lipophile et finalement vers les lysosomes. De manière

intéressante, les objets testés ne montrent pas de toxicité cellulaire particulière avec les quantités utilisées, sauf lors de l'utilisation des QD.

Au niveau du relargage *in vivo*, l'injection dans du matrigel® avec cellules Nalm-6 et l'injection systémique ont été testées. Dans le matrigel®, la fluorescence (i.e. le contenu encapsulé) se répand au fil des jours à partir du point d'injection, avec une intensité de fluorescence qui augmente, tout en restant dans le matrigel®. Il est probable que BODIPY soit relargué à proximité du point d'injection puis qu'il diffuse. Lors de l'injection systémique, la souris devient verte en fluorescence sur 5 jours. Les coques des hybridosomes sont quant à elles retrouvées dans le foie et dans la rate, très rapidement (30 minutes). **Un scénario probable serait la prise en charge par le système de détoxification de la souris, avec accumulation des hybridosomes dans les cellules macrophages du foie et de la rate, puis relargage des molécules de fluorophore qui viennent s'accumuler peu à peu dans les tissus lipophiles, par exemple sous-cutanés, puis diffusent dans la peau.**

Finalement, quelques voies d'exploration pour l'encapsulation de nouveaux composés antifongiques ou anticancéreux ont été présentées. Il s'agit de quelques essais qui doivent pour certains être poursuivis pour certain afin d'élargir le panel des possibilités d'encapsulation avec les hybridosomes. En particulier, les anticancéreux sont très intéressants, notamment pour obtenir des nanocapsules combinant l'efficacité du médicament encapsulé avec les possibilités offertes par les NP inorganiques. C'est tout particulièrement intéressant dans l'optique des travaux que nous menons sur le traitement du glioblastome en radiothérapie avec les hybridosomes. Ceci fait l'objet du chapitre suivant.

III.6. Références bibliographiques

1. Đorđević, V. *et al.* Encapsulation Technologies for Food Industry. in *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food* (eds. Nedović, V., Raspor, P., Lević, J., Tumbas Šaponjac, V. & Barbosa-Cánovas, G. V.) 329–382, Springer International Publishing (2016).
2. Saifullah, Md., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Tanver Rahman, M. R. & Van Vuong, Q. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science & Technology* 86, 230–251 (2019).
3. Riikonen, J., Xu, W. & Lehto, V.-P. Mesoporous systems for poorly soluble drugs – recent trends. *International Journal of Pharmaceutics* 536, 178–186 (2018).
4. Wais, U., Jackson, A. W., He, T. & Zhang, H. Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale* 8, 1746–1769 (2016).
5. Ye, C. & Chi, H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering: C* 83, 233–246 (2018).
6. Casanova, F. & Santos, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation* 33, 1–17 (2016).
7. Miyata, K., Christie, R. J. & Kataoka, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *Reactive and Functional Polymers* 71, 227–234 (2011).
8. Martínez Rivas, C. J. *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 532, 66–81 (2017).
9. Crucho, C. I. C. & Barros, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C* 80, 771–784 (2017).
10. Crucho, C. I. C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *ChemMedChem* 10, 24–38 (2015).
11. Discher, D. E. & Ahmed, F. Polymersomes. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8, 323–341 (2006).
12. Lee, J. S. & Feijen, J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release* 161, 473–483 (2012).
13. Moreira, A. F., Dias, D. R. & Correia, I. J. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. *Microporous and Mesoporous Materials* 236, 141–157 (2016).
14. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release* 200, 138–157 (2015).
15. Wei, X. *et al.* Cardinal Role of Intraliposome Doxorubicin-Sulfate Nanorod Crystal in Doxil Properties and Performance. *ACS Omega* 3, 2508–2517 (2018).
16. Li, T., Cipolla, D., Rades, T. & Boyd, B. J. Drug nanocrystallisation within liposomes. *Journal of Controlled Release* 288, 96–110 (2018).
17. Lepeltier, E., Bourgaux, C. & Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 71, 86–97 (2014).
18. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science* 163, 90–122 (2011).

19. Ulrich, G. & Ziessel, R. Convenient and Efficient Synthesis of Functionalized Oligopyridine Ligands Bearing Accessory Pyrromethene-BF₂ Fluorophores. *Journal of Organic Chemistry* 69, 2070–2083 (2004).
20. Liao, Y. *et al.* Spectroscopy of BODIPY in solid phase: crystal and nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15, 3186–3195 (2013).
21. Wang, L., Li, L. & Cao, D. A BODIPY-based dye with red fluorescence in solid state and used as a fluorescent and colorimetric probe for highly selective detection of cyanide. *Sensors and Actuators B: Chemical* 239, 1307–1317 (2017).
22. Barenholz, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* 160, 117–134 (2012).
23. Wibroe, P. P., Ahmadvand, D., Oghabian, M. A., Yaghmur, A. & Moghimi, S. M. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. *Journal of Controlled Release* 221, 1–8 (2016).
24. Barenholz, Y. & Haran, G. Method of amphiphatic drug loading in liposomes by pH gradient. Brevet USOO5192549 (A) (1993).
25. Sciortino, F. *et al.* Structure and elasticity of composite nanoparticle/polymer nanoshells (hybridosomes®). *Soft Matter* 13, 4393–4400 (2017).
26. Zunszain, P. A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E. & Curry, S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structural Biology* 9 (2003).
27. Haskard, C. A. & Li-Chan, E. C. Y. Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS⁻) Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2671–2677 (1998).
28. Mathematical models of drug release. in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (editor Bruschi, M. L.) 63–86, Elsevier (2015).
29. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. & Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 15, 25–35 (1983).
30. Ritger, P. L. & Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* 5, 23–36 (1987).
31. Permanadewi, I., Kumoro, A. C., Wardhani, D. H. & Aryanti, N. Modelling of controlled drug release in gastrointestinal tract simulation. *Journal of Physics: Conference Series* 1295, 012063 (2019).
32. Szatmári, T. *et al.* Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science* 97, 546–553 (2006).
33. Sciortino, F. *et al.* Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* 2, 796–799 (2016).
34. Kim, C. K. *et al.* Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells. *Journal of the American Chemical Society* 131, 1360–1361 (2009).
35. Kettler, K., Veltman, K., Meent, D. van de, Wezel, A. van & Hendriks, A. J. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 481–492 (2014).

36. Debaize, L. *et al.* Interplay between transcription regulators RUNX1 and FUBP1 activates an enhancer of the oncogene c-KIT and amplifies cell proliferation. *Nucleic Acids Research* 46, 11214–11228 (2018).
37. Durymanov, M. O., Rosenkranz, A. A. & Sobolev, A. S. Current Approaches for Improving Intratumoral Accumulation and Distribution of Nanomedicines. *Theranostics* 5, 1007–1020 (2015).
38. Miao, L. & Huang, L. Exploring the Tumor Microenvironment with Nanoparticles. in *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer* (eds. Mirkin, C. A., Meade, T. J., Petrosko, S. H. & Stegh, A. H.) 193–226, Springer International Publishing (2015).
39. Zhang, B., Hu, Y. & Pang, Z. Modulating the Tumor Microenvironment to Enhance Tumor Nanomedicine Delivery. *Frontiers in Pharmacology* 8, 952, 1-16 (2017).
40. Luciani, N., Gazeau, F. & Wilhelm, C. Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 19, 6373–6380 (2009).
41. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 785–796 (2004).
42. Wang, Y. *et al.* Formulation and pharmacokinetic evaluation of a paclitaxel nanosuspension for intravenous delivery. *International Journal of Nanomedicine* 6, 1497–1507 (2011).
43. Siefert, A. L. *et al.* Immunomodulatory nanoparticles ameliorate disease in the Leishmania (Viannia) panamensis mouse model. *Biomaterials* 108, 168–176 (2016).
44. Bruni, N. *et al.* Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. *International Journal of Nanomedicine* 12, 5289–5311 (2017).
45. Oryan, A., Bahrami, S. & Bemani, E. Efficacy of voriconazole on leishmaniasis by Leishmania major: An in vitro and in vivo study. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 11, 562 (2018).

III.7. Article publié dans *Journal of Controlled Release*

The Ouzo effect: A tool to elaborate high-payload nanocapsules

C. Goubault, F. Sciortino, O. Mongin, U. Jarry, M. Bostoën, H. Jakobczyk, A. Burel, S. Dutertre, M.B. Troadec, M. L. Kahn, S. Chevance, F. Gauffre, *Journal of Controlled Release* **2020**, 324, 430-439.



The Ouzo effect: A tool to elaborate high-payload nanocapsules

Clément Goubault^a, Flavien Sciortino^a, Olivier Mongin^a, Ulrich Jarry^b, Mégane Bostoën^b,
Hélène Jakobczyk^c, Agnès Burel^d, Stéphanie Dutertre^d, Marie-Bérengère Troadec^{e,f},
Myrtil L. Kahn^g, Soizic Chevance^a, Fabienne Gauffre^{a,*}

^a Univ Rennes, CNRS, ISCR-UMR6226, Rennes F-35000, France

^b Univ Rennes, CNRS, INSERM, BIOSIT - UMS 3480, LabCom Oncotrial, Biotrial Pharmacology, Rennes F-35000, France

^c Univ Rennes, CNRS, IGDR - UMR 6290, Rennes F-35000, France

^d Univ Rennes, CNRS, INSERM, BIOSIT - UMS 3480, US_S 018, MRic, Rennes F-35000, France

^e Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGB, Brest F-29200, France

^f CHRU Brest, laboratoire de génétique chromosomique, Brest, France

^g LCC, CNRS, Toulouse F-31000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hybridosomes[®]
Encapsulation
Nanoprecipitation
Ouzo effect
Hydrophobic cargo

ABSTRACT

We investigate the encapsulation in hybridosomes[®], a type of capsules unique regarding their structure and method of elaboration. Hybridosomes[®] are made of a single shell of inorganic nanoparticles (~5 nm) crosslinked with a polymer and are easily obtained *via* spontaneous emulsification in a ternary mixture THF/water/butylated hydroxytoluene (BHT). Our main finding is that an exceptionally high concentration of a hydrophobic model dye can be loaded in the hybridosomes[®], up to 0.35 mol.L⁻¹ or equivalently 170 g.L⁻¹ or 450,000 molecules/capsule. The detailed investigation of the encapsulation mechanism shows that the dye concentrates in the droplets during the emulsification step simultaneously with capsule formation. Then it precipitates inside the capsules during the course of solvent evaporation. *In vitro* fluorescence measurements show that the nanoprecipitated cargo can be transferred from the core of the hybridosomes[®] to the membrane of liposomes. *In vivo* studies suggest that the dye diffuses through the body during several days. The released dye tends to accumulate in body-fat, while the inorganic nanoparticles remain trapped into the liver and the spleen macrophages.

1. Introduction

Encapsulation is a major issue in nanomedicine for the delivery of toxic, unstable or poorly soluble drugs but also for the food and cosmetic industries [1–6]. A large variety of encapsulation systems are available, including polymer nanoparticles (NP), micelles, liposomes and polymersomes, silica NP, nanogels and solid-lipid NP, to name only a few [7–14]. The selection of the encapsulation technology is dictated both by the application and by the properties of the cargo. In particular, the hydrophilic or hydrophobic nature of the cargo is a determining factor. Thus, hydrophobic ingredients will most often be encapsulated in the hydrophobic core of solid-lipid NP or of polymer micelles, whereas nanogels or liposomes will be preferred for hydrophilic ones. Besides, for any medical or biotechnology application, the size needs to be precisely controlled as a key factor for the biodistribution of the nanocarrier [15–17]. Indeed, size strongly influences the adsorption of plasma proteins (opsonins) which triggers the clearance from the bloodstream. Renal filtration and accumulation in the liver also depend

on the NP size. Thus, it is generally admitted that particles with diameter below 5 nm are rapidly evacuated *via* renal clearance, whereas particles larger than 10 nm are captured by phagocytic cells, unless they are rendered stealthy by surface modification [15,17,18].

Whilst most studies have focused on the pharmacokinetics and therapeutic efficacy of encapsulated drugs, strategies to improve loading have been overlooked. To date, this remains one of the challenging issues of drug encapsulation. Indeed, achieving a very high encapsulation efficiency reduces losses of active ingredients. In addition, the more the carrier is loaded, the lower the level of excipient relative to the active molecules. In the case of liposomes, the simplest approach for drug encapsulation is passive loading: the liposomes are formed from a lipid film by rehydration in a buffer containing the drug to encapsulate. Therefore, the inner and outer drug concentrations are similar, and inherently limited by the solubility of the drug in the buffer. Whilst relatively convenient and easy, this method suffers from low encapsulation efficacy and high levels of non-encapsulated drugs, which need to be eliminated. The *active* (or *remote*) loading driven by a

* Corresponding author.

E-mail address: fabienne.gauffre@univ-rennes1.fr (F. Gauffre).

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>

Received 13 March 2020; Received in revised form 22 April 2020; Accepted 15 May 2020

Available online 18 May 2020

0168-3659/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

transmembrane pH-gradient has successfully enabled the loading of large amounts of drugs. Thus Doxil[®], which was the first liposomal formulation approved by the FDA in 1995, is an emblematic example of the use of active loading. The load reaches ca 10,000 doxorubicin molecules per liposome (typically 0.05–0.1 mol.L⁻¹), in the form of its ammonium salt [19–21]. The encapsulation mechanism is based on a transmembrane pH-gradient coupled to the precipitation of the ammonium salt in the core of the liposome. The precipitation produces a sink effect, which drives the doxorubicin inward [20,22]. Interestingly, the low solubility of the salt helps slowing down the release of the drug from the liposome. Active loading has been extended to a few other drugs including ciprofloxacin, vincristine, topotecan and irinotecan using ammonium sulfate, citric acid, calcium acetate, phosphate or EDTA gradients [22]. Despite these undeniable successes, the active loading method remains complex to implement. In addition, it is limited to a relatively low number of amphiphilic and acidic (or basic) drugs, and cannot be applied to hydrophobic drugs.

In contrast, the co-precipitation of polymers and drugs is a straightforward strategy to encapsulate hydrophobic drugs into polymer NP [23]. In practice, the polymer and hydrophobic solute are dissolved into an organic solvent miscible with water, typically acetone, ethanol or tetrahydrofuran (THF). This solution is then rapidly mixed with a large amount of water to induce nanoprecipitation. It was shown that under appropriate conditions this process can generate polymer/drug particles in the 50–300 nm range, with a very narrow size-dispersity [9,24]. However, the main drawback of co-precipitation in the form of particles is the large amount of excipient, generally biodegradable polymers such as poly(lactic acid) and poly-(iso-hexylcyanoacrylate) [8], relative to the encapsulated drug. For this reason, a process leading to pure drug nanoprecipitation in a capsule would be more advantageous, provided that the process remains simple to implement. Interestingly, the “Ouzo effect”, a process related to nanoprecipitation, can produce such capsules. The Ouzo effect occurs in ternary systems consisting of a water-miscible solvent, water, and a low amount of oil. Beyond a certain amount of water, oil-rich droplets separate from the continuous phase. This phenomenon is responsible for the appearance of the turbidity in the well-known Greek beverage and its analogues, such as Pastis or Raki [25–29]. More generally, different situations are grouped under the term “Ouzo effect”. Indeed, depending on the solvent/water ratio, these systems can form either a thermodynamically stable micro-emulsion (SFME for surfactant free micro-emulsion) or a metastable phase (the “Ouzo domain”) with oil droplets coalescing more or less rapidly. In the SFME domain, the droplets have a submicronic size with a very narrow polydispersity. Interestingly, it was shown by Ganachaud et al. that the droplets formed in the SFME domain can be used as templates to elaborate capsules of polymer [30] or fluorescent organic nanoparticles [31].

More recently, our group reported the use of the Ouzo effect to form hybrid inorganic-NP/polymer capsules, named hybridosomes[®] [32–34]. The procedure of elaboration of the hybridosomes[®] via the Ouzo effect is summarized in Fig. 1 [32]. Hydrophobic NP are first suspended in THF (as the water-miscible solvent) containing a preservative (Butylated Hydroxytoluene, BHT, as the lipophilic compound). Then, a large amount of water (typically 0.7–0.9 in terms of volumic fraction) is added to generate supersaturation of the oil and nucleation of droplets. Simultaneously to droplet formation, the NP which are also hydrophobic, become incompatible with the water-rich solvent, and precipitate at the interface of the Ouzo droplets. Although this process may seem similar to Pickering emulsions, we wish to underline here an important difference. In the case of Pickering emulsions, the particles are adsorbed at the interface, in equilibrium with the bulk phase, with an adsorption energy proportional to the square of the particle radius [35,36]. In practice, nanoparticles are only very weakly adsorbed, which severely limits their efficiency for the stabilization of emulsions. Here, in the contrary, the nanoparticles are irreversibly precipitated at the droplet surface. It is interesting to note that if a low

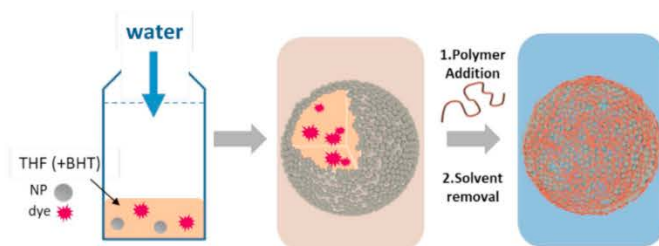


Fig. 1. Schematic representation of the process of elaboration of the Hybridosomes[®] via the nanoprecipitation of hydrophobic NP at the surface of Ouzo droplets. Water is rapidly added to a THF solution containing hydrophobic NP (here, Superparamagnetic Iron Oxide NP, coated with octylamine) and BHT (here THF 25%/water 75%/BHT < 0.01%). Ouzo droplets form and the NP cover their surface. Then, a polymer (PAA-*b*-PEG) is added to crosslink the NP. After removal of the solvent (evaporation or dialysis), the core is substituted with water.

amount of water is added (typically < 0.5 in the case of THF) the NP precipitates out of the ouzo domain, while the drops are not formed [32]. We then observe a macroscopic precipitate and not the formation of capsules. For this reason, it is necessary to add a large fraction of water quickly. Finally, we crosslink the NP with a polymer, which provides mechanical robustness to the capsules, enabling the replacement of the solvent core with water, either by evaporation or dialysis.

Herein, we hypothesized that the specific mechanism of capsule formation via the Ouzo effect is intrinsically very efficient for encapsulation. Using a fluorescent BODIPY dye with different spectral characteristics in the solid and liquid states [37], we investigated in great details the physical state of the dye in the course of its encapsulation in hybridosomes[®] and determined the encapsulation efficiency and the internal payload. Besides, we studied the release of the cargo, *in vitro* and *in vivo*, using fluorescence measurements and demonstrated that the dye is able to diffuse into cells cytoplasm and distributes through the body after intravenous injection.

2. Results & discussion

2.1. Encapsulation

2.1.1. A straightforward encapsulation procedure

To achieve encapsulation, the target compound is simply added to the organic phase beforehand as shown in Fig. 1 [37]. In the present work, we selected the fluorescent BODIPY dye 1 (Fig. 2A), synthesized in the laboratory, as a model compound to investigate the encapsulation. Indeed, this dye is poorly soluble in water (see SI section A), which

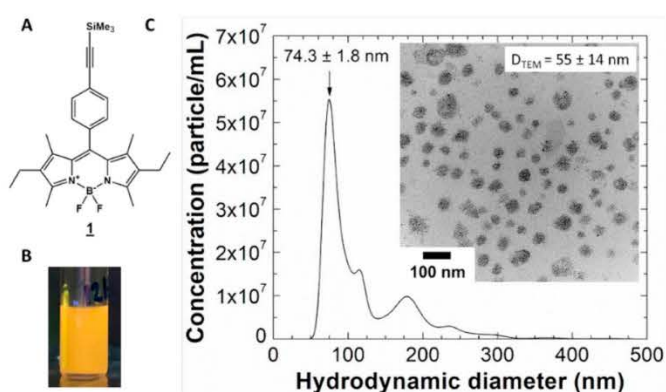


Fig. 2. (A) Structure of the BODIPY 1. (B–C) Characterization of a suspension of BODIPY-loaded hybridosomes[®] ([BODIPY] = 50 mmol.L⁻¹) (B) Photograph under UV-irradiation (λ_{exc} = 365 nm). (C) Size distribution using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Transmission Electron Microscopy (TEM) (inset).

is an important factor for its sequestration in the Ouzo droplets. Moreover, in contrast to most dyes, the solid form of **1** is also significantly emissive with a red shift compared to the soluble form, which is useful to probe its physical state and image dye-loaded hybridosomes[®]. To facilitate the purification step, we prepared the hybridosomes[®] from superparamagnetic iron oxide NP (SPION, 5 nm) [38] coated with an octylamine ligand. Then, the NP shell was crosslinked by a poly(ethylene glycol)_{2k}-*b*-poly(acrylic acid)_{7k} diblock copolymer (PEG-PAA). As shown in our previous work, these hybridosomes[®] (SPION@PEG-PAA hybridosomes[®]) can be easily separated from the bulk using a permanent magnet. In contrast to other separation methods such as centrifugation and steric exclusion, magnetic separation allows to selectively attract the magnetic hybridosomes[®], leaving aside non-encapsulated nanoprecipitated dye, if any.

Regarding the Ouzo system, we selected a THF/water mixture (25/75). Indeed, THF is a good solvent for both the alkylamine-coated SPION and **1**. No oil is added to the system, as standard commercial THF already contains traces of an hydrophobic antioxidant preservative, butylated hydroxytoluene (BHT ~ 320 mg.L⁻¹; water solubility ~0.6 mg.L⁻¹ [39]; LogP = 5.10 [40]) which can play the role of the oil in the Ouzo emulsion. Indeed, previous work has shown that BHT was responsible for the formation of droplets of the order of a few hundreds of nanometers in THF/water mixtures [41]. To confirm this result in our own conditions, dynamic light scattering (DLS) measurements of THF/water mixtures (25/75) were performed (Fig. S 1). Two types of THF were compared: the BHT-containing THF used in our preparations and the preservative-free THF. It appears clearly that the presence of BHT is necessary to observe such mesoscopic structures (with the principal mode for the mean hydrodynamic diameter at 190 nm). Both BODIPY and BHT can participate in the formation of Ouzo droplets. According to our measurements, BHT is present at a concentration of 0.36 mmol.L⁻¹ in the initial THF/water 25/75 mixture. As for BODIPY **1**, its concentration varies between 5 and 150 μmol.L⁻¹. Calculation of the solubility of these two compounds in THF/water mixtures, using the thermodynamic calculation software COSMO-RS (Fig. S2) [42], shows that **1** is much less soluble than BHT, by two or three orders of magnitude. Both concentrations are close to or beyond the solubility limits in the THF/water (25/75) continuous phase (1.3 mmol.L⁻¹ and 1.5 μmol.L⁻¹ for BHT and **1**, respectively). These calculations explain the presence of droplets observed in the mixture of water and commercial THF. They also suggest that under these conditions of concentration, BODIPY will be found mainly in the dispersed phase.

Dye-loaded hybridosomes[®] were prepared according to these conditions. Fig. 2 shows a photograph of a suspension of dye-loaded hybridosomes[®] under UV-irradiation ($\lambda_{exc} = 365$ nm), as well as size measurements using transmission electron microscopy (TEM) (mean diameter: 55 ± 14 nm) and nanoparticle tracking analysis (NTA) (hydrodynamic diameter main mode: 74.3 ± 1.8 nm). The absorbance spectra of **1** under its soluble and nanoprecipitated forms are displayed in Fig. S3.

2.1.2. Investigation of nanoprecipitation

We first investigated the behavior of the dye during nanoprecipitation, in the absence of NP. Fig. 3 shows the emission spectra of BODIPY **1**, in THF and in the THF/water mixture (25/75). Both spectra are very similar, with a main emission band at 538 nm suggesting that the dye is dissolved in both cases. However, at this point, we do not know whether the dye is dissolved in the continuous phase (THF/water mixture) or in the Ouzo droplets. After total evaporation of THF and centrifugal purification, the emission spectrum of the resuspended pellet exhibits two broad bands at 555 and 620 nm. The red shift of the main emission (from 538 to 555 nm) and the emergence of a second emission transition at lower energy are attributed to a nanodispersed form of **1** [43,44]. The presence of a nanodispersed form is confirmed by NTA which shows a population of 132 ± 4 nm (Fig. S4).

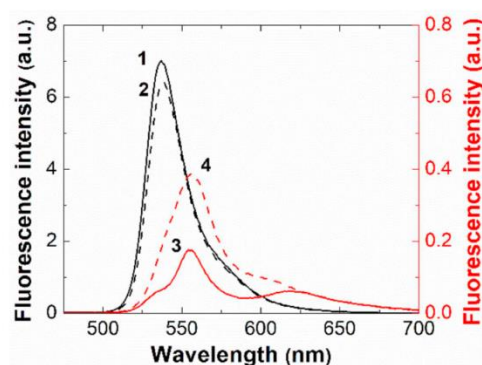


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of BODIPY **1** at different steps of the process ($\lambda_{exc} = 400$ nm). 1) Dissolved BODIPY in THF (plain black line); 2) BODIPY in THF/water (25/75) mixture (dashed black line); 3) Nanoprecipitated BODIPY (plain red line); 4) BODIPY encapsulated in PEG-PAA-stabilized iron oxide hybridosomes[®] (dashed red line). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In a second time, we measured the emission spectra of **1** when encapsulated in the hybridosomes[®]. In this case, the feature of the emission is very similar to that of the nanoprecipitated form, suggesting that the encapsulated dye is also a nanoprecipitate. Nevertheless, the peak at 555 nm seems to be more predominant compared to the nanodispersed non-encapsulated form of BODIPY. This may be due to a fraction of **1** solubilized in the PEG block of PEG-PAA. Note that both the nanoprecipitated and encapsulated form of BODIPY show lower emission intensity (~ 1/10) than the soluble form. At this point, our results clarify an important issue: the dye is mostly localized in the droplet. If this was not the case, it would nanoprecipitate outside of the hybridosomes[®] during the evaporation of the solvent.

Quantitative evaluation of loading. The efficiency of loading was characterized from the measurement of the absorbance of the dye in the hybridosomes[®] and in the supernatant after magnetic separation. Fig. 4 shows both the *encapsulation yield* (defined as the amount of encapsulated dye over the total amount of dye) and the *internal concentration* in the hybridosomes[®] ($[BOD]_{in}$), for different total concentrations of dyes ($[BOD]_{tot}$). These are calculated from experimental values reported in Table S1. For all concentrations, a very high encapsulation yield was found (88 ± 5%). Losses and variability can be partly attributed to the 2 steps of magnetic purifications. Interestingly, the internal concentration can be as high as 0.35 mol.L⁻¹ (or ~ 170 g.L⁻¹), which corresponds to ca 450,000 molecules/capsule. This is 2 to 50 times higher than values previously reported for Doxil[®] [19,20,45]. Changing the amount of SPION to prepare hybridosomes[®] does not modify the encapsulation yield (Fig. S5). This shows that there is no adsorption of the BODIPY on the NP surface. Indeed, if the encapsulation process was related to adsorption of the dye on the NP, there should be an increase of the encapsulated amount with the number of NP.

Moreover, we investigated the influence of the total dye concentration on the nanoprecipitation in the absence of NP. In this case, water was rapidly added to THF solutions of **1** of various concentrations (10–150 μmol.L⁻¹), to reach the ratio THF/water (25/75). Then, THF was evaporated and the suspension centrifugated. The nanoprecipitation yield was determined from UV–visible measurements of the pellet after redispersion in THF (Fig. 5). Very interestingly, the nanoprecipitation yield decreases with lowering dye concentrations to the low initial concentrations range, which was not observed in the presence of hybridosomes[®]. More precisely, Fig. 5 also shows that the concentration of dye recovered in the supernatant after centrifugation (empty squares) is ca 6 μmol.L⁻¹, whatever the total amount of dye in the mixture. The difference of behavior between the nanoprecipitation in

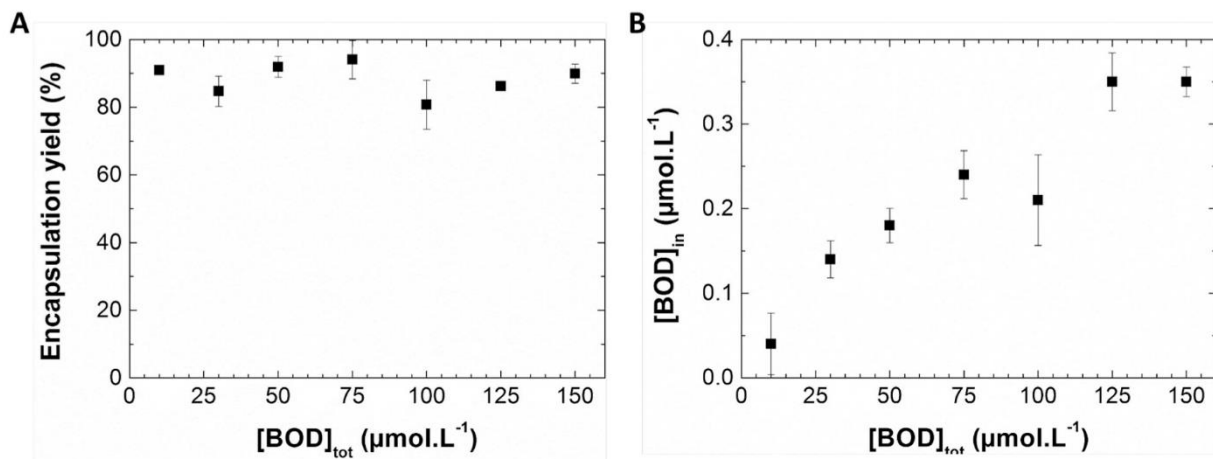


Fig. 4. (A) Encapsulation yield and (B) internal BODIPY concentration in hybridosomes® as a function of the total concentration of BODIPY.

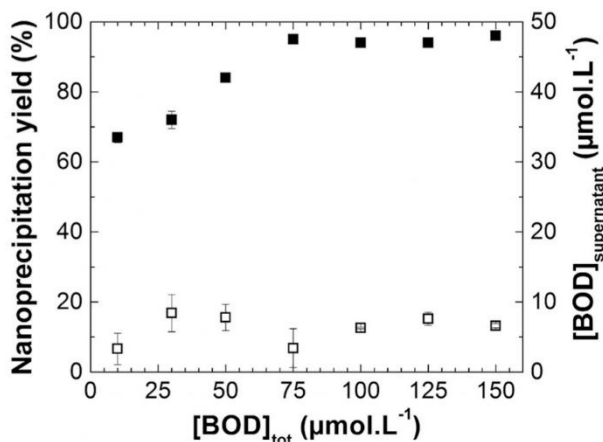


Fig. 5. Nanoprecipitation of BODIPY in water: nanoprecipitation yield (plain squares) and residual BODIPY concentration in the supernatant (empty squares).

solution and in the hybridosomes® is striking. For a detailed explanation, the reader is invited to refer to the SI section A “Comparison of the nanoprecipitation vs encapsulation yield”. In brief, (i) in the case of nanoprecipitation without NP, the fraction of unprecipitated dye is related to the solid/liquid equilibrium of the dye, and directly corresponds to the solubility of the dye. (ii) In the case of hybridosomes®, the encapsulation yield corresponds to the fraction of dye nanoprecipitated in the hybridosomes® reported to the total amount of dye. It is found constant, as a result of the partitioning equilibrium of the dye between the continuous and the dispersed phase.

2.2. In vitro and in vivo release

In a previous work, we demonstrated that hybridosomes® have a porous structure, with pores ~ 4 nm [33]. This should allow the leakage of encapsulated cargo. The water solubility of dye 1 being extremely low (ca 10^{-10} mol.L $^{-1}$), no release could be measured in pure water. Nevertheless, it is possible to investigate the release in a hydrophobic medium. To do this, we used a mixture of dye-loaded hybridosomes® and liposomes as a model of hydrophobic environment. In the presence of liposomes a dramatic enhancement of the fluorescence is observed (Fig. S6), due to the transfer of the dye to the membrane of the liposomes. Fig. 6a shows the kinetics of transfer of the dye from dye-loaded hybridosomes® to the membrane of liposomes, for three concentrations of liposomes (2, 5, and 8 mg.mL $^{-1}$). The amount of transferred dye increases with time over more than one week (Fig. 6b). In contrast, in

pure fetal bovine serum, only a small fraction of the dye is solubilized, within the first day, most probably in proteins. Besides, the higher the lipid concentration, the higher the level of dye extracted. This indicates that the transfer of the dye from the hybridosomes® to the liposomes is driven by its solubility in the lipid membrane. As also shown in Fig. 6, the solubilization kinetics of the nanoprecipitated dye is only slightly different from that of the hybridosome®-encapsulated dye, which confirms the porous character of the hybridosomes®. These kinetics measurements can be satisfactorily fitted by the empirical Korsmeyer-Peppas equation $f = k.t^n$ [46–48], with n close to 0.5 (Table S2 in SI section G), which strongly suggest that the limiting step is a diffusive process.

In a second step, BODIPY-loaded hybridosomes® were incubated with malignant GL261 cells. This cell line is a frequently used murine glioma model and we considered it in the perspective of a future evaluation of hybridosomes® for treatment of glioblastoma [49]. Fig. 7 shows confocal fluorescence images of dye-loaded hybridosomes® incubated with the cells, in the absence of any specific cell staining. Bright green spots are clearly visible inside the cells incubated with hybridosomes®. These are attributed to internalized BODIPY, probably in confined spaces such as lysosomes. In addition to these bright spots, the cytoplasm is rather uniformly stained with the dye, which obviously do not penetrate in the nucleus. Very interestingly, orange fluorescence is also visible and co-localized with the green fluorescence, validating the fact that it is attributable to 1 which shows a characteristic dual green-orange emission as described in Fig. 3. These results show that after 2 h of incubation, the dye is partially released in the cytoplasm, and partially enclosed in intracellular compartments. Release of hydrophobic Bodipy dyes from NP into the cytosol of cells was previously reported and can occur even in the absence of uptake of the particles, through membrane mediated diffusion [50]. Note that internalization of nano-objects into cells depends both on the physico-chemical features of the nano-objects and on the cell types, phagocytic cells being more prone to internalization of particles over 50 nm [51]. In the present case, using iron oxide hybridosomes®, it is difficult to ascertain whether the hybridosomes® shells are taken up by the cells or not. However, experiments achieved using hybridosomes® made from fluorescent quantum dots suggest that they mostly remain at the membrane of the cells.

Finally, dye-loaded hybridosomes® were injected into mice *via* two injection modes. Firstly, dye-loaded hybridosomes® were injected in matrigel® seeded with Nalm6 cells (Fig. 8 A&B). Nalm6 cells are malignant lymphoblast cells, commonly used as model of acute lymphoblastic leukemia [52]. The green fluorescence was monitored over 2 weeks with a bioimager. Both the intensity (Fig. 8 B) and the size of the fluorescent zone (Fig. 8 A) increase over the duration of the study.

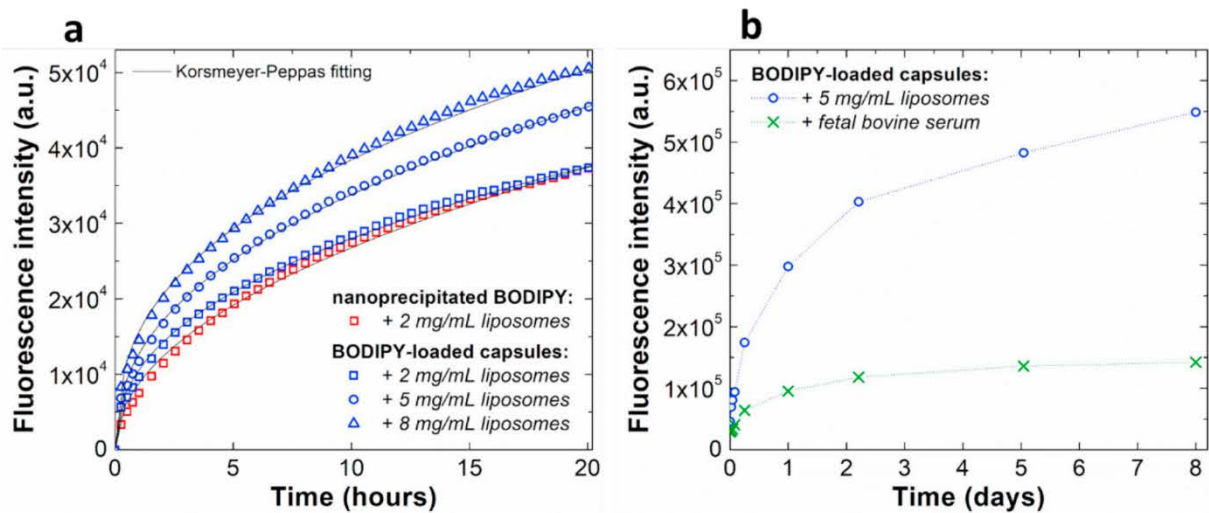


Fig. 6. Time-dependent release of BODIPY. (a) transfer from dye-loaded hybridosomes[®] to liposomes (lipid: 2 (□), 5 (○), 8 (△) mg.mL⁻¹) and (□): transfer from nanoprecipitated dye to liposomes (lipid: 2 mg.mL⁻¹); black lines: fit by empirical equation: $f = k.t^n$. (b): long time scale transfer of **1** from dye-loaded hybridosomes[®] to liposomes (○, lipid: 5 mg.mL⁻¹) and to fetal bovine serum (×).

