



HAL
open science

Micelles fluorées et polydiacétyléniques pour la thérapie et le diagnostic

Lucie Jamgotchian

► **To cite this version:**

Lucie Jamgotchian. Micelles fluorées et polydiacétyléniques pour la thérapie et le diagnostic. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF037 . tel-03141287

HAL Id: tel-03141287

<https://theses.hal.science/tel-03141287v1>

Submitted on 15 Feb 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.

Micelles fluorées et polydiacétyléniques pour la thérapie et le diagnostic

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571, Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité : Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Médicaments et Technologies
pour la Santé, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue en visio-conférence totale,
le 17 décembre 2020, par**

Lucie JAMGOTCHIAN

Composition du Jury

Elias FATTAL Professeur des Universités, Université Paris-Saclay	Président du jury
Patrick SAULNIER Professeur des Universités, Université d'Angers	Rapporteur & Examineur
Cécilia MENARD-MOYON Chargée de recherche CNRS, HDR, Université de Strasbourg	Rapporteur & Examinatrice
Cyrille RICHARD Directeur de recherche CNRS, Université Paris Descartes	Examineur
Edmond GRAVEL Chercheur CEA, Université Paris-Saclay	Examineur
Eric DORIS Chercheur CEA, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

À mes grands-parents,

Remerciements

À Monsieur Elias Fattal, professeur à l'Université Paris-Sud, à Monsieur Patrick Saulnier, professeur à l'Université d'Angers, à Madame Cécilia Ménard-Moyon, chargée de recherche au CNRS à l'Université de Strasbourg, à Monsieur Cyrille Richard, directeur de recherche au CNRS à l'Université Paris-Descartes, à Monsieur Edmond Gravel, chercheur au CEA de Saclay ainsi qu'à Monsieur Eric Doris, chercheur au CEA de Saclay, qui me font l'honneur de juger mon travail et que je remercie profondément.

Je voudrais remercier le Dr. Frédéric Taran, chef du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, pour m'avoir permis d'effectuer ces quatre années dans les meilleures conditions possibles.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mon directeur de thèse, Monsieur Eric Doris et mon encadrant, Monsieur Edmond Gravel pour m'avoir permis de travailler à vos côtés pendant toutes ces années. Je vous remercie pour votre confiance, pour votre soutien et votre aide surtout durant les dernières semaines, pour nos discussions autour des différents projets sur lesquels j'ai pu travailler et sur lesquels je me suis sentie épanouie. Merci à tous les deux pour le temps que vous avez consacré à la relecture de mon manuscrit et pour vos encouragements de fin de thèse que j'ai particulièrement apprécié.

Mes pensées vont également au Dr. Laurent Devel. J'ai pu découvrir la vie des métalloprotéases mais j'ai surtout été initiée à ces projets « à l'interface » avant de m'engager sur cette thèse. Tu as toujours été de bons conseils et je n'oublierai jamais ta disponibilité. Je te remercie pour le temps que tu as consacré à la relecture du manuscrit. Je souhaite également remercier Madame Mylène Bernès pour son aide précieuse durant mes premières années au CEA et au fil de mes projets. Ça a toujours été un plaisir pour moi de travailler avec vous ainsi que tous les membres du SIMOS que je n'oublie pas ! Bien que Mylène ne fasse plus partie de l'équipe, je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Je voudrais maintenant remercier mes nombreux collaborateurs en commençant par le Dr. Sébastien Meriaux, le Dr. Solenne Vaillant, Monsieur Erwan Selingue, Madame Françoise Geffroy et toute l'équipe de Neurospin. Merci pour l'aide que vous m'avez apporté mais surtout pour votre confiance. Votre implication dans les études *in vitro* puis *in vivo* par IRM a été d'une grande importance dans la réalisation de ma thèse. Vous avez été d'un grand soutien et d'une grande aide. Vous m'avez notamment fait confiance pour la manipulation des IRM et à l'aide de vos enseignements, j'ai pu effectuer une partie des manip *vivo* en parfaite autonomie. J'ai été très heureuse de travailler avec vous, j'en garderai un très bon souvenir.

Je souhaite également remercier le Dr. Charles Truillet, le Dr. Vu-Long Tran ainsi que toute l'équipe du Service Hospitalier Frédéric Joliot à Orsay. Nous avons commencé une collaboration sur l'imagerie CT-scan puis PET-scan. Merci de m'avoir initiée à ces systèmes d'imagerie. J'espère que la suite du projet sur la radio-sensibilisation sera fructueuse !

Je souhaiterais remercier Madame Elodie Barruet, pour toutes les analyses ICP-MS ainsi que Madame Fabienne Testard pour les analyses SAXS. Merci pour votre aide et pour tous ces

échanges très enrichissants. Je souhaite également remercier toutes les personnes ayant travaillé et collaboré sur le projet LERMIT, coordonné par le Dr. Vincent Dive. Merci également à Monsieur Guillaume Pinna pour les tests de cytotoxicité. Merci pour votre disponibilité, votre réactivité et pour les différentes discussions que nous avons pu avoir autour des projets.

Mes remerciements les plus profonds s'adressent à toute l'équipe d'analyse du SCBM qui a joué un rôle important dans la réalisation de mon travail de thèse. Merci à David-Alexandre Buisson, Amélie Goudet et Sabrina Lebrequier, mais également à Céline Chollet et Elodie Marcon. Je vous remercie pour toutes les analyses RMN du fluor et toutes les masses intro-directes que vous avez pu effectuer. Je vous remercie pour vos conseils et votre disponibilité. Vous avez été pour moi une source de bonne humeur, alors ne changez pas. Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

Merci à toutes les personnes du SCBM que j'ai pu côtoyer tous les jours pendant 4 ans ! Merci aux permanents : Karen, Antoine, Davide, Dominique, Olivier, Jean-Christophe, Marie-Pierre, Cristelle, Christophe Dugave, Christophe Créminion, Chantal et Bernard avec qui je n'ai pas travaillé directement. Merci pour votre présence, pour nos échanges et vos encouragements surtout en fin de thèse.

Merci aux doctorants et post-doctorants du Carbone-14 et de la recherche qui ont marqué mon expérience doctorale. En particulier merci à Margaux, Karine, Antonio, Gianluca, Robin, Alex, Maxime, Hugo et aux posts-docs Mathilde, Audrey, Serena, Victor (couroucouc rouplo), Expédite. Merci pour tous ces apéros, pour ces sorties dans Paris, les running le midi, pour nos larmes de joie et de tristesse ! C'était une aventure humaine extraordinaire ! Avec vous, l'expérience de la thèse semble être un long fleuve tranquille ! J'en garderai que de bons souvenirs. J'ai vraiment fait de belles rencontres et j'espère que nous garderons contacts.

Finalement, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien au laboratoire ! Les nouveaux, les anciens, merci à tous pour votre présence, vos encouragements, vos sourires, vos blagues et vos pains aux chocolats que j'ai particulièrement appréciés ! Je pense particulièrement à Martina, Marion, Arun, Gopi, Danaji, Minh-Duc, Emilie, Timothée, Alaric, Viktor, Anaëlle, Alberto, Mickaël, Emmanuel, Joseph, Sophie, Florence, Sébastien, Grégory. J'espère que nous garderons contacts à l'avenir. Merci pour votre soutien, pour tous nos échanges et pour tous ces moments de partage.

Je souhaiterais remercier plus particulièrement Sophia. Tu es devenue une personne très importante pour moi. Je te remercie profondément pour tout le soutien que tu m'as apporté dans les périodes les plus difficiles de ma vie. Je te remercie pour ta bonne humeur au quotidien, tes encouragements, ta disponibilité. Je te remercie pour nos discussions, nos délires et nos galères... que nous sommes seules à comprendre et à partager... MERCI pour ça ! Je sais que j'ai été d'un grand soutien pour toi aussi, sache que je serai toujours là. Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite de la thèse. Je suis sûre que tout se passera bien !!

Merci à Jérémy et Lucas avec qui j'ai partagé le laboratoire pendant 3 ans. Vous êtes devenus des personnes très importantes pour moi et je suis très heureuse de vous avoir connus. Nous avons réussi à surmonter pas mal d'épreuves ensemble (nos premières galères scientifiques, administratives, nos galères personnelles, nos premiers doutes) mais sur une chanson de Rita

Mitsuko tout est surmontable n'est-ce pas ? Je vous remercie pour votre présence jusqu'à la fin de la thèse, vos encouragements, pour nos échanges scientifiques. Merci d'avoir égayé mon quotidien dans les périodes les plus difficiles (il ne faut pas grand-chose...). Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite ! Cette ambiance va terriblement me manquer.

Merci à mes amies Elodie, Marine, Séverine, Cathy et Coralie. Vous m'avez permis de garder un pied sur terre mais aussi de m'évader un peu lorsque cela était nécessaire. Merci pour toutes ces soirées électro à Paris, Lyon ou Barcelone, pour tous ces fous-rires, pour nos virées et nos vacances en bord de mer ou à la montagne, dans notre région natale adorée (avant l'arrivée du Covid...). Malgré la distance, nous avons continué à nous voir régulièrement, à nous appeler et je vous remercie pour vos messages d'encouragements pendant les périodes les plus difficiles. J'espère qu'on aura encore plein de beaux moments à partager.

Merci à mes colocataires : Linh, Arnaud, Virginie, Bérangère, Pascal, Sid-Ahmed, Victor, Oliver, Solène, Guillaume, Corentin, Anh, Elodie. Vous êtes des personnes incroyables. Vous avez été les premiers à me supporter au quotidien, le soir après une journée de travail intense... Merci pour votre patience, merci pour tous nos délires, merci pour votre écoute, merci pour tous ces moments de partage... Merci pour ces petites escapades à Conches-en-Ouche ou à Chateauneuf-sur-Cher ! Je n'oublierai jamais cette expérience de colocation à vos côtés (sans oublier le confinement, que j'ai particulièrement apprécié...). Pour certains, vous êtes devenus de très bons amis, j'espère que nous garderons contact... !

Mes derniers remerciements s'adressent à mes parents et ma sœur. Vivre en région parisienne, pour une fille du sud, ce n'est vraiment pas facile tous les jours...Malgré les quelques 900 km qui nous séparent, vous avez toujours été présents et disponibles, avec toujours de bonnes paroles pour m'encourager. Cette thèse marque la fin d'un long parcours, qui, sans vous, sans votre aide n'aurait pu s'achever. Ces 3 dernières années ont été particulièrement difficiles et nous avons traversé des épreuves assez douloureuses. Merci de m'avoir donné la force de continuer à me battre et à travailler sur cette thèse. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour tout ce que vous m'avez transmis et appris.

Merci à mes grands-parents, Odette et Grégoire, qui m'ont vu grandir et devenir une adulte, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ma thèse. À ma grand-mère Adrigue, qui croyait en moi dès mon jeune âge. Mon seul regret est que vous ne puissiez partager cette réussite avec moi. Vous me manquez énormément. À mon grand-père Vrege qui, par sa force, me permet de penser que rien n'est impossible !

Mention spéciale à la Covid-19, pour cette année laborieuse.

Sommaire

Abréviations	7
Avant-propos	11
Introduction générale : utilisation de micelles en nanomédecine	10
I – Les systèmes nanométriques pour le diagnostic et la thérapie	15
1- Nanomédecine et vectorisation.....	15
2- La vectorisation : définitions et optimisation du concept	15
2.1- Vecteurs furtifs : Effet EPR et ciblage passif	16
2.2- Ligands de surface : reconnaissance cellulaire et ciblage actif	18
II- Etat de l’art sur le développement de vecteurs nanoparticulaires	20
1- Composition des nanoparticules organiques	21
2- Nanoparticules : outils de vectorisation	22
2.1- Les liposomes	22
2.2- Les nanocapsules et les nanosphères	24
2.3- Les nanoparticules de carbone.....	25
2.4- Les systèmes mono-macromoléculaires.....	26
2.5- Les micelles	28
III- Auto-assemblage d’amphiphiles et formation de micelles	29
1- Interactions entre auto-assemblages.....	29
2- Structures des auto-assemblages : concepts historiques	30
3- Concentration micellaire critique	32
4- Stabilisation de la micelle.....	33
4.1- Stabilisation par réticulation	33
4.2- Stabilisation par des composés perfluorocarbonés	34
V – Conclusion et objectifs de la thèse.....	35
Chapitre 1 : Micelles polydiacétyléniques pour le diagnostic et le traitement de l’athérosclérose	31
I- Plaque d’athérome et micelles PDA-PEG : état de l’art	39
1- L’athérosclérose et la découverte du GW3965	39
1.1- Développement de la plaque d’athérome.....	39
1.2- Identification du GW3965 comme agoniste partiel des LXR	41
2- Micelles PDA-PEG : développement et études préliminaires.....	45
2.1- Historique sur le développement des micelles PDA-PEG.....	45
2.1.1- Amphiphiles DA-NTA	45

2.1.2- Amphiphiles DA-PEG -----	47
2.2- Fonctionnalisation des micelles pour un ciblage actif -----	49
3- Objectifs-----	51
II- Formulation d'un composé agoniste des LXR-----	53
1- Synthèse des amphiphiles -----	53
2- Assemblage des micelles et caractérisations-----	55
3- Étude de toxicité-----	57
3.1 – Effet de la polymérisation-----	57
3.2- Distribution intracellulaire -----	59
4- Synthèse du GW3965-----	59
5- Formulation du GW3965 -----	60
5.1- Encapsulation du GW3965-----	60
5.2- Caractérisations de la formulation -----	62
5.2.1- Détermination de la taille des particules-----	62
5.2.2- Cinétique de libération du GW3965 -----	62
5.2.3- Stabilité au stockage -----	63
5.2.4- Efficacité <i>in vitro</i> -----	64
III- Études de pharmacocinétique et de biodistribution-----	65
1- Principes généraux sur la pharmacocinétique-----	65
2- Choix du modèle animal -----	66
3- Étude de pharmacocinétique et de biodistribution des micelles -----	67
3.1- Formulation des micelles encapsulant un fluorophore-----	67
3.2- Étude de pharmacocinétique après administration par voie intraveineuse -----	68
3.4- Étude de biodistribution après injection par voie intra-veineuse -----	69
4- Étude pharmacocinétique de la formulation du GW3965 -----	70
IV- Formulation de deuxième génération -----	71
1- Optimisation structurale et formulation -----	71
1.1- Synthèse des dérivés du GW3965-----	72
1.2- Formulation dans les micelles PDA-PEG et caractérisations -----	73
1.3- Études <i>in vitro</i> sur l'efficacité de la formulation-----	74
2- Études <i>in vivo</i> des formulations des dérivés du GW -----	75
2.1- Étude de pharmacocinétique -----	75
2.2- Étude de l'activité transcriptionnelle <i>in vivo</i> -----	77
V- Fonctionnalisation pour du ciblage actif-----	79
1- Modification de l'amphiphile pour un ciblage actif -----	79

1.1-	Fonctionnalisation des micelles.....	80
1.2-	Caractérisations	81
2-	Étude <i>in vivo</i> avec le RXP470.1	82
VI-	Conclusions et perspectives.....	83
Chapitre 2 : Micelles fluorées pour l'imagerie par résonance magnétique du fluor ---		85
I-	L'IRM ¹⁹ F en tant qu'outil diagnostique de tumeurs solides.....	87
1-	Principe de l'IRM	87
1.1-	Principe physique	87
1.2-	Agents de contraste développés pour l'IRM.....	89
2-	IRM du fluor-19.....	89
2.1-	Avantages du fluor-19	89
2.2-	Développement de sondes fluorées.....	90
3-	Applications à l'imagerie de tissus tumoraux.....	93
4-	Vers la conception de micelles fluorées	93
5-	Objectifs.....	94
II-	Formulation du PERFECTA à l'aide de micelles fluorées	94
1-	Synthèse des amphiphiles PFTD-PEG	94
2-	Assemblage des micelles et caractérisations.....	95
2.1-	Détermination de la CMC	95
2.2-	Assemblage	96
3-	Formulation de la molécule de PERFECTA	96
3.1-	Synthèse du PERFECTA.....	96
3.2-	Formulation dans les micelles PFTD-PEG	97
3.3-	Détermination du taux de chargement par RMN ¹⁹ F.....	97
4-	Caractérisations	99
4.1-	Détermination de la taille et de la structure des nanoparticules.....	99
4.2-	Étude de stabilité de la formulation	101
III-	Études de toxicité et imagerie cellulaire	102
1-	Tests de cytotoxicité.....	102
2-	Imagerie cellulaire	103
IV-	Évaluation du potentiel diagnostique des micelles de PERFECTA par IRM	105
1-	Mise au point du protocole IRM	105
1.1-	Préparation des échantillons et gamme de concentration	105
1.2-	Optimisation de la séquence IRM.....	105
2-	Études préliminaires <i>in vivo</i>	107

3-	Évaluation du potentiel diagnostique -----	108
3.1-	Croissance et implantation des tumeurs -----	108
3.2 -	Optimisation du protocole in vivo -----	108
3.3-	Acquisition des données IRM -----	109
3.4-	Résultats -----	110
3.5-	Analyses ex vivo -----	111
3.5.1	Expérience IRM -----	112
3.5.2	Expérience RMN ¹⁹ F -----	112
VI-	Conclusion et perspectives -----	113
	Chapitre 3 : Nanoparticules d'or pour l'imagerie et la radiothérapie -----	115
I -	Applications des nanoparticules d'or en nanomédecine -----	117
1-	Propriétés optiques des nanoparticules d'or -----	117
2-	Préparation de nanoparticules d'or -----	119
2.1-	Synthèses de nanoparticules sphériques par voie chimique -----	119
2.1.1-	Synthèse de Turkevich, -----	120
2.1.2-	Synthèse de Brust -----	120
2.2-	Stratégies de fonctionnalisation -----	120
2.2.1-	La fonctionnalisation directe -----	121
2.2.2-	La fonctionnalisation indirecte -----	121
3-	Nanoparticules d'or en imagerie et thérapie -----	122
3.1-	Nanoparticules d'or pour l'imagerie par tomодensitométrie -----	122
3.1.1-	Principe de fonctionnement du contraste aux rayons X -----	122
3.1.2-	Intérêt diagnostique des nanoparticules d'or -----	123
3.2-	Utilisation de nanoparticules d'or pour la radiothérapie -----	125
3.2.1-	Principe de la radiothérapie -----	125
3.2.2-	Intérêt thérapeutique des nanoparticules d'or -----	126
4-	Objectifs -----	128
II -	Préparation des micelles encapsulant les nanoparticules d'or -----	128
1-	Stratégie mise en œuvre -----	128
2-	Préparation des micelles encapsulant les nanoparticules d'or -----	129
2.1-	Synthèse des nanoparticules d'or -----	129
2.2-	Échange du ligand -----	130
2.3-	Encapsulation des nanoparticules d'or dans les micelles -----	132
3-	Quantification de l'or -----	133
4-	Caractérisations -----	135

4.2- Analyses de SAXS -----	135
4.3- Études de stabilité -----	136
III – Imagerie par tomodensitométrie -----	137
1- Mise au point par tomodensitométrie -----	137
2- Expériences de tomodensitométrie <i>in vivo</i> -----	138
IV – Conception de micelles pour la radiothérapie -----	140
1- Imagerie TEP-scan et choix du radionucléide -----	140
2- Synthèse des amphiphiles -----	141
3- Essais de chélation du zirconium -----	143
4- Assemblage des micelles et caractérisations -----	144
5- Encapsulation des nanoparticules d'or -----	144
6- Solubilisation du dioxygène -----	144
V – Conclusion et perspectives -----	145
Conclusion Générale -----	147
Experimental section -----	151
General informations -----	153
Experimental part: “Chapitre 1” -----	155
Experimental part: “Chapitre 2” -----	176
Experimental part : “Chapitre 3” -----	184

Abréviations

ABCA1	ATP-binding cassette A1
ABCG1	ATP-binding cassette G1
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
APOA1	Alipoprotéine A1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AuNP	Nanoparticules d'or
AVC	Accident vasculaire cérébral
CBA	Cytometric Bead Array
Cl-HOBT	6-Chloro-1-Hydroxybenzotriazole di-hydrate
CM	Chargement massique
CMC	Concentration micellaire Critique
CT-scan	Computed Tomography
Cyclo	Cyclohexane
DA-NTA	Diacetylenic NitrilotriAcetic amphiphile
DA-PEG	Diacetylenic Poly(ethylene glycol) amphiphile
DCM	Dichlorométhane
DCs	Dendritic cells
DFO	Deferroxamine
DI	Dose injectée
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIC	N,N'Diisopropylcarbodiimide
DLS	Dynamic light scattering
Dm	Diamètre moyen
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DOPC	dioleoylphosphatidylcholine
DOPE	dioleoylphosphatidylethanolamine
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DPTA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
DSPC	diastearoylphosphatidylcholine
DSPE	diastearoylphosphatidylethanolamine
DSPG	diastearoylphosphatidylglycerol
EC50	Concentration efficace
EDCI	N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
EE	Efficacité d'encapsulation
EIC	Chromatogramme de l'ion extrait

EPC	Egg Phosphatidylcholine
EPR	Enhanced permeability and retention effect
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FID	Free Induction Decay
FP730	FluoroProbes 730
GSH	Glutathion
h	heure
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HBL	Balance Hydrophile-Lipophile
HDL	Lipoprotéines de hautes densité
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC-MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
HSPC	hydrogenated soy phosphatidylcholine
i.p.	intrapéritonéale
i.v.	intraveineuse
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	Knockout
LC-MSMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDH	Lactates déshydrogénases
LDL	Lipoprotéines de basses densité
LXR	Liver X receptor
MeOH	méthanol
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MLV	Liposomes multi-lamellaires
MMP	Métalloprotase de la matrice
Mn	Masse moyenne
MSME	Multi-Slice-Multi-Echoes
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NIR	Near-InfraRed
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Phosphatidyl Choline
PCL	Poly-caprolactone
PDA	Polydiacétylénique
PDA-NTA	Polymerized diacetylenic NitrolotriAcetic micelles

PDA-PEG	Polymerized diacetylenic Poly(ethylene glycol) micelles
PDB	Protein data bank
PEG	Polyéthylène glycol
PERFECTA	SuPER FluorinatEd ContrasT Agent
PFCE	Perfluoro crown ether
PFCs	Perfluorocarbones
PFDT	Perfluorodecanethiol
PFMC	Perfluoromethylcyclohexane
PFOB	Perfluorooctyl bromide
PFPE	Perfluoropolyether
PFTD-PEG	Perfluoro-tetradecanol Poly(ethylene glycol) amphiphile
PGA	Polyglycolide
PI	Propidium iodide
PK	Pharmacocinétique
PLA	Poly acide lactique
PLGA	Poly[lactide-co-glycolide]
PVP	Poly vinylpyrrolidone
RARE	Rapid Acquisition with Refocused Echoes
RES	Système réticulo-endothélial
RF	Radio Fréquence
RGD peptide	Arginine-Glycine-Acide aspartique peptide
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RTC	Reverse transport cholesterol
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SAR	Relation structure-activité
SAXS	Small angle X-rays scattering
SNR	Signal over noise ratio
SPIO	Ion super paramagnétique
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRB1	Récepteur scavenger de classe B, type 1
SVF	Sérum de veau foetal
t.a.	température ambiante
TEP-scan	Tomographie à émission de positons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
u.a.	unité arbitraire
UH	Unité Hounsfield
UV	Ultra-Violet
VLDL	Lipoprotéines de très basses densité

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été financés par le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives et réalisés à Saclay au sein du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage sous la direction du Dr. Eric Doris.

Depuis plusieurs années, les activités de recherche du laboratoire s'orientent vers la conception de nanoparticules, plus particulièrement des micelles, dans un but diagnostique et thérapeutique.

Ce manuscrit se divise en quatre parties.

Dans une première section, un état de l'art sur le développement de nanoparticules pour des applications en nanomédecine sera présenté.

Une seconde partie sera dédiée à l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de micelles polymérisées pour le ciblage passif et actif des acteurs du processus inflammatoire à l'origine de la formation de plaques d'athérome.

Dans une troisième partie, des micelles fluorées seront assemblées et valorisées pour le diagnostic *in vivo* de tumeurs par IRM ¹⁹F.

La dernière partie sera dédiée au développement de micelles fluorées encapsulant des nanoparticules d'or pour de l'imagerie par tomодensitométrie et pour de la radio-sensibilisation.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été valorisés par trois publications, une publiée dans *Nanoscale*, une soumise à *Nanoscale* et une en préparation.

Introduction générale : utilisation de micelles en nanomédecine

C'est en 1959 que Richard P. Feynman¹, évoque l'existence d'un « nanomonde ». Dans son discours *There's plenty of room at the bottom*², il invite la communauté scientifique à explorer l'univers de l'infiniment petit et à manipuler la matière atome par atome. Ce n'est cependant que quelques années plus tard que les recherches se sont intensifiées afin de faire émerger le potentiel des nanotechnologies, notamment en médecine. Cette nouvelle discipline qu'est la nanomédecine, offre de nombreuses perspectives pour le traitement et le diagnostic de certaines pathologies.

I - Les systèmes nanométriques pour le diagnostic et la thérapie

1- Nanomédecine et vectorisation

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la recherche médicale et la conception de molécules actives, certaines limitations demeurent. En effet, les molécules actives qui sont administrées aux patients, sont le plus souvent peu spécifiques d'une cible donnée ce qui limite leur efficacité vis-à-vis de la pathologie visée et induit des effets secondaires indésirables. La conséquence directe de ce manque de spécificité est l'administration de doses plus fortes à des fréquences plus importantes ce qui conduit à des effets indésirables. Outre le manque de spécificité d'action, l'hydrophobicité des principes actifs pharmaceutiques constitue également une limitation. Se pose alors le problème de la formulation de ces principes actifs afin d'en améliorer la compatibilité (solubilité/stabilité) en milieux biologiques.

Le recours aux nanotechnologies va permettre de contourner certaines de ces problématiques. Par exemple, l'utilisation de nanoparticules « transporteuses » (vecteurs) constitue une stratégie qui peut se révéler efficace. En effet, le vecteur de par ses propriétés physico-chimiques (taille, charges électrostatiques de surface, hydrophilie...) adaptées, doit permettre une prise en charge, une distribution et une élimination optimales de la molécule active. Le devenir de cette dernière est alors régi par le devenir du vecteur lui-même et ses interactions avec le milieu biologique. L'un des défis de la nanomédecine est également de comprendre la nature de ces interactions.

2- La vectorisation : définitions et optimisation du concept

Ce concept a été évoqué et introduit pour la première fois au début du XXème siècle par Paul Ehrlich (Prix Nobel de Médecine en 1908). En effet, il rêvait déjà d'une « solution miracle » afin de transporter un médicament de manière spécifique vers son site d'action.

¹ Prix Nobel de physique 1965

² Discours donné à l'occasion du congrès annuel de l'American Physical Society

Ce rêve est devenu réalité il y a plus de 40 ans, grâce au développement de liposomes par Bangham, initialement développés pour l'étude de la dynamique des membranes biologiques. Si la « nanomédecine » n'existait pas à cette période-là, c'est par cette découverte que Bangham introduisit la notion de vectorisation.³ Ces liposomes sont les premiers vecteurs, avec les nanocapsules et les nanosphères, à avoir été développés. Cependant, une fois injectés dans l'organisme, ces vecteurs sont reconnus comme corps étrangers et vont activer les mécanismes de défense de l'organisme. Ce système de défense fait intervenir une famille de protéines appelées opsonines, qui vont s'adsorber à la surface des vecteurs, facilitant leur reconnaissance et leur prise en charge par les macrophages (Figure 1). Une fois capturés par les macrophages, les vecteurs sont éliminés par le système réticulo-endothélial (RES) et se retrouvent, ainsi que leur contenu, dans des organes de dépuraction tels que le foie ou la rate.

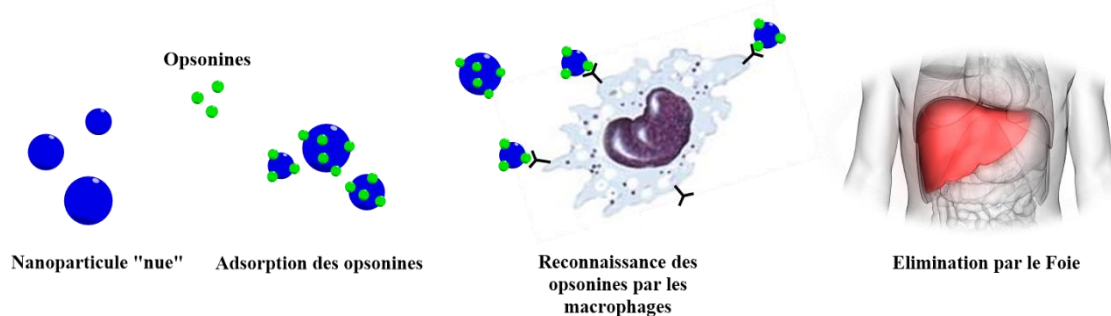


Figure 1 : Illustration du mécanisme d'élimination des nanoparticules.

Ce phénomène d'accumulation hépatique est particulièrement intéressant lorsque l'on souhaite améliorer l'efficacité de certains anticancéreux en ciblant le foie (cas des métastases hépatiques) et réduire leur toxicité pour d'autres organes.⁴

Cette première génération de vecteurs est donc caractérisée par :

- 1- Une opsonisation puis une reconnaissance par des macrophages
- 2- Une accumulation dans la rate et le foie

Cependant, l'élimination rapide des vecteurs par les macrophages peut diminuer l'effet pharmacologique du principe actif surtout si les foyers ciblés sont situés hors du RES. C'est la raison pour laquelle, plusieurs méthodes permettant de « masquer » les nanoparticules ont été développées. Parmi ces systèmes, certains bénéficient d'une modification au niveau de leur surface qui va empêcher la fixation des opsonines. C'est ce que nous allons développer dans la partie qui suit.

2.1- Vecteurs furtifs : Effet EPR et ciblage passif

De manière générale, l'architecture du vecteur peut être divisée en deux niveaux : le cœur et la surface du vecteur. Le cœur est utilisé pour la prise en charge de la molécule active, alors que la couronne périphérique est en interaction avec le milieu biologique environnant.

³ Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13*, 238-52.

⁴ Owens, D. E.; Peppas, N. A. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 93-102.

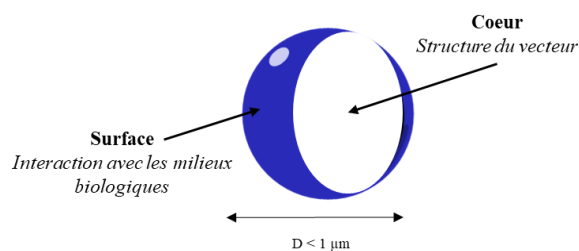


Figure 2 : Représentation schématique d'un vecteur nanométrique.

Bien qu'il n'y ait pas de méthodes génériques permettant de bloquer totalement le phénomène d'opsonisation, une chimie de surface adaptée peut néanmoins influencer de manière significative sur ce processus et accroître le temps de demi-vie plasmatique du vecteur. En effet, certaines observations montrent que l'opsonisation de nanoparticules hydrophobes est plus rapide que celle de particules hydrophiles.⁵ Un rapport entre la charge à la surface de la particule et l'opsonisation a également été démontré *in vitro*. En effet, des particules neutres ont un taux d'opsonisation beaucoup plus faible que des particules chargées.

Une méthode pour ralentir le phénomène d'opsonisation consiste donc à utiliser des groupements à la surface des particules afin de bloquer les interactions hydrophobes et électrostatiques qui aident les opsonines à se lier aux particules.⁴ Ces groupements sont généralement des polymères hydrophiles et flexibles, en particulier du poly(éthylène glycol) (PEG), qui vont donc agir comme des boucliers en bloquant la fixation des opsonines par des forces de répulsion stériques.^{6,7} D'autres polymères tels que les polysaccharides, le polyacrylamide ou le polysorbate ont également été décrits dans la littérature.

Avec une surface « optimisée », les vecteurs de petite taille vont pouvoir circuler de manière prolongée et diffuser vers des zones inflammatoires ou au niveau des tumeurs grâce à la perméabilité de l'endothélium vasculaire de ces tissus. En effet, dans le cas de tumeurs solides, c'est l'hyper-vascularisation des tumeurs et leur croissance rapide qui engendrent la formation d'espaces interstitiels entre les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, permettant la diffusion des nanoparticules des vaisseaux vers les tissus tumoraux. Ce phénomène d'extravasation est également associé à un drainage lymphatique défaillant, ce qui favorise l'accumulation des vecteurs dans les tissus tumoraux (Figure 3). Cet effet de perméabilité accrue et de rétention appelé EPR (Enhanced Permeability and Retention) permet l'accumulation par voie passive des nanoparticules et a conduit à l'émergence de systèmes nanoparticulaires pour la délivrance ciblée de principes actifs mais aussi pour le diagnostic de tumeurs solides.

⁵ Carrstensen, H.; Muller, R. H.; Muller, B. W. *Clinical Nutrition* **1992**, *11*, 289-297.

⁶ Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 403-419.

⁷ Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 149-158.

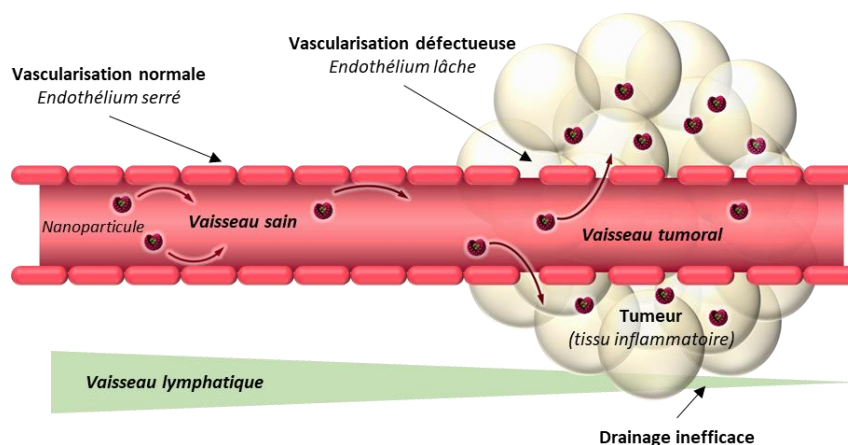


Figure 3 : Représentation schématique de l'effet EPR.

Cette nouvelle génération de vecteur est donc caractérisée par :

- 1- Des vecteurs furtifs non reconnus par les macrophages
- 2- Une circulation prolongée dans le sang
- 3- Une accumulation dans les tissus tumoraux et inflammatoires

Du fait de sa variabilité inter-espèces, l'effet EPR est controversé au sein de la communauté scientifique.⁸ Par ailleurs, ce type de ciblage ne permet pas une internalisation sélective au niveau des cellules atteintes mais une simple accumulation au niveau de la zone tissulaire ayant une forte perméabilité vasculaire. C'est pourquoi de nouveaux vecteurs bénéficiant d'un ciblage amélioré ont été développés.

2.2- Ligands de surface : reconnaissance cellulaire et ciblage actif

Le ciblage actif doit permettre aux vecteurs d'interagir spécifiquement avec les cellules malades. Pour ce faire, la couronne périphérique des vecteurs est fonctionnalisée à l'aide de ligands capables de reconnaître spécifiquement les récepteurs exprimés à la surface des cellules ciblées. Ce type de reconnaissance permet au vecteur (et donc au principe actif) d'être guidé jusqu'à sa cible cellulaire et d'être internalisé par endocytose. Lorsque le vecteur se trouve dans l'endosome, le ligand va se dissocier du récepteur qui sera recyclé pour retrouver sa fonction principale à la surface de la membrane cellulaire (Figure 4). Certains récepteurs membranaires sont parfaitement identifiés et la structure des ligands associés a été déterminée. Par exemple, l'acide folique est le ligand du récepteur qui porte le même nom et qui est surexprimé de manière très sélective à la surface de certaines lignées cellulaires cancéreuses (cellules Hela du col de l'utérus ou cellules Ov-3 de l'ovaire, par exemple).

⁸ Danhier, F. *Journal of Controlled Release* **2016**, *244*, 108-121.

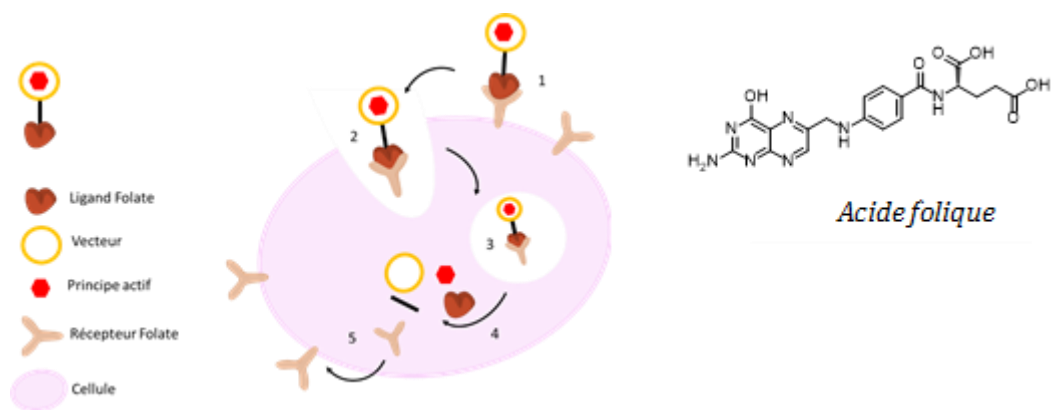


Figure 4 : Représentation schématique du ciblage actif d'un vecteur fonctionnalisé par de l'acide folique et de son internalisation au niveau cellulaire : 1) reconnaissance de l'acide folique par son récepteur, 2) invagination de la membrane, 3) endocytose, 4) libération du principe actif dans la cellule, 5) recyclage du récepteur.

Outre l'acide folique, il existe une multitude de ligands pour le ciblage de cellules tumorales,⁹

- La biotine ou vitamine B₈, peut être utilisée comme agent de ciblage. En effet, les cellules cancéreuses consomment beaucoup plus de biotine que des cellules saines, du fait de leur prolifération rapide. Elles surexpriment donc plus de récepteurs à la vitamine B₈ que des cellules saines.¹⁰
- L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel capable de reconnaître spécifiquement les récepteurs à la glycoprotéine CD44 (surexprimés au niveau de cellules cancéreuses). Ce ligand peut donc être utilisé pour fonctionnaliser des vecteurs pour du ciblage actif.¹¹
- Le peptide RGD est un peptide de 3 acides aminés (Arginine-Glycine-Acide aspartique). Des récepteurs transmembranaires appelés intégrines, et plus particulièrement les intégrines $\alpha\beta_3$, sont surexprimés au niveau des cellules cancéreuses et sont impliqués dans l'angiogenèse. Le peptide RGD est capable de reconnaître spécifiquement ces intégrines c'est la raison pour laquelle il a été fréquemment utilisé pour du ciblage actif.¹²
- Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés comme agents de ciblage car ils sont capables d'interagir avec des antigènes ou avec des récepteurs bien spécifiques qui sont surexprimés au niveau de cellules cancéreuses. Par exemple, les récepteurs R-EGF, récepteurs de facteur de croissance épidermique, sont surexprimés dans les cancers de la prostate, des ovaires ou des poumons.¹³

Même si le ciblage actif (des nanovecteurs) est principalement exploité en oncologie, ces systèmes peuvent être appliqués à d'autres types de pathologies. Il a par exemple été possible de fonctionnaliser des liposomes chargés en amphotéricine B à l'aide d'anticorps monoclonaux

⁹ Pérez-Herrero, E.; Fernandez-Medarde, A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *93*, 52-79.

¹⁰ Na, K.; Bum Lee, T.; Park, K.-H.; Shin, E.-K.; Lee, Y.-B.; Choi, H.-K. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *18*, 165-173.

¹¹ Choi, K. Y.; Saravanakumar, G.; Park, J. H.; Park, K. *Colloids and Surfaces* **2012**, *99*, 82-94.

¹² Brooks, P. C.; Montgomery, A. M. P.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresch, D. A. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.

¹³ Weiner, L. M.; Dhodapkar, M. V.; Ferrone, S. *The Lancet* **2009**, *373*, 1033-1040.

(anticorps 3A) capables de reconnaître des glycoprotéines exprimées au niveau de l'endothélium pulmonaire, cela dans le but de traiter des aspergilloses pulmonaires.¹⁴

Les vecteurs doivent donc répondre à la fois aux contraintes apportées par la vectorisation et le ciblage tout en conservant leurs propriétés de furtivité (Figure 5).

Pour résumer, un vecteur, du fait de ses nombreuses interactions avec le milieu biologique, doit respecter un certain nombre de critères et doit :

- 1) être biocompatible et/ou biodégradable
- 2) posséder des propriétés de furtivité, afin d'échapper au système immunitaire et éviter sa capture par les macrophages
- 3) faciliter le transport de la molécule active, la protéger dans des conditions physiologiques et faciliter son adressage vers sa cible
- 4) libérer la molécule active au niveau de sa cible de manière efficace.

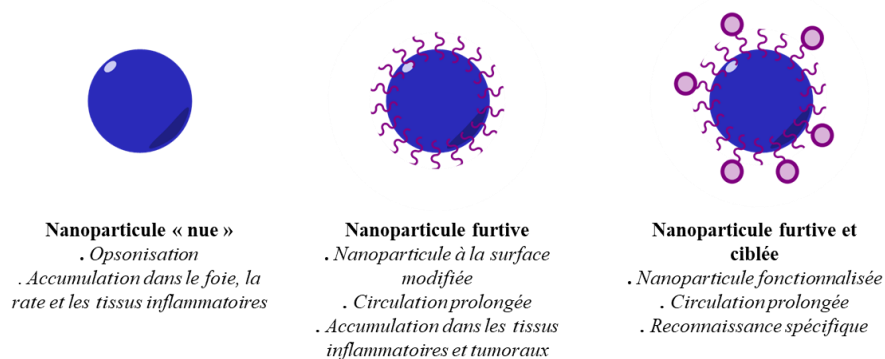


Figure 5 : Représentation schématique des différentes générations de vecteurs utilisés en nanomédecine.

II- Etat de l'art sur le développement de vecteurs nanoparticulaires

En s'appuyant sur les différents critères qu'impose la vectorisation, une multitude de nanoparticules a été envisagée et développée. Ces nanoparticules peuvent être catégorisées en deux grandes familles en fonction de leur nature chimique. On retrouve les nanoparticules organiques (lipides, polymères, macromolécules, nanotubes de carbone) et les nanoparticules inorganiques (quantum dots, nanoparticules magnétiques, silice). Pour la suite de ce rapport, nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanoparticules organiques.

¹⁴ Otsubo, T.; Maruyama, K.; Maesaki, S.; Miyazaki, Y.; Tanaka, E.; Takizawa, T.; Moribe, K.; Tomono, K.; Tashiro, T.; Kohno, S. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1998**, *42*, 40-44.

1- Composition des nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques doivent posséder des propriétés de biodégradabilité et/ou de biocompatibilité pour pouvoir être administrées chez l'Homme ou l'animal. En effet, elles ne doivent pas persister sur le long terme dans l'organisme et induire des réactions toxiques ou inflammatoires. C'est la raison pour laquelle un nombre limité de composants organiques ont été utilisés jusqu'à présent pour l'assemblage de vecteurs nanoparticulaires, les lipides et les polymères étant les constituants majoritaires.

Les composés lipidiques sont particulièrement intéressants puisqu'ils font partie intégrante des membranes cellulaires. Les lipides sont par ailleurs les premières molécules à avoir été utilisées sous forme de liposomes pour la vectorisation. Les lipides dont les acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, sont généralement utilisés comme excipients dans la formulation de principe actif. Un exemple de formulation utilisant l'huile d'arachide, principalement composée d'acide oléique et d'acide linoléique, a par exemple été utilisée pour l'administration par voie intra-péritonéale et sous-cutanée de Tamoxifène.¹⁵

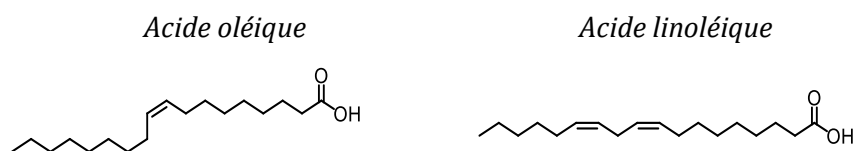


Figure 6 : Structures chimiques des composés qui entrent dans la composition de l'huile d'arachide.

Outre leur utilisation en tant qu'excipients, les lipides peuvent également être utilisés en tant que constituants de vecteurs, sous forme de liposomes, nanosphères ou nanocapsules et parfois en association avec des polymères afin d'améliorer leur stabilité. En effet, certains polymères, qu'ils soient naturels ou synthétiques, entrent dans la composition de vecteurs organiques ce qui permet d'accéder à une grande diversité structurale. Les polymères naturels (protéines, polysaccharides...) ont d'abord été utilisés en nanomédecine comme par exemple pour le cas de l'Abraxane® qui a été commercialisé aux USA en 2005 pour le traitement du cancer du sein. Cette formulation est basée sur des nanosphères d'albumine (polymères d'acides aminés) et prend en charge un anticancéreux, le paclitaxel.¹⁶ Des polymères de synthèses ont par la suite été utilisés, mais ne répondent pas forcément aux critères de biocompatibilité ou de biodégradabilité d'un vecteur. En effet, certains polymères ne sont que partiellement dégradables voire non dégradés, comme le poly(éthylène glycol) mais vont cependant fournir des fragments solubles en milieu biologique pour être facilement excrétés.¹⁷

Aujourd'hui, la plupart des nanoparticules sont à base de copolymères et sont composés de polymères dits « structurels » et de polymères dits « fonctionnels » de manière à améliorer la stabilité de la formulation. Les polymères structurels, tels que le poly(acide lactique) (PLA) ou le

¹⁵ Suarez-Martinez, A. D.; Peirce, S. M.; Isakson, B. E.; Nice, M.; Wang, J.; Lounsbury, K. M.; Scallan, J. P.; Murfee, W. L. *Microcirculation* **2018**, *25*, e12502.

¹⁶ Henderson, I. C.; Bhatia, V. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2007**, *7*, 919-943.

¹⁷ Torchilin, V. P. *Pharmaceutical Research* **2006**, *24*, 1.

poly(acide glycolique) (PGA), et les copolymères poly[lactide-co-glycolide] (PLGA), vont définir la morphologie du vecteur alors que les polymères fonctionnels, sont utilisés pour contrôler les interactions avec le milieu environnant. En effet, en fonctionnalisant un polymère hydrophobe avec du PEG, on va chercher à améliorer le temps de circulation des vecteurs afin de minimiser les interactions avec les protéines plasmatiques.

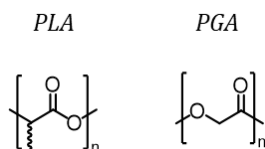


Figure 7 : Structure des polymères PLA et PGA.

Les recherches s'orientent de plus en plus vers le développement de polymères biodégradables qui sont sensibles à des stimulus environnementaux : variation de pH, température, concentrations en ions... Par exemple le poly(acrylamide-*n*-isopropyle) est connu pour être sensible à des modifications de températures. Le polymère sera alors dégradé sous l'effet d'une variation de température, permettant ainsi la libération du principe actif.

Selon leur nature et le type d'interactions entre polymères, il est également possible d'obtenir des auto-assemblages aux morphologies différentes : des nanocapsules, des nanosphères, des micelles de polymères. L'obtention de telles structures est détaillée ci-après.

2- Nanoparticules : outils de vectorisation

Compte tenu des contraintes liés à la vectorisation, un certain nombre de vecteurs ont été conçus afin d'améliorer les propriétés *in vivo* d'actifs thérapeutiques. Parmi ces vecteurs, nous pouvons citer les liposomes, les nanocapsules, les nanosphères, les nanoparticules de carbone (nanotubes, graphène, fullerène...), les dendrimères et les micelles. Chacun de ces systèmes possède des avantages et des inconvénients qui seront détaillés dans les paragraphes qui suivent.