Many nanomedicine studies have reported that, in contrast to molecular compounds, nanoparticles injected intratumorally remain close to the injection site because they are unable to migrate effectively through the extracellular matrix [53–55]. As we have just shown, the encapsulated dye can easily be released from hybridosomes[®] and incorporated into lipophilic reservoirs. In addition, green fluorescence is strongly attenuated through the body and can only be monitored when close to the surface. Therefore, the spreading of the fluorescent zone several millimeters away from the site of injection is most probably due to the release of the molecular dye and its accumulation into subcutaneous fat. Secondly, we performed an intravenous retro orbital injection (Fig. 8 C & D). A green fluorescence appears gradually all over the mouse, with an increasing intensity over 5 days. This is also due to the accumulation of the dye in fatty tissues under the skin. Since previous experiments using MRI monitoring of SPION hybridosomes[®] evidenced that they were captured by liver and spleen macrophages within 30 min after injection [32], the present observations strongly support a release of the dye in the blood stream.

In order to complement these results, TEM was performed on

sections of liver and spleen 24 h after intravenous injection of hybridosomes[®] (Fig. 9). As indicated by arrows, structures of ca 100 nm in diameter and presenting a strong contrast effect are detected in both the liver and the spleen. In accordance with our previous *in vivo* MRI experiments [32], it is reasonable to identify these structures as internalized hybridosomes[®]. In the liver, they were found in hepatocytes as well as in Kupffer cells (liver macrophages). Regarding the spleen, they were observed only in macrophage cells connected to endothelial cells and not in the red pulp lymphocytes cells. Within the cells, NP were mainly localized in vesicular compartments and not scattered in the cytoplasm, suggesting that the hybridosomes[®] were especially captured by the cellular degradation system. Since we have observed previously an accumulation of the hybridosomes[®] in the liver in the course of the first hour after intravenous injection [32], it may seem surprising that the fluorescence still increases after 5 days. The hypothesis of a rapid release in the blood pool, followed by a slow accumulation in the body fat may be ruled out. Indeed, our *in vitro* release experiments show a very limited transfer to serum albumin which suggests a low dissolution of the dye in the blood pool. In addition, molecular compounds

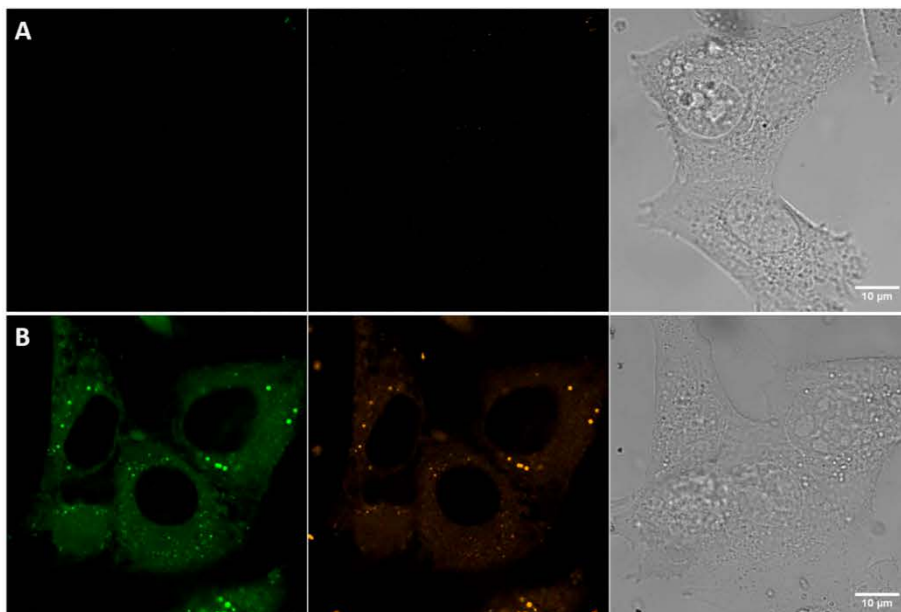


Fig. 7. Confocal fluorescence imaging of malignant GL261 cells (A) before and (B) after 2 h incubation with BODIPY-loaded hybridosomes[®]. From left to right, green fluorescence channel, orange fluorescence channel and transmitted light image. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

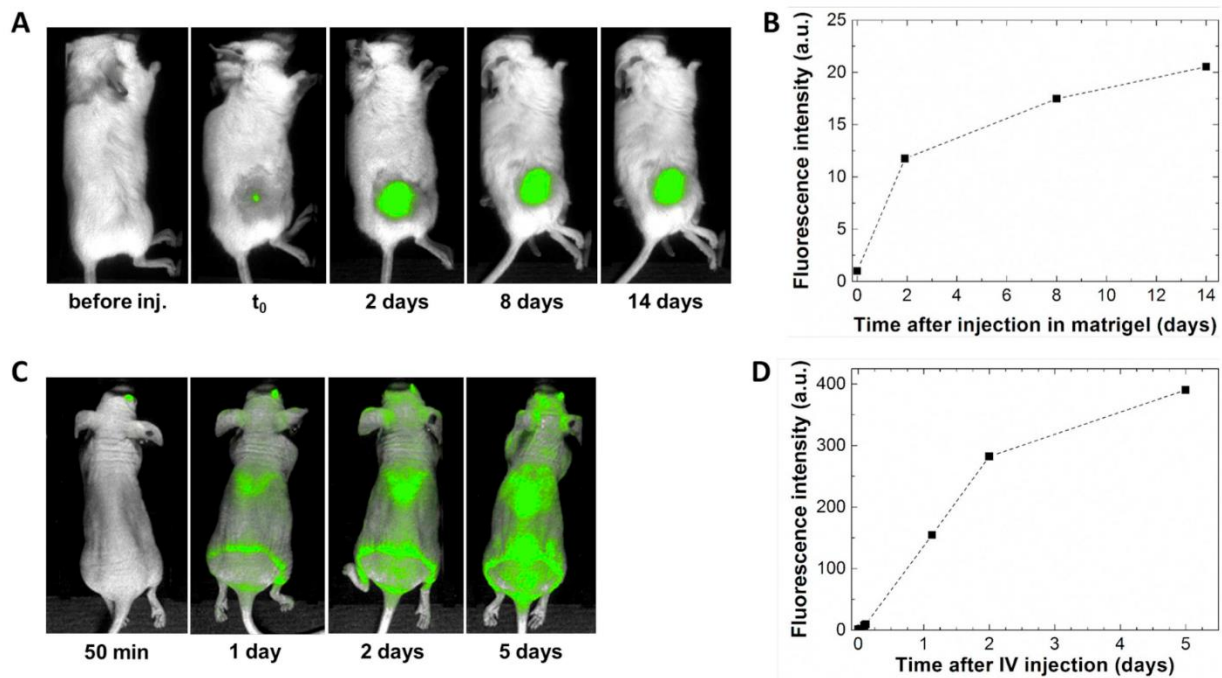


Fig. 8. (A) *In vivo* fluorescence bioimaging after injection of dye-loaded hybridosomes[®] in matrigel[®] containing Nalm6 cells; (B) Time evolution of the fluorescence intensity measured from (A). (C) *In vivo* fluorescence bioimaging after intravenous injection (retro-orbital vein). ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$). (D) Time evolution of the fluorescence intensity measured from (A).

released in the blood pool would be rapidly eliminated *via* renal excretion. A more likely mechanism would involve the Monocyte Phagocytic System (MPS) [56]. Indeed, it is widely reported in the case of nanoparticle formulation of hydrophobic drugs, that the particles are first uptaken by the MPS, and accumulates mainly in macrophages of the liver (Kupffer cells) and of the spleen [57,58]. Inside these cells they traffic through lysosomes. Due to their lipophilic character, they may pass the lysosomal membrane and finally exit the cell. This result in a pharmacokinetic profile with much prolonged $t_{1/2}$.

Finally, it is interesting to summarize the encapsulation properties of hybridosomes[®] by comparing them with similarly structured nanovectors. In fact, there are relatively few examples of capsules whose walls are entirely or partly made of nanoparticles, and capable of encapsulation [59–63]. Regarding the encapsulation efficiency, it is straightforward to calculate that we can reach a mass percentage of 47% ($m_{dye}/m_{vesicle}$). In comparison, Nie reported a maximal loading of 18.4% for the encapsulation of a photosensitizer (Ce6) into vesicles made from gold NP [62] and of 28% for doxorubicin into iron oxide vesicles [63], using NP tethered with amphiphilic block-copolymers. In both cases, the encapsulation of the water-soluble drug is operated *via* the film rehydration method, an aqueous solution of the cargo being used as the solvent for the rehydration process. Lecommandoux et al. reported a slightly higher load (34%) of an hydrophobic form of doxorubicin in the membrane of magnetic polymersomes, using a coprecipitation method [61]. The core encapsulation of hydrophobic drugs such as indomethacin or protonated ibuprofen in capsules made from Pickering emulsion is also reported, with relatively low loading efficiency (6%) [59,64]. This quantitative comparison of mass encapsulation rates ($m_{dye}/m_{vesicle}$) is questionable, as it varies greatly with the density of the NP used (e.g. AuNP vs SPION), the proportion of polymer in the shell or the presence of an oil core in the case of Pickering emulsions. However, our results clearly show an unprecedented loading, thanks to the nanoprecipitation of the hydrophobic cargo within the core of the capsules.

3. Conclusion

The results presented here lift the veil on the mechanism of encapsulation in hybridosomes[®], using the Ouzo effect. The essential result of this study is that we were able to encapsulate the model cargo in nanocapsules up to 170 g.L^{-1} , or equivalently 450,000 molecules/capsule. Thanks to the specific emission properties of the model cargo, we could monitor its physical state throughout the encapsulation process and provide a detailed mechanism. We show that this exceptional loading ability is specific to the Ouzo effect, since it generates at the same time the accumulation of the cargo in the Ouzo droplets and the formation of capsules around the droplets. This procedure is also extremely straightforward to implement.

Thanks to *in vitro* and *in vivo* fluorescence experiments, we were able to observe the cellular internalization of the cargo, after incubation with cells, and prove its availability in solution or after body injection. It is clear that the cargo (encapsulated under the form of a nanoprecipitate) can dissolve, leak out across the hybridosome[®] shell and transfer to any lipophilic compartment, such as liposomes membrane or body fat. Note that the controlled release of the drug may be achieved by adding additional polymer layers, but this is beyond the scope of this study.

This exceptional encapsulation method can be applied both to capsules made only of polymers and to hybridosomes[®]. In the case of hybridosomes[®], the intrinsic properties of nanoparticles can add significant value. For example, the SPION used here ease the purification of the nano-carriers by magnetic separation, and allow electron microscopy observation and MRI monitoring. The use of gold nanoparticles seems also very promising in combination with the encapsulation of an anti-cancer molecule, for treatments combining radiotherapy and chemotherapy, for example in the case of glioblastoma. Work is in progress in this direction.

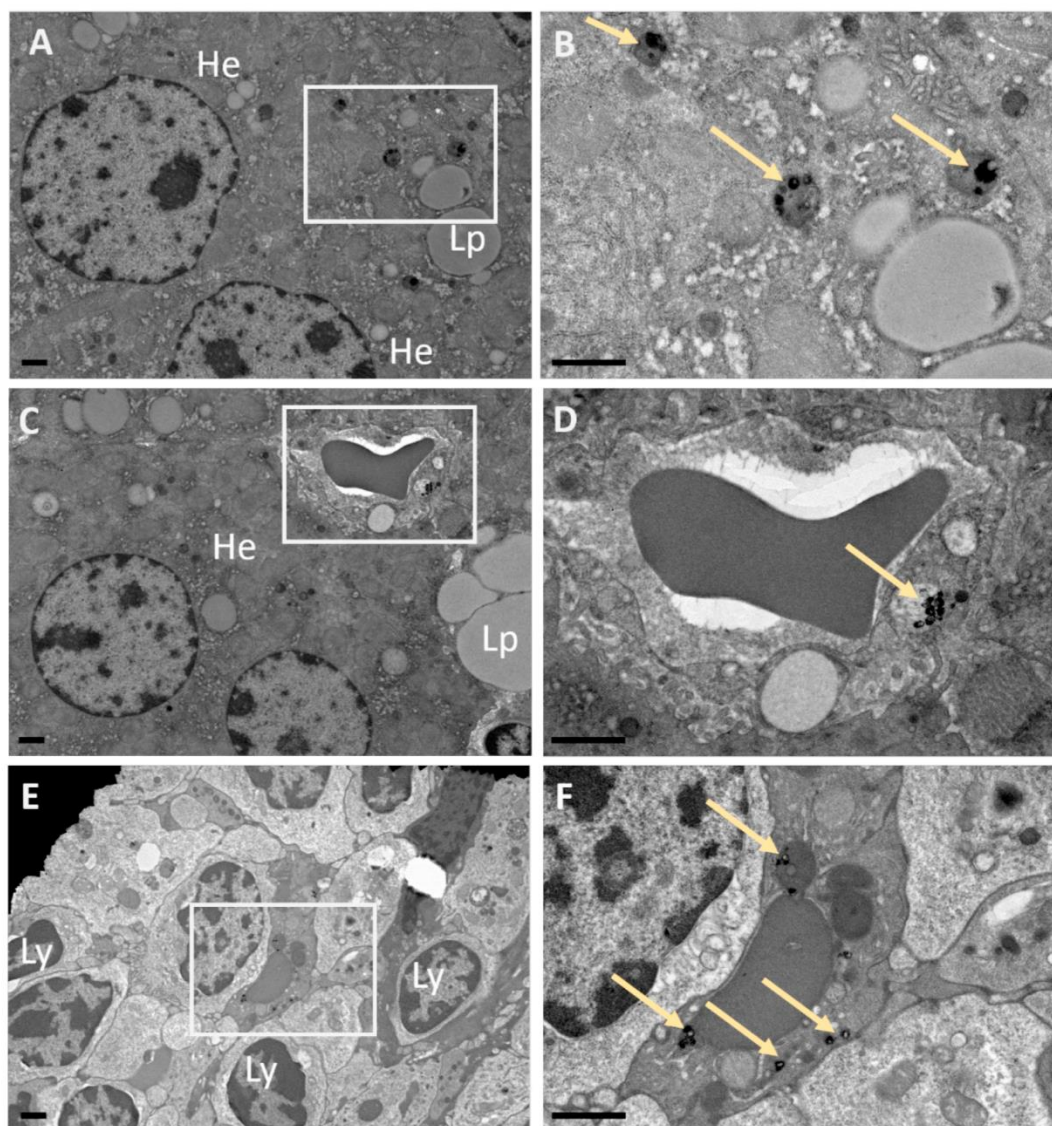


Fig. 9. Transmission Electron Microscopy (TEM) images of the liver (A, B, C and D) and the spleen (E and F) of mice 24 h after intravenous injection of hybridosomes[®]. A, C and E represent cell architecture at low magnification. Ultrastructural details inside the white rectangles in A, C and E are imaged in B, D and F, respectively. Yellow arrows indicate the NP inside the cells. Abbreviations: Hepatocyte (He), Lipid globule (Lp), Lymphocyte (Ly). Scale bar: 1 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Materials & methods

4.1. Materials

Superparamagnetic iron oxide NP (SPION) ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; mean diameter 5 nm) were synthesized following a reported procedure [38] but using in addition to octylamine (2 eq.), 1eq. of oleic acid. 4,4-Difluoro-8-(4-trimethylsilylethynylphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene **1** (BODIPY, $M = 476.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was synthesized following a reported procedure [65]. Poly(ethylene glycol)-*b*-Poly(acrylic acid) ($M_{\text{PEG}} = 2 \text{ kDa}$; $M_{\text{PAA}} = 7.2 \text{ kDa}$) were kindly provided by G. Casterou. Tetrahydrofuran (GPR Rectapur $\geq 99\%$ stabilized) was purchased from VWR and used as received. Samples were made using MilliQ water ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.2. Elaboration of BODIPY-loaded hybridosomes[®]

Dye-loaded hybridosomes[®] were prepared by an implementation of the previously published procedure for the preparation of hollow hybridosomes[®] [32]. In a typical experiment, water was added to a THF

solution containing dye **1** to reach THF/water 25/75. The final Fe_2O_3 concentration was in the range of $10\text{--}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The PEG-PAA was then added at a concentration of $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ([acrylic acid units] = $2.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). After a quick homogenization, the solvent was slowly evaporated overnight at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Two 24 h magnetic separation were performed, the supernatant was discarded and the purified hybridosomes[®] were redispersed in fresh water. The hybridosomes[®] suspension was characterized by NTA (*vide infra*) and TEM using a Jeol 1400 electron microscope equipped with a Gatan Orius 1000 camera.

4.3. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

The size distribution (hydrodynamic diameter) and particle concentration was determined by NTA. NTA was carried out with a Nanosight LM10 device system (Malvern Panalytical) equipped with a 40 mW laser working at $\lambda = 638 \text{ nm}$. Video sequences were recorded via a CCD camera operating at 30 frames per second and evaluated via the NANOSIGHT NTA 2.0 Analytical Software Suite. A blank NTA measurement with pure water was performed to exclude a possible contamination with scatterers. For each sample, 3 acquisitions with an

acquisition time of 60 s were performed at 25 °C. Calculations of the hydrodynamic diameters were achieved taking the viscosity of water at the temperature of measurement.

4.4. Titration of nanoprecipitated BODIPY in water

The nanoprecipitated BODIPY 1 was prepared by evaporating THF from THF/water (25/75) solutions of BODIPY. Then the suspensions were centrifuged (20 min, 3820 g, Mikro 220R - Hettich). The supernatant was extracted twice with dichloromethane, the organic phase was evaporated and re-dissolved in THF. The pellet was directly re-dissolved in THF. The titration of BODIPY in THF is performed by absorbance measurements ($\lambda_{\max} = 526$ nm) based on a calibration curve in the range of 0.5;20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ BODIPY.

The nanoprecipitation yield (NY) is calculated as follows:

$$NY (\%) = \frac{[BOD]_{\text{pellet}}}{[BOD]_{\text{pellet}} + [BOD]_{\text{sup}}} \times 100$$

where $[BOD]_{\text{pellet}}$ and $[BOD]_{\text{sup}}$ are the concentrations of BODIPY in the pellet and in the supernatant after centrifugation, respectively.

4.5. Encapsulation efficiency

The encapsulation yield (EY) in hybridosomes® was determined using an absorbance microplate reader (FLUOstar Omega - BMG Labtech), following this typical procedure: in a 96 wells absorbance microplate, the absorbance of both pellets and supernatants obtained by magnetic separation were determined at $\lambda_{\max} = 535$ nm. The EY was calculated as follows:

$$EY (\%) = \frac{A_{\text{pellet}}}{A_{\text{pellet}} + A_{\text{sup}}} \times 100$$

where A_{pellet} is the absorbance of the magnetically purified BODIPY-loaded hybridosomes® suspension and A_{sup} is the absorbance of the supernatant.

The total internal volume of the hybridosomes® is calculated using the formula:

$$V = \sum n_i \frac{4\pi}{3} R_i^3$$

Which is a sum over all the discrete size bins (i) containing each a number n_i of particles of hydrodynamic radius R_i .

The internal concentration in hybridosomes® can be calculated from EY and NTA measurements as follows:

$$C_{\text{in}} = \frac{n_{\text{tot}} \times EY}{V}$$

where n_{tot} stands for the total amount of dye molecules. Error bars correspond to the mean deviation from the trend curve.

4.6. ICP-OES for determination of the iron concentration

Typically, the hybridosomes® were dissolved in nitric acid for one week under heating at 40 °C. After appropriate dilution with milliQ water, the iron concentration was determined using an iCAP 7000 Series ICP-OES spectrometer (Thermo Scientific) under an argon flow, previously calibrated from 0 to 2 ppm of Fe.

4.7. COSMO-RS calculations

COSMO-RS calculations were performed using COSMOtherm (evaluation version). The Conductor-like Screening Model for Realistic Solvation (COSMO-RS), combines quantum chemical DFT calculations with statistical thermodynamics and allows for the prediction of a broad range of physico-chemical properties of molecules in solution including solubility. Calculation parameters were set as follow

($T = 25$ °C; ΔG_{fusion} estimated by software).

4.8. Fluorescence of BODIPY in different environments

Emission spectra were recorded on a Fluorolog-3 fluorimeter (Horiba Jobin-Yvon). The measurements were performed at 90° from incident light in a 45 μL fluorescence quartz cuvette (Hellma Suprasil; path length 3 × 3 mm) at an excitation wavelength of 400 nm and the emission was recorded from 450 to 750 nm.

4.9. In vitro release

The release kinetics of BODIPY in different environments was studied by incubating BODIPY-loaded hybridosomes® or nanodispersed BODIPY with liposomes (at different concentrations) or Fetal Bovine Serum (FBS). Typically, 50 μL of BODIPY-loaded hybridosomes® were incubated with 50 μL of a suspension of liposomes, and water was added to reach a total volume of 250 μL . The liposomes dispersions (10 mg.mL^{-1} ; 90%wt eggPC; 10%wt PEG₂₀₀₀-DSPE; $Z_{\text{av}} = 72 \pm 0.8$ nm; PDI = 0.235) were kindly provided by F. Camerel (ISCR). For short-time fluorescence release in liposomes, the fluorescence intensity was monitored at 25 °C using a FLUOstar Omega (BMG Labtech) microplate reader equipped with a 485 ± 6 nm excitation band-path filter and a 520 ± 5 nm emission band-path filter. For long-time release kinetics, the fluorescence intensity at 537 nm upon excitation at 480 nm was monitored for 8 days using a Fluorolog-3 fluorimeter (Horiba Jobin-Yvon). In this particular case, the shell of the hybridosomes® was composed of SPION and QD (CdSe/ZnS Cytodiagnosics) emitting at 665 nm.

4.10. Cell culture and confocal imaging

GL261 cells were cultured in DMEM medium (Dutscher, Brumath, France) supplemented with 10% heat inactivated FBS (Dutscher) and 2 mM L-Glutamine (PanBiotech, Aidenbach, Bavaria, Germany) in 8-well chambered coverglass suitable for confocal microscopy (Nunc™ Lab-Tek™). Wells were seeded with 25,000 cells/well and incubated with 10 μL of concentrated hybridosomes® ($[\text{Fe}] \approx 200$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$) for 3 h at 37 °C 5% CO₂. The culture medium is replaced by 100 μL of imaging medium before the confocal imaging. Images were acquired with a LSM 880 confocal (Zeiss) equipped with a 63 × oil-immersion objective (NA 1.4) driven by ZEN software. The excitation laser was set at 488 nm, the green emission channel detector at 517–544 nm and the orange emission channel detector at 579–624 nm. Images were analyzed and processed with ImageJ.

4.11. In vivo release

For the release study in matrigel® (Growth Factor Reduced (GFR) matrigel®, Corning, Tewksbury, MA), one immunocompromized adult NSG mouse (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; Charles River Laboratories, Wilmington, MA), anesthetized with inhaled isoflurane, was injected subcutaneously with matrigel® containing Nalm6 cells (v/v: 50 μL matrigel® mixed with 50 μL 1 million Nalm6 in PBS). After 9 days, 50 μL of BODIPY-loaded hybridosomes® were injected in the matrigel® and the fluorescence was monitored the following days, using a PhotonImager Optima bioimager (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France) equipped with a highly sensitive cooled CCD camera. The same region of interest (ROI) was used for all the recordings in order to compare the intensities over time. For the systemic release study, two Balb/c nude mice (Charles River), anesthetized with isoflurane, were injected 50 μL of BODIPY-loaded hybridosomes® in the retro-orbital vein and the fluorescence was monitored over a week. The whole-mouse photon intensity was recorded. The mice were bred in the animal facility of the University of Rennes (Arche/SFR BIOSIT) under SPF status and used at 6–12 weeks of age. These experiments were approved

by the ethics committee for animal experimentation of the French Ministry for Higher Education and Scientific Research (Agreement A-35-238-40).

4.12. Transmission Electron Microscopy (TEM) of biological samples for in vivo biodistribution study

C57Bl/6 mice were intravenously injected with 50 µL of hybridosomes® (1 mg Fe per kg bodyweight) and euthanized 24 h after the injection. After the dissection of the liver and the spleen, small pieces of tissues were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer during 1 h at room temperature. Then, after 3 washes in cacodylate buffer, the samples were impregnated in heavy metal solution (1% osmium tetroxide) for 1 h. Next, after rinsing, the samples were dehydrated with graded acetone series following standard procedures and embedded in Epon-Araldite-DMP30 resin (polymerized at 60 °C for 48 h). Ultrathin sections of 80 nm were cut with a Leica UC7 ultramicrotome (LeicaWetzlar, Germany), collected on copper grids, poststained with 2% uranyl acetate solution and finally imaged with a Jeol 1400 electron microscope (Jeol Co., Ltd., Tokyo, Japan) equipped with a Gatan Orius 1000 camera (Gatan Ametek, Pleasanton, USA).

Acknowledgements

We are very grateful to M. Ciancone and F. Camerel for providing the liposomes, and to B. Lefeuvre for ICP measurements. We thank the animal core facility ARCHE (ARCHE /SFR BIOSIT, Université Rennes 1, France) for animal husbandry and care. This work was supported by the CNRS, the University Rennes 1, the Région Bretagne, and the UMS BIOSIT (CNRS, University of Rennes 1, INSERM).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>.

References

- V. Đorđević, A. Paraskevopoulou, F. Mantzouridou, S. Lalou, M. Pantić, B. Bugarski, V. Nedović, Encapsulation Technologies for Food Industry, in: V. Nedović, P. Raspor, J. Lević, V. Tumbas Šaponjac, G.V. Barbosa-Cánovas (Eds.), *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 329–382, https://doi.org/10.1007/978-3-319-24040-4_18.
- M.D. Saifullah, M.R.I. Shishir, R. Ferdowsi, M.R. Tanver Rahman, Q. Van Vuong, Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review, *Trends Food Sci. Technol.* 86 (2019) 230–251, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>.
- J. Riikonen, W. Xu, V.-P. Lehto, Mesoporous systems for poorly soluble drugs – recent trends, *Int. J. Pharm.* 536 (2018) 178–186, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.054>.
- U. Wais, A.W. Jackson, T. He, H. Zhang, Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles, *Nanoscale*. 8 (2016) 1746–1769, <https://doi.org/10.1039/C5NR07161E>.
- C. Ye, H. Chi, A review of recent progress in drug and protein encapsulation: approaches, applications and challenges, *Mater. Sci. Eng. C* 83 (2018) 233–246, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.10.003>.
- F. Casanova, L. Santos, Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review, *J. Microencapsul.* 33 (2016) 1–17, <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1115900>.
- K. Miyata, R.J. Christie, K. Kataoka, Polymeric micelles for nano-scale drug delivery, *React. Funct. Polym.* 71 (2011) 227–234, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.009>.
- C.J. Martínez Rivas, M. Tarhini, W. Badri, K. Miladi, H. Greige-Gerges, Q.A. Nazari, S.A. Galindo Rodríguez, R.Á. Román, H. Fessi, A. Elaissari, Nanoprecipitation process: from encapsulation to drug delivery, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 66–81, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>.
- C.I.C. Crucho, M.T. Barros, Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C* 80 (2017) 771–784, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>.
- C.I.C. Crucho, Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine, *ChemMedChem*. 10 (2015) 24–38, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402290>.
- D.E. Discher, F. Ahmed, Polymersomes, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 323–341, <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095838>.
- J.S. Lee, J. Feijen, Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization, *J. Control. Release* 161 (2012) 473–483, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.005>.
- A.F. Moreira, D.R. Dias, L.J. Correia, Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: a review, *Microporous Mesoporous Mater.* 236 (2016) 141–157, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.038>.
- A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications, *J. Control. Release* 200 (2015) 138–157, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>.
- M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats, *Nanomedicine*. 3 (2008) 703–717, <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>.
- F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 505–515, <https://doi.org/10.1021/mp800051m>.
- H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B. Itty Ipe, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1165–1170, <https://doi.org/10.1038/nbt1340>.
- G. Chen, I. Roy, C. Yang, P.N. Prasad, Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2826–2885, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>.
- Y. Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release* 160 (2012) 117–134, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- X. Wei, D. Shamrakov, S. Nudelman, S. Peretz-Damari, E. Nativ-Roth, O. Regev, Y. Barenholz, Cardinal role of Intraliposome doxorubicin-sulfate Nanorod crystal in Doxil properties and performance, *ACS Omega*. 3 (2018) 2508–2517, <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01235>.
- P.P. Wibroe, D. Ahmadvand, M.A. Oghabian, A. Yagmur, S.M. Moghimi, An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome, *J. Control. Release* 221 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.021>.
- T. Li, D. Cipolla, T. Rades, B.J. Boyd, Drug nanocrystallisation within liposomes, *J. Control. Release* 288 (2018) 96–110, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.001>.
- E. Lepeltier, C. Bourgaux, P. Couvreur, Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: application to drug delivery devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 71 (2014) 86–97, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>.
- C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: critical comparison, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 163 (2011) 90–122, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.005>.
- S.A. Vitale, J.L. Katz, Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”, *Langmuir*. 19 (2003) 4105–4110, <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- I. Grillo, Small-angle neutron scattering study of a world-wide known emulsion: The Pastis, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 225 (2003) 153–160, [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00331-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00331-5).
- N.L. Sitnikova, R. Sprik, G. Wegdam, E. Eiser, Spontaneously formed trans-Anethole/water/alcohol emulsions: mechanism of formation and stability, *Langmuir*. 21 (2005) 7083–7089, <https://doi.org/10.1021/la046816l>.
- D. Carreau, I. Pianet, P. Brunerie, B. Guillemat, D.M. Bassani, Probing the initial events in the spontaneous emulsification of *trans*-Anethole using dynamic NMR spectroscopy, *Langmuir*. 23 (2007) 3561–3565, <https://doi.org/10.1021/la062339q>.
- E. Scholten, E. van der Linden, H. This, The life of an Anise-flavored alcoholic beverage: does its stability cloud or confirm theory? *Langmuir*. 24 (2008) 1701–1706, <https://doi.org/10.1021/la702186g>.
- X. Yan, P. Alcouffe, G. Sudre, L. David, J. Bernard, F. Ganachaud, Modular construction of single-component polymer nanocapsules through a one-step surfactant-free microemulsion templated synthesis, *Chem. Commun.* 53 (2017) 1401–1404, <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.
- X. Yan, M. Remond, Z. Zheng, E. Hoibian, C. Soulage, S. Chambert, C. Andraud, B. Van der Sanden, F. Ganachaud, Y. Bretonnière, J. Bernard, General and scalable approach to bright, stable, and functional AIE Fluorogen colloidal nanocrystals for in vivo imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 25154–25165, <https://doi.org/10.1021/acsaami.8b07859>.
- F. Sciortino, G. Casterou, P.-A. Eliat, M.-B. Troadec, C. Gaillard, S. Chevance, M.L. Kahn, F. Gauffre, Simple engineering of polymer-nanoparticle hybrid Nanocapsules, *ChemNanoMat*. 2 (2016) 796–799, <https://doi.org/10.1002/cnma.201600155>.
- F. Sciortino, M. Thivolle, M.L. Kahn, C. Gaillard, S. Chevance, F. Gauffre, Structure and elasticity of composite nanoparticle/polymer nanoshells (hybridosomes®), *Soft Matter* 13 (2017) 4393–4400, <https://doi.org/10.1039/C7SM00705A>.
- H. Jakobczyk, F. Sciortino, S. Chevance, F. Gauffre, M.-B. Troadec, Promises and limitations of nanoparticles in the era of cell therapy: example with CD19-targeting chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 813–824, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.075>.
- B.P. Binks, Particles as surfactants – similarities and differences, *Interface Science*. 21 (2002).
- K. Larson-Smith, D.C. Pozzo, Pickering emulsions stabilized by nanoparticle surfactants, *Langmuir*. 28 (2012) 11725–11732, <https://doi.org/10.1021/la301896c>.
- F. Sciortino, G. Ryzdek, F. Grasset, M.L. Kahn, J.P. Hill, S. Chevance, F. Gauffre, K. Ariga, Electro-click construction of hybrid nanocapsule films with triggered delivery properties, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 2761–2770, <https://doi.org/10.1039/C7PY00000A>.

- 10.1039/C7CP07506E.
- [38] G. Casterou, V. Collière, P. Lecante, Y. Coppel, P.-A. Eliat, F. Gaufrere, M.L. Kahn, Improved transversal Relaxivity for highly crystalline nanoparticles of pure γ -Fe₂O₃ phase, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 18855–18861, <https://doi.org/10.1002/chem.201502905>.
- [39] H. Inui, K. Itoh, M. Matsuo, J. Miyamoto, Studies on biodegradation of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) in the environment part-III biodegradability of BHT with activated sludge, *Chemosphere*. 8 (1979) 383–391, [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(79\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(79)90129-2).
- [40] US EPA, Estimation programs Interface suite™ for Microsoft® windows, v 4.11, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2020.
- [41] Z. Li, H. Cheng, J. Li, J. Hao, L. Zhang, B. Hammouda, C.C. Han, Large-scale structures in tetrahydrofuran–water mixture with a trace amount of antioxidant Butylhydroxytoluene (BHT), *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 7887–7895, <https://doi.org/10.1021/jp203777g>.
- [42] M. Hahn, S. Krickl, T. Buchecker, G. Jošt, D. Tournaud, P. Bauduin, A. Pfützner, A. Klamt, W. Kunz, Ab initio prediction of structuring/mesoscale inhomogeneities in surfactant-free microemulsions and hydrogen-bonding-free microemulsions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 8054–8066, <https://doi.org/10.1039/C8CP07544A>.
- [43] Y. Liao, V. Génot, R. Méallet-Renault, T.T. Vu, J.-F. Audibert, J.-P. Lemaistre, G. Clavier, P. Retailleau, R.B. Pansu, Spectroscopy of BODIPY in solid phase: crystal and nanoparticles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 3186–3195, <https://doi.org/10.1039/C2CP43289G>.
- [44] L. Wang, L. Li, D. Cao, A BODIPY-based dye with red fluorescence in solid state and used as a fluorescent and colorimetric probe for highly selective detection of cyanide, *Sensors Actuators B Chem.* 239 (2017) 1307–1317, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.112>.
- [45] Y. Barenolz, G. Haran, Method of Amphiphatic Drug Loading in Liposomes by pH Gradient, US5192549A, <https://patents.google.com/patent/US5192549A/en>, (1993).
- [46] Mathematical models of drug release, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Elsevier, 2015, pp. 63–86, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- [47] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).
- [48] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release* 5 (1987) 23–36, [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4).
- [49] T. Szatmári, K. Lumniczky, S. Désaknai, S. Trajceviski, E.J. Hídvégi, H. Hamada, G. Sáfrány, Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy, *Cancer Sci.* 97 (2006) 546–553, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00208.x>.
- [50] C.K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z.-J. Zhu, S. Menichetti, V.M. Rotello, Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into Cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1360–1361, <https://doi.org/10.1021/ja808137c>.
- [51] K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel, A.J. Hendriks, Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 481–492, <https://doi.org/10.1002/etc.2470>.
- [52] L. Debaize, H. Jakobczyk, S. Avner, J. Gaudichon, A.-G. Rio, A.A. Sérandour, L. Dorsheimer, F. Chalmel, J.S. Carroll, M. Zörnig, M.A. Rieger, O. Delalande, G. Salbert, M.-D. Galibert, V. Gandemer, M.-B. Troadec, Interplay between transcription regulators RUNX1 and FUBP1 activates an enhancer of the oncogene c-KIT and amplifies cell proliferation, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 11214–11228, <https://doi.org/10.1093/nar/gky756>.
- [53] M.O. Durymanov, A.A. Rosenkranz, A.S. Sobolev, Current approaches for improving Intratumoral accumulation and distribution of nanomedicines, *Theranostics*. 5 (2015) 1007–1020, <https://doi.org/10.7150/thno.11742>.
- [54] L. Miao, L. Huang, Exploring the tumor microenvironment with nanoparticles, in: C.A. Mirkin, T.J. Meade, S.H. Petrosko, A.H. Stegh (Eds.), *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*, Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 193–226, https://doi.org/10.1007/978-3-319-16555-4_9.
- [55] B. Zhang, Y. Hu, Z. Pang, Modulating the tumor microenvironment to enhance tumor nanomedicine delivery, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 952, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00952>.
- [56] N. Luciani, F. Gazeau, C. Wilhelm, Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 6373–6380, <https://doi.org/10.1039/B903306H>.
- [57] B.E. Rabinow, Nanosuspensions in drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 785–796, <https://doi.org/10.1038/nrd1494>.
- [58] X. Li, Xu Wang, Wei Cheng, Formulation and pharmacokinetic evaluation of a paclitaxel nanosuspension for intravenous delivery, *IJN*, 2011, p. 1497, <https://doi.org/10.2147/IJN.S21097>.
- [59] S. Simovic, H. Hui, Y. Song, A.K. Davey, T. Rades, C.A. Prestidge, An oral delivery system for indomethacin engineered from cationic lipid emulsions and silica nanoparticles, *J. Control. Release* 143 (2010) 367–373, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.008>.
- [60] E. Amstad, J. Kohlbrecher, E. Müller, T. Schweizer, M. Textor, E. Reimhult, Triggered release from liposomes through magnetic actuation of Iron oxide nanoparticle containing membranes, *Nano Lett.* 11 (2011) 1664–1670, <https://doi.org/10.1021/nl2001499>.
- [61] C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre, S. Lecommandoux, Doxorubicin loaded magnetic Polymerosomes: Theranostic Nanocarriers for MR imaging and magneto-chemotherapy, *ACS Nano* 5 (2011) 1122–1140, <https://doi.org/10.1021/nn102762f>.
- [62] J. Lin, S. Wang, P. Huang, Z. Wang, S. Chen, G. Niu, W. Li, J. He, D. Cui, G. Lu, X. Chen, Z. Nie, Photosensitizer-Loaded Gold Vesicles with Strong Plasmonic Coupling Effect for Imaging-Guided Photothermal, Photodynamic Therapy 7 (2013) 10.
- [63] K. Yang, Y. Liu, Y. Liu, Q. Zhang, C. Kong, C. Yi, Z. Zhou, Z. Wang, G. Zhang, Y. Zhang, N.M. Khoshab, X. Chen, Z. Nie, Cooperative assembly of magneto-Nanovesicles with Tunable Wall thickness and permeability for MRI-guided drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 4666–4677, <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00884>.
- [64] P.M. Sy, N. Anton, Y. Idoux-Gillet, S.M. Dieng, N. Messaddeq, S. Ennahar, M. Diarra, T.F. Vandamme, Pickering nano-emulsion as a nanocarrier for pH-triggered drug release, *Int. J. Pharm.* 549 (2018) 299–305, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.066>.
- [65] G. Ulrich, R. Ziesel, Convenient and efficient synthesis of functionalized Oligopyridine ligands bearing accessory Pyromethene-BF₂ fluorophores, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2070–2083, <https://doi.org/10.1021/jo035825g>.