2.1- Les liposomes

Les liposomes sont généralement constitués d'un auto-assemblage de lipides (phospholipides), parfois associés à des polymères. Les phospholipides possèdent un caractère amphiphile avec une partie lipophile (longue chaînes grasses) et une partie hydrophile. Ils vont former une bicouche lipidique pour finalement s'auto-assembler sous forme de vésicule (Figure 8). C'est sous l'effet de forces d'attraction/répulsion des parties hydrophiles/hydrophobes que s'auto-assemblent les phospholipides. Le cœur du liposome renferme donc un cœur aqueux permettant l'encapsulation de principes actifs hydrophiles. Des molécules hydrophobes peuvent également être transportées en se logeant dans la partie hydrophobe que forme la bicouche de phospholipides. L'introduction de PEG ou de chitosane en surface des liposomes, permet d'améliorer le temps de résidence *in vivo* des vecteurs.

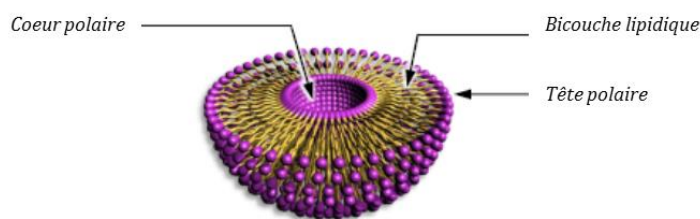


Figure 8 : Représentation schématique d'un liposome.

Le Doxil® est la première formulation liposomale à avoir été approuvée par la FDA en 1995. Composé du phospholipide PEG-DSPE ((poly éthylèneglycol) distearoylphosphatidylethanolamine), mais aussi de phosphatidylcholine et de cholestérol (dans un ratio molaire 5 :55 :40) ce liposome permet de prendre en charge la doxorubicine qui est un anti-cancéreux utilisé pour le traitement du sarcome de Kaposi.¹⁸ D'autres exemples de liposomes actuellement sur le marché sont présentés dans le Tableau 1.

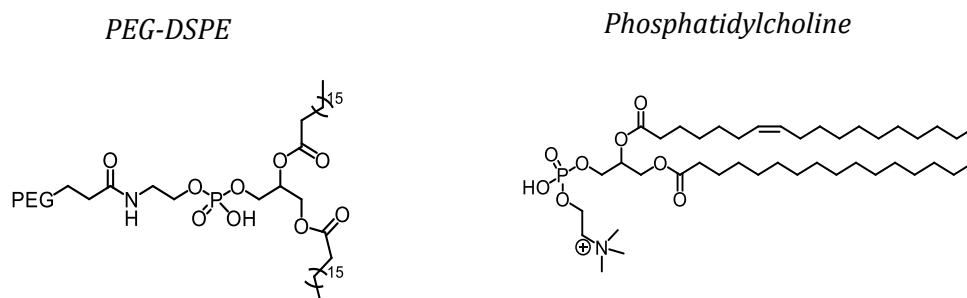


Figure 9 : Structures du PEG-DSPE et de la phosphatidylcholine qui entrent dans la composition du liposome utilisé pour le traitement du sarcome de Kaposi.

Tableau 1 : Exemples de liposomes utilisés comme vecteurs de médicaments actuellement sur le marché.

Nom Commercial	Composition Lipidique	Principe actif véhiculé	Indications thérapeutiques
Myocet®	EPC et cholestérol	Doxorubicine	Métastases du cancer du sein
DaunoXome®	DSPC et Cholestérol	Daunorubicin	Tumeurs du sang
Ambisome®	HSPC, DSPG, cholestérol et amphotericin B	Amphotericin B	Infections fongiques

EPC : egg phosphatidylcholine, DSPC : distearoylphosphatidylcholine, DOPC : dioleoylphosphatidylcholine, DOPE : dioleoylphosphatidylethanolamine, HSPC : hydrogenated soy phosphatidylcholine, DSPG : distearoylphosphatidylglycerol.

L'obtention de liposomes se fait selon différents protocoles en fonction de la taille souhaitée. Par exemple, les liposomes multi-lamellaires (MLV) sont constitués de plusieurs bicouches lipidiques. Ils possèdent des tailles variables (entre 500 et 5000 nm) et la méthode traditionnelle

¹⁸ Abraham, S. A.; Waterhouse, D. N.; Mayer, L. D.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Bally, M. B. In *Liposomes*; 391 ed.; Academic Press, 2005.

permettant de les obtenir consiste à hydrater un film lipidique, préalablement formé par évaporation d'une solution organique. Cette séquence doit s'effectuer dans des conditions de températures particulières, dépendantes des lipides utilisés (température de transition de phase). Afin d'obtenir des liposomes uni-lamellaires, des traitements physiques supplémentaires sont nécessaires (passage aux ultrasons d'une solution de MLV).¹⁹ Sous certaines conditions, les lipides peuvent également conduire à la formation de nanosphères et de nanocapsules.

2.2- Les nanocapsules et les nanosphères

Les nanosphères et les nanocapsules peuvent être composées de lipides mais le plus souvent de polymères et sont obtenues sous contrôle précis de la température et de la pression (systèmes non auto-assemblés).

Les nanocapsules sont des systèmes réservoirs : elles sont caractérisées par l'existence d'un cœur huileux ou aqueux (Figure 10). Les nanosphères, à la différence des nanocapsules, ne possèdent pas de cœur liquide et vont contenir la matière active sous forme dispersée au sein d'une matrice polymères.²⁰

Plusieurs procédés de fabrication existent (mécaniques, chimiques, physico-chimiques) et le choix de la méthode dépend de l'application visée, des constituants qui les composent ou encore de la molécule à encapsuler. Parmi ces méthodes, une technique de formation de nanocapsules de polymères repose sur une réaction de polymérisation interfaciale mettant en jeu deux monomères, l'un étant hydrosoluble. La réaction de polycondensation a lieu à l'interface eau/huile et permet finalement l'encapsulation de composés actifs. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite des étapes de purifications lourdes. C'est pourquoi d'autres méthodes peuvent être utilisées, comme la nanoprecipitation, utilisant des polymères préformés.

L'obtention de nanocapsules lipidiques repose quant à elle sur la stabilisation de gouttelettes issues de la dispersion d'une phase huileuse dans une phase aqueuse (nanoémulsion) par l'intermédiaire de lipides jouant le rôle de tensio-actifs. Après mélange des différents constituants, l'émulsion est chauffée à une certaine température (température de transition de phase) pour être ensuite refroidie très brutalement par ajout d'eau froide.²¹

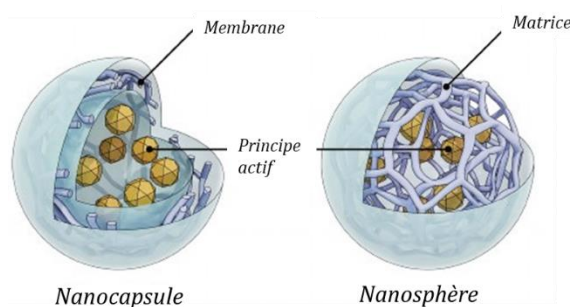


Figure 10 : Représentation d'une nanosphère et d'une nanocapsule.

¹⁹ Cullis, P. R.; Mayer, L. D.; Bally, M. B.; Madden, T. D.; Hope, M. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1989**, *3*, 267-282.

²⁰ Muller, R. H.; Mader, K.; Gohla, S. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, 161-177.

²¹ Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99-134.

De tels vecteurs ont par exemple été utilisés pour de l'imagerie *in vivo* par IRM (Imagerie par résonance magnétique) du fluor. Des nanocapsules de 120 nm à base de copolymères PLGA-PEG renfermant un cœur liquide d'une molécule de bromure de perfluorooctyle, ont permis de mettre en évidence une accumulation des nanoparticules au niveau des tissus tumoraux par effet EPR, 7 h post-injection. Cela a été possible à l'aide de la molécule perfluorée utilisée comme sonde IRM du fluor mais aussi grâce à la présence de PEG permettant d'améliorer significativement le temps de résidence des nanoparticules dans le sang tout en favorisant l'effet EPR.²²

2.3- Les nanoparticules de carbone

Les fullerènes, le graphène et les nanotubes de carbone sont les principales catégories de nanoparticules à base de carbone que l'on retrouve en nanomédecine notamment parce qu'elles possèdent des morphologies et propriétés physico-chimiques uniques. Avec une très grande surface spécifique, ces objets sont capables de prendre en charge une quantité importante de molécules actives.²³ Par ailleurs, il est possible de fonctionnaliser la surface de ces matériaux ce qui permet d'accéder à des plateformes multivalentes pour des applications biomédicales.²⁴

Du fait de leur composition entièrement carbonée, ces objets sont difficilement dispersables dans l'eau. Pour contourner cette limitation, une modification de leur surface est nécessaire par adsorption, interactions électrostatiques ou en introduisant des groupements carboxyliques de surface par oxydation. La forme oxydée du graphène, permet par exemple d'obtenir une forme hydrosoluble, facilement fonctionnalisable et biocompatible.²⁵

La surface des nanoparticules carbonées peut être également fonctionnalisée par des transformations chimiques comme la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire. Des nanotubes de carbone ont été ainsi fonctionnalisés pour y accrocher un anti-cancéreux (taxoïde) et la biotine, permettant un ciblage des cellules cancéreuses (Figure 11). Ces nanotubes incorporent également un lien clivable qui permettra le relargage du principe actif après internalisation cellulaire et interaction avec du glutathion (GSH - tri-peptide réducteur présent dans le réticulum endoplasmique qui a la particularité de cliver les ponts disulfures).²⁶

²² Diou, O.; Tsapis, N.; Giraudeau, C. I.; Valette, J.; Gueutin, C.; Bourasset, F.; Zanna, S.; Vauthier, C.; Fattal, E. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5593-5602.

²³ Vashist, S. K.; Zheng, D.; Pastorin, G.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F.-S. *Carbon* **2011**, *49*, 4077-4097.

²⁴ Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 5366-5397.

²⁵ Kurapati, R.; Bonachera, F.; Russier, J.; Sureshabu, A. R.; Ménard-Moyon, C.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *2D Materials* **2017**, *5*, 015020.

²⁶ Chen, J.; Chen, S.; Zhao, X.; Kuznetsova, L. V.; Wong, S. S.; Ojima, I. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 16778-16785.

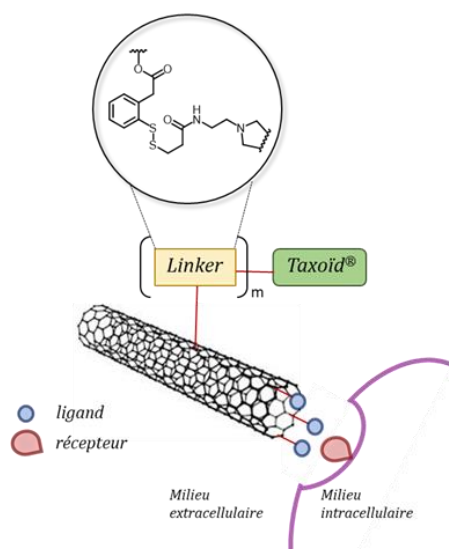


Figure 11 : Exemple de fonctionnalisation d'un nanotube de carbone avant internalisation cellulaire pour la libération contrôlée d'un anticancéreux.²⁶

A l'heure actuelle, de nombreuses recherches s'orientent sur la biocompatibilité et la toxicité *in vivo* et *in vitro* des nanomatériaux à base de carbone. Ces nanoparticules exercent des degrés de toxicité différents en fonction de leur voie d'administration, des modèles utilisés, et du type de fonctionnalisation de surface. Par ailleurs, il est difficile de contrôler la taille des nanoparticules ce qui complique l'interprétation des données de toxicité. Cependant, ces matériaux peuvent être dégradés par des systèmes biologiques. Il a par exemple été montré en 2008 que la peroxidase du raifort (HRP pour horseradish peroxidase) pouvait dégrader les nanotube de carbone en 12 semaines, en présence de peroxyde d'hydrogène.²⁷ Une équipe s'est par la suite inspirée de ces travaux pour modifier chimiquement la structure du graphène en y incorporant des molécules spécifiques en surface permettant d'activer leur dégradation enzymatique.²⁵ Il est donc possible que d'autres peroxydases (comme la myéloperoxidase) puisse agir de cette manière *in vivo*.

2.4- Les systèmes mono-macromoléculaires

Les dendrimères sont des macromolécules composées d'unités organiques hyperbranchées. Ces systèmes de vecteurs sont particuliers puisqu'ils sont composés d'une seule macromolécule à la différence des liposomes, nanocapsules ou micelles. Ils sont synthétisés de manière séquentielle, par addition de monomères dans les trois dimensions de l'espace. En fonction de la nature des monomères ajoutés, le dendrimère possédera un caractère plutôt hydrophobe ou hydrophile. Il est donc possible d'envisager la synthèse d'un dendrimère possédant un cœur hydrophobe favorisant les interactions avec des principes actifs hydrophobes. La surface peut être, par ailleurs, très facilement fonctionnalisée avec des ligands pour du ciblage actif (Figure 12).

Deux stratégies de synthèse peuvent être envisagée : une stratégie divergente qui consiste à élaborer la synthèse à partir du cœur du dendrimère et une stratégie convergente qui permet de former le dendrimère depuis la périphérie vers le cœur. La synthèse divergente permet d'obtenir des dendrimères de grandes tailles mais la fonctionnalisation des branches peut être difficile et incomplète.

²⁷ Allen, B. L.; Kichambare, P. D.; Gou, P.; Vlasova, I. I.; Kapralov, A. A.; Konduru, N.; Kagan, V. E.; Star, A. *Nano Letters* **2008**, *8*, 3899-3903.

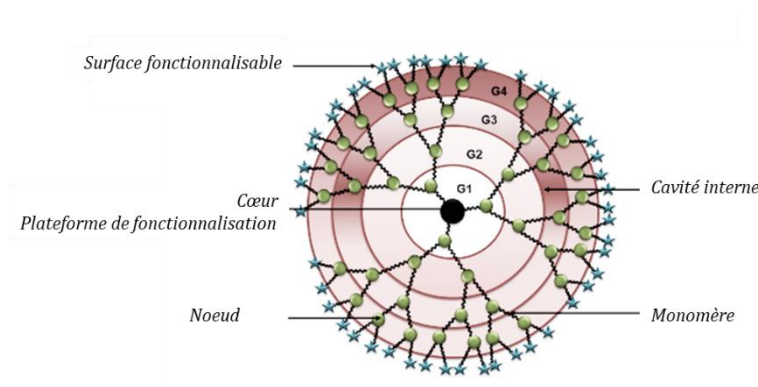


Figure 12 : Représentation schématique d'un dendrimère.

La toxicité *in vitro* et *in vivo* des dendrimères dépend de leur composition de surface. Des dendrimères chargés négativement ou neutres semblent avoir des toxicités moindres par rapport à des dendrimères cationiques.²⁸ Une fonctionnalisation des dendrimères par du PEG, de la pyrrolidone ou d'autres composés biocompatibles, permet également de réduire significativement la cytotoxicité.²⁹

Les capacités de chargement sont généralement forte avec, par exemple, 78 molécules d'ibuprofène qui ont pu être associées à un dendrimère de Poly(amidoamine) (PAMAM) par interactions ioniques.³⁰

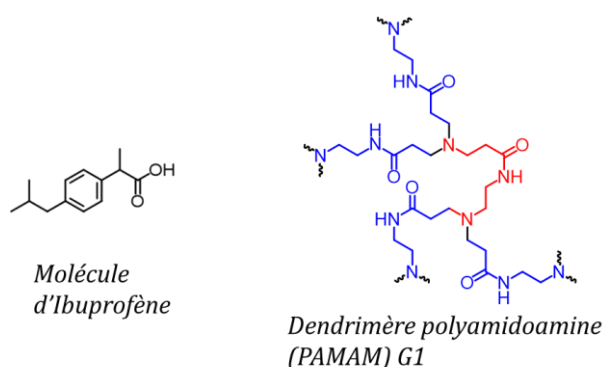


Figure 13 : Structure de l'ibuprofène et d'une partie du dendrimère PAMAM.

Une autre étude a démontré l'efficacité de la prise en charge et de la délivrance contrôlée, au niveau de cellules cancéreuses, du *cis*-platine par des dendrimères de PAMAM. Le dendrimère chargé a permis de réduire la toxicité parasite du *cis*-platine tout en maintenant une activité antiproliférative des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*.³¹

²⁸ Malik, N.; Wiwattanapatee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 133-148.

²⁹ Ciolkowski, M.; Petersen, J. F.; Ficker, M.; Janaszewska, A.; Christensen, J. r. B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, *8*, 815-817.

³⁰ Kolhe, P.; Misra, E.; Kannan, R. M.; Kannan, S.; Lieh-Lai, M. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *259*, 143-160.

³¹ Tran, N. Q.; Nguyen, C. K.; Nguyen, T. P. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, *4*, 045013.

2.5- Les micelles

Les micelles constituent une autre catégorie de vecteurs potentiels. Découvertes en 1910, les micelles sont des auto-assemblages d'amphiphiles, constitués d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Alors qu'en milieu aqueux, la partie hydrophile est en contact avec le milieu environnant, en milieu organique, c'est la composante hydrophobe qui est en contact avec le milieu extérieur, il s'agit alors de micelles dites inverses. En nanomédecine, seules les micelles «conventionnelles» sont exploitées.

Les micelles peuvent être composées de polymères (micelles polymériques) mais également de lipides, plus particulièrement de phospholipides. Dans ce cas, la stabilité de l'auto-assemblage est améliorée par la présence de deux chaînes d'acides gras permettant d'augmenter les interactions hydrophobes du cœur de la micelle. Les phospholipides sont associés, le plus souvent, à des polymères hydrophiles qui vont permettre d'améliorer la solubilité et la stabilité de l'auto-assemblage.

Les micelles polymériques sont assemblées à partir de copolymères à blocs. Un bloc est un enchaînement d'unités monomériques et chaque bloc va présenter une affinité différente pour le milieu environnant : en général les amphiphiles de copolymères contiennent un bloc A hydrophobe et un bloc B hydrophile. Les blocs peuvent s'enchaîner de manière très variables, généralement de types A-B ou A-B-A. Les micelles de polymères ont l'avantage d'avoir des tailles modulables et des surfaces facilement modifiables. En général, les blocs hydrophiles sont composés de PEG avec des poids moléculaires qui peuvent varier de 1 à 15 kDa ou encore d'alcool polyvinylique et de poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP). Les blocs hydrophobes sont plus nombreux et variés. On retrouve principalement de l'acide polylactique (PLA) et la caprolactone.

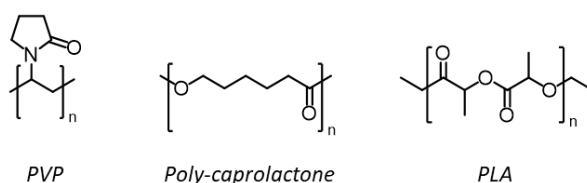


Figure 14 : Structures chimiques de différents polymères utilisés pour former des amphiphiles de copolymères

De nombreuses combinaisons sont possibles pour la préparation de micelles polymériques. Des polymères Poly(styrène)-b-PEG ou encore Poly(ϵ -caprolactone)-b-PEG-b-poly(ϵ -caprolactone) peuvent être utilisés pour former des micelles de copolymères et sont obtenues suite à la solubilisation des blocs dans un solvant approprié et à une concentration supérieure à la CMC (concentration micellaire critique). Un échange de solvant par dialyse est ensuite nécessaire afin d'obtenir des micelles sphériques de tailles bien définies en phase aqueuse.³² Des exemples de micelles de copolymères fonctionnalisées à l'aide de ligands et utilisées dans des études précliniques de thérapie anticancéreuse sont donnés dans le Tableau 2.

³² O'Reilly, R. K.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, 1068-1083.

Tableau 2 : Micelles de copolymères actuellement en étude pré-clinique. PG : poly(L-Acide glutamique), PCL : poly(ϵ -caprolactone), PLGA : poly(lactide-co-glycolide).

Copolymères	Principe actif	Ligand	Cible
PEG-b-PG ³³	Doxorubicine	mAb C225	Récepteur EGF
PEG-b-PCL ³⁴	Doxorubicine	Ligand $\alpha_v\beta_3$	Intégrine $\alpha_v\beta_3$
PLGA-b-PEG ³⁵	Doxorubicine	Folate	Récepteur folate
mPEG-b-PCL ³⁶	Paclitaxel	Folate	Récepteur folate

Les micelles de copolymères sont donc particulièrement utilisées de nos jours pour la formulation de principes actifs. Elles offrent certains avantages clés, notamment une taille réduite (pour une diffusion plus profonde dans les tissus cibles), la modularité, un assemblage simple et une capacité de charge élevée. Nous allons maintenant voir quelles sont les règles et propriétés physico-chimiques qui sont à l'origine de ces morphologies ordonnées et variées afin d'appréhender la problématique du projet de recherche.

III- Auto-assemblage d'amphiphiles et formation de micelles

Les amphiphiles sont des molécules synthétiques ou naturelles qui ont la capacité de s'auto-assembler en une grande variété de structures : des micelles, des liposomes, des vésicules... C'est l'incompatibilité thermodynamique entre les différents blocs (hydrophile/lipophile) qui est à l'origine d'une organisation spatiale ordonnée à l'échelle nanométrique.

1- Interactions entre auto-assemblages

Les amphiphiles sont des composés qui possèdent à la fois un bloc hydrophile et un bloc lipophile. De manière générale, le bloc lipophile, que l'on nomme également « queue », est composé d'une longue chaîne hydrocarbonée (saturée ou insaturée), alors que la « tête » hydrophile peut être ionique ou neutre. On retrouve par exemple des amphiphiles non ioniques composés d'une chaîne oxyde de PEG en tant que tête hydrophile et d'une longue chaîne alkyle comme queue hydrophobe. Les amphiphiles ioniques sont souvent utilisés comme détergents ou savons et sont généralement anioniques avec des têtes polaires chargées négativement (carboxylate, sulfate, sulfonate...) et des contre-ions chargés positivement (ions sodium, potassium, ammonium...). Les structures des amphiphiles les plus communs sont représentées dans la Figure 15. On retrouve également des amphiphiles zwitterioniques où la tête polaire

³³ Vega, J.; Ke, S.; Fan, Z.; Wallace, S.; Charsangavej, C.; Li, C. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 826-832.

³⁴ Nasongkla, N.; Shuai, X.; Ai, H.; Weinberg, B. D.; Pink, J.; Boothman, D. A.; Gao, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 6323-6327.

³⁵ Yoo, H. S.; Park, T. G. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96*, 273-283.

³⁶ Park, E. K.; Lee, S. B.; Lee, Y. M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1053-1061.

possède à la fois une charge positive et négative. C'est par exemple le cas du phospholipide phosphatidyl choline.³⁷

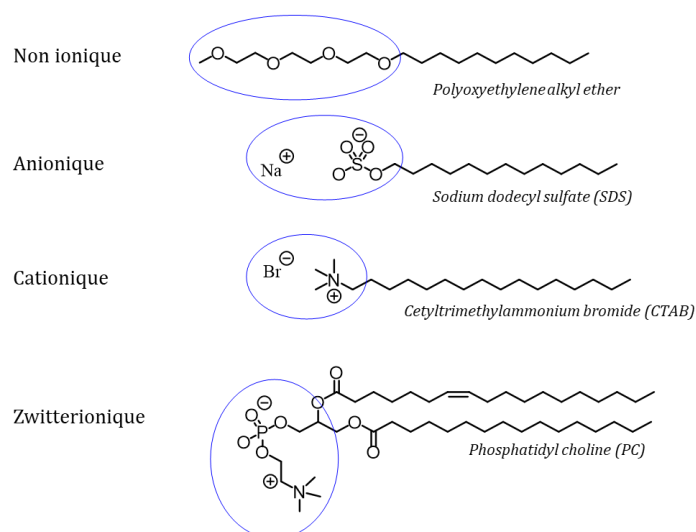


Figure 15 : Structures des amphiphiles les plus communs.

La tête polaire permet d'interagir avec l'eau et donc de solubiliser la molécule amphiphile. Le bloc lipophile va quant à lui se mettre à l'interface : soit dans l'air soit dans un liquide non polaire ou simplement être replié sur lui-même. Cela va donc modifier la tension de surface existante, c'est notamment pour cela que l'on appelle ces composés des tensio-actifs.

Les amphiphiles sont soumis à un certain nombre de forces et d'interactions faibles. Cependant la multitude d'interactions faibles va produire un effet coopératif permettant de stabiliser les auto-assemblages et de maintenir les amphiphiles ensemble en solution. Les principales interactions faibles (non covalentes) qui sont impliquées dans le phénomène d'auto-assemblage d'amphiphiles sont :

- Les liaisons hydrogène : suffisamment fortes pour lier certaines molécules entre elles mais faibles pour être cassés dans les cellules vivantes lorsque cela est nécessaire
- Les effets hydrophobes : vont réguler la tendance qu'ont les molécules hydrophobes à s'auto-agréger
- Les interactions électrostatiques
- Les forces de van der Waals

Ces forces, qui sont largement moins intenses que des liaisons covalentes (400 kJ mol^{-1}) lorsqu'elles sont considérées individuellement, peuvent varier de 5 kJ mol^{-1} , pour les forces de van der Waals, à 120 kJ mol^{-1} pour certaines liaisons hydrogènes. Cela rend les structures des auto-assemblages plus flexibles et mobiles leur permettant d'une part, de résister à des perturbations mineures mais aussi, de préserver la réversibilité de la structure.

2- Structures des auto-assemblages : concepts historiques

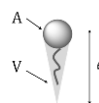
La morphologie des auto-assemblages dépend d'un certain nombre de paramètres comme la forme et la nature chimique des amphiphiles qui les constituent.

³⁷ Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazu, S.; Calandra, P. *Advances in Condensed Matter Physics* **2015**.

C'est en 1954 que Griffin suggère une méthode afin de connaître le caractère plutôt hydrophile ou lipophile d'un amphiphile : c'est ce que l'on appelle la balance hydrophile-lipophile (*HBL*). C'est à l'aide d'une équation mathématique qui prend en compte la masse molaire de la partie hydrophobe ainsi que la masse molaire totale du tensio-actif, que cette méthode nous permet de connaître la solubilité globale du complexe ou encore l'affinité du tensio-actif pour certains solvants.³⁸

Ce concept a évolué dans les années 60. En effet le *HBL* ne permettait pas de relier directement la structure chimique des tensio-actifs avec la structure des auto-assemblages. C'est Israelachvili qui définit, plus tard, une équation mathématique selon laquelle il serait possible de prédire la structure de la nanoparticule à partir d'un paramètre d'assemblage (*P*)³⁹. Cette équation fait intervenir *V* le volume occupé par la chaîne hydrophobe, *A* la surface de la tête polaire et *l* la longueur de la chaîne.

$$P = \frac{V}{A \cdot l}$$



En fonction de la valeur de *P*, les nanoparticules peuvent être sphériques, cylindriques ou lamellaires. Quelques paramètres peuvent néanmoins avoir une influence sur la valeur de *P* comme la température, le nombre de chaînes hydrophobes ou la salinité de la phase aqueuse. Un résumé des structures des agrégats qui peuvent être prédits sont présentés en Figure 16. Ces concepts restent très théoriques et ne sont que très rarement utilisés en formulation.

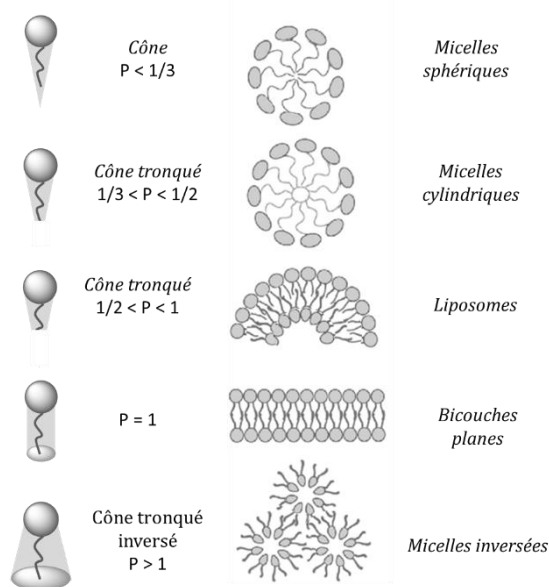


Figure 16 : Résumé des structures obtenues en fonction du *P* calculé.

Outre le paramètre *P*, d'autres facteurs sont déterminants dans la formation d'auto-assemblages. Dans le cadre de cette thèse, nous allons plus particulièrement nous intéresser à la formation de micelles qui sont des assemblages sphériques d'amphiphiles présentant une surface

³⁸ Griffin, W. C. *Journal of Cosmetic Science* **1949**, 1, 311-326.

³⁹ Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc.* **1976**, 72, 1525-1568.

hydrophile, assurant l'interface avec le milieu aqueux, et un cœur hydrophobe qui peut servir de réservoir pour le transport de molécules d'intérêt thérapeutique. Un des paramètres important dans la formation de telles structures supramoléculaire est la concentration micellaire critique.

3- Concentration micellaire critique

La formation d'auto-assemblages ne peut s'effectuer que sous certaines conditions. La concentration micellaire critique (CMC) peut être utilisée afin d'obtenir des informations sur les paramètres thermodynamiques de formation des auto-assemblages⁴⁰. En d'autres termes, elle permet d'accéder à la concentration à partir de laquelle les amphiphiles s'auto-assemblent afin de former des micelles. En dessous de cette concentration, les amphiphiles sont libres en solution et se retrouvent principalement à l'interface (eau/air par exemple). Lorsque l'on augmente la quantité d'amphiphiles, la concentration augmente jusqu'à atteindre une valeur limite que l'on appelle CMC. A partir de cette concentration, les amphiphiles ajoutés vont former des « agrégats ».

Certains paramètres peuvent influencer cette CMC comme par exemple la longueur de la queue lipophile : en effet, plus la chaîne est grande, plus la CMC sera faible. La température est également importante : en dessous d'une certaine température (point de Krafft), les molécules précipitent au lieu de former des nanoparticules.

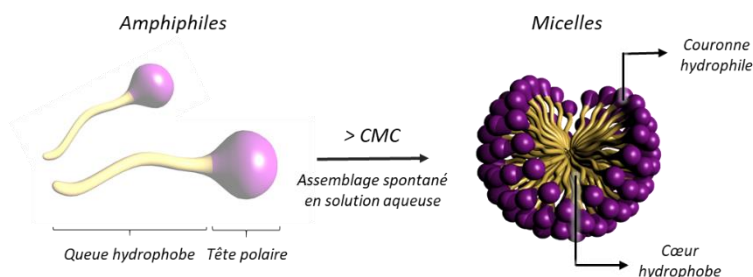


Figure 17 : Obtention de micelles suite à un auto-assemblage d'amphiphiles en phase aqueuse.

Cette CMC peut être déterminée par des méthodes :

- De fluorescence via l'encapsulation d'une molécule de pyrène.⁴¹ En fonction de l'environnement du pyrène, les pics caractéristiques à 373 et 383 nm vont évoluer. Si le pyrène est encapsulé dans la micelle (milieu hydrophobe), le pic à 383 nm va augmenter en intensité. La CMC est déterminée suite à la mesure du ratio I_{373}/I_{383} pour différentes concentrations d'amphiphiles.
- De mesure de tension de surface (méthode de l'anneau de *du Noüy*)⁴², méthode qui utilise un tensiomètre et qui sera détaillée dans les chapitres suivants. L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être utilisée pour différents systèmes nanométriques.

Du fait de leur nature dynamique, les micelles sont assez peu stables et possèdent des CMC relativement élevées. Ainsi, la dilution des auto-assemblages, par exemple, dans la circulation

⁴⁰ Principe de la thermodynamique $\delta G = \delta H - T\delta S$. Si $\delta G > 0$, le procédé est spontané.

⁴¹ Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuo, P. L.; Ananthapadmanabhan, K. P. *Langmuir* **1985**, *1*(3), 352-5.

⁴² Lunkenheimer, K.; Wantke, K.-D. *Colloid and Polymer Science* **1981**, *259*, 354-366.

sanguine, a pour effet de déstructurer l'architecture micellaire. D'autre part, les protéines du sang peuvent également interagir avec les unimères et déstabiliser l'auto-assemblage. Ces phénomènes vont conduire à un relargage prématuré du principe actif transporté dans le cœur de la micelle. C'est pourquoi des méthodes permettant de stabiliser les systèmes ont été développées.

4- Stabilisation de la micelle

Afin d'améliorer la stabilité des auto-assemblages, plusieurs stratégies ont été envisagées dans la littérature. La stabilisation peut être effectuée par i) des interactions physiques (interactions π , interactions hydrophobes, électrostatiques...) ou par ii) la création de liaisons entre unimères au niveau du cœur ou en surface de la micelle.⁴³

4.1- *Stabilisation par réticulation*

Les unimères peuvent être modifiés chimiquement afin de réaliser une réticulation covalente entre les différentes unités qui va permettre de stabiliser l'auto-assemblage. Les micelles peuvent être réticulées aussi bien au niveau de leur cœur que de leur surface et ce changement va affecter de manière significative les propriétés physico-chimiques des objets obtenus.

Les méthodes de réticulation sont très variées et reposent le plus souvent sur :

- Une polymérisation radicalaire via l'utilisation d'un activateur de radicaux ou par irradiation UV. Ce sont généralement des groupements allyliques qui sont ajoutés au niveau des blocs de copolymères. En 1979, les équipes de Prochaska et Balosh ont été les premières à introduire la réticulation par polymérisation au niveau du cœur de la micelle en utilisant du polybutadiène.⁴⁴ L'équipe de Kataoka s'est par exemple intéressée à la réticulation du bloc hydrophobe PEG-b-PLA par l'ajout d'un motif méthacrylate. La réticulation du cœur a lieu après polymérisation radicalaire et l'ajout d'un agent déstabilisant (du type SDS) ne permet pas de dissocier l'auto-assemblage qui reste stable au cours du temps.⁴⁵
- La présence de ponts disulfures qui sont généralement formés par oxydation de thiols. Ces derniers sont par exemple très importants pour la stabilisation structurale de certaines protéines. Néanmoins, cette liaison peut également être facilement rompue par une étape de réduction chimique. L'équipe de Kataoka a par exemple démontré la réversibilité d'un auto-assemblage via l'utilisation d'un groupement thiol au niveau d'un bloc du copolymère. Suite à l'oxydation du thiol, des ponts disulfures permettent de stabiliser les assemblages. A contrario, une déstabilisation peut être effectuée suite à une réduction du pont disulfure par action du GSH (Glutathion).⁴⁶

⁴³ Talelli, M.; Barz, M.; Rijcken, C. J.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Lammers, T. *Nano today* **2015**, *10*, 93-117.

⁴⁴ Prochaska, K.; Wypych, J. *Journal of Applied Polymer Science* **1979**, *23*, 2031-2042.

⁴⁵ Iijima, M.; Nagasaki, Y.; Okada, T.; Kato, M.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1999**, *32*, 1140-1146.

⁴⁶ Li, Y.; Lokitz, B. S.; Armes, S. P.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2726-2728.

- Des réactions de chimie-click. Wooley et Hawker ont développés une méthode permettant de stabiliser des micelles au niveau du cœur ou en surface. Pour cela, des copolymères composés de poly(acrylic acid)-*b*-poly(styrene) ont été fonctionnalisés à l'aide de groupements réactifs (alcynes et azotures). Ces nouveaux amphiphiles ont été utilisés comme « échafaudages » pour finalement former des nanoparticules réticulées par chimie click.⁴⁷

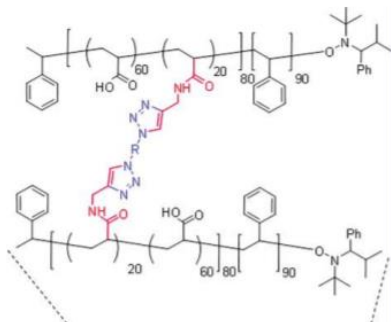


Figure 18 : Réaction de chimie click entre alcyne et azoture pour stabiliser un auto-assemblage.⁴⁷

4.2- Stabilisation par des composés perfluorocarbonés

Dans les années 80, une équipe menée par Rabolt a montré la possibilité de former des auto-assemblages d'amphiphiles à partir de chaînes perfluorées auxquelles un bloc hydrophile a été rajouté.⁴⁸ La cohésion des objets est assurée ici par des interactions hydrophobes entre les chaînes perfluorées.

La force de la liaison covalente entre carbone et fluor ainsi que la faiblesse des interactions intermoléculaires de Van der Waals donnent aux composés perfluorocarbonés (PFCs) des caractéristiques uniques comme : i) une faible tension de surface, ii) une faible constante diélectrique, iii) un fort pouvoir solubilisant des gaz (notamment le dioxygène), iv) une extrême hydrophobicité et lipophobicité et v) une forte biocompatibilité. La présence d'une très grande quantité d'atomes de fluor dans les surfactants fluorés modifie leur comportement par rapport à leurs homologues hydrogénés. Ces composés sont moins solubles en phase aqueuse ce qui a pour conséquence de modifier la tension de surface et donc la valeur de la CMC. En effet, les surfactants perfluorés sont capables de réduire la tension de surface de l'eau : elle passe à 15-20 mN m⁻¹ contre 30-40 mN m⁻¹ pour leurs homologues hydrogénés. Le caractère plus hydrophobe des composés perfluorocarbonés conduit donc à des auto-assemblages beaucoup plus stables en solution par rapport à des tensio-actifs hydrogénés.

L'équipe de Mecozzi a par exemple démontré l'effet stabilisant d'un bloc perfluorocarboné lors de la formation de micelles de copolymères. La synthèse d'un copolymère A-B-C avec un bloc B entièrement perfluoré a permis d'incorporer dans le cœur lipophile de la micelle un principe actif hydrophobe (Paclitaxel) avec une très bonne efficacité d'encapsulation. L'incorporation de ce bloc perfluorocarboné a permis de prolonger significativement la circulation sanguine du Paclitaxel ($t_{1/2} = 69,5$ h contre 52,9 h respectivement avec et sans bloc de PFCs).⁴⁹

⁴⁷ Joralemon, M. J.; O'Reilly, R. K.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16892-16899.

⁴⁸ Rabolt, J. F.; Russell, T. P.; Tweig, R. J. *Macromolecules* **1984**, *17*, 2786-94.

⁴⁹ Barres, A. R.; Wimmer, M. R.; Mecozzi, S. *Molecular pharmaceutics* **2017**, *14*, 3916-3926.

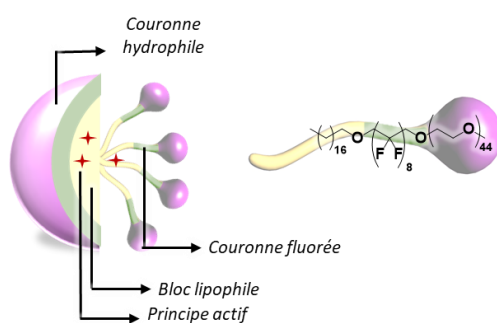


Figure 19 : Représentation schématique de l'auto-assemblage formé à partir d'un triblock contenant un bloc perfluorocarboné.⁴⁹

De cette manière il est possible d'obtenir des systèmes micellaires très variés possédant des propriétés *in vivo* améliorée. Le laboratoire s'intéresse particulièrement au développement de micelles stabilisées dans leur cœur par réticulation. Les micelles polydiacétyléniques, en particulier, feront l'objet d'une partie de mon travail de thèse. Des micelles présentant un bloc perfluoré dans leur cœur seront également développées. Ces deux catégories de micelles seront évaluées pour des applications thérapeutiques et diagnostiques.

V – Conclusion et objectifs de la thèse

Dans cette partie introductive, nous avons présenté l'intérêt de la nanomédecine et l'importance de la vectorisation pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. Si le choix des vecteurs disponibles dans la littérature est varié, nous avons opté, pour nos problématiques, pour le développement de systèmes micellaires originaux. Ces derniers offrent certains avantages clés, notamment une taille réduite (pour une diffusion plus profonde dans les tissus cibles), de la modularité (assemblage à façon), et une capacité de chargement élevée. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse autour de l'utilisation de micelles pour : i) le traitement de la plaque d'athérome, ii) comme outil de diagnostic pour l'IRM du fluor et iii) comme outil de diagnostic pour la tomographie par émission de positons.

Dans une première partie, nous discuterons de la synthèse de micelles polydiacétyléniques stabilisées. Ces micelles seront utilisées pour la prise en charge d'un composé anti-inflammatoire et la formulation sera validée *in vitro* et *in vivo* pour le traitement de l'athérosclérose. Les micelles seront également associées à un ligand à des fins de ciblage actif de la plaque.

Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons au développement de micelles incorporant un cœur perfluoré pour une application diagnostique. Nous exploiterons ici la capacité des objets micellaires à cibler les tissus tumoraux par effet EPR et l'accumulation des micelles sera visualisée par IRM du fluor-19 *in vivo*.

Enfin, dans une dernière partie, des nanoparticules d'or seront encapsulées dans des micelles fluorées et utilisées à des fins d'imagerie par tomographie par émission de positons (PET) ciblant les tissus tumoraux. La présence de l'or assure un contraste aux rayons-X et les phases fluorées une solubilisation de dioxygène. Nous souhaiterions pouvoir exploiter cette dernière propriété afin de transporter du dioxygène au niveau des tissus cancéreux (qui sont le plus souvent hypoxiques) et potentialiser ainsi les traitements par radiothérapie en générant des quantités plus importantes d'espèces réactives de l'oxygène cytotoxiques.

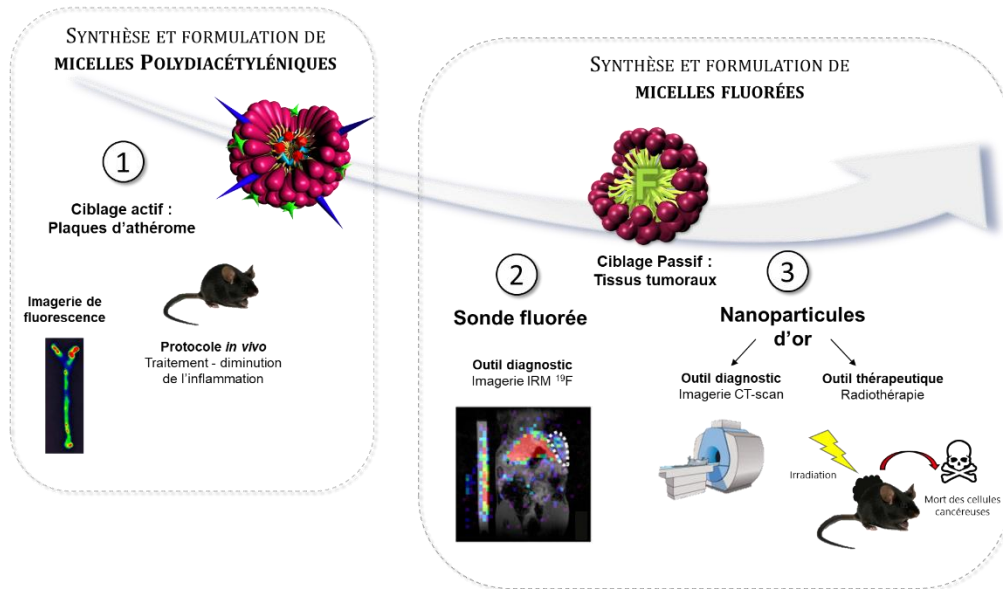


Figure 20 : Présentation schématique du projet de thèse.

Chapitre 1 : Micelles polydiacétyléniques pour le traitement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est la première cause de mortalité dans les pays développés. Cette pathologie se caractérise par l'apparition de « dépôts » suite à l'accumulation de lipides, glucides complexes ou tissus adipeux, au niveau des artères : c'est ce que l'on appelle la plaque d'athérome. Il s'agit d'un phénomène physiologique de vieillissement des artères qui peut être accentué par des facteurs de risques comme l'hypertension artérielle, le diabète ou le tabagisme.

I- Plaque d'athérome et micelles PDA-PEG : état de l'art

1- L'athérosclérose et la découverte du GW3965

1.1- Développement de la plaque d'athérome

Une artère est constituée de trois parties (Figure 21) : l'adventice, la média et l'intima (ou endothélium). La couche de cellules que constitue l'endothélium vasculaire protège l'artère. Néanmoins cette couche peut subir des dommages induits par les substances qu'elle transporte. En effet, le sang circulant dans les artères est composé de globules blancs, globules rouges et de substances essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, comme le cholestérol qui peut être cependant à l'origine de certaines pathologies.

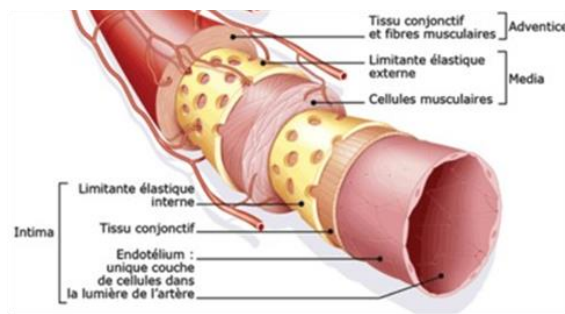


Figure 21 : Représentation schématique d'une artère avec ses trois tuniques : l'adventice, la média, l'intima.

De nature hydrophobe, la molécule de cholestérol est associée à des lipoprotéines qui assurent son transport dans le sang. Ces lipoprotéines, qui sont des assemblages de lipides et de protéines, peuvent être classées en fonction de leur densité : on distingue ainsi i) les LDL (lipoprotéines de basse densité) qui transportent essentiellement le cholestérol du foie, où il est produit, vers les autres tissus, ii) les HDL (lipoprotéines de haute densité) qui transportent l'excès de cholestérol vers le foie où il sera dégradé, et iii) les VLDL (lipoprotéines de très basse densité) (Figure 22). Chaque famille de lipoprotéines est reconnue par des cellules différentes, leur conférant ainsi des fonctionnalités différentes.

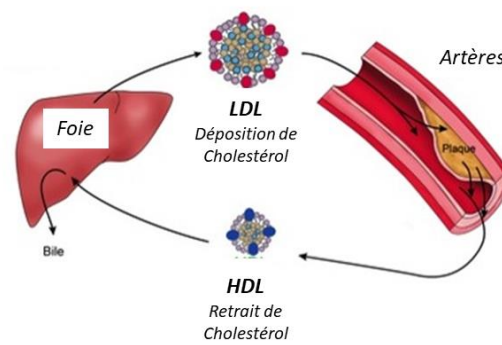


Figure 22 : Représentation schématique du rôle des lipoprotéines dans le transport du cholestérol.

La molécule de cholestérol associée aux LDL est donc acheminée du foie, où elle est produite, vers les autres tissus par les artères. Néanmoins, sous l'effet de facteurs de risques, l'endothélium des artères peut devenir perméable permettant aux LDL circulantes de diffuser au niveau de l'intima. Le passage des LDL au travers de l'endothélium n'est pas sans conséquences, surtout lorsque le taux de LDL circulantes est élevé, favorisant leur accumulation au niveau de l'intima.⁵⁰

Le mécanisme de formation de la plaque est un processus lent et progressif en plusieurs étapes au cours desquelles les LDL jouent un rôle majeur. Lorsque les LDL sont accumulées au niveau de l'intima, l'organisme va actionner un mécanisme de défense en faisant intervenir des monocytes qui vont dégrader les LDL par oxydation (Figure 23). Les macrophages provenant de la différenciation des monocytes circulants, vont ensuite se charger en LDL oxydées et se transformer en cellules spumeuses (macrophages modifiés, chargés en LDL oxydées). La production de cytokines inflammatoires va amplifier la réaction inflammatoire, permettant le recrutement de monocytes qui vont dégrader le LDL. En parallèle, des plaquettes viennent se fixer au niveau de l'endothélium endommagé et des facteurs de croissance sont libérés. Ces facteurs de croissance vont permettre aux cellules musculaires lisses de migrer de la média vers l'intima afin de renforcer l'endothélium endommagé pour finalement former une plaque fibreuse.

La formation de la plaque peut donc se résumer en 7 étapes :

- Étape 1 : diffusion des LDL au travers de l'endothélium (transcytose)
- Étape 2 : rétention des LDL dans l'intima
- Étape 3 : oxydation des LDL par les monocytes
- Étape 4 : activation des cellules endothéliales par l'expression de molécules d'adhésion à leur surface (recrutement de monocytes circulants)
- Étape 5 : production de cytokines inflammatoires (amplification de la réaction inflammatoire)
- Étape 6 : migration de cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et formation de la chape fibreuse
- Étape 7 : développement de la plaque et remodelage vasculaire

⁵⁰ Kolodgie, F. D.; Narula, J.; Yuan, C.; Burke, A. P.; Finn, A. V.; Virmani, R. *Journal of the American College of Cardiology* **2007**, *49*, 2093-2101.