Hybridosomes radiothérapeutiques pour le traitement du glioblastome

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| IV.1. INTRODUCTION | 229 |
| IV.1.1. DESCRIPTION ET TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME | 229 |
| IV.1.2. AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE PAR L'UTILISATION DE NP RADIOSENSIBILISANTES | 230 |
| IV.2. LES HYBRIDOSOMES POUR L'AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE GLIOBLASTOME | 231 |
| IV.2.1. HYBRIDOSOMES UTILISES POUR CETTE ETUDE | 232 |
| IV.2.1.1. <i>Composition des hybridosomes</i> | 232 |
| IV.2.1.2. <i>Intérêt de ces hybridosomes pour cette étude</i> | 233 |
| IV.2.2. DELIVRANCE INTRACELLULAIRE DU CONTENU ENCAPSULE | 234 |
| IV.2.3. ÉVALUATION DE L'EFFICACITE DES HYBRIDOSOMES POUR L'AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE..... | 235 |
| IV.2.3.1. <i>Biodistribution des hybridosomes et de leur contenu</i> | 235 |
| IV.2.3.1.1. Localisation de la coque de l'hybridosome | 237 |
| IV.2.3.1.2. Localisation du contenu encapsulé | 241 |
| IV.2.3.2. <i>Évaluation de l'effet radiothérapeutique</i> | 248 |
| IV.2.3.2.1. Protocole | 248 |
| IV.2.3.2.2. Résultats | 250 |
| IV.2.3.2.2.1. Survie | 250 |
| IV.2.3.2.2.2. Suivi des tumeurs par IRM et bioluminescence | 253 |
| IV.2.3.2.2.3. Comparaison de l'IRM et de la bioluminescence | 257 |
| IV.2.3.2.2.4. Un cas de survie très prolongée | 258 |
| IV.3. PERSPECTIVES..... | 262 |
| IV.3.1. QUANTITE D'AUNP | 262 |
| IV.3.2. ENCAPSULATION DE COMPOSES ACTIFS | 263 |
| IV.3.3. INCORPORATION DANS UN GEL POST-RESECTION | 264 |
| IV.4. CONCLUSION | 265 |
| IV.5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 267 |

Dans ce dernier chapitre, nous allons aborder une application des hybridosomes pour le traitement d'une forme très agressive de tumeurs du cerveau : le glioblastome multiforme (GBM). Sur la base des résultats précédents – possibilité d'utiliser des NP variées et encapsulation par nanopréciipitation à des concentrations élevées jusqu'à 170 g.L^{-1} – les hybridosomes apparaissent en effet être des candidats de choix pour le traitement des cancers nécessitant des thérapies multimodales comme le GBM. Ce chapitre porte sur l'évaluation du potentiel des hybridosomes composés de SPION et d'une faible quantité d'AuNP (10% massiques) pour l'amélioration de la radiothérapie du GBM (modèle murin GL261), sans médicament encapsulé pour l'instant. Le BODIPY sera utilisé afin de mimer le relargage *in vitro* et *in vivo* d'un futur médicament.

Après une introduction sur le GBM, son traitement et les perspectives, nous présenterons en détail le protocole suivi pour évaluer le potentiel radiosensibilisant des hybridosomes. Cette étude s'articule en premier lieu autour de l'étude de la biodistribution *in vitro* et *in vivo* des hybridosomes suite à l'injection intratumorale (tumeur GL261-Luc⁺). Nous suivrons séparément les NP et le contenu encapsulé (BODIPY). Ensuite, nous étudierons l'influence des hybridosomes en combinaison ou non avec de la radiothérapie, notamment en termes de survie des animaux. Ces expérimentations, *in vitro* ou *in vivo*, font appel à de la microscopie de fluorescence, de l'IRM, des suivis de fluorescence et de bioluminescence *in vivo* ou encore des analyses histologiques *post-mortem* sur les organes prélevés. Finalement, nous aborderons les perspectives liées à l'utilisation des hybridosomes dans le traitement du GBM.

Les travaux de ce chapitre font l'objet d'un article soumis dans *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* ("Radiosensitizing Fe-Au Nanocapsules (Hybridosomes®) increase survival of GL261 brain tumor-bearing mice treated by radiotherapy").

IV.1. Introduction

IV.1.1. Description et traitement du glioblastome

Le glioblastome multiforme (GBM) est le type de cancer du cerveau le plus commun (OMS grade IV), avec une incidence de 5 personnes sur 100 000. Il est très agressif et infiltre souvent en profondeur les tissus du cerveau.¹ Le décès fait généralement suite aux conséquences de la surpression induite par la croissance tumorale dans la boîte crânienne. Le protocole standard de traitement – le protocole de Stupp – se base sur de la chirurgie, suivie de radiothérapie (5 x 2 Gy/semaine, pendant 6 semaines ; dose totale de 60 Gy) et chimiothérapie avec le témozolomide (TMZ). La chimiothérapie est concomitante (75 mg/m² d'aire corporelle/jour, 7 jours/semaine du premier au dernier jour de radiothérapie) puis adjuvante (150 – 200 mg/m² pendant 5 jours durant chaque cycle de 28 jours).² Malgré ce traitement sévère, la survie moyenne reste très faible (< 18 mois) avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 5%.^{3,4} Par ailleurs, le GBM, et globalement les tumeurs malignes du système nerveux central, sont parmi les rares cancers pour lesquels il n'y a eu que très peu d'amélioration de l'espérance de vie sur les 30 dernières années.⁵

En plus de la nature infiltrante de la tumeur, laquelle rend la résection totale par chirurgie quasi impossible, un des obstacles majeurs pour le traitement du GBM est la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, celle-ci limite fortement la pénétration de molécules chimiothérapeutiques et des agents radiosensibilisants dans le cerveau. Le développement de la tumeur cérébrale provoque la rupture partielle et donc la perméabilité de la BHE mais souvent à son stade avancé et non uniformément, ce qui mène à une délivrance de médicaments inefficace.⁶ Pour dépasser ces limitations, une des stratégies est l'administration locale.⁷ Ainsi, des implants polymères délivrant une chimiothérapie tels que le GLIADEL® sont actuellement utilisés en clinique. La délivrance intracrânienne directe de vecteurs chargés en principe actif, en particulier les nanocapsules lipidiques, ou de vecteurs cellulaires comme les cellules souches produisant des inhibiteurs de facteurs de croissance, ont mené à des résultats prometteurs sur des modèles de GBM orthotopiques. Par ailleurs, la délivrance de médicaments avec des dispositifs permettant la délivrance par convection (gradient de pression permettant la délivrance de molécules thérapeutiques directement dans les espaces interstitiels du système nerveux central)⁸ permet l'administration de médicaments sur des périodes plus longues et a montré des résultats encourageants sur des modèles petit animal (voir référence ⁹ pour une revue).

IV.1.2. Amélioration de la radiothérapie par l'utilisation de NP radiosensibilisantes

Parmi les nombreuses stratégies anti-cancer explorées,¹⁰ l'amélioration de la radiothérapie *via* l'utilisation de NP radiosensibilisantes est une piste intéressante avec des promesses de percée thérapeutique majeure. En particulier, l'utilisation de NP possédant un numéro atomique (Z) élevé a été rapportée.¹¹⁻¹⁴ En effet, la radiothérapie conventionnelle est limitée par les dommages infligés aux tissus sains situés sur le passage du rayon. En présence de NP de Z élevé, l'énergie est absorbée et « déposée » beaucoup plus localement que dans les tissus normaux, grâce à l'absorption photonique importante. Les photons-X sont absorbés par les atomes *via* l'effet photoélectrique, avec une efficacité globalement proportionnelle à Z^4 , favorisant ainsi les atomes de Z élevé par rapport aux tissus mous. Suite à l'absorption d'un seul photon d'énergie élevée, un atome avec un Z élevé peut expulser plusieurs électrons Auger de moindre énergie et donc de faible pénétration (~10 nm). De plus, les électrons Auger générés et les rayons X secondaires induisent la production de radicaux hydroxyles (HO•) par hydrolyse de l'eau. Ces radicaux ainsi que d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées réagissent facilement avec les molécules biologiques.¹⁵ La figure ci-dessous résume l'amélioration de la radiothérapie par les NP de Z élevé, avec les différents mécanismes impliqués.¹⁶ On voit que l'action des rayons X a lieu comme nous l'avons dit grâce à la forte absorption par des éléments lourds des NP, mais aussi sans l'aide des NP en endommageant directement l'ADN ou en induisant directement la photolyse de l'eau et ainsi la production de ROS. *In fine*, toutes ces voies mènent à la dégradation de l'ADN, de la membrane lipidique ou encore des protéines.

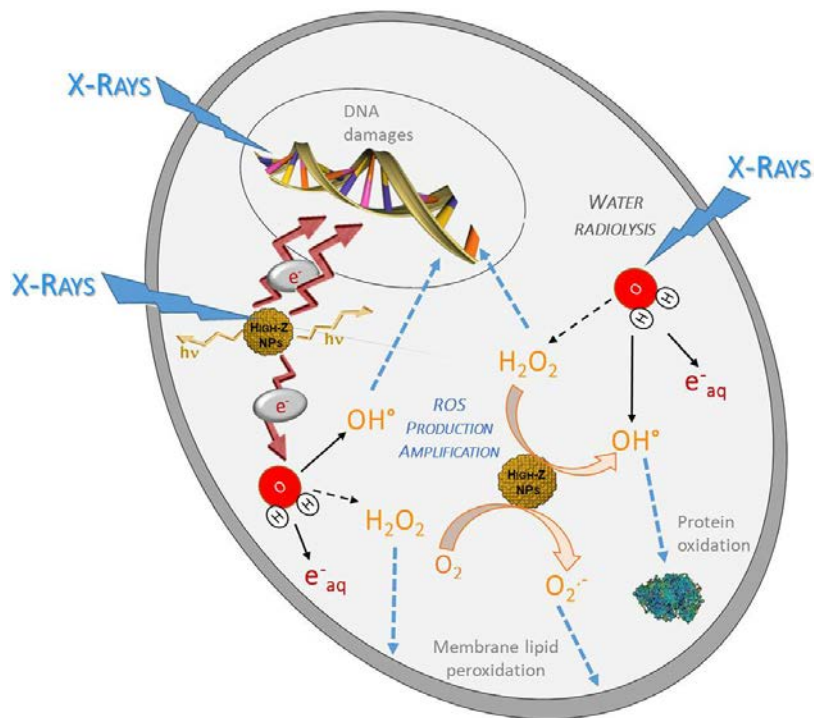


Figure 4. 1 – Représentation schématique de l’amélioration de la radiothérapie par les NP de Z élevé. (adapté de ¹⁶)

L’or ($Z = 79$) est un élément de choix. En effet, il présente une bonne biocompatibilité ainsi qu’un effet photoélectrique fort.¹² Les premières preuves expérimentales *in vivo* de l’effet radiosensibilisant des AuNP datent des années 2000^{15,17} et le nombre de publications n’a cessé d’augmenter depuis. Parmi les autres matériaux à base de métaux qui ont été envisagés pour la radiosensibilisation, le gadolinium ainsi que l’oxyde de fer superparamagnétique ont l’avantage de pouvoir être suivis par imagerie par résonance magnétique (IRM). Les NP à base d’or, d’argent et de gadolinium sont les plus couramment investiguées pour le GBM.¹⁶

IV.2. Les hybridosomes pour l’amélioration de la radiothérapie sur le glioblastome

Afin d’évaluer l’efficacité des hybridosomes composés de SPION et d’AuNP pour l’amélioration de la radiothérapie sur modèle murin de GBM, nous avons mis en place une étude *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, nous allons présenter les hybridosomes utilisés ainsi que leur interaction avec des cultures cellulaires du modèle GL261-Luc⁺. Nous aborderons ensuite pleinement les expérimentations *in vivo* qui ont été menées pour évaluer le gain thérapeutique en présence d’hybridosomes, associés ou non à de la radiothérapie. Nous suivrons en particulier la survie des animaux et de l’évolution des tumeurs par IRM et bioluminescence.

IV.2.1. Hybridosomes utilisés pour cette étude

IV.2.1.1. Composition des hybridosomes

Pour ces travaux sur la radiothérapie du GBM, nous avons utilisé des hybridosomes composés de SPION et d'AuNP, appelé par la suite H(Fe/Au) pour simplifier la notation. Ils se composent de SPION@octylamine/acide oléique (diamètre $4,2 \pm 1,7$ nm) et d'AuNP@oléylamine (diamètre $9,8 \pm 2,3$ nm). La coque est stabilisée par du PEG_{2k}-PAA_{7k}. La caractérisation de ces hybridosomes à la fois par NTA et par TEM est présentée en **Figure 4. 2**. La distribution en taille de la dispersion d'hybridosomes dans l'eau présente un mode principal à 94 ± 13 nm. La microscopie électronique en transmission des nano-objets séchés sur grille confirme la formation de nanocapsules d'environ 100 nm, contenant à la fois les SPION et les AuNP. Les deux types de NP sont bien discernables grâce à leur différence de taille et de contraste, lequel augmente avec la densité électronique des éléments ($Z_{Au} = 79$, $Z_{Fe} = 26$, $Z_O = 8$). Les AuNP apparaissent donc plus sombres que les SPION en TEM. La composition massique Fe: Au des échantillons est de 10:1 (dosage ICP-OES).

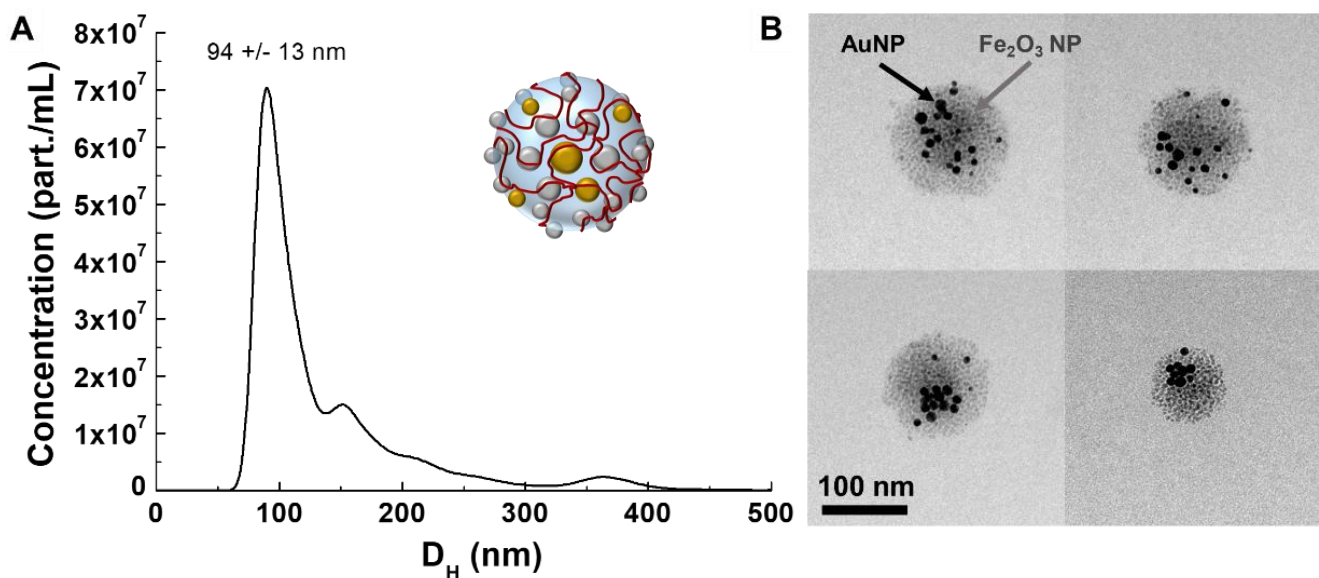


Figure 4. 2 – Caractérisation des hybridosomes SPION/AuNP@PEG-PAA. **(A)** Dispersion de taille déterminée par NTA. Le schéma représente un hybridosome avec les AuNP en jaune et les SPION en gris. Le schéma n'est pas à l'échelle, la taille des NP est exagérée et la différence de taille entre les AuNP et les SPION n'est pas prise en compte. **(B)** Images TEM.

IV.2.1.2. Intérêt de ces hybridosomes pour cette étude

Ces hybridosomes, de par leur conception avec deux types de NP, sont des outils potentiellement intéressants pour l'étude et le traitement du glioblastome.

Comme nous l'avons vu dans le début de ce chapitre, les AuNP sont connues pour leur effet radiosensibilisant, *via* l'augmentation du dépôt de dose, la génération d'électrons Auger et secondaires et la formation de ROS. Elles pourraient donc permettre d'améliorer la radiothérapie et ainsi ralentir la croissance tumorale et améliorer la survie. D'autre part, des travaux précédents ont montré que les hybridosomes SPION sont de bons outils pour l'imagerie IRM lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse, avec une diminution rapide du contraste du foie suite à l'accumulation des hybridosomes.¹⁸ Cela permettrait une amélioration du contraste et améliorerait la visualisation de la vascularisation du foie et le diagnostic de la tumeur hépatique. Dans le cas présent, nous allons étudier des injections intratumorales et la fonctionnalité de diagnostic IRM ne sera pas utilisée. Toutefois, le contraste négatif des SPION peut être utilisé pour attester que les SPION ont bien été injectées et sont présentes dans la tumeur. Les SPION peuvent également induire la formation de ROS sous irradiation, notamment *via* le relargage d'ions et la surface active des SPION,^{19,20} et une synergie entre les deux types de NP pourrait apparaître. Nous cherchons donc dans ce chapitre à voir si ces objets permettent des améliorations sur le modèle murin GL261 *in vivo*.

L'intérêt des hybridosomes pour ce genre d'applications repose par ailleurs sur leur capacités d'encapsulation. Comme nous le savons, ces objets sont capables d'encapsuler des composés hydrophobes de manière très efficace, à la fois en termes de rendement d'encapsulation et de concentration interne. Cette caractéristique est très intéressante dans le cadre du GBM où à la fois la radiothérapie et la chimiothérapie sont indispensables. Les hybridosomes pourraient ainsi être de bons outils, en associant radiothérapie et chimiothérapie. Nous reparlerons de l'aspect encapsulation de médicaments dans les perspectives à la fin de ce chapitre.

IV.2.2. Délivrance intracellulaire du contenu encapsulé

De manière similaire à ce qui a été présenté dans le chapitre précédent, nous avons en premier lieu suivi l'incubation des cellules tumorales avec les hybridosomes. Il s'agit des hybridosomes SPION/AuNP tels que présenté ci-dessus, avec en plus un cœur de BODIPY. Pour ces études, nous avons utilisé le modèle murin GL261 dans des souris immunocompétentes. Ce modèle est considéré comme le modèle standard pour la recherche sur le glioblastome.²¹ En effet, en dépit de certaines caractéristiques qui le distinguent du glioblastome spontané, notamment le manque de vascularité histologique caractéristique, ce modèle montre un développement rapide et une excellente reproductibilité.²¹ La particularité de notre étude est l'utilisation d'un modèle exprimant la luciférase GL261-Luc⁺.²² Ces cellules produisent des photons en présence de luciférine, ce qui permet de suivre l'activité et la croissance tumorale par bioluminescence. La **Figure 4. 3** présente la microscopie de fluorescence confocale réalisée après incubation des hybridosomes avec les cellules pendant 2 h. La fluorescence verte du BODIPY colore de manière diffuse tout le cytoplasme, avec par ailleurs la présence de spots plus intenses. Il y a donc **internalisation du BODIPY dans le cytoplasme mais pas dans le noyau**. De plus, les hybridosomes ne semblent pas induire de toxicité pour les cellules sur la durée d'incubation (2 h), comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre précédent avec les hybridosomes constitués uniquement de SPION.

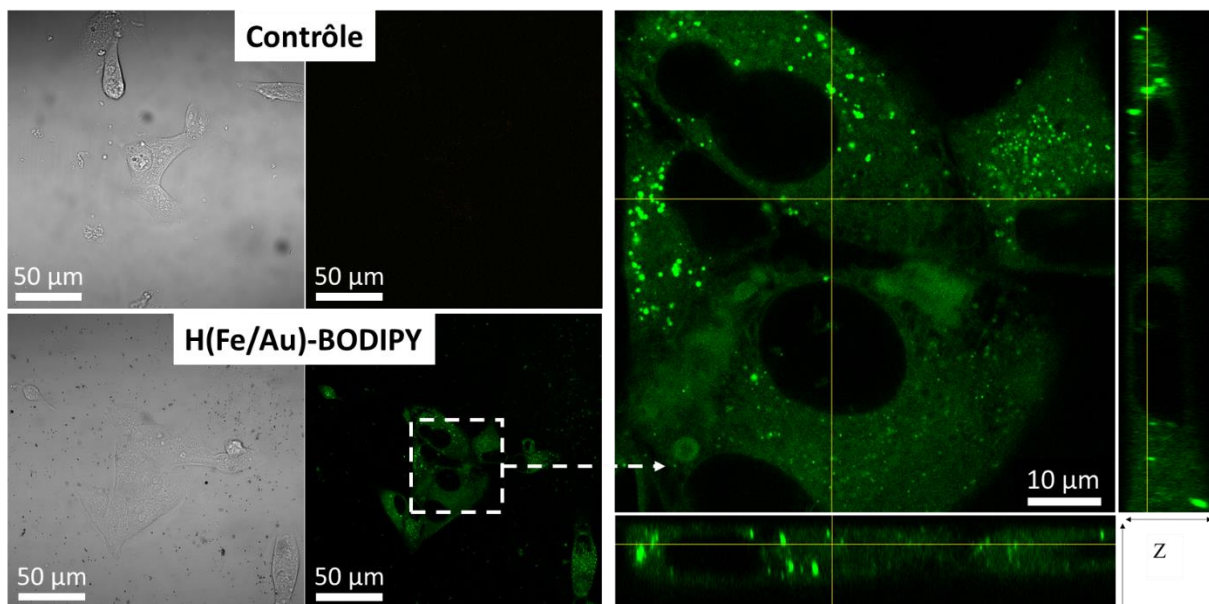


Figure 4. 3 – Images en transmission et microscopie de fluorescence confocale ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 517 - 544 \text{ nm}$) de cellules GL261 contrôles et incubées avec des hybridosomes SPION/AuNP chargés en BODIPY, sans marquage cellulaire. À droite, agrandissement en Z-scan, avec les vues orthogonales XZ et XY.

IV.2.3. Évaluation de l'efficacité des hybridosomes pour l'amélioration de la radiothérapie

IV.2.3.1. Biodistribution des hybridosomes et de leur contenu

Le protocole envisagé pour l'étude *in vivo* comprend des injections intratumorales suivies d'irradiations (cf. protocole, partie IV.2.3.2.1). Avant de pouvoir réaliser ce protocole, nous avons étudié la localisation des hybridosomes et de leur contenu après injection intratumorale. Nous cherchons en particulier à obtenir des hybridosomes qui restent en place dans la tumeur le temps des irradiations, c'est-à-dire sur une semaine. Cela permettrait d'effectuer le protocole envisagé avec une seule injection, ce qui est moins invasif pour les animaux.

Nous avons tout d'abord réalisé une injection des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA dans la tumeur d'une souris (cellules GL261-Luc⁺ ; souris C57BL/6). La souris est suivie sur une semaine puis elle est finalement euthanasiée. Nous avons également suivi la fluorescence grâce au bioimageur. La **Figure 4. 4** résume les premiers résultats. En premier lieu, le contraste négatif des SPION en IRM est clairement visible suite à l'injection, et reste visible 4 jours après l'injection. Des mesures de relaxométrie ont permis de déterminer une valeur de r_2 d'environ $450 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui est drastiquement plus élevé que les SPION non organisés (cf. partie expérimentale). Cette valeur est d'ailleurs plus élevée que ce qui avait été déterminé pour des hybridosomes SPION@PEG-PAA dans des travaux précédents ($r_2 = 274 \pm 35 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$).¹⁸ Les hybridosomes, ou tout du moins les SPION qui les composent, sont donc présents au niveau du site d'injection sur presque 1 semaine. Enfin, la fluorescence est clairement visible au niveau de la tête de la souris *in vivo*. De plus, la fluorescence du cerveau *post-mortem* atteste de la présence du BODIPY autour du site d'injection au bout de 4 jours. Ainsi, **à la fois les NP de la coque des hybridosomes et le BODIPY encapsulé sont toujours présents à proximité du point d'injection, pendant au moins 5 jours.**

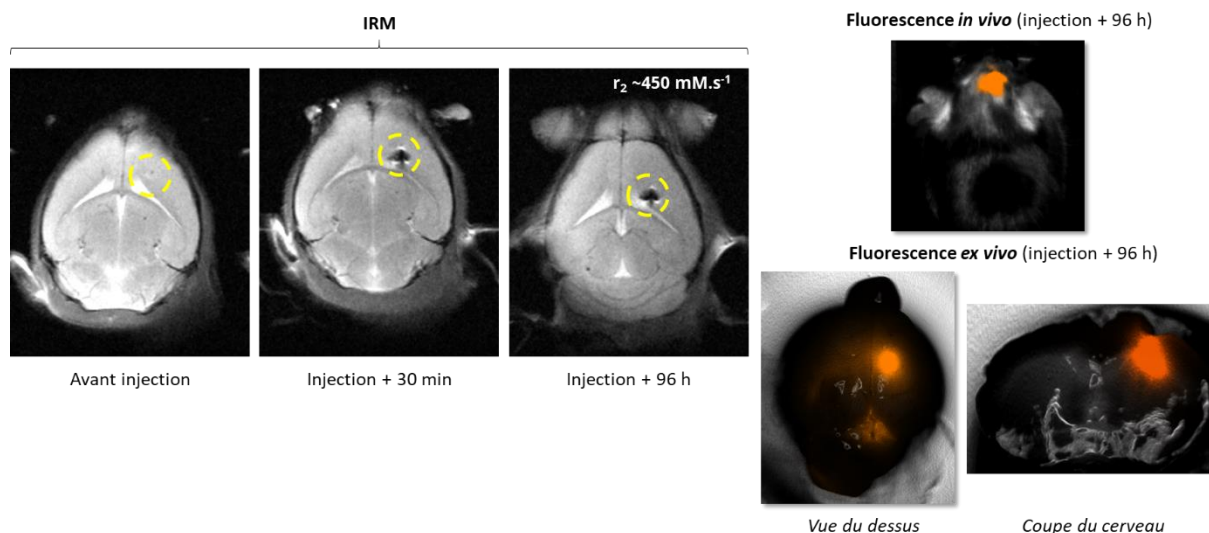


Figure 4. 4 – Suivi par IRM du cerveau d’une souris ayant reçu une injection d’hybridosomes SPION/BODIPY sur 4 jours. À droite, la fluorescence du cerveau *in vivo* (haut) et *post-mortem* (bas) est réalisée avec le bioimageur ($\lambda_{exc} = 487 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 580 - 615 \text{ nm}$).

Ces résultats préliminaires étant encourageants, nous avons ainsi décidé d’étudier plus en détail la distribution sur 5 jours, avec euthanasie des souris après des durées différentes. Pour chaque souris, les organes (cerveau, foie, rate et ganglions lymphatiques cervicaux) sont prélevés pour analyses histologiques (HES et Perls) et de fluorescence sur les coupes de tissus. 12 souris, réparties en 6 groupes de 2, et possédant une tumeur GL261-Luc⁺ (croissance de la tumeur pendant 2 semaines) reçoivent une injection d’hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA puis sont sacrifiées à 30 min, 24 h, 48 h, 72 h ou 120 h après l’injection. La coloration de Perls a été réalisée seulement sur les coupes de cerveau et de foie des souris contrôles (souris 1 et 2) et à 120 h après l’injection (souris 11 et 12). Le **Tableau 4. 1** résume les groupes de souris considérés :

Tableau 4. 1 – Résumé des groupes de souris black 6 étudiées pour le suivi de la biodistribution *in vivo* suite à l’injection d’hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA dans les tumeurs GL261-Luc⁺.

| Identifiants souris | 1-2 | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 | 11-12 |
|---------------------|---------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Groupe | Contrôle (sans injection) | Injection + 30 min | Injection + 24 h | Injection + 48 h | Injection + 72 h | Injection + 120 h |

Les résultats de biodistribution peuvent être présentés en deux parties distinctes, visant à suivre d’une part la coque des hybridosomes et d’autre part à suivre le BODIPY encapsulé.

IV.2.3.1.1. Localisation de la coque de l'hybridosome

Regardons en premier lieu l'analyse de l'histologie des cerveaux prélevés. La **Figure 4. 5** présente une coupe de cerveau pour chaque temps (souris 1, 4, 5, 7, 10, 11) avec coloration HES. Le contrôle sans injection d'hybridosomes (**Figure 4. 5 A**) nous permet d'étudier la morphologie des tissus présentant une tumeur avec une croissance de 2 semaines. Une distinction claire est visible entre le cerveau sain et la zone tumorale, présentant une prolifération de cellules et une organisation chaotique. Au bout de deux semaines, la tumeur apparaît déjà être très importante (sur la coupe : longueur = 3,27 mm / largeur = 2,3 mm). Il s'agit d'une durée critique au-delà de laquelle la souris n'a plus vraiment de chance de voir sa survie améliorée, même en améliorant le traitement. En effet, lors de premiers essais, nous avons laissé les tumeurs croître pendant 3 semaines et les souris se portaient très mal et décédaient très rapidement. Ainsi, nous utiliserons toujours par la suite une durée de 2 semaines de croissance tumorale avant le traitement de radiothérapie. Au centre de la tumeur, une zone rose-rouge est visible. Elle correspond à du sang coagulé, probablement le site d'injection des cellules tumorales. Suite à l'injection des hybridosomes (**Figure 4. 5 B-F**), il n'y a pas de changement significatif de la morphologie des tissus. Par ailleurs, nous pourrions nous attendre à « voir » une coloration brune à l'endroit où se situent les hybridosomes, du fait de la couleur des SPION, mais cela n'a pas été le cas. La coloration HES n'est donc pas adaptée pour détecter la localisation des nanocapsules.

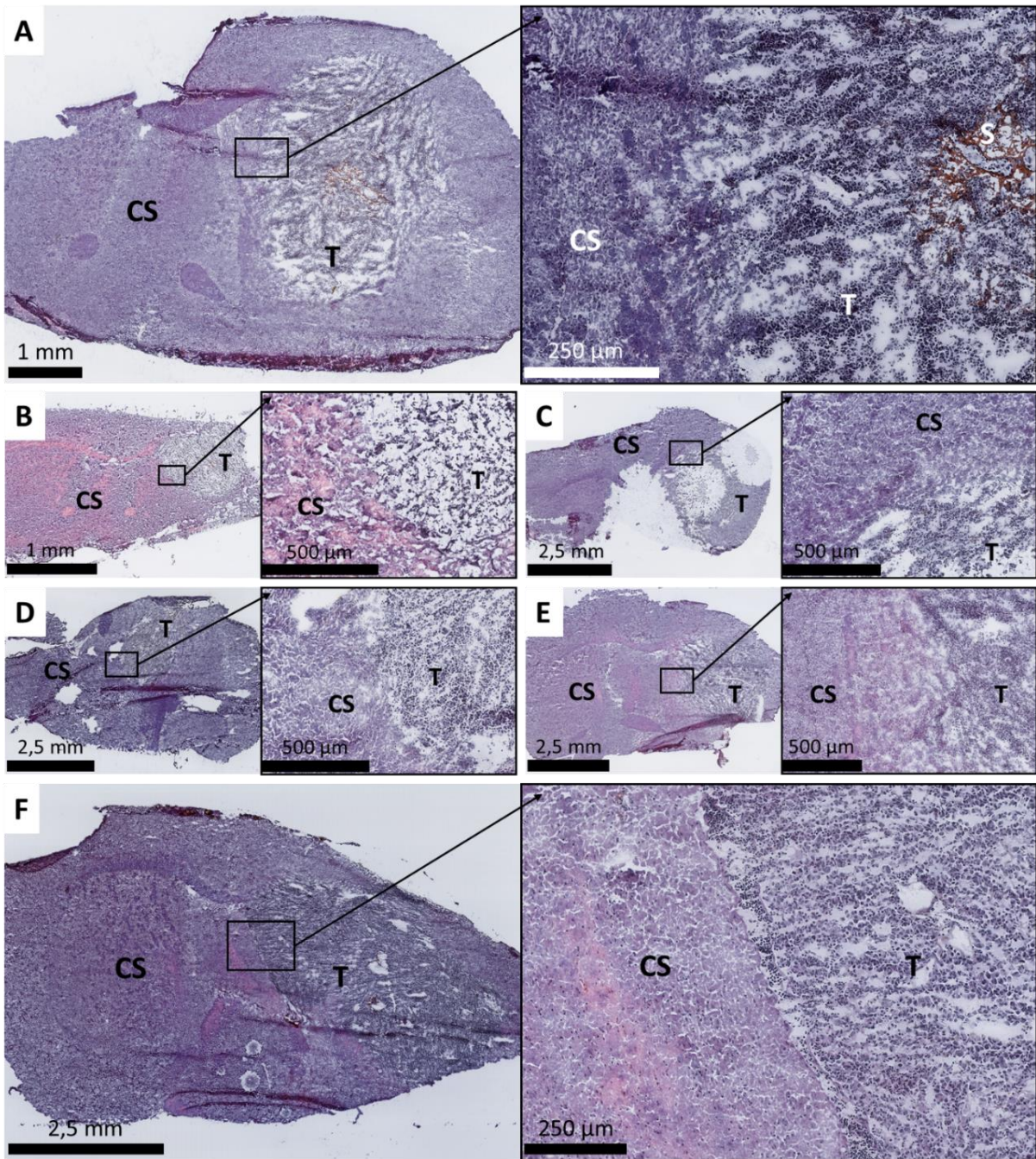


Figure 4. 5 – Coloration HES de coupes de cerveaux de souris présentant des tumeurs (cellules GL261-Luc⁺) sans injection (**A**) ou après injection intratumorale d'hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA : 30 min (**B**), 24 h (**C**), 48 h (**D**), 72 h (**E**) et 120 h (**F**). Pour chaque temps, une image à faible grossissement ainsi qu'un agrandissement correspondant à la transition entre le tissu sain et la tumeur sont présentés côte à côte. Abréviations : cerveau sain (CS), tumeur (T), site d'injection (S).

Afin de détecter la présence de fer dans les tissus, nous avons réalisé des colorations de Perls sur les coupes de cerveau et de foie, avant injection et à la fin de la période, à 5 jours après injection (**Figure 4. 6**). La présence d'ions Fe^{3+} apparaît en bleu intense. Avant injection, aucune présence de fer n'est détectée dans le cerveau, que ce soit au niveau du tissu sain ou de la tumeur. On peut noter que, tout comme pour la coloration HES, la zone tumorale présente beaucoup d'hétérogénéité. 5 jours après l'injection intratumorale (**Figure 4. 6 B**), la présence de fer dans la tumeur est clairement identifiée, notamment en périphérie de la tumeur. Il n'y a cependant pas de fer détecté dans le reste du cerveau au niveau du tissu sain. Ainsi, **sur une période de 5 jours suite à l'injection des hybridosomes, le fer (i.e. les coques des hybridosomes) est présent de manière significative et irrégulière à proximité des contours de la tumeur mais pas dans le cerveau sain**. Cela indique qu'il n'y a pas de diffusion des hybridosomes depuis la tumeur vers le reste du cerveau sur cette période. Par ailleurs, la coloration Perls des coupes de foie ne révèlent pas de présence de fer exogène. L'injection intratumorale des hybridosomes est donc tout à fait adaptée pour réaliser par la suite une irradiation chaque jour pendant 5 jours, et ce sans besoin de refaire une injection.

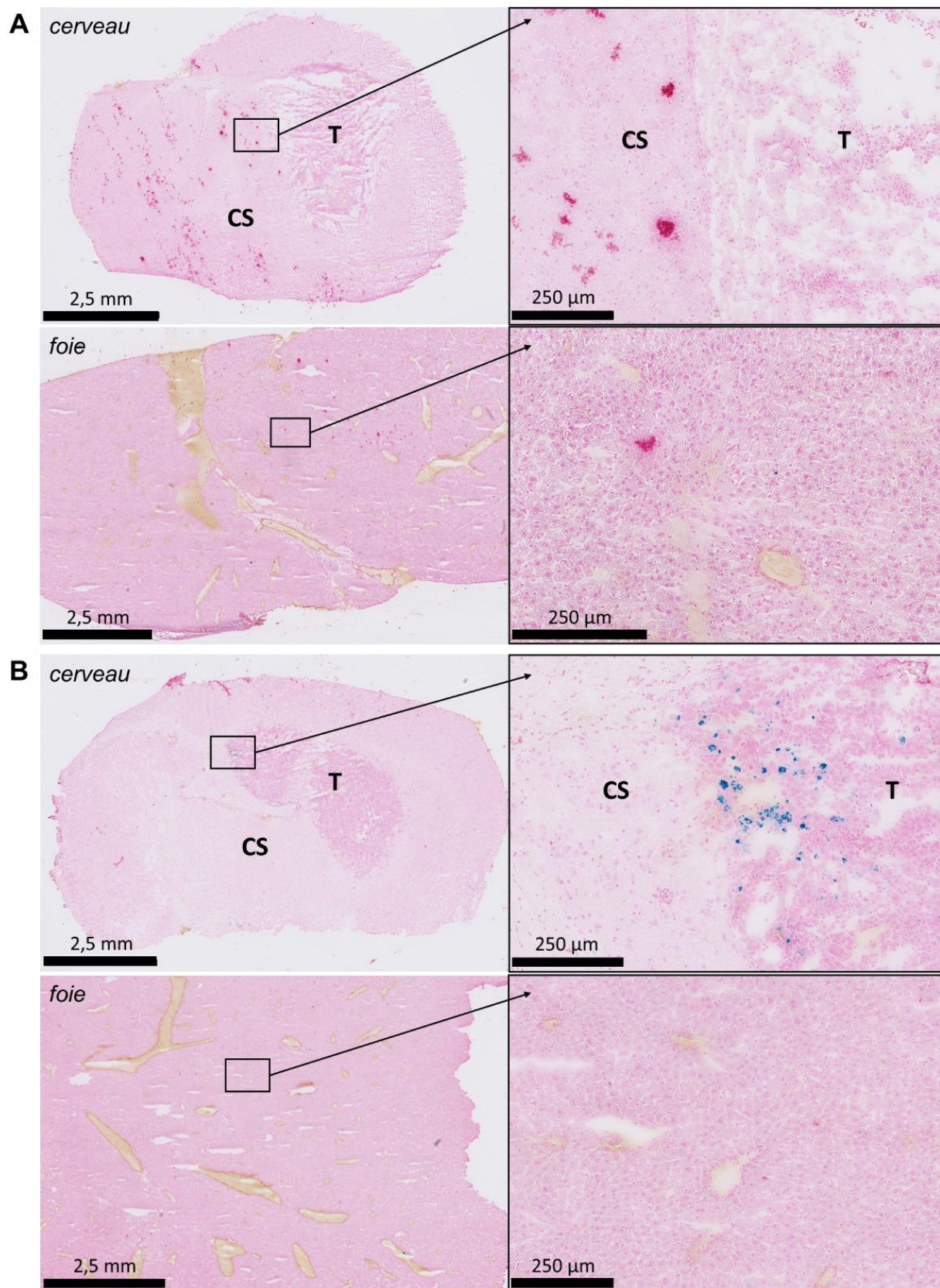


Figure 4. 6 – Coloration PERLS de coupes de cerveaux et de foies de souris présentant des tumeurs GL261-Luc⁺ sans injection **(A)** ou 5 jours après injection intratumorale d'hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA **(B)**. L'image de droite est un agrandissement de l'image de gauche. Abréviations : cerveau sain (CS), tumeur (T).

IV.2.3.1.2. Localisation du contenu encapsulé

L'utilisation d'hybridosomes chargés en BODIPY permet de faire le suivi *in vivo* du contenu encapsulé. Comme vu dans le chapitre précédent, le BODIPY encapsulé est fluorescent à la fois dans le vert et dans le rouge. Cela permet d'effectuer une double détection pour s'assurer que ce qui est détecté est bien le BODIPY. Ce suivi du BODIPY nous permet de modéliser le relargage d'un médicament dans l'environnement tumoral. La fluorescence du BODIPY a été recherchée dans tous les organes prélevés, à savoir le cerveau, le foie, la rate et les ganglions cervicaux, et ce pour toutes les souris. Les résultats de microscopie de fluorescence sont présentés de la **Figure 4. 7** à la **Figure 4. 10**, avec les coupes de cerveaux, de foies, de rates et de ganglions lymphatiques cervicaux, respectivement. Une seule souris est présentée pour chaque groupe.

Au niveau des coupes de cerveaux, il n'y a aucun signal de fluorescence pour les contrôles non-injectés. Un signal de fluorescence (que ce soit rouge ou verte) est présent 30 minutes après injection et reste localisé dans une zone limitée, probablement autour du site d'injection. Ensuite, le signal s'étale dans l'espace sur les 5 jours de suivi. On note par ailleurs que la fluorescence est colocalisée avec la tumeur (à l'exception de l'individu à 48h). Au niveau du foie, une fluorescence diffuse apparaît aussi, avec un retard de quelques jours. Un faible signal fluorescent est également visible dans les ganglions cervicaux après quelques jours. Il y a toutefois beaucoup d'auto-fluorescence dans le rouge, même pour la souris contrôle. Le signal est non-significatif dans la rate.

L'analyse de la fluorescence du cerveau *in vivo* montre ainsi que **les hybridosomes relarguent leur contenu dans la zone tumorale après l'injection. Le BODIPY est présent pendant au moins 5 jours après l'injection.** Il s'accumule également dans le foie, avec un peu de retard. Une explication possible de l'émission observée dans le foie est qu'une partie des hybridosomes chargés en BODIPY passe du site tumoral au système vasculaire, où ils sont captés par les monocytes puis véhiculés dans le foie. En effet, pour rappel, étant donné que les hybridosomes font environ 90 nm de diamètre, ils ont vocation à être rapidement pris en charge par le système phagocytaire mononucléé (MPS) s'ils entrent dans la circulation sanguine. Sur cette période de temps, une partie du BODIPY atteint également la rate et possiblement les ganglions lymphatiques cervicaux.

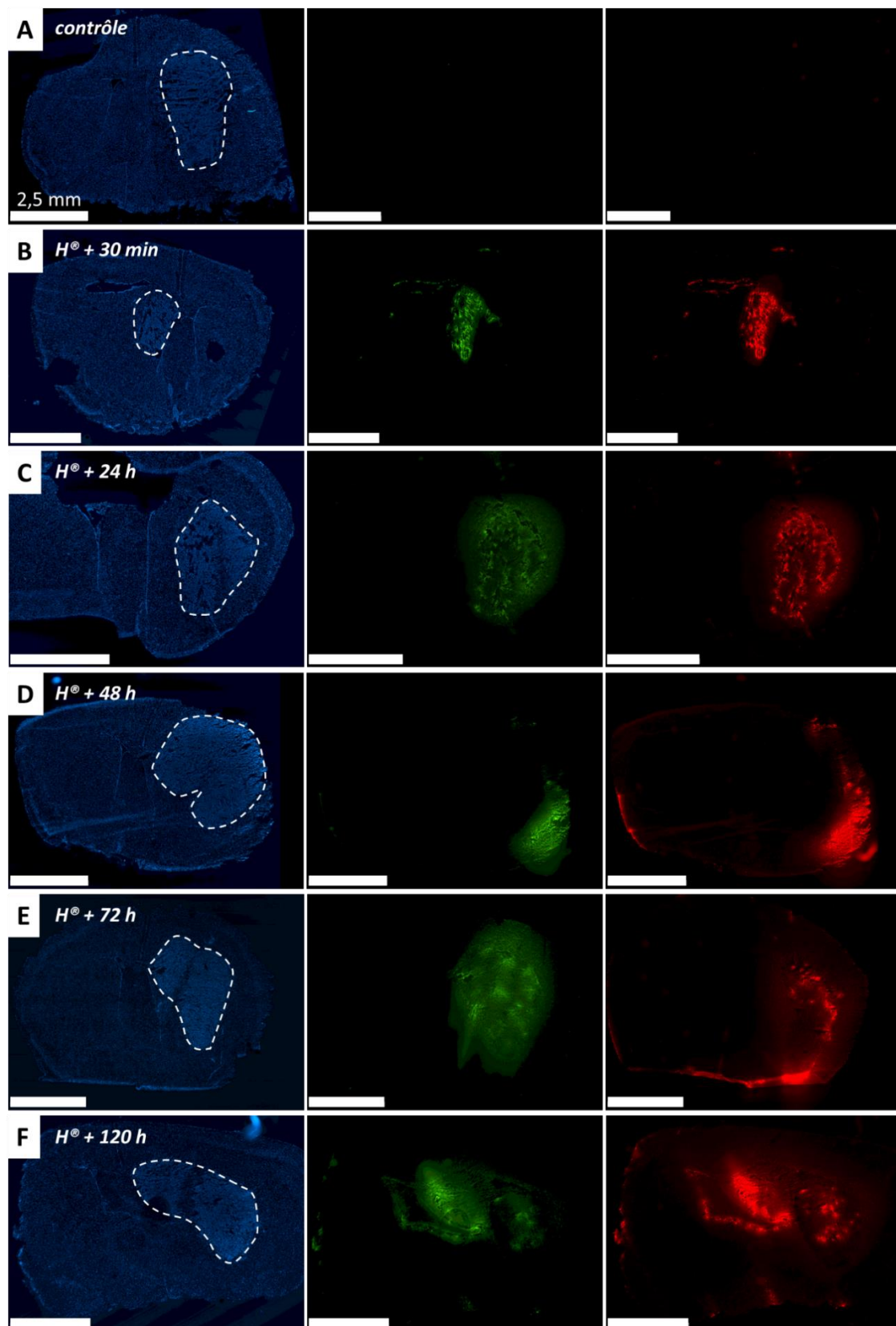


Figure 4. 7 – Microscopie de fluorescence de coupes de cerveaux de souris présentant des tumeurs GL261-Luc⁺ sans injection (A) ou après injection intratumorale d’hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA : 30 min (B), 24 h (C), 48 h (D), 72 h (E) et 120 h (F). De gauche à droite, visualisation des noyaux cellulaires (DAPI), fluorescence dans le vert (filtres FITC) et dans le rouge (filtres TRITC). Les pointillés délimitent les tumeurs.

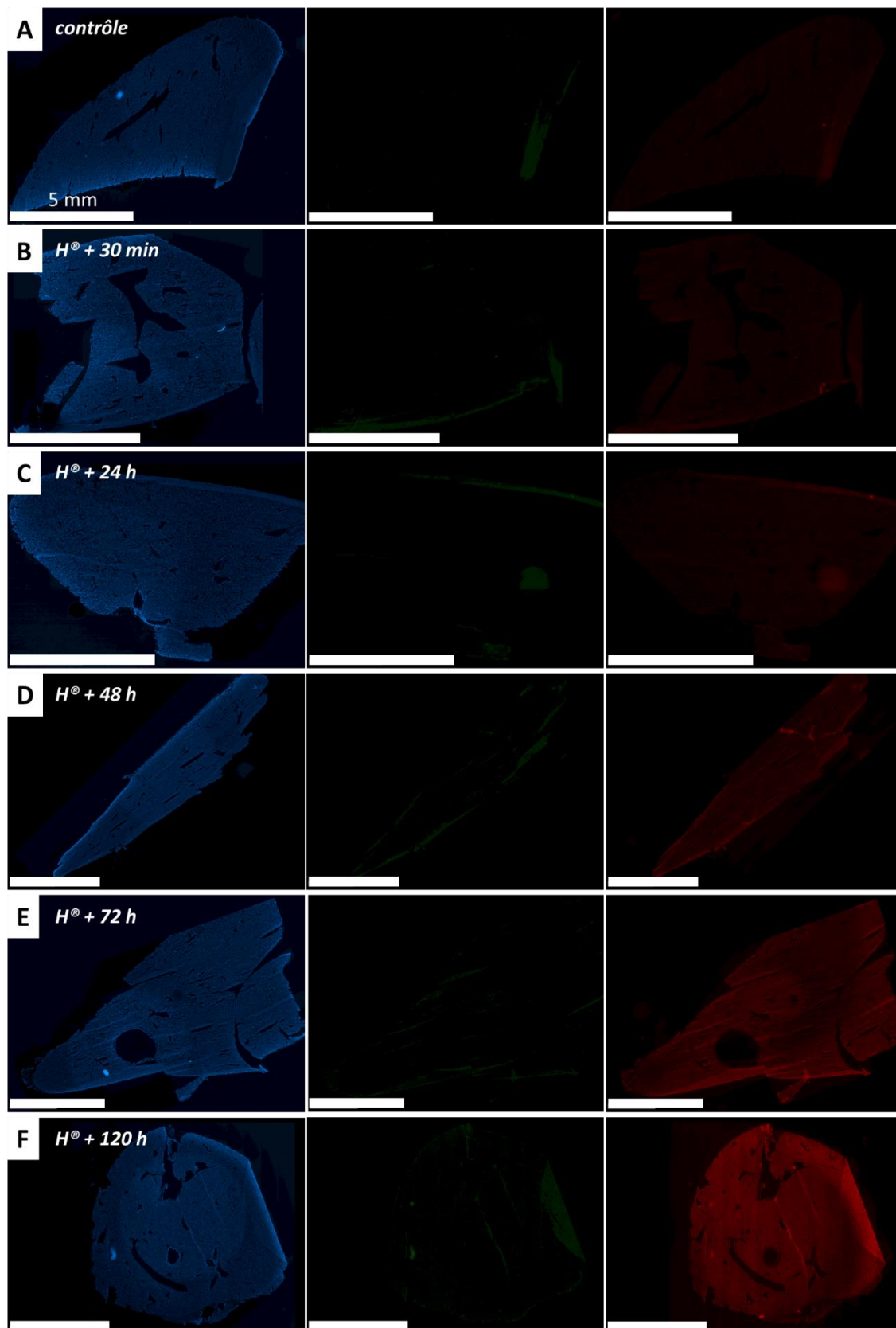


Figure 4. 8 – Microscopie de fluorescence de coupes de foies de souris présentant des tumeurs cérébrales GL261-Luc⁺ sans injection (A) ou après injection intratumorale d’hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA : 30 min (B), 24 h (C), 48 h (D), 72 h (E) et 120 h (F). De gauche à droite, visualisation des noyaux cellulaires (DAPI), fluorescence dans le vert (filtres FITC) et dans le rouge (filtres TRITC).

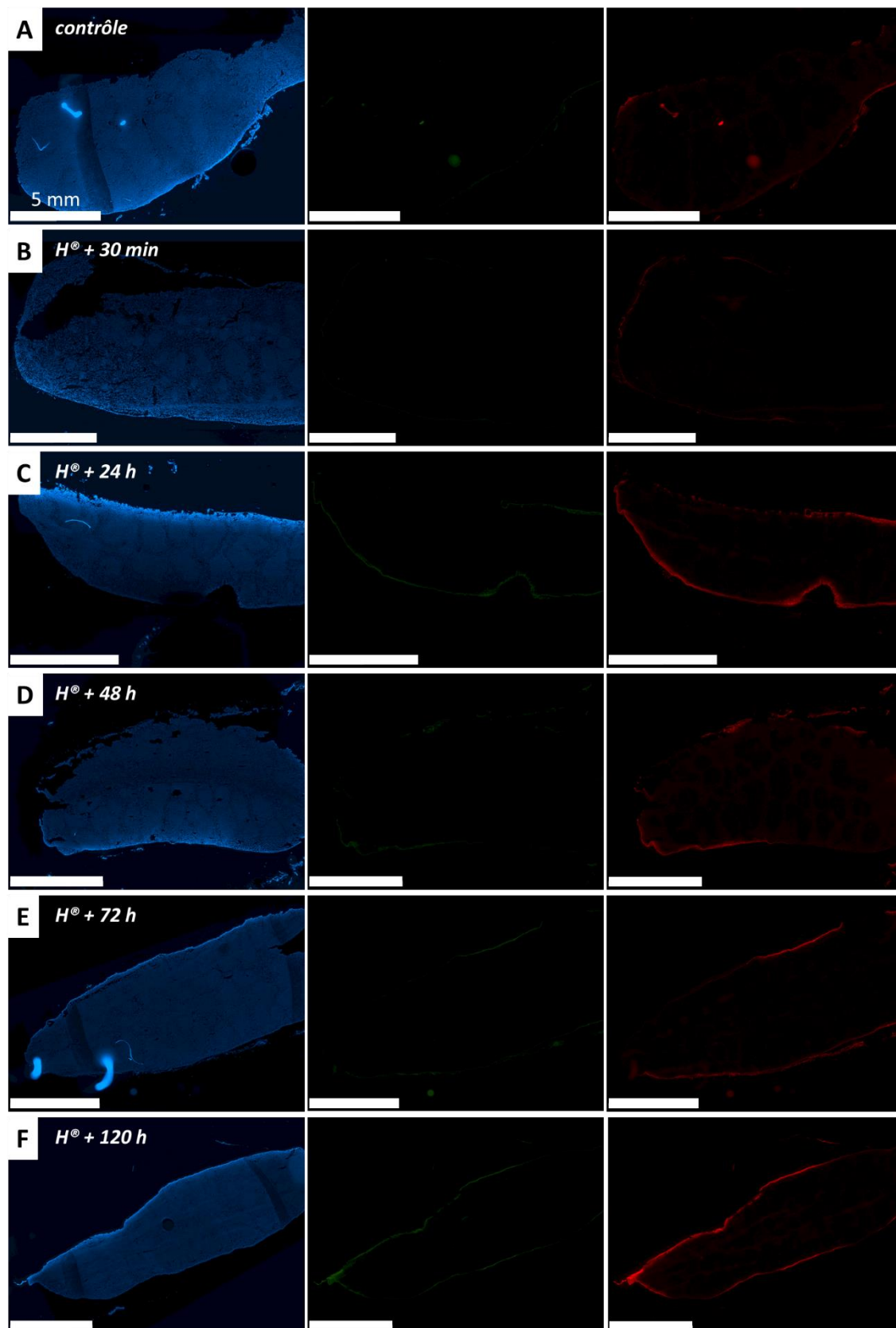


Figure 4. 9 – Microscopie de fluorescence de coupes de rates de souris présentant des tumeurs cérébrales GL261-Luc⁺ sans injection (A) ou après injection intratumorale d’hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA : 30 min (B), 24 h (C), 48 h (D), 72 h (E) et 120 h (F). De gauche à droite, visualisation des noyaux cellulaires (DAPI), fluorescence dans le vert (filtres FITC) et dans le rouge (filtres TRITC).

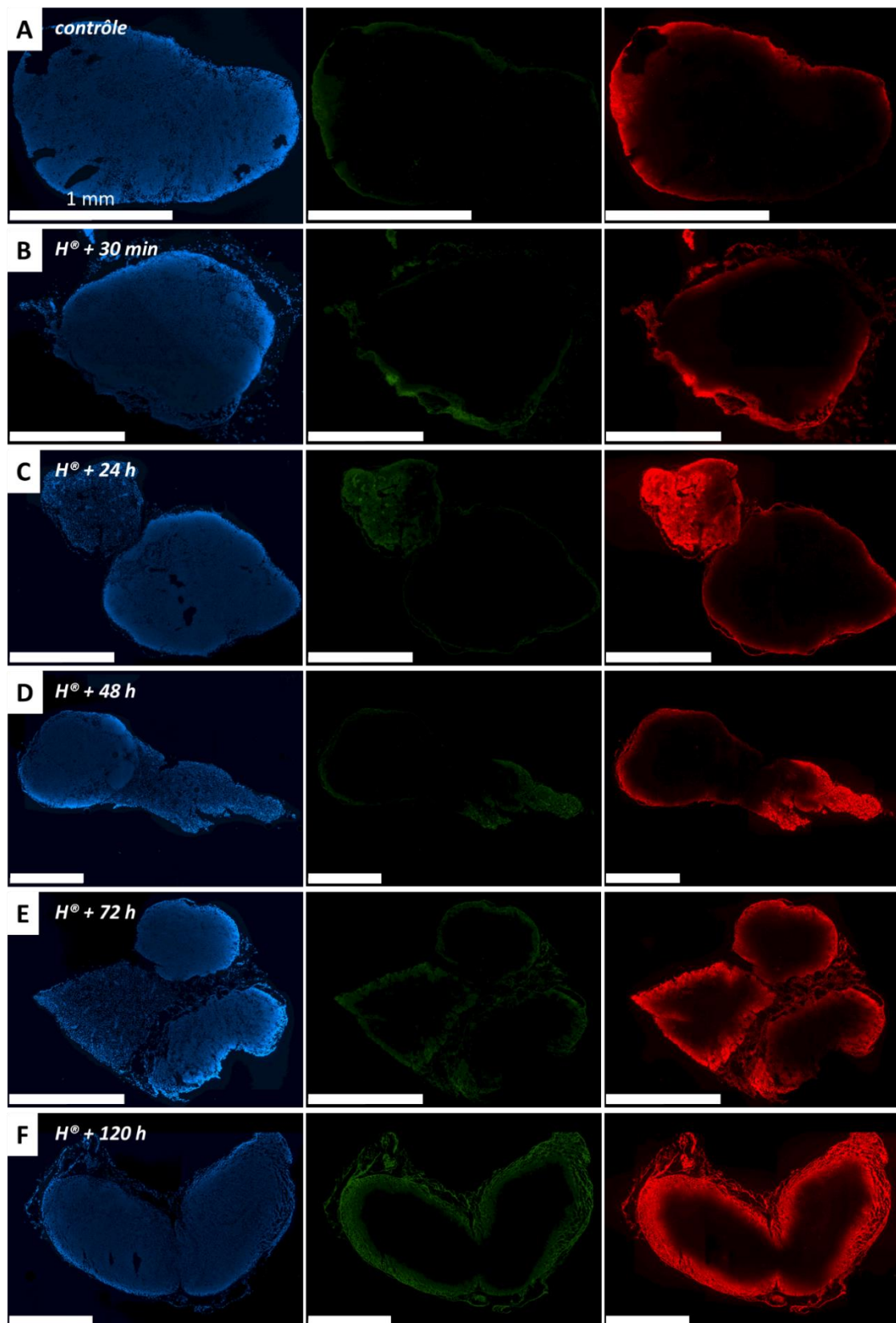


Figure 4. 10 – Microscopie de fluorescence de coupes de ganglions lymphatiques cervicaux de souris présentant des tumeurs cérébrales GL261-Luc⁺ sans injection (**A**) ou après injection intratumorale d'hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA : 30 min (**B**), 24 h (**C**), 48 h (**D**), 72 h (**E**) et 120 h (**F**). De gauche à droite, visualisation des noyaux cellulaires (DAPI), fluorescence dans le vert (filtres FITC) et dans le rouge (filtres TRITC).

Nous avons par ailleurs analysé plus finement les microscopies de fluorescence du cerveau et du foie à 5 jours (**Figure 4. 11**). La fluorescence verte et rouge est clairement visible dans les cellules au niveau de la tumeur. Cela signifie que les hybridosomes peuvent relarguer le BODIPY, lequel diffuse ensuite dans le cytosol des cellules de la région tumorale. À noter tout de même que nous ne pouvons pas déterminer sur la base de ces observations s'il s'agit de cellules tumorales seulement. Il est d'ailleurs très probable que le BODIPY diffuse de manière non discriminante dans les cellules tumorales et les cellules normales, la masse tumorale n'étant pas composée à 100% de cellules tumorales. On note aussi que le BODIPY ne pénètre pas dans les noyaux. Cette capacité à diffuser dans le cytosol mais pas dans le noyau des cellules GL261 est en accord avec ce que nous avons observé précédemment *in vitro*, ainsi qu'avec des observations rapportées dans la littérature utilisant différents BODIPY encapsulés.²³ Étant donné que la coque des hybridosomes reste en dehors des cellules,^{23,24} la répartition subcellulaire du contenu encapsulé dépend seulement de ses propriétés moléculaires. Ainsi, une molécule spécifique pourrait être capable d'entrer dans le noyau alors que le BODIPY que nous utilisons ne le peut pas. Pour ce qui est du foie, la fluorescence observée est principalement dans le rouge, ce qui pourrait indiquer que le BODIPY y est séquestré principalement sous forme agrégée.²⁴

En résumé, l'ensemble de ces résultats est en accord avec les résultats précédents, à la fois *in vitro* et *in vivo*, et montre que les hybridosomes ont une structure poreuse permettant le relargage de leur contenu dans des compartiments hydrophobes, notamment au niveau du site tumoral suite à une injection intratumorale.^{24,25} Une distribution du contenu encapsulé dans le corps est également observée, avec une accumulation notamment dans le foie. Cela est très intéressant dans l'optique d'une délivrance locale avec relargage contrôlé d'un médicament, par exemple pour une chimiothérapie concomitante au traitement de radiothérapie.

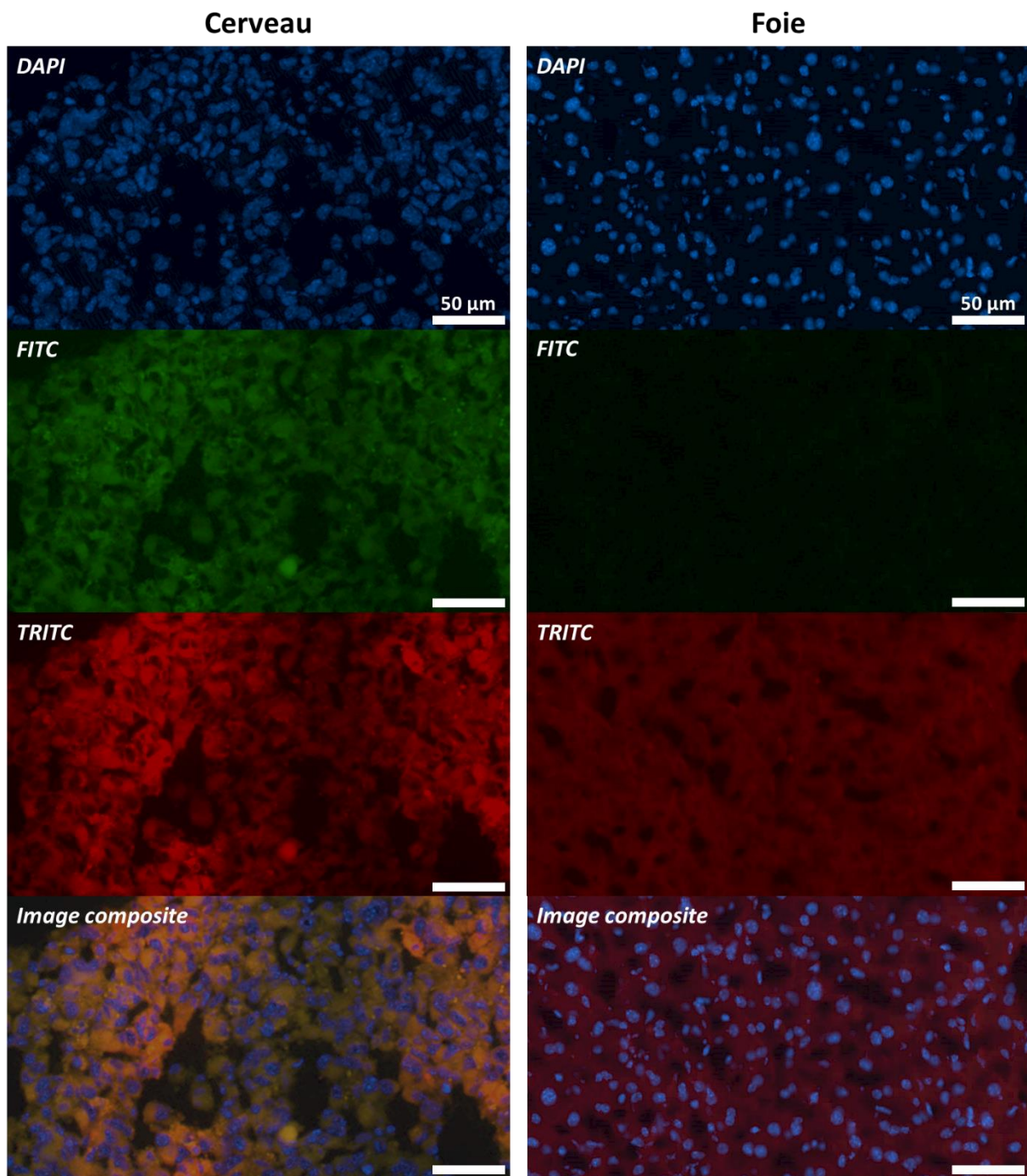


Figure 4. 11 – Microscopies de fluorescence du cerveau et de foie 5 jours après l'injection intratumorale. Les canaux de fluorescence bleue (noyaux cellulaires) (DAPI), verte (FITC) et rouge (TRITC) sont représentés. Les images en bas sont issues de la combinaison des différents canaux.

IV.2.3.2. Évaluation de l'effet radiothérapeutique

IV.2.3.2.1. Protocole

Afin d'évaluer l'efficacité des hybridosomes SPION/AuNP pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie, nous avons mis en place un protocole avec injections des hybridosomes dans les tumeurs GL261-Luc⁺ préexistantes, suivies ou non de radiothérapies. Ce protocole est résumé en **Figure 4. 12**.

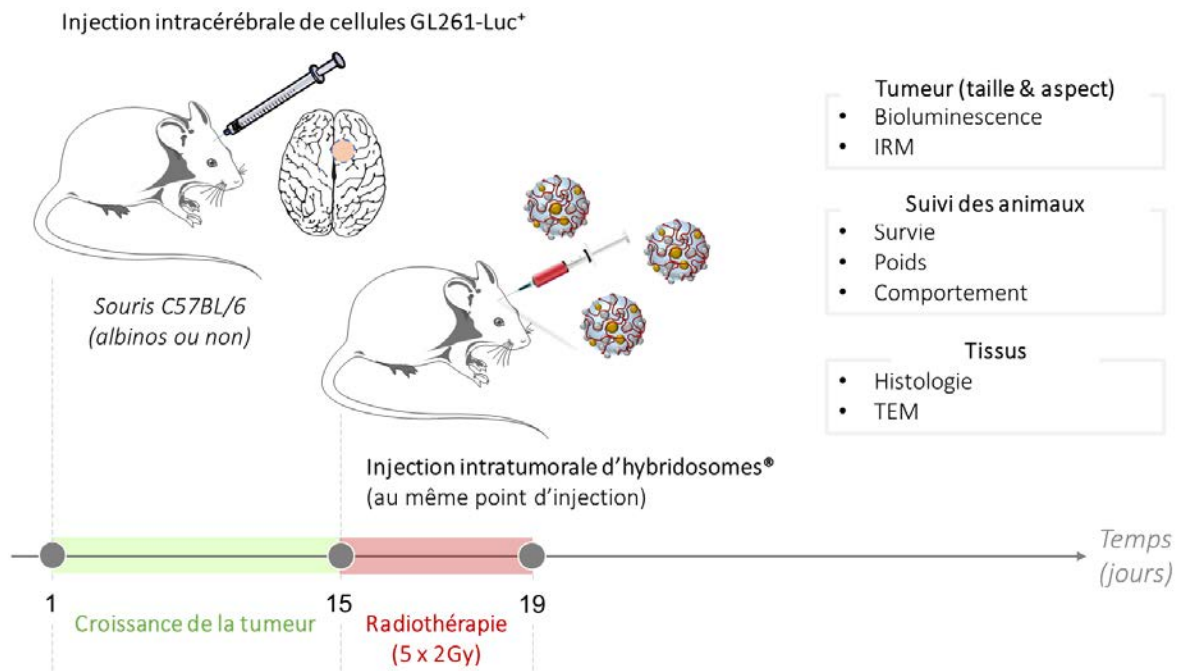


Figure 4. 12 - Schéma du protocole expérimental sur souris pour l'évaluation des propriétés des hybridosomes en tant qu'agent d'amélioration de la radiothérapie sur le glioblastome.

Les souris sont suivies au cours de l'étude grâce à plusieurs indicateurs. L'indicateur principal est la survie des animaux en fonction du temps. Les animaux sont euthanasiés lorsque des signes anormaux sont détectés, physiques (par exemple une baisse de poids importante, une baisse d'activité ou une prostration) ou sociaux (par exemple une baisse d'interaction avec les congénères). L'activité des cellules tumorales ainsi que le volume tumoral peuvent être suivis grâce aux mesures de bioluminescence et d'IRM, respectivement. Cela nous permet d'obtenir des informations relatives à l'évolution de la tumeur ainsi que des informations morphologiques et anatomiques. Après le décès, les organes (en particulier le cerveau) peuvent être prélevés pour procéder à des analyses histologiques ou par microscopie électronique à transmission.

Nous avons constitué 6 groupes de souris possédant une tumeur GL261-Luc⁺ et recevant des traitements différents. Nous utilisons des souris C57BL/6, dont une partie est albinos. Seule les souris albinos seront par la suite suivies par bioluminescence (meilleur signal). Les animaux reçoivent une injection intratumorale d'H(Fe), d'H(Fe/Au) ou aucune injection, en fonction de leur groupe, selon le **Tableau 4. 2**. Le même jour, la radiothérapie débute pour les groupes concernés, à hauteur de 2 Gy/jour pendant 5 jours consécutifs.

Tableau 4. 2 – Groupes de traitement pour l'expérimentation *in vivo*.

| | Traitement | Nombre de souris (<i>dont albinos</i>) |
|------------------|------------------------|--|
| Groupe #1 | <i>groupe contrôle</i> | 11 (6) |
| Groupe #2 | H(Fe) | 7 (7) |
| Groupe #3 | H(Fe/Au) | 9 (3) |
| Groupe #4 | IR | 12 (6) |
| Groupe #5 | H(Fe) + IR | 11 (11) |
| Groupe #6 | H(Fe/Au) + IR | 13 (7) |

H(Fe) : Hybridosomes SPION@PEG_{2k}-PAA_{7k}

H(Fe/Au) : Hybridosomes SPION/AuNP@PEG_{2k}-PAA_{7k}

IR : Irradiation

Nous nous sommes assurés de l'homogénéité des groupes de souris. Pour cela, nous avons retiré deux souris de l'étude. Celles-ci présentaient à l'issue de la croissance tumorale (9^{ème} ou 10^{ème} jour) des tumeurs trop importantes (volume ~30 mm³, déterminé par IRM). Les statistiques des volumes tumoraux des 6 groupes de souris avant et après retrait des deux souris sont présentées **Figure 4. 13 A** et **B**, respectivement. On voit qu'au final les groupes présentent des populations assez homogènes, sans grosses tumeurs. Il est particulièrement important que le groupe témoin ne comporte pas de grosses tumeurs, afin de ne pas fausser les résultats de survie de notre étude (i.e. pour que le groupe témoin ne meure pas plus vite artificiellement, ce qui pourrait favoriser les résultats en faveur de notre traitement).

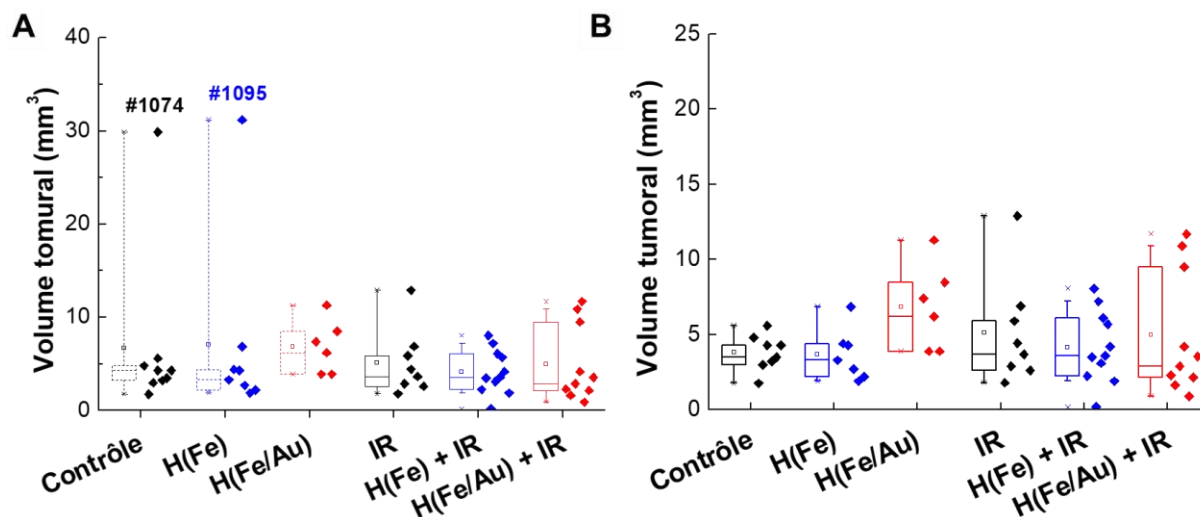


Figure 4. 13 – Distribution de taille des tumeurs des 6 groupes de souris avant (A) et après (B) le retrait des deux grosses tumeurs des souris #1074 (contrôle) et #1095 (H(Fe)). Cette distribution correspond aux mesures de taille effectuées 9 ou 10 jours après l’implantation des cellules tumorales. La médiane est représentée par la ligne horizontale dans les boîtes. Les limites inférieure et supérieure des boîtes représentent le 1^{er} et le 3^{ème} quartile, respectivement. Les moustaches inférieure et supérieure représentent le 1^{er} et le 9^{ème} décile, respectivement.

IV.2.3.2.2. Résultats

IV.2.3.2.2.1. Survie

La **Figure 4. 14** présente les courbes de survie de Kaplan-Meier de tous les groupes en fonction du temps. En premier lieu, les groupes n’ayant pas subi de radiothérapie (lignes pointillées) présentent tous un profil de survie semblable, avec un décès rapide autour de 20 jours après l’induction de la tumeur. La présence ou non d’hybridosomes (courbes rouge et bleue pointillées) n’entraîne pas modification significative de survie par rapport au groupe témoin (courbe noire pointillée). Sans traitement de radiothérapie particulier, les souris décèdent donc rapidement. Lorsque les souris sont traitées uniquement par radiothérapie (courbe noire pleine), il ne semble pas y avoir de réel changement, tout comme lorsque la radiothérapie se fait en présence d’hybridosomes ne contenant que des SPION (courbe bleue pleine). **La radiothérapie seule ou en présence de SPION ne semble donc pas améliorer la survie des souris.**

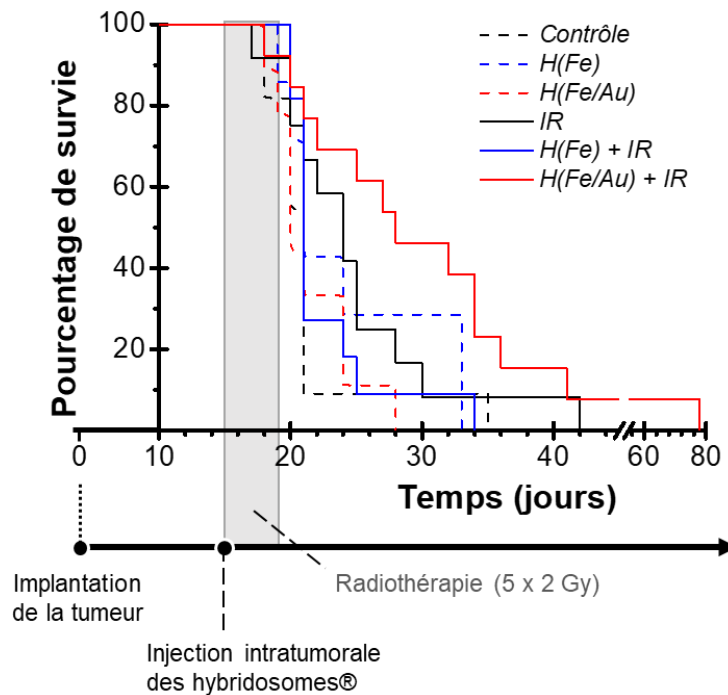


Figure 4. 14 – Courbes de survie de Kaplan-Meier des individus des différents groupes en fonction du temps.