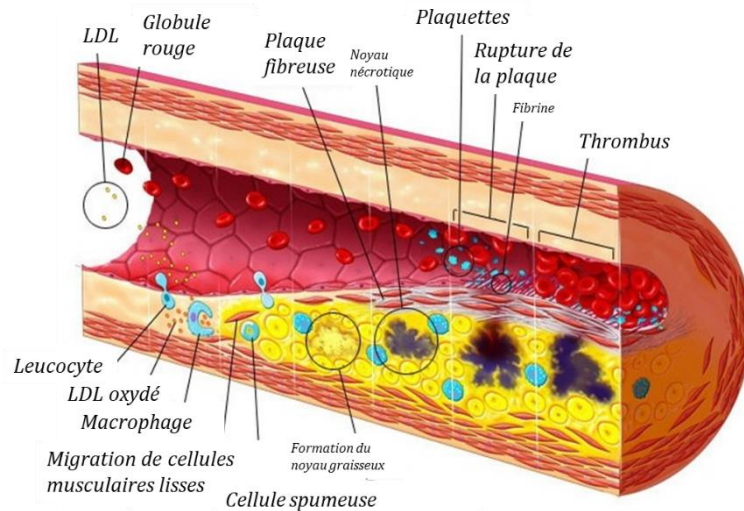


Figure 23 : Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans la formation d'une plaque d'athérome au niveau d'une artère.

La plaque d'athérome, lorsqu'elle arrive à un stade avancé, est dite « instable » car susceptible de se rompre à tout moment.⁵⁰ La rupture de la plaque provoque la formation de caillots de sang ce qui empêche ce dernier de circuler librement. Selon le lit vasculaire, la rupture d'une plaque est à l'origine d'un certain nombre de pathologies comme des accidents vasculaires cérébraux (AVC), des infarctus du myocarde et des embolies.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitements efficaces qui permettent d'éviter la rupture de la plaque d'athérome. Certaines mesures peuvent néanmoins avoir une action préventive et ralentir l'évolution de la plaque vers un phénotype instable. Cela nécessite : i) un changement de mode de vie (exercice physique, arrêt du tabagisme, changement d'alimentation...), ii) une prise d'hypolipémiants (statines) pour diminuer le taux de cholestérol dans le sang, ou iii) une prise d'antiagrégants plaquettaires (aspirine ou clopidogrel). À ces traitements, et pour les cas les plus critiques, peuvent s'ajouter des actes chirurgicaux consistant à retirer la plaque : on parle ici d'athérectomie.⁵⁰

Dans ce contexte, de nombreuses recherches s'orientent vers le développement de traitements curatifs qui auraient pour principal objectif d'agir directement sur la régression de la plaque d'athérome déjà installée, limitant ainsi le recours à des actes chirurgicaux invasifs.

1.2- Identification du GW3965 comme agoniste partiel des LXR

Une des pistes explorée pour induire une régression de la plaque d'athérome est de pouvoir éliminer le cholestérol de la plaque. Ainsi, la voie de dégradation du cholestérol médiée par les HDL semble être une piste intéressante car ces dernières participent à l'élimination du cholestérol des tissus *via* un mécanisme de transport inverse de cholestérol (RCT, *Reverse Cholesterol Transport*).

Ce mécanisme de RCT fait intervenir trois acteurs majeurs : le cholestérol, les lipoprotéines et les cellules spumeuses (macrophages modifiés). Tout d'abord les HDL sont produites dans les intestins et le foie à partir d'une apolipoprotéine (APOA1). Afin de prendre en charge le cholestérol, les lipoprotéines doivent interagir avec les cellules spumeuses. Cette interaction se fait par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire appelée ABCA1 (pour ATP binding cassette A1) présente à la surface des cellules spumeuses sur laquelle la lipoprotéine va venir se fixer, être internalisée et se charger en cholestérol (Figure 24, étape 1, 2 et 3). La lipoprotéine chargée de cholestérol est ensuite excrétée hors de la cellule spumeuse par exocytose avant d'interagir avec une seconde protéine transmembranaire (ABCG1, étape 4 et 5). À cette étape, elle se charge davantage en cholestérol pour devenir une HDL mature qui assure le transport du cholestérol vers le foie en vue de son élimination (étape 6). Cette dernière étape du processus de RCT permet également de recycler les HDL en APOA1 qui deviennent de nouveau disponibles pour un nouveau cycle de RCT (étape 7).⁵¹

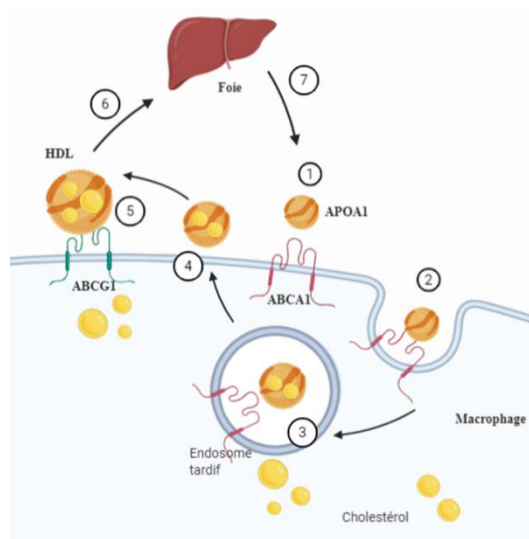


Figure 24 : Représentation schématique de la régulation de l'efflux de cholestérol (RCT). (1) : fixation de APOA1 au niveau du récepteur ABCA1 ; (2) : endocytose ; (3) : chargement en cholestérol libre ; (4) : exocytose de APOA1 ; (5) : maturation en HDL et chargement en cholestérol par l'intermédiaire d'enzymes ; (6) : transport du cholestérol dans le foie et recyclage du HDL en APOA1.

L'importance de ce mécanisme dans la régulation du taux de cholestérol dans le sang a été démontrée par une équipe travaillant sur la maladie de Tangier. Cette dernière se caractérise par une absence totale de HDL dans le sang ce qui provoque un développement prématuré de plaques d'athérome. Une mutation au niveau du transporteur ABCA1 a été mise en avant afin d'expliquer l'absence de HDL circulantes.⁵² Ainsi, une des stratégies pour moduler la quantité de HDL circulantes, et donc le processus de RTC, consisterait à activer l'expression de ABCA1 par l'intermédiaire de molécules activatrices.

⁵¹ Moreno, P. R.; Sanz, J.; Fuster, V. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *53*, 2315-2323.

⁵² Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H.; Real, J.; Amoura, Z.; Piette, J.-C.; Deleuze, J.-F.; Brewer, H. B.; Duverger, N.; Denèfle, P.; Assmann, G. *Nature Genetics* **1999**, *22*, 352-355.

Afin de comprendre le mécanisme d'activation de ABCA1, il est important de s'intéresser aux récepteurs LXR. Les récepteurs LXR (*Liver X Receptors*, LXR α et LXR β) sont présents chez les macrophages et appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes codant pour ABCA1 et ABCG1.⁵³ Les LXR peuvent être activés par des ligands naturels dérivés du cholestérol (oxystérols), tels que le 24(S),25-epoxycholesterol (24,25-EC) (Figure 25).^{54,55}

Outre ces ligands naturels, des ligands de synthèse ont également été identifiés comme activateurs de LXR. L'équipe de Shan a effectué un screening de plus de 300 000 composés ce qui a abouti à l'identification d'un agoniste non stéroïdien (composé T0901317, Figure 25) capable d'augmenter l'expression de ABCA1 et ABCG1. L'activité de cette molécule a été quantifiée par la mesure de la concentration efficace (EC₅₀) qui correspond à la concentration nécessaire pour obtenir 50 % de l'effet maximal. Elle est de 20 nM pour le T0901317 et de 100 nM pour un analogue, le T0314407. Des tests d'affinité ont été réalisés et montrent que le T0901317 se lie beaucoup mieux que le ligand naturel au niveau du récepteur.⁵⁵ Par ailleurs, le composé T0901317 a montré une faculté à activer la lipogenèse *in vivo*.⁵⁶

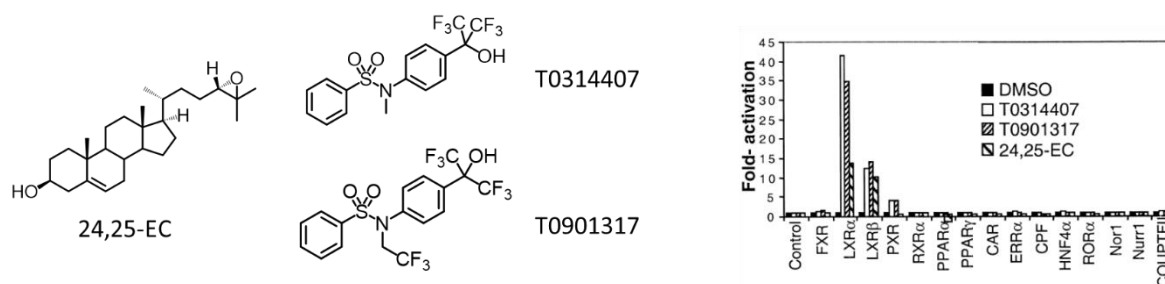


Figure 25 : Structure du ligand naturel 24,25-EC et de deux agonistes au récepteur LXR, le T0314407 et le T0901317 et spécificité de l'activation du LXR par les ligands dans un essai de transfection transitoire.

À la suite de ces travaux pionniers, l'équipe de Collins a réalisé un criblage d'une banque de molécules de GlaxoSmithKline. Ce criblage, qui avait pour cible un peptide de 24 acides aminés présent dans le domaine de liaison des LXR, a permis de découvrir de nouveaux agonistes des LXR. Un premier composé (composé « hit ») possédant une EC₅₀ de 260 nM a ainsi été identifié (Figure 26).⁵⁷ L'activité de cette molécule étant plus faible que celle du ligand naturel (24,25-EC, EC₅₀ = 95 nM). Des études de relation structures-activité (SAR) approfondies ont été entreprises en faisant notamment varier les groupements portés par l'amine tertiaire et par le groupement aromatique terminal. La synthèse des analogues a été réalisée selon une approche parallèle sur support solide et a permis d'identifier le composé GW3965 (Figure 26). En plus d'être sélectif et spécifique, le

⁵³ Janowski, B. A.; Willy, P. J.; Devi, T. R.; Falck, J. R.; Mangelsdorf, D. J. *Nature* **1996**, *383*, 728-731.

⁵⁴ Lehmann, J. M.; Kliewer, S. A.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Oliver, B. B.; Su, J.-L.; Sundseth, S. S.; Winegar, D. A.; Blanchard, D. E.; Spencer, T. A.; Willson, T. M. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 3137-3140.

⁵⁵ Janowski, B. A.; Grogan, M. J.; S.A., J.; Wisely, G. B.; Kliewer, S. A.; Corey, E. J.; Mangelsdorf, D. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 266-271.

⁵⁶ Schultz, J. R.; Tu, H.; Luk, A.; Repa, J. J.; Medina, J. C.; Li, L.; Schwendner, S.; Wang, S.; Thoolen, M.; Mangelsdorf, D. J.; Lustig, K. D.; Shan, B. *Genes & development* **2000**, *14*, 2831-2838.

⁵⁷ Collins, J. L.; Fivush, A. M.; Watson, M. A.; Galardi, C. M.; Lewis, M. C.; Moore, L. B.; Parks, D. J.; Wilson, J. G.; Tippin, T. K.; Binz, J. G.; Plunket, K. D.; Morgan, D. G.; Beaudet, E. J.; Whitney, K. D.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1963-1966.

GW3965 a montré une bonne biodisponibilité orale chez la souris. Par ailleurs, l'expression de ABCA1 a été multipliée par 8 dans les tissus impliqués dans le processus de RCT, et le taux de HDL dans le sang des souris a augmenté de 30 %, 3 jours après administration et est maintenu après 14 jours.

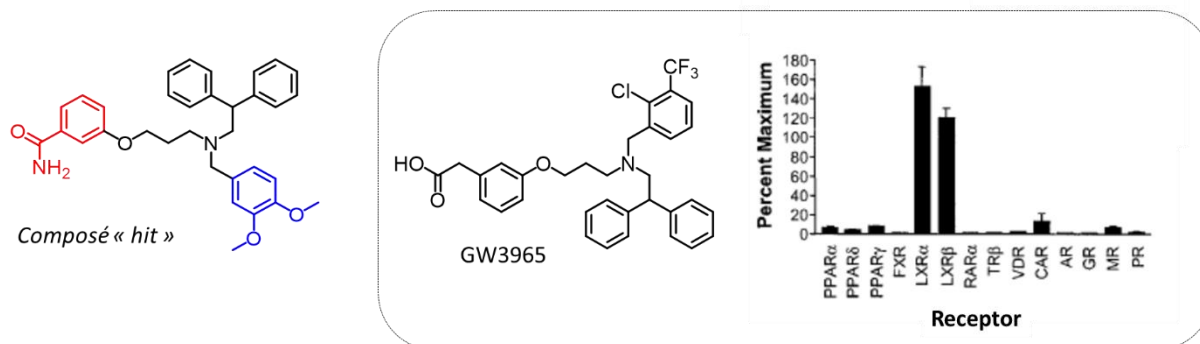


Figure 26 : résultat du criblage et groupements modifiables (rouge et bleu). Structure du GW3965 issu des études de SAR et profil de sélectivité GW3965 vis-à-vis de plusieurs récepteurs nucléaires.

Des études par cristallographie ont permis d'identifier la nature des interactions impliquées dans le domaine de liaison des ligands. Le récepteur LXR est constitué d'une poche plutôt hydrophobe et flexible, qui est capable de s'adapter pour accueillir des ligands structurellement différents. La présence de quelques résidus polaires ou chargés, va permettre d'orienter la molécule de GW3965 et de la stabiliser au niveau de cette cavité, en complément des interactions hydrophobes (PDB code : 3IPQ).⁵⁸

Le GW3965 étant structurellement très différent des oxystérols, il représente une nouvelle famille de composés potentiellement utiles pour le développement de principes actifs visant à traiter les maladies cardiovasculaires. Cependant, les effets bénéfiques sur la plaque d'athérome liés à l'administration du GW3965, s'accompagnent d'effets indésirables. En effet, ce composé participe à l'augmentation du taux de lipides, en particulier les triglycérides, dans le sang (hypertriglycéridémie) ce qui provoque une forte toxicité au niveau du foie (stéatose hépatique).⁵⁶ Si ces effets délétères ont conduit à l'arrêt des essais cliniques sur le GW3965, la mise en place de nouvelles stratégies permettant de limiter ses effets néfastes, tout en maintenant son efficacité, pourrait réactiver l'intérêt suscité pour ce composé.⁵⁹

Le GW3965 possède un caractère plutôt hydrophobe et n'est que très faiblement soluble dans des phases aqueuses (< 0,1 mg mL⁻¹). Ainsi, l'utilisation de formulations nanoparticulaires pour la prise en charge du GW3965 permettrait d'augmenter sa solubilité en milieu biologique, d'atténuer sa toxicité, de le protéger du milieu environnant et d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques, notamment grâce à un meilleur ciblage de la plaque d'athérome. Notre

⁵⁸ Farnegardh, M.; Bonn, T.; Sun, S.; Ljunggren, J.; Ahola, H.; Wilhelmsson, A.; J-A, G.; Carlquist, M. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 38821-38828.

⁵⁹ Grefhorst, A.; Elzinga, B. M.; Voshol, P. J.; Plosch, T.; Kok, T.; Bloks, V. W.; Sluijs, F. H. V. d.; Havekes, L. M.; Romijn, J. A.; Verkade, H. J.; Kuipers, F. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 34182-34190.

objectif a donc été de développer des micelles polydiacétyléniques pour l'encapsulation et le transport du GW3965 vers la plaque d'athérome.

2- Micelles PDA-PEG : développement et études préliminaires

2.1- Historique sur le développement des micelles PDA-PEG

2.1.1- Amphiphiles DA-NTA

Depuis quelques années, notre laboratoire s'intéresse au développement de micelles polymérisées qui sont assemblées à partir d'amphiphiles incorporant une tête polaire et une chaîne hydrophobe « diacétylène ». Ces développements s'inspirent des travaux pionniers de G. Wegner qui a étudié la formation de films monocouches et de membranes bicouches stabilisés à partir de monomères diacétyléniques qui sont polymérisés sous irradiation UV.⁶⁰ Cette polymérisation s'opère selon un mécanisme topochimique d'addition conjuguée 1,4 (Schéma 1).⁶¹

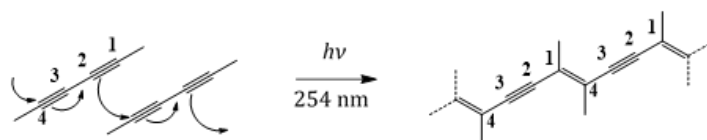


Schéma 1 : Schéma réactionnel de la polymérisation des diacétylènes.

Le premier amphiphile (DA-NTA) développé au laboratoire était composé d'une longue chaîne hydrophobe de 25 atomes de carbone contenant le motif diacétylène (DA) et d'une tête polaire nitrilotriacétique (NTA, Figure 27).⁶²

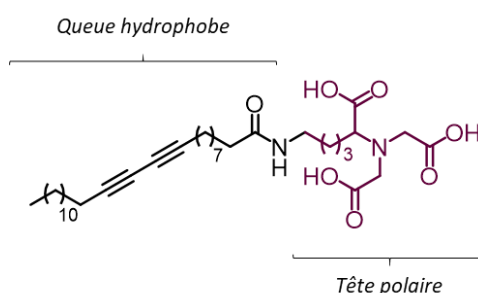


Figure 27 : Structure de l'amphiphile DA-NTA.

Le comportement supramoléculaire de cet amphiphile dépend essentiellement du pH du milieu aqueux dans lequel la molécule est dispersée. Ce comportement varie en fonction des différents états de protonation de la tête polaire et influence le paramètre d'assemblage « P ». Comme évoqué dans la partie introductive de cette thèse, ce paramètre est inversement proportionnel à l'aire de la tête polaire de l'amphiphile. À des pH compris entre 4 et 10, l'amine

⁶⁰ Wegner, G. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1971**, *145*, 85-94.

⁶¹ Okawa, Y.; Aono, M. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 2317-2322.

⁶² Ogier, J.; Arnould, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J.-M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 3902-3907.

tertiaire est protonée conduisant à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires avec les carboxylates adjacents qui induisent une conformation plutôt compacte de la tête polaire. Cette conformation mène à des structures classiques de bicouches. Lorsque le pH est supérieur à 10, l'amine tertiaire devient neutre alors que les acides carboxyliques sont anioniques. La tête polaire est alors déployée et occupe un volume plus important, permettant ainsi la formation de micelles (Schéma 2).⁶³

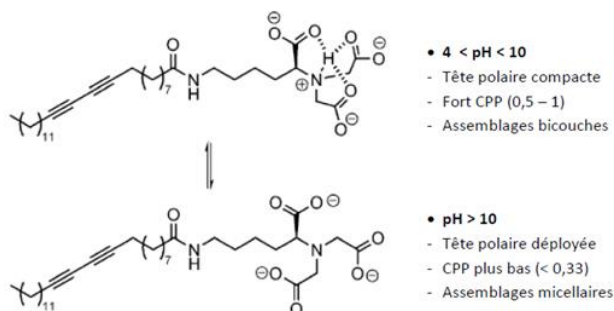


Schéma 2 : Valeur du paramètre P en fonction de l'état de protonation de la tête polaire NTA.⁶³

Dans des conditions de pH neutre et après polymérisation à 254 nm les assemblages de DA-NTA se structurent en rubans bicouches de couleur bleue qui est caractéristique d'un système fortement conjugué. Ce système est propice à des modifications structurales induites par des perturbations environnementales comme une variation de température. La couleur de la suspension colloïdale évolue pour devenir violette puis rouge lorsque cette dernière est chauffée à 70 °C. Ce changement de couleur est caractéristique de la formation d'une bicouche torsadée voire d'une spirale. Lorsque la température est supérieure à 70 °C, un nanotube se forme (Schéma 3).⁶³

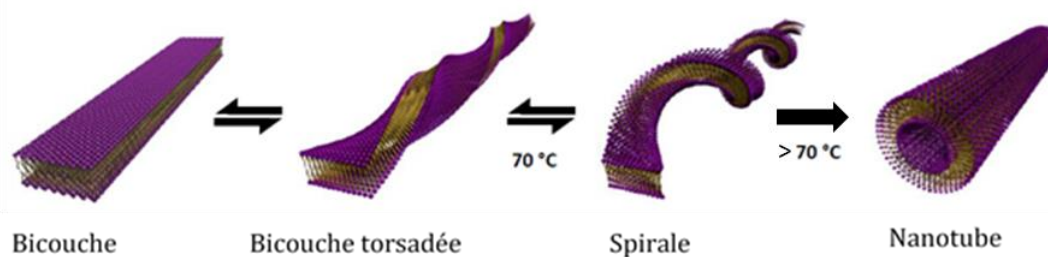


Schéma 3 : Représentation schématique des auto-assemblages obtenus après irradiation UV et dans des conditions de pH neutres, à différentes températures.⁶³

À pH alcalin (> 10) le même amphiphile DA-NTA conduit à la formation de micelles (Schéma 4). Des images obtenues par microscopie électronique en transmission (MET) montrent la présence d'objets sphériques qui possèdent un diamètre moyen de 6-7 nm. Cette taille est en accord avec le diamètre hydrodynamique des micelles mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*).

⁶³ Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 400-408.

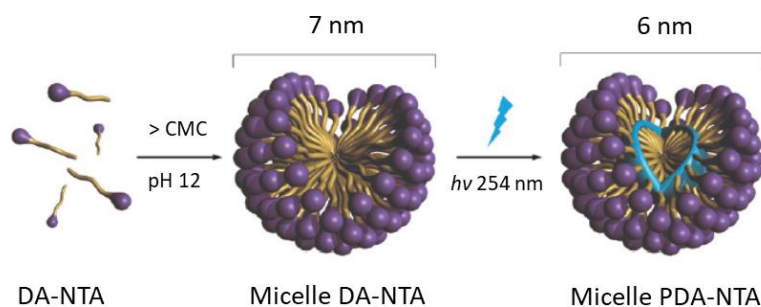


Schéma 4 : Assemblage des micelles DA-NTA et polymérisation en micelles PDA-NTA.

L'effet de la polymérisation sur l'assemblage des micelles a également été évalué. Un suivi par spectroscopie UV permet de se rendre compte de l'état de polymérisation des motifs diacétyléniques. En effet, l'évolution du système ène-yne s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance UV-visible due à une délocalisation des électrons π . Les micelles PDA-NTA ne sont que faiblement conjuguées et vont présenter un maximum d'absorption autour de 275 nm. L'évolution de l'absorbance en fonction du temps permet donc de se rendre compte de l'avancement du degré de polymérisation des micelles.

Cette étape de polymérisation permet de renforcer l'architecture supramoléculaire de la micelle. En effet, les micelles conventionnelles (non polymérisées) sont assez peu stables en milieu dilué du fait de leur CMC relativement élevée (par ex. $0,015 \text{ mg mL}^{-1}$ pour DA-NTA). La polymérisation permet d'obtenir des vecteurs polydiacétyléniques plus stables (PDA-NTA) dont la CMC est le plus souvent trop faible pour être mesurée par des techniques conventionnelles.

Des études préliminaires de formulation de principes actifs dans les micelles PDA-NTA ont montré l'efficacité du système pour prendre en charge des molécules hydrophobes : 4,5 mg de paclitaxel ont pu être solubilisés dans 1 mL de micelles à 10 mg mL^{-1} (solubilité intrinsèque du Paclitaxel dans l'eau $< 0.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Par ailleurs, des études *in vivo* sur ces mêmes amphiphiles encapsulant de la camptothécine ont permis de révéler l'efficacité des vecteurs en prolongeant le temps de résidence sanguin du principe actif.⁶²

2.1.2- Amphiphiles DA-PEG

Sur la base de cette première génération de vecteurs, une seconde génération a été développée, en remplaçant la tête polaire de type nitrilotriacétate par un motif poly(éthylène glycol). Les unités PEG de surface confèrent une protection stérique qui limite l'opsonisation des vecteurs assemblés à partir d'amphiphiles DA-PEG leur permettant de circuler plus longtemps dans le sang (Figure 28).⁶⁴

⁶⁴ Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. *Small* **2011**, *7*, 2786-2792.

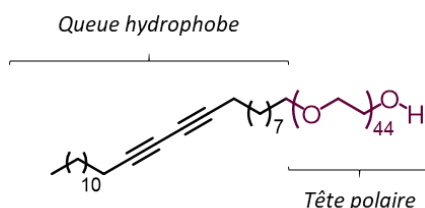


Figure 28 : Structure de l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀.

L'influence de la longueur de la chaîne PEG sur le devenir *in vivo* des micelles a d'abord été étudiée. Des amphiphiles composés de PEG₃₅₀ (soit 8 unités éthylène glycol) ou PEG₂₀₀₀ (45 unités éthylène glycol) ont été synthétisés. Pour chaque longueur de PEG, deux amphiphiles ont été préparés : un amphiphile avec un groupe hydroxyle terminal classique (-OH) et un amphiphile portant un acide carboxylique terminal (-CO₂H). La nouvelle génération de micelles est obtenue par dispersion en quantité équimolaire des deux amphiphiles dans de l'eau ultra pure, suivie d'une sonication et d'une polymérisation sous UV (Schéma 5). Cette association d'amphiphiles en une micelle hybride unique permet l'introduction de points d'ancrage (-CO₂H) pour une fonctionnalisation ultérieure. Des analyses de DLS montrent des particules sphériques monodisperses avec un diamètre hydrodynamique moyen de 8 nm pour les PDA-PEG₃₅₀ et 13 nm pour les PDA-PEG₂₀₀₀. À la différence des amphiphiles DA-NTA, le volume de la tête polaire est ici dirigé par la taille de la chaîne PEG plutôt que par l'état de protonation.

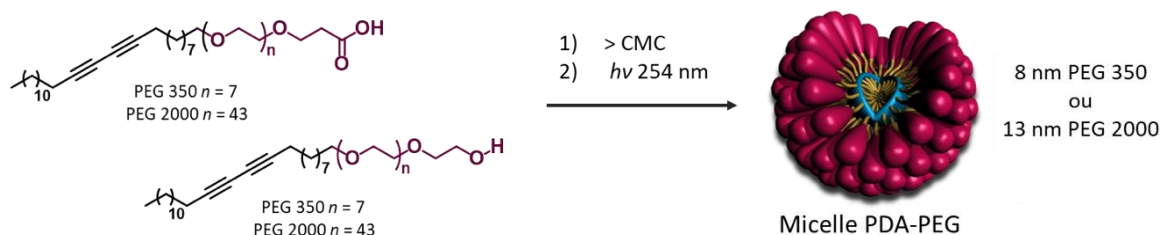


Schéma 5 : Structures chimiques des amphiphiles DA-PEG et assemblage des micelles.

Des études menées par notre équipe ont permis de comparer la biodistribution de vecteurs polymérisés PDA-NTA, PDA-PEG₃₅₀ et PDA-PEG₂₀₀₀ après fonctionnalisation avec une sonde fluorescente (FluoroProbes 730, FP730). La sonde a été introduite à la surface des micelles par un couplage peptidique et a permis de suivre le devenir des vecteurs *in vivo*. Les micelles ont été injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de tumeurs (cellules de cancer du sein MDA-MB-231) et leur suivi a été réalisé par imagerie planaire proche infrarouge (NIR, *Near-InfraRed*, Figure 29). L'observation de la face ventrale montre que les micelles s'accumulent dans un premier temps (quelques heures après injection) dans le foie. Aucune fluorescence n'est détectée dans la rate, les reins ou la vessie, suggérant une voie d'élimination hépatobiliaire. 24 h heures après injection, un fort signal de fluorescence est visualisé au niveau de la tumeur avec un contraste marqué par rapport aux tissus sains environnants. Cette observation met en évidence la capacité des micelles à s'accumuler par voie passive au niveau des tissus tumoraux (effet EPR) avec une accumulation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ deux fois supérieure à celle des micelles PDA-PEG₃₅₀ ou PDA-NTA. Par ailleurs, des études de pharmacocinétique ont été réalisées : des prélèvements sanguins ont été effectués au cours du temps et la présence de fluorescence dans le

sang a été mesurée à 732 nm. Les temps de demi-vie ont été comparés et les micelles PDA-PEG₂₀₀₀ circulent plus longtemps dans le sang que les autres vecteurs (> 50 % de la dose injectée 60 min post-injection contre 30 et 10 % pour PDA-PEG₃₅₀ et PDA-NTA). D'autre part, des tests de stabilité des vecteurs dans le sang ont été réalisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les profils de migration des objets, après prélèvement sanguins, et ceux des objets non injectés sont identiques et permettent de confirmer la stabilité des micelles *in vivo*.⁶⁴

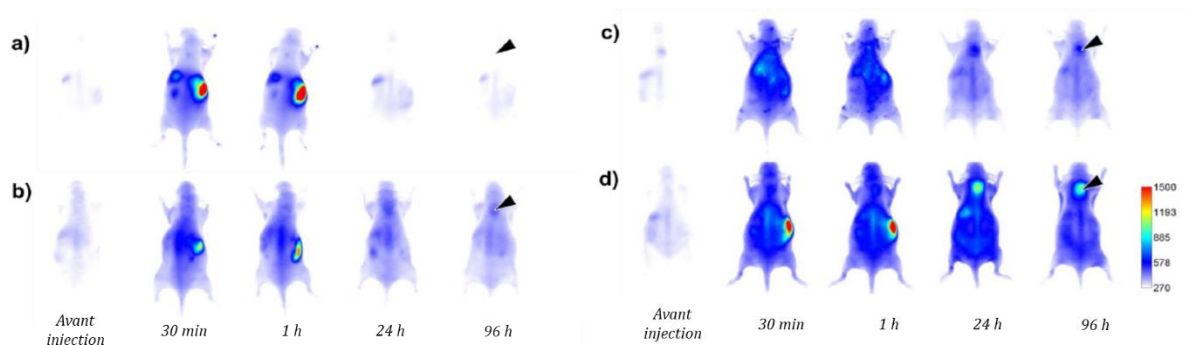


Figure 29 : Biodistribution par imagerie planaire NIR après injection i.v. sur des souris xénogreffées (MDA-MB-231) : a) FP730 seul ; b) PDA-NTA-FP730 ; c) PDA-PEG₃₅₀-FP730 ; d) PDA-PEG₂₀₀₀-FP730.⁶⁴

Ces observations mettent en évidence la performance des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler avec ce système de vecteur pour la suite de nos études visant à cibler la plaque d'athérome.

2.2- Fonctionnalisation des micelles pour un ciblage actif

Afin de pouvoir améliorer les propriétés *in vivo* du GW3965 et de limiter les effets secondaires indésirables, un ligand peut être introduit à la surface des vecteurs pour du ciblage actif. Une des stratégies consiste à cibler les acteurs du processus inflammatoire tels les métalloprotéases qui sont impliquées dans un certain nombre de processus inflammatoires et en particulier dans l'athérosclérose.⁶⁵ Parmi les métalloprotéases, la MMP-12 sécrétée par les macrophages en condition inflammatoire, a été proposée comme un acteur clé contribuant non seulement à la progression mais également à la rupture de la plaque d'athérome.⁶⁵ À ce titre, La MMP-12 pourrait constituer une cible thérapeutique de choix.

Les métalloprotéases sont des endopeptidases à zinc. Ces enzymes possèdent au sein de leur site actif, un atome de zinc qui participe à l'hydrolyse des substrats protéiques. Elles sont au nombre de 23 chez l'Homme et possèdent toutes de fortes homologues structurales notamment au niveau de leur site actif. Le domaine catalytique des MMP est constitué d'une poche dite catalytique contenant l'atome de zinc et dans laquelle vient s'insérer le substrat. Une particularité des MMP est la présence d'une cavité profonde plutôt hydrophobe (cavité S1', Figure 30) traversant la protéine et dont la paroi extérieure est une boucle mobile (boucle S1'). Cette boucle, dite de spécificité, varie en taille et en composition en fonction des MMP. On notera également la

⁶⁵ Johnson, J. L. *European Journal of Pharmacology* **2017**, 816, 93-106.

présence d'un glutamate (Glu219) qui, comme le zinc catalytique, participe à l'hydrolyse de la liaison peptidique en tant qu'acide/base général.⁶⁶

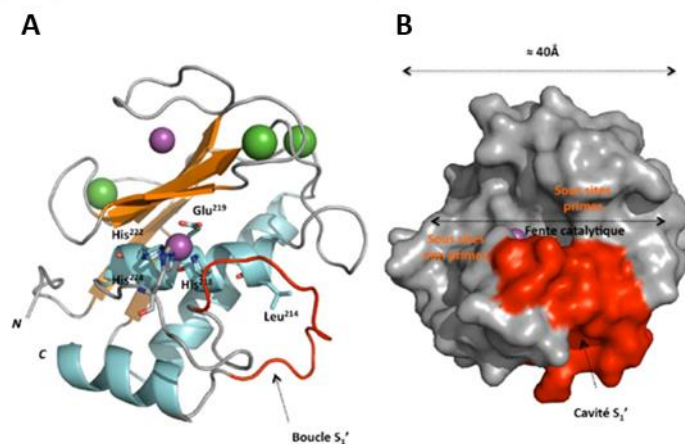


Figure 30 : A) domaine catalytique de la MMP-12 en représentation ruban avec les atomes de zinc en magenta. B) Domaine catalytique de la MMP-12 en représentation surface.

Dans un contexte structural précis avec plusieurs structures cristallographiques de MMP accessibles via la PDB (*Protein Data Bank*), l'équipe de Vincent Dive (CEA/SIMOS) s'est intéressée à la conception de ligands capables d'interagir au sein de la poche catalytique de ces protéases. Il s'agit de pseudopeptides phosphiniques possédant au sein de leur structure une fonction phosphinate (PO_2^-) interagissant avec l'atome de zinc catalytique (Figure 31, A). Cette fonction phosphinate possède une géométrie tétraédrique, analogue à celle de l'état de transition lors de la rupture d'une liaison amide (Figure 31, B).

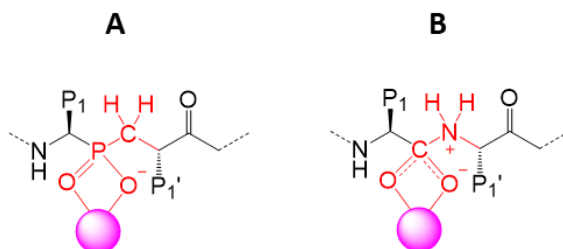


Figure 31 : Pseudopeptides phosphiniques en tant qu'analogues de l'état de transition. L'atome de zinc catalytique est représenté par une sphère colorée en magenta.

Pour cette raison, les pseudopeptides phosphiniques peuvent être considérés comme des analogues de l'état de transition et sont à ce titre des inhibiteurs puissants de métalloprotéases.⁶⁷ En s'appuyant sur ce squelette, l'équipe de V. Dive a développé des bibliothèques focalisées de peptides phosphiniques et les a criblés sur un jeu de plusieurs MMP. Ceci a permis d'identifier le premier ligand puissant et sélectif de la MMP-12 : le RXP470.1 (Figure 32, A).⁶⁸

⁶⁶ Devel, L.; Czarny, B.; Beau, F.; Georgiadis, D.; Stura, E.; Dive, V. *Biochimie* **2010**, *92*, 1501-1508.

⁶⁷ Dive, V.; Georgiadis, D.; Matziari, M.; Makaritis, A.; Beau, F.; Cuniasse, P.; Yiotakis, A. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2004**, *61*, 2010-2019.

⁶⁸ Devel, L.; Rogakos, V.; David, A.; Makaritis, A.; Beau, F.; Cuniasse, P.; Yiotakis, A.; Dive, V. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 11152-11160.

La résolution de la structure cristallographique du complexe RXP470.1/MMP-12 a confirmé le mode d'interaction de cet inhibiteur au sein du site actif de la MMP-12 (Figure 32, B). Cette résolution cristallographique met effectivement en évidence les interactions de l'atome de zinc avec la fonction phosphinate et permet de visualiser l'insertion de la chaîne hydrophobe en P1' dans la cavité S1' de l'enzyme.⁶⁹

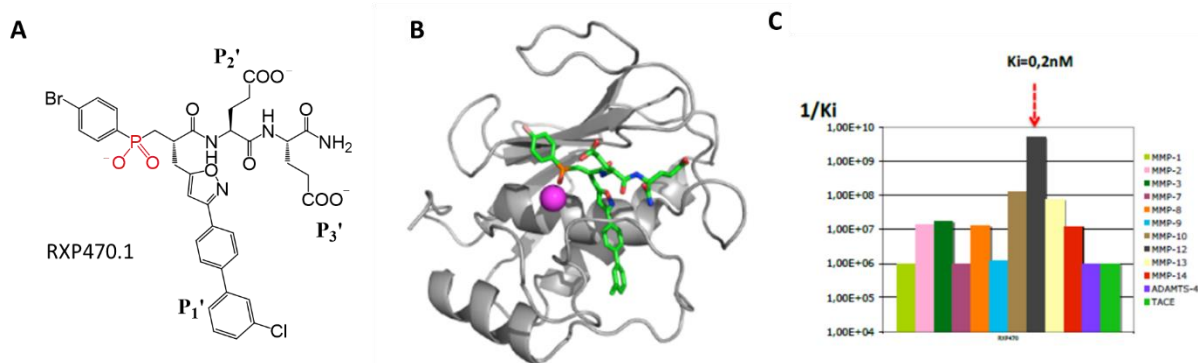


Figure 32 : Structure chimique du RXP470.1 (A), complexe MMP-12/RXP470.1 (B) et profil d'affinité/sélectivité de ce ligand vis-à-vis de plusieurs métalloprotéases (C).

Le RXP470.1 a initialement été évalué dans un modèle murin d'athérosclérose et a montré sa capacité à bloquer la progression de la plaque mais aussi à changer sa composition, lui conférant un phénotype de plaque stable.⁷⁰ Le potentiel thérapeutique du RXP470.1 a depuis été validé dans d'autres modèles précliniques.⁷¹

Compte tenu des travaux réalisés sur ce ligand et des résultats obtenus, il a donc été envisagé de fonctionnaliser les micelles polydiacétylénique à l'aide du ligand RXP470.1 afin de réaliser un ciblage actif au niveau des plaques d'athérome.

3- Objectifs

Après avoir décrit les phénomènes liés à l'apparition de la plaque d'athérome au niveau des artères, nous avons discuté de l'identification d'une nouvelle famille de composés agonistes, sélectifs et spécifiques des récepteurs LXR impliqués dans le mécanisme de RCT. Parmi ceux-ci, le GW3965 est prometteur mais présente des effets secondaires le rendant peu compatible avec une administration en tant que médicament (augmentation du taux de triglycérides). L'utilisation d'un système de vectorisation pourrait permettre de contourner les limitations du GW3965 *in vivo*.

⁶⁹ Czarny, B.; Stura, E. A.; Devel, L.; Vera, L.; Cassar-Lajeunesse, E.; Beau, F.; Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Dive, V. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 1149-1159.

⁷⁰ Johnson, J. L.; Devel, L.; Czarny, B.; George, S. J.; Jackson, C. L.; Rogakos, V.; Beau, F.; Yiotakis, A.; Newby, A. C.; Dive, V. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2011**, *31*, 528-535.

⁷¹ Marchant, D. J.; Bellac, C. L.; Moraes, T. J.; Wadsworth, S. J.; Dufour, A.; Butler, G. S.; Bilawchuk, L. M.; Hendry, R. G.; Robertson, A. G.; Cheung, C. T.; Ng, J.; Ang, L.; Luo, Z.; Heilbron, K.; Norris, M. J.; Duan, W.; Bucyk, T.; Karpov, A.; Devel, L.; Georgiadis, D.; Hegele, R. G.; Luo, H.; Granville, D. J.; Dive, V.; McManus, B. M.; Overall, C. M. *Nature Medicine* **2014**, *20*, 493-502.

Le laboratoire s'intéresse depuis quelques années à l'élaboration de micelles PDA-PEG stabilisées par photo-polymérisation. Nous souhaitons valoriser ces micelles pour la prise en charge et la vectorisation du GW3965 dans un modèle de plaque d'athérome. Dans un premier temps, nous allons évaluer la capacité des micelles à diffuser par voie passive vers la plaque d'athérome, via l'effet EPR classiquement observé dans les processus inflammatoires.

Nous étudierons ensuite le ciblage actif des micelles/GW3965 en y adjoignant un ligand peptidique RXP470.1, qui est non seulement capable de se lier sélectivement à une famille d'enzymes surexprimées au niveau de la plaque d'athérome, mais également d'agir comme inhibiteur des MMP12.

La suite de ce chapitre sera donc dédiée à i) la formulation du composé GW3965 dans des micelles PDA-PEG, ii) la fonctionnalisation des micelles avec un ligand de ciblage, iii) l'évaluation des nanovecteurs *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins d'athérosclérose.

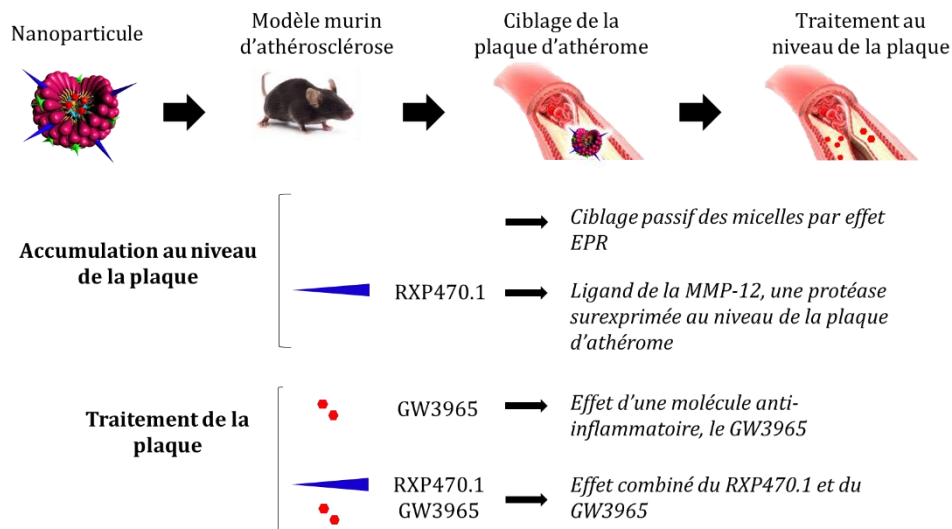


Figure 33 : Objectifs du chapitre.

II- Formulation d'un composé agoniste des LXR

1- Synthèse des amphiphiles

La synthèse des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ (dénommées PDA-PEG ci-après) a été réalisée à partir de deux amphiphiles : des amphiphiles avec une terminaison acide carboxylique qui sera le point d'ancrage pour de futures fonctionnalisations (par exemple avec un ligand) et des amphiphiles avec une terminaison éther méthylique. Introduits dans des proportions contrôlées, ces deux amphiphiles, s'auto-assemblent dans l'eau sous la forme de micelles mixtes sphériques.

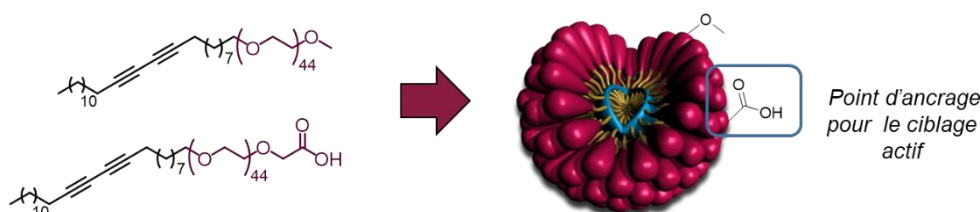


Schéma 6 : Structure des amphiphiles et formation des micelles PDA-PEG.

La synthèse des unités amphiphiles se fait selon un schéma linéaire. La première étape consiste à réduire l'acide pentacosanoïque commercial à l'aide d'aluminohydride de lithium dans du tétrahydrofurane (THF) pendant 90 min à froid (0 °C). L'alcool **I.1** issu de cette réaction est ensuite engagé dans une réaction d'Appel en présence de tétrabromure de carbone et de triphénylphosphine dans du dichlorométhane (DCM) pendant 15 min à température ambiante. Cette étape permet d'introduire un groupement halogéné réactif (composé **I.2**) pour le couplage à suivre des chaînes PEG.

Deux types de PEG peuvent être introduits à cette étape. Une substitution nucléophile du brome par l'alcoolate du PEG₂₀₀₀, permet d'obtenir le composé **I.3**, alors que l'alcoolate formé à partir du PEG₂₀₀₀ monométhyle éther permet d'obtenir le composé **I.4**. Ces substitutions nucléophiles s'effectuent en présence d'hydruide de sodium dans du THF à température ambiante pendant 72 h. Cette synthèse nous donne accès à l'amphiphile avec une terminaison éther méthylique **I.4**.

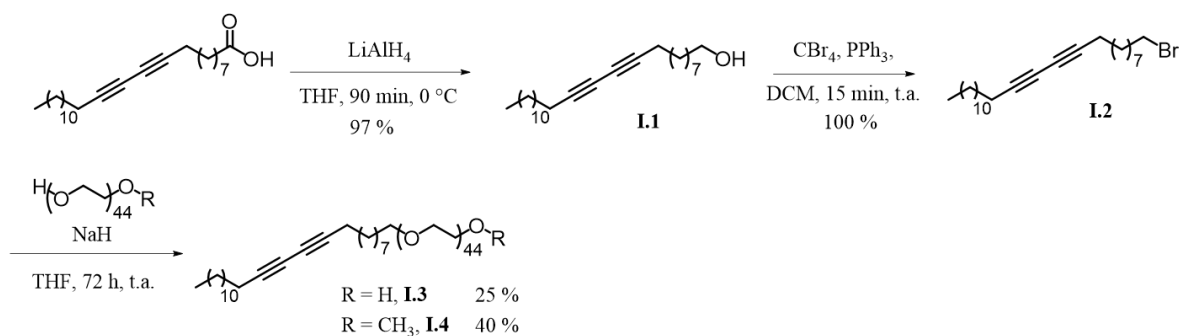


Schéma 7 : Schéma réactionnel de la synthèse des DA-PEG.

L'amphiphile incorporant une terminaison acide carboxylique a, quant à lui, été obtenu par alkylation du composé intermédiaire **I.3** (PEG avec une terminaison OH obtenu ci-dessus) avec le bromoacétate de *tert*-butyle. Cette réaction conduit à l'ester *tert*-butylique **I.5** qui est finalement déprotégé en condition acide pour fournir l'amphiphile désiré et portant une fonction acide carboxylique **I.6**.

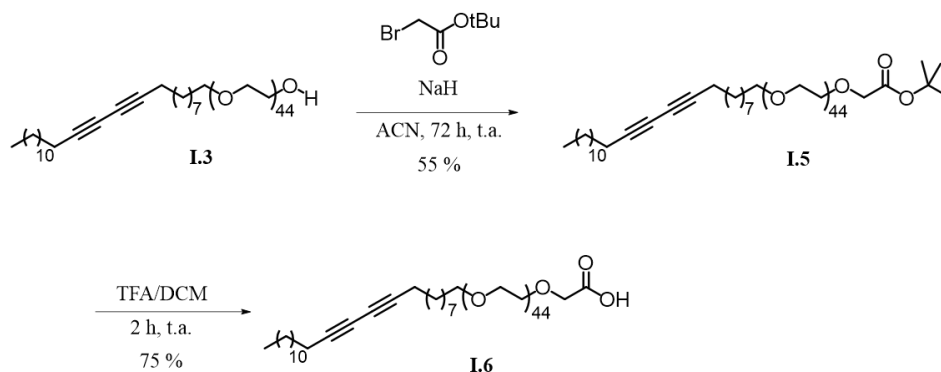


Schéma 8 : Schéma réactionnel de la synthèse des DA-PEG-CO₂H, point d'ancrage pour de futures fonctionnalisations.