De manière très intéressante, **l'injection d'hybridosomes mixtes Fe/Au suivie de la radiothérapie** (courbe rouge pleine) **mène à une réelle modification de la survie des souris.** Cette amélioration du traitement radiothérapique en présence d'hybridosomes Fe/Au est traduite par l'analyse statistique de la survie, qui est résumée en **Figure 4. 15**. Ainsi, en se concentrant tout d'abord sur la médiane, on peut voir que 50% des souris sont décédées à 28 jours, contre 21 jours pour le contrôle sans hybridosomes ni irradiations et 24 jours pour les irradiations seules. Du point de vue de la survie moyenne du groupe, une fois de plus, le groupe #6 se démarque des autres, avec une survie moyenne de 32 jours, contre 21,5 jours pour le groupe contrôle et 24,8 jours pour le groupe avec irradiation seule. On note par ailleurs qu'il y a une différence significative entre les groupes #6 et #1 ($p = 0,0115$, logrank), c'est-à-dire entre le groupe H(Fe/Au) + IR et le groupe contrôle. Il s'agit du seul groupe avec une différence significative vis-à-vis du groupe contrôle. En revanche, même si le nombre de souris utilisé était à peu près le même (12 et 13 respectivement), le traitement avec irradiation seule n'a pas montré de bénéfice significatif ($p = 0,1123$). Cela est attendu pour le modèle GL261 qui est relativement radiorésistant.²⁶ Les groupes traités avec H(Fe), H(Fe/Au) et même H(Fe) + IR n'ont montré aucune différence significative avec le groupe contrôle ne recevant aucun traitement.

Il est important de noter que l'intervalle de confiance (95%) sur la survie moyenne des souris du groupe H Fe/Au + IR (#6) est très élevé ([22,7 ; 41,3] jours). Cela traduit l'importante dispersion de l'échantillon. Ainsi, dans ce groupe, la première souris décède à 18 jours alors que la dernière survivante décède à 78 jours. Il y a donc un effet significatif de la combinaison entre H(Fe/Au) et l'irradiation, mais cela n'empêche pas un certain nombre d'individus de décéder tout aussi rapidement qu'en l'absence de traitement. Globalement, ce groupe se comporte toutefois mieux que les autres et survit plus longtemps. Cette souris à la survie exceptionnelle sera abordée plus en détail par la suite (cf. partie « *Comparaison de l'IRM et de la bioluminescence* »). À noter que **même si on enlève la souris à la survie exceptionnelle des données, la survie du groupe #6 reste quand même significativement améliorée, avec une moyenne de survie de $28,2 \pm 4,6$ et une médiane à 27,5 jours (Figure 4. 15 ; ●).**

Nous remarquons que les hybridosomes SPION n'améliorent pas la radiothérapie (groupe #5), et même possiblement induisent un certain effet délétère comparé à la radiothérapie seule. Cela contraste avec quelques études précédentes montrant un effet de radiosensibilisation des NP d'oxyde de fer.^{27,28} Cet effet n'est pas principalement relié à l'augmentation de la déposition de dose, comme dans le cas de l'or, mais résulte d'une production de ROS catalysée par le fer *via* les réactions de Fenton ou Haber-Weiss.¹⁴ Plus récemment, il a été démontré que les SPION irradiées ciblent l'environnement tumoral immunosuppresseur, et réactivent la défense immunitaire au niveau de la tumeur.²⁹ Même si l'oxyde de fer seul ne montre aucun effet, une synergie peut apparaître entre l'or et le fer en combinant les effets d'important dépôt de dose et de catalyse des ROS. Cela a été observé précédemment dans le cas de l'association d'or et d'oxyde de manganèse.³⁰ Cette synergie pourrait expliquer en partie l'effet bénéfique des H(Fe/Au). L'étude de cette synergie nécessiterait de pouvoir évaluer l'effet de l'or seul. Toutefois, nous n'avons pas pour l'instant élaboré des hybridosomes composés intégralement d'AuNP-oléylamine.

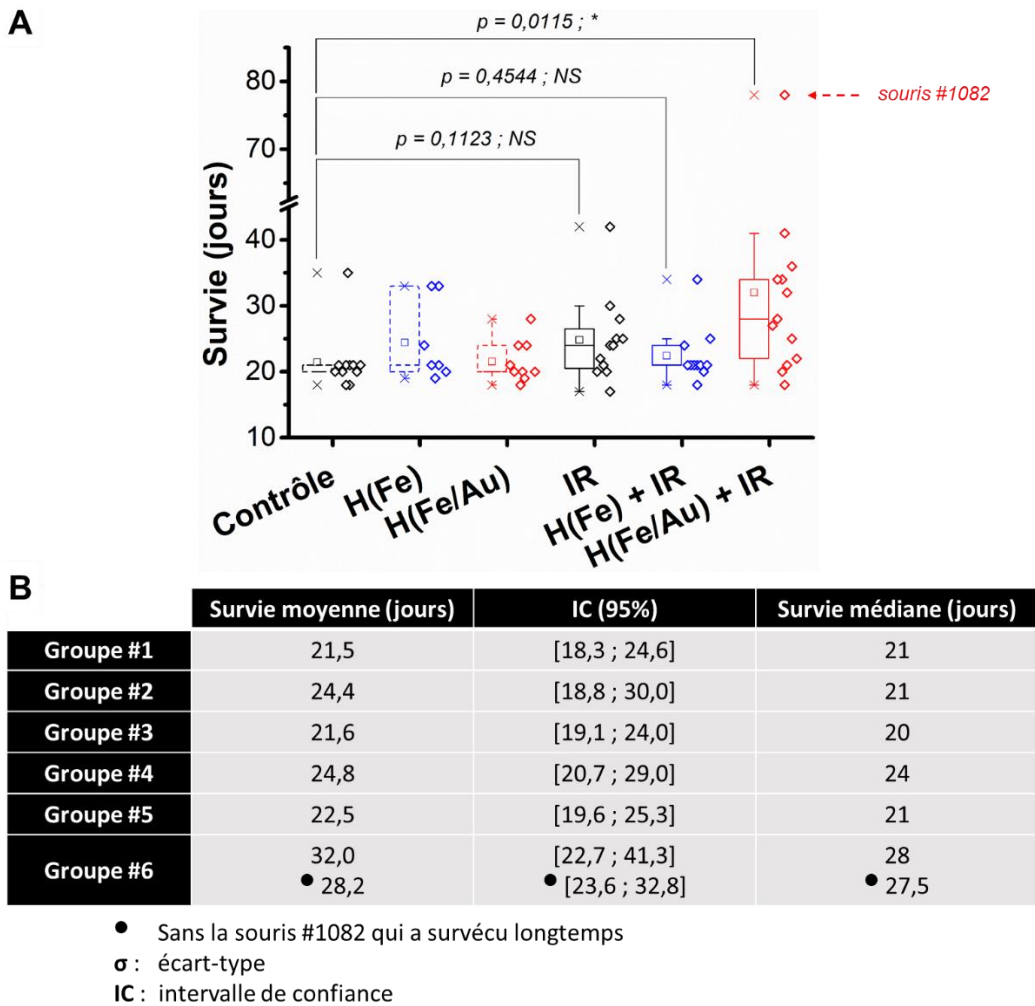


Figure 4. 15 – Analyse statistique de la survie des groupes de souris considérés. **(A)** Représentation en boîte à moustache. La médiane est représentée par la ligne horizontale dans les boîtes. Les limites inférieure et supérieure des boîtes représentent le 1^{er} et le 3^{ème} quartile, respectivement. Les moustaches inférieure et supérieure représentent le 1^{er} et le 9^{ème} décile, respectivement. Le résultat du test de significativité (logrank) est indiqué avec la P value : P value > 0,05, non significatif (NS) / 0,01 < P value ≤ 0,05 → différence significative (*). **(B)** Résumé de la moyenne, l’intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la médiane de survie de chaque groupe.

IV.2.3.2.2.2. Suivi des tumeurs par IRM et bioluminescence

Pour le moment, seule la survie des souris a été présentée. Nous avons également suivi l’évolution des tumeurs par IRM et bioluminescence. La première mesure de bioluminescence a été réalisée le 9^{ème} jour après l’implantation des cellules tumorales, et le 10^{ème} ou 11^{ème} jour pour l’IRM. Il n’y a pas eu de mesures pendant la période d’irradiation (jusqu’au 21^{ème} jour) pour éviter les anesthésies répétitives. Ensuite, les mesures ont été acquises tous les 4 à 5 jours jusqu’au décès des animaux. Seules les souris albinos peuvent être suivies par bioluminescence (ce qui explique le plus grand nombre d’animaux suivis en IRM par rapport à la bioluminescence). La **Figure 4. 16** présente l’évolution des tumeurs en fonction du temps suivant l’implantation de la tumeur, en

termes de volumes mesurables en IRM et d'intensités de bioluminescence. Très souvent, peu de mesures ont pu être faites avant le décès de la souris, ce qui explique que seuls un ou deux points sont tracés sur le graphique pour chaque individu.

Ici, la mesure de taille est réalisée grâce au contraste naturel des tumeurs par rapport au cerveau sain. La propriété d'agent de contraste des SPION n'est pas utilisée. Il s'agit en revanche d'un moyen d'attester de la bonne injection des hybridosomes dans la tumeur. Ceci diffère de l'injection intraveineuse des hybridosomes, où l'accumulation des SPION dans le foie permettait de mettre en évidence la tumeur et la vascularisation du foie.¹⁸

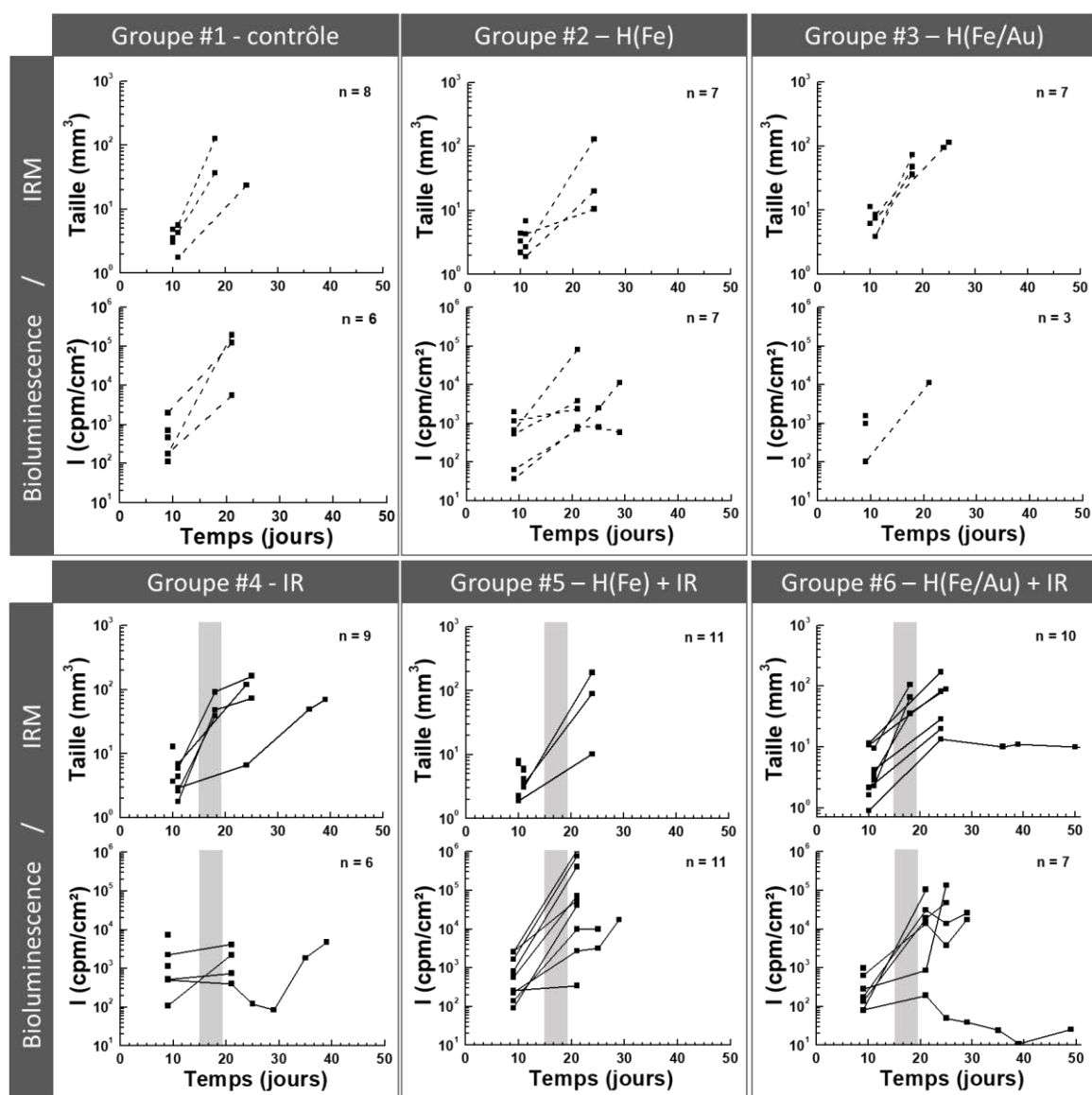


Figure 4. 16 – Suivi de la croissance des tumeurs en fonction du temps après l'implantation de la tumeur pour les groupes contrôle (#1), H(Fe) (#2), H(Fe/Au) (#3), IR (#4), H(Fe) + IR (#5) et H(Fe/Au) + IR (#6). Pour chaque groupe, les volumes des tumeurs mesurées en IRM (haut) et les intensités de bioluminescence (bas) sont présentés.

Le dernier point de suivi (suivi impossible par la suite à cause du décès) des souris appartenant aux 3 groupes non irradiés (#1-3) dépasse rarement 20 jours (seulement 2 souris sur 18). En revanche, il est clair à partir des mesures de bioluminescence que plusieurs individus dans les groupes recevant les irradiations (groupe #4-6) montrent une réduction de l'intensité du signal de bioluminescence à l'issue de la période d'irradiation. Cela est particulièrement vrai pour le groupe #6 (H(Fe/Au) + IR) où 3 souris sur 7 ont montré une diminution significative du signal après irradiation. **Il s'agit du seul groupe pour lequel l'intensité de bioluminescence présente une diminution aussi claire.** Dans le groupe contrôle #4, qui est irradié sans hybridosomes, seule 1 souris sur 6 montre une telle diminution du signal. 2 souris dans le groupe irradié en présence d'hybridosomes Fe (groupe #5) voient un arrêt temporaire de leur croissance tumorale, mais aucune diminution de la taille n'a été observée. Les mesures de bioluminescence semblent donc confirmer les observations au niveau de la survie. Cela montre que **la présence d'or est indispensable pour atteindre un effet radiothérapeutique bénéfique.**

Pour ce qui est de l'IRM, les données ne permettent pas de dégager de tendance particulière selon les groupes, si ce n'est bien sûr le cas de la souris survivant très longtemps. Il y a donc peut-être une diminution de l'activité des cellules tumorales suite au traitement pour certaines souris du groupe #6 (comme vu en bioluminescence) mais en aucun cas une baisse ou un arrêt de la croissance du volume tumoral. Il est difficile de faire une analyse sur ces données qui ne comportent en général qu'un ou deux points. S'il y a un effet du traitement, il est trop faible pour que nous le percevions avec si peu de points.

Afin d'illustrer les différentes mesures effectuées, nous présentons ci-dessous les images IRM (1 souris choisie par groupe) (**Figure 4. 17**) et de bioluminescence (**Figure 4. 18**) *in vivo*, avant et après traitement.

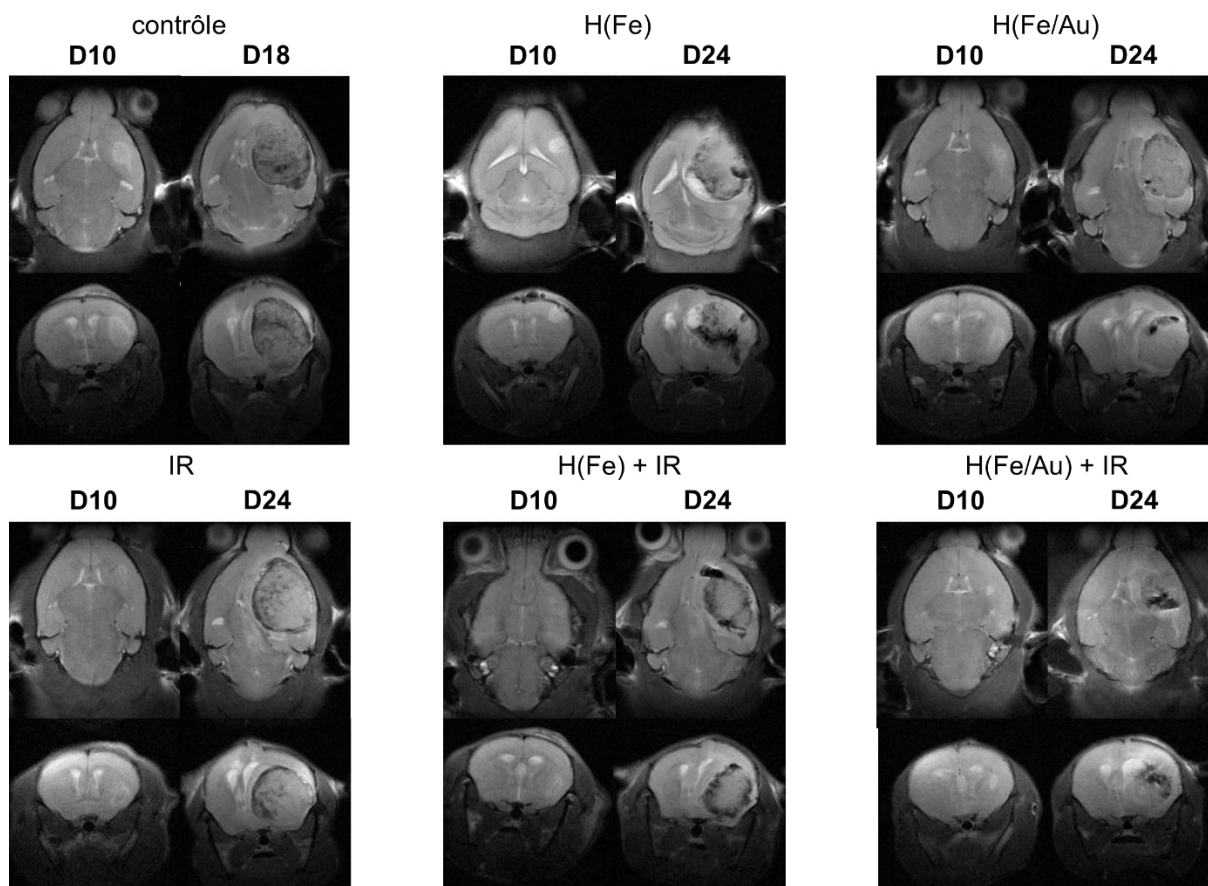


Figure 4. 17 – Images IRM de cerveaux d’une souris de chaque groupe considéré, aux jours 10 et 24. Pour chaque temps, les coupes axiales (haut) et coronales (bas) apparaissent.

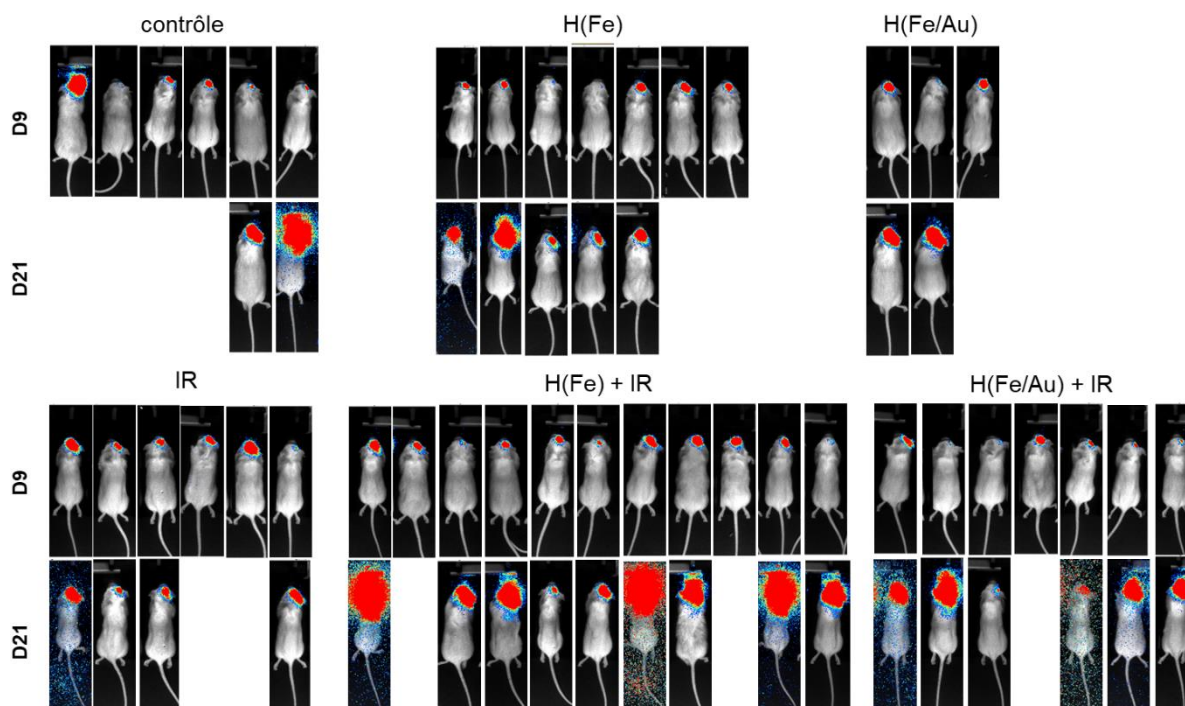


Figure 4. 18 – Suivi de la bioluminescence de toutes les souris albinos des différents groupes avant et après radiothérapie (le cas échéant).

IV.2.3.2.2.3. Comparaison de l'IRM et de la bioluminescence

La bioluminescence et l'IRM sont des techniques complémentaires pour le suivi de la croissance tumorale. La bioluminescence produit une mesure de l'activité des cellules tumorales. C'est une technique rapide et peu coûteuse mais qui ne peut pas être appliquée en clinique. Elle peut être utilisée à condition qu'un modèle tumoral exprimant la luciférase soit disponible. Des divergences peuvent apparaître à cause de la nature hautement diffusante des tissus cérébraux, ce qui se traduit par une perte d'intensité au niveau du détecteur pour les tumeurs les plus profondes. La position de la souris par rapport au détecteur de bioluminescence est aussi un facteur important.³¹ À noter également que la bioluminescence est dépendante de l'apport en luciférine par la circulation sanguine. Ainsi, une mauvaise vascularisation ou bien encore une nécrose peuvent se traduire par une diminution ou une absence de bioluminescence. Malgré cela, il s'agit d'une technique extrêmement pratique et rapide en exploration pré-clinique. En clinique, le diagnostic est effectué grâce à l'IRM. Il s'agit d'une technique d'imagerie donnant des informations morphologiques et spatiales sur la tumeur. À noter que la distinction entre l'inflammation et la tumeur elle-même n'est pas toujours évidente. Cependant, contrairement à la bioluminescence, l'IRM peut ne pas prendre en compte des cellules tumorales isolées, qui peuvent dans le cas du GBM s'étendre à plusieurs centimètres de la tumeur principale.

Étant donné que les études avec des données simultanées en IRM et en bioluminescence sont rares, nous avons tiré profit de notre ensemble de données pour vérifier la corrélation entre l'IRM et les mesures de bioluminescence. La **Figure 4. 19** est une représentation Log-Log de l'intensité de bioluminescence en fonction du volume tumoral déterminé par IRM. Les données suivent globalement une droite de pente 1, ce qui indique que **le volume obtenu par IRM est positivement corrélé à l'intensité de bioluminescence**. La divergence est plus importante pour les petits volumes tumoraux (< 10 mm³). Cela pourrait être dû à l'hyposignal des SPION qui masque la tumeur et rend délicate la mesure IRM des petites tumeurs.

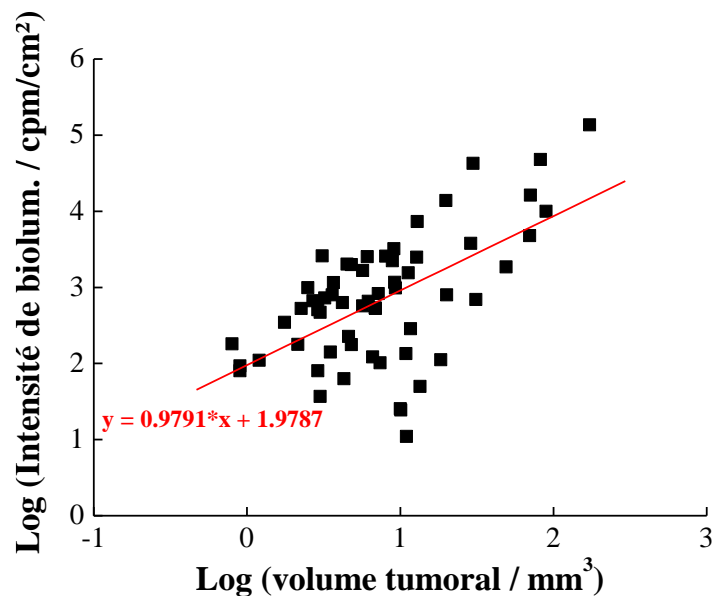


Figure 4. 19 – Représentation Log-Log de l’intensité de bioluminescence en fonction du volume tumoral déterminé par IRM sur la durée du suivi, pour les souris albinos.

IV.2.3.2.2.4. *Un cas de survie très prolongée*

De manière frappante, une souris (#1082) traitée avec des hybridosomes SPION/AuNP combinés avec l’irradiation (groupe #6) a survécu jusqu’au 78^{ème} jour après l’implantation de la tumeur. La taille de la tumeur a été suivie sur toute cette période par bioluminescence et IRM. Les données relatives à cette souris sont rassemblées ci-dessous. Plus précisément, la **Figure 4. 20** présente le suivi IRM et de bioluminescence à partir de la fin du traitement jusqu’à la mort l’animal.

Le signal de bioluminescence de la tumeur diminue clairement après le traitement, sur une période de plus de 3 semaines (du 21^{ème} au 39^{ème} jour) (**Figure 4. 20 A**). La diminution de l’intensité sur cette période est de plus d’un facteur 20. À partir du 40^{ème} jour, la bioluminescence augmente à nouveau, tout d’abord lentement, puis plus violemment. Au niveau du volume tumoral déterminé par IRM (**Figure 4. 20 B**), la tumeur est restée extrêmement petite et cachée par le signal hypointense des SPION du 24^{ème} au 62^{ème} jour. Une augmentation soudaine du volume tumoral a eu lieu entre les 70^{ème} et 78^{ème} jours. Les volumes déterminés en IRM sont toutefois à prendre avec précaution, étant donné que le contraste très intense apporté par les SPION gêne la mesure des tumeurs. Cela est vrai pour les mesures post-injection (du 24^{ème} au 62^{ème} jour). Les toutes dernières mesures (70^{ème} et 78^{ème} jour) sont plus fiables étant donné que la tumeur a bien grossi, ce qui permet de bien en distinguer les contours.

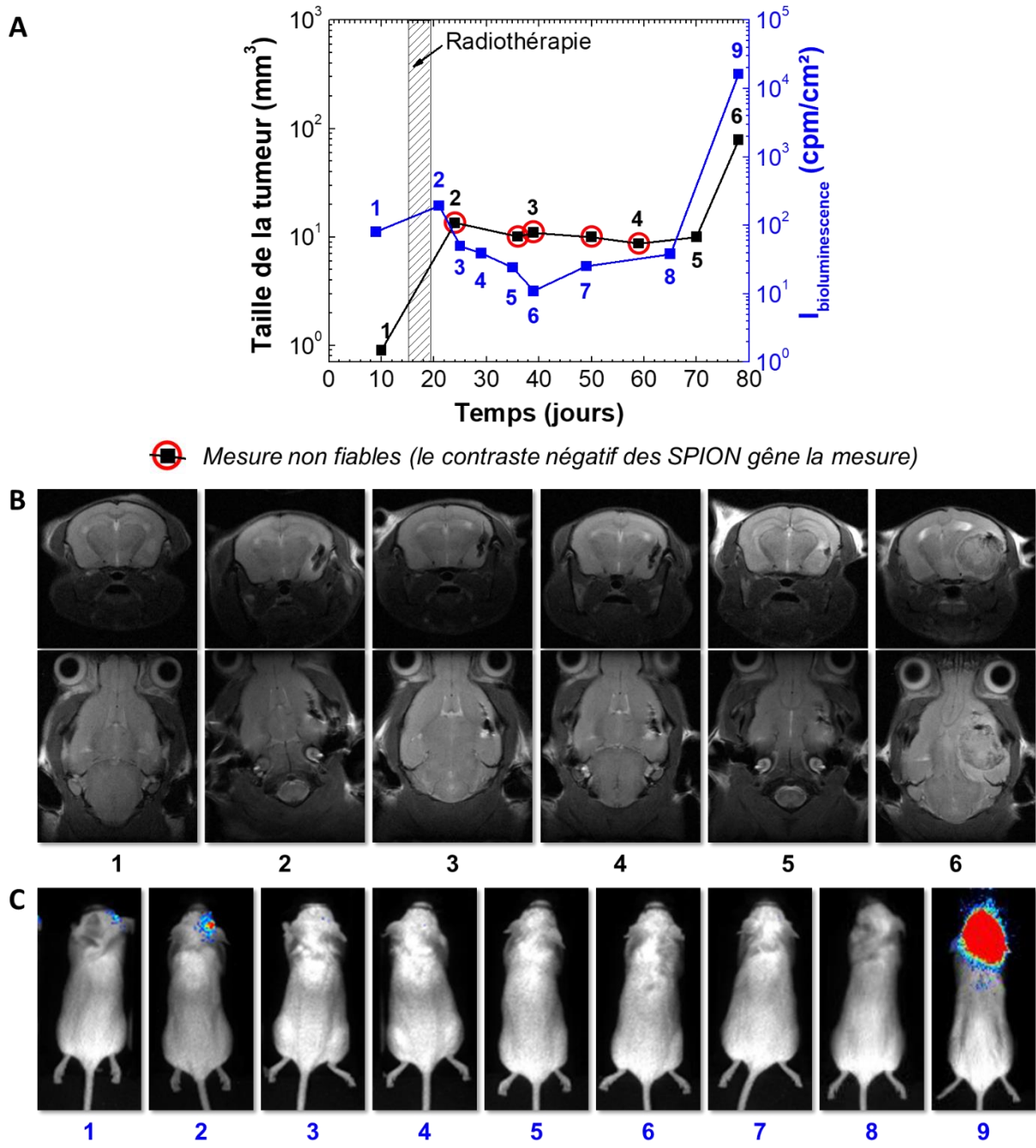


Figure 4. 20 – Suivi en fonction du temps de la souris ayant vécu le plus longtemps (#1082) jusqu'à son décès (jour 78). **(A)** Évolution du volume de la tumeur (IRM) et de l'intensité de bioluminescence. **(B)** Images IRM du cerveau à différents temps (correspondant aux numéros noirs en (A)) en coupe axiale (haut) et coronale (bas). **(C)** Images de bioluminescence de l'animal entier à différents temps (numéros rouges en (A)).

Pour aller plus loin, le cerveau de la souris #1082 a été prélevé après le décès, sectionné en plusieurs coupes séparées de 100 μm et analysé par microscopie optique après colorations HES et Perls (**Figure 4. 21**). Une très grosse tumeur est visible sur les coupes HES, en accord avec les observations d'IRM et de bioluminescence. De plus, au 78^{ème} jour, la coloration de Perls confirme la localisation de fer en périphérie de la tumeur, comme visible en IRM. Il est possible que le fer se retrouve en périphérie suite à la croissance de la tumeur importante du milieu vers l'extérieur. De larges zones à l'intérieur de la tumeur semblent endommagées, nécrosées ou coagulées. Cela confirme également que **le fer des H(Fe/Au) est toujours présent même 2 mois après leur injection intratumorale**. Nous pouvons raisonnablement espérer qu'une radiothérapie additionnelle approximativement au 40^{ème} jour, c'est-à-dire 20 jours après la fin du traitement, aurait permis d'améliorer encore plus la survie de cet individu. Cette radiothérapie aurait bénéficié des NP toujours présentes à ce stade.

Il faut tout de même noter que la tumeur de cette souris était au départ de taille relativement faible (0,9 mm^3 , pour une taille moyenne du groupe #6 de $5,0 \pm 4,1 \text{ mm}^3$).

À noter que les organes prélevés lors du décès de la souris peuvent être analysés en TEM. Cela n'a toutefois pas pu être encore fait au moment de l'écriture de ces lignes.

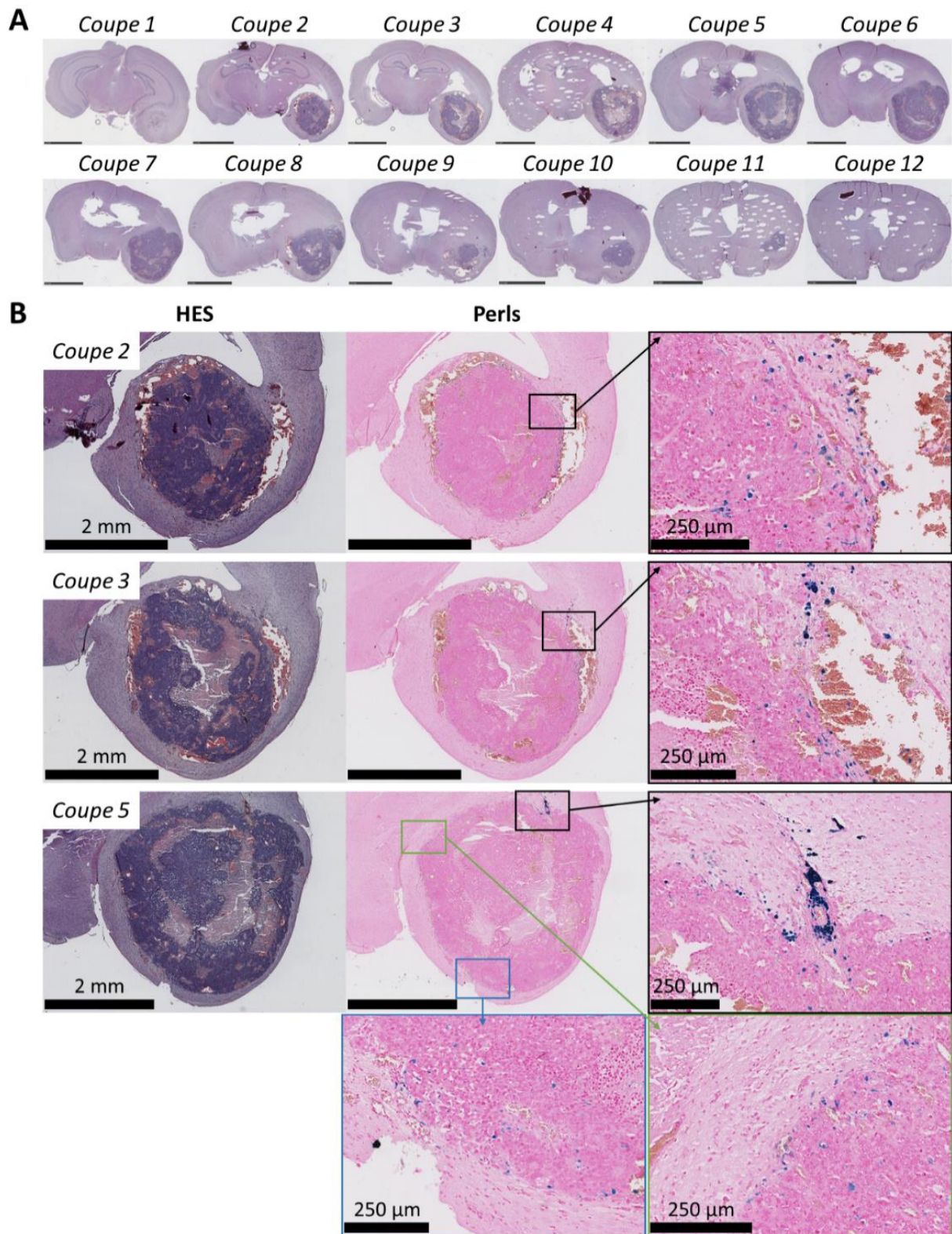


Figure 4. 21 – (A) Microscopie de coupes du cerveau de la souris #1082 après coloration HES. Les coupes 1 à 12 sont réalisées tous les 100 μm. **(B)** Agrandissement de la zone tumorale des coupes 2, 3 et 5, avec coloration HES (gauche) et Perls (milieu et droite). Les images de droite représentent un zoom des zones encadrées.