Nous avons également développé une version marquée au carbone-14 de l'amphiphile pegylé **I.4** (composé **I.9**, Schéma 9). Cet amphiphile permettra d'assembler des micelles radiomarquées qui seront utilisées pour étudier la voie d'internalisation cellulaire. Nous avons ainsi réalisé la synthèse de l'acide pentacosadiynoïque **I.8** intermédiaire, marqué au carbone-14 en utilisant une méthodologie développée au Laboratoire de Marquage au carbone-14 de notre service, en collaboration avec Olivier Loreau. Cet acide sera utilisé comme précurseur de la synthèse de nos amphiphiles ¹⁴C.

L'obtention du composé radiomarqué se fait à partir du dérivé bromé **I.2** obtenu ci-dessus par une première étape de substitution avec du cyanure de potassium marqué au carbone 14 (K¹⁴CN). La fonction nitrile de **I.7** est ensuite hydrolysée en milieu alcalin pour conduire à l'acide carboxylique **I.8** marqué au ¹⁴C. Les dernières étapes de la synthèse de l'amphiphile « chaud » ¹⁴C-DA-PEG **I.9** sont similaires à celles mise en place dans la synthèse de l'amphiphile DA-PEG « froid » et décrites au niveau du schéma 8.

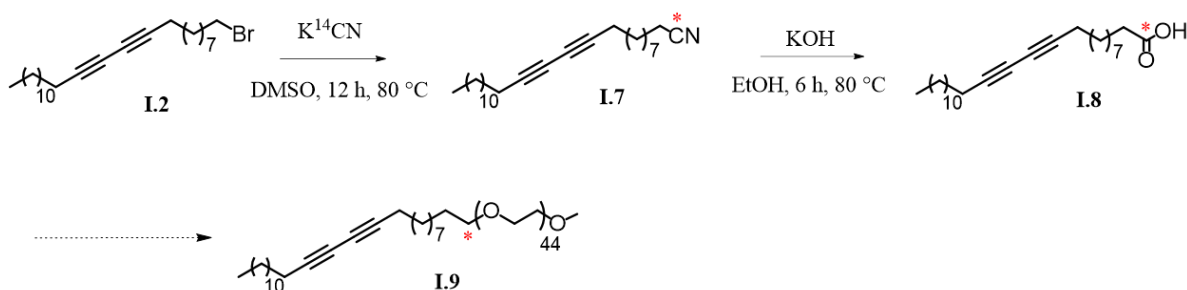


Schéma 9 : Voie d'obtention de l'amphiphile DA-PEG¹⁴C et position du carbone radiomarqué.

2- Assemblage des micelles et caractérisations

Pour former les micelles PDA-PEG, les amphiphiles DA-PEG méthyl éther **I.4** et DA-PEG carboxylique **I.6** sont dispersés en phase aqueuse dans une proportion massique 9:1 à une concentration supérieure à la CMC précédemment mesurée ($0,095 \text{ mg mL}^{-1}$).⁶⁴ Pour de futures études *in vivo*, les amphiphiles sont solubilisés dans une solution tampon, tel que le PBS (*Phosphate Buffer Saline*), afin de limiter les chocs osmotiques potentiels. Ainsi, une suspension de micelles à 10 mg mL^{-1} préparée dans du PBS a été obtenue après traitement aux ultrasons.

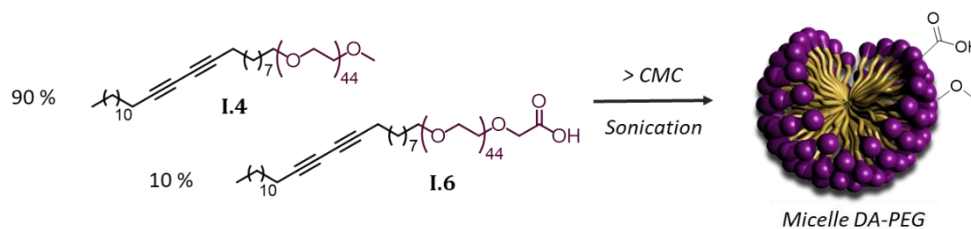


Schéma 10 : Structure des amphiphiles et formation des micelles DA-PEG.

Afin d'améliorer la stabilité *in vivo* des vecteurs, les amphiphiles sont photo-polymérisés par irradiation dans l'UV à une longueur d'onde de 254 nm.

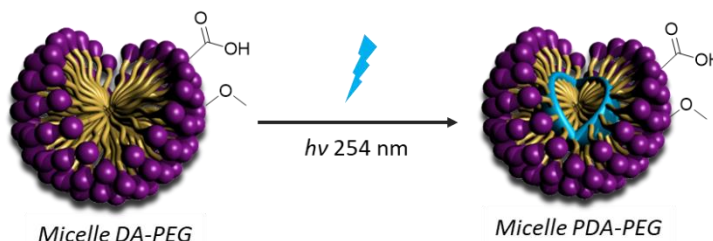


Schéma 11 : Obtention des micelles PDA-PEG stabilisées par réticulation du coeur.

Dans les précédents travaux réalisés au laboratoire sur des objets similaires, le temps de polymérisation était fixé à 6 h.⁶² Nous avons souhaité optimiser ce temps afin qu'il soit le plus court possible tout en maximisant le degré de polymérisation. Un suivi de la polymérisation a été effectué par spectroscopie UV-visible. Un échantillon de la solution de micelle a été prélevé à différents temps d'illumination, puis dilué pour être analysé. Entre t_0 et 2 h, nous pouvons observer la présence d'un épaulement vers 275 nm et d'une augmentation de l'absorbance, caractéristiques de la formation d'un système conjugué. Après 4 h d'irradiation, un affaissement du pic ainsi qu'une diminution de l'absorbance est observable. Ce phénomène est souvent constaté pour des polymères qui peuvent se dégrader, sous irradiations UV, à cause d'une hausse locale de la température. Des imperfections au niveau du système conjugué sont observées, dû à la rupture des liaisons covalentes.⁷² Cela conduit à une solution de micelle incolore et à un phénomène de photo-blanchiment des polymères.⁷³ Entre 2 et 4 h de polymérisation, nous

⁷² Daly, S. M.; Heffernan, L. A.; Barger, W. R.; Shenoy, D. K. *Langmuir* **2006**, *22*, 1215-1222.

⁷³ Neuberg, P.; Perino, A. I.; Morin-Picardat, E.; Anton, N.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S.; Remy, J.-S.; Wagner, A. *Chemical Communications* **2015**, *51*, 11595-11598.

n'observons aucune modification. Un temps de polymérisation de 4 h a donc été choisi pour la suite de nos études.

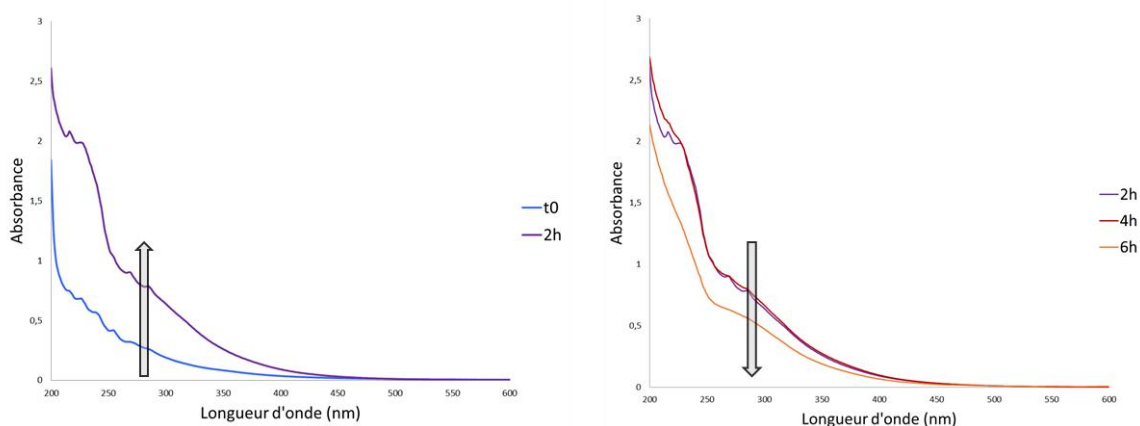


Figure 34 : Évolution de l'absorbance en fonction du temps d'irradiation à 254 nm.

La suspension de micelles, de couleur jaune pâle, est alors filtrée sur membrane stérile de porosité 0,2 μm , afin de pouvoir être conservée à température ambiante. Les micelles radiomarquées ont quant à elles été obtenues suivant le même protocole (en respectant les contraintes liées à la manipulation de la radioactivité) à la seule différence près que l'amphiphile DA-PEG méthyl éther **I.4** est ici utilisé en mélange avec l'amphiphile ^{14}C -DA-PEG **I.9**. À l'issue de la séquence d'assemblage (dispersion/polymérisation/filtration), la quantité totale de radioactivité dans la suspension micellaire est de 500 μCi pour 20 mg de micelles, tel que mesuré par scintillation liquide.

Les micelles ont par la suite été caractérisées par DLS permettant d'avoir accès à leur rayon hydrodynamique. La DLS est une technique non destructive qui s'appuie sur les variations d'intensité de la lumière diffusée suite au mouvement brownien des particules en solution. Ces variations vont donner accès aux variations de vitesse des particules en mouvement qu'il est également possible de corrélérer à leur taille à l'aide d'équations mathématiques. Des micelles non polymérisées et des micelles polymérisées 4 h ont été testées. Les résultats indiquent que les amphiphiles DA-PEG forment effectivement des micelles de 11 nm de diamètre en moyenne avec une belle distribution de taille centrée autour de cette valeur. Nous constatons également que les temps de polymérisation n'ont pas d'influence sur la taille des objets obtenus.

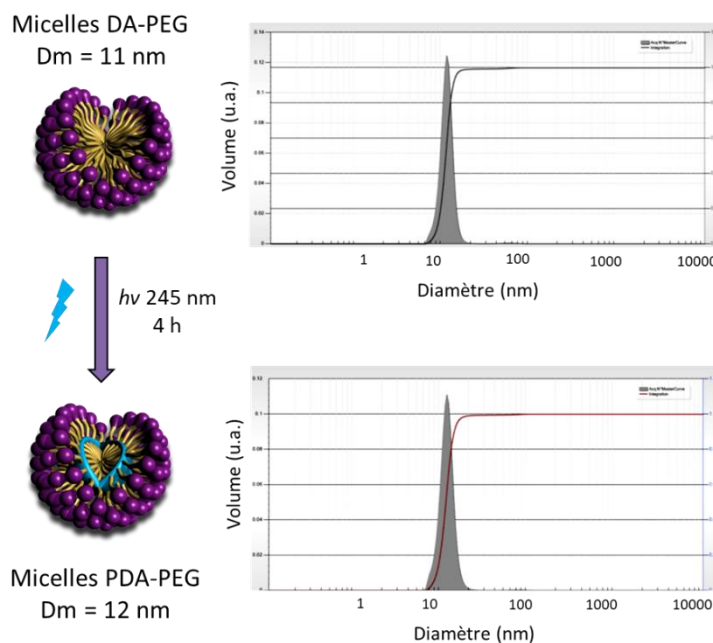


Figure 35 : Analyses DLS de micelles DA-PEG et PDA-PEG.

3- Étude de toxicité

3.1 – Effet de la polymérisation

Les micelles assemblées ci-dessus étant destinées à une administration *in vivo*, des études préliminaires de toxicité (*in vitro*) ont été entreprises en collaboration avec l'équipe du professeur Elias Fattal (UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud). L'influence de la polymérisation des micelles sur leur toxicité potentielle a en particulier été étudiée.

Les premières expériences ont été conduites sur des cellules phagocytaires RAW 264.7 qui sont utilisées comme modèles expérimentaux pour leur capacité à intercepter et éliminer les corps d'origine étrangère, c'est la raison pour laquelle cette lignée a été choisie pour nos études.⁷⁴

Deux lots de micelles ont été préparés à partir des amphiphiles DA-PEG méthyl éther **I.4** et DA-PEG carboxylique **I.6** qui sont dispersés en phase aqueuse dans une proportion massique 9:1 et soumis à sonication. La moitié de l'échantillon est ensuite traitée par polymérisation sous UV pour conduire au lot de micelles PDA-PEG, alors que l'autre moitié ne subit aucun traitement photochimique (micelles non-polymérisées DA-PEG). Les deux échantillons ont été évalués en parallèle vis-à-vis de leur cytotoxicité cellulaire et des lésions induites sur la membrane plasmique. La micelle polymérisée PDA-PEG a également été étudiée notamment en ce qui concerne les aspects pro-apoptotiques, inflammatoires et génotoxiques. Ces résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

⁷⁴ Chen, L.; Liu, J.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Kang, Y.; Chen, A.; Feng, X.; Shao, L. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 1939-1962.

Tableau 3 : Différents tests réalisés sur des cellules RAW 264.7 avec des micelles DA-PEG et/ou PDA-PEG polymérisées.⁷⁵

Entrée	Etude	Type de test	Objets testés	Résultats obtenus
1	Viabilité cellulaire	MTT	DA-PEG PDA-PEG	PDA-PEG 10 × moins toxiques ($IC_{50} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) que DA-PEG ($IC_{50} = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$)
2	Altération membrane cellulaire	Libération de LDH	DA-PEG PDA-PEG	PDA-PEG : pas effet DA-PEG : altération membranaire [C] > 0,1 mg mL ⁻¹
3	Apoptose/Nécrose	Annexine V / PI	PDA-PEG	Pas d'induction d'apoptose, pas d'induction de nécrose [C] ≤ 1 mg mL ⁻¹
4	Réponse Inflammatoire	Méthode CBA	PDA-PEG	Sur 4 cytokines testées, absence de réponse inflammatoire liée aux micelles [C] ≤ 1 mg mL ⁻¹
5	Dommages à l'ADN	Test Comet	PDA-PEG	Pas de dommages causés à l'ADN [C] ≤ 1 mg mL ⁻¹

L'impact des micelles PDA-PEG polymérisées et DA-PEG non-polymérisées sur la viabilité des cellules a été évalué par la quantification de l'activité mitochondriale (test MTT, Tableau 3, entrée 1). Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré en fonction de la concentration en amphiphiles constitutifs des micelles dans une gamme comprise entre 0,0003 et 1 mg mL⁻¹, après 24, 48 et 72 h d'incubation. La première remarque est que nous observons une cytotoxicité qui est proportionnelle à la dose. Cependant, les micelles polymérisées sont sensiblement moins toxiques avec une d' IC_{50} dix fois plus élevée (à 24 h) que les micelles non-polymérisées (1 mg mL⁻¹ vs 0,1 mg mL⁻¹). Cette différence est néanmoins moins accentuée à 72 h. Ces résultats montrent donc l'effet bénéfique de la polymérisation sur l'atténuation de la cytotoxicité du système, comme déjà observé par ailleurs.⁷³

Un test de déstabilisation membranaire sous l'influence des micelles a également été réalisé en analysant la libération de lactate déshydrogénase (LDH), qui est une enzyme cytosolique, (entrée 2). La libération de LDH dans le milieu extracellulaire est un indicateur de l'altération de la membrane. Le dosage de la LDH a été effectué 24 h après incubation avec des micelles PDA-PEG polymérisées et DA-PEG non-polymérisées, dans une gamme de concentration en amphiphile comprise entre de 0,0003 et 1 mg mL⁻¹. Alors que la libération de LDH n'est pas significative à des concentrations < 0,1 mg mL⁻¹, elle augmente considérablement au-dessus de 0,1 mg mL⁻¹ pour les micelles DA-PEG non-polymérisées. Au contraire, nous n'observons pas de libération de LDH lorsque les cellules sont traitées avec les micelles PDA-PEG polymérisées et ce jusqu'à des concentrations de 1 mg mL⁻¹.

Les micelles PDA-PEG ont ensuite été étudiées plus avant et les résultats obtenus montrent i) qu'il n'y a pas d'augmentation de l'apoptose ou de la nécrose dans les cellules exposées aux micelles PDA-PEG, quelle que soit la concentration des micelles (≤ 1 mg mL⁻¹), ii) que ces vecteurs n'engendrent pas de réponse inflammatoire et iii) une absence de génotoxicité qui a été évaluée

⁷⁵ Costamagna, F.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J.; Clarisse, D.; Jamgotchian, L.; Loreau, O.; Denis, S.; Gravel, E.; Doris, E.; Fattal, E. *Nanoscale* **2020**, *12*, 2452-2463.

par un test des comètes qui n'a révélé aucun changement significatif pour les cellules traitées avec des micelles PDA-PEG pendant 24 h à des concentrations $\leq 1 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.2- Distribution intracellulaire

Nous avons par la suite évalué l'internalisation et la distribution intracellulaire des micelles PDA-PEG. Pour cela, les micelles DA-PEG non-polymérisées et PDA-PEG polymérisées marquées au ^{14}C ont été assemblées et testées à une concentration sub-toxique de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ en interaction avec les cellules RAW 264.7. La première observation est qu'à 24 h, les micelles DA-PEG pénètrent dans les cellules, par un mécanisme passif, en quantité deux fois plus importante que les micelles PDA-PEG polymérisées, qui elles sont internalisées par endocytose.

Afin de connaître la distribution des micelles au niveau de la cellule, un protocole permettant de séparer les compartiments sous-cellulaires (cytosol, membranes, noyau) a été mis au point. Le taux de radioactivité dans chaque compartiment cellulaire a été mesuré et indique que les micelles PDA-PEG polymérisées s'accumulent après 48 h préférentiellement dans le cytosol contrairement aux micelles DA-PEG non-polymérisées qui s'accumulent plutôt dans la membrane cellulaire. L'hypothèse formulée est que les micelles non-polymérisées, en raison de leur nature dynamique, perdent leur statut de « particule » lorsqu'elles interagissent avec les membranes cellulaires. Au contraire, les micelles polymérisées se distribuent sous forme intacte à l'intérieur des cellules.

Au vu des résultats *in vitro* obtenus, nous constatons que les micelles polymérisées sont beaucoup moins toxiques que les micelles non-polymérisées (viabilité cellulaire et dénaturation des membranes), et qu'elles permettent une meilleure distribution et internalisation au niveau cellulaire.

4- Synthèse du GW3965

Le GW3965 est une molécule disponible commercialement sous sa forme chlorhydrate. Cependant, le prix auquel est vendu ce composé (165 €/5 mg chez Sigma-Aldrich) nous a conduit à envisager sa synthèse à plus grande échelle selon l'approche décrite au niveau du Schéma 12.

La fonction amine primaire du 3-aminopropanol commercial est engagée dans une première réaction d'amination réductrice en présence de diphenylacétaldéhyde, d'acétate de sodium et de cyanoborohydrure de sodium dans le méthanol. L'amine secondaire issue de cette réaction (composé **I.10**) est ensuite traitée par une deuxième amination réductrice en présence cette fois de 2-chloro-3-(trifluorométhyl)benzaldehyde et de triacétoxyborohydrure de sodium dans du dichlorométhane. Le composé **I.11** obtenu est alors couplé, au niveau de sa fonction alcool, avec le méthyle-2-(3-hydroxyphényl)acétate (**I.12**) dans les conditions de Mitsunobu (PPh_3/DIAD) et le groupement ester de **I.13** est finalement saponifié par LiOH pour conduire au GW39625 (**I.14**) avec un rendement de 98 %. Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir > 600 mg de GW3965, quantité suffisante pour initier nos essais de formulation.

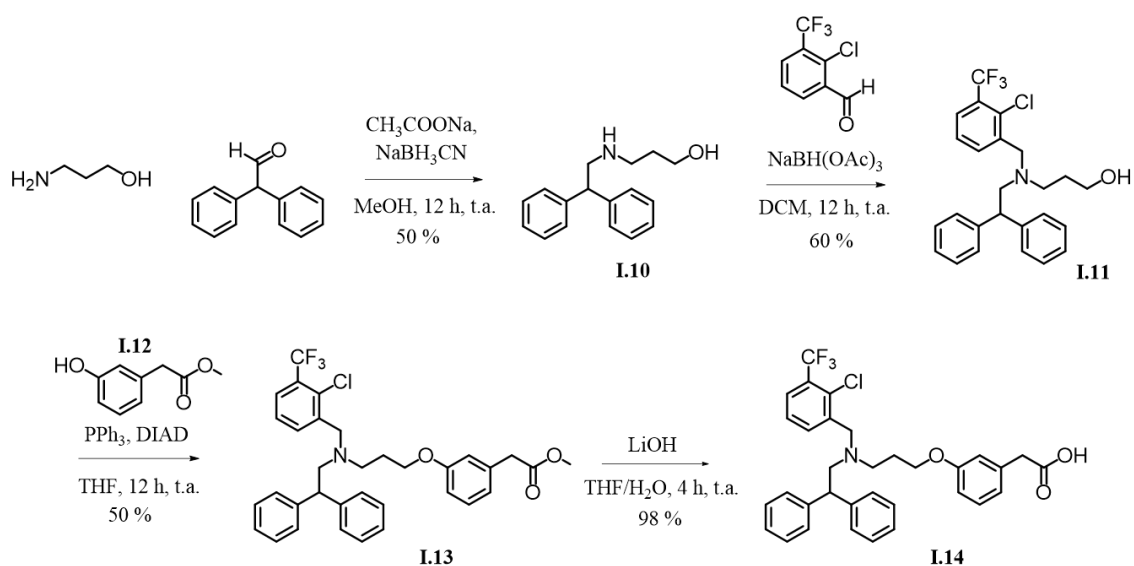


Schéma 12 : Voie de synthèse du GW3965.

5- Formulation du GW3965

5.1- Encapsulation du GW3965

La formulation du GW3965 consiste à utiliser les micelles polymérisées préalablement obtenues (PDA-PEG) pour encapsuler la molécule de GW3965 et l'emmenner en solution aqueuse.

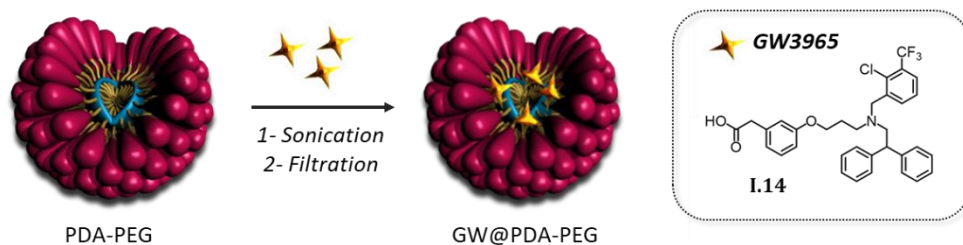


Schéma 13 : Principe de l'encapsulation du GW3965 dans les micelles PDA-PEG.

Le protocole standard d'encapsulation de molécules de nature hydrophobe dans les micelles PDA-PEG consiste à préparer une suspension aqueuse de micelles à laquelle est ajoutée une solution de la molécule à encapsuler dissoute dans un solvant organique (par ex. chloroforme). Le mélange est ensuite traité aux ultrasons afin de favoriser le transfert du composé dans le compartiment central hydrophobe de la micelle. Les ultrasons vont également créer un échauffement modéré, permettant au solvant de s'évaporer de façon concomitante à l'encapsulation. Ainsi, 200 μL d'une solution à 5 mg mL^{-1} de GW3965 dans du chloroforme sont mélangés à 1 mL d'une suspension de micelles polymérisées à 10 mg mL^{-1} pour être soniqués (30 min, puissance de sortie 45 %). La suspension est ensuite filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm afin d'éliminer la fraction GW3965 non encapsulée. La quantité de principe actif encapsulé a été mesurée par un dosage par HPLC-MS (pic UV à 280 nm). Cette quantification permet

également de confirmer l'intégrité de la molécule de GW3965 après encapsulation dans les micelles.

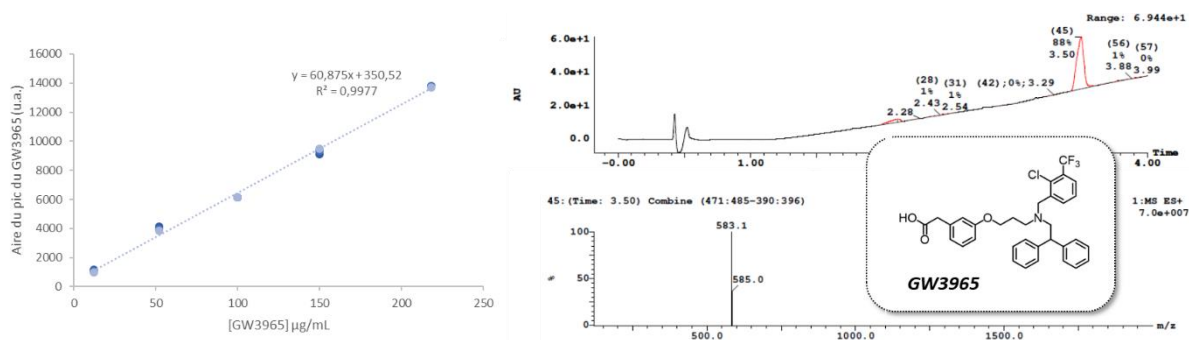


Figure 36 : Gamme d'étalonnage obtenue par HPLC-MS et profil HPLC-MS (280 nm) associé à la molécule de GW3965.

Le protocole établi permet d'atteindre une concentration en GW3965 de 0,86 mg mL⁻¹ dans 10 mg mL⁻¹ de micelles soit un taux de chargement massique (CM) de 8 % et une efficacité d'encapsulation (EE) de 86 % déterminés à partir des formules suivantes :

$$CM = 100 * \frac{m_{\text{principe actif}}}{m_{\text{principe actif}} + m_{\text{vecteur}}}$$

$$EE = 100 * \frac{m_{\text{GW final}}}{m_{\text{GW initial}}}$$

Ce même protocole a été suivi pour l'encapsulation de GW3965 sous sa forme chlorhydrate (GW3965·HCl, composé commercial). La présence du sel ne semble pas influencer sur l'efficacité d'encapsulation du GW3965 dans les micelles. Le taux d'encapsulation mesuré à 8% est comparable à ce que nous pouvons trouver dans la littérature. Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par plusieurs équipes sur des nanoparticules de copolymères, encapsulant du GW3965 où des valeurs de 60 et 80 % d'EE ont pu être atteintes.^{76,77} Compte tenu de ces résultats plutôt encourageants, des études plus approfondies (caractérisations de la nanoparticule et cinétique de libération) ont donc été réalisées.

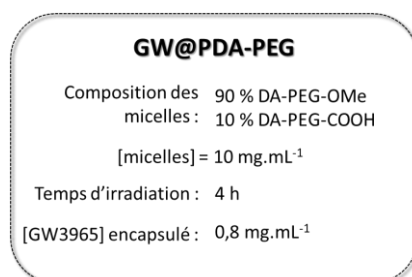


Figure 37 : Formulation du GW3965 dans des micelles PDA-PEG.

⁷⁶ Zhang, X.-Q.; Even-Or, O.; Xu, X.; van Rosmalen, M.; Lim, L.; Gadde, S.; Farokhzad, O. C.; Fisher, E. A. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 228-236.

⁷⁷ Smith, T.K.T.; Kahiel, Z.; LeBlond, N.D.; Ghorbani, P.; Farah, E.; Al-Awosi, R.; Cote, M.; Gadde, S.; Fullerton, M.D. *Molecules* **2019**, *24*, 3751.

5.2- Caractérisations de la formulation

Afin de justifier l'utilisation de cette formulation pour de futures études *in vivo*, un certain nombre de caractérisations ont été nécessaires notamment en ce qui concerne les aspects de taille et de stabilité de la formulation.

5.2.1- Détermination de la taille des particules

Une analyse par DLS a permis de déterminer le rayon hydrodynamique des micelles PDA-PEG encapsulant le GW3965. La taille des micelles encapsulant le GW3965 a été comparée à la taille des micelles vides. Aucune différence entre les deux formulations n'a été observée, nous mesurons un diamètre hydrodynamique moyen de 12 nm pour les deux échantillons.

5.2.2- Cinétique de libération du GW3965

Une étude sur la stabilité de la formulation a été réalisée afin d'évaluer la cinétique de libération de la molécule active. Pour qu'une molécule active soit libérée d'une micelle, il faut que la micelle se dissocie ou que la molécule active migre du cœur vers la périphérie de la micelle, pour finalement se retrouver dans le milieu environnant.

Les micelles PDA-PEG, ne sont que peu dissociables du fait de la polymérisation de leur cœur. Ainsi, la diffusion est probablement le mécanisme mis en jeu pour la libération de la molécule active. Afin d'étudier cette diffusion, une méthode consiste à dialyser la formulation contre un large volume d'eau. La membrane de dialyse utilisée présente une porosité qui ne laisse passer que les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à la taille des pores (3,5 kDa), sans laisser diffuser les micelles qui restent « piégées » dans le compartiment de dialyse. Ainsi, si une fuite du principe actif a lieu, celui-ci sera libéré dans le milieu aqueux.

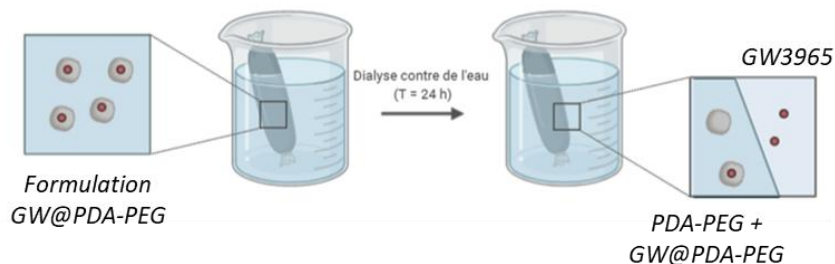


Figure 38 : Principe de la mesure de la cinétique de libération du GW3965 des micelles PDA-PEG par dialyse.

2 mL d'une suspension colloïde de micelles à 10 mg mL^{-1} contenant $0,86 \text{ mg mL}^{-1}$ de GW3965 a été placée dans un boudin et dialysée contre 2 L d'eau ultra pure. La concentration résiduelle en GW3965 a été mesurée en fonction du temps dans le sac de dialyse. Nous observons que le profil de libération du GW3965 est relativement rapide avec environ 50 % de molécule libérée après

seulement 2 h d'incubation. Au-delà de 5 h de dialyse, un palier est observé avec un peu plus de 60 % de GW3965 libéré.

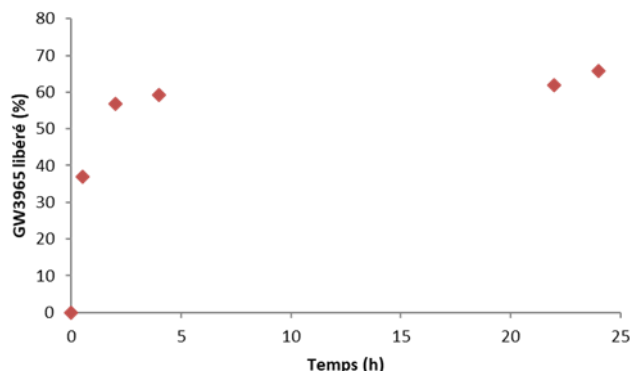


Figure 39 : Profil de libération du GW3965 des micelles PDA-PEG en fonction du temps.

Les micelles PDA-PEG sont donc capables non seulement de prendre en charge le GW3965 mais également de le libérer dans le milieu environnant. En revanche, compte tenu de la cinétique rapide de libération du GW3965 du cœur de la micelle, le stockage des suspensions doit être optimisé pour pouvoir faciliter l'utilisation de nos vecteurs nanométriques chargés en principes actifs.

5.2.3- Stabilité au stockage

Un colloïde de micelles PDA-PEG à 10 mg mL^{-1} encapsulant $0,86 \text{ mg mL}^{-1}$ de GW3965 a donc été séparé en trois lots. Chaque lot a été testé pour une condition de stockage différente :

- échantillon 1 : liquide, stocké à température ambiante
- échantillon 2 : liquide, stocké à $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- échantillon 3 : lyophilisé, stocké à température ambiante

La première observation est que les suspensions conservées à température ambiante et à $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (échantillons 1 et 2) se troublent rapidement en 24 h, ce qui suggère une libération du principe actif dans le milieu. Les deux échantillons sont filtrés sur membrane $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ afin d'éliminer le GW3965 qui aurait pu diffuser hors des micelles et précipiter dans l'eau. La concentration résiduelle de GW3965 dans les micelles est ensuite déterminée par HPLC-MS et comparée à la quantité initialement encapsulée de GW3965. Le dosage des échantillons 1 et 2 montre une fuite du principe actif des micelles qui ne contiennent plus que $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de GW3965/ 10 mg mL^{-1} de micelle après 24 h. Cette valeur est à comparer au chargement initial de $0,86 \text{ mg mL}^{-1}$, mesuré à t_0 , indiquant une perte de 65 %.

Le stockage en solution des micelles chargées n'est donc pas approprié. Par contre, une conservation sous forme lyophilisée permet de préserver le taux de chargement en GW3965. En effet, lorsque l'échantillon lyophilisé est repris dans le même volume d'eau qu'initialement après plusieurs jours de stockage à sec (2 semaines), nous mesurons un taux de chargement en GW3965 comparable au taux de chargement initial ($0,86 \text{ mg mL}^{-1}$). L'intégrité de la micelle a, par ailleurs, été validée par analyse DLS (12 nm). C'est sous cette forme lyophilisée que les micelles chargées

en principe actif seront transmises à nos collaborateurs biologistes en vue d'évaluer la capacité du GW3965 formulé sous forme de micelles à augmenter l'expression de ABCA1.

5.2.4- Efficacité *in vitro*

L'efficacité *in vitro* de la formulation a été évaluée par un test d'activité transcriptionnelle, en collaboration avec l'équipe du Dr Philippe Lesnik (UMRS 1166). Une suspension de micelles encapsulant le GW3965 (8 % en masse) a été préparée puis évaluée vis-à-vis de sa capacité à activer l'expression de ABCA1 et ABCG1 *in vitro*.

À partir de souris LDLr, (voir paragraphe III.2 pour plus de détails sur le modèle), il est possible d'obtenir des macrophages inflammatoires. Pour cela, du thioglycolate est injecté dans la cavité péritonéale des souris et après trois jours d'inflammation, les macrophages sont collectés et mis en culture. Les macrophages sont alors incubés pendant 24 h avec soit du GW3956 solubilisé dans 1 % de DMSO (contrôle positif), soit des micelles chargées en GW3965 à 8 % massique. Dans ces deux cas de figure, la concentration finale de GW3956 dans le milieu est de 100 nM. Les formulations ont été évaluées vis-à-vis de la capacité du GW3956 (natif et formulé) à augmenter le niveau d'expression de ABCA1 et ABCG1 (dosage de l'ARN messager codant pour ABCA1 et ABCG1).

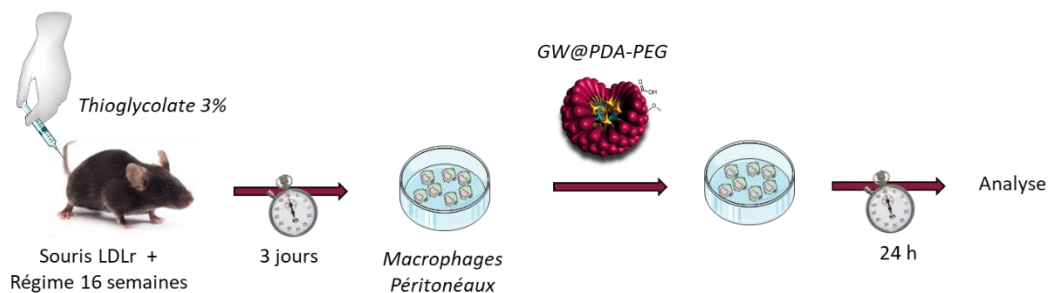


Figure 40 : Principe de l'étude d'activité transcriptionnelle *in vitro*.

La première observation est que le GW3965 solubilisé dans 1 % de DMSO ([GW3965] finale = 100 nM) induit un effet activateur ($\times 6$) de l'expression de ABCA1 dans les macrophages. Cet effet est également observé pour la formulation à 8 % du GW3965 dans les micelles PDA-PEG. Une activation de l'expression de ABCG1 un peu plus modérée est observée pour le composé seul ou formulé dans les micelles. Ces résultats montrent que la formulation n'impacte pas de façon négative l'effet activateur du GW3965 puisqu'une formulation à 8 % permet même de reproduire l'effet du médicament seul. Néanmoins, en prenant en compte nos observations antérieures pour les micelles chargées à 8 % concernant le profil de libération du GW3965 *in vitro*, nous ne pouvons exclure qu'une quantité importante de GW3965 soit libérée spontanément ce qui expliquerait ces résultats (Figure 41).

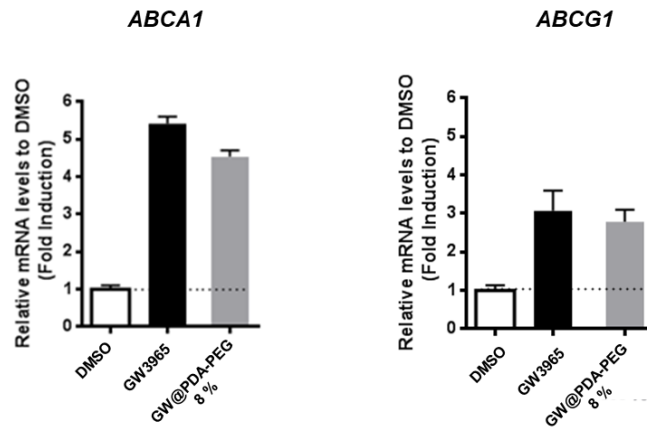


Figure 41 : Résultat de l'étude in vitro permettant de mesurer l'effet activateur de la formulation vis-à-vis de ABCA1 et ABCG1 (n = 3).

En parallèle à ces expériences *in vitro*, des études *in vivo* nous ont permis d'obtenir des profils de pharmacocinétique et de biodistribution sur les micelles seules mais aussi sur la formulation du GW3965. C'est ce que nous allons détailler dans la partie suivante de ce chapitre.

III- Études de pharmacocinétique et de biodistribution

Les études de pharmacocinétiques sont nécessaires dans le développement d'un médicament. C'est une étape obligatoire qui va permettre d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme.

1- Principes généraux sur la pharmacocinétique

Après l'administration d'un médicament, l'évolution des concentrations dans le sang dépend des voies d'administrations mais aussi des paramètres pharmacocinétiques qui décrivent le devenir du médicament. Les principaux paramètres sont :

- La biodisponibilité (F) qui est définie comme la fraction de la dose administrée qui parvient jusqu'à la circulation sanguine. Ce paramètre peut évoluer en fonction de facteurs affectant l'absorption digestive ou suite à l'effet du premier passage hépatique.
- Le volume de distribution (Vd) qui est un volume fictif théorique et qui représente la capacité d'un médicament à diffuser dans l'organisme.
- La clairance (Cl) qui correspond à la capacité de l'organisme à éliminer le médicament. Elle peut être modifiée par des facteurs affectant l'élimination rénale ou hépatique du médicament.
- La demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) qui est définie comme le temps nécessaire à la diminution de 50 % de la concentration plasmatique. Ce paramètre donne des informations sur la persistance du médicament dans le sang.

Des facteurs physiologiques, pathologiques ou environnementaux peuvent modifier les paramètres pharmacocinétiques et s'accompagneront de différences dans l'évolution des concentrations.

Dans le cadre de nos travaux, cette étude de pharmacocinétique va surtout nous permettre de comparer les performances du GW3965 formulé dans les micelles par rapport au GW3965 seul. En pratique, cette étude va consister à suivre la concentration plasmatique du GW3965 en fonction du temps, après administration par voie intraveineuse. Une fois la formulation injectée, un prélèvement sanguin rétro-orbitaire est réalisé à différents intervalles de temps. Généralement, la mise au point de protocoles d'extraction, d'identification et de dosages sont nécessaires. Cependant, nous devons également considérer le vecteur comme une molécule active à part entière. Dans ce cas précis, nous pourrions avoir recours à l'utilisation d'une sonde fluorescente. Deux axes seront donc développés dans cette partie : i) l'étude pharmacocinétique de la micelle et ii) l'étude pharmacocinétique de la micelle encapsulant le GW3965.

2- Choix du modèle animal

Dans une étude de pharmacocinétique, le choix du modèle animal est particulièrement important. Pour notre cas d'étude, nous avons choisi d'utiliser des souris. Ces animaux se reproduisent rapidement et sont facilement manipulables génétiquement. Par ailleurs, dans le cadre de recherches sur l'athérosclérose, des modèles présentant des formes d'athérosclérose, avec des développements précoces de plaques d'athérome sont utilisés. Les souris sont capables de développer des formes d'athérosclérose très rapidement, soit i) par des régimes riches en cholestérol, ii) suite à des manipulations génétiques, ou iii) suite à l'introduction de facteurs de risques, comme le diabète.⁷⁸

Trois modèles murins d'athérosclérose sont prépondérants :

- Les souris LDLr souffrant d'une mutation qui affecte la production de LDL ce qui augmente la quantité de cholestérol dans leur sang
- Les souris ApoE^{-/-} souffrant d'une mutation qui affecte la production de l'apolipoprotéine E ce qui augmente la concentration de cholestérol dans leur sang
- Les souris ApoE/LDLr développant une forme sévère d'athérosclérose.

Ces différents modèles ne permettent pas de reproduire le phénotype des plaques chez l'Homme et en particulier le phénotype de plaques instables : ce sont donc des modèles imparfaits. Deux modèles seront particulièrement utilisés dans ce chapitre : le modèle ApoE^{-/-}, disponible dans l'équipe de P. Lesnik et le modèle LDLr disponible dans l'équipe de V. Dive. Ce dernier modèle mime au mieux le profil lipidique de l'homme et a donc été privilégié afin d'étudier l'effet de nos formulations *in vivo*.

⁷⁸ Emini Veseli, B.; Perrotta, P.; De Meyer, G. R. A.; Roth, L.; Van der Donckt, C.; Martinet, W.; De Meyer, G. R. Y. *European Journal of Pharmacology* **2017**, *816*, 3-13.







	Model	Lipid profile	Plaque distribution and characteristics (20 weeks WD)	Advantages & limitations
ApoE ^{-/-}	Disruption of the ApoE gene 	Plasma cholesterol: 400-600 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD Lipoproteins: ↑ VLDL ↑ LDL ↓ HDL	 Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Develops atherosclerosis on ND ➖ No human-like lipid profile ➖ ApoE plays a role in inflammation → influence plaque development ➖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
LDLr ^{-/-}	Disruption of the LDL receptor gene 	Plasma cholesterol: 200-300 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD Lipoproteins: ↑ VLDL ↑ LDL = HDL	 Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Human-like lipid profile (LDL) ➢ Functional ApoE → no impact on inflammation ➖ Complex lesion development requires a WD ➖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
ApoE ^{-/-} LDLr ^{-/-}	Disruption of the ApoE and the LDL receptor gene 	Plasma cholesterol: 400-600 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD Lipoproteins: ↑ VLDL ↑ LDL ↓ HDL	 Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Develops atherosclerosis on ND ➖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications

Figure 42 : Modèles d'athérosclérose chez la souris.⁷⁸

3- Étude de pharmacocinétique et de biodistribution des micelles

Pour suivre la concentration dans le sang et faciliter le suivi *in vivo* de nos micelles, une sonde fluorescente a été encapsulée. L'utilisation d'une telle sonde est une méthode relativement simple et rapide puisqu'elle ne nécessite pas la mise en place de protocoles d'extraction et d'analyses de masses pour identification et dosage du composé encapsulé. Les analyses s'effectueront simplement par des mesures directes de la fluorescence à des temps donnés, juste après collecte de la fraction de sang chez l'animal.

3.1- Formulation des micelles encapsulant un fluorophore

Pour ces études, un dérivé de la cyanine 5.5 (DiD) a été utilisé comme rapporteur fluorescent. L'encapsulation de la sonde fluorescente est réalisée par dispersion aux ultrasons d'une solution de DiD (dans l'éthanol) dans des micelles PDA-PEG polymérisées à 10 mg mL⁻¹ dans l'eau. La suspension a ensuite été filtrée sur membrane 0,2 µm, puis caractérisée par DLS afin de confirmer la présence des assemblages micellaires (diamètre hydrodynamique mesuré = 12 nm). La quantité de fluorophore encapsulée dans les micelles a été quantifiée et déterminée par spectroscopie UV-visible à 644 nm (à partir du coefficient d'extinction molaire du DiD) et indique un chargement massique de 1 % de DiD dans les micelles. Cette formulation DiD@PDA-PEG est stable dans le temps, tel que mis en évidence par une mesure d'absorbance réalisée après 7 jours de stockage à 4 °C.

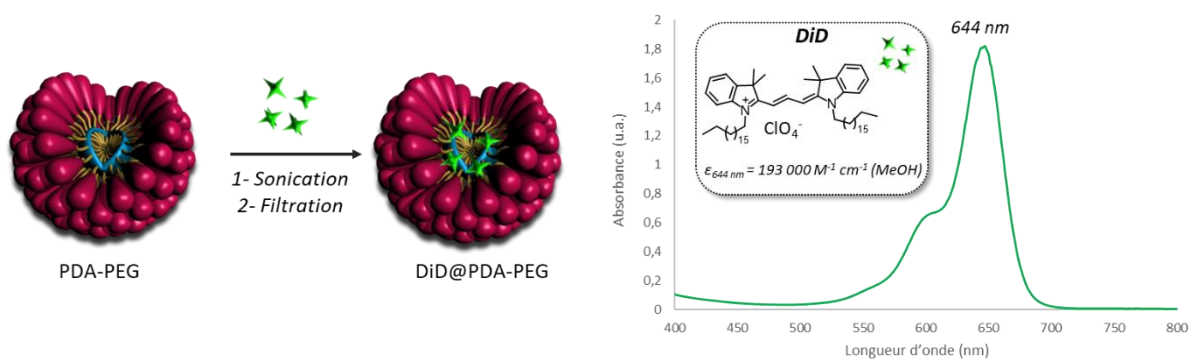


Schéma 14 : Principe de l'encapsulation du DiD dans les micelles PDA-PEG et spectre d'absorbance après dissociation des micelles dans du MeOH (dilution $\times 10$).

3.2- Étude de pharmacocinétique après administration par voie intraveineuse

La formulation DiD@PDA-PEG a été injectée par voie intraveineuse (i.v.) à des souris LDLr. Les expériences de pharmacocinétique ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de V. Dive sur un imageur FMT (*Fluorescence Molecular Tomography*) en mode transmittance. Le profil pharmacocinétique des micelles est obtenu en traçant la concentration en fluorophore dans le sang en fonction des différents temps de prélèvement ($n = 5$ sur 72 h). Ces prélèvements de sang sont effectués par voie rétro-orbitale avant d'être dosés par imagerie de fluorescence. La valeur mesurée est corrélée à une gamme de concentration préalablement établie en mélangeant différentes concentrations de fluorophore dans du sang de souris et en mesurant la fluorescence associée. Cette gamme nous permet de remonter à la quantité de fluorescence, et donc de micelle, dans le sang à un instant « t » donné.

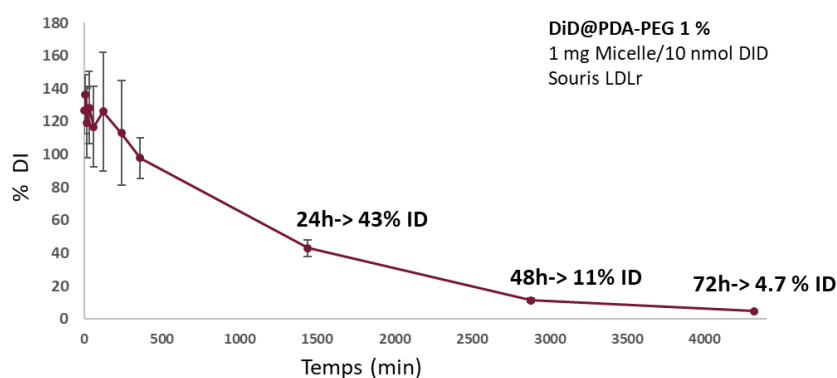


Figure 43 : Profil pharmacocinétique de micelles PDA-PEG chargées en DiD.