IV.3. Perspectives

IV.3.1. Quantité d'AuNP

De manière intéressante, l'augmentation de la survie a été obtenue ici avec des concentrations en or très faibles. Un travail précédent basé sur des simulations numériques a conclu qu'une concentration intratumorale de 0,7 % massique (i.e. 7 mg Au/g de tumeur) est requise pour observer un doublement de la dose avec des rayons X de 140 kVp.³² Une autre simulation numérique suggère qu'une concentration en AuNP d'au moins 0,1% est nécessaire pour générer la radiosensibilisation avec des rayons X de basse énergie (~100 keV).³³ La plupart des études expérimentales *in vivo* ont vu des améliorations significatives de la survie des animaux avec des AuNP à des concentrations entre 0,1 et 75 mg/g de tumeur.^{11,15,32} Toutefois, la proportion de NP qui atteint la tumeur est généralement <1%, ce qui peut mener à l'injection de doses au-delà du raisonnable pour la transposition en clinique.³⁴ Mowat *et al.* ont estimé qu'une injection de 8 µg/g (de masse corporelle) ou moins est pertinente pour une transposition clinique. Depuis lors, des résultats de radiosensibilisation significatifs ont été observés avec les AuNP à moins de 5 µg/g.³⁵⁻³⁷ Dans nos travaux, 0,25 µg d'or ont été injectés dans les tumeurs, soit de l'ordre 0,01 µg/g de masse corporelle, associés avec des irradiations dans la gamme ~10-100 keV, comme dans la plupart des études précliniques rapportées. Ainsi, nous pouvons augmenter la quantité d'or pour augmenter le bénéfice radiothérapeutique. Cela peut être facilement atteint sans augmenter la quantité d'hybridosomes totale, en augmentant le ratio d'AuNP par rapport aux SPION dans leur coque, ou même en utilisant des hybridosomes entièrement constitués d'or. En effet, l'oxyde de fer a été utilisé ici comme moyen de prouver et de suivre la présence des SPION au niveau du site d'injection et il n'est pas indispensable au bénéfice radiosensibilisant. Même si l'amélioration de l'irradiation devrait être bien plus faible que pour des énergies de radiation cliniques (MeV), plusieurs publications montrent que des matériaux avec un Z élevé comme l'or ou le gadolinium ont quand même un effet de déposition de dose significatif.^{11,13,38}

À noter que la taille des AuNP est également un facteur important dans l'amélioration de la radiothérapie. Il a notamment été montré que les AuNP de plus petite taille étaient plus efficaces pour la production de ROS.³⁹ Mais une plus petite taille peut par ailleurs induire une plus grande toxicité, menant éventuellement à une plus grande mortalité.⁴⁰ Un bon compromis doit donc être trouvé au niveau de la taille. Dans notre cas, les AuNP font 10 nm de diamètre et ne montrent pas de toxicité apparente sur les souris. Qui plus est, l'association des NP au sein d'un objet tel que

les hybridosomes peut potentiellement augmenter l'effet de dépôt de dose. Il a par exemple été montré que les clusters de SPION menaient à un dépôt de dose accru sous irradiation.⁴¹

Il serait par ailleurs intéressant de quantifier la génération des ROS par les hybridosomes sous irradiation, avec et sans or.

La polyvalence de la coque en termes de compositions en NP permet d'envisager des propriétés très variées, permettant par exemple de faire de l'hyperthermie ou encore de la thérapie photodynamique. Ces aspects ne seront pas détaillés ici.

IV.3.2. Encapsulation de composés actifs

Nous avons déjà abordé en fin de chapitre précédent l'encapsulation de molécules thérapeutiques dans les hybridosomes. Elles doivent impérativement être très hydrophobes pour que nous espérons réussir à les encapsuler. Par exemple le témazolomide s'est montré trop hydrosoluble lors de nos essais préliminaires. Il s'agit pourtant de la molécule de référence dans le traitement du GBM. Parmi les autres molécules possibles figure la carmustine, elle aussi bien trop soluble (4 mg/mL). La lomustine, également de la famille des nitrosourées, pourrait être intéressante avec sa solubilité dans l'eau bien plus faible et ses promesses d'amélioration du traitement du GBM. Un essai de phase 3 en combinaison avec le témazolomide a en effet conclu à une amélioration de la survie moyenne (toutefois sur un petit échantillon de patients).⁴² La curcumine présente également des propriétés intéressantes sur de nombreuses cibles et est engagés dans de nombreux essais cliniques sur des cancers variés. Son efficacité sur le GBM est à prouver mais elle pourrait augmenter l'activité cytotoxique d'autres molécules, la lomustine par exemple.⁴³⁻⁴⁵ Notre groupe a commencé des tests visant à l'encapsuler. Nous avons également parlé dans le chapitre précédent du paclitaxel, dont les propriétés de solubilité sont engageantes pour l'encapsulation par nanopréciptation. Là aussi des essais sont en cours. Finalement, nous pouvons parler d'une classe de molécules très intéressantes, les facteurs antiangiogéniques, en particulier ceux agissant sur le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). La vascularisation anormale de la tumeur est un facteur majeur dans la résistance au traitement du GBM, par exemple en induisant une pression interstitielle élevée dans la tumeur (frein à la délivrance de la chimiothérapie) ou en empêchant l'oxygénation (frein à la radiothérapie et à la génération de ROS).⁷ Cette vascularisation anormale est principalement attribuée aux niveaux très élevés de VEGF dans la tumeur.⁷ Des inhibiteurs de VEGF sont donc des pistes intéressantes pour

contrer le GBM. On peut par exemple citer le sorafénib, qui est très peu soluble dans l'eau et présente des effets secondaires très importants du fait de son faible passage de la barrière hémato-encéphalique (doses administrées importantes).⁴⁶ Pour cette molécule, l'administration locale efficace dans la tumeur cérébrale est donc une voie d'amélioration. Des NP lipidiques avec du sorafénib ont par exemple montré une activité antiangiogénique et une cytotoxicité (cellules U87MG) *in vitro* ainsi qu'une normalisation de la vascularisation *in vivo*. Cette molécule est donc potentiellement intéressante pour nous et sera certainement explorée par la suite.

L'encapsulation d'un médicament en conjonction avec l'amélioration de la radiothérapie induite par les NP peut laisser entrevoir des synergies positives d'un point de vue thérapeutique.

IV.3.3. Incorporation dans un gel post-résection

Comme déjà évoqué, la procédure classique de traitement du glioblastome passe par la chirurgie et la résection de la tumeur. De par la nature hautement infiltrante du GBM, la résection totale est quasi impossible, ce qui constitue une difficulté majeure pour un traitement efficace. Nous pensons que les hybridosomes pourraient avoir un rôle intéressant à jouer s'ils étaient administrés à l'issue de la chirurgie, directement dans la cavité résultante. Par exemple, des implants polymériques biodégradables imprégnés de principe actif et placés dans la cavité de résection ont montré en présence de radiothérapie une augmentation significative de la survie médiane, par rapport à la radiothérapie seule (13,9 contre 11,6 mois).⁴⁷ Dans notre cas, l'idée serait d'incorporer les hybridosomes dans un gel, lequel aurait l'avantage d'épouser finement la cavité puis de se dégrader afin de délivrer les NP plus efficacement même dans des endroits difficilement accessibles. Par exemple, le gel pourrait être constitué de polymère F127 qui est un copolymère tribloc de la famille des Pluronic (poloxamères). En solution dans l'eau, ce polymère forme un gel physique thermosensible qui présente une transition liquide-gel quand la température est augmentée à une température proche de celle du corps. Ainsi, il s'agit d'un candidat pertinent pour les formulations injectables biomédicales. Ce polymère a aussi des propriétés favorables comme la non-toxicité et la biocompatibilité, et il est approuvé par la FDA. Il a par conséquent été utilisé dans de nombreuses applications biomédicales.⁴⁸ Le F127 n'est toutefois pas biodégradable (mais le gel pourrait éventuellement être éliminé par les fluides corporels excrétés dans le cerveau). Il est également possible de mélanger le Pluronic avec un autre polymère biodégradable comme l'alginate⁴⁹ ou l'acide hyaluronique⁵⁰. Par ailleurs, une molécule anticancéreuse encapsulée dans les hybridosomes pourrait diffuser progressivement à

travers le gel afin de permettre la chimiothérapie. La diffusion du principe actif encapsulé pourrait être modulée à la fois par les propriétés du gel et la perméabilité des hybridosomes, laquelle pourrait être modifiée par le nombre de couches polymériques autour des hybridosomes. Bien que séduisante, l'incorporation des hybridosomes dans un gel n'est pour l'instant qu'une idée et n'a pas encore été explorée. Cette stratégie nécessite de nombreux développements, tant au niveau de la rhéologie du gel, de sa perméabilité, de sa dégradation en fonction de la température ou du temps, de sa dégradation au contact des cellules ou encore de son comportement vis-à-vis des rayons X, etc... et bien sûr des tests *in vivo*.

IV.4. Conclusion

Nous avons pu évaluer dans ce chapitre l'utilisation des hybridosomes composés de SPION et d'AuNP pour l'amélioration de la radiothérapie dans le cadre du GBM. Cette évaluation a été effectuée sur le modèle GL261-Luc⁺ (sur souris C57BL/6, albinos ou non), modèle murin standard qui offre ici la possibilité de suivre l'activité des cellules tumorales par bioluminescence. Le suivi a par ailleurs été effectué par IRM et l'étude complétée par des prélèvements *post-mortem*. Le protocole engagé consiste à induire une tumeur cérébrale *via* injection intracrânienne des cellules tumorales, qui s'installent et croissent pendant deux semaines. Ensuite, le traitement se compose d'une injection d'hybridosomes suivie d'une semaine de radiothérapie à hauteur de 2 Gy/jour. Nous avons comparé 6 groupes de souris avec injection d'hybridosomes SPION ou SPION/AuNP ou aucune injection, suivie ou non de la radiothérapie.

L'étude préliminaire de biodistribution des hybridosomes *in vivo* suite à l'injection intratumorale met en évidence la **persistance des hybridosomes au niveau de la tumeur pendant au moins 5 jours**. Cette présence est visible à la fois grâce au contraste négatif en IRM mais aussi par la coloration de Perls sur les tissus prélevés. Ceci est bienvenu dans le cas de notre protocole puisqu'une seule injection est nécessaire pour réaliser l'intégralité des irradiations sur la semaine. Cela permet de réduire la difficulté du traitement pour les souris. Le BODIPY encapsulé (qui mime un médicament) reste également confiné dans la zone tumorale sur la période étudiée. Il semblerait aussi que l'on retrouve un peu de BODIPY ailleurs, en particulier dans le foie avec l'apparition progressive de fluorescence en fonction du temps. L'analyse de Perls ne révèle toutefois pas d'accumulation de fer dans le foie.

La conclusion principale de cette étude est que **les hybridosomes SPION/AuNP permettent une amélioration de la radiothérapie *in vivo***, ce qui se traduit par une survie des souris (moyenne : 32 jours ; médiane : 28 jours) bien plus élevée que le groupe contrôle n'ayant rien reçu (21,5 jours ; 21 jours) mais aussi que le groupe ayant subi la radiothérapie seule sans injection d'hybridosomes (24,8 jours ; 24 jours). Seul le groupe SPION/AuNP + irradiation montre une baisse notable de bioluminescence après traitement (3 souris sur 7). **La présence d'or ET l'utilisation de la radiothérapie sont donc nécessaires pour obtenir une augmentation de survie notable.**

De manière très intéressante, **une souris ayant reçu les hybridosomes SPION/AuNP couplés à la radiothérapie a montré une survie exceptionnelle de 78 jours**, bien que la tumeur fût initialement relativement petite. Cette souris a été suivie jusqu'à son décès. De la fin du traitement jusqu'à plus de 60 jours, le volume de la tumeur déterminé par IRM reste très petit. Entre le 70^{ème} jour et le décès, la tumeur connaît alors une croissance très importante. La bioluminescence diminue quant à elle clairement pendant les 3 semaines suivant la fin du traitement, avant une augmentation puis une explosion du signal à partir du 40^{ème} jour. Il serait judicieux de réaliser une autre session de radiothérapie avant que la taille de la tumeur n'explode, par exemple autour du 40^{ème} jour, pour améliorer encore plus la survie. Cela est d'autant plus pertinent que **les hybridosomes** (ou tout du moins le fer) **sont encore présent dans la tumeur même au 78^{ème} jour**. Plusieurs sessions de radiothérapie sont donc potentiellement réalisables avec une seule injection d'hybridosomes.

Les hybridosomes ne constituent qu'une première étape pour l'amélioration du traitement du glioblastome et ils ne se substituent pas à la résection de la tumeur. Une piste intéressante serait l'incorporation de ces hybridosomes dans un gel qui serait déposé dans la cavité formée suite à la chirurgie. Cela pourrait permettre d'améliorer le traitement post-résection. À noter par ailleurs que les résultats présentés ici ont été obtenus avec une très faible quantité d'or (de l'ordre de 0,01 mg/kg de masse corporelle). Il serait donc judicieux d'augmenter cette proportion d'or, par exemple en augmentant le ratio AuNP/SPION dans la coque des hybridosomes (ici, 1:10) ou en utilisant des hybridosomes intégralement constitué d'AuNP. Finalement, l'amélioration réelle du traitement ne se fera pas sans l'utilisation conjuguée de la chimiothérapie. Les hybridosomes sont là aussi un atout grâce à leurs capacités d'encapsulation exceptionnelles. Nous ne sommes pas parvenus pour l'instant à l'encapsulation de molécules anti-cancéreuses mais des composés hydrophobes comme le paclitaxel, la curcumine ou encore des inhibiteurs du récepteur du VEGF

tels que le sorafénib sont des pistes intéressantes. **Les hybridosomes se présentent donc comme des nano-objets prometteurs avec des perspectives de synergie entre les propriétés radiosensibilisantes des NP et celle de la molécule encapsulée.**

IV.5. Références bibliographiques

1. Aubry, M. *et al.* From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget* 6, 12094–12109 (2015).
2. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352, 987–996 (2005).
3. Wang, Z., Yang, G., Zhang, Y.-Y., Yao, Y. & Dong, L.-H. A comparison between oral chemotherapy combined with radiotherapy and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 96, e8444 (2017).
4. Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J. R. & Wick, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro-Oncology* 15, 4–27 (2013).
5. Sant, M. *et al.* Survival of European patients with central nervous system tumors. *International Journal of Cancer* 131, 173–185 (2012).
6. Sarkaria, J. N. *et al.* Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology* 20, 184–191 (2018).
7. Clavreul, A., Pourbaghi-Masouleh, M., Roger, E. & Menei, P. Nanocarriers and nonviral methods for delivering antiangiogenic factors for glioblastoma therapy: the story so far. *International Journal of Nanomedicine* 14, 2497–2513 (2019).
8. Mehta, A. M., Sonabend, A. M. & Bruce, J. N. Convection-Enhanced Delivery. *Neurotherapeutics* 14, 358–371 (2017).
9. Séhédic, D. *et al.* Locoregional Confinement and Major Clinical Benefit of ¹⁸⁸Re-Loaded CXCR4-Targeted Nanocarriers in an Orthotopic Human to Mouse Model of Glioblastoma. *Theranostics* 7, 4517–4536 (2017).
10. Zhang, H. *et al.* Glioblastoma Treatment Modalities besides Surgery. *Journal of Cancer* 10, 4793–4806 (2019).
11. T. Butterworth, K., J. McMahon, S., J. Currell, F. & M. Prise, K. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* 4, 4830–4838 (2012).
12. Coulter, J. A., Hyland, W. B., Nicol, J. & Currell, F. J. Radiosensitising Nanoparticles as Novel Cancer Therapeutics — Pipe Dream or Realistic Prospect? *Clinical Oncology* 25, 593–603 (2013).
13. Rancoule, C. *et al.* Nanoparticles in radiation oncology: From bench-side to bedside. *Cancer Letters* 375, 256–262 (2016).
14. Xie, J. *et al.* Emerging Strategies of Nanomaterial-Mediated Tumor Radiosensitization. *Advanced Materials* 31, 1802244 (2019).
15. Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60, 977–985 (2008).

16. Pinel, S., Thomas, N., Boura, C. & Barberi-Heyob, M. Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 138, 344–357 (2019).
17. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine & Biology* 49, N309–N315 (2004).
18. Sciortino, F. *et al.* Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* 2, 796–799 (2016).
19. Klein, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 5 (2012).
20. Klein, S. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Novel X-ray Enhancer for Low-Dose Radiation Therapy. *Journal of Physical Chemistry B* 118, 6159–6166 (2014).
21. Maes, W. & Van Gool, S. W. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60, 153–160 (2011).
22. Clark, A. J. *et al.* Stable luciferase expression does not alter immunologic or in vivo growth properties of GL261 murine glioma cells. *Journal of Translational Medicine* 12, 345 (2014).
23. Trofymchuk, K. *et al.* BODIPY-loaded polymer nanoparticles: chemical structure of cargo defines leakage from nanocarrier in living cells. *Journal of Materials Chemistry B* 7, 5199–5210 (2019).
24. Goubault, C. *et al.* The Ouzo effect: A tool to elaborate high-payload nanocapsules. *Journal of Controlled Release* 324, 430–439 (2020).
25. Sciortino, F. *et al.* Structure and elasticity of composite nanoparticle/polymer nanoshells (hybridosomes®). *Soft Matter* 13, 4393–4400 (2017).
26. Szatmári, T. *et al.* Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science* 97, 546–553 (2006).
27. Kirakli, E. K. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) mediated in vitro radiosensitization at megavoltage radiation energies. *Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry* 315, 595–602 (2018).
28. Abdul Rashid, R. *et al.* Radiosensitization effects and ROS generation by high Z metallic nanoparticles on human colon carcinoma cell (HCT116) irradiated under 150 MeV proton beam. *OpenNano* 4, 100027 (2019).
29. Wu, C. *et al.* Repolarization of myeloid derived suppressor cells via magnetic nanoparticles to promote radiotherapy for glioma treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 16, 126–137 (2019).
30. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Reviews* 116, 2826–2885 (2016).
31. Keyaerts, M., Caveliers, V. & Lahoutte, T. Bioluminescence Imaging. in *Comprehensive Biomedical Physics* 4, 245–256 (2014).
32. Cho, S. H. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Physics in Medicine & Biology* 50, N163–N173 (2005).
33. Roeske, J. C., Nuñez, L., Hoggarth, M., Labay, E. & Weichselbaum, R. R. Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles. *Technology in Cancer Research & Treatment* 6, 395–401 (2007).
34. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* 1, 16014 (2016).

35. R. Bhattarai, S. *et al.* Gold nanotriangles: scale up and X-ray radiosensitization effects in mice. *Nanoscale* 9, 5085–5093 (2017).
36. Liu, S. *et al.* Radiosensitizing effects of different size bovine serum albumin-templated gold nanoparticles on H22 hepatoma-bearing mice. *Nanomedicine* 13, 1371–1383 (2018).
37. Luo, D. *et al.* Prostate-specific membrane antigen targeted gold nanoparticles for prostate cancer radiotherapy: does size matter for targeted particles? *Chemical Science* 10, 8119–8128 (2019).
38. Mowat, P. *et al.* In Vitro Radiosensitizing Effects of Ultrasmall Gadolinium Based Particles on Tumour Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11, 7833–7839 (2011).
39. Misawa, M. & Takahashi, J. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7, 604–614 (2011).
40. Bobyk, L. *et al.* Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9, 1089–1097 (2013).
41. Retif, P. *et al.* Monte Carlo simulations guided by imaging to predict the in vitro ranking of radiosensitizing nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 11, 6169–6179 (2016).
42. Herrlinger, U. *et al.* Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA–09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 393, 678–688 (2019).
43. Giordano & Tommonaro. Curcumin and Cancer. *Nutrients* 11, 2376 (2019).
44. Klinger, N. V. & Mittal, S. Therapeutic Potential of Curcumin for the Treatment of Brain Tumors. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 324085, 1–14 (2016).
45. Sordillo, L. A., Sordillo, P. P. & Helson, L. Curcumin for the Treatment of Glioblastoma. *Anticancer Research* 35, 6373–6378 (2015).
46. Clavreul, A. *et al.* Development and characterization of sorafenib-loaded lipid nanocapsules for the treatment of glioblastoma. *Drug Delivery* 25, 1756–1765 (2018).
47. Qi, Z., Xing, W., Shao, C., Yang, C. & Wang, Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy* 9, 3341–3348 (2015).
48. Russo, E. & Villa, C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* 11, 671 (2019).
49. Chen, C.-C., Fang, C.-L., Al-Suwayeh, S. A., Leu, Y.-L. & Fang, J.-Y. Transdermal delivery of selegiline from alginate–Pluronic composite thermogels. *International Journal of Pharmaceutics* 415, 119–128 (2011).
50. Jung, Y., Park, W., Park, H., Lee, D.-K. & Na, K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydrate Polymers* 156, 403–408 (2017).



Partie expérimentale

SOMMAIRE

| | | |
|-------------|--|------------|
| V.1. | NANOPARTICULES UTILISEES..... | 272 |
| V.1.1. | SPION | 272 |
| V.1.2. | AuNP | 272 |
| V.1.3. | QD | 274 |
| V.1.3.1. | QD InP@ZnS | 274 |
| V.1.3.2. | QD CdS@ZnS (société Cytodiagnotics) | 275 |
| V.2. | METHODES DE PREPARATION ET CARACTERISATION DES HYBRIDOSOMES..... | 275 |
| V.2.1. | PREPARATION ET PURIFICATION DES HYBRIDOSOMES..... | 275 |
| V.2.2. | CARACTERISATION DES HYBRIDOSOMES..... | 275 |
| V.2.2.1. | NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) | 275 |
| V.2.2.2. | DLS (Dynamic Light Scattering) | 276 |
| V.2.2.3. | TEM (Transmission Electron Microscopy)..... | 276 |
| V.2.2.4. | Spectroscopie UV-visible | 276 |
| V.3. | CHAPITRE 2 – EFFET OUZO ET NANOCAPSULES | 277 |
| V.3.1. | DOSAGE DE LA QUANTITE DE BHT DANS LE THF COMMERCIAL | 277 |
| V.3.2. | COSMO-RS | 277 |
| V.3.3. | DETERMINATION VISUELLE DES DIAGRAMMES DE PHASE..... | 278 |
| V.3.4. | EXPLORATION DU DIAGRAMME DE PHASE « EAU/THF/BHT »..... | 279 |
| V.3.5. | RMN ACIDE OLEIQUE/OCTYLAMINE..... | 280 |
| V.3.6. | SUIVI DE L'EVAPORATION DU THF PAR RMN ¹ H | 284 |
| V.3.7. | SUIVI DE LA FLUORESCENCE DES HYBRIDOSOMES COMPOSES DE QD | 286 |
| V.3.8. | POTENTIEL ZETA | 286 |
| V.3.9. | SYNTHESE DE NANO-OBJETS SPION@SiO ₂ | 286 |
| V.4. | CHAPITRE 3 – L'EFFET OUZO POUR L'ENCAPSULATION PAR NANOPRECIPITATION..... | 287 |
| V.4.1. | ENCAPSULATION DE BODIPY PAR NANOPRECIPITATION DANS LES HYBRIDOSOMES..... | 287 |
| V.4.2. | NANOPRECIPITATION DU BODIPY DANS L'EAU | 287 |
| V.4.3. | DETERMINATION DU RENDEMENT DE NANOPRECIPITATION..... | 287 |
| V.4.4. | DETERMINATION DU RENDEMENT D'ENCAPSULATION..... | 288 |
| V.4.5. | ÉTUDE DE LA FLUORESCENCE DU BODIPY DANS DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS..... | 289 |
| V.4.6. | ÉTUDE DU RELARGAGE EN MILIEU HYDROPHOBE | 289 |
| V.4.7. | ÉTUDE DE L'INTERNALISATION CELLULAIRE | 290 |
| V.4.8. | ÉTUDE DU RELARGAGE <i>IN VIVO</i> | 290 |
| V.4.8.1. | Étude avec injection dans le Matrigel® | 290 |
| V.4.8.2. | Étude avec injection systémique | 291 |
| V.4.9. | MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE COUPES DE TISSUS..... | 291 |
| V.5. | CHAPITRE 4 – APPLICATION AU GLIOBLASTOME | 292 |
| V.5.1. | PREPARATION DES HYBRIDOSOMES SPION/AuNP@PEG-PAA | 292 |
| V.5.2. | RELAXOMETRIE..... | 292 |
| V.5.3. | INCUBATION AVEC LES CELLULES TUMORALES | 293 |
| V.5.4. | IMPLANTATION DES TUMEURS CEREBRALES | 294 |
| V.5.5. | ÉTUDE DE BIODISTRIBUTION SUITE A L'INJECTION INTRATUMORALE | 294 |
| V.5.6. | ÉVALUATION DE L'EFFET RADIOSENSIBILISANT DES HYBRIDOSOMES..... | 294 |
| V.5.7. | SUIVI DES SOURIS ET ANALYSES..... | 295 |
| V.5.7.1. | Signes cliniques pouvant mener à l'euthanasie..... | 295 |
| V.5.7.2. | Bioluminescence <i>in vivo</i> | 296 |
| V.5.7.3. | IRM <i>in vivo</i> | 296 |
| V.5.7.4. | Analyse statistique de la survie | 297 |
| V.5.7.5. | Prélèvements des tissus et histologie | 297 |

V.1. Nanoparticules utilisées

V.1.1. SPION

La synthèse des SPION a été développée et réalisée par Myrtil Kahn (LCC, Toulouse).^c En bref, les NP de maghémite (γ -Fe₂O₃) sont synthétisées par hydrolyse contrôlée d'un précurseur de Fe(II) – (Fe{N(SiMe₃)₂})₂ – en présence des ligands (2 équivalents octylamine, 1 équivalent acide oléique) puis oxydation à l'air. Les SPION sont dispersables dans le THF. La taille moyenne déterminée par TEM est de 4,2 ± 1,7 nm (**Figure 5. 1 A**). Le spectre UV-visible est présenté en **Figure 5. 1 B**.

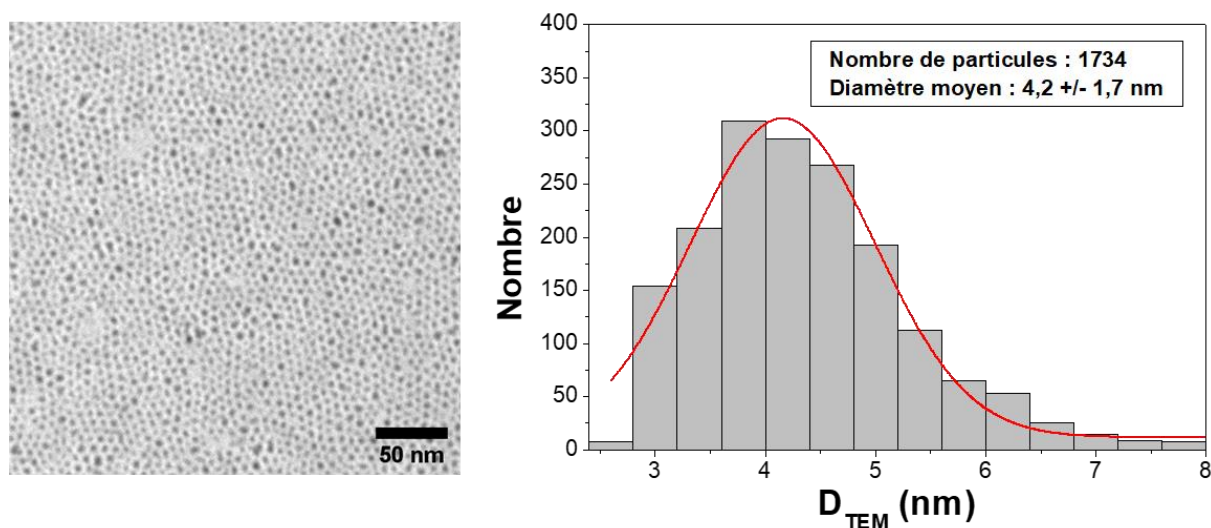


Figure 5. 1 – Microscopie électronique en transmission des SPION@octylamine /acide oléique utilisées et distribution de taille (TEM).

V.1.2. AuNP

Les AuNP stabilisées par l'oléylamine ont été synthétisées selon une procédure publiée.^d 5 mL d'oléylamine sont dégazés sous vide puis amenés à 150°C dans un schlenk muni d'un réfrigérant sous argon. Ensuite, 5 mL d'oléylamine contenant 117,6 mg d'HAuCl₄, 3H₂O (0,3 mmol) sont ajoutés à l'oléylamine à 150°C. Le mélange est ensuite maintenu à 150°C sous agitation magnétique pendant 1h30. Le mélange réactionnel est initialement orange pâle puis devient rose

^c Casterou, G. *et al.* Improved Transversal Relaxivity for Highly Crystalline Nanoparticles of Pure γ -Fe₂O₃ Phase. *Chemistry – A European Journal* 21, 18855–18861 (2015).

^d Liu, S., Chen, G., Prasad, P. N. & Swihart, M. T. Synthesis of Monodisperse Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles with Tunable Size and Surface Plasmon Resonance Frequency. *Chem. Mater.* 23, 4098–4101 (2011).

et enfin rouge intense. Le chauffage est arrêté puis le mélange laissé sous agitation le temps qu'il revienne à température ambiante. Une fois le mélange refroidi, 5 mL d'EtOH sont ajoutés pour précipiter les AuNP. Le mélange est divisé en 11 tubes qui sont centrifugés pendant 5 minutes à 11700 g (MIKRO 220R, Hettich). Les surnageants sont prélevés et les culots (dépôt sur les parois) redispersés dans 10 mL de THF. La taille moyenne, déterminée par TEM, est de $9,8 \pm 2,3$ nm (Figure 5. 2).

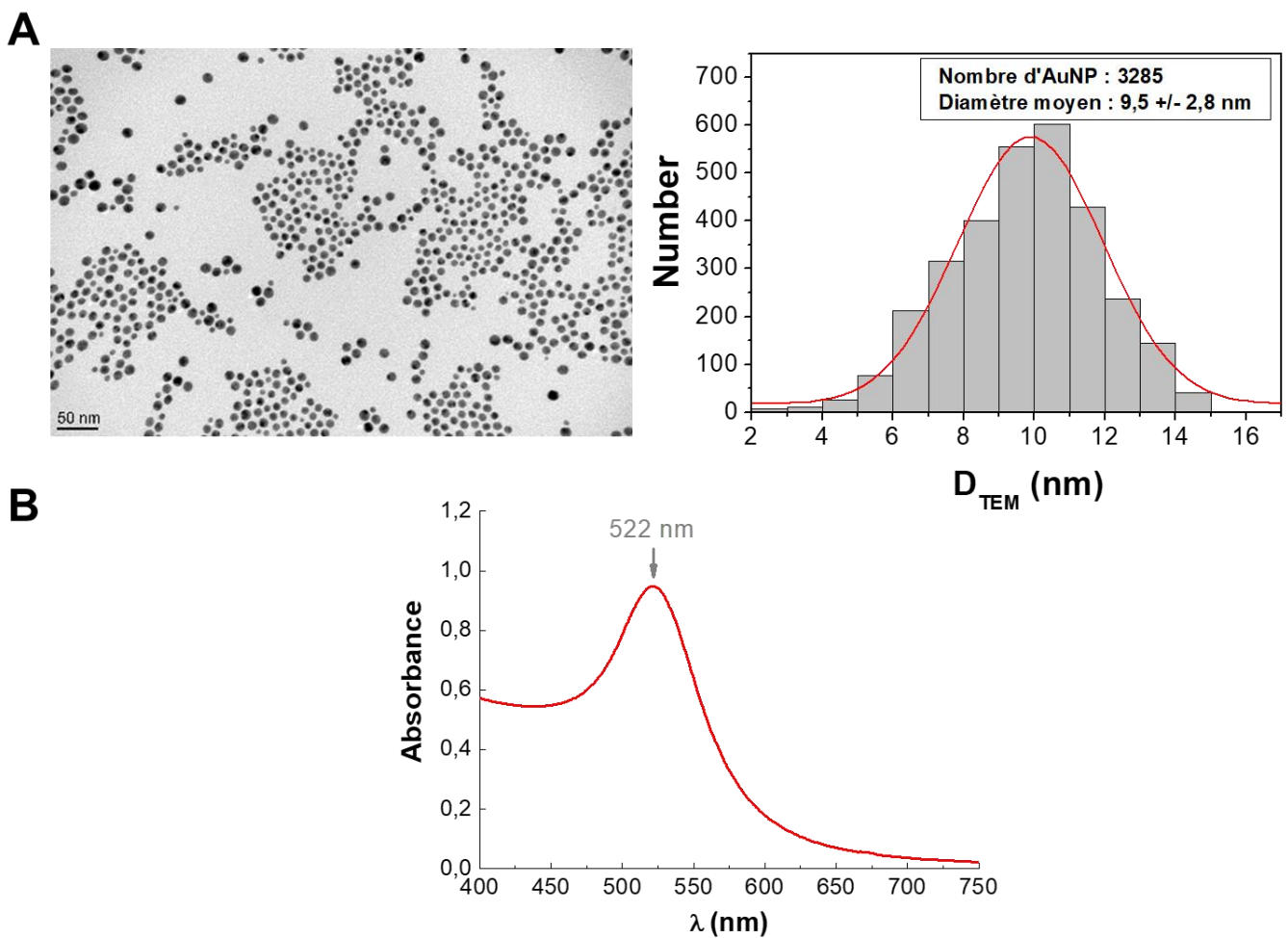


Figure 5. 2 – (A) Microscopie électronique en transmission des AuNP@oléylamine utilisées et distribution de taille (TEM). **(B)** Spectre d'absorbance de la dispersion d'AuNP@oléylamine dans le THF.

V.1.3. QD

V.1.3.1. QD InP@ZnS

La synthèse de ces QD InP@ZnS a été développée et réalisée par F. Delpech (LCPNO, Toulouse).^e Cette synthèse a lieu à partir de précurseurs d'indium – In(amid)₃ – et de phosphore – P(SiMe₃)₃ – en présence de l'acide palmytique (PA). Les QD InP@PA ainsi produits sont ensuite enrobés d'une couche de ZnS (0,5 – 0,7 nm) dans l'oléylamine (OLA). Des QD InP@ZnS stabilisés par l'OLA sont finalement obtenus (la RMN du solide ne montre que la présence d'OLA). Le schéma de synthèse est le suivant (**Figure 5.3**).

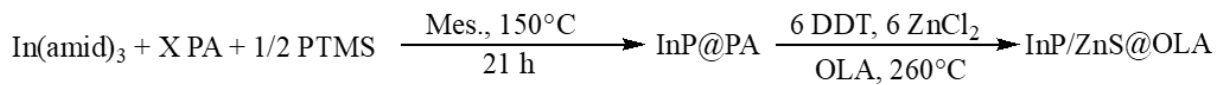


Figure 5.3 – Schéma de synthèse des QD InP@ZnS. Abréviations : acide palmytique (PA), mésitylène (Mes.), oléylamine (OLA), (DDT), tris(triméthylsilyl)phosphine (PTMS), complexe d'indium amidinate (In(amid)₃).

Nous disposons de deux QD, un émettant à 575 nm (RAS193B, QD1, 3-4 nm) et un autre émettant à 635 nm (BM-78, QD2, 5-6 nm). Les spectres d'absorbance et d'émission sont présentés en **Figure 5.4**.

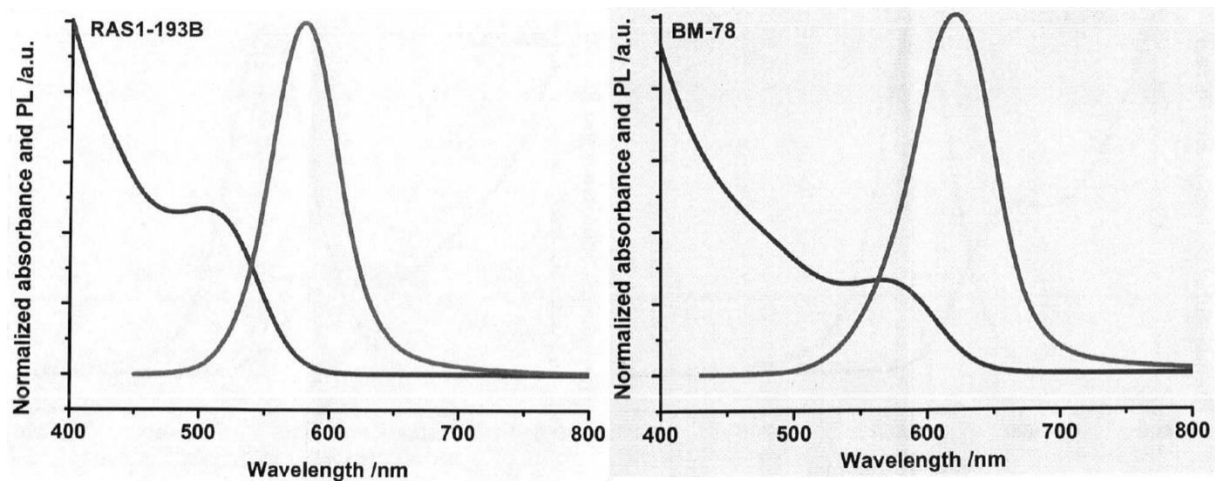


Figure 5.4 – Spectres d'absorbance et d'émission des QD1 (gauche) et QD2 (droite).

^e Baquero, E. A. et al. Synthesis of Oxide-Free InP Quantum Dots: Surface Control and H₂-Assisted Growth. Chem. Mater. 29, 9623–9627 (2017).