Un profil de pharmacocinétique caractéristique d'une injection par voie i.v. est observé, avec une décroissance exponentielle de la concentration en DiD dans le sang (Figure 43). En effet, après administration, le composé d'intérêt est directement disponible dans la circulation sanguine. Nous observons une persistance de la micelle-DiD dans le sang avec des taux circulants de 43 % à 24 h, 11 % à 48 h et > 4 % à 72 h. Des résultats antérieurs publiés par notre laboratoire avaient montré que les micelles PDA-PEG circulaient de manière moins prolongée (15 % après 24 h) dans le

sang.⁶³ Néanmoins ces données ne peuvent être comparées à notre étude dans la mesure où les formulations utilisées et les conditions du protocole *in vivo* ne sont pas identiques (fluorophore FP-730 greffé en surface des amphiphiles, injection i.v. à des souris nude et appareillage utilisé différent). Certains phénomènes biologiques liés à l'utilisation de souris LDLr pourraient être en cause d'une circulation prolongée de nos formulations (adsorption de nos formulations au niveau des lipoprotéines par exemple).

Le profil obtenu dans notre cas, avec une concentration plasmatique des micelles qui décroît très lentement dans le temps après administration, est favorable pour la suite de notre étude.

3.4- Étude de biodistribution après injection par voie intra-veineuse

En parallèle de l'étude de pharmacocinétique, une étude sommaire de biodistribution a été réalisée en collectant certains organes chez l'animal sacrifié. Ainsi, la fluorescence présente dans l'artère brachio-céphalique et le foie a été mesurée à 24, 48 et 72 h post-injection par voie i.v. Des dosages par imagerie de fluorescence des organes (*ex vivo*) ont été effectués puis corrélés à une gamme de concentration, nous permettant de remonter à la quantité de fluorescence (et donc de micelle) présente dans les différents organes (Figure 44). Nous pouvons observer la présence d'un signal de fluorescence au niveau de l'artère brachio-céphalique, signe d'une accumulation passive de nos micelles au niveau de la plaque d'athérome. Par ailleurs, de la fluorescence a également été détectée au niveau du foie ce qui est classiquement observé avec la plupart des vecteurs nanométriques. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que l'utilisation de notre formulation dans le traitement de la plaque d'athérome pourrait améliorer de manière significative le transport du composé GW3965 vers la plaque d'athérome.

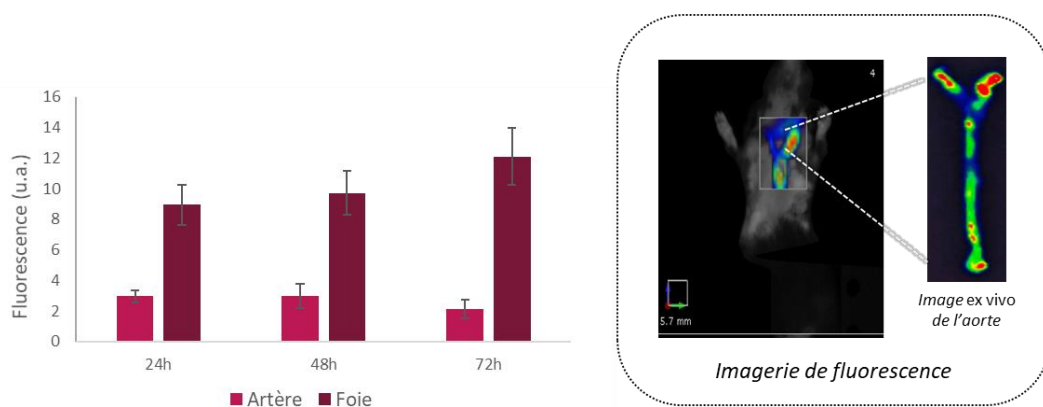


Figure 44 : Biodistribution des micelles DiD@PDA-PEG dans des souris LDLr après sacrifice à 24, 48 et 72 h. Imagerie de fluorescence après administration de la formulation 48 h post-injection chez une souris LDLr et image ex vivo de l'aorte.

Après avoir évalué le profil pharmacocinétique des micelles, nous allons maintenant nous intéresser au devenir *in vivo* de notre formulation encapsulant le GW3965.

4- Étude pharmacocinétique de la formulation du GW3965

Afin de suivre la concentration plasmatique du GW3965 formulé dans les micelles, un protocole d'extraction et de dosage de la molécule active a été développé par R. Thai (CEA/SIMOS) en utilisant une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (μ LC/MSMS)

Pour ce faire, l'échantillon de sang collecté est d'abord précipité à froid en présence d'acétone. Le but ici est de faire précipiter les protéines du sang et d'extraire le GW3965. L'échantillon est centrifugé, le surnageant est collecté, évaporé et repris dans de l'éthanol pour être analysée par μ LC/MSMS. La quantification se fait par intégration des pics UV, EIC-MS et EIC-MS² (chromatogramme de l'ion extrait) caractéristiques du GW3965 et comparés à des droites d'étalonnage établies par dissolution de GW3965 dans du sang et obtenues en suivant le même protocole.

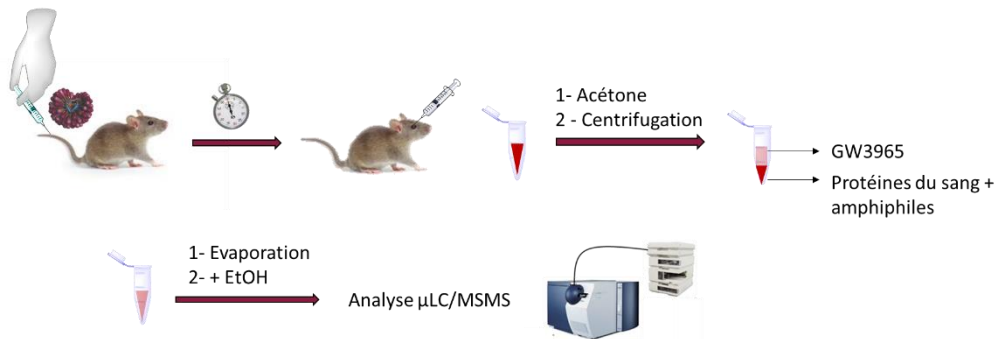


Figure 45 : Principe de l'étude de pharmacocinétique.

La formulation GW@PDA-PEG (8 %) a été injectée par voie intraveineuse à une dose de 20 μ g de GW3965 dans des souris LDLr. Le profil pharmacocinétique du GW3965 est obtenu en traçant la concentration plasmatique moyenne en fonction du temps auquel est réalisé de prélèvement. Ce profil est comparé au profil du GW3965 non formulé en micelles et qui est injecté solubilisé dans du DMSO/PBS.

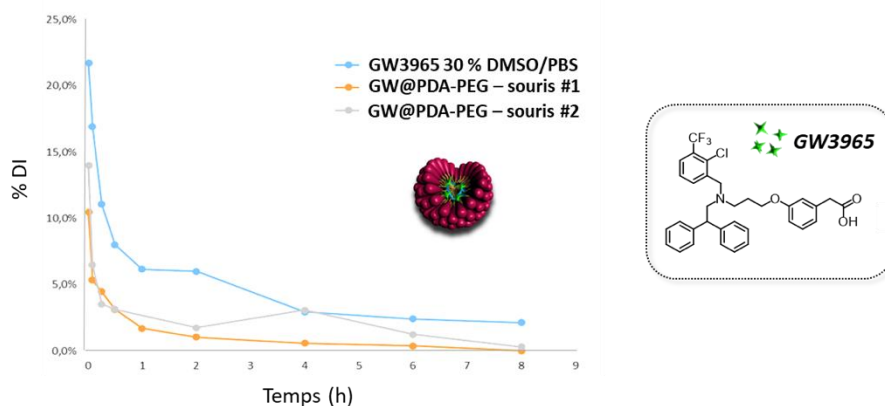


Figure 46 : Profil pharmacocinétique du GW3965 seul et de la formulation GW@PDA-PEG dans des souris LDLr (n = 2) après administration par voie i.v.

Les pharmacocinétiques du composé GW3965 seul et formulé dans les micelles présentent un profil proche avec une décroissance rapide de la concentration plasmatique. En effet, après une heure d'injection, il ne circule plus qu'environ 5 % de la dose injectée de GW3965 dans le sang. Ce résultat pourrait surprendre dans la mesure où les études préliminaires de pharmacocinétique, réalisées sur la micelle encapsulant un fluorophore (DiD@PDA-PEG), indiquaient une persistance dans la circulation sanguine (43 % de la DI 24 h post-injection). Cependant, nous avons également démontré que le GW3965 chargé à 8% dans la micelle présentait une cinétique de libération assez rapide (voir section 5.2.2) avec une « fuite » de plus de 50 % de GW3965 après seulement 2 h d'incubation. Cet effet ne nous permet pas de valoriser la formulation du GW3965 natif dans nos micelles.

Compte tenu des données de cinétique de libération de la molécule de GW3965 ainsi que des profils de pharmacocinétique obtenus, cette étude n'a pas été poursuivie et une optimisation de la formulation a été envisagée dans le but d'améliorer les propriétés du GW3965 *in vivo*. Une stratégie consiste à rendre la molécule de GW3965 plus lipophile permettant ainsi sa rétention dans le cœur de la micelle. C'est l'option que nous avons retenue et que nous allons développer dans la prochaine section.

IV- Formulation de deuxième génération

Afin de contourner les problèmes de libération précoce du GW3965 de la micelle, nous avons envisagé de modifier la structure de ce composé pour le rendre plus lipophile. Cette modification structurale a été réalisée en s'appuyant sur les données cristallographiques du GW3965 en interaction avec son récepteur privilégié.

1- Optimisation structurale et formulation

La molécule de GW3965 ne présente que très peu de groupements qui puissent être fonctionnalisés chimiquement. Il est également important d'effectuer ces modifications sans affecter ses propriétés de liaisons avec le récepteur LXR. En observant la structure cristallographique du complexe GW3965/LXR disponible dans la PDB (PDB code : 3IPQ), nous avons constaté que la fonction acide carboxylique du GW3965 pointe vers la surface de la protéine et est exposée au solvant. En nous appuyant sur cette observation, nous avons formulé l'hypothèse qu'une modification de cette fonction acide carboxylique en fonction ester n'altérerait pas de façon drastique la capacité de liaison du GW3965 modifié au niveau de sa cible.

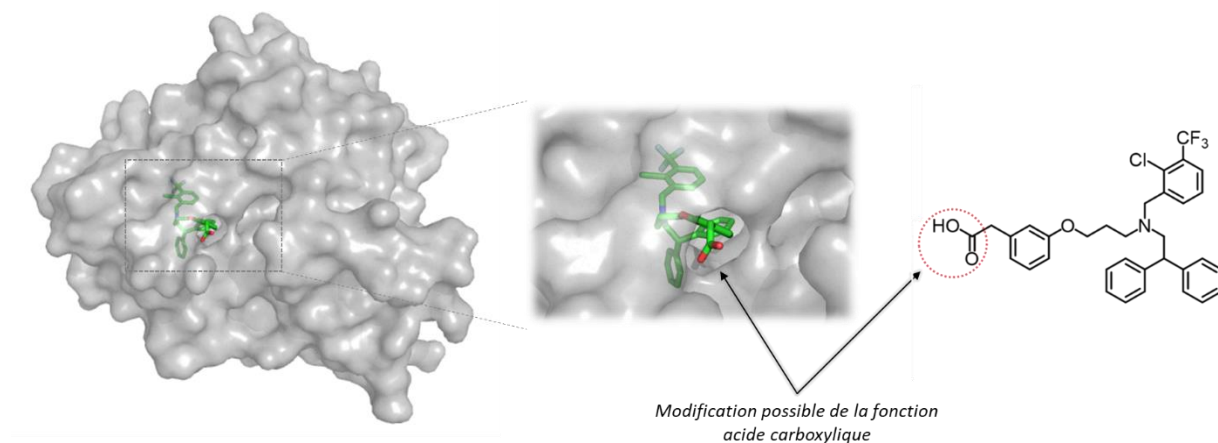


Figure 47 : Structure cristallographique du complexe GW3965/LXR et structure du GW3965 avec la zone de modification envisagée.

Des esters possédant des chaînes alkyles de différentes longueurs (groupement méthyle, chaîne hydrocarbonée de douze atomes de carbone (C12) ou seize atomes de carbone (C16)) ont été envisagés comme modification du GW3965 afin de lui conférer plus de lipophilie et lui permettre d'être mieux retenu dans les micelles.

1.1- Synthèse des dérivés du GW3965

Les dérivés du GW3965 ont été obtenus selon la voie de synthèse précédemment décrite pour le GW3965. Cette voie présente l'avantage d'être modulaire puisque le même précurseur (composé **I.11**) sera utilisé afin d'obtenir les nouveaux dérivés du GW3965 par couplage avec les modules **I.12**, **I.15** ou **I.16** qui incorporent des groupements R de taille variable.

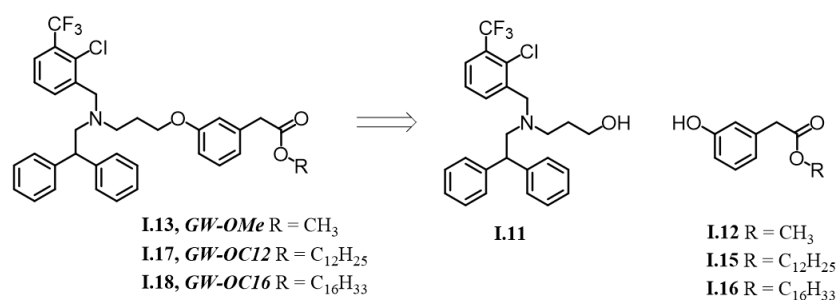


Schéma 15 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention des dérivés du GW3965.

Les composés **I.12**, **I.15** et **I.16** ont été obtenus par estérification de l'acide 3-hydroxyphenylacétique avec les alcools correspondants (respectivement, méthanol, dodécanol et hexadécanol) présence d'acide sulfurique. Les esters obtenus sont ensuite engagés dans une réaction de Mitsunobu avec le précurseur **I.11** en présence de DIAD et de PPh₃. Ce couplage permet d'accéder de façon efficace aux composés attendus **I.13**, **I.17** et **I.18** après purification.

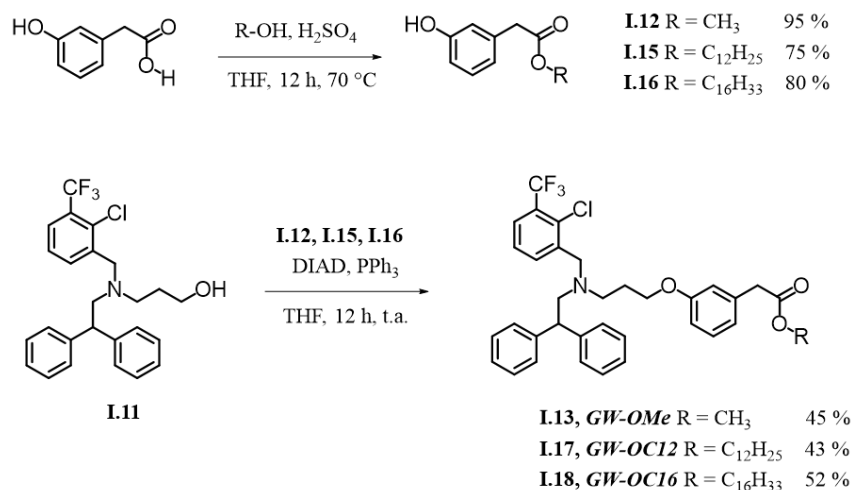


Schéma 16 : Voie de synthèse des dérivés du GW3965.

Les dérivés **I.13**, **I.17** et **I.18** (respectivement GW-OMe, GW-OC12 et GW-OC16) ont ensuite fait l'objet de différents essais de formulation dans les micelles PDA-PEG.

1.2- Formulation dans les micelles PDA-PEG et caractérisations

Nous avons formulé les dérivés du GW en suivant le protocole établi pour le GW3965. Les différents dérivés du GW3965 ont été solubilisés dans du chloroforme (solution à 5 mg mL⁻¹), puis 200 µL de cette solution ont été ajoutés à 1 mL de micelles polymérisées PDA-PEG à 10 mg mL⁻¹ dans l'eau. La suspension est ensuite traitée aux ultrasons afin de favoriser le transfert de la molécule hydrophobe dans la micelle et créer parallèlement un échauffement permettant au chloroforme de s'évaporer (30 min, puissance en sortie 45 %). Les différentes suspensions ont ensuite été filtrées sur membranes 0,2 µm afin d'éliminer la fraction non-encapsulée des dérivés du GW3965.

Trois formulations ont donc été obtenues :

GW-OMe@PDA-PEG	GW-OC12@PDA-PEG	GW-OC16@PDA-PEG
Composition des micelles : 90 % DA-PEG-OMe 10 % DA-PEG-COOH	Composition des micelles : 90 % DA-PEG-OMe 10 % DA-PEG-COOH	Composition des micelles : 90 % DA-PEG-OMe 10 % DA-PEG-COOH
[micelles] = 10 mg.mL ⁻¹	[micelles] = 10 mg.mL ⁻¹	[micelles] = 10 mg.mL ⁻¹
Temps d'irradiation : 4 h	Temps d'irradiation : 4 h	Temps d'irradiation : 4 h
DLS : 20 nm	DLS : 14 nm	DLS : 12 nm
[GW3965] encapsulé : 0,7 mg.mL ⁻¹	[GW3965] encapsulé : 0,8 mg.mL ⁻¹	[GW3965] encapsulé : 0,9 mg.mL ⁻¹

Figure 48 : Formulations des dérivés du GW3965 dans les micelles PDA-PEG.

Les différents échantillons ont ensuite été caractérisés par DLS qui confirme la présence de structures nanométriques de taille compatible (12-20 nm) avec les micelles. La quantification du chargement des micelles avec le dérivé du GW3965 a été par la suite réalisée par dosage spectroscopique UV-visible à 272 nm. Ce dosage permet de quantifier de manière absolue la fraction de GW3965-modifié encapsulé grâce à une droite de calibration préalablement obtenue.

Nous constatons rapidement que le dérivé GW-OMe n'est pas stable dans le cœur de la micelle. Ce phénomène est similaire à celui observé pour la formulation du GW3965. En effet, un trouble apparaît après un jour de stockage à température ambiante ce qui indique probablement une libération de la molécule active dans le milieu.

Les dérivés GW-OC12 et -OC16 ont pu être formulé efficacement (respectivement 0,8 et 0,9 mg mL⁻¹). Par ailleurs, des tests de stabilité ont été réalisés après 1 semaine de stockage à température ambiante et les quantités de dérivés du GW3965 restent inchangées. Cette observation confirme que la modification moléculaire permet une stabilisation par effet hydrophobe plus importante et autorise le maintien de la molécule active dans le cœur de la micelle.

Ces formulations GW-OC12@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG ont par la suite été étudiées vis-à-vis de leur capacité à activer *in vitro* la transcription des gènes ABCA1 et ABCG1.

1.3- Études *in vitro* sur l'efficacité de la formulation

Avant d'effectuer les études de pharmacocinétique, nous avons vérifié que les dérivés du GW-OC12 et -OC16, ainsi que leur formulation en micelles possédaient un mode d'action comparable à celui du GW3965, c'est-à-dire capable d'activer l'expression des gènes ABCA1 et ABCG1. Pour cela, des études d'activité transcriptionnelle *in vitro* similaires à celles réalisées sur la formulation GW@PDA-PEG ont été effectuées sur les deux formulations identifiées comme étant les plus stables en milieu aqueux : GW-OC12@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG.

Des macrophages inflammatoires issus de souris traitées au thioglycolate ont été mis en culture en présence de : i) GW3965, ii) GW-OC12, iii) GW-OC16 et iv) de leurs formulations en micelles et l'effet des différents composés sur le niveau d'expression de ABCA1 et ABCG1 a été mesuré par dosage des ARN messagers correspondants ([GW] = 100 nM).

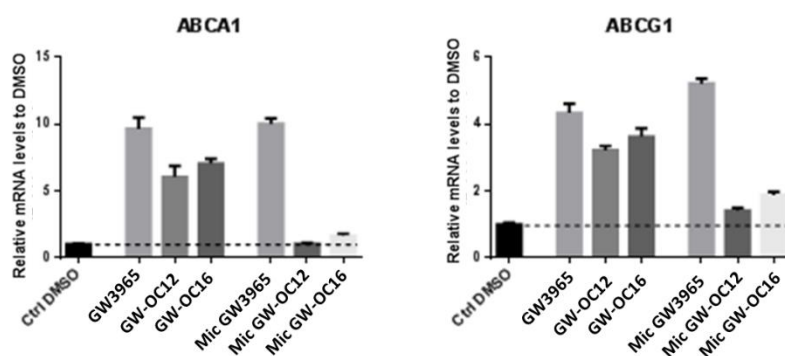


Figure 49 : Résultats de l'étude *in vitro* permettant de mesurer l'effet activateur des formulations sur ABCA1 et ABCG1.

Les profils obtenus montrent que les composés GW-OC12 et GW-OC16 seuls, préalablement solubilisés dans le DMSO, sont capables d'activer l'expression des gènes ABCA1 et ABCG1 même

si l'effet est légèrement moins prononcé que le composé GW3965 de référence. Ces résultats positifs suggèrent soit i) que la modification structurale du GW3965 au niveau de l'acide carboxylique transformé en ester n'affecte pas les propriétés de liaisons du dérivé au niveau du récepteur LXR soit ii) que la fonction ester est instable dans nos conditions de test, ce qui aurait pour effet de libérer progressivement le GW3965 non modifié au cours du temps. Quoi qu'il en soit les composés modifiés sont actifs sur l'expression des gènes cibles.

Par ailleurs, les composés GW-OC12 et GW-OC16 encapsulés dans les micelles PDA-PEG conduisent également à une activation de ABCA1 et ABCG1. Même si l'amplitude de cette activation est plus modérée que celle observée pour les composés seuls (non formulés en micelles), GW-OC16 a notamment un effet quantifiable sur l'activation ABCA1 et plus encore sur ABCG1. Cette tendance à l'activation des gènes cibles *in vitro* est plutôt prometteuse pour la suite de notre étude. Cette différence de comportement entre les esters de GW-OC12/OC16 dans le DMSO et les formulations micellaires (des mêmes composés), pourrait avoir pour origine la stabilité colloïdale de GW-OC12@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG. En effet, les esters lipophiles restent préférentiellement encapsulés dans le cœur des micelles, les rendant peu disponibles pour des interactions avec leur cible. Afin de contourner cette limitation, des temps d'incubation plus longs (supérieurs à 24 h) pourraient permettre d'augmenter la proportion de molécules libérées dans le milieu.

2- Études *in vivo* des formulations des dérivés du GW

2.1- *Étude de pharmacocinétique*

En parallèle à cette évaluation *in vitro*, la pharmacocinétique des formulations micellaires de GW-OC12 et GW-OC16 a été étudiée chez la souris LDLr ($n = 2$). À cet effet, un protocole d'extraction et de dosage similaire à celui décrit pour le GW3965 a été employé. Comme dans le cas du GW3965, les quantités de dérivés du GW3965 circulant ont été déterminées à partir de droites d'étalonnage. Les profils pharmacocinétiques obtenus sont présentés dans la Figure 50.

L'allure des profils pharmacocinétiques diffère selon les formulations. La pharmacocinétique des micelles GW-OMe@PDA-PEG semble être comparable à celle du GW@PDA-PEG avec une clairance sanguine extrêmement rapide et moins de 5 % de la dose injectée présente en circulation quelques minutes post injection. Dans le cas des formulations GW-OC12@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG, les dérivés du GW3965 circulent beaucoup plus longtemps avec respectivement, 28 % et 43 % de la dose injectée encore présente en circulation au bout de 24 h. Ces résultats semblent indiquer une corrélation directe entre longueur de la chaîne grasse et temps de circulation. Ainsi, plus la chaîne grasse est longue, plus le temps de circulation dans le sang est prolongé, renvoyant à une excellente stabilité de la formulation micellaire.

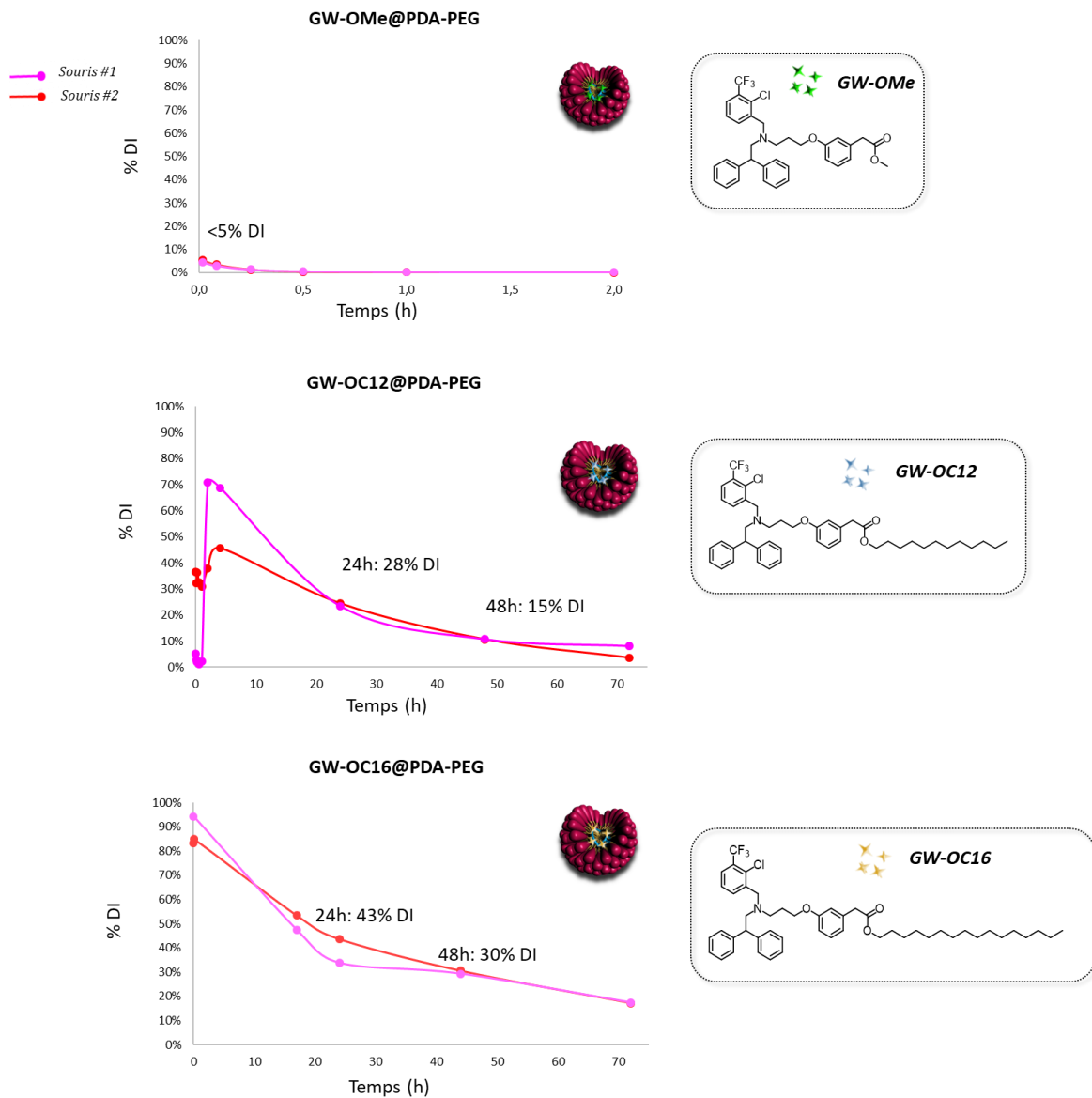


Figure 50 : Profils pharmacocinétiques des formulations des dérivés du GW.

Les formulations GW-OC12@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG permettent ainsi de maintenir durablement les dérivés du GW3965 en circulation. À ce titre, la formulation GW-OC16@PDA-PEG semble être la plus intéressante pour de futures études *in vivo*.

Par ailleurs il est intéressant de noter qu'aucune hydrolyse de l'ester n'a été détectée par analyse de masse suite au dosage des échantillons. Des études de stabilité de la formulation GW-OC16@PDA-PEG ont été effectuées dans du broyat de foie à 37 °C pendant 16 h et aucune modification du GW-OC16 n'a été observée.

Afin de confirmer le potentiel de la formulation GW-OC16@PDA-PEG, une évaluation de l'activité transcriptionnelle *in vivo* a été effectuée.

2.2- Étude de l'activité transcriptionnelle *in vivo*

Cette étude consiste à administrer nos formulations chez des souris LDLr ayant suivi un régime riche en cholestérol et à extraire les ARNm au niveau de certains organes, en particulier le foie et l'aorte. L'activité induite par GW-OC16@PDA-PEG sera comparée au GW3965 seul et formulé en micelles.

Un protocole d'injections multiples a été utilisé afin de maximiser l'effet pharmacologique. Pour cela, trois injections *in vivo* ont été réalisées à 48 h d'intervalle sur 5 jours (soit 6 mg kg⁻¹ par jour de GW3965 ou de son dérivé administré) à la suite desquelles des lysats de foie et d'aorte ont été récupérés afin d'en extraire les ARNm. Les taux d'expression des gènes cibles du LXR (ABCA1 et ABCG1) ont été étudiés. Par ailleurs, les effets des différents composés testés sur le taux de triglycérides (TG) circulants et hépatiques ont été évalués. Les résultats de cette étude sont représentés dans la Figure 51.

Un des effets de l'utilisation d'agonistes du LXR dans le traitement de l'athérosclérose est que, malgré l'augmentation du flux de cholestérol dans les macrophages présents au niveau des plaques, ces composés modifient le métabolisme des lipides hépatiques en favorisant la stéatose hépatique (c'est-à-dire l'accumulation de corps gras au niveau du foie) et une hypertriglycéridémie (augmentation du taux de triglycérides dans le sang). Le taux de triglycérides circulants et hépatiques a donc été mesuré chez les souris traitées avec le GW3965 et comparé avec celui mesuré chez les souris traitées avec les formulations GW3965@PDA-PEG et GW-OC16@PDA-PEG. Alors que nous observons une augmentation des triglycérides hépatiques et plasmatiques induite par le composé GW3965, les formulations en micelles n'activent pas le métabolisme des lipides hépatiques. Les taux relevés pour les micelles GW3965@PDA-PEG et GWOC16@PDA-PEG sont comparables à ceux du contrôle négatif. Ces résultats suggèrent donc que la formulation en micelle atténue les effets délétères du GW3965 chez les souris.

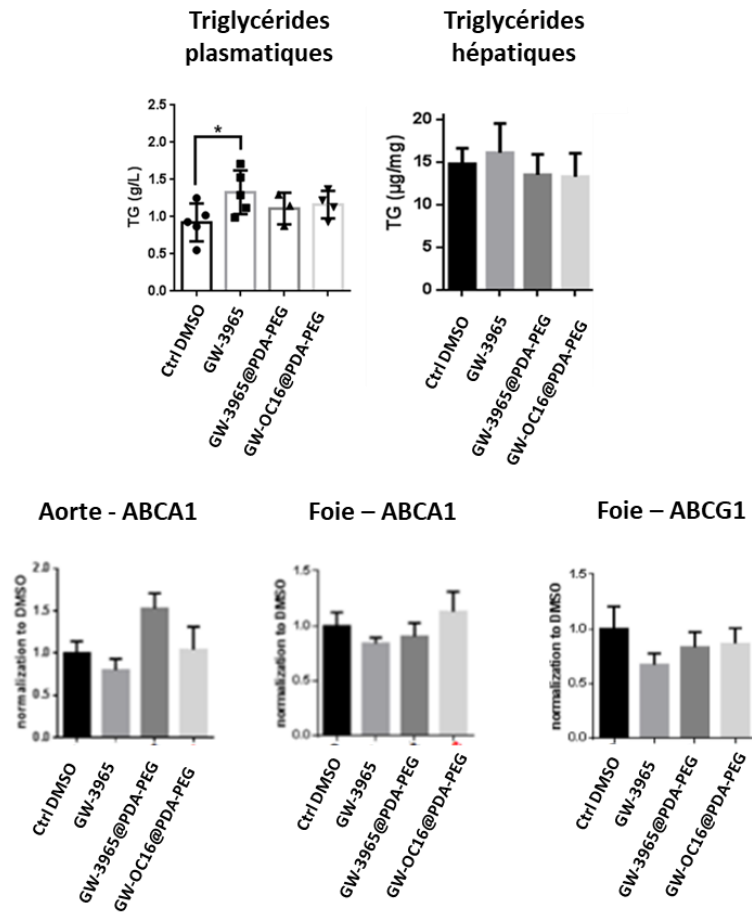


Figure 51 : Étude des formulations GW-OC16@PDA-PEG et GW3965@PDA-PEG sur l'activation de l'expression de ABCA1 au niveau du foie et de l'aorte.

Nous avons ensuite analysé les changements observés dans l'expression des gènes du LXR au niveau d'homogénats de foie et d'aorte afin de déterminer les effets des différentes formulations. Alors que le GW3965 seul n'active pas ou peu l'expression de ABCA1 et ABCG1, le GW3965 et son dérivé -OC16 formulés dans les micelles PDA-PEG semblent l'activer mais de façon modérée, que ce soit dans le foie ou l'aorte. Collectivement, ces données indiquent donc que les formulations micellaires protègent d'une hyperlipidémie et d'une accumulation de triglycérides dans le foie. Elles permettent également d'activer l'expression d'un des gènes cibles.

L'effet global est donc plutôt favorable même si l'activation des gènes codant pour ABCA1 reste moyenne. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique des formulations en micelles, nous avons envisagé de les fonctionnaliser avec un ligand, le RXP470.1.

V- Fonctionnalisation pour du ciblage actif

Compte tenu des résultats obtenus *in vivo* sur l'activation des gènes cibles du LXR, il a été envisagé de fonctionnaliser les micelles à l'aide d'un ligand permettant de cibler les populations de macrophages de la plaque pour une meilleure efficacité thérapeutique. Le RXP470.1, qui, pour rappel, est capable de se lier spécifiquement au niveau d'une métalloprotéase (MMP-12) surexprimée au niveau des plaques d'athérome sera utilisé dans le cadre de cette étude pour la fonctionnalisation des micelles PDA-PEG.

Outre son rôle de ligand, le RXP470.1 est également connu pour bloquer la progression de la plaque d'athérome. En effet, certaines MMP ont la capacité de stabiliser la plaque alors que d'autres, comme la MMP-12 favorisent un phénotype de plaque instable par l'intermédiaire de nombreux mécanismes incluant la destruction de la matrice extracellulaire.^{70,79} L'utilisation du RXP470.1 en tant qu'inhibiteur permet de réduire significativement la plaque d'environ 50 % et améliore la composition de ces dernières favorisant un phénotype beaucoup plus stable.⁷⁰ De ce fait, un traitement pourrait consister à combiner l'effet inhibiteur du RXP470.1 à l'effet anti-inflammatoire des dérivés GW3965.

1- Modification de l'amphiphile pour un ciblage actif

La formulation PDA-PEG utilisée jusqu'à présent comprend dans sa composition 10 % en masse d'amphiphiles DA-PEG-CO₂H. Ces derniers ont été ajoutés dans la composition des micelles afin de pouvoir y greffer, via un lien peptidique, un agent de ciblage.

Le RXP470.1 a également été modifié de manière à y introduire une fonction amine latérale dans le but d'effectuer un couplage avec l'acide carboxylique de l'amphiphile. Des modifications structurales en C-ter ont préalablement été effectuées et n'affectent pas les propriétés de liaison du RXP470.1 avec sa cible MMP-12. Ceci a été validé aussi bien pour des couplages avec des agents d'imagerie que pour des fonctionnalisations à la surface de nanoparticules.^{80,81} Les dérivés du RXP470.1 préalablement développés par l'équipe de V. Dive sont généralement constitués du motif RXP470.1 et d'un bras espaceur de type amino-poly(éthylène glycol) (RXP470-PEG₂-NH₂).

⁷⁹ Newby, A. C. *Trends in cardiovascular medicine* **2007**, *17*, 253-258.

⁸⁰ Bordenave, T.; Helle, M.; Beau, F.; Georgiadis, D.; Tepshi, L.; Bernes, M.; Ye, Y.; Levenez, L.; Poquet, E.; Nozach, H.; Razavian, M.; Toczek, J.; Stura, E. A.; Dive, V.; Sadeghi, M.; Devel, L. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 2407-2417.

⁸¹ Devel, L.; Almer, G.; Cabella, C.; Beau, F.; Bernes, M.; Oliva, P.; Navarro, F.; Prassl, R.; Mangge, H.; Texier, I. *Molecules* **2019**, *24*, 3499.

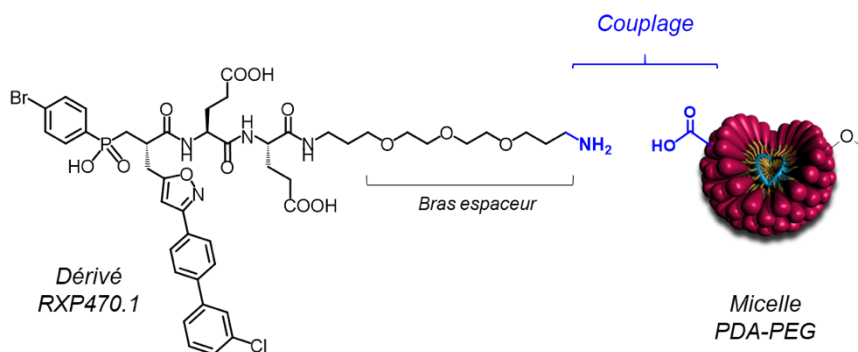


Figure 52 : Structure du RXP470.1 modifié en C-ter pour un couplage avec la fonction acide carboxylique de la micelle PDA-PEG.

1.1- Fonctionnalisation des micelles.

La stratégie de fonctionnalisation des micelles consiste à utiliser les micelles préformées par assemblage d'amphiphiles/polymérisation et à réaliser un couplage à la surface des micelles.

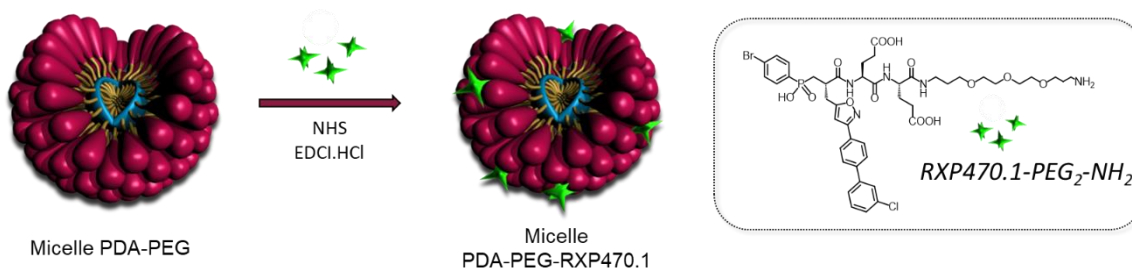


Schéma 17 : Stratégie de fonctionnalisation avec le dérivé du RXP470.1.

Pour cela, des micelles PDA-PEG à 10 mg mL^{-1} sont activées au niveau de la fonction acide carboxylique en présence de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDCI-HCl, 10 équiv.) et de *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS, 10 équiv.) dans du tampon phosphate salin, pendant 30 min à température ambiante. Du mercaptoéthanol (10 équiv.) est ensuite introduit puis laissé sous agitation 30 min, afin de neutraliser l'EDCI en excès. Le RXP470-PEG₂-NH₂ est finalement ajouté au milieu réactionnel (2 équiv.) après avoir ajusté le pH du milieu à 7,5 à l'aide d'une solution de NaOH (1 M). La réaction est laissée sous agitation pendant 24 h puis le mélange est purifié par dialyse (cut-off 10 kDa, 1 mL de solution contre 400 mL d'eau) jusqu'à ce qu'aucun RXP470-PEG₂-NH₂ libre ne soit détecté dans le sac de dialyse (analyse en spectrométrie de masse). Les micelles brutes sont collectées et purifiées par chromatographie d'exclusion stérique pour conduire aux micelles PDA-PEG-RXP470.1.

Les micelles PDA-PEG-RXP470.1 sont ensuite caractérisées pour i) quantifier le taux de RXP470.1 effectivement introduit à la surface des micelles, et ii) mesurer l'affinité du RXP470.1 lié à la micelle vis-à-vis de la MMP-12.

1.2- Caractérisations

La présence du RXP470.1 à la surface des micelles a été confirmée par un dosage en acides aminés (réalisé au CEA/SIMOS). Cette méthode permet de quantifier les deux résidus glutamates présents dans la structure du RXP470.1. Un taux de fonctionnalisation de 6 % en RXP470.1 à la surface des micelles a été mesuré, ce qui signifie que si l'on considère que la micelle est constituée de 100 unités amphiphiles (dont 10 sont des amphiphiles **I.6** fonctionnalisables (-CO₂H)), 6 d'entre eux sont effectivement liés au RXP470.1.

Des tests d'affinité *in vitro* vis-à-vis de plusieurs MMP ont été réalisés permettant de valider la capacité de liaison sélective de la nouvelle formulation avec la MMP-12 (Figure 53). On constate que le RXP470.1 greffé en surface des micelles perd légèrement en affinité vis-à-vis de la MMP-12 (2,5 nM pour PDA-PEG-RXP470.1 contre 0,2 nM pour le RXP470.1 seul), mais les valeurs de Ki mesurés sont acceptables d'autant que la sélectivité par rapport aux autres MMP est préservée. Ce profil est comparable aux profils obtenus pour d'autres dérivés du RXP470.1 ce qui est rassurant quant au comportement de nos micelles.^{82,80}

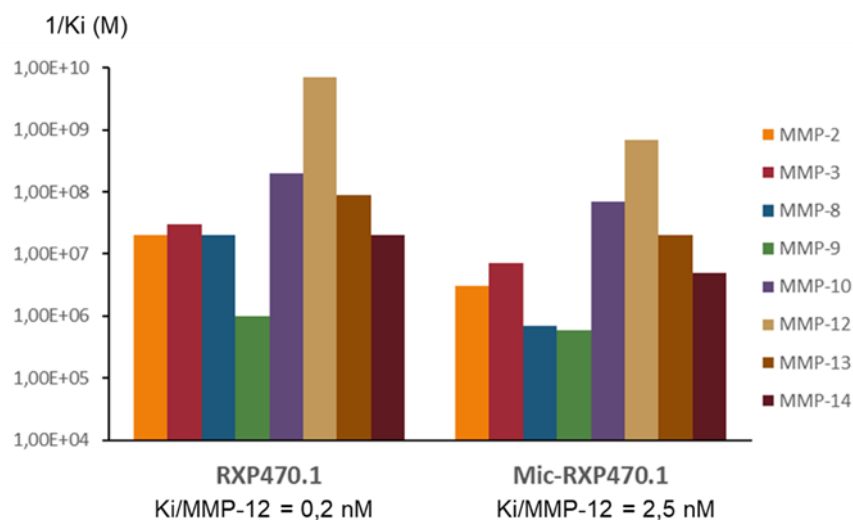


Figure 53 : Profil d'affinité et sélectivité du RXP470.1 et des micelles fonctionnalisées par le dérivé du RXP470.1 vis-à-vis de plusieurs MMP.

Des analyses DLS ont également permis de confirmer la présence de micelles en suspension. Les particules détectées présentent un diamètre hydrodynamique conservé de 12 nm.

Après avoir confirmé la capacité de liaison des micelles PDA-PEG-RXP470.1 à la MMP-12, nous allons maintenant nous intéresser à des études *in vivo* pour le ciblage de la plaque sur un modèle murin d'athérosclérose.

⁸² Razavian, M.; Bordenave, T.; Georgiadis, D.; Beau, F.; Zhang, J.; Golestani, R.; Toczek, J.; Jung, J.-J.; Ye, Y.; Kim, H.-Y.; Han, J.; Dive, V.; Devel, L.; Sadeghi, M. M. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 38345.

2- Étude *in vivo* avec le RXP470.1

Un profil de pharmacocinétique de la micelle PDA-PEG-RXP470.1 a été réalisé sur un modèle de souris LDLr. Les micelles sont tout d'abord chargées en fluorophore (DiD) (1 % massique) afin de pouvoir les tracer *in vivo*. Les micelles rendues fluorescentes sont alors injectées et des fractions de sang collectées à différents intervalles, nous permettant d'établir le profil pharmacocinétique des micelles fonctionnalisées avec leur ligand. Les résultats ont été comparés à ceux de la formulation DiD@PDA-PEG, c'est-à-dire des micelles non fonctionnalisées.

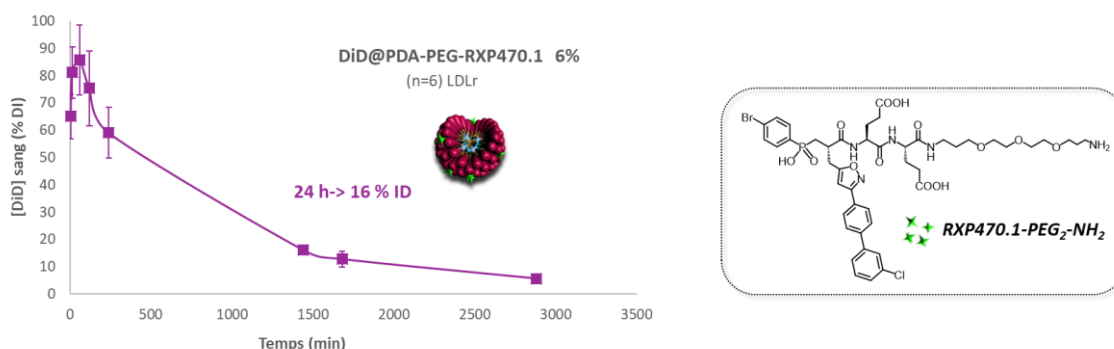


Figure 54 : Profil de pharmacocinétique de micelles fonctionnalisées à 6 % par le dérivé RXP470.1.

Le profil pharmacocinétique montre une élimination beaucoup plus rapide des micelles PDA-PEG-RXP470.1 que les micelles PDA-PEG « nues » (voir Figure 43). En effet, après 24 h, seuls 16 % de la dose injectée de PDA-PEG-RXP470.1 demeurent dans la circulation sanguine. Cette valeur est à comparer aux 43% des micelles PDA-PEG sans ligands qui sont toujours circulantes à 24 h. La présence des ligands RXP470.1 à la surface des micelles semble donc impacter défavorablement les interactions du vecteur avec le milieu biologique en favorisant probablement les phénomènes d'opsonisation et l'élimination « prématurée » de la micelle PDA-PEG-RXP470.1.^{83,84}

Malgré une pharmacocinétique moins favorable que celle des micelles non fonctionnalisées, nous avons cependant souhaité pouvoir évaluer la capacité des micelles PDA-PEG-RXP470.1 à s'accumuler au niveau de la crosse aortique et plus particulièrement dans les populations ciblées de macrophages (Coll. P. Lesnik). Deux lots de micelles ont été préparés, un lot de micelles sans ligand et un avec 6% de RXP470.1. Les deux lots sont rendus fluorescents par encapsulation de 1% de DiD et injectés à des modèles murins d'athérosclérose (LDLr). 100 µL de micelles à 10 mg mL⁻¹ sont injectés par voie intraveineuse aux souris et les organes d'intérêt (ici la crosse aortique) sont collectés 72 h après administration. L'aorte est digérée, les suspensions cellulaires sont fractionnées et analysées par cytométrie en flux. Ces expériences permettent une quantification du signal de fluorescence présent dans différentes populations cellulaires, dont les macrophages.

⁸³ Salvati, A.; Pitek, A. S.; Monopoli, M. P.; Prapainop, K.; Bombelli, F. B.; Hristov, D. R.; Kelly, P. M.; Aberg, C.; Mahon, E.; Dawson, K. A. *Nature Nanotechnology* **2013**, *8*, 137-143.

⁸⁴ Xiao, W.; Gao, H. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *552*, 328-339.

La première observation est que nous détectons de la fluorescence dans les populations de macrophages, que ce soit pour les micelles « nues » ou celles avec ligand. Cependant, l'intensité de fluorescence est deux fois plus intense pour les micelles PDA-PEG-RXP470.1, ce qui suggère une accumulation plus marquée de la micelle incorporant le RXP470.1, par rapport à la micelle contrôle sans ligand. L'accumulation des micelles fonctionnalisées a également pu être mise en évidence par microscopie de fluorescence qui indique également que les micelles RXP470.1 se localisent principalement au niveau de zones tissulaires riches en macrophages (Figure 55).

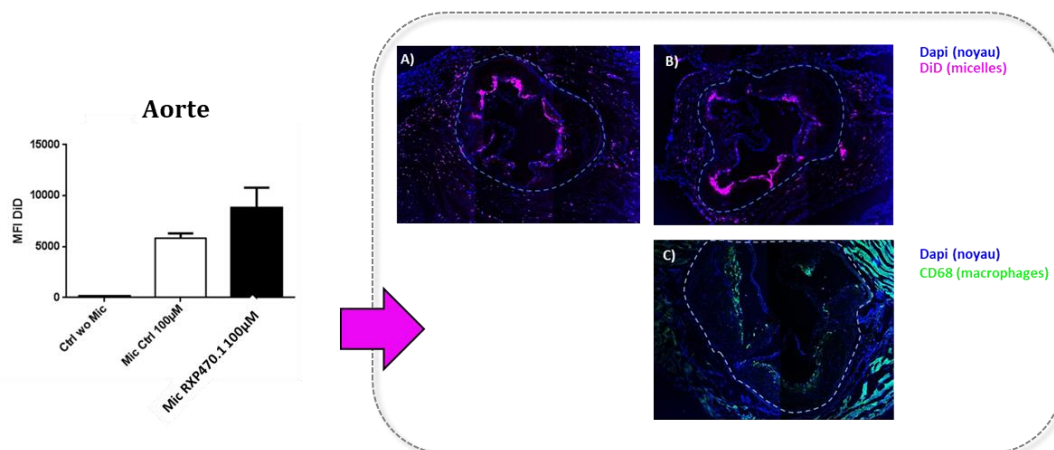


Figure 55 : Évaluation de la capture des micelles RXP470.1 au niveau de macrophages isolés d'une aorte et imagerie de fluorescence d'une plaque d'athérome. (A) micelles encapsulant du DiD, (B) micelles RXP470.1 encapsulant du DiD, (C) marqueur des macrophages (CD68).

Ces dernières expériences nous confortent donc dans la capacité de la micelle à cibler la plaque d'athérome. Cet effet a pu être accentué par l'ajout d'un ligand à la surface des micelles, qui conduit à une accumulation préférentielle du vecteur dans les populations de macrophages ciblées. Faute de temps nous n'avons pas pu explorer plus avant l'effet thérapeutique de cette formulation en y associant le dérivé ester du GW3965 développé précédemment. L'effet combiné du RXP470.1 et du GW3965 reste par ailleurs à valider dans la réduction synergique de la plaque d'athérome.

VI- Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la vectorisation d'une molécule anti-inflammatoire dans le but de minimiser ses effets indésirables. Ce composé, le GW3965, active l'expression de gènes impliqués dans le processus de transport inverse du cholestérol et limite, de ce fait, l'accumulation de cholestérol au niveau des plaques d'athérome. Dans ce contexte, nous avons envisagé de formuler la molécule de GW3965 dans des micelles PDA-PEG afin d'améliorer le ciblage et limiter les effets indésirables.

Des premiers essais de formulation du GW3965 dans les micelles PDA-PEG ont conduit à un taux de chargement de 8 % mais des tests *in vitro* ont mis évidence une forte instabilité de la formulation qui conduit à une libération prématurée principe actif. Il a donc été envisagé de modifier structurellement le GW3965 en y adjoignant un groupement lipophile afin d'augmenter son hydrophobicité et améliorer sa rétention dans la micelle.

Différents dérivés esters du GW3965 ont été synthétisés, encapsulés dans les micelles et évalués biologiquement. Sur la base des profils de stabilité dans la micelle et de sa pharmacocinétique, la formulation faisant intervenir le dérivé GW-OC16 est apparue comme étant la plus prometteuse avec un temps de circulation long (43% de la dose injectée encore présente dans le sang à 24 h). Le composé GW-OC16 seul ou formulé en micelle possède des propriétés d'activation de l'expression des gènes cibles du LXR non seulement *in vitro*, mais également *in vivo* avec un effet cependant beaucoup moins prononcé.

Nous avons par la suite envisagé d'améliorer la capacité de ciblage de nos micelles en y adjoignant le RXP470.1 qui est un ligand/inhibiteur de la métalloprotéase MMP12, surexprimée au niveau de la plaque d'athérome. Le profil pharmacocinétique des micelles fonctionnalisées avec le RXP470.1 diffère de celui de la micelle « nue » avec seulement 16 % de la dose injectée qui persiste dans le sang 24 h post-injection. Ces micelles fonctionnalisées sont cependant capables de s'accumuler dans des zones riches en macrophages, tel que démontré dans la crosse aortique avec une accumulation deux fois supérieure à celle des micelles n'incorporant pas le RXP470.1. Ce résultat met en avant l'efficacité de l'approche « ciblage actif » qui est médiée par le ligand RXP470.1.

À ce stade, nous pourrions donc envisager de futures études à l'aide de micelles PDA-PEG fonctionnalisées par le RXP470.1 et chargées avec un dérivé ester du GW3965. L'action au niveau du récepteur LXR et les effets sur le processus de RCT devront être validés sur des modèles murins d'athérosclérose. Enfin, l'effet synergique du RXP470.1 et du GW3965 sur la progression de la plaque devra également être évalué.

Chapitre 2 : Micelles fluorées pour l'imagerie par résonance magnétique du fluor

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive très largement utilisée en clinique. Elle permet notamment d'accéder à des images de tissus mous avec un très bon contraste et d'acquérir des données aussi bien structurales que fonctionnelles. Contrairement à d'autres modalités d'imagerie comme la tomographie par émission de positons (TEP-scan), l'IRM est non-ionisante et ne présente pas de danger particulier pour le patient. Cette technique est classiquement basée sur la détection des protons de l'eau qui sont abondants dans les tissus, ce qui permet d'obtenir des images anatomiques d'une très grande précision. Dans certains cas, des agents de contraste à base de chélates du gadolinium peuvent être administrés dans le but d'améliorer la visualisation des tissus pathologiques. Ces agents vont perturber les protons de l'eau qui les entourent et ainsi produire un contraste plus marqué au niveau de l'image enregistrée.

Malgré les efforts réalisés dans la conception d'agents de contraste, un certain nombre de limitations persistent. En effet, le manque de spécificité lié à la détection « indirecte » des agents de contraste (visualisation non pas de l'agent lui-même mais de son influence sur l'eau environnante) nécessite des traitements de données supplémentaires, en fonction des agents de contraste utilisés et des caractéristiques des tissus, ce qui rend la quantification d'autant plus complexe. Par ailleurs, afin de surmonter la sensibilité relativement faible de l'IRM, des concentrations élevées en agents de contraste (le plus souvent à base de métaux) peuvent être administrées, conduisant à une potentielle toxicité associée.

Afin d'améliorer la spécificité de détection et autoriser une détection « directe » (visualisation de l'agent lui-même), des agents de contraste incorporant dans leur structure des atomes visibles en IRM (c'est-à-dire possédant un moment magnétique de spin) tels que ^{13}C , ^{31}P ou ^{19}F ont été développés. Même si elle n'est que très peu utilisée en routine, l'imagerie par IRM du fluor-19 est à ce jour la plus prometteuse. En effet, la sensibilité élevée du noyau « F » et la quasi absence de fluor dans l'organisme permet d'avoir accès à une détection fine et très spécifique du signal. Cependant cette méthode d'imagerie nécessite d'être optimisée, notamment au niveau des agents de contraste utilisés.

I- L'IRM ^{19}F en tant qu'outil diagnostique de tumeurs solides

1- Principe de l'IRM

1.1- Principe physique

Basée sur le principe de la RMN (résonance magnétique nucléaire), l'IRM utilise les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène (ou autres atomes avec des valeurs de spin non nulles) qui sont activées à l'aide d'électro-aimants puissants. Le patient est positionné dans un champ magnétique statique. En l'absence de champ magnétique, l'orientation des moments magnétiques nucléaires (ou spins) est aléatoire (Figure 56, A). Lorsqu'un champ magnétique d'amplitude B_0 est introduit, les spins vont s'orienter dans la direction parallèle ou antiparallèle au champ (Figure 56, B).

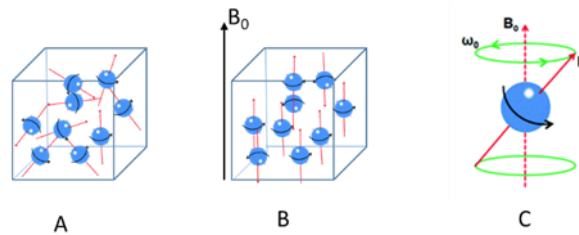


Figure 56 : Représentation des spins nucléaires a) avant application d'un champ magnétique, b) après application du champ B_0 , c) précession de spin autour de B_0 .

À proximité de la zone à étudier, une antenne va générer des impulsions d'ondes radio-fréquences (à la fréquence de Larmor⁸⁵) très brèves qui vont modifier l'orientation des spins. Après chaque impulsion radio-fréquence, le noyau entre en résonance : il retourne à sa position d'origine avec un mouvement de précession à une fréquence similaire à celle qui l'a désorienté. Le retour des spins à leur état initial est caractérisé par deux temps de relaxation, T_1 et T_2 (Figure 57) qui correspondent respectivement au temps de relaxation longitudinal (repousse de la composante M_z) et transversal (disparition de la composante M_{xy}).⁸⁶

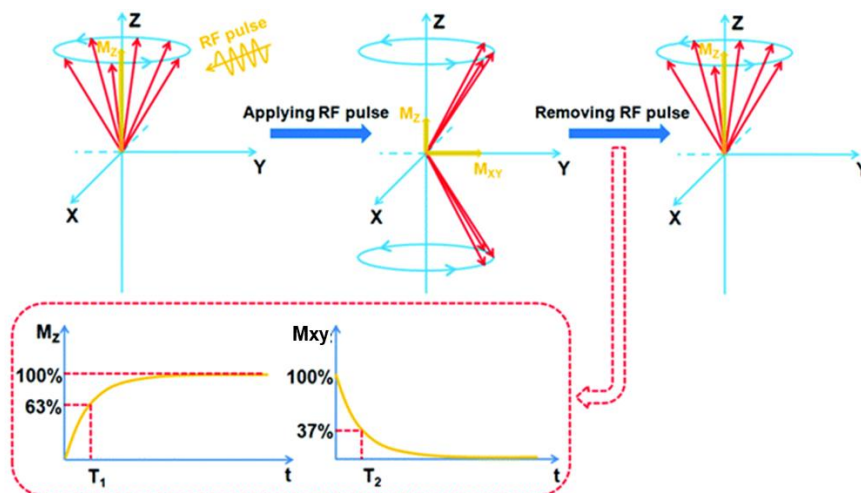


Figure 57 : Représentation schématique du principe de la RMN. Après une impulsion RF, les protons sont excités puis retour des spins à leur état initial. Représentation graphique de la relaxation T_1 et T_2 .⁸⁶

La relaxation s'accompagne d'une précession autour de l'axe dirigé dans le sens de B_0 . Ce phénomène de précession conduit finalement à l'observation d'un signal RMN après transformée de Fourier.

La dernière étape consiste à produire une image et nécessite de localiser le signal. C'est pourquoi un champ magnétique variable est appliqué en chaque point de l'espace à imager à l'aide

⁸⁵ Fréquence de Larmor : $\omega_0 = \gamma B_0$ avec γ le rapport gyromagnétique qui traduit la vitesse de précession d'un noyau par rapport au champ magnétique (unité $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$).

⁸⁶ Cao, Y.; Xu, L.; Kuang, Y.; Xiong, D.; Pei, R. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, *5*, 3431-3461.

de gradients d'encodage. La provenance des différents signaux détectés pourra ensuite être évaluée en fonction de leur fréquence de précession.

1.2- Agents de contraste développés pour l'IRM

Les agents de contraste aujourd'hui utilisés en clinique ont pour objectif d'interagir avec les molécules d'eau qui sont dans leur environnement proche : ils vont modifier les temps de relaxation T_1 et T_2 des protons de l'eau.

Ces agents de contraste peuvent être classés en 2 familles principales, d'après leur mécanisme principal d'action :

- 1) Les agents paramagnétiques qui réduisent principalement le temps de relaxation T_1 et génèrent un hypersignal (contraste positif) sur des images IRM pondérées en T_1 . Les lanthanides, tels que le gadolinium, sont connus pour provoquer cet effet ;
- 2) Les agents super-paramagnétiques qui réduisent principalement le temps de relaxation T_2 , ce qui produit un hyposignal (contraste négatif) sur les images pondérées T_2 . Les particules métalliques d'oxyde de fer en sont un bon exemple.⁸⁷

Le manque de spécificité dans la détection du signal induit par ces agents de contraste est un facteur limitant. Les nanoparticules d'oxyde de fer ont par exemple été retirées du marché car le signal induit (contraste négatif) est difficilement interprétable dans le contexte d'un diagnostic. Il apparaît ainsi intéressant de poursuivre le développement de nouveaux outils pour l'IRM en se basant sur la détection de noyaux sensibles autres que le proton.

2- IRM du fluor-19

2.1- Avantages du fluor-19

L'IRM du fluor présente un certain nombre d'avantages comme l'abondance naturelle de 100 % du noyau ^{19}F . Les caractéristiques RMN du ^{19}F et du ^1H sont relativement proches : ils possèdent tous deux un spin nucléaire de $\frac{1}{2}$, le rapport gyromagnétique du ^{19}F est de 40,05 MHz/T (contre 42,57 MHz/T pour ^1H) et sa sensibilité est très proche de celle du proton (83 %).⁸⁸

Par ailleurs, notre organisme ne contient que très peu de fluor endogène. Il est présent à l'état de traces au niveau des os et des dents mais sa concentration ne dépasse pas les 10^{-6} M (contre 88 M pour les protons de l'eau). Immobilisé dans une phase solide, le fluor endogène présente un temps de relaxation T_2 très court et n'est donc pas « visible » en utilisant des méthodes d'IRM conventionnelles.⁸⁹ Il est ainsi possible d'enregistrer des images sans bruit de fond et la provenance du signal ^{19}F est, sans ambiguïté, associée à l'agent de contraste fluoré administré. Par ailleurs, et contrairement à l'IRM du proton, le signal mesuré en IRM ^{19}F est directement proportionnel à la concentration en fluor de l'agent de contraste, ce qui autorise des expériences d'imagerie quantitative.

⁸⁷ Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodriguez-Rodriguez, A.; Caravan, P. *Chemical Reviews* **2019**, *119*, 957-1057.

⁸⁸ Bartusik, D.; Aebischer, D. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2014**, *68*, 813-817.

⁸⁹ Ruiz-Cabello, J. s.; Barnett, B. P.; Bottomley, P. A.; Bulte, J. W. M. *NMR in Biomedicine* **2011**, *24*, 114-129.

Après administration, l'espèce chimique fluorée utilisée comme agent de contraste, se retrouve diluée dans l'organisme. Afin de récolter le maximum de signal, l'acquisition des données nécessite d'augmenter, comparativement à l'imagerie du proton, les temps d'acquisition et de diminuer la résolution spatiale des images pour garantir un rapport signal-sur-bruit suffisant. Avec les techniques actuelles, il est possible de détecter des concentrations en fluor de l'ordre du millimolaire (mM) avec des temps d'acquisition longs (de l'ordre d'une heure) qui ne sont pas toujours compatibles avec des applications *in vivo*.⁹⁰ Concilier une durée d'acquisition exploitable pour des applications *in vivo* avec une qualité d'image suffisante est ainsi l'un des défis à relever pour l'IRM du fluor.

Pour améliorer significativement la sensibilité de détection des images ¹⁹F, il faut un agent de contraste possédant une forte densité de noyaux ¹⁹F associée à une concentration tissulaire élevée. C'est en s'appuyant sur ces prérequis que les premiers agents de contraste pour l'IRM ¹⁹F ont été développés.

2.2- Développement de sondes fluorées

La première image IRM ¹⁹F a été obtenue en 1977 à partir de solutions de fluorure de sodium et de perfluorotributylamine. L'imagerie *in vivo* d'abdomen de rats a été réalisée quelques années plus tard par l'équipe de McFarland en utilisant plusieurs anesthésiants fluorés ou des substituts synthétiques du sang tels que le Fluosol-DA (composé à 14 % de perfluorodecaline et à 6 % de perfluorotripropylamine).⁹¹ Depuis, l'IRM ¹⁹F a trouvé de nombreux champs d'application, comme la mesure de la pression en O₂ au niveau des tissus tumoraux par des modifications des temps de relaxation T₁ et T₂, le suivi *in vivo* de cellules marquées par l'agent de contraste fluoré ou encore dans la détection de plaques d'athérome. Ces applications mettent en évidence le potentiel de cette modalité d'imagerie.^{92,93,94}

Les perfluorocarbones (PFC) sont les premiers composés à avoir été utilisés comme agents de contraste en IRM ¹⁹F. Ces composés sont généralement inertes et non toxiques *in vivo*, même à des concentrations élevées. Par ailleurs, ils ne sont pas dégradés à pH physiologique, ne sont pas métabolisés par des enzymes et ont tendance à être éliminés par le système réticulo-endothélial. Du fait de leur faible solubilité en phase aqueuse, ces composés sont souvent formulés en nano-émulsions (100–300 nm), généralement composées de lipides, phospholipides ou de copolymères (PLGA), permettant également d'améliorer leur temps de circulation dans le sang.⁹⁰

Le bromure de perfluorooctyle (PFOB), qui compte parmi les PFC les plus utilisés, est biocompatible et a été approuvé par la FDA dans les années 90. Néanmoins ce composé possède un certain nombre de fluors magnétiquement non-équivalents ce qui peut créer des artefacts de

⁹⁰ Tirotta, I.; Dichiarante, V.; Pigliacelli, C.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G. *Chemical Reviews* **2015**, *115*.

⁹¹ McFarland, E.; Koutcher, J.; Rosen, B.; Teicher, B.; Brady, T. *Journal of computer assisted tomography* **1985**, *8-15*.

⁹² Zhao, D.; Constantinescu, A.; Jiang, L.; L, J.; Hahn, E. W.; Mason, R. *American journal of clinical oncology* **2001**, *24*, 462-466.

⁹³ Srinivas, M.; Heerschap, A.; Ahrens, E. T.; Figdor, C. G.; de Vries, I. J. M. *Trends in biotechnology* **2010**, *28*, 363-370.

⁹⁴ Lanza, G. M.; Yu, X.; Winter, P. M.; Abendschein, D. R.; Karukstis, K. K.; Scott, M. J.; Chinen, L. K.; Fuhrhop, R. W.; Scherrer, D. E.; Wickline, S. A. *Circulation* **2002**, *106*, 2842-2847.

déplacement chimique avec des images répliquées. En effet, le spectre RMN du PFOB présente un pic pour le groupement CF_3 (arbitrairement assigné au déplacement chimique 10), un deuxième pic pour le groupement CF_2Br (à +18 ppm par rapport au CF_3) et un massif de six résonances pour les groupements CF_2 (Figure 58). Afin d'améliorer la sensibilité de détection, des optimisations au niveau des séquences IRM ^{19}F ont par exemple été développées spécifiquement pour le PFOB.⁹⁵ Autrement, des sondes perfluorées générant un pic unique en RMN comme dans le cas du composé PFCE, peuvent être utilisées.

L'éther couronne perfluoré (PFCE) est un PFC composé de 20 atomes de fluor qui sont tous magnétiquement équivalents. Cette équivalence génère un pic unique en RMN du fluor ce qui permet d'obtenir une grande sensibilité sans aucun artefact de déplacement chimique.⁹⁶ En revanche, les résultats *in vivo* semblent montrer que le PFCE persiste dans l'organisme plusieurs mois après son administration.⁹⁷

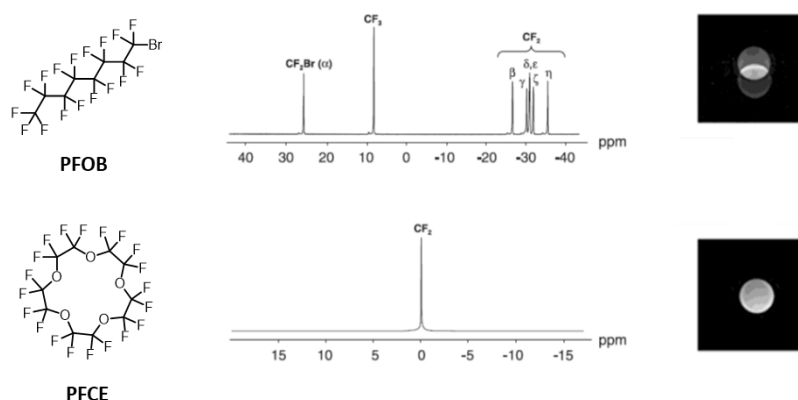


Figure 58 : Structures des molécules de PFOB et PFCE avec les spectres RMN ^{19}F et les images IRM ^{19}F associées.⁹⁷

En 2014, un nouveau composé pour des applications en IRM ^{19}F est décrit dans la littérature.⁹⁸ Il s'agit du PERFECTA (Figure 59) qui est un éther ramifié incorporant 36 atomes de fluor tous magnétiquement équivalents. Il présente une très bonne compatibilité cellulaire et possède des propriétés spectrales (temps de relaxation et sensibilité) particulièrement adaptées à une utilisation *in vivo*. Il peut être facilement synthétisé et a déjà été formulé en émulsions d'huile de carthame et de lécithine dans l'eau.

⁹⁵ Giraudeau, C.; Flament, J.; Marty, B.; Boumezbeur, F.; Mériaux, S.; Robic, C.; Port, M.; Tsapis, N.; Fattal, E.; Giacomini, E.; Lethimonnier, F.; Le Bihan, D.; Valette, J. *Magnetic Resonance in Medicine* **2010**, 63, 1119-1124.

⁹⁶ Kislukhin, A. A.; Xu, H.; Adams, S. R.; Narsinh, K. H.; Tsien, R. Y.; Ahrens, E. T. *Nature materials* **2016**, 662-668.

⁹⁷ Jacoby, C.; Temme, S.; Mayenfels, F.; Benoit, N.; Krafft, M. P.; Schubert, R.; Schrader, J.; Flogel, U. *NMR in Biomedicine* **2014**, 27, 261-271.

⁹⁸ Tirotta, I.; Mastropietro, A.; Cordiglieri, C.; Gazzera, L.; Baggi, F.; Baselli, G.; Bruzzone, M. G.; Zucca, I.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Baldelli Bombelli, F.; Metrangolo, P.; Resnati, G. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136, 8524-8527.

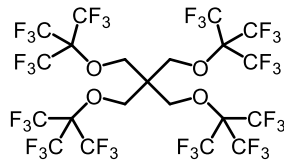


Figure 59 : Structure de la molécule de PERFECTA

Les propriétés IRM du PERFECTA ont été évaluées sur des fantômes qui ont permis de déterminer la concentration minimale en fluor détectable *via* l'utilisation d'un imageur préclinique de 7 T (Figure 60, A). Ces émulsions ont ensuite été utilisées afin de marquer des cellules dendritiques qui ont été injectées par voie intra-musculaire à des souris et des images ont été obtenues *in vivo* en seulement 10 minutes d'acquisition (Figure 60, B et C).

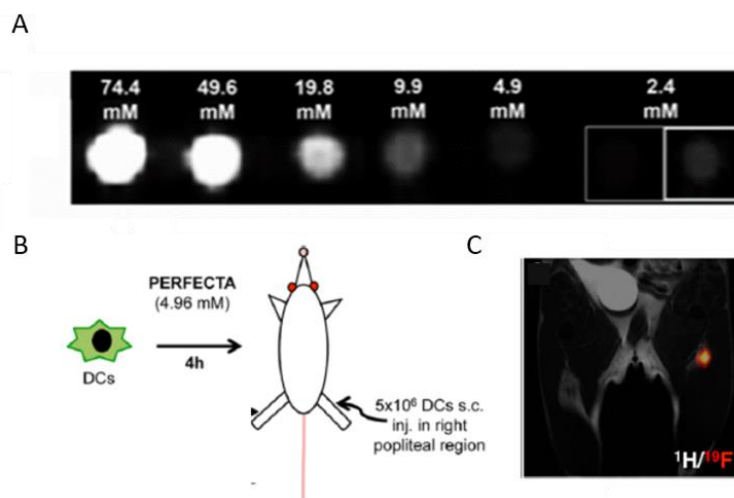


Figure 60 : (A) Expériences IRM ^{19}F réalisées sur des fantômes contenant des nanoémulsions de PERFECTA diluées dans de l'eau à différentes concentrations. (B) Mode opératoire utilisé pour l'injection de cellules dendritiques (DC) marquées par les nanoémulsions de PERFECTA et (C) image IRM ^{19}F *in vivo*.⁹⁸

Ces séries d'optimisations autour du développement d'agents de contraste pour de l'imagerie IRM ^{19}F nous permettent aujourd'hui d'en décrire les caractéristiques idéales. L'agent de contraste doit répondre à un certain nombre d'exigences : i) contenir un grand nombre d'atomes de fluor équivalents, ii) être stable chimiquement, iii) être peu toxique et iv) présenter un spectre RMN simple (pic unique en RMN ^{19}F).⁹⁰

Afin de valoriser le potentiel des sondes fluorées pour des applications diagnostiques et thérapeutiques, de nombreuses approches ont été envisagées pour leur administration, dont l'utilisation de formulations nanométriques. Ces dernières permettent d'améliorer la solubilité des sondes en milieu physiologique et peuvent être fonctionnalisées de manière à y incorporer des agents de ciblage et/ou des molécules thérapeutiques.

3- Applications à l'imagerie de tissus tumoraux

Une des applications développées ces dernières années consiste à utiliser des émulsions de sondes fluorées afin d'imager des tissus tumoraux. Des nanoparticules fonctionnalisées ont ainsi été conçues, permettant de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Des nanocapsules ont par exemple été fonctionnalisées à l'aide d'un peptide RGD reconnu par les récepteurs de certaines cellules tumorales (intégrines $\alpha_v\beta_3$) mais aussi au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux néoangiogéniques. Ces systèmes nanométriques de 120 nm de diamètre sont composés de copolymères PLGA-PEG qui ont une grande efficacité d'encapsulation vis-à-vis du PFOB (85 %). Cette formulation a été injectée par voie intraveineuse à des souris et la zone tumorale a pu être visualisée par IRM ^{19}F .⁹⁹

Plus récemment, des polymères fluorés hyperbranchés à base de PEG ont été utilisés pour la détection *in vivo* de cellules du mélanome B16 par imagerie combinée ^{19}F MRI/fluorescence. Par rapport à l'exemple décrit ci-dessus où la sonde est simplement encapsulée dans le vecteur, la sonde fluorée est ici liée de manière covalente à la nanoparticule.¹⁰⁰

À l'heure actuelle, aucune publication ne fait état de l'imagerie *in vivo* de tissus tumoraux *via* l'utilisation de nanoparticules incorporant du PERFECTA. Compte tenu des propriétés IRM évoquées précédemment (un seul pic de résonance/forte concentration en atomes de fluor équivalents) et du savoir-faire du laboratoire dans l'assemblage de micelles, nous avons envisagé de développer des micelles capables d'encapsuler le PERFECTA et de l'emmener vers sa cible tumorale. Dans un contexte d'imagerie des tissus tumoraux, ces micelles ne nécessiteront pas de fonctionnalisation particulière car nous souhaitons exploiter l'effet EPR qui permet une accumulation passive de la micelle dans la tumeur. Néanmoins, pour d'autres applications, qu'elles soient diagnostiques et/ou thérapeutiques, une fonctionnalisation de surface reste envisageable.

4- Vers la conception de micelles fluorées

Les sondes utilisées pour l'imagerie IRM ^{19}F sont pour la plupart perfluorées, c'est-à-dire constituées de chaînes fluoro-carbonées aux propriétés physicochimiques particulières. Il est donc nécessaire de concevoir un système de micelles capables de prendre en charge de telles molécules, qui sont classiquement insolubles en phase organique et en phase aqueuse.

En 2004, Hoang et Mecozzi décrivent la dispersion en phase aqueuse de molécules entièrement fluorées à l'aide d'amphiphiles co-polymères fluorés. Ces blocs de co-polymères sont dispersables dans l'eau et conduisent à des auto-assemblages micellaires possédant une phase « cœur » fluorée. En effet, les propriétés des chaînes fluorées (faible polarisabilité du fluor et plus grand volume de van der Waals) fournissent une force motrice permettant aux amphiphiles perfluorés de s'auto-assembler dans des solutions aqueuses sous la forme de micelles. Par ailleurs, du fait d'une CMC plus faible par rapport à leurs homologues hydrogénés, les amphiphiles

⁹⁹ Diou, O.; Fattal, E.; Delplace, V.; Mackiewicz, N.; Nicolas, J.; Mériaux, S. b.; Valette, J.; Robic, C.; Tsapis, N. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *87*, 170-177.

¹⁰⁰ Rolfe, B. E.; Blakey, I.; Squires, O.; Peng, H.; Boase, N. R. B.; Alexander, C.; Parsons, P. G.; Boyle, G. M.; Whittaker, A. K.; Thurecht, K. J. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 2413-2419.

perfluorés présentent une meilleure stabilité. Ces systèmes ont, par la suite, prouvé leur efficacité à solubiliser en phase aqueuse un anesthésiant utilisé en clinique sous forme vaporisée (sévoflurane), ce qui ouvre la possibilité d'administrer ce composé par voie intraveineuse.¹⁰¹

5- Objectifs

Nous avons envisagé de modifier les micelles classiquement développées dans notre laboratoire en remplaçant le cœur hydrocarboné par un cœur perfluorocarboné, de manière à créer un environnement favorable pour la prise en charge d'une sonde fluorée et sa dispersion en phase aqueuse.

Les objectifs de ce chapitre sont donc de présenter l'assemblage de nouveaux amphiphiles fluorés en micelles. Nous évoquerons : i) la synthèse des unités amphiphiles fluorés, ii) leur assemblage en micelles et l'encapsulation du PERFECTA, iii) la caractérisation physico-chimique du système, iv) l'évaluation *in vitro* et iv) l'évaluation *in vivo* par IRM préclinique. Le potentiel diagnostique de la nouvelle formulation sera évalué par la mise en place d'un protocole d'imagerie sur des souris porteuses de tumeurs.

II- Formulation du PERFECTA à l'aide de micelles fluorées

1- Synthèse des amphiphiles PFTD-PEG

Le devenir *in vivo* des vecteurs étant principalement contrôlé par leur chimie de surface et compte tenu des résultats précédemment obtenus sur les micelles PDA-PEG, nous avons opté pour une tête polaire de type PEG₂₀₀₀. Notre amphiphile (PFTD-PEG, Figure 61) sera composé d'une chaîne hydrophobe perfluorée à 14 atomes de carbone et d'un éther de polyéthylène glycol hydrophile. Les deux parties sont reliées entre elles par un simple lien éther qui présente une très grande robustesse.

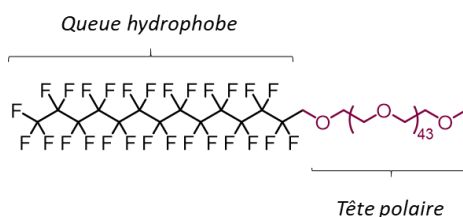


Figure 61 : Structure de l'amphiphile PFTD-PEG.

La synthèse de l'amphiphile PFTD-PEG est simple et s'effectue en deux étapes linéaires. Du PEG sous forme d'éther de monométhyle ($M_n = 2000$) est activé par du chlorure de mésyle en présence de triéthylamine dans du dichlorométhane. Le PEG activé **II.1** est ensuite mis à réagir avec l'alcoolate (obtenu par déprotonation préalable au NaH) du 1*H*,1*H*-perfluoro-1-tétradécanol

¹⁰¹ Hoang, K. C.; Mecozzi, S. *Langmuir* **2004**, *20*, 7347-7350.

(PFTD). La réaction procède par une substitution nucléophile du PEG activé **II.1** au reflux du THF et permet d'obtenir l'amphiphile souhaité PFTD-PEG **II.2** avec 68 % de rendement.

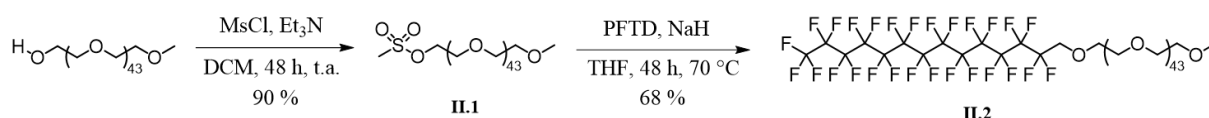


Schéma 18 : Voie d'obtention de l'amphiphile PFTD-PEG.

2- Assemblage des micelles et caractérisations

2.1- Détermination de la CMC

Comme évoqué dans l'introduction générale (III.3), la détermination de la CMC est importante car elle permet d'avoir une idée de la stabilité des auto-assemblages en cas de forte dilution. La méthode de la mesure de la tension de surface a été utilisée dans notre cas pour déterminer cette concentration. Au cours de cette expérience qui consiste à mesurer la force exercée par nos solutions sur un anneau immergé, une série de mesures est réalisée en utilisant des concentrations croissantes d'amphiphiles. À une concentration inférieure à la CMC, les amphiphiles sont isolés en solution et la valeur de la tension de surface diminue lorsque des amphiphiles sont ajoutés. À partir du moment où des micelles se forment, la valeur de la tension de surface ne varie plus.

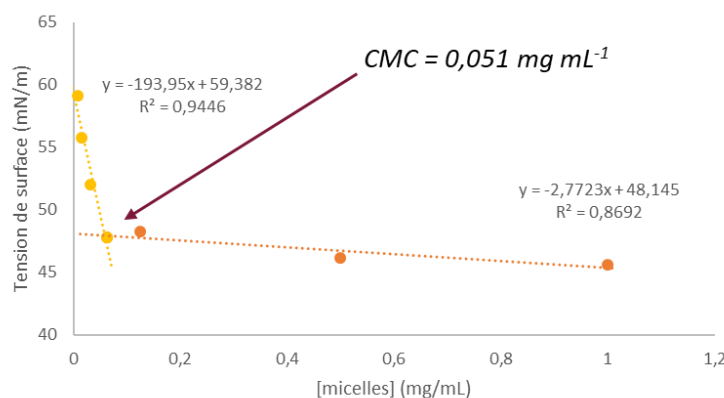


Figure 62 : Détermination de la CMC par mesure de la tension de surface (méthode du Noüy).

La valeur de la CMC mesurée pour les amphiphiles PFTD-PEG est de $0,051 \text{ mg mL}^{-1}$. Avec une CMC inférieure à celle des amphiphiles DA-PEG ($0,095 \text{ mg mL}^{-1}$) classiquement utilisés dans notre laboratoire, les amphiphiles PFTD-PEG forment donc des auto-assemblages plus stables.

2.2- Assemblage

Les auto-assemblages en phase aqueuse des amphiphiles ont ensuite été étudiés. En pratique, les amphiphiles ont été solubilisés dans de l'eau milliQ à une concentration de 10 mg mL^{-1} ($>$ CMC). La solution est ensuite passée aux ultrasons (doigt sonicant) pendant 10 min puis filtrée sur membrane $0,2 \mu\text{m}$. Afin de confirmer la présence de micelles, des analyses DLS ont été effectuées, permettant de déterminer le rayon hydrodynamique des objets formés. La présence de micelles monodisperses possédant un diamètre hydrodynamique moyen de 13 nm est observée.

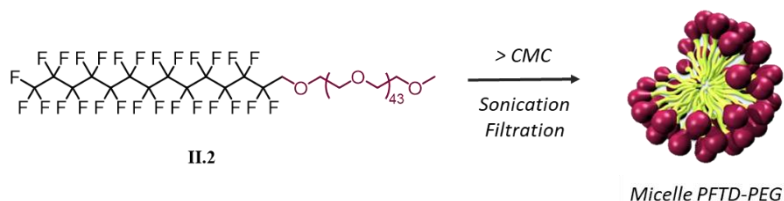


Figure 63 : Structure de l'amphiphile et obtention des micelles PFTD-PEG.

Grâce à une analyse similaire, nous avons pu déterminer le nombre d'unités amphiphiles par micelle (méthode utilisant la diffusion statique de la lumière, SLS). En effet, c'est en se basant sur la théorie de Rayleigh,¹⁰² que cette donnée a pu être déterminée. Un poids moléculaire total de $80,3 \pm 5,77 \text{ kDa}$ a été déterminé ce qui correspond à environ 30 unités amphiphiles par micelle.

Après avoir caractérisé l'auto-assemblage d'amphiphiles PFTD-PEG, des essais de formulation de la molécule de PERFECTA ont été réalisés.

3- Formulation de la molécule de PERFECTA

3.1- Synthèse du PERFECTA

La molécule de PERFECTA a été synthétisée au laboratoire selon le protocole décrit par Tirota *et al.* en utilisant, comme étape clé, la réaction de Mitsunobu.⁹⁸ Le composé précurseur est le pentaerithritol dont les 4 fonctions hydroxyles vont être substituées par le perfluoro-*tert*-butanol en présence de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) et de triphénylphosphine (conditions de Mitsunobu) dans du THF (Schéma 19). Le PERFECTA est obtenu avec 45 % de rendement après filtration à froid. Chacun des motifs perfluoro-*tert*-butanol apporte une contribution de 9 atomes de fluor, chaque molécule de PERFECTA incorpore donc 36 atomes de fluor chimiquement et magnétiquement équivalents. En effet, une caractérisation par RMN ^{19}F (dans CDCl_3 + quelques gouttes d'un solvant fluoré (HFIP)) met en évidence la présence d'un pic unique caractéristique à un déplacement chimique de -76.2 ppm .

¹⁰² La théorie de Rayleigh décrit le phénomène par lequel l'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle au poids moléculaire de la molécule.

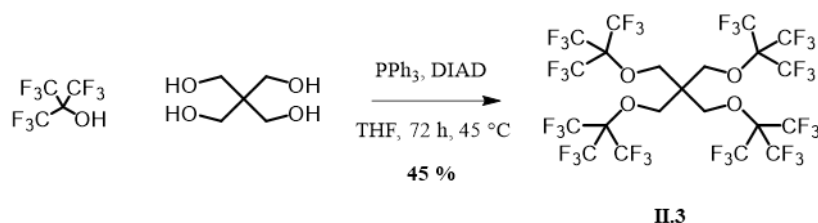


Schéma 19. Voie d'obtention du PERFECTA.

3.2- Formulation dans les micelles PFTD-PEG

Le protocole standard d'encapsulation de molécules hydrophobes dans des micelles consiste à préparer une suspension aqueuse de micelles à une concentration > CMC, à laquelle est ajoutée la molécule à encapsuler dissoute dans un minimum de solvant organique (ex. CHCl_3). Le mélange est ensuite traité au bras à ultrasons permettant le transfert de la molécule hydrophobe vers le cœur de la micelle et l'évaporation du solvant organique.

Dans le cadre de ces travaux, des optimisations ont été nécessaires afin d'augmenter le taux d'encapsulation du PERFECTA dans les micelles (temps sous ultrasons, quantités introduites, nécessité ou pas d'un co-solvant...). En effet, nous souhaitions pouvoir disposer d'une formulation très chargée en PERFECTA afin de rendre la détection par IRM ^{19}F plus sensible, sous réserve que le PERFECTA encapsulé reste stable au cours du temps dans les conditions physiologiques.

Le protocole retenu consiste à préparer une suspension colloïdale de 20 mg mL^{-1} d'amphiphiles PFTD-PEG dans laquelle 20 mg de PERFECTA sous forme solide ont été introduits. L'introduction du PERFECTA sans solvant, sous forme solide, a été privilégiée ici, nous permettant de nous affranchir d'un solvant fluoré qui pourrait se retrouver piégé dans le cœur de la micelle. Le passage de la solution aux ultrasons va créer localement un échauffement permettant la fusion du PERFECTA (T_f : 66 °C) et son passage vers le cœur fluoré de la micelle. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,2 μm afin d'éliminer d'éventuels agrégats et conduire à la micelle PERFECTA@PFTD-PEG.

3.3- Détermination du taux de chargement par RMN ^{19}F

Une méthode de quantification a été mise au point dans le but de déterminer la quantité de PERFECTA effectivement présente dans la suspension colloïdale. Les méthodes de dosages comme la LC-MS ou la spectroscopie UV-visible, ne sont pas adaptées à notre cas d'étude : la molécule de PERFECTA n'absorbe pas dans le domaine UV et elle ne s'ionise pas par des méthodes classiques de spectrométrie de masse. La méthode la plus appropriée reste la RMN ^{19}F dans laquelle l'intensité intégrée d'un signal de résonance est proportionnelle au nombre de noyaux représentés par ce signal. En utilisant un étalon interne de concentration connue, il est possible de remonter à la concentration en fluor, et donc à la concentration en PERFECTA, par intégration des pics.

L'analyse RMN ^{19}F des micelles encapsulant le PERFECTA (spectre dans D_2O) fournit des signaux caractéristiques : un singulet intense à -76.2 ppm qui est attribué au groupements CF_3 du

PERFECTA, et deux signaux plus faibles à -83.2 (CF_3) et -123.1 ppm (CF_2) qui appartiennent aux amphiphiles constitutifs de la micelle. L'étalon interne choisi est le fluorure de potassium (KF) qui possède un déplacement chimique de -125.3 ppm qui est distinct de ceux du PERFECTA et de la micelle (Figure 64). Par ailleurs, il s'agit d'un solide qui se pèse facilement et qui se solubilise bien dans l'eau.

L'analyse quantitative par RMN consiste à peser avec précision KF afin d'obtenir une solution étalon de concentration connue. La solution étalon est ensuite introduite en quantité définie en présence de la solution à doser dans le tube RMN, pour analyse (Figure 64).

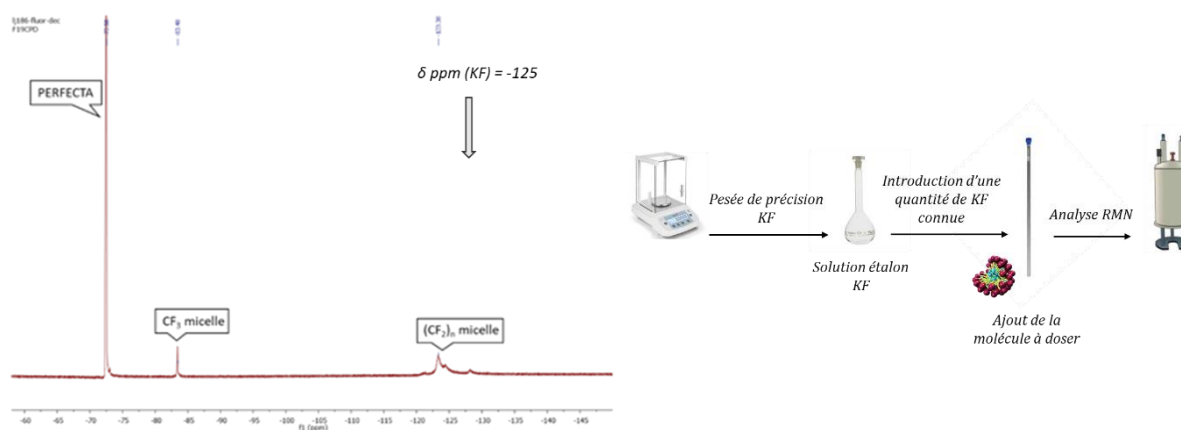


Figure 64 : Spectre RMN ^{19}F des micelles encapsulant le PERFECTA (D_2O) et mode de fonctionnement d'une analyse RMN quantitative utilisant un étalon interne.

Différents lots de micelles à 20 mg mL^{-1} ont été incubés avec des concentrations de PERFECTA croissantes (2,5 ; 5 ; 10 et 20 mg) et les échantillons ont été analysés par RMN ^{19}F en présence d'une quantité connue de KF. La quantité de PERFECTA encapsulé a été déterminée par intégration comparative du pic à -76.17 ppm et celui de l'étalon interne à -125.3 ppm (Figure 65).

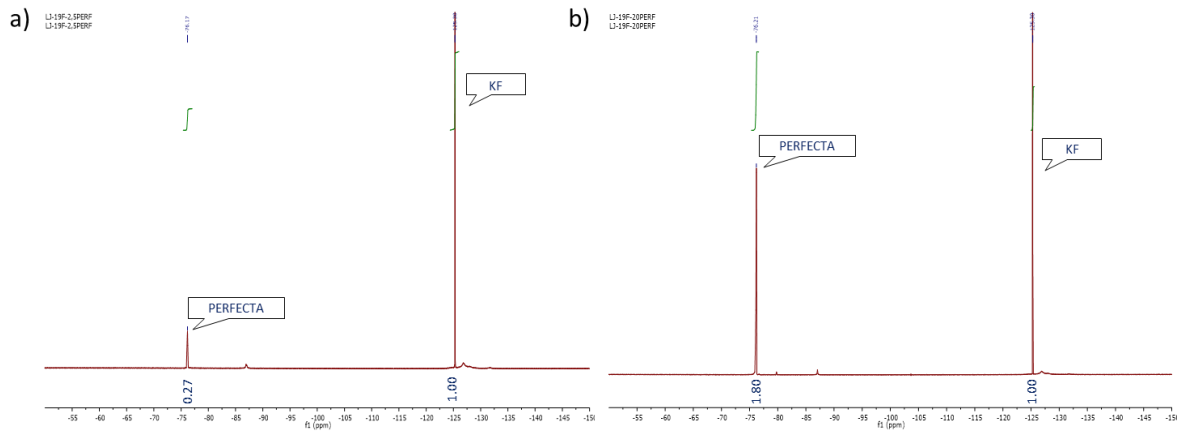


Figure 65 : Spectres RMN ^{19}F des micelles PERFECTA@PFTD-PEG dans du D_2O utilisant du KF comme standard interne. Les micelles PFTD-PEG (20 mg mL^{-1}) sont mises en présence de : (a) 2,5 mg, (b) 20 mg de PERFECTA.

Cette gamme de concentration a permis de valider l'efficacité de la méthode de dosage : il apparaît que la quantité de PERFECTA initialement introduite est entièrement encapsulée pour les formulations comprises entre 2,5-10 mg. En revanche, pour la formulation obtenue avec 20 mg de PERFECTA, seuls 14 mg ont été encapsulés dans la micelle. Nous avons ici une efficacité de chargement de 70 % et un taux de chargement de 41% massique. C'est cette formulation qui sera retenue pour la suite de nos études.

PERFECTA@PFTD-PEG

PFTD-PEG : 20 mg/mL
PERFECTA : 20 mg

Sonication 20 min
Puissance 45 %
Filtration 0,2 μm

PERFECTA encapsulé
14 mg/mL

Figure 66 : Formulation retenue pour de futures études par IRM ^{19}F .

4- Caractérisations

4.1- Détermination de la taille et de la structure des nanoparticules

Une analyse par DLS nous a permis de déterminer le rayon hydrodynamique des micelles PFTD-PEG encapsulant le PERFECTA et la taille des objets a été comparée à la taille des micelles vides. Le rayon hydrodynamique passe de 13 nm pour les micelles vides à 20 nm pour les micelles PERFECTA@PFTD-PEG (Figure 67).

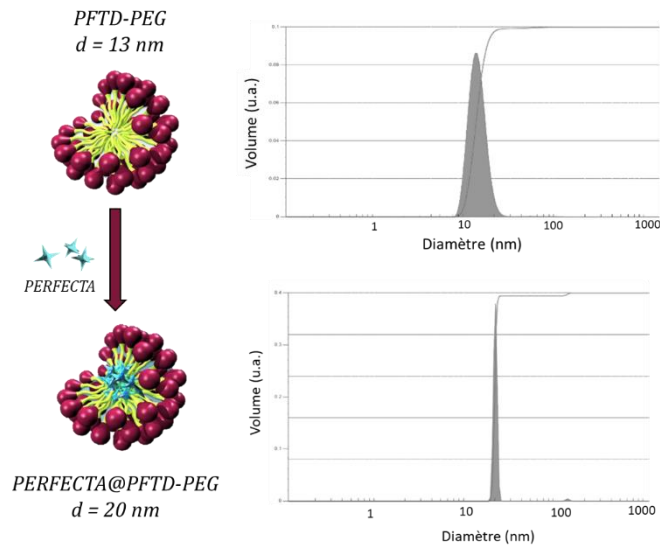


Figure 67 : Analyses DLS de micelles PFTD-PEG et de micelles PERFECTA@PFTD-PEG.