V.1.3.2. QD CdS@ZnS (société Cytodiagnostics)

Ces QD ont été achetés auprès de la société Cytodiagnostics Inc. Il s'agit de $\text{Cd}_x\text{Se}_{1-x}\text{@ZnS}$ d'un diamètre de l'ordre de 6 nm. La variation de composition permet de modifier les longueurs d'ondes d'émission, qui sont disponibles entre 450 et 665 nm. Ces QD absorbent aux longueurs d'onde inférieures à 450 nm. Il s'agit de QD hydrophobes stabilisés par l'acide oléique et dispersés dans le toluène. Il est donc nécessaire de les transférer dans le THF pour préparer les hybridosomes. Pour cela, les QD dans le toluène sont précipités par ajout de méthanol (au moins 50% vol.). Après 20 minutes d'attente, ils sont centrifugés (30 min, 3500 g, 20°C) puis le culot est redispersé dans le THF.

V.2. Méthodes de préparation et caractérisation des hybridosomes

V.2.1. Préparation et purification des hybridosomes

La procédure classique de préparation des hybridosomes est la suivante : la solution de THF contenant les NP hydrophobes (SPION, AuNP, QD) est mélangée d'un seul coup à la phase aqueuse (milliQ) afin d'atteindre des proportions volumiques eau/THF de 75/25. Un mélange très rapide (1 à 2 s) au vortex est réalisé. Typiquement, la quantité de SPION utilisée est de 20 μg Fe/mL (ICP-OES). Après 7 h d'attente, le polymère (PAA_{450k} ou PEG_{7k}-PAA_{2k}) est ajouté à hauteur de 2,4 mmol.L⁻¹ de fonctions acide carboxylique. Le THF est ensuite évaporé 1 nuit (~15 h) dans un bain de sable à 40°C. La purification est effectuée par aimantation sur un aimant permanent (aimant NdFeB, 10x10x8 mm, Supermagnete) dans le cas des SPION (2x 24 h) ou par centrifugation pour les autres NP. Le culot est finalement redispersé dans l'eau.

V.2.2. Caractérisation des hybridosomes

V.2.2.1. NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

La distribution des diamètres hydrodynamiques (D_H) ainsi que la concentration en particules est principalement déterminée par NTA. En bref, la dispersion à analyser est placée dans une cellule (Nanosight LM10, Malvern Panalytical) équipée d'un laser (40 mW ; $\lambda = 638$ nm). Les taches de diffusion individuelles des nano-objets sont ensuite suivies et enregistrées par une caméra CCD opérant à 30 images/seconde (3 acquisitions de 60 s ; 25°C). L'analyse de leur mouvement Brownien permet de déterminer la distribution des diamètres hydrodynamiques (D_H , sur la gamme 10 – 1000 nm), ainsi que la concentration en nanoparticules. L'analyse est effectuée grâce au logiciel NANOSIGHT NTA 2.0. Les échantillons d'hybridosomes sont préalablement dilués pour

la mesure NTA afin d'observer idéalement 50 à 100 nanoparticules par image. L'intensité du laser (Camera Level) est ajustée pour que les taches de diffusion soient exploitables.

Le volume total occupé par les nanoparticules (ou par les gouttes) peut ensuite être déterminé en intégrant l'intégralité de la distribution en taille, selon l'équation suivante :

$$V = \sum n_i \times \frac{4\pi}{3} R_i^3$$

V.2.2.2. DLS (Dynamic Light Scattering)

Les mesures de DLS sont réalisées sur une DLS déportée VASCO-KIN (Cordouan Technologies). La dispersion à analyser peut être analysée directement dans le flacon sans besoin d'utiliser une cuve. Les tailles (Z_{av}) sont déterminées à partir des corrélogrammes avec la méthode des cumulants. La viscosité des mélanges de solvants sont prises en compte pour l'analyse.

V.2.2.3. TEM (Transmission Electron Microscopy)

La préparation des grilles de TEM consiste à déposer une goutte de dispersion d'hybridosomes (5 μ L) puis à évaporer le liquide à température ambiante. Les grilles utilisées sont des grilles 200 mailles en cuivre recouverte d'un film carbone/formvar (ref S162, Agar Scientific). L'imagerie est réalisée avec un microscope électronique JEOL 1400 TEM opérant à 120 kV équipé d'une caméra GATAN Orius 1000 (MRic-TEM, Biosit) ou un microscope JEOL 2100 LaB6 équipé d'une caméra GATAN Orius 200D (THEMIS, Scanmat).

V.2.2.4. Spectroscopie UV-visible

Les mesures d'absorbance UV-visibles sont effectuées sur un appareil Cary 60 (Agilent) ou sur un lecteur de microplaques (FLUOstar, BMG Labtech). Le CaryUV nécessite un volume plus important mais peut être utilisé avec le THF (cuves en quartz ou verre). Ce n'est pas le cas des microplaques (polymère qui ne résiste pas au THF), mais celles-ci sont adaptées aux petits volumes (par exemple 50 μ L).

V.3. Chapitre 2 – Effet Ouzo et nanocapsules

V.3.1. Dosage de la quantité de BHT dans le THF commercial

Le dosage de la quantité de BHT dans le THF commercial (VWR Rectapur stabilisé avec BHT) est réalisé par spectrométrie UV-visible à 278 nm. Une gamme d'étalonnage est préparée entre 10 et 250 ppm par dissolution de BHT dans du THF pur conservé sur colonne. Le dosage du THF commercial contenant du BHT est effectué à dilution x4 pour être dans la gamme d'absorbance de la droite d'étalonnage.

V.3.2. COSMO-RS

Les calculs COSMO-RS sont réalisés avec COSMOthermX (version d'évaluation). COSMO-RS (COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents) combine des calculs de chimie quantique DFT avec de la statistique thermodynamique. La molécule à étudier est préalablement modélisée et sa densité de charge de surface est déterminée. La prédiction d'une grande variété de propriétés physico-chimiques de molécules en solution est ensuite possible, par exemple leur solubilité. Les paramètres de calcul sont les suivants : $T = 25^{\circ}\text{C}$; ΔG_{fusion} estimée par le logiciel. En particulier, la solubilité dans des mélanges « eau/THF » (ratio eau/THF variés) du BHT, du BODIPY ainsi que du paclitaxel ont été déterminés. Le **Tableau 5. 1** récapitule les valeurs calculées :

| $\Phi_{vol} (eau)$ | BHT Log (S) (mol/L) | BODIPY Log (S) (mol/L) | Paclitaxel Log (S) (mol/L) | $\Phi_{vol} (eau)$ | BHT Log (S) (mol/L) | BODIPY Log (S) (mol/L) | Paclitaxel Log (S) (mol/L) |
|--------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 0 | - | 0 | -0,81097 | 0,22816 | 0,47153 | -0,58133 | -2,4077 |
| 0,00734 | - | 0,15266 | -0,84102 | 0,24678 | 0,45757 | -0,72775 | -2,55123 |
| 0,01495 | - | 0,14694 | -0,87475 | 0,26655 | 0,43668 | -0,88951 | -2,70156 |
| 0,02287 | - | 0,14052 | -0,91236 | 0,28759 | 0,40167 | -1,06568 | -2,8593 |
| 0,0311 | - | 0,13328 | -0,95418 | 0,31002 | 0,33345 | -1,25605 | -3,02534 |
| 0,03966 | - | 0,12505 | -1,00054 | 0,33399 | 0,199959 | -1,46126 | -3,20091 |
| 0,04858 | - | 0,11565 | -1,05182 | 0,35965 | 0,01386 | -1,68285 | -3,38768 |
| 0,05788 | - | 0,10481 | -1,10839 | 0,3872 | -0,18799 | -1,92323 | -3,58791 |
| 0,06757 | - | 0,09219 | -1,17063 | 0,41685 | -0,39868 | -2,18574 | -3,80466 |
| 0,0777 | - | 0,07737 | -1,23886 | 0,44885 | -0,62048 | -2,47483 | -4,04206 |
| 0,08829 | 0,51704 | 0,05977 | -1,31332 | 0,48349 | -0,85764 | -2,7963 | -4,3057 |
| 0,09936 | 0,51511 | 0,03862 | -1,39422 | 0,52112 | -1,11562 | -3,15775 | -4,60318 |
| 0,11096 | 0,51293 | 0,01289 | -1,48163 | 0,56213 | -1,4013 | -3,56926 | -4,94495 |
| 0,12312 | 0,51042 | -0,01878 | -1,57556 | 0,607 | -1,72367 | -4,04439 | -5,34554 |
| 0,13589 | 0,50752 | -0,05815 | -1,67593 | 0,65631 | -2,09474 | -4,60183 | -5,82543 |
| 0,14931 | 0,50413 | -0,10743 | -1,78264 | 0,71075 | -2,53102 | -5,26788 | -6,41411 |
| 0,16343 | 0,5001 | -0,16916 | -1,89554 | 0,77116 | -3,05582 | -6,0804 | -7,15485 |
| 0,17831 | 0,49523 | -0,24591 | -2,01453 | 0,83859 | -3,70293 | -7,09479 | -8,11226 |
| 0,19401 | 0,48922 | 0,33973 | -2,13953 | 0,91432 | -4,52131 | -8,39069 | -9,38217 |
| 0,2106 | 0,48159 | -0,45162 | -2,27054 | 1 | -5,57311 | -10,0614 | -11,08676 |

Tableau 5. 1 – Valeurs de solubilité du BHT, du BODIPY et du paclitaxel dans le mélange eau/THF calculées par COSMO-RS

V.3.3. Détermination visuelle des diagrammes de phase

Des solutions mères du composé hydrophobe dans le THF exempt de BHT sont préparées par dilutions successives, ce qui permet d'atteindre des concentrations très faibles. Le diagramme est ensuite construit en préparant chaque composition individuellement. Pour les molécules étudiées (BHT, BODIPY, ligand), l'étude du diagramme de phase a toujours lieu à des fractions massiques en THF qui ne dépassent pas 0,5. La détermination des différentes phases est réalisée visuellement après mélange de la solution « THF/composé hydrophobe » avec l'eau et brève agitation au vortex, dans les 10 à 20 minutes suivant le mélange. La zone ouzo se caractérise par l'apparition rapide d'un trouble persistant, sans démixtion visuelle. Pour les compositions très proches de la binodale, l'utilisation d'une source lumineuse peut être nécessaire pour mettre en évidence le trouble. Le domaine diphasique se caractérise par une démixtion visible. Pour les compositions proches de la spinodale, la visualisation de la démixtion est plus délicate mais elle est mise en évidence par des petites gouttelettes d'huile sur les parois du tube à essai.

V.3.4. Exploration du diagramme de phase « eau/THF/BHT »

Le système « eau/THF/BHT » est étudié en détails dans le domaine « SFME » (avant la binodale) et dans le domaine ouzo. Pour la zone SFME, 5 compositions à 10^{-6} %w BHT (à 10, 20, 30, 40 et 50 %w THF) et 4 compositions à 30 %w THF (à 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} %w BHT) sont étudiées par NTA. Le domaine ouzo est étudié en NTA à 10, 20 et 30 %w THF, pour des teneurs en BHT de 10^{-6} , 10^{-5} , 5.10^{-5} , 10^{-4} et 2.10^{-4} %w. La mesure NTA est réalisée sans dilution pour ne pas modifier le système. La mesure est donc plus délicate que pour les hybridosomes où la dilution est possible. L'intensité du laser (Camera Level) doit être modifiée pour pouvoir effectuer la mesure (il ne faut pas trop de lumière diffusée).

Pour toutes ces mesures, la viscosité des différents mélanges « eau/THF » à 25°C est indiquée en **Figure 5. 5**.^f

| Φ_{mol} (THF) | Φ_{mass} (THF) | Φ_{vol} (THF) | Viscosité (cP) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------|
| 0 | 0 | 0 | 0,89 |
| 0,0271 | 0,100 | 0,111 | 1,201 |
| 0,0587 | 0,200 | 0,218 | 1,49 |
| 0,0967 | 0,300 | 0,324 | 1,68 |
| 0,1427 | 0,400 | 0,427 | 1,732 |
| 0,1998 | 0,500 | 0,528 | 1,678 |
| 0,2726 | 0,600 | 0,627 | 1,49 |
| 0,3682 | 0,700 | 0,723 | 1,224 |
| 0,45 | 0,766 | 0,786 | 1,024 |
| 0,4998 | 0,800 | 0,817 | 0,924 |
| 0,6 | 0,857 | 0,870 | 0,758 |
| 0,6921 | 0,900 | 0,910 | 0,656 |
| 0,75 | 0,923 | 0,931 | 0,608 |
| 0,8 | 0,941 | 0,947 | 0,579 |
| 0,9 | 0,973 | 0,976 | 0,516 |
| 1 | 1 | 1 | 0,463 |

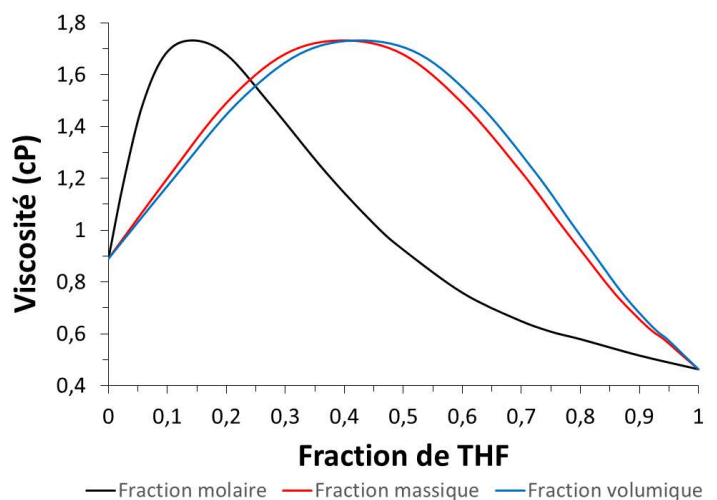


Figure 5. 5 – Viscosité du mélange « eau/THF » en fonction de la composition à 25°C. (D'après ³)

^f Das, B., Nath Roy, M. & Hazra, D. K. Densities and viscosities of the binary aqueous mixtures of tetrahydrofuran and 1,2-dimethoxyethane at 298, 308 and 318 K. *Indian Journal of Chemical Technology* 1, 93–97 (1994).

V.3.5. RMN Acide oléique/octylamine

Les mélanges OA + OIAc (1:1 et 2:1, eq) sont préparés puis dissous dans le THF deutéré (1 goutte de mélange dans 500 μ L de THF-d8). Les spectres RMN ont été obtenus sur un spectromètre Bruker 500 MHz Av III HD équipé d'une sonde directe de type BBFO (Broad Band Fluorine Observation) à 300 K. Les déplacements chimiques de RMN ^1H and ^{13}C sont exprimés en parties par million (ppm) en utilisant le signal du solvant résiduel comme référence. Les expériences RMN DOSY ^1H ont été obtenues en utilisant la séquence ledbpgp2s avec $\delta=2$ ms, $\Delta=80$ ms (paramètres de gradient). Les spectres ont été traités avec l'outil « dosy » de topspin, par intégration manuelle des pics d'intérêt.

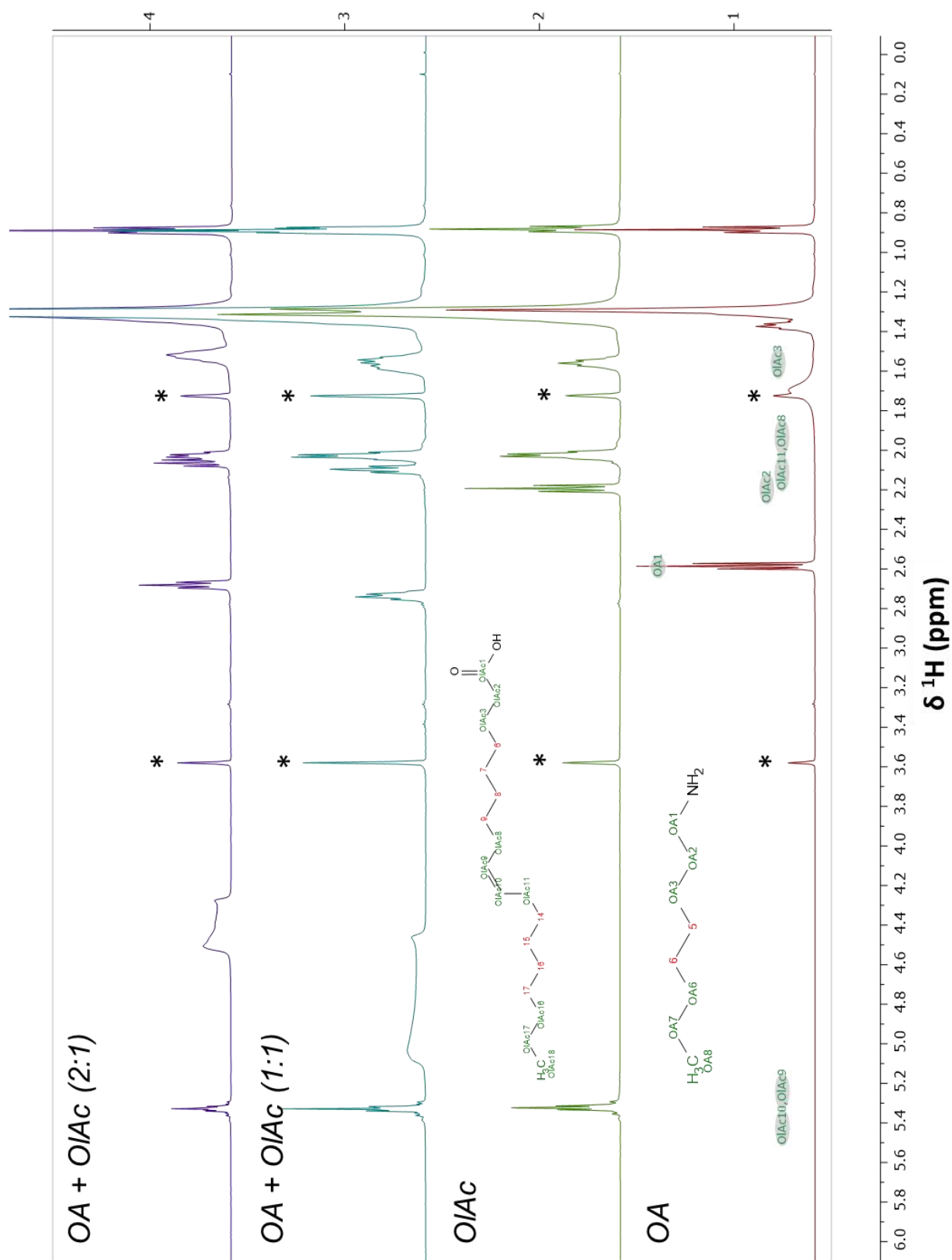


Figure 5. 6 – Spectres RMN ^1H de l’octylamine (OA), l’acide oléique (OIAc), le mélange OA+OIAc (1 :1) et (2 :1), dans le THF- d_8 à 300 K. (*) solvant.

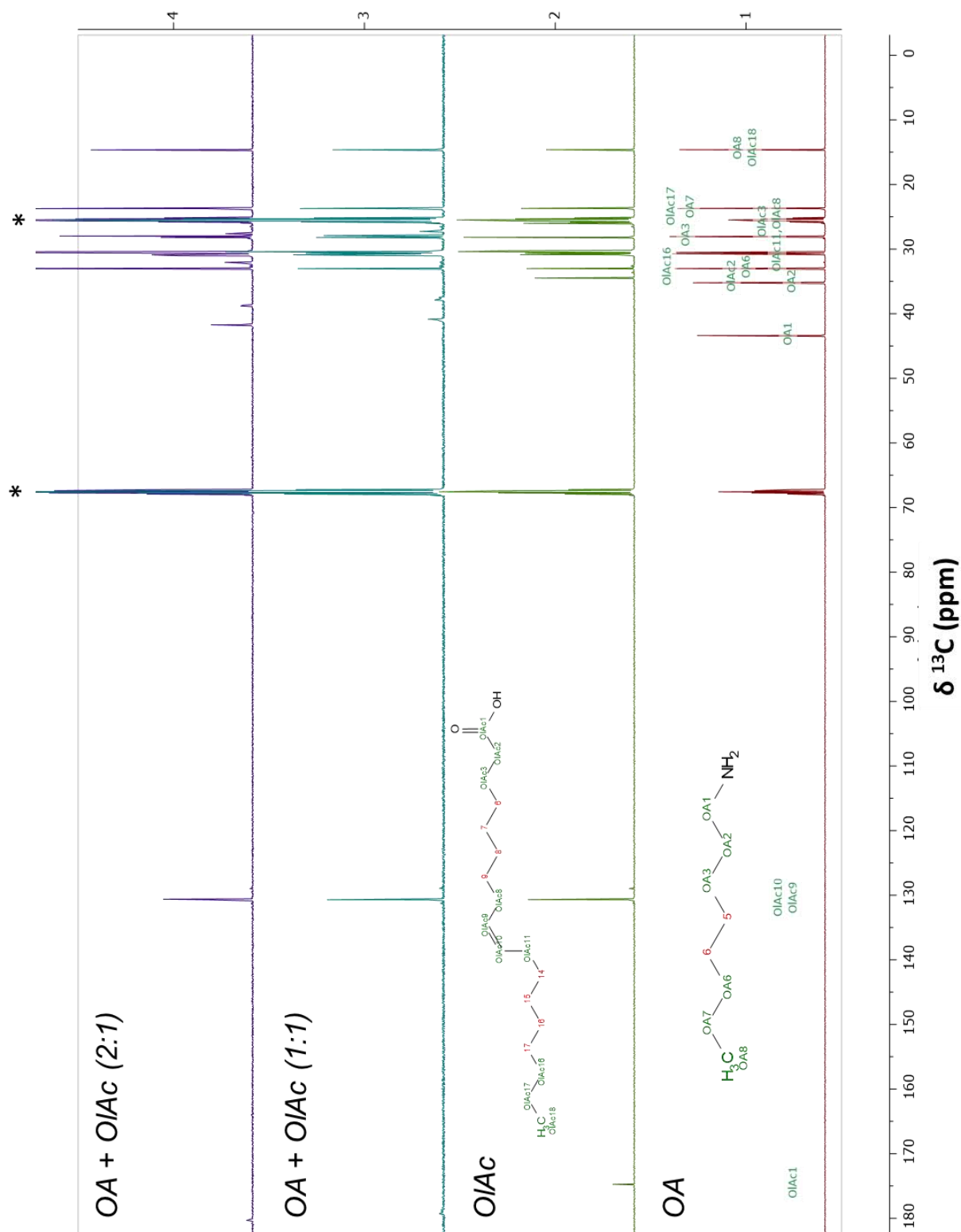


Figure 5. 7 – Spectres RMN ^{13}C de l’octylamine (OA), l’acide oléique (OIAc), le mélange OA+OIAc (1 :1) et (2 :1), dans le THF-d8 à 300 K. (*) solvant.

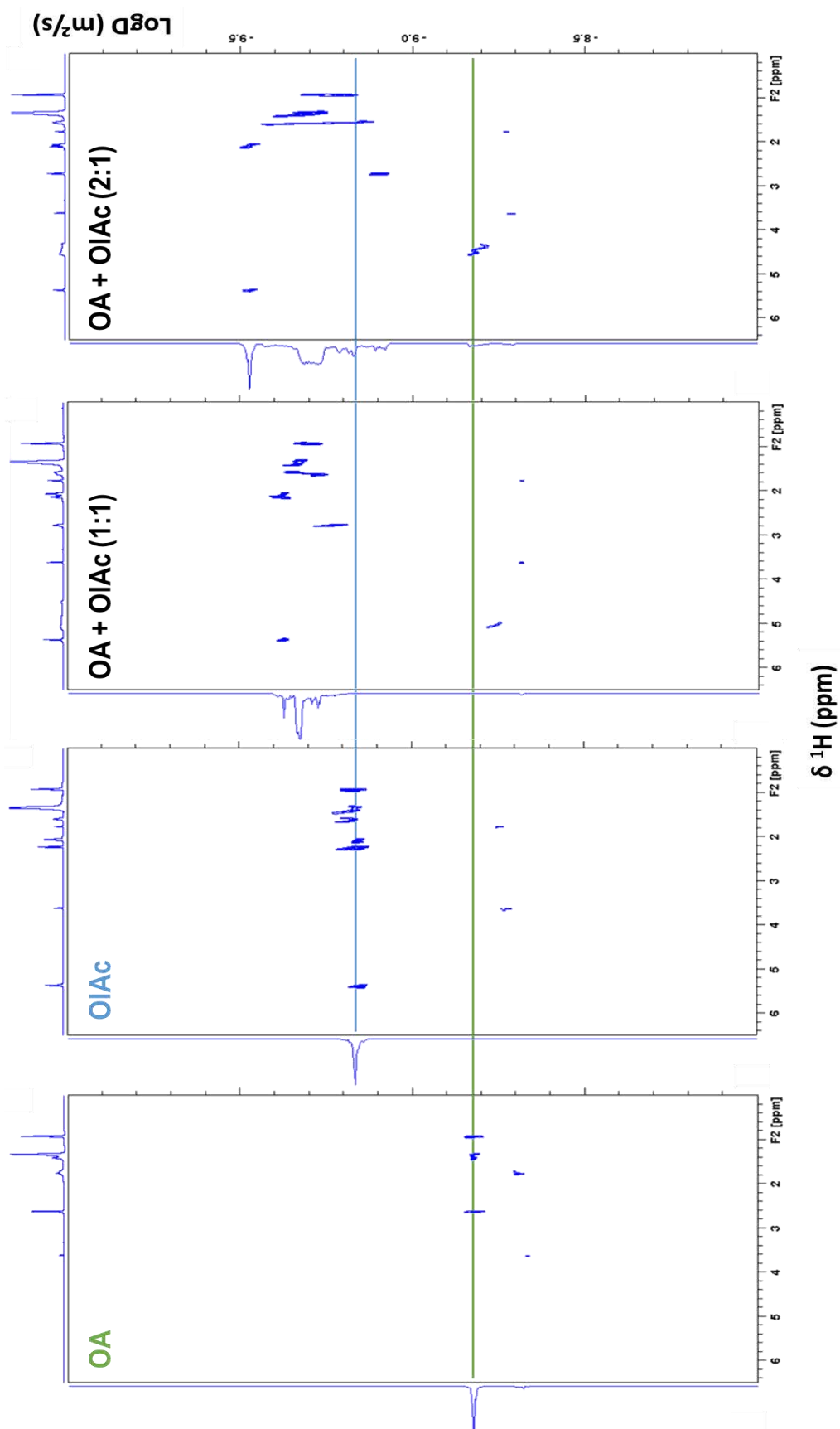


Figure 5. 8 – Spectres DOSY 2D ^1H de l’octylamine, de l’acide oléique ainsi que des mélanges octylamine/acide oléique 1:1 et 2:1 dans le THF-d8, enregistrés à 300 K. 1^{ère} dimension : LogD en $\text{m}^2\text{/s}$. 2^{ème} dimension : déplacement chimique ^1H en ppm.

V.3.6. Suivi de l'évaporation du THF par RMN ^1H

L'évaporation du THF dans le mélange « THF/D₂O » est suivie par RMN ^1H à 20°C sur un spectromètre Bruker 300 MHz Av III équipé d'une sonde directe de type BBFO à 300 K. Le mélange comporte par ailleurs du triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSP-d₄) en tant que référence (0 ppm). Le mélange est mis à évaporer puis le spectre RMN ^1H est réalisé à t₀, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15 et 21h (**Figure 5. 9**). Le TSP-d₄ ne s'évapore pas et constitue la référence pour le suivi de l'évaporation du THF. La quantité de THF en fonction du temps est déterminée grâce au rapport des intégrations d'un des pics du THF (par exemple à 3,8 ppm) et du pic du TSP-d₄. Les pics de l'EtOH peuvent aussi être visibles (résidu lors du lavage des tubes).

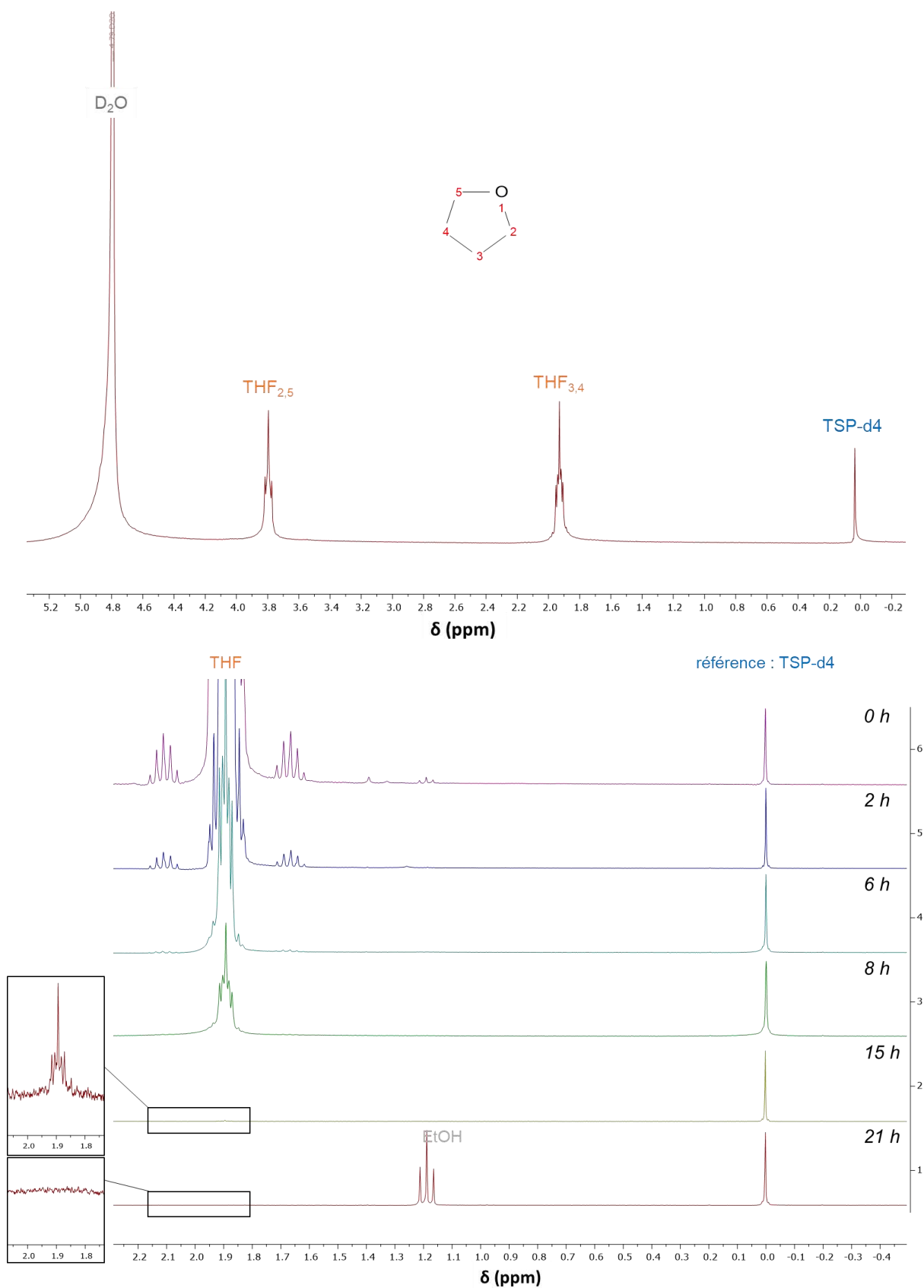


Figure 5. 9 –Spectre RMN ^1H (haut) du mélange « $\text{D}_2\text{O}/\text{THF}$ » à 300 K avec une référence (TSP-d4). (bas) Zoom entre - 0,5 et 2,3 ppm pour différents temps d'évaporation à 40°C. On observe la diminution du pic du THF au fur et à mesure de son évaporation.

V.3.7. Suivi de la fluorescence des hybridosomes composés de QD

La fluorescence est suivie dans le temps sur un fluorimètre Fluorolog-3 (Horiba Jobin-Yvon), à la fois pour les hybridosomes à base QD Cytodiagnosics 630 nm ($\lambda_{exc} = 400$ nm ; $\lambda_{em} = 630$ nm) et les QD InP@ZnS QD1 ($\lambda_{exc} = 450$ nm ; $\lambda_{em} = 575$ nm) et QD2 ($\lambda_{exc} = 450$ nm ; $\lambda_{em} = 625$ nm). La mesure est effectuée dans une microcuvette de fluorescence en quartz de 45 μ L (Hellma Suprasil ; chemin optique 3 mm). La normalisation des intensités sur la durée du suivi est réalisée avec à la pyranine comme référence.

V.3.8. Potentiel Zeta

La mesure du potentiel Zeta est effectuée sur un appareil NanoZS Instrument (Malvern), avec 3 mesures par échantillon, à 25°C. L'analyse a lieu avec le Fe₂O₃ comme matériau dispersé (indice de réfraction = 2,937) et l'eau comme phase dispersante (indice de réfraction = 1,33 ; viscosité = 0,8872 cP). Les données sont analysées avec le modèle de Smoluchowski.

V.3.9. Synthèse de nano-objets SPION@SiO₂

La synthèse des SPION@SiO₂ est adaptée de celle des hybridosomes. Deux solutions sont préparées. La solution 1 (NP-shell) qui est composée d'eau, de THF commercial et SPION, dans les mêmes proportions que pour les préparations d'hybridosomes. La solution 2 est composée d'éthanol et d'une solution d'ammoniaque à 32%, dans des proportions volumiques 6:1. Typiquement, les deux solutions sont mélangées (50:50 vol.) et après 2h, du TEOS est ajouté dans le mélange (entre 0,5 et 20 μ L, soit entre 2,25 et 90 μ mol, pour 1 mL de préparation). Le mélange est agité rapidement au vortex puis mis à évaporer à 40°C dans un bain de sable sur une nuit. Les objets obtenus peuvent être purifiés par aimantation (2x 24 h). Le ratio solution 1 / solution 2 peut également être varié.

V.4. Chapitre 3 – L’effet Ouzo pour l’encapsulation par nanoprécipitation

V.4.1. Encapsulation de BODIPY par nanoprécipitation dans les hybridosomes

L’encapsulation de BODIPY dans les hybridosomes est réalisée en incorporant le BODIPY directement dans le THF au départ. Le protocole est ensuite le même que pour la fabrication des hybridosomes sans BODIPY. Des hybridosomes ont été préparés avec succès pour des concentrations en BODIPY comprises entre 10 et 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La quantité de NP a également été variée entre 10 et 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe_2O_3 (dosage du Fe par ICP-OES).

V.4.2. Nanoprécipitation du BODIPY dans l’eau

Le BODIPY nanoprécipité est préparé par évaporation de BODIPY dans le mélange « eau/THF » 75/25 (%vol). L’évaporation a lieu à 40°C pendant une nuit dans un bain sec. La purification des suspensions est réalisée par centrifugation (20 min, 3820 *g*, Mikro 220R – Hettich). Le culot est finalement redispersé dans de l’eau milliQ pour atteindre le volume désiré, typiquement 1 mL. Cette approche peut être appliquée à d’autres composés hydrophobes solubles dans le THF.

V.4.3. Détermination du rendement de nanoprécipitation

À l’issue de la purification par centrifugation de la suspension de BODIPY nanodispersé, le surnageant et le culot sont conservés. Le BODIPY contenu dans le surnageant est extrait deux fois par le dichlorométhane (2x 500 μL de dichlorométhane pour 500 μL d’échantillon). Le dichlorométhane est ensuite évaporé et le BODIPY est re-dissous dans du THF (typiquement dans 1 mL). Le culot est quant à lui directement dissous dans le THF après centrifugation. La détermination des concentrations dans le surnageant et le culot est réalisée par mesure d’absorbance ($\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$), après dilution appropriée pour que l’absorbance soit dans la gamme d’étalonnage (concentration entre 0 et 20 μM). La mesure est effectuée sur un appareil Agilent Cary 60. La courbe de calibration du BODIPY dans le THF est présentée en **Figure 5. 10**. Le rendement de nanoprécipitation (RN) est calculé comme suit :

$$RN (\%) = \frac{[\text{BODIPY}]_{\text{culot}}}{[\text{BODIPY}]_{\text{culot}} + [\text{BODIPY}]_{\text{surnageant}}} \times 100$$

Où $[\text{BODIPY}]_{\text{culot}}$ et $[\text{BODIPY}]_{\text{surnageant}}$ sont les concentrations en BODIPY après centrifugation dans le culot et dans le surnageant, respectivement.

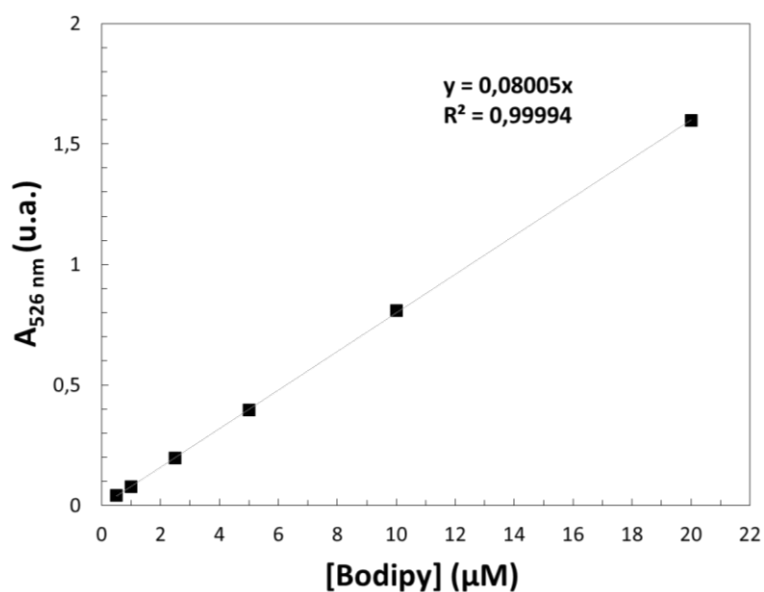


Figure 5. 10 – Courbe de calibration du BODIPY dans le THF par lecture de l’absorbance à 526 nm.