Des analyses par microscopie électronique ont également été effectuées par le Dr. Wai Li Ling du CEA/IBS afin d'évaluer la structure des auto-assemblages formés. Les clichés ont été obtenus par la technique de cryo-microscopie électronique qui est une technique qui diffère légèrement de la microscopie électronique en transmission (MET) classique, essentiellement dans la préparation de l'échantillon. La méthode de cryo-MET permet de conserver la morphologie et la structure des composés en les maintenant à basse température (congélation) pendant l'analyse. Des micelles PFTD-PEG et la formulation PERFECTA@PFTD-PEG à 20 mg mL^{-1} ont été analysées.

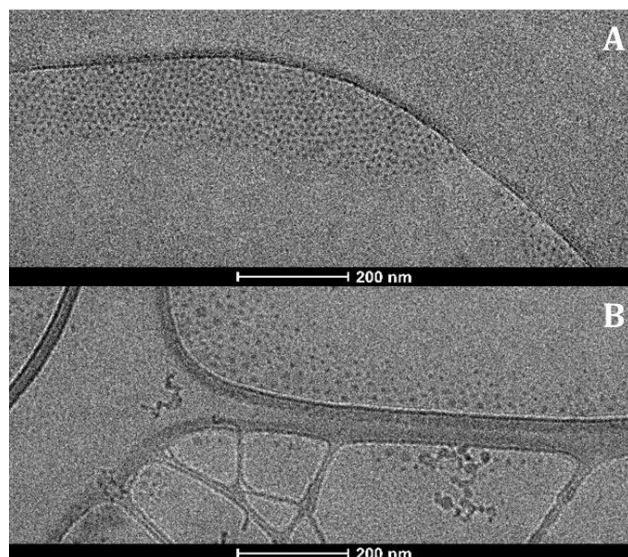


Figure 68 : Imagerie cryo-MET de micelles vides PFTD-PEG (A) et de micelles encapsulant le PERFECTA (B).

Les micelles vides observées en Figure 68, A sont de tailles homogènes et semblent s'organiser de manière ordonnée. Les micelles chargées en PERFECTA (Figure 68, B) s'organisent quant à elle

de manière plus aléatoire et ont un diamètre moyen supérieur aux micelles vides. Cette observation est en accord avec les données de DLS.

4.2- Étude de stabilité de la formulation

Des études de stabilité des micelles PERFECTA@PFTD-PEG ont ensuite été réalisées et suivies par RMN ^{19}F . Les micelles sont suspendues dans du NaCl à 0,9 % et l'échantillon est stocké à température ambiante pendant des temps variables (de 5 jours à 1 mois). Les suspensions sont ensuite filtrées, puis dosées à l'aide de la méthode décrite précédemment (KF comme étalon interne). Le rapport des intensités des pics du PERFECTA/étalon interne reste identique au cours du temps, ce qui signifie que la quantité de PERFECTA encapsulée reste inchangée et que le stockage des micelles à température ambiante ne déstabilise pas les auto-assemblages formés. Des essais de stabilité par DLS ont également confirmé l'absence d'agrégats sur une période d'un mois.

D'autres études de stabilité ont été réalisées dans du sérum de veau fœtal (SVF) afin de mimer la présence de protéines du sang. Pour cela, une solution de PERFECTA@PFTD-PEG préparée dans du NaCl à 0,9 % a été mise en présence d'une quantité connue de KF (à partir de la solution stock). Finalement, 10 % de SVF ont été introduits puis des analyses RMN ^{19}F au cours du temps ont été effectuées.

Le rapport des intensités des pics du PERFECTA/étalon interne (valeur d'intégration de 1 pour le KF contre 1,58-1,59 pour le PERFECTA, Figure 69) reste identique sur 96 h à 25 °C, ce qui signifie que la quantité de PERFECTA encapsulée reste inchangée et que l'introduction de SVF dans le milieu ne déstabilise pas les micelles.

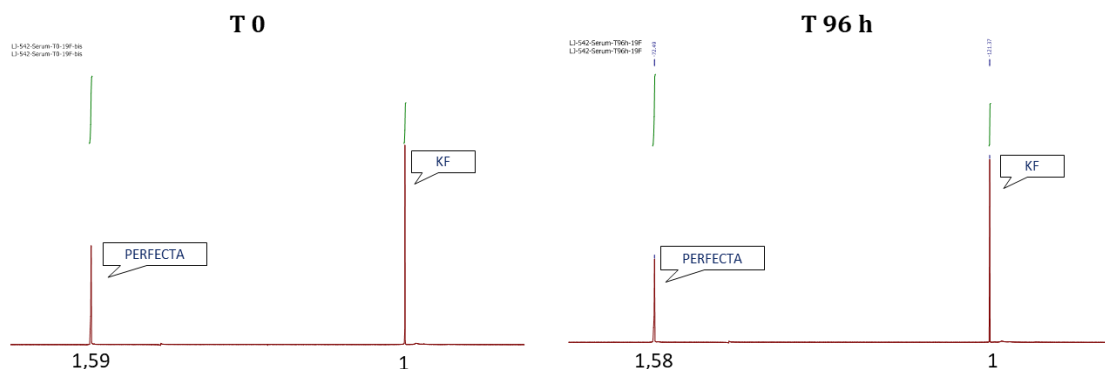


Figure 69 : Spectres RMN ^{19}F obtenus après étude de stabilité des micelles PERFECTA@PFTD-PEG dans du sérum SVF (10 %) en présence de KF, à $t = 0$ puis $t = 96$ h après stockage à 25 °C.

La formulation du PERFECTA dans les micelles PFTD-PEG conduit donc à une formulation stable sur plusieurs jours. Cependant, avant de pouvoir utiliser nos micelles PERFECTA@PFTD-PEG *in vivo*, il est nécessaire d'en évaluer la cytotoxicité potentielle sur différentes lignées cellulaires.

III- Études de toxicité et imagerie cellulaire

1- Tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité permettent de déterminer la concentration à partir de laquelle un composé perturbe la croissance cellulaire. Ces tests ont été réalisés par le Dr Guillaume Pinna (CEA/SBIGEM) sur deux lignées cellulaires : HEK-293 (cellules rénales embryonnaires humaines immortalisées) et MC-38 (cellules murines d'adénocarcinome du côlon). Dans une plaque 96 puits, les cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes de i) micelles vides et ii) micelles encapsulant la molécule de PERFECTA pendant 72 h à 37 °C. L'ADN des cellules a ensuite été marqué par le colorant de Hoechst qui permet de quantifier le nombre de cellules vivantes par spectroscopie de fluorescence.

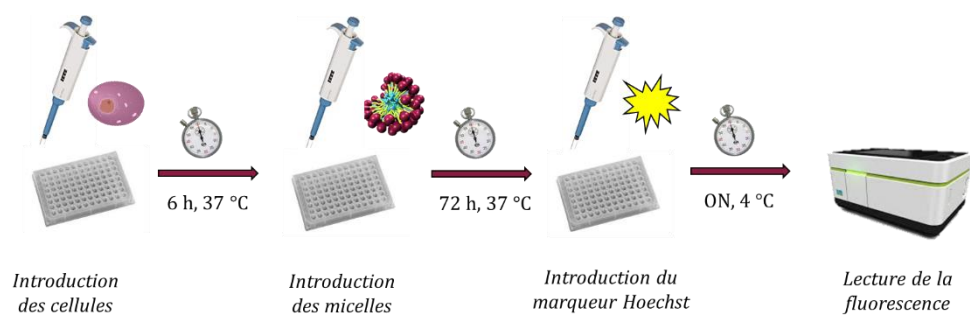


Figure 70 : Principe du test de cytotoxicité.

Les résultats sont représentés ci-dessous et sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport à un témoin traité avec une solution tampon (PBS). Même à de fortes concentrations en micelles (1 mM), le taux de survie cellulaire reste important. Il semblerait également que l'apport du PERFECTA ne modifie que peu l'effet observé dans le cas des micelles vides.

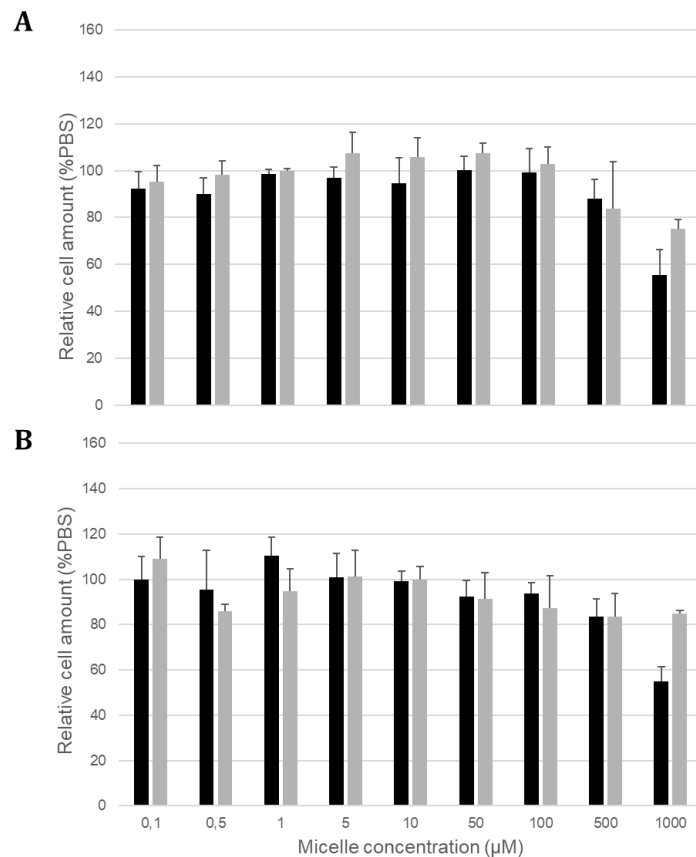


Figure 71 : Prolifération/survie des cellules HEK-293 (A) et MC-38 (B) traitées par des micelles pendant 72 h. Gris : micelles PFTD-PEG, Noir : micelles PERFECTA@PFTD-PEG.

Ces résultats confirment donc l'innocuité de la formulation même à de fortes concentrations sur différentes lignées cellulaires (HEK-29 et MC-38). Il a donc été envisagé de poursuivre nos études par de l'imagerie par microscopie de fluorescence afin d'appréhender le comportement de nos formulations en interaction avec les cellules MC-38.

2- Imagerie cellulaire

Pour cette étude, des micelles PFTD-PEG marquées par un fluorophore (DiD) ont été préparées afin de visualiser par microscopie de fluorescence le comportement des micelles en présence de cellules MC-38. En pratique, du DiD en solution dans de l'éthanol est ajouté (la masse de DiD introduit représente 0,1 % de la masse de micelles) à des micelles PFTD-PEG à 20 mg mL⁻¹. L'échantillon est traité au doigt à ultrasons pendant 30 min puis filtré. Des dosages par spectroscopie UV-visible permettent de confirmer le taux de 0,1% de DiD effectivement encapsulé. Des analyses par DLS montrent la présence d'auto-assemblages de 17 nm de diamètre.

Des micelles-DiD à différentes concentrations (10 μM à 1 mM) ont ensuite été incubées en présence de cellules MC-38 pendant 18 h. Après ajout d'un marqueur nucléaire (colorant de Hoechst), les échantillons sont imagés par microscopie de fluorescence à l'aide d'un lecteur de plaque (Figure 72). Les noyaux des cellules marqués au colorant de Hoechst sont visualisés dans le canal bleu (Ex. 360–400 nm, Em. 410–480 nm), alors que le DiD est observé dans le canal rouge (Ex. 620–640 nm, Em. 650–760 nm). Les images sont obtenues au grossissement $\times 20$. La première observation est liée à la capacité de la micelle à être internalisée dans les cellules puisque nous détectons la présence du marqueur fluorescent dans le cytoplasme à partir d'une concentration d'environ 100 μM en micelles. La deuxième observation est que cette internalisation est fonction de la dose ; plus la concentration de départ en micelles est grande, plus l'internalisation dans les cellules est forte. Enfin, les micelles-DiD semblent être réparties de manière homogène au niveau du cytoplasme, sans accumulation dans le noyau tel que visualisé par superposition des images du canal rouge et bleu. Il est également à noter qu'aucune altération de la morphologie des cellules n'est à déplorer, même aux plus fortes concentrations (1 mM) étudiées.

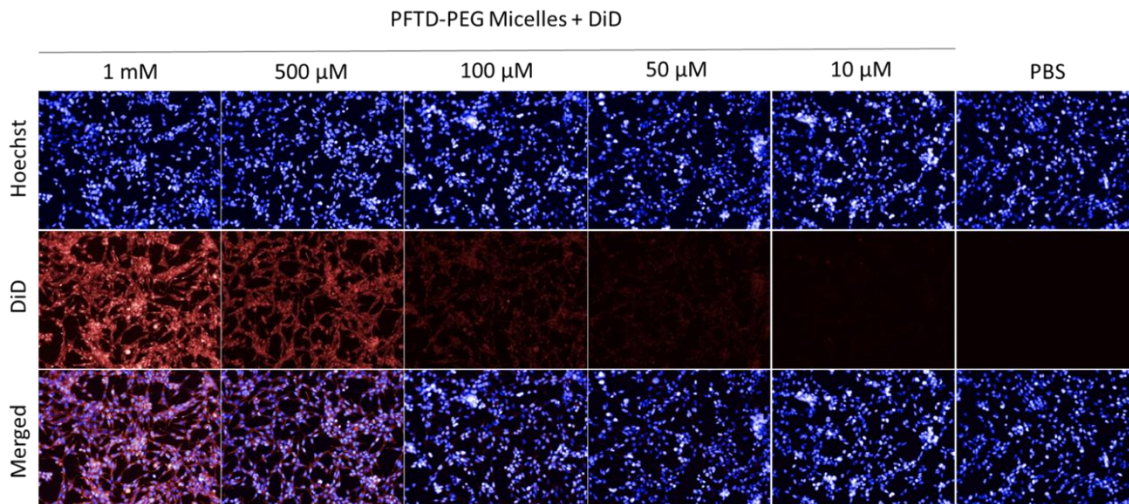


Figure 72 : Imagerie de fluorescence de cellules MC-38 incubées en présence de différentes concentrations de micelles PFTD-PEG encapsulant du DiD (1 mM, 500, 100, 50 et 10 μM). Le noyau des cellules est marqué au colorant de Hoechst.

Les micelles PFTD-PEG sont donc internalisées dans les cellules MC-38 sans effet délétère sur leur morphologie. Outre les tests de viabilité cellulaire, cette dernière observation nous conforte sur le caractère « non toxique » des micelles. Cependant, avant d'envisager des études IRM ^{19}F *in vivo*, il est nécessaire de procéder au paramétrage des séquences IRM.

IV- Évaluation du potentiel diagnostique des micelles de PERFECTA par IRM

1- Mise au point du protocole IRM

Cette étude préliminaire par IRM ^{19}F est importante afin d'adapter les différents paramètres des séquences IRM pour de futures études *in vivo*. Plusieurs essais seront réalisés et devront permettre de i) connaître la concentration minimale en PERFECTA (encapsulé dans les micelles) détectable par IRM et de ii) déterminer la séquence IRM qui va permettre de concilier un temps d'acquisition compatible pour des applications *in vivo* avec une bonne qualité d'image (i.e., un rapport signal-sur-bruit et une résolution spatiale élevés). Les expériences IRM ont été réalisées en collaboration avec Solenne Vaillant, doctorante dans l'équipe du Dr Sébastien Mériaux (CEA/NeuroSpin), sur un scanner préclinique Bruker opérant à 7 Tesla avec une antenne volumique à deux canaux ($^{19}\text{F}/^1\text{H}$).

1.1- Préparation des échantillons et gamme de concentration

Afin de déterminer le seuil de détection IRM, 8 échantillons de PERFECTA@PFTD-PEG incorporant des concentrations croissantes en PERFECTA ont été préparés (Figure 73). Les concentrations en PERFECTA ont été validées au préalable par RMN ^{19}F en suivant le protocole présenté dans la partie II.3.3. Des fantômes de volume compris entre 200 et 300 μL ont été préparés dans des seringues puis placés dans l'aimant pour analyse IRM et optimisation des séquences.

1.2- Optimisation de la séquence IRM

Pour cette étude, deux types de séquences IRM ont été testés :

- 1) une séquence MSME (Multi Slice Multi Echo)
- 2) une séquence RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes)

Ces deux séquences permettent une détection directe du PERFECTA en se plaçant à sa fréquence de résonance.

Nos objectifs sont de favoriser le rapport signal-sur-bruit (SNR, *Signal to Noise Ratio*), avec des temps d'acquisition relativement rapides, tout en limitant les artefacts et en garantissant une résolution spatiale suffisante. La séquence MSME permet généralement d'obtenir des images avec un très bon SNR, mais les temps d'acquisition sont assez longs, ce qui la rend peu compatible pour des expériences *in vivo*. Cette séquence nous a par exemple permis de détecter des concentrations très faibles en fluor, jusqu'à 0,02 M (entre les tubes G et H) pour une durée d'acquisition de 73 min 20 s (Figure 73). Grâce à ces acquisitions MSME, nous pouvons confirmer une bonne linéarité entre le rapport signal-sur-bruit issu des images IRM ^{19}F et les concentrations en fluor dans chaque tube (Figure 73).

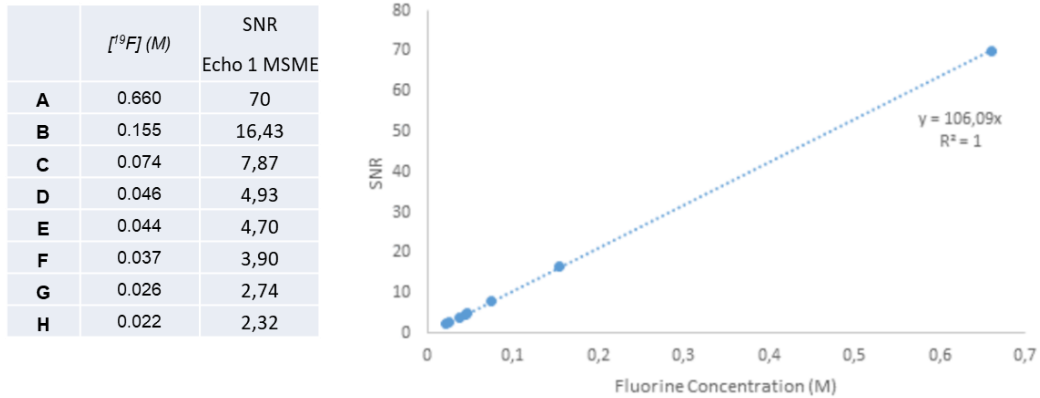


Figure 73 : Expérience IRM ^{19}F effectuée sur des fantômes contenant des solutions de micelles PERFECTA@PFTD-PEG à différentes concentrations et évaluation de la linéarité du SNR.

Une optimisation du protocole IRM visant à diminuer le temps d'acquisition consiste à remplacer une approche paramétrique T_2 avec plusieurs échos (MSME) par une approche pondérée T_2 avec un seul écho (RARE). Pour cela, l'image de la séquence MSME a été comparée à des images acquises avec une séquence RARE comprenant 2, 10 ou 20 moyennages, correspondant à des temps d'acquisition de 55 s, 4 min 35 s et 9 min 10 s respectivement. En augmentant le nombre de moyennages, il est possible d'augmenter le SNR.

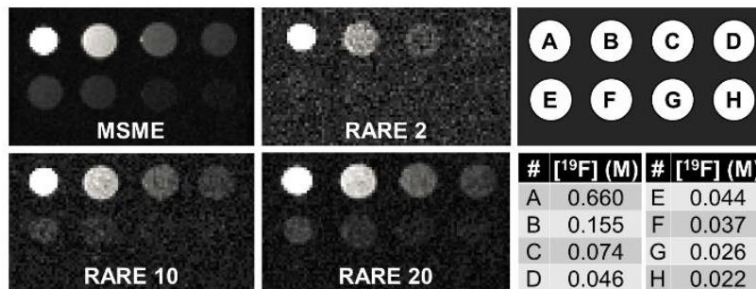


Figure 74 : Images IRM ^{19}F suite à l'optimisation des séquences sur des fantômes.

Les images issues de cette optimisation permettent de nous rendre compte de l'efficacité de la séquence RARE 20. En effet, pour un temps d'acquisition d'environ 9 min, elle permet d'atteindre un seuil de détection comparable à la séquence MSME, soit une concentration de 0,02 M en fluor de PERFECTA (tubes G et H, Figure 74). Compte tenu des résultats publiés par l'équipe de Tirotta, dans lesquels une concentration seuil de 9,9 mM a été détectée en 7 fois plus de temps d'acquisition (60 min), et au vu des résultats issus de cette série d'optimisation, il nous est apparu que la séquence RARE 20 était capable de concilier durée d'acquisition et sensibilité de détection.

Les temps de relaxation T_1 et T_2 ont également été déterminés. Ils donnent des informations sur les interactions du noyau avec son environnement proche et devraient permettre de conclure sur l'état de mobilité du PERFECTA dans le cœur de la micelle. En utilisant les séquences IRM adaptées, il a été possible d'estimer les temps de relaxation de nos micelles chargées en PERFECTA et des valeurs de $T_1 = 248,2$ ms et de $T_2 = 171,1$ ms ont été mesurées ($[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 0.5$ M). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature et en particulier avec les valeurs déterminées par

l'équipe de Tirota avec un même champ magnétique (7 T) pour différentes émulsions chargées en PERFECTA (T_1 entre 587 et 643 ms ; T_2 entre 182 et 198 ms). La différence entre les T_1 mesurés s'explique notamment par l'utilisation de systèmes de formulation différents (nanoémulsions vs micelles fluorées).

Les valeurs de T_1 et de T_2 mesurées pour le PERFECTA dans la micelle ont été comparées à celles de la molécule de PERFECTA seule en solution dans un solvant fluoré (hexafluorobenzène, $[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 0.5 \text{ M}$) pour laquelle des temps de relaxation T_1 de 700,7 ms et T_2 de 1098,3 ms ont été mesurés. La diminution des valeurs de T_1 et de T_2 lorsque la molécule de PERFECTA est encapsulée suggère l'existence d'interactions spin-spin entre les atomes de fluor du PERFECTA au sein du cœur des micelles. Une augmentation du T_2 aurait pu signifier que la molécule de PERFECTA s'échappe de notre système nanoparticulaire, ce que nous n'observons pas ici. Cette donnée est particulièrement importante compte tenu de la séquence IRM utilisée (pondérée T_2).

Les résultats obtenus à l'aide de fantômes mettent en avant le potentiel IRM de la formulation PERFECTA@PFTD-PEG associée à la séquence RARE 20. En effet, les seuils de concentration détectables sont compatibles avec une utilisation *in vivo*. Nous avons donc entrepris de réaliser des premiers essais *in vivo* en utilisant l'IRM ^{19}F pour le suivi des micelles chargées en PERFECTA.

2- Études préliminaires *in vivo*

À l'aide des différents paramètres IRM déterminés à l'issue des expériences *in vitro*, des premières acquisitions d'images *in vivo* ont été effectuées après administration de nos micelles de PERFECTA. En effet, le choix de la séquence IRM doit être validé en conditions « réelles » en portant une attention particulière aux quantités injectées. Pour cela, des séries d'optimisation du protocole *in vivo* ont été effectuées : elles nous permettront d'élaborer un protocole de référence (voie d'administration, quantités injectées, ordre des séquences IRM utilisées...).

Le modèle animal étudié étant la souris, la voie d'administration retenue est la voie intraveineuse et les quantités de micelles injectées ont été fixées à 150 μL de micelles ($[\text{micelle}]_{\text{stock}} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$). Ces 150 μL correspondent à 3 mg de micelles. Si l'on considère le poids moléculaire de l'amphiphile (2700 Da), 3 mg représentent 1,1 μmol d'amphiphiles (ou micelles). Compte tenu du volume sanguin des souris (environ 2 mL), la concentration finale de micelles dans le sang (au moment de l'injection) est $\sim 0,5 \text{ mM}$, ce qui est inférieur au seuil de toxicité, tel que déterminé *in vitro* sur les lignées cellulaires HEK293 et MC-38.

Une deuxième optimisation a consisté à adapter les paramètres IRM tels que le champ de vue, la taille de la matrice d'acquisition et le nombre de coupes. Ces données permettent de définir la résolution spatiale, et notamment la taille du voxel, déterminant la finesse des détails dans l'image. Comme le montre le Tableau 4, la résolution spatiale de $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ et le temps d'acquisition (8 min 20 s) utilisés dans notre protocole d'imagerie sont comparables à ce que l'on peut retrouver dans la littérature. Si l'on compare notre étude (entrée 1) avec l'étude de Waiczies *et al.* (entrée 3), nous constatons que, dans ce dernier cas, la résolution spatiale est plus élevée mais nécessite un temps d'acquisition extrêmement long (45 min) qui est difficilement compatible pour une utilisation (pré)clinique. A contrario, dans l'étude de Diou *et al.* (entrée 2), un temps d'acquisition court (4 min 30 s) a été privilégié ce qui conduit à une dégradation de la résolution spatiale,

surtout dans la troisième direction. Les données préliminaires acquises sont ainsi plutôt encourageantes pour la suite de notre étude *in vivo*.

Tableau 4 : Comparaison des résolutions spatiales et des temps d'acquisition de différents protocoles *in vivo* pour l'imagerie IRM ^{19}F .

	Sonde fluorée	Formulation	Concentration en fluor (M)	Champ magnétique (T)	Résolution spatiale (mm ³)	Temps d'acquisition
1	PERFECTA	Micelle	0,5	7	1x1x5	8 min 20 s
2 ¹⁰³	PFOB	Nanocapsule	1,4	7	0,63x0,94x16	4 min 30 s
3 ¹⁰⁴	PFCE	Nanoémulsion	0,6	9,4	0,4x0,4x0,4	45 min
4 ⁹⁸	PERFECTA	Nanoémulsion	0,18	7	1,56x1,56x3	10 min
5 ¹⁰⁵	PFPE	Polymère	--	9,4	1,875x1,875x2	12 min 48 s

3- Évaluation du potentiel diagnostique

Le potentiel diagnostique de la formulation PERFECTA@PFTD-PEG a ensuite été évalué sur des souris porteuses de tumeurs MC-38.

3.1- Croissance et implantation des tumeurs

Des cellules cancéreuses murines du colon (MC-38) ont été implantées chez des souris C57BL/6 âgées de 2 mois. Ces cellules sont connues pour se multiplier rapidement et la croissance de la tumeur MC-38 s'accompagne d'un phénomène de néoangiogénèse, c'est-à-dire de la formation de vaisseaux tumoraux. L'état de vascularisation de l'environnement tumoral est particulièrement important pour nos micelles qui doivent cibler et s'accumuler au niveau des tissus tumoraux par effet EPR. Généralement, plus la tumeur est volumineuse, plus le réseau de vascularisation néoangiogénique est dense. Cependant, la taille des tumeurs peut également nuire à la sensibilité de détection IRM du signal ^{19}F , car un volume tumoral trop important dilue le signal associé à l'agent de contraste fluoré. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre volume tumoral et état de vascularisation. Nous avons choisi d'effectuer les injections de micelles 10 jours après l'implantation des tumeurs (volume tumoral moyen à J + 10 = 138 ± 26 mm³).

3.2 – Optimisation du protocole *in vivo*

Un groupe de 3 premières souris a été utilisé pour valider le protocole d'imagerie développé ci-dessus. Une dizaine de jours après implantation des tumeurs, 150 µL de PERFECTA@PFTD-PEG (14 mg de PERFECTA encapsulé dans une solution de 20 mg mL⁻¹/NaCl 0,9 %, [$^{19}\text{F}_{\text{PERF}}$] = 0,5 M) sont injectés par voie intraveineuse (t0). La dose injectée correspond à 3 mg de micelles + 2,1 mg

¹⁰³ Diou, O.; Tsapis, N.; Giraudeau, C. I.; Valette, J.; Gueutin, C.; Bourasset, F.; Zanna, S.; Vauthier, C.; Fattal, E. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5593-5602.

¹⁰⁴ Waiczies, H.; Lepore, S.; Drechsler, S.; Qadri, F.; Purfurst, B.; Sydow, K.; Dathe, M.; Kuhne, A.; Lindel, T.; Hoffmann, W.; Pohlmann, A.; Niendorf, T.; Waiczies, S. *Scientific Reports* **2013**, *3*, 1280.

¹⁰⁵ Zhang, C.; Moonshi, S. S.; Han, Y.; Puttick, S.; Peng, H.; Magoling, B. J. A.; Reid, J. C.; Bernardi, S.; Searles, D. J.; Kral, P.; Whittaker, A. K. *Macromolecules* **2017**, *50*, 5953-5963.

de PERFECTA. Un signal au niveau du foie est visible dès 30 min après injection et se maintient 24 h post-injection. Cependant, aucun contraste n'est observé au niveau de la tumeur à 24 h.

Ce constat nous a conduit à envisager une deuxième injection (à $t_0 + 24$ h) de 150 μL de micelles PERFECTA sur les mêmes animaux. Les souris ont été imagées par IRM 6 h ($t_0 + 30$ h) après cette deuxième injection et nous avons eu la bonne surprise d'observer un contraste IRM ^{19}F au niveau du tissu tumoral. Comme attendu, les injections multiples permettent d'augmenter les taux circulants de micelles dans la vascularisation et donc de favoriser son accumulation dans la tumeur. Suite à ces observations et pour la suite de nos études, nous avons retenu d'injecter 150 μL de micelles de PERFECTA à 24 h d'intervalle sur 4 jours et les animaux seront imagés selon le déroulé présenté dans la Figure 75.

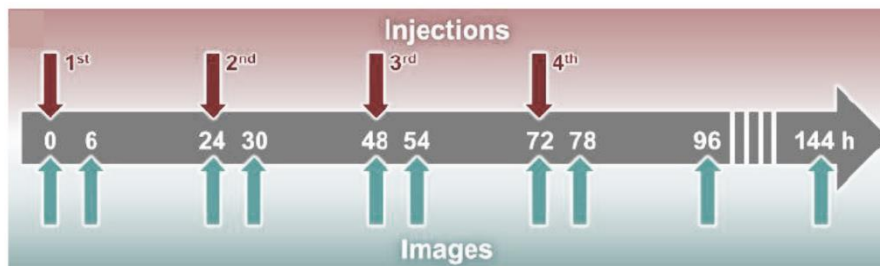


Figure 75 : Protocole d'injections multiples de micelles PERFECTA@PFTD-PEG sur des souris C57BL/6-MC-38 et acquisitions d'images par IRM ^{19}F en fonction du temps.

3.3- Acquisition des données IRM

L'acquisition d'images *in vivo* par IRM ^{19}F se fait en plusieurs étapes.

- 1) Les souris sont anesthésiées sous isoflurane (2 % dans un mélange air/oxygène 1:1) puis placées sur un lit dédié. Des capteurs permettent de contrôler leur respiration et leur température.
- 2) Un tube de référence contenant la formulation la plus concentrée (échantillon A de la gamme, Figure 74) est placé sur le flanc de la souris (Figure 76, identifié par un R). Ce tube, facilement visualisable par IRM ^{19}F , permet la calibration de certains paramètres de la séquence d'imagerie, et lors de l'analyse des données acquises, il permet la quantification de la concentration en fluor dans les images.
- 3) Une fois l'animal dans l'aimant, il est nécessaire de réaliser des premières séquences de positionnement du champ de vue d'imagerie (Localizer), et éventuellement de déplacer le lit de la souris dans l'aimant afin de cibler les zones d'intérêt (tumeur, foie, cœur).
- 4) Une fois les paramétrages IRM effectués en présence de l'animal, le lit de la souris est retiré de l'aimant pour l'administration de notre formulation de PERFECTA@PFTD-PEG, puis le lit est repositionné dans l'aimant.
- 5) Une première image ^{19}F est acquise en utilisant la séquence RARE20. Puis une deuxième image anatomique ^1H est acquise avec une résolution spatiale plus élevée ($0.25 \times 0.25 \times 1 \text{ mm}^3$) afin de pouvoir mieux localiser l'origine du signal ^{19}F et segmenter les zones d'intérêt (tumeur, foie, cœur).

- 6) Des codes de reconstruction des données développés en interne à NeuroSpin permettent finalement d'obtenir les images présentées en Figure 76.

3.4- Résultats

À la suite de ces travaux préliminaires, nous avons poursuivi notre étude sur un groupe de 9 souris auxquelles ont été injectées 150 μ L de micelles PERFECTA@PFTD-PEG par jour, pendant 4 jours consécutifs. Les images ^1H et ^{19}F ont été enregistrées juste après injection puis 6 h post-injection. Les images présentées sur la Figure 76 correspondent à une superposition de l'image anatomique ^1H (échelle noir et blanc) avec l'image ^{19}F (échelle de couleurs liée à la concentration en fluor). Des régions d'intérêt ont été segmentées sur les images anatomiques permettant d'accéder au volume des différents organes d'intérêt (tumeur, foie, cœur) et le signal ^{19}F a été quantifié dans ces régions grâce au tube de référence placé sur le flanc de la souris.

Un signal ^{19}F peut être observé au niveau du cœur 6 h après la première injection, confirmant la circulation de nos micelles de PERFECTA dans le réseau vasculaire (Figure 76). Après la deuxième injection, un contraste apparaît très clairement au niveau du foie, indiquant une accumulation des nanoparticules. Suivant les injections ultérieures, le contraste au niveau du foie continue de s'accroître avec $[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}]$ avoisinant 0,125 M 6 h après la 4^{ème} injection. Cette valeur correspond à 30 % de la dose injectée cumulée. En effet, des accumulations au niveau du foie sont généralement observées pour des particules de taille nanométrique, suite au phénomène d'opsonisation et de prise en charge par le système réticulo-endothélial.

De façon satisfaisante, un signal ^{19}F est également détecté au niveau de la tumeur après la deuxième injection. Ce signal continue d'augmenter jusqu'à atteindre une concentration maximale de 0,051 M après la 4^{ème} injection, ce qui correspond à $3.6\% \pm 1\%$ de la dose cumulée injectée (calculé dans un volume tumoral moyen $214 \pm 66 \text{ mm}^3$, $N = 7$). Cette valeur est à comparer avec les muscles, où aucun signal ^{19}F n'a été observé.

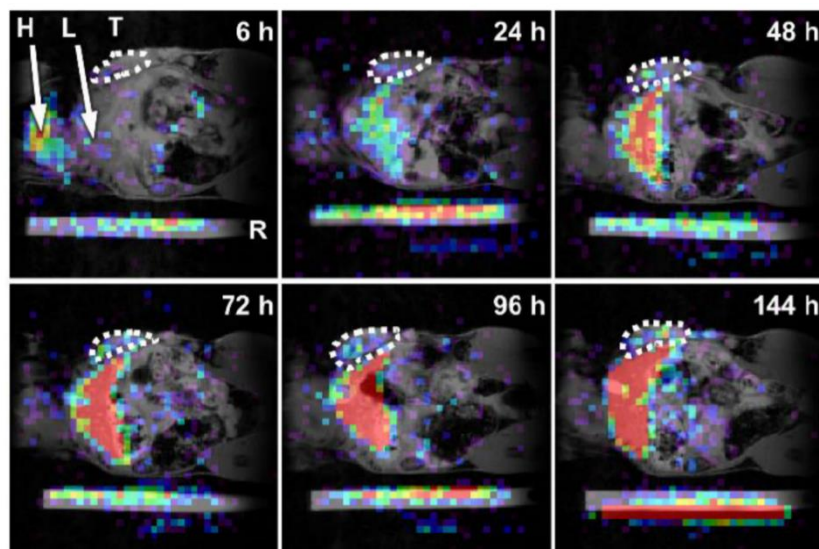


Figure 76 : Images $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ d'une souris porteuse d'une tumeur (indiquée par des pointillés). T = tumeur, H = cœur, L = foie, R = référence.

Cette différence entre les tissus sains et la tumeur conduit à un contraste, reflétant de manière évidente l'accumulation des micelles de PERFECTA et la délimitation du volume tumoral. Des images après 96 puis 144 h (24 et 72 h après la dernière injection) permettent de suivre la diminution lente du signal des micelles de PERFECTA au niveau du foie où la concentration en ^{19}F décroît de 0,125 à 0,092 M (-26%, cf Figure 77). En parallèle, le signal ^{19}F au niveau de la tumeur diminue également mais de manière beaucoup plus lente et la concentration en ^{19}F passe de 0,051 à 0,044 M (-14 %) ce qui suggère une rétention des micelles de PERFECTA au niveau de la tumeur.

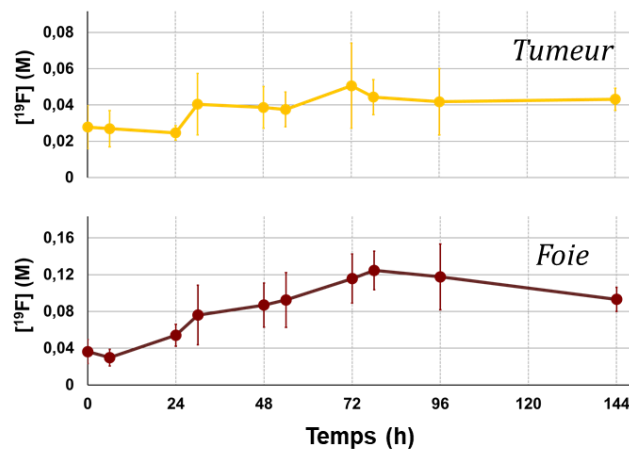


Figure 77 : Evolution de la concentration en fluor dans la tumeur et le foie en fonction du temps.

Bien que la voie d'excrétion des micelles de PERFECTA n'a pas été étudiée ici, nous supposons que ces micelles se comportent de la même façon que des micelles de taille et de chimie de surface similaires préalablement développées au laboratoire. Ces dernières avaient été radiomarquées au carbone-14 et détectées dans les fèces, ce qui suggère une voie d'excrétion hépatobiliaire.⁶² Compte tenu de la diminution du signal IRM détecté au niveau du foie, nous pouvons supposer que les micelles de PERFECTA suivent la même voie d'excrétion.

De façon satisfaisante, ces études démontrent également la biocompatibilité des micelles de PERFECTA puisqu'aucun signe clinique n'a été observé chez l'animal durant les 4 jours de protocole. Par ailleurs, les animaux ont été pesés chaque jour sans variation significative de leur poids (20.1 ± 1.0 g).

Les organes d'intérêt ont par la suite été prélevés et analysés *ex vivo*.

3.5- Analyses *ex vivo*

Les souris ont été sacrifiées et exsanguino-perfusées à l'issue des expériences IRM *in vivo* et certains organes ont été prélevés (en particulier le foie, la tumeur et le muscle). Les organes isolés ont été analysés par des expériences IRM et de RMN ^{19}F afin de confirmer *ex vivo* la présence de la sonde fluorée PERFECTA.

3.5.1 Expérience IRM

Une quantification *ex vivo* des micelles PERFECTA@PFTD-PEG a pu être réalisée à l'aide d'acquisitions IRM sur le foie réséqué via l'utilisation d'un tube de référence de concentration connue ($[^{19}\text{F}] = 660 \text{ mM}$). Des images IRM ^{19}F ont d'abord confirmé la présence de PERFECTA (Figure 78) et les mesures de concentration indiquent $[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 89 \text{ mM}$, ce qui est en accord avec les quantités déterminées au cours du protocole *in vivo* ($[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 92 \text{ mM}$ à 144 h juste avant le sacrifice).

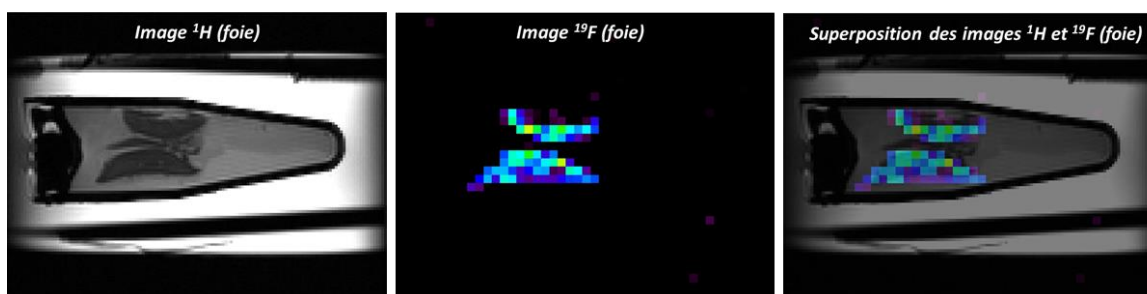


Figure 78 : Images $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ du foie *ex vivo*.

3.5.2 Expérience RMN ^{19}F

Une méthode complémentaire utilisant la RMN ^{19}F a été mise en place afin de confirmer la présence de PERFECTA dans les organes d'intérêt (foie, tumeur et muscle). Un protocole d'extraction de molécules fluorées à partir des organes prélevés a été élaboré.

Les organes congelés (tumeur, foie, muscle) ont été broyés à froid à l'aide d'un broyeur à billes et en présence d'un solvant d'extraction (HFIP). Ce dernier a été rajouté afin d'atteindre une concentration finale de 0,2 g d'organes dans 1 mL de solvant. Des séries de centrifugation ont permis d'obtenir des homogénats d'organes. Le surnageant a été recueilli, filtré sur Célite® et le solvant évaporé. Un solvant deutéré (CDCl_3) a été rajouté au résidu pour être analysé par RMN ^{19}F (Figure 79). La présence d'un pic caractéristique à -76.17 ppm permet d'identifier sans ambiguïté la molécule de PERFECTA au niveau du foie et de la tumeur mais pas dans les tissus musculaires. Cette dernière observation, réalisée à l'aide d'une technique RMN sensible, met en exergue l'absence de diffusion aléatoire de la micelle et son accumulation sélective au niveau de la tumeur, ce qui constituait notre ambition de départ.

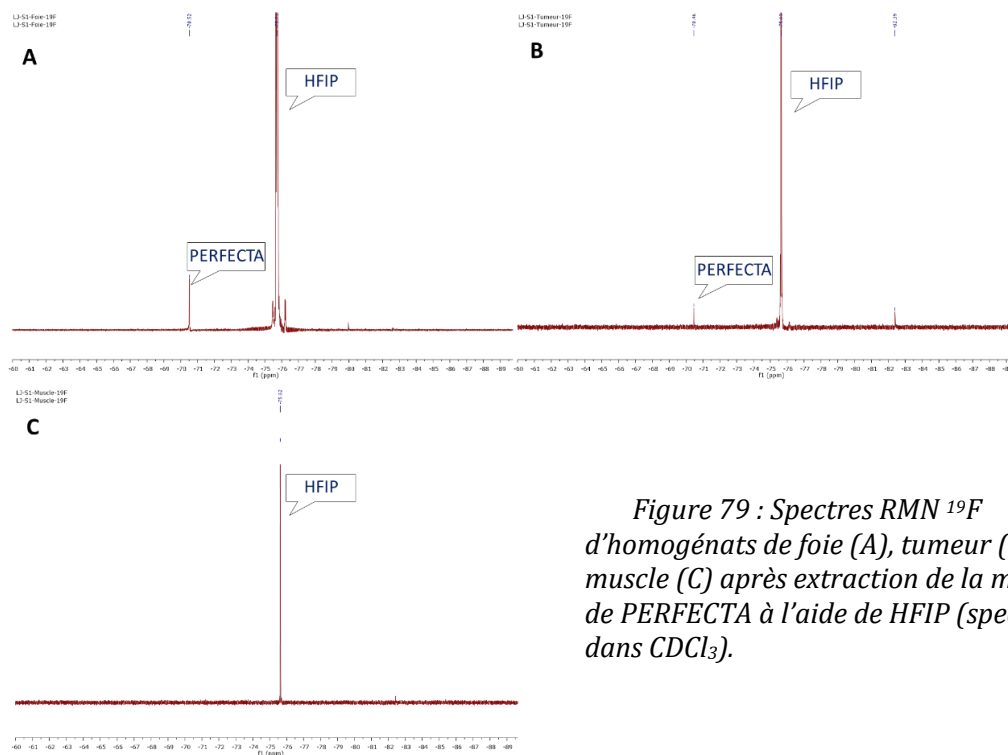


Figure 79 : Spectres RMN ^{19}F d'homogénats de foie (A), tumeur (B) et muscle (C) après extraction de la molécule de PERFECTA à l'aide de HFIP (spectres dans CDCl_3).

VI- Conclusion et perspectives

Des micelles ont été assemblées à partir d'unités amphiphiles constituées d'un motif PEGylé, assurant l'interface avec le milieu environnant, et une chaîne hydrophobe perfluorée constituant le cœur de la micelle. Ces micelles ont été conçues de sorte à pouvoir encapsuler le PERFECTA, une sonde sensible pour l'IRM ^{19}F , et ainsi être injectées *in vivo* comme agent de contraste.

Un protocole associant des séquences IRM optimisées et une formulation micellaire fortement chargée en PERFECTA (PERFECTA@PFTD-PEG) ont permis d'imager sur un modèle souris l'accumulation des micelles dans une tumeur MC-38 par effet EPR, avec environ 3,6 % de la dose injectée accumulée au niveau du tissu d'intérêt. La visualisation du processus d'accumulation et la quantification dans les organes ont été réalisés par IRM ^{19}F avec une sensibilité et une résolution spatiale supérieures à la plupart des sondes fluorées développées dans la littérature. Les micelles trouvent ici une application diagnostique qui pourrait être complétée par la délivrance ciblée de médicaments et donner ainsi accès à un outil théranostique. Par ailleurs, afin d'améliorer le contraste, nous pourrions envisager des nanoobjets dont le signal IRM pourrait être activé à la demande, au moment et à l'endroit choisis. C'est l'approche qui est aujourd'hui explorée au laboratoire dans la continuité des travaux que nous avons initiés.

Chapitre 3 : Nanoparticules d'or pour l'imagerie et la radiothérapie

Le traitement des cancers constitue un enjeu majeur de santé publique. L'objectif des protocoles thérapeutiques anticancéreux est l'élimination sélective et totale du tissu malade, car la présence de cellules cancéreuses résiduelles pourrait participer au développement d'une nouvelle tumeur. Le traitement doit également engendrer un minimum d'effets secondaires. La chirurgie n'est pas la seule technique permettant l'ablation tumorale. Cette dernière peut également être réalisée, entre autres techniques, par radiothérapie *via* l'utilisation de rayonnements ionisants focalisés au niveau des tissus à traiter. Cependant, la localisation exacte de la tumeur est requise afin de ne traiter que les tissus malades et épargner les tissus sains.

C'est dans ce contexte que des systèmes nanométriques ont été conçus afin d'apporter des solutions aux problématiques associés au traitement de tumeurs. Certains de ces systèmes présentent des propriétés intrinsèques originales qui sont exploitables pour des applications biomédicales comme l'imagerie photo-acoustique, la thérapie photo-thermique, l'imagerie aux rayons X ou encore la radiothérapie. En particulier, l'or sous sa forme nanoparticulaire (AuNP) suscite un intérêt particulier pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. Cet engouement s'explique par i) la stabilité chimique et physique des nanoparticules d'or et leur biocompatibilité intrinsèque, ii) leur large gamme de propriétés, iii) leur facilité de synthèse et de fonctionnalisation.

I – Applications des nanoparticules d'or en nanomédecine

1- Propriétés optiques des nanoparticules d'or

La coupe de Lycurgus est un objet qui permet de dater l'utilisation d'AuNP dès le IV^{ème} siècle (Figure 80). Constituée de nanoparticules d'or et d'argent emprisonnées dans une matrice de verre, elle présente la particularité de changer de couleur en fonction de son exposition à la lumière, ce qui illustre parfaitement les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière en interaction avec des nanoparticules métalliques.



Figure 80 : Coupe de Lycurgus selon deux types d'éclairage : verte et opaque lorsqu'elle est éclairée de l'extérieur, rouge et translucide lorsqu'elle est éclairée de l'intérieur.

Lorsque l'on réduit la taille de l'or massif jusqu'au domaine nanométrique, de nouvelles propriétés, notamment optiques, apparaissent. Par exemple, les suspensions colloïdales d'or peuvent prendre plusieurs couleurs, du jaune au marron en passant par le rouge en fonction de la taille et la forme des nanoparticules. Ces modifications sont dues au phénomène de résonance de plasmon de surface (SPR) observé pour de petites particules métalliques.