V.4.4. Détermination du rendement d’encapsulation

Le rendement d’encapsulation dans les hybridosomes est déterminé par absorbance, avec un lecteur de microplaques (FLUOstar Omega – BMG Labtech). Après purification magnétique des hybridosomes SPION/BODIPY, les culots et surnageants sont séparés et placés dans les puits d’une microplaque 96 puits (Greiner). Les échantillons sont éventuellement dilués afin que l’absorbance entre dans la gamme de mesure de l’appareil. L’absorbance est mesurée ($\lambda_{\max} = 535$ nm) et le rendement d’encapsulation (RE) est déterminé comme suit :

$$RE (\%) = \frac{A_{culot}}{A_{culot} + A_{surnageant}} \times 100$$

Où A_{culot} est l’absorbance à 535 nm du culot purifié magnétiquement et $A_{surnageant}$ l’absorbance à 535 nm du surnageant.

Le volume interne total des hybridosomes est calculé à partir des distributions de taille déterminées par NTA, comme expliqué précédemment. La concentration interne en BODIPY dans les hybridosomes peut alors être estimée à partir du rendement d’encapsulation et du volume interne :

$$C_{interne} = \frac{n_{tot} \times RE}{V}$$

Où n_{tot} est la quantité totale de BODIPY introduite dans la préparation au départ. Les barres d'erreurs des rendements d'encapsulation correspondent à l'écart moyen par rapport à la courbe de tendance. Celles des concentrations internes dans les hybridosomes sont calculées à partir de l'incertitude sur le volume représenté par les hybridosomes.

V.4.5. Étude de la fluorescence du BODIPY dans différents environnements

Les spectres d'émission sont enregistrés avec un fluorimètre Fluorolog-3 (Horiba Jobin-Yvon). Les mesures sont réalisées à un angle de 90° par rapport au rayon incident dans une cuvette de fluorescence en quartz de 45 μL (Hellma Suprasil ; chemin optique 3 mm) à une longueur d'excitation de 400 nm. Le spectre d'émission est enregistré entre 450 et 750 nm. Pour la fluorescence solide, la poudre est observée entre une lamelle et une lame de microscope. Le spectre de fluorescence est acquis à une longueur d'onde d'excitation de 350-380 nm.

V.4.6. Étude du relargage en milieu hydrophobe

Les cinétiques de relargage du BODIPY dans différents environnements ont été étudiées en incubant des hybridosomes chargés en BODIPY (SPION/BODIPY@PEG-PAA) ou du BODIPY nanoprécipité avec des liposomes (à différentes concentrations), ou avec du sérum de veau foetal. Typiquement, 50 μL d'hybridosomes chargés en BODIPY sont incubés avec différentes quantités de dispersion de liposomes, et de l'eau est ajoutée pour ajuster les puits à 250 μL . La dispersion de liposomes (10 mg/mL, 90%wt eggPC, 10%wt PEG₂₀₀₀-DSPE, $Z_{\text{av}} = 72 \pm 0,8$ nm, PDI = 0,235) a été fournie par F. Camerel et M. Ciancone (ISCR). Pour le relargage rapide dans le temps, la fluorescence a été suivie à 25°C sur un lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech) équipé d'une filtre d'excitation à 485 ± 6 nm et d'un filtre d'émission à 520 ± 5 nm. Pour le relargage à plus grande échelle de temps, la fluorescence à 537 nm sous excitation à 480 nm a été suivie pendant 8 jours sur un fluorimètre Fluorolog-3 (Horiba Jobin-Yvon). Dans ce cas particulier, la coque des hybridosomes est constituée de SPION et de QD (Cytodiagnosics) émettant à 665 nm.

V.4.7. Étude de l'internalisation cellulaire

Les cellules GL261-Luc⁺ ont été mises à disposition par R. Hashizume (University of California, San Francisco).⁹ Les cellules sont mises en culture dans du milieu de culture DMEM (Dutscher) avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (Dutscher) et 2 mM L-Glutamine (PanBiotech) dans des lames de microscopie confocale 8 puits (Nunc™ Lab-Tek™). Les puits sontensemencés avec 25000 cellules/puits et incubés avec 10 µL de dispersion d'hybridosomes concentrée ([Fe] ≈ 200 µg.mL⁻¹) pendant 3 h à 37 °C et 5% de CO₂. Le milieu de culture est remplacé par 100 µL de milieu d'imagerie avant l'imagerie confocale. Les images sont acquises sur un microscope confocal LSM 880 (Zeiss) équipé avec un objectif à immersion à huile x 63 (ouverture numérique 1,4) piloté par le logiciel ZEN. Le laser d'excitation est fixé à une longueur d'onde de 488 nm. Les canaux de détection sont fixés à 517-544 nm (canal vert), 579-624 nm (canal orange) et 659-695 nm (canal rouge). Les images sont finalement traitées avec ImageJ.

La localisation de la coque a été suivie grâce à des hybridosomes comprenant des QD Cytodiagnosics bleus ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) ou rouges ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$). Le marquage des noyaux (Hoescht ; $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) et de la membrane (WGA ; $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520\text{-}550 \text{ nm}$) ont parfois été réalisés. Ces tests d'internalisation ont été effectués sur des lignées tumorales Nalm-6 (M.-B. Troadec, IGDR), 501-Mel et U87MG.

V.4.8. Étude du relargage *in vivo*

L'élevage des animaux a lieu dans l'animalerie de l'Université de Rennes (Arche/Biosit) sous statut SPF. Les souris sont utilisées à un âge de 6 à 12 semaines. Ces expériences ont été approuvées par le comité d'éthique en expérimentation animale du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (agrément A-35-238-40).

V.4.8.1. Étude avec injection dans le Matrigel®

L'étude de relargage dans le matrigel® (Growth Factor Reduced (GFR) matrigel®, Corning) est effectué sur une souris adulte immunodéprimée NSG (Charles River Laboratories), anesthésiée par inhalation d'isoflurane. Un mélange de 50 µL de matrigel® et de 50 µL de PBS contenant 1 million de cellules Nalm6 est injecté en sous-cutané (M.-B. Troadec). Après 9 jours, 50 µL d'hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA sont injectés dans le matrigel®. La fluorescence est

⁹ Clark, A. J. *et al.* Stable luciferase expression does not alter immunologic or *in vivo* growth properties of GL261 murine glioma cells. *Journal of Translational Medicine* 12, 345 (2014).

enregistrée les jours suivants grâce à un bioimageur PhotonImager Optima (Biospace Lab) équipé avec une caméra CCD refroidie très sensible ($\lambda_{em} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{exc} = 547 \text{ nm}$). La même région d'intérêt est utilisée pendant le traitement afin de comparer les intensités de fluorescence dans le temps (logiciel M3 Vision). En parallèle, nous suivons une souris contrôle avec le matrigel® mais sans injection d'hybridosomes.

V.4.8.2. Étude avec injection systémique

Pour l'étude de relargage systémique, 2 souris Balb/c nude (Charles River Laboratories), anesthésiée par isoflurane, sont injectée avec 50 μL d'hybridosomes chargés en BODIPY (SPION/BODIPY@PEG-PAA) dans la veine rétro-orbitaire (M.-B. Troadec). La fluorescence est suivie avec le bioimageur pendant 8 jours ($\lambda_{em} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{exc} = 547 \text{ nm}$). La fluorescence sur l'intégralité de la souris est mesurée. À l'issue de l'expérimentation, l'animal est euthanasié et sa peau est prélevée pour être imagée avec le bioimageur. Les prélèvements de peau sont conservés puis traités et colorés HES et Perls.

V.4.9. Microscopie électronique en transmission de coupes de tissus

La microscopie électronique en transmission est utilisée pour attester de la présence d'hybridosomes contenant des SPION dans le foie et la rate suite à une injection intraveineuse. Elle a été réalisée sur la plateforme MRic-TEM, Biosit. Il s'agit de l'imagerie d'anciens échantillons conservés depuis la thèse précédente (F. Sciortino). Les souris C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse (injection rétro-orbitaire) avec 50 μL de dispersion d'hybridosomes dans le PBS (1 mg Fe/kg de masse corporelle) puis euthanasiées 24 h après l'injection. Après dissection du foie et de la rate, des petits morceaux de tissus sont fixés dans du glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages dans le tampon cacodylate, les échantillons sont imprégnés d'une solution de métaux lourds (1% tétraoxyde d'osmium) pendant 1 h. Ensuite, après rinçage, les échantillons sont déshydratés par des séries d'acétone en suivant les procédures standard puis inclus dans une résine Epon-Araldite-DMP30 (polymérisée à 60°C pendant 48 h). Des coupes ultrafines (80 nm) sont réalisées avec un ultramicrotome Leica UC7, puis montées sur grille de cuivre et colorées avec une solution d'acétate d'uranyle à 2%. Finalement, les coupes sont imagées avec un microscope électronique Jeol 1400 (Jeol Co., Ltd.) équipé d'une caméra Gatan Orius 1000 (Gatan Ametek).

V.5. Chapitre 4 – Application au glioblastome

V.5.1. Préparation des hybridosomes SPION/AuNP@PEG-PAA

Ce chapitre met en œuvre différents hybridosomes, en particulier ceux composés de SPION et d'AuNP. Ces hybridosomes sont préparés selon la procédure habituelle mais en incorporant plusieurs types de NP hydrophobes dans la phase organique au départ, en l'occurrence les SPION@acide oléique/octylamine et les AuNP@oléylamine. Ces objets mixtes peuvent être purifiés par aimantation grâce aux SPION. Les concentrations en Fe et Au dans les dispersions d'hybridosomes purifiés ont été déterminées par spectroscopie atomique (ICP-OES). Typiquement les suspensions d'hybridosomes sont dissoutes dans de l'acide nitrique pendant 1 semaine à 40°C. Après dilution appropriée avec de l'eau milliQ, les concentrations sont déterminées grâce à un spectromètre iCAP 7000Series ICP-OES (Thermo Scientific) sous flux d'argon : [Fe] = 18,7 µg/mL et [Au] = 2 µg/mL dans le cas des hybridosomes SPION/AuNP@PEG-PAA;

Nous avons également utilisé des hybridosomes SPION/AuNP/BODIPY ou SPION/BODIPY, toujours stabilisés par le PEG-PAA, respectivement pour l'étude d'incubation avec les cellules tumorales et l'étude de biodistribution. Le BODIPY est alors incorporé (50 µM) dans la phase organique pour permettre l'encapsulation par nanopréciptation (comme décrit précédemment).

V.5.2. Relaxométrie

Elle est réalisée sur la plateforme PRISM, Bio-Scan, Biosit. Les mesures de relaxivité ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) longitudinale r_1 et transversale r_2 des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA ont été réalisées à 4,7 T avec un spectromètre IRM horizontal Bruker Biospec 47/40. Les échantillons contenant des concentrations croissantes de Fe (dosées par ICP-OES) ont été positionnés ensemble au centre d'une bobine radio-fréquence émettrice-réceptrice de 72 mm de diamètre avec détection en quadrature. Les temps de relaxation T_1 des échantillons ont été mesurés en utilisant une séquence de type écho de spin avec temps de répétition variables (RAREVTR) 2D. Les paramètres suivant ont été utilisés : 6 TR = 50, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ms, TE = 13 ms, RARE factor = 1, Champ de vue = 51,2 mm x 51,2 mm, matrice = 128x128, résolution spatiale = 400 µm x 400 µm, épaisseur de coupe = 3 mm, Nombre d'accumulation = 1, Temps d'acquisition = 18 min 43 s. Les temps de relaxation T_2 des échantillons ont été mesurés en utilisant une séquence d'écho de spin multi-échos (MSME) 2D avec les paramètres suivants : TR = 2500 ms, TE = 8 ms, Nombre d'échos = 16, délai inter-écho = 8 ms, Champ de vue = 51,2 mm x 51,2 mm, matrice = 128x128, résolution

spatiale = 400 μm x 400 μm , épaisseur de coupe = 3 mm, Nombre d'accumulation = 1, Temps d'acquisition = 5 min 20 s. Après acquisition, les images ont été traitées et analysées avec ImageJ. Les cartographies T_1 et T_2 sont réalisées avec le plugin « MRI Analysis Calculator » (**Figure 5. 11 A**). Une région d'intérêt (ROI) circulaire a ensuite été tracée pour chaque échantillon afin de mesurer leurs temps de relaxation T_1 et T_2 moyens (**Figure 5. 11 B**).

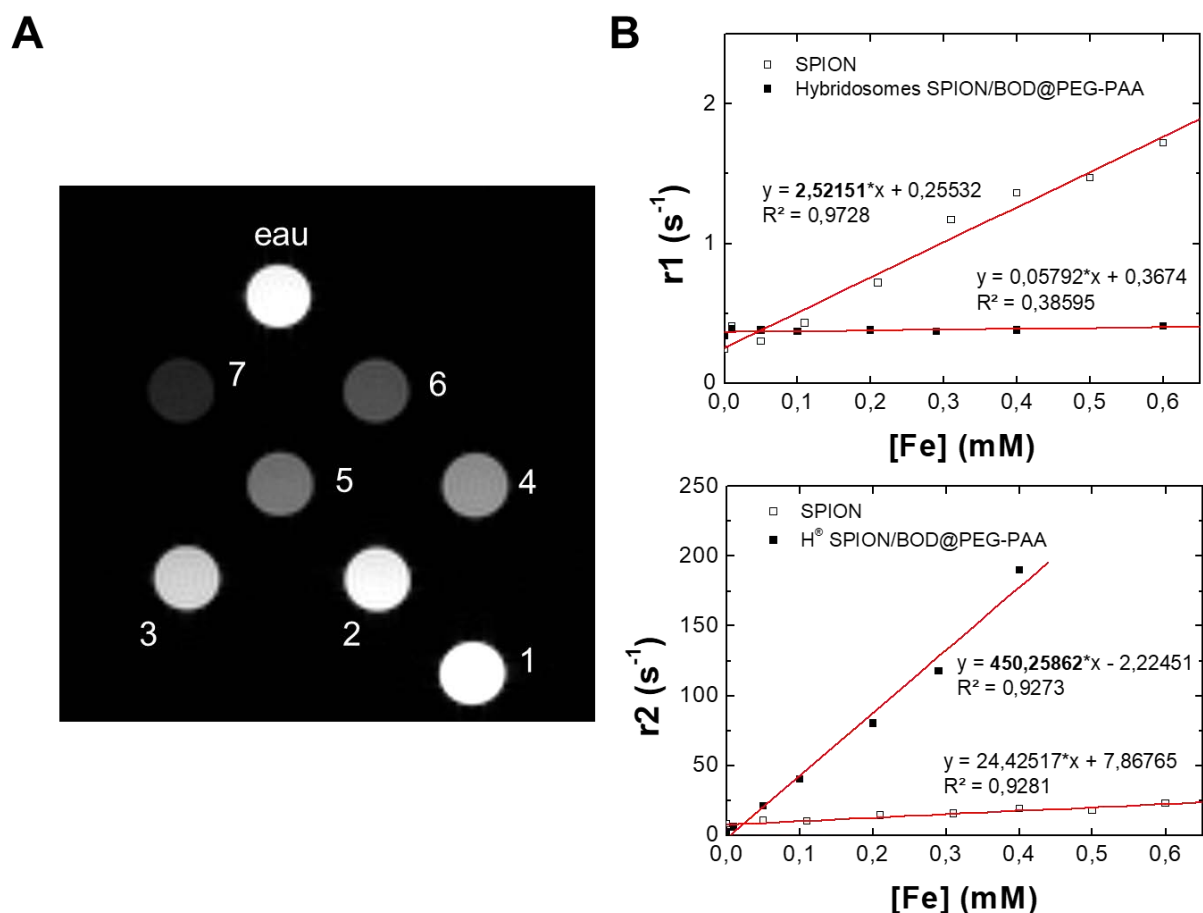


Figure 5. 11 – (A) Cartographie T_2 des hybridosomes SPION/BODIPY@PEG-PAA dans l'eau ; concentrations en Fe : 0.01 mM (1), 0,05 mM (2), 0,1 mM (3), 0,2 mM (4), 0,29 mM (5), 0,4 mM (6) et 0,6 mM (7). **(B)** Détermination des relaxivités r_1 et r_2 des hybridosomes dans l'eau et des SPION dans le THF.

V.5.3. Incubation avec les cellules tumorales

Ces manipulations ont été réalisées sur la plateforme MRic, Biosit. Les cellules GL261-Luc⁺ sont incubées pendant 2 h avec les hybridosomes SPION/AuNP/BODIPY@PEG-PAA puis imagées par microscopie de fluorescence confocale. Les images de microscopie confocale sont acquises avec un microscope confocal LSM 880 (Zeiss) équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 60X

(ouverture numérique 1,4) et contrôlé par le logiciel ZEN. Le laser d'excitation est à 488 nm et le détecteur d'émission est réglé à 517-544 nm. Les images sont traitées et analysées avec ImageJ^h.

V.5.4. Implantation des tumeurs cérébrales

Les cellules GL261-Luc⁺ sont mises en culture dans du milieu DMEM (Dutscher) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (Dutscher) et 2 mM L-Glutamine (PanBiotech). Les souris C57BL/6 (B6/Rj) et C57BL/6 albinos (B6/Rj-Tyrc/c) ont été achetées auprès de Janvier Labs et élevées dans l'animalerie de l'Université de Rennes 1 (ARCHE, Biosit).

Pour l'injection stéréotaxique, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (10 µg/g) et de xylazine (1 µg/g) et sont placées sur un cadre stéréotactique (Stoelting). Une injection de 10⁴ cellules GL261-Luc⁺ dans 2 µL de PBS stérile est réalisée avec une seringue Hamilton (0,5 µL/min), au niveau du bregma à 3 mm à droite de la suture médiane et à une profondeur de 2,5 mm. La seringue est maintenue en place pendant une minute supplémentaire lorsque l'injection est finie et est enlevée lentement. Les animaux sont ensuite recousus.

Les protocoles sont approuvés par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que par le comité d'éthique local (Comité Rennais d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale (CREEA)) (agrément #10972).

V.5.5. Étude de biodistribution suite à l'injection intratumorale

Pour l'étude de la biodistribution *in vivo*, les hybridosomes SPION /BODIPY@PEG-PAA sont injectés dans les tumeurs cérébrales des souris 14 jours après implantation des cellules GL261-Luc⁺.

V.5.6. Évaluation de l'effet radiosensibilisant des hybridosomes

Pour l'étude du potentiel radiosensibilisant, les hybridosomes SPION@PEG-PAA sont injectés dans les tumeurs des groupes #2 et #5 (tels que décrits dans le chapitre 4) et les hybridosomes SPION/AuNP@PEG-PAA sont administrés aux groupes #3 et #6, au 14^{ème} jour ou 16^{ème} jour (souris albinos) après induction de la tumeur. La radiothérapie démarre le même jour pour les groupes #4, #5 et #6. Les souris albinos (a) et non-albinos (na) sont distribuées dans les groupes comme suit : #1 = 6(a)/5(na) ; #1 = 6(a)/5(na) ; #2 = 7(a) ; #3 = 3(a)/6(na) ; #4 = 6(a)/6(na) ; #5 = 11(a) ;

^h Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675 (2012).

#6 = 7(a)/6(na). Le **Tableau 5. 2** récapitule les groupes de souris et traitements. La quantité injectée est de 5 µL de dispersion d'hybridosomes concentrée dans le PBS (500 µg/mL Fe ; 53 µg/mL Au dans le cas de des hybridosomes SPION/AuNP, i.e. ~125 µg Fe et 13 µg Au/kg de masse corporelle). L'injection intratumorale est réalisée comme décrite au-dessus à 1 µL/min à la même position que pour l'implantation de la tumeur. Pour les irradiations les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane. Les irradiations sont réalisées avec un générateur de rayons X (CellRad, faxitron Bioptics) sur la zone de la tête à hauteur de 2 Gy/jour pendant 5 jours (dose totale 10 Gy).

Tableau 5. 2 – Groupes de souris ayant subi différents traitements pour l'expérimentation *in vivo*

| | Traitement | Nombre de souris (<i>dont albinos</i>) |
|------------------|------------------------|--|
| Groupe #1 | <i>groupe contrôle</i> | 11 (6) |
| Groupe #2 | H(Fe) | 7 (7) |
| Groupe #3 | H(Fe/Au) | 9 (3) |
| Groupe #4 | IR | 12 (6) |
| Groupe #5 | H(Fe) + IR | 11 (11) |
| Groupe #6 | H(Fe/Au) + IR | 13 (7) |

H(Fe) : Hybridosomes SPION@PEG_{2k}-PAA_{7k}

H(Fe/Au) : Hybridosomes SPION/AuNP@PEG_{2k}-PAA_{7k}

IR : Irradiation

V.5.7. Suivi des souris et analyses

V.5.7.1. Signes cliniques pouvant mener à l'euthanasie

Les souris sont suivies quotidiennement et euthanasiées lorsqu'elles montrent des signes cliniques spécifiques, en suivant la procédure standard. Parmi les signes conventionnels, ceux que nous avons observés sont les suivants :

- Signes cliniques notables (*point limite atteint si 3 signes simultanés sont observés*) : agitation/agressivité ; hypomobilité/hyporéactivité ; incoordination modérée ; stéréotypes ; flaccidité musculaire généralisée ; gonflement abdominal ; dos arqué ; perte de poids < 10% ; absence d'ingestion de nourriture pendant moins de 2 jours.
- Signes cliniques sévères (*point limite atteint si 1 signe est détecté*) : akinésie ; décubitus ; difficulté/impossibilité de mobilisation ; incoordination marquée ; tremblements généralisés ; convulsions ; perte de poids > 10% ; absence d'ingestion de nourriture pendant plus de 2 jours.

V.5.7.2. Bioluminescence *in vivo*

La bioluminescence a été réalisée à l'animalerie ARCHE, Biosit. Les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de 150 µL de solution de D-Luciférine K⁺ à 15 µg/µL (Interchim) sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. L'acquisition du signal de bioluminescence est effectuée sur un bioimageur Photon Imager (Biospace Lab) équipé d'une caméra CCD ultrasensible refroidie. Les données sont traitées et analysées avec une région d'intérêt centrée sur la tête des souris en cpm (count per minute)/cm².

V.5.7.3. IRM *in vivo*

L'IRM *in vivo* des souris est réalisée à 4,7 Tesla avec un système d'imagerie horizontal Biospec 47/40 (Bruker Biospin) (Plateforme PRISM, Bio-Scan, Biosit). Après anesthésie par inhalation d'isoflurane, les souris sont placées sur le ventre et maintenues avec un système de contention équipé d'un masque facial avec 1 – 2,5% d'isoflurane dans l'air. La respiration est contrôlée grâce à un capteur pneumatique. La température corporelle est maintenue entre 36,5 et 37,5°C par une couverture chauffante avec régulation rétroactive pendant tout le protocole d'imagerie. Le volume tumoral est suivi par les images axiales et coronales pondérées T₂ obtenues par une séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement)ⁱ. Les paramètres d'acquisition sont les suivants : TR = 3500 ms ; TE/TE_{eff} = 9,35/28,5 ms ; RARE factor = 8 ; 2 averages, in plane resolution = 100 µm x 100 µm ; épaisseur des coupes = 1 mm. Le temps d'acquisition est de 2 min 20 s pour chaque acquisition. Le volume des tumeurs V (mm³) est calculé en utilisant un modèle d'ellipsoïde de révolution selon la formule : $V = (L * l * h) * \pi/6$, avec L, l et h les longueurs des 3 axes principaux de la tumeur mesurés sur les images de résonance magnétique axiales et coronales.

ⁱ Hennig, J., Friedburg, H. & Ströbel, B. Rapid nontomographic approach to MR myelography without contrast agents. *J Comput Assist Tomogr* 10, 375–378 (1986).

V.5.7.4. Analyse statistique de la survie

Pour éviter les biais causés par les tailles des tumeurs, les souris ont été distribuées dans 6 groupes de manière à ce que chaque groupe de souris soit composé de tumeurs de toutes les tailles, en se basant sur les mesures IRM à jour 9/10 après implantation des tumeurs. Deux souris (sur 54) avec des volumes tumoraux dépassant 30 mm³ sont exclues. La taille moyenne des tumeurs de la cohorte après l'écartement de ces deux souris est de 4,8 ± 1,2 mm³. Les données de survie sont analysées avec la représentation de Kaplan-Meier, exprimées en termes de survie moyenne et médiane, avec représentation en boîte à moustache, grâce aux logiciels GraphPad Prism 7.0 et Origin 7.5. Les P values sont calculées avec le test Logrank (Mantel-Cox) (*, p < 0,05).

V.5.7.5. Prélèvements des tissus et histologie

Pour l'étude de biodistribution sur 5 jours, les cerveaux, rate, foie, et ganglions lymphatiques cervicaux sont prélevés à des temps différents (avant injection des hybridosomes, injection +30 min, +24h, +48h, +72h, +120h). Après prélèvement, les organes sont congelés dans l'isopentane (Sigma-Aldrich) et sectionnés en plusieurs coupes tous les 10 µm avec un cryostat (Leica) à -30°C. Les coupes sont en premier lieu scannées avec un NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K.) pour l'acquisition de la fluorescence du BODIPY (fluorescence verte (filtre FITC) et fluorescence rouge (filtre TRITC)). Ensuite, les coupes sont colorées avec le DAPI (SouthernBiotech), hématoxyline éosine safran (HES) et/ou Perls (détection du fer) avant une seconde acquisition. Les images sont ensuite traitées avec de logiciel NDPview (Hamamatsu). Les organes de la souris survivante pendant 78 jours sont également prélevés au moment du décès. Le cerveau est sectionné en plusieurs coupes et coloré HES et Perls. Les organes sont conservés pour des analyses TEM futures.



Conclusion générale

Les travaux de cette thèse ont porté sur les hybridosomes[®], nanocapsules hybrides de polymère et de nanoparticules formées par effet ouzo. Ces nano-objets ont été développés lors de la thèse précédente (F. Sciortino). L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre l'effet ouzo et les paramètres clés le régissant, tout en explorant des applications, notamment biomédicales. Ainsi la thèse s'est déroulée en plusieurs parties, avec en premier lieu une partie fondamentale sur la physico-chimie du procédé d'élaboration des hybridosomes, puis une investigation de l'encapsulation par effet ouzo et finalement l'application au traitement du glioblastome sur un modèle murin.

Nous avons commencé par étudier le système ouzo « eau/THF/BHT » que nous utilisons pour la préparation des hybridosomes. Pour la première fois, nous avons réalisé le diagramme de phase de ce système, en balayant à la fois la zone SFME (surfactant-free microemulsion), le domaine ouzo et la zone diphasique. Dans ce système, nos travaux ont confirmé que le BHT est indispensable à l'établissement du système ouzo. Dans la zone SFME, la quantité du composé hydrophobe n'a pas d'influence sur la taille et la concentration de gouttes, et donc sur le volume occupé par celles-ci. Il semblerait par ailleurs que la taille et la concentration augmentent légèrement quand il y a plus de solvant. En revanche, le comportement dans le domaine ouzo est complètement différent, avec à la fois la taille, la concentration et le volume occupé par les gouttes qui augmentent lorsque la quantité de soluté hydrophobe est plus importante, ce qui se traduit par des mélanges très diffusants.

Toutefois, le BHT n'est pas la seule espèce permettant d'induire un effet ouzo. Afin de mieux maîtriser notre procédé, nous avons étudié les diagrammes de phase de différents ligands des nanoparticules dans le système « eau/THF ». Tous les ligands testés excepté l'octylamine, c'est-à-dire l'acide oléique, l'oléylamine et le mélange (octylamine + acide oléique) présentent un grand domaine ouzo. Ainsi, la présence de ces ligands nous a permis d'obtenir des hybridosomes, même en l'absence de BHT. De manière intéressante les domaines ouzo de l'oléylamine et de l'acide oléique, qui disposent de la même chaîne grasse, sont très semblables. Tous les ligands étudiés, excepté l'octylamine, sont donc capables d'induire la formation d'un domaine ouzo et sont donc susceptibles de favoriser la préparation des hybridosomes.

Nous avons ensuite préparé des hybridosomes avec des nanoparticules de nature et de taille variées, entre 3 et 10 nm de diamètre. Nous avons obtenu des hybridosomes même avec les plus

petites nanoparticules, ce qui ne correspond pas à des émulsions de Pickering, dont la stabilisation par de toutes petites nanoparticules est très difficile du fait de la très faible enthalpie d'adsorption des nanoparticules aux interfaces. Par ailleurs, la concentration en nanoparticules influence les objets formés : plus la concentration en nanoparticules est élevée, plus la taille des gouttes est petite, tout du moins avant évaporation. Après évaporation, la taille est plutôt indépendante de cette concentration en nanoparticules, certainement du fait de la contraction de l'hybridosome pendant l'évaporation. En tout état de cause, la concentration en objets augmente avec la concentration en nanoparticules, ce que l'on observe à la fois en DLS et en NTA. Cela pourrait être attribué à l'effet tensioactif des nanoparticules qui permet de stabiliser plus d'interface.

Nous avons également poursuivi le travail qui avait été entrepris lors de la thèse précédente sur la préparation de structures SPION@SiO₂ par condensation du TEOS autour de gouttes ouzo. Les structures formées possèdent toutes un cœur de SPION et des épaisseurs variables suivant les conditions expérimentales, notamment en fonction de la quantité de précurseur de silice dans le milieu.

Nous avons ensuite mis à jour les très bonnes performances d'encapsulation dans les hybridosomes, avec à la fois rendement très élevé (80 à 90%) et des concentrations internes exceptionnelles (jusqu'à 170 g.L⁻¹). Ces performances s'expliquent notamment par la nature nanoprécipitée de la molécule encapsulée. Nous n'avons pas constaté d'influence majeure du composé encapsulé sur la taille des hybridosomes formés, ni sur leur concentration. Nous avons par la suite étudié son relargage dans divers environnements. En premier lieu, nous avons suivi le relargage du composé nanoprécipité dans un environnement hydrophobe modèle : les liposomes. La molécule encapsulée hydrophobe est extraite par les liposomes, d'autant plus rapidement que la concentration en lipide augmente. Il s'agit d'un mécanisme limité par la diffusion. Ce relargage est par ailleurs observé *in vitro* mais aussi *in vivo*. Au niveau des cultures cellulaires, le composé encapsulé est internalisé dans le cytoplasme, sans jamais rentrer dans le noyau. Quant à la coque, elle n'est jamais internalisée et reste à l'extérieur des cellules ou au niveau de la membrane. De manière très intéressante, l'injection intraveineuse *in vivo* sur les souris se traduit par un relargage progressif de la molécule encapsulée, qui s'accumule dans les tissus gras sous-cutanés puis diffuse dans la peau. Cela résulterait d'une captation des hybridosomes par le système de détoxification du corps avec une accumulation dans le foie. Le principe actif

encapsulé dans les hybridosomes serait ensuite relargué dans la circulation sanguine et s'accumulerait de la même manière dans les tissus gras sous-cutanés. Il est important de noter que les hybridosomes SPION n'ont pas montré de toxicité sur les lignées cellulaires testées.

Nous avons finalement mis à profit les propriétés des nanoparticules pour l'amélioration de la radiothérapie du glioblastome. De manière très intéressante, les hybridosomes composés de SPION et d'une petite quantité d'AuNP (ratio Fe:Au 10:1), couplés à la radiothérapie, permettent une amélioration significative de la survie des souris, avec plus de 10 jours de survie moyenne en plus (32 jours contre 21,5 jours pour le groupe contrôle). Le groupe comprenant les hybridosomes « SPION/AuNP + irradiation » est le seul des 6 groupes testés à présenter une amélioration significative de survie par rapport au groupe contrôle (*, p value = 0,0115). Ainsi, l'or semble potentialiser l'effet délétère du rayonnement sur la tumeur. Par ailleurs, une souris a présenté une survie très prolongée (78 jours) dans le groupe « SPION/AuNP + irradiation ». Du fer (provenant des hybridosomes) est retrouvé dans la périphérie de la tumeur au bout des 78 jours. Ces résultats prometteurs laissent à penser qu'une deuxième session de radiothérapie pourrait être réalisée et efficace 40 jours après injection.

En termes de perspectives, il serait intéressant d'étudier plus en détail le comportement des nanoparticules dans le système ouzo, leur dynamique aux interfaces ou encore la modification du domaine ouzo avec ou sans particules. L'étude de notre procédé et de l'effet ouzo serait ainsi particulièrement intéressante avec des nanoparticules très petites. Une des pistes est l'utilisation de fullerènes C₆₀, qui ont un diamètre inférieur au nanomètre. Au niveau de l'encapsulation, le fluorophore utilisé dans cette thèse n'est pas restrictif et nous envisageons de tirer parti du procédé d'élaboration des hybridosomes pour encapsuler d'autres molécules hydrophobes, par exemple des médicaments mais aussi des parfums ou arômes. Par ailleurs, les nanoparticules ne sont pas souhaitées ou utiles dans tous les domaines d'applications. Nous cibons ici les applications pour lesquelles il n'existe aucune solution à l'heure actuelle et où les nanoparticules apportent une réelle plus-value. Par exemple, nous pourrions viser une application antibactérienne grâce aux effets combinés de nanoparticules d'argent et d'un principe actif encapsulé. Une application aux affections cutanées serait donc tout à fait pertinente. Lorsque les nanoparticules ne sont pas nécessaires, il serait opportun d'explorer la réalisation de

nanocapsules comportant uniquement du polymère (ce que nous avons déjà entrepris). D'autre part, les perspectives pour le traitement du glioblastome sont séduisantes, avec l'idée d'intégrer les hybridosomes dans un gel pour faciliter la radiothérapie post-résection. Les résultats que nous avons obtenus au niveau de la radiothérapie du glioblastome sont particulièrement prometteurs d'autant plus que la quantité d'or utilisée est très faible. Une piste d'amélioration serait donc d'augmenter cette quantité d'or, soit en utilisant des hybridosomes intégralement composés d'AuNP (ce que l'on ne sait pas faire pour l'instant), soit en augmentant le ratio AuNP/SPION dans la coque des hybridosomes. Nous envisageons finalement la préparation d'objets permettant de faire de la chimiothérapie (médicament encapsulé) en même temps que la radiothérapie (AuNP). Cela permettrait de pousser encore plus loin les performances des hybridosomes dans le traitement du glioblastome, et pour les applications biomédicales en général.

Titre : L'effet ouzo pour l'élaboration de nanocapsules hybrides (Hybridosomes®), l'encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciipitation et la radiothérapie

Mots-clés : Hybridosomes, Nanoparticules, Radiothérapie, Encapsulation, Nanopréciipitation, Effet ouzo

Résumé : L'effet ouzo est un phénomène d'émulsification spontanée dans un système « eau/solvant miscible/composé hydrophobe », menant à la formation de gouttelettes de taille contrôlée et peu polydisperses. Il a par exemple été utilisé pour l'élaboration de nanoparticules, l'encapsulation ou encore la délivrance contrôlée de médicaments. Depuis plusieurs années, notre groupe a mis en place un procédé basé sur l'effet ouzo permettant la préparation de nanocapsules composées de nanoparticules inorganiques et de polymère : les Hybridosomes. Ainsi, ce procédé simple mène à des nanocapsules dont les propriétés sont modulables en fonction des nanoparticules assemblées (oxyde de fer, or, quantum dots...).

L'objectif de ces travaux est de comprendre les mécanismes physico-chimiques impliqués dans la formation des hybridosomes ainsi que d'en explorer les applications, en l'occurrence l'encapsulation et la radiothérapie.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude du système ouzo permettant la réalisation des hybridosomes. Nous cherchons à comprendre les paramètres modifiant la génération des gouttes, avec un intérêt tout particulier pour l'influence des ligands présents sur les nanoparticules. Par ailleurs, nous investiguons l'utilisation de nanoparticules de nature et de taille variées. Ensuite, nous évaluons l'utilisation de notre procédé pour l'encapsulation de composés hydrophobes par nanopréciipitation. Les très bonnes performances d'encapsulation ainsi que le relargage (*in vitro* et *in vivo*) sont exposés. Finalement, nous utilisons avec succès les hybridosomes composés de nanoparticules d'or et d'oxyde de fer pour la radiothérapie du glioblastome sur un modèle murin.

Title : The ouzo effect for the preparation of hybrid nanocapsules (Hybridosomes®), the encapsulation of hydrophobic compounds by nanoprecipitation and radiotherapy

Keywords: Hybridosomes, Nanoparticles, Radiotherapy, Encapsulation, Nanoprecipitation, Ouzo effect

Abstract: The ouzo effect is a spontaneous emulsification technique involving a "water/miscible solvent/hydrophobic compound" system, leading to the formation of droplets of controlled size and low polydispersity. It has been used, for example, in the development of nanoparticles, for encapsulation or controlled drug delivery. For several years, our group has implemented a process based on the ouzo effect to prepare nanocapsules composed of inorganic nanoparticles and polymer: Hybridosomes. Thus, this simple process leads to nanocapsules whose properties can be modulated according to the assembled nanoparticles (iron oxide, gold, quantum dots...).

The objective of this work is to understand the physico-chemical mechanisms involved in the formation of hybridosomes as well as to explore their applications, in this case encapsulation and radiotherapy.

The first part of this manuscript is devoted to the study of the ouzo system allowing the generation of hybridosomes. We seek to understand the parameters influencing the formation of the droplets, with a particular interest in the ligands present on the surface of nanoparticles. Besides, we investigate the use of nanoparticles of various natures and sizes. Then, we evaluate the use of our process for the encapsulation of hydrophobic compounds by nanoprecipitation. The very good encapsulation performances as well as the release (*in vitro* and *in vivo*) are exposed. Finally, we successfully use hybridosomes composed of gold and iron oxide nanoparticles for glioblastoma radiotherapy in a murine model.