Le phénomène de SPR a été décrit par Otto et Raether.¹⁰⁶ Lorsqu'une particule métallique est exposée à la lumière, le champ électromagnétique induit une oscillation collective des électrons libres (électrons de la bande de conduction) de la particule métallique (Figure 81). Cela se produit lorsque la longueur d'onde incidente est supérieure à la taille de la particule. Cette oscillation provoque une séparation des charges électriques et crée un moment dipolaire à la surface des nanoparticules. L'amplitude de l'oscillation atteint son maximum à une fréquence spécifique appelée résonance de plasmon de surface qui va dépendre de la forme, de la taille et de l'environnement dans lequel se trouve la nanoparticule. La SPR induit une forte absorption de la lumière incidente et peut être mesurée par spectroscopie UV-visible (Figure 81).¹⁰⁷

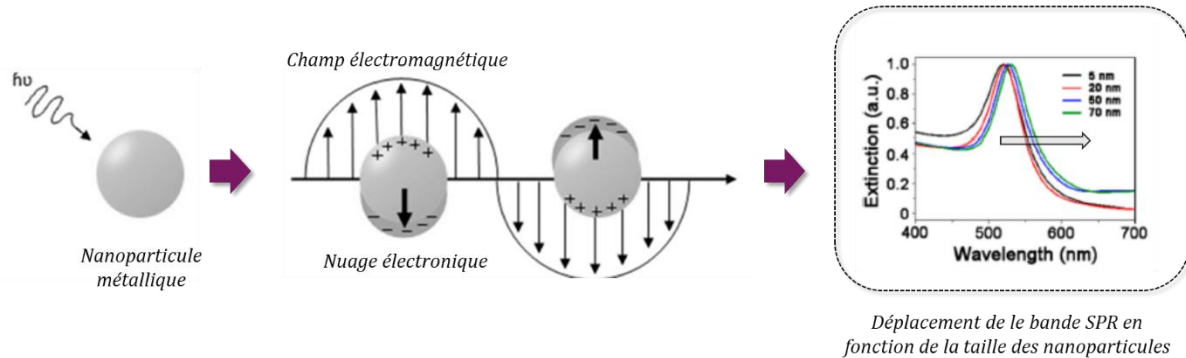


Figure 81 : Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) et spectres UV-vis-NIR de nanoparticules d'or sphériques de différentes tailles.

Dans le cas de nanoparticules sphériques, une seule bande de plasmon est observée. Cette dernière se décale vers des longueurs d'onde supérieures avec l'augmentation du diamètre des nanoparticules (500 nm pour les AuNP de 3 nm de diamètre à 600 nm pour des diamètres > 100 nm).

Des nanoparticules sous forme de bâtonnets présentent quant à elles deux bandes SPR distinctes résultant de l'oscillation des électrons le long de deux axes : une bande d'absorption forte dans le domaine proche infra-rouge et une bande plus faible dans le domaine du visible. L'absorbance dans le domaine proche infra-rouge est particulièrement intéressante pour des applications en biomédicales car l'eau n'absorbe pas à ces longueurs d'ondes, la lumière peut ainsi pénétrer plus profondément dans les tissus biologiques.¹⁰⁸

D'autres applications peuvent également tirer profit des propriétés plasmoniques des AuNP qui ont par exemple été utilisées comme capteurs. En effet, la présence de composés chimiques ou d'analytes biologiques peut induire une agrégation, une désagrégation ou un changement dans la constante diélectrique du milieu, ce qui entraîne une modification de la bande SPR.¹⁰⁹ Cette modification se manifeste par un décalage de l'absorbance vers les longueurs d'ondes supérieures (600 nm) et un pic élargi en fonction de l'état d'agrégation.

¹⁰⁶ Otto, A. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1968**, 216, 398-410.

¹⁰⁷ Alkilany, A. M.; Murphy, C. J. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, 12, 2313-2333.

¹⁰⁸ Weisleder, R. *Nature Biotechnology* **2001**, 19, 316-317.

¹⁰⁹ Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. *Chemical Communications* **2008**, 544-557.

La résonance plasmonique de surface met en évidence les propriétés uniques de l'or à l'échelle nanométrique. Parmi ces propriétés, la conversion de l'énergie lumineuse en chaleur. En effet, la lumière absorbée par les nanoparticules d'or est également rapidement convertie en chaleur, ce qui crée une hyperthermie. Cet échauffement localisé a, par exemple, été exploité pour traiter des cellules cancéreuses.¹¹⁰ On parle ici de thérapie photo-thermique.

Les possibilités d'applications utilisant les nanoparticules d'or sont donc très variées. Elles peuvent être utilisées comme outils diagnostique ou thérapeutique en exploitant à la fois les propriétés intrinsèques des nanoparticules (optiques, électroniques...) mais aussi leur capacité à être facilement fonctionnalisées par des biomolécules par exemple. C'est ce que nous allons détailler dans la suite de ce chapitre.

2- Préparation de nanoparticules d'or

Les procédés établis pour la synthèse de nanoparticules d'or permettent le contrôle de la taille, la forme ou du type de fonctionnalisation que l'on souhaite y apporter. En général, ces voies de synthèses suivent un processus en trois étapes :

- Étape 1 : la synthèse proprement dite qui va « figer » le corps cristallin des nanoparticules.
- Étape 2 : l'introduction de ligands de surface qui incorporent des fonctions chimiques réactives.
- Étape 3 : une fonctionnalisation de ces ligands afin d'introduire un composé spécifique en fonction de l'application visée.

Les procédés de synthèse peuvent être réalisés par des méthodes physiques, chimiques ou encore biologiques.^{111,112} Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'obtention de nanoparticules d'or sphériques par voie chimique.

2.1- Synthèses de nanoparticules sphériques par voie chimique

Faraday décrit pour la première fois la synthèse d'or colloïdal suite à une réduction d'acide chloraurique par du phosphore.¹¹³ Depuis, des techniques d'analyses telles que la microscopie électronique à transmission (MET) ont permis de suivre la croissance des nanoparticules et ainsi adapter et améliorer les voies de synthèses en fonction de l'application visée. De nos jours, les voies de synthèse les plus fréquemment rencontrées dans la littérature sont celles décrites par Turkevich et Brust.

¹¹⁰ Ali, M. R. K.; Wu, Y.; El-Sayed, M. A. *The Journal of Physical Chemistry* **2019**, *123*, 15375-15393.

¹¹¹ Pourali, P.; Badiie, S. H.; Manafi, S.; Noorani, T.; Rezaei, A.; Yahyaei, B. *Electronic Journal of Biotechnology* **2017**, *29*, 86-93.

¹¹² Sengani, M.; Grumezescu, A. M.; Rajeswari, V. D. *OpenNano* **2017**, *2*, 37-46.

¹¹³ Faraday, M. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145-181.

2.1.1- Synthèse de Turkevich^{114,115}

La réduction de sels d'or par du citrate de sodium est une voie de synthèse connue pour sa simplicité et sa fiabilité. Cette méthode, décrite par Turkevich en 1951, permet d'obtenir des nanoparticules de tailles variables comprises entre 15 et 150 nm. La réaction est basée sur la réduction d'acide chloraurique (HAuCl₄) à l'aide de citrate de sodium, en phase aqueuse. Dans ce procédé, les ions citrates agissent à la fois comme réducteur et agent stabilisant afin d'empêcher l'agrégation des nanoparticules. Les molécules de citrate qui s'adsorbent à la surface de la particule, permettent de créer une charge négative autour de cette dernière. Des forces de répulsions électrostatiques entre particules empêchent leur agrégation. Par ailleurs, la quantité de citrate introduite par rapport à la quantité de sels d'or permet de contrôler la taille des nanoparticules obtenues. En effet, des quantités importantes de citrate conduisent généralement à des nanoparticules de petite taille.¹¹⁶

2.1.2- Synthèse de Brust¹¹⁷

La synthèse de Brust, décrite en 1994, permet d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques de 5 nm de diamètre stabilisées par des ligands thiols. Elles sont synthétisées dans un système biphasique eau-toluène. L'acide chloraurique est tout d'abord solubilisé dans la phase aqueuse puis transféré dans la phase toluène à l'aide d'un agent de transfert de phase (bromure de tétraoctylammonium - TOAB). Après une séparation des deux phases, un alcane thiol est introduit dans la phase organique, et une solution aqueuse de borohydrure de sodium est finalement additionnée. La formation des nanoparticules est observable par le changement de couleur de la phase organique qui vire au rouge vin.^{118,119}

La méthode de Brust a par la suite été améliorée de manière à produire des nanoparticules en une seule phase et étendue à d'autres métaux comme l'argent, le cuivre et le palladium.^{120,121} Le succès de cette méthode réside dans : i) la facilité de synthèse, ii) la stabilité des nanoparticules obtenues sans agrégation ou décomposition après plusieurs cycles isolation/dispersion; iii) le contrôle de la taille avec une faible polydispersité, iv) la facilité de fonctionnalisation et de modification des nanoparticules *via* un échange de ligands.

2.2- Stratégies de fonctionnalisation

Les nanoparticules dispersées dans un solvant sont soumises à des forces multiples comme la gravité, l'agitation thermique et des forces attractives/répulsives entre particules (interactions

¹¹⁴ Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.

¹¹⁵ Frens, G. *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20-22.

¹¹⁶ Ojea-Jimenez, I.; Romero, F. M.; Bastus, N. G.; Puentes, V. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 1800-1804.

¹¹⁷ Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 801-802.

¹¹⁸ Li, Y.; Zaluzhna, O.; Xu, B.; Gao, Y.; Modest, J. M.; Tong, Y. J. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2092-2095.

¹¹⁹ Perala, S. R. K.; Kumar, S. *Langmuir* **2013**, *29*, 9863-9873.

¹²⁰ Chen, S.; Sommers, J. M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 8816-8820.

¹²¹ Shen, C.; Hui, C.; Yang, T.; Xiao, C.; Tian, J.; Bao, L.; Chen, S.; Ding, H.; Gao, H. *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 6939-6944.

électrostatiques, forces de van der Waals) qui peuvent provoquer l'agrégation de ces dernières. Des molécules « barrières » sont ainsi ajoutées pour éloigner les nanoparticules les unes des autres et maintenir de la stabilité colloïdale dans le milieu choisi. Ces molécules peuvent être utilisées comme points d'ancrage pour des composés d'intérêts (fonctionnalisation indirecte), ou permutées par de nouveaux ligands de surface (fonctionnalisation directe).

2.2.1- La fonctionnalisation directe

Durant la synthèse de nanoparticules d'or, des ligands, agissant en tant que réducteur et/ou agent stabilisants sont introduits. Par exemple, lors de la synthèse de Turkevich, les nanoparticules obtenues sont stabilisées par des ions citrates qui sont suffisamment labiles pour être échangés par des ligands présentant des groupements de plus grande affinité pour la surface de l'or. Il est donc possible d'apporter certaines fonctionnalités à la surface des nanoparticules par échange de ligands. La fonctionnalité (principe actif, biomolécule, radionucléide...) sera alors directement greffée à la surface de la nanoparticule.

2.2.2- La fonctionnalisation indirecte

Les nanoparticules d'or peuvent être conjuguées à des biomolécules par interactions hydrophobes ou électrostatiques avec le ligand déjà en place à la surface de la nanoparticule. Cette approche est particulièrement intéressante dans le cas de la délivrance de principe actif puisqu'aucune modification chimique de la molécule active ne doit être envisagée.¹²² Les fonctionnalités peuvent par ailleurs être introduites par une liaison covalente avec le ligand de surface de la nanoparticule. La plupart des réactions font intervenir des couplages peptidiques ou des réactions de chimie click (alcyne-azoture, maléimide-thiol...). Il est donc nécessaire que le ligand contienne des groupes fonctionnels permettant l'accroche de molécules actives en périphérie.¹²³

La simplicité avec laquelle les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées permet donc d'avoir accès à une très grande diversité de systèmes et d'envisager de nombreuses applications biomédicales, des thérapies ciblées en passant par de l'imagerie multimodale.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous souhaitons nous orienter vers l'élaboration de nanoparticules d'or pour deux applications : le contraste aux rayons X et la potentialisation de la radiothérapie. En effet, les nanoparticules d'or ont également la particularité de pouvoir interagir avec les rayonnements X ce qui les rend utiles pour des applications aussi bien diagnostiques que thérapeutiques.^{124,125,126}

¹²² Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z.-J.; Menichetti, S.; Rotello, V. M. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 1360-1361.

¹²³ Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 4678-4684.

¹²⁴ Paciotti, G. F.; Myer, L.; Weinreich, D.; Goia, D.; Pavel, N.; McLaughlin, R. E.; Tamarkin, L. *Drug Delivery* **2004**, *11*, 169-183.

¹²⁵ Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. *Small* **2005**, *1*, 325-327.

¹²⁶ Cole, L. E.; Ross, R. D.; Tilley, J. M.; Vargo-Gogola, T.; Roeder, R. K. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 321-341.

3- Nanoparticules d'or en imagerie et thérapie

3.1- Nanoparticules d'or pour l'imagerie par tomodensitométrie

3.1.1- Principe de fonctionnement du contraste aux rayons X

La technique d'imagerie aux rayons X est une technique non invasive basée sur l'atténuation par les tissus de l'organisme d'un faisceau de rayons X (25–150 keV) produits par un tube à rayons X (ou tube de Coolidge). Après avoir traversé le patient, le faisceau est recueilli sur une plaque photographique ou au niveau d'un détecteur de photons avant d'être révélé ou converti en signaux numériques.

Pour comprendre le principe de fonctionnement de l'imagerie aux rayons X, il est important de s'intéresser au phénomène physique d'interaction des rayonnements avec la matière. Une fois produits, les rayons X vont traverser le patient et interagir plus ou moins fortement avec les tissus. Comme les photons des rayons X sont absorbés ou diffusés, l'intensité (I) du faisceau de rayons X peut se traduire par :

$$I = I_0 e^{-x\mu/\rho}$$

Avec I_0 l'intensité initiale du faisceau de rayons X, x l'épaisseur du tissu ou du matériau, μ le coefficient d'atténuation linéaire aux rayons X (cm^{-1}) des tissus ou matériau et ρ la densité du tissu ou matériau (g cm^{-3}).

Si la matière est dense, la collision des électrons constituant la matière avec les rayons X est forte. C'est pourquoi, les os, riches en calcium, vont relativement bien absorber les rayons X. Les tissus mous comme les poumons et les muscles sont, au contraire, peu denses et les rayons X vont les traverser sans donner de contraste.¹²⁷ Autrement dit, les éléments à hauts numéros atomiques (Z) et de forte densité (ρ) absorbent plus facilement les rayons X. Ils vont posséder un fort coefficient d'atténuation de masse (μ/ρ) et seront donc visibles par contraste aux rayons X.

Les techniques de radiographie et de tomodensitométrie utilisent ce même principe physique. Par rapport à la radiographie, l'imagerie par tomodensitométrie permet d'avoir accès à des images en trois dimensions réalisées à partir de séries de projections autour du patient. Développé dans les années 70 par Hounsfield et McCormack, l'imagerie par tomodensitométrie est aujourd'hui la méthode la plus utilisée pour le diagnostic.

Les inconvénients majeurs de cette technique sont liés à la difficulté à distinguer certains tissus, due à la faible atténuation aux rayons X de tissus mous, ce qui se traduit par un faible rapport signal/bruit. Les agents de contrastes ont ainsi été introduits dans le but de renforcer le contraste entre les tissus possédant une faible atténuation (ou une atténuation similaire) aux rayons X en augmentant le rapport signal/bruit sans augmenter la dose de rayonnement reçue par le patient.

¹²⁷ Yu, S.-B.; Watson, A. D. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2353-2378.

En 1910, des suspensions à base de sulfate de baryum ont été utilisées pour l'exploration du tube digestif après administration orale. De petites molécules iodées hydrosolubles ont, par la suite, été développées puis les structures ont été optimisées de manière à les rendre moins toxiques. Le baryum et l'iode sont des éléments qui possèdent un numéro atomique élevé ($Z_I = 53$ et $Z_{Ba} = 56$). Ils ont tendance à absorber naturellement les rayons X et se comportent donc comme des agents contrastant pour l'imagerie X. Dans ce contexte, la molécule de iohexol, découverte en 1970 est une des molécules iodées les plus utilisées de nos jours (Figure 82). Cependant son utilisation est limitée à cause d'une élimination par le foie et les reins rapide, ne laissant pas suffisamment de temps pour l'acquisition de données. Afin de contourner ces limitations, des formulations liposomales ou micellaires ont, par exemple, été développées.^{128,129}

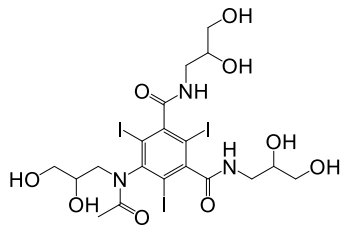


Figure 82 : molécule de iohexol.

Une alternative à l'utilisation des molécules iodées consiste à utiliser des métaux avec des numéros atomiques élevés.

3.1.2- Intérêt diagnostique des nanoparticules d'or

L'or possède un numéro atomique plus élevé que l'iode ($Z_{Au} = 79$) et donc un pouvoir absorbant supérieur ($5,16 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ contre $1,94 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ à 100 keV). Ainsi l'or offre théoriquement 2,7 fois plus de contraste par unité de masse que l'iode.

Les premiers essais *in vivo* d'imagerie utilisant des nanoparticules d'or comme agent de contraste datent de 2006. L'équipe de Hainfeld s'est intéressée au potentiel diagnostique de nanoparticules d'or de 1,9 nm de diamètre ainsi qu'à leur biodistribution. Après administration intraveineuse d'Or ($2,7 \text{ g kg}^{-1}$) à des souris porteuses de tumeurs mammaires sous cutanées (EMT-6), les auteurs ont pu visualiser des vaisseaux sanguins de très petite taille (100 μm de diamètre) et localiser la tumeur (Figure 83). Par ailleurs, des images enregistrées à des temps variables mettent en évidence la voie d'élimination des nanoparticules qui ne s'accumulent ni dans le foie ni dans la rate mais au niveau des reins, suggérant leur élimination par voie urinaire.¹³⁰ Le contraste résultant de l'administration de nanoparticules d'or a été comparé au contraste produit par l'iohexol. À quantité équivalente, les nanoparticules d'or génèrent un contraste trois fois supérieur. Il est également possible de visualiser un contraste à des énergies très faibles (< 30 keV).

¹²⁸ Torchilin, V. P.; Frank-Kamenetsky, M. D.; Wolf, G. L. *Academic Radiology* **1999**, *6*, 61-65.

¹²⁹ Kao, C.-Y.; Hoffman, E. A.; Beck, K. C.; Bellamkonda, R. V.; Annapragada, A. V. *Academic Radiology* **2003**, *10*, 475-483.

¹³⁰ Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Focella, T. M.; Smilowitz, H. M. *The British Journal of Radiology* **2006**, *79*, 248-253.

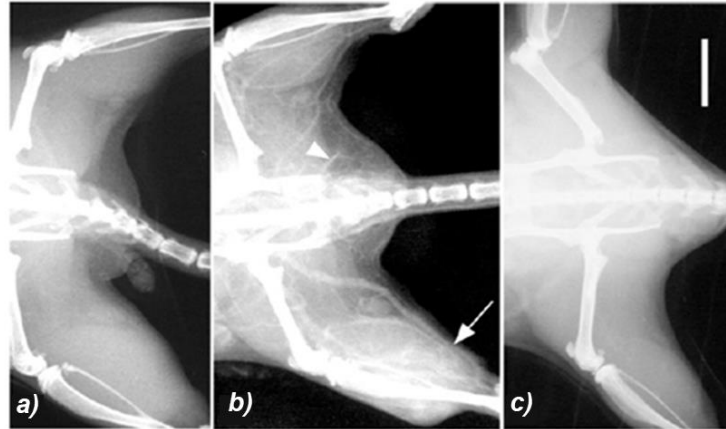


Figure 83 : Image aux rayons X d'une souris porteuse d'une tumeur (flèche) (a) avant injection et 2 min après administration (b) de nanoparticules d'or et (c) de iohexol.¹³⁰

3.1.3- Facteurs influençant le contraste

L'effet de la taille des nanoparticules sur l'efficacité du contraste a été étudié dans la littérature mais les conclusions tirées sont contradictoires. Certains travaux ont par exemple démontré que des AuNP de petite taille (5–13 nm) possédaient un pouvoir d'atténuation aux rayons X supérieur à celui d'AuNP plus grosses.^{131,132} L'équipe de Chang s'est également intéressée à l'atténuation aux rayons X de particules de taille comprise entre 3,9 et 41,1 nm. Contrairement à ce qui a été énoncé précédemment, cette équipe a mis en avant le potentiel des grosses nanoparticules d'or à générer un meilleur contraste.¹³³ Une étude plus récente réalisée par l'équipe de Cormode sur six AuNP de tailles comprises entre 4 et 152 nm et sur trois scanners différents semble montrer que la taille des AuNP n'a pas d'influence marquée sur l'atténuation des rayons X mais sur la pharmacocinétique des différentes formulations. Les petites nanoparticules d'or (4–15 nm) circulant beaucoup plus longtemps dans le sang, la différence de pharmacocinétique en fonction de la taille des AuNP est donc à prendre en compte en fonction de l'application souhaitée.¹³⁴

Le potentiel des AuNP à absorber les rayonnements est également favorable à une utilisation en radiothérapie.

¹³¹ Xu, C.; Tung, G. A.; Sun, S. *Chemistry of materials* **2008**, *20*, 4167-4169.

¹³² Khademi, S.; Sarkar, S.; Kharrazi, S.; Amini, S. M.; Shakeri-Zadeh, A.; Ay, M. R.; Ghadiri, H. *Physica Medica: European Journal of Medical Physics* **2018**, *45*, 127-133.

¹³³ Dou, Y.; Guo, Y.; Li, X.; Li, X.; Wang, S.; Wang, L.; Lv, G.; Zhang, X.; Wang, H.; Gong, X.; Chang, J. *ACS Nano* **2016**, *10*, 2536-2548.

¹³⁴ Dong, Y. C.; Hajfathalian, M.; Maidment, P. S. N.; Hsu, J. C.; Naha, P. C.; Si-Mohamed, S.; Breuille, M.; Kim, J.; Chhour, P.; Douek, P.; Litt, H. I.; Cormode, D. P. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 14912.

3.2- Utilisation de nanoparticules d'or pour la radiothérapie

3.2.1- Principe de la radiothérapie

La radiothérapie, également connue sous le nom de thérapie par rayonnement, est basée sur l'utilisation d'un rayonnement ionisant (rayons X, gamma, ions énergétiques) afin de détruire les cellules cibles et limiter leur croissance et leur division. Cette approche thérapeutique a été utilisée pour la première fois par Grubbe, pour le traitement aux rayons X d'un patient atteint de cancer.¹³⁵

En radiothérapie, les radiations peuvent être délivrées de différentes manières :

- Par l'utilisation d'une source de rayonnement externe (rayons X ou gamma).
- Par l'intermédiaire d'une source radioactive scellée placée à proximité de la zone à traiter (radiothérapie interne).
- Par l'administration d'une macromolécule (anticorps, peptide) radiomarquée (ex. lutétium 177) capable d'agir spécifiquement au niveau d'une cible thérapeutique (radiothérapie vectorisée).

Les effets physiologiques liés à l'utilisation de radiations ont été mis en évidence pour la première fois en 1898 par Pierre et Marie Curie avec le radium.¹³⁶ Les rayonnements ont la particularité d'interagir avec la matière en produisant des réactions en cascades qui conduisent à une fragmentation de l'ADN et plus généralement du matériel biologique. Avant de s'intéresser plus en détail sur les effets des rayonnements au niveau de la matière, il est important de comprendre le processus de radiothérapie, illustré ci-après pour les rayons X.

- Étape 1 : les rayons X sont produits à l'aide d'un accélérateur linéaire de particules. Il accélère des électrons qui vont bombarder une cible en tungstène.
- Étape 2 : une fois sur la cible, les électrons sont freinés ce qui génère une énergie sous forme de photons (rayons X).
- Étape 3 : les rayons sont orientés et focalisés sur la zone à traiter pour finalement déposer leur énergie au niveau du matériel biologique constitutif des cellules (lipides, protéines, ADN...).

Lorsque les rayons atteignent les cellules, ils vont induire des altérations (coupure de liaisons chimique, arrachement d'électrons, etc.), créant ainsi des lésions ce qui modifie le fonctionnement normal des cellules. Le rayonnement est dit ionisant lorsqu'il est lui-même chargé (protons, électrons, ions lourds) ou non-ionisant lorsqu'il est électriquement neutre (photons, neutrons). Dans ce dernier cas, le rayonnement interagit avec la matière en produisant des électrons secondaires (effet photoélectrique ou Compton). En fonction de l'énergie du photon incident, les altérations peuvent s'effectuer :

¹³⁵ Grubbe, E. H. (1902). "X-rays in the treatment of cancer and other malignant diseases". *Medical Record*. **62**: 692–695.

¹³⁶ Lederman, M. *International Journal of Radiation Oncology* **1981**, 7, 639-648.

- De manière directe : si l'énergie des électrons secondaires est suffisamment importante, elle va directement provoquer des lésions par cassure des brins d'ADN.
- De manière indirecte : les rayonnements interagissent avec les composants intracellulaires, en particulier l'eau, en produisant des radicaux libres. Ces radicaux sont des espèces chimiques très instables du fait de la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence. La radiolyse de l'eau forme des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) qui peuvent être toxiques pour la cellule. C'est par exemple le cas du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles. Ces derniers sont des oxydants puissants qui vont jouer un rôle dans le processus de dégradation de biomolécules en créant des dégâts importants de manière irréversible.

Finalement, des processus au niveau cellulaire vont être activés de manière à réparer les lésions dues aux radiations. Il est cependant très difficile pour les cellules de remédier à ce type de dommages : elles vont mourir par nécrose ou apoptose.

Les cellules saines voisines peuvent également être affectées faisant apparaître des effets secondaires indésirables comme une fibrose ou un risque de cancer induit par les rayons. D'autre part, les cellules cancéreuses peuvent parfois développer une forme de résistance aux rayons. Il est donc nécessaire d'augmenter la dose de rayonnement entraînant davantage de lésions au niveau des tissus sains environnants. Des efforts ont donc été déployés afin d'ajuster la dose de rayonnement appliquée à la tumeur avec plus de précisions par combinaison avec une modalité d'imagerie, par exemple.

3.2.2- Intérêt thérapeutique des nanoparticules d'or

Afin de contourner les problèmes liés aux effets secondaires causés par les fortes doses de rayonnement, notamment par l'altération de cellules saines, des alternatives ont été développées en se basant, par exemple, sur l'utilisation de nanoparticules d'or. En effet, les nanoparticules d'or possèdent un effet radio-sensibilisant qui résulte de leur capacité à interagir avec les photons « X » et à produire des électrons secondaires. Ces électrons secondaires généreront ensuite des radicaux libres responsables des dommages au niveau cellulaire.

L'utilisation de nanoparticules d'or ciblées en radiothérapie permet d'absorber localement le rayonnement et de potentialiser son effet au niveau des cellules tumorales.¹³⁷ Cette méthode pourrait permettre d'utiliser des doses d'irradiation plus faibles car absorbées en quasi-totalité par les nanoparticules de manière à épargner les tissus sains environnants.

Les premiers essais *in vivo* de radio-sensibilisation utilisant des nanoparticules d'or ont été effectués par Hainfeld en 2004. Suite à l'administration par voie intra-veineuse de nanoparticules d'or de 1,9 nm (Nanoprobés®) chez des souris porteuses de tumeurs mammaires (EMT-6), une série de radiation aux rayons X a permis de suivre l'évolution de la régression tumorale (Figure

¹³⁷ Haume, K.; Rosa, S.; Grellet, S.; Smialek, M. A.; Butterworth, K. T.; Solov'yov, A. V.; Prise, K. M.; Golding, J.; Mason, N. J. *Cancer Nanotechnology* **2016**, 7, 8.

84). Un suivi de la croissance tumorale au cours du temps chez les souris irradiées traitées ou non à l'or, a permis de valider l'effet radio-sensibilisant des nanoparticules d'or.¹³⁸

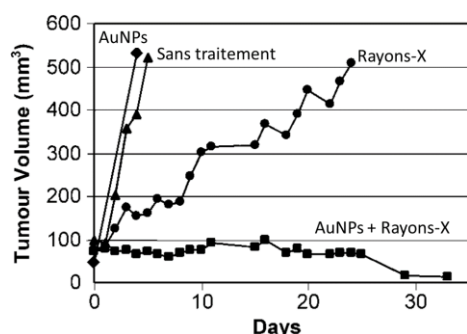


Figure 84 : Evolution de la croissance tumorale en fonction du temps.

Depuis, dans le but d'améliorer l'effet radio-sensibilisant, des nanoparticules d'or aux chimies de surfaces variées ont été développées. Quelques exemples sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Résumé de quelques études in vitro/in vivo sur l'effet radio-sensibilisant de nanoparticules d'or.

Taille des particules	Chimie de surface	Dose injectée	Energie	Type cellulaire testé	Résultat <i>in vitro/in vivo</i>
13 nm	Citrate	200 µL, 200 nM	6 MeV	B16F10 (mélanome)	Retard croissance tumorale ¹³⁹
4,8 à 50 nm	PEG	4 mg/kg	662 keV	U14 (col de l'utérus)	Retard croissance tumorale ¹⁴⁰
2 nm	Glutathion	10 mg/kg	662 keV	U14	Décroissance du volume tumoral ¹⁴¹
14 nm	Glucose	5 nM	6 MeV	SK-OV-3 (Ovaire)	Inhibition de la croissance cellulaire ¹⁴²

3.2.3- Facteurs influençant l'effet radio-sensibilisant

L'effet radio-sensibilisant peut varier en fonction de la localisation des nanoparticules dans les différents compartiments cellulaire.¹⁴³ Par ailleurs, l'environnement tumoral peut également avoir une influence sur l'efficacité de l'effet radio-sensibilisant. En effet, la plupart des tumeurs solides sont hypoxiques en raison d'un apport insuffisant d'oxygène par le système vasculaire. Cela constitue un réel obstacle surtout lorsque le mécanisme de destruction des cellules cancéreuses est basé sur la génération de ROS. Par conséquent, plusieurs approches ont été développées afin de pallier les problèmes d'hypoxie et incluent l'oxygénothérapie hyperbare qui consiste à administrer de l'oxygène par voie respiratoire à une pression supérieure à la pression

¹³⁸ Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. *Physics in Medicine and Biology* **2004**, *49*, N309-N315.

¹³⁹ Chang, M.-Y.; Shiau, A.-L.; Chen, Y.-H.; Chang, C.-J.; Chen, H. H.-W.; Wu, C.-L. *Cancer Science* **2008**, *99*, 1479-1484.

¹⁴⁰ Zhang, X.-D.; Wu, D.; Shen, X.; Chen, J.; Sun, Y.-M.; Liu, P.-X.; Liang, X.-J. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6408-6419.

¹⁴¹ Zhang, X.-D.; Chen, J.; Luo, Z.; Wu, D.; Shen, X.; Song, S.-S.; Sun, Y.-M.; Liu, P.-X.; Zhao, J.; Huo, S.; Fan, S.; Fan, F.; Liang, X.-J.; Xie, J. *Advanced Healthcare Materials* **2014**, *3*, 133-141.

¹⁴² Geng, F.; Song, K.; Xing, J. Z.; Yuan, C.; Yan, S.; Yang, Q.; Chen, J.; Kong, B. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 285101.

¹⁴³ Hossain, M.; Su, M. *The journal of physical chemistry* **2012**, *116*, 23047-23052.

atmosphérique ou l'utilisation de composés vecteurs (ex. perfluorocarbone), capables de transporter de l'oxygène jusqu'à la tumeur.¹⁴⁴

4- Objectifs

Dans le cadre de cette thèse, nous avons souhaité développer des formulations de nanoparticules d'or encapsulées dans des micelles fluorées. Le système nanoparticulaire doit posséder trois propriétés, à savoir : i) être capable de cibler les tissus cancéreux par effet EPR, ii) améliorer le contraste en imagerie par tomодensitométrie en apportant localement une forte quantité de nanoparticules d'or, iii) accentuer l'effet radio-sensibilisant de l'or en apportant du dioxygène au niveau des tissus tumoraux afin de favoriser la production d'espèces réactives (ROS) sous rayonnement.

La suite de ce chapitre sera donc dédiée à i) la synthèse des nanoparticules d'or, leur fonctionnalisation et leur encapsulation dans les micelles fluorées, ii) l'évaluation du potentiel en imagerie des nanoparticules *in vivo* par tomодensitométrie et iii) l'évaluation de la prise en charge de dioxygène dans les micelles pour de la radiothérapie.

II – Préparation des micelles encapsulant les nanoparticules d'or

1- Stratégie mise en œuvre

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la stratégie mise en place pour produire des micelles fluorées incorporant des nanoparticules d'or. Ces micelles sont les mêmes que celles utilisées dans la partie IRM ¹⁹F de ce manuscrit, à savoir des micelles constituées d'amphiphiles PFTD-PEG (chaîne perfluorocarbonée liée à une unité PEG₂₀₀₀). La chimie de surface PEGylée de ces micelles a déjà montré un comportement favorable *in vivo* pour le ciblage des tumeurs par effet EPR. Le principe sous-jacent est de pouvoir encapsuler des nanoparticules d'or dans le cœur fluoré de la micelle et d'exploiter la capacité des phases fluorées à transporter du dioxygène, pour une délivrance simultanée d'or et d'oxygène au niveau des tissus tumoraux. Notre objectif est l'obtention d'un outil unique capable d'induire un contraste aux rayons X pour l'imagerie de la zone tumorale et de potentialiser un effet radiothérapeutique en associant localement or et oxygène.

Le cœur fluoré de la micelle permet de prendre en charge des composés eux-mêmes fluorés. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes orientés vers la préparation de nanoparticules d'or stabilisées par des ligands perfluorocarbonés (Figure 85). L'or entouré de sa couche de ligands fluorés, deviendra alors affiné pour le cœur de la micelle, permettant son encapsulation et sa dispersion en milieu physiologique.

¹⁴⁴ Graham, K.; Unger, E. *International journal of nanomedicine* **2018**, 6049-6058.

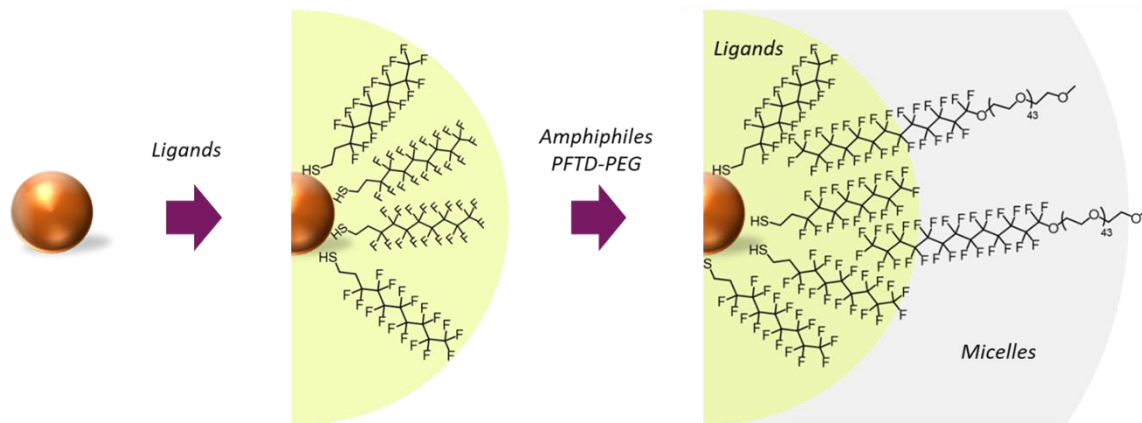


Figure 85 : Stratégie utilisée visant à obtenir des nanoparticules d'or encapsulées dans des micelles fluorées.

2- Préparation des micelles encapsulant les nanoparticules d'or

2.1- Synthèse des nanoparticules d'or

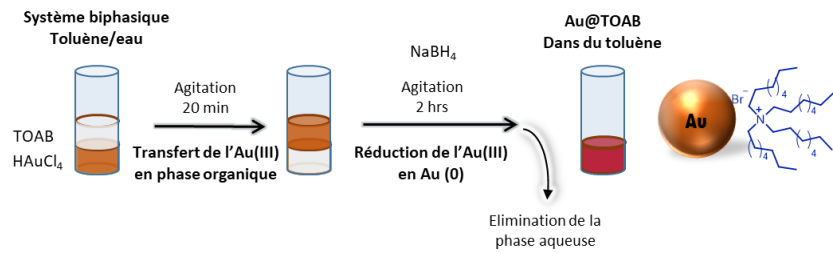
Pour notre étude, nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules d'or sphériques de 5 nm de diamètre. Ces nanoparticules sont les plus utilisées pour l'imagerie aux rayons X et pour la radiothérapie. D'autre part, l'accès à ce type de nanoparticules est relativement aisé et de nombreuses voies de synthèse ont été décrites afin d'en contrôler la taille mais aussi la forme. Par ailleurs, ces synthèses conduisent à des nanoparticules qui possèdent des ligands faiblement liés en surface (ammoniums quaternaires) qui seront donc facilement échangeables par nos nouveaux ligands fluorés.

La méthode initiale de Brust consiste à mettre en contact de l'acide chloraurique, un agent de transfert de phase, un alcanethiol et du borohydrure de sodium. Les nanoparticules produites incorporent en surface les ligands alcanethiol initialement introduits. Ces ligands sont « fortement » ancrés et difficilement échangeables. Une voie de synthèse alternative a été décrite plus récemment par Schiffrin et permet d'obtenir les nanoparticules « intermédiaires » stabilisées par du bromure de tétraalkylammonium qui est un ligand labile pouvant être facilement déplacé par un ligand présentant une affinité plus importante pour l'or.¹⁴⁵ C'est la méthode que nous avons retenue pour la préparation de nos AuNP.

Une solution d' HAuCl_4 dans de l'eau ultra pure est mise en contact avec une du bromure de tétraalkylammonium (TOAB) dans le toluène. Le système biphasique est agité vigoureusement pendant 5 min permettant de procéder au transfert de l'or de la phase aqueuse vers la phase organique. Une solution de NaBH_4 est ensuite ajoutée ce qui conduit à un changement rapide de couleur du jaune au rouge, caractéristique d'une modification du degré d'oxydation de l'or.

¹⁴⁵ Fink, J.; Kiely, C. J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, 922-926.

Figure 86 : Voie d'obtention des Au@TOAB selon la méthode de Schiffrin.



La phase organique contenant les nanoparticules d'or est ensuite isolée. Les nanoparticules d'or stabilisées par des ammoniums quaternaires (Au@TOAB) ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET) et par spectroscopie UV-visible.

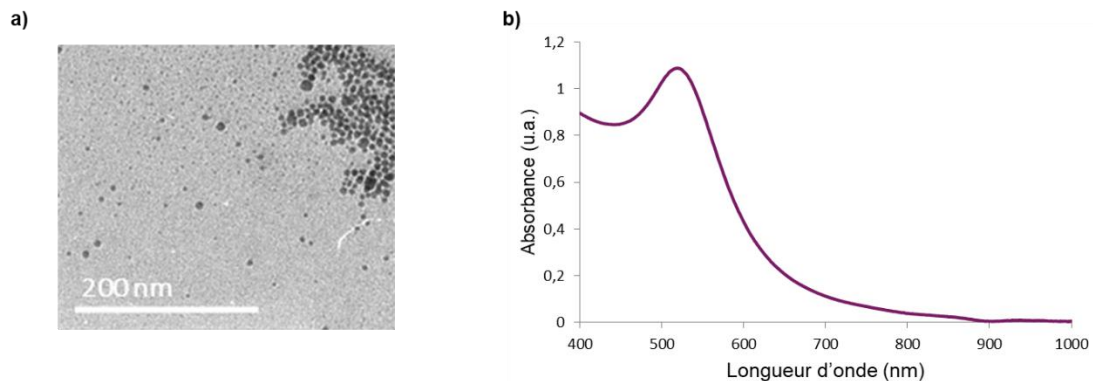


Figure 87 : a) image MET et b) bande SPR de nanoparticules d'or stabilisées par des TOAB.

La microscopie électronique est particulièrement bien adaptée à l'analyse de particules métalliques de taille nanométrique qui génèrent un bon contraste aux faisceau d'électrons. Une image MET des nanoparticules d'or stabilisées par des ammoniums quaternaires est présentée en Figure 87. Les nanoparticules d'or présentent une morphologie sphérique et une taille relativement homogène (ca. 5 nm). La mesure de la SPR par spectroscopie UV-visible est en accord avec les données de microscopie et suggère également la présence d'une population monodisperse de nanoparticules.

La stabilité de la solution colloïdale est d'une durée de 5 jours maximum à température ambiante. Au-delà de cette limite, des agrégats commencent à se former et sont visibles à l'œil nu et un élargissement de la bande SPR est observé.

2.2- Échange du ligand

Pour pouvoir être prises en charge dans le cœur entièrement fluoré des micelles, les nanoparticules d'or doivent présenter une surface fluorée. La stabilisation de ces nanoparticules métalliques à l'aide de ligands perfluorés devrait permettre leur migration dans le cœur des micelles par l'intermédiaire d'interactions fluor-fluor. Par ailleurs, suite aux travaux de Cima et d'autres équipes, dans lesquels la stabilité de nanoparticules d'or a été évaluée, l'utilisation d'un groupement thiol comme point d'ancrage des ligands s'est avéré judicieux.¹⁴⁶ Cette fonctionnalité

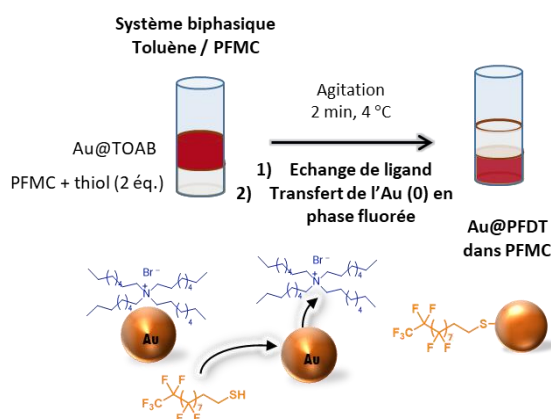
¹⁴⁶ Flynn, N. T.; Tran, T. N. T.; Cima, M. J.; Langer, R. *Langmuir* **2003**, *19*, 10909-10915.

possède une grande affinité avec la surface de l'or et devrait favoriser la permutation des ligands ammoniums quaternaires par les nouveaux ligands perfluorés.

Un échange de ligand a donc été mis en place en nous inspirant du système biphasique utilisé ci-dessus pour la synthèse des nanoparticules. Le ligand utilisé est le 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodécane-thiol (PFDT) qui possède un groupement thiol (-SH) affin pour les surfaces d'or. PFDT est d'abord solubilisé dans un solvant fluorocarboné (le perfluorométhylcyclohexane, PFMC) puis mis au contact des nanoparticules d'or (Au@TOAB) suspendues dans un solvant hydrocarboné (toluène). Les deux phases ne sont pas miscibles et créent donc un système biphasique. Le système est agité vigoureusement ce qui conduit à une émulsion et à un transfert des nanoparticules d'or de la phase hydrocarbonée vers la phase fluorocarbonée avec une permutation concomitante du ligand d'origine (TOAB) par le nouveau ligand fluoré (PFDT).

Ce protocole d'échange de ligand repose sur la capacité des groupements thiols de PFDT à interagir plus fortement avec l'or que les ammoniums de TOAB, permettant au ligand fluoré de se lier à la surface de la nanoparticule. Cette interaction aboutit à un habillage des AuNP avec le 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodécane-thiol (PFDT) qui a été introduit en excès (2 équiv.) afin de faciliter l'échange total avec les ammoniums quaternaires. Compte tenu du caractère amphiphile du ligand, nous pouvons supposer que ce dernier se positionne à l'interface permettant le transfert de phase des nanoparticules.

Figure 88 : Voie d'obtention des Au@PFDT à l'aide d'un système biphasique toluène/PFMC.



Afin d'éviter toute agrégation, l'étape de transfert et d'échange doit se faire sous agitation vigoureuse et à froid. En effet, il a été démontré dans plusieurs études que l'ancrage des thiols à la surface des AuNP était plus rapide à basse température (4 °C).^{147,148} Après élimination de la phase toluène, des étapes de lavage à l'eau sont nécessaires afin d'éliminer l'excès de TOAB. Des analyses par RMN ¹⁹F / ¹H ont été effectuées sur Au@PFDT et confirment la présence du ligand PFDT à la surface de l'or et l'absence de TOAB résiduel. Des images MET montrent des nanoparticules de morphologie et de taille inchangées après l'échange de ligands (Figure 89).

¹⁴⁷ Xia, X.; Yang, M.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Li, Q.; Chen, J.; Xia, Y. *ACS Nano* **2012**, 6, 512-522.

¹⁴⁸ Aina, V.; Marchis, T.; Laurenti, E.; Diana, E.; Lusvardi, G.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Cerrato, G.; Morterra, C. *Langmuir* **2010**, 26, 18600-18605.

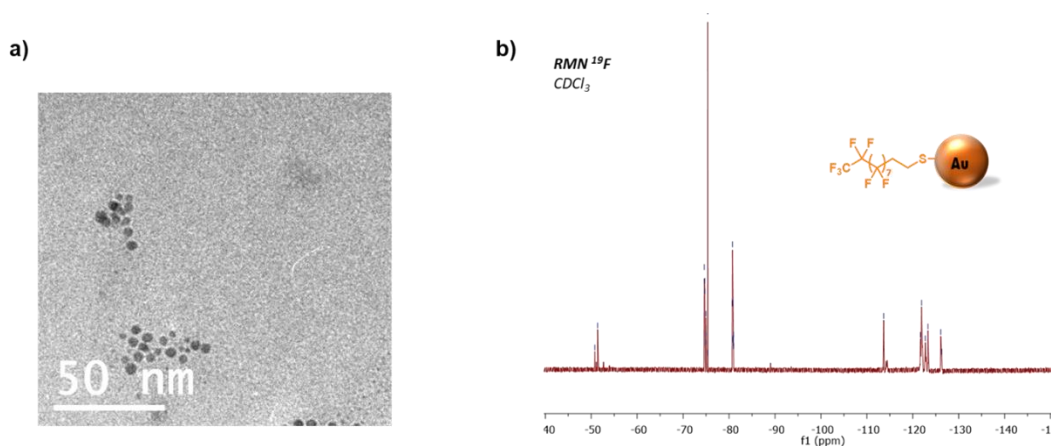
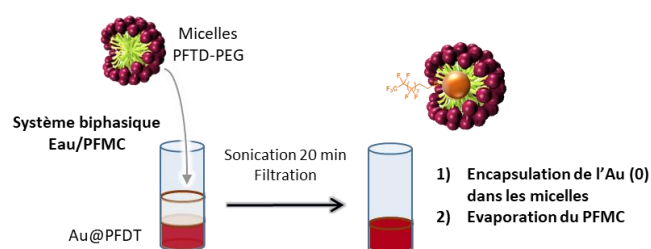


Figure 89 : a) image MET et b) spectre RMN ^{19}F (CDCl_3) de nanoparticules d'or stabilisées par un ligand thiol perfluoré.

2.3- Encapsulation des nanoparticules d'or dans les micelles

À l'issue de l'échange de ligands, les AuNP se retrouvent stabilisées par les ligands perfluorés (Au@PFDT) et dispersées dans un solvant fluoré, le PFMC. Pour réaliser l'étape d'encapsulation des nanoparticules d'or dans les micelles fluorées, nous avons utilisé un système biphasique qui consiste à mettre en contact une suspension colloïdale aqueuse de micelles fluorées (10 mg mL^{-1}) avec une suspension de nanoparticules d'or Au@PFDT suspendue dans du PFMC. Le système est traité aux ultrasons ce qui conduit à une émulsion et à un transfert des nanoparticules d'or de la phase fluorocarbonée vers la phase aqueuse. Ce transfert s'accompagne de l'évaporation concomitante du solvant fluoré, et de l'encapsulation des nanoparticules dans le cœur des micelles (Figure 90). La solution monophasique (aqueuse) finalement obtenue est ensuite filtrée sur membrane de porosité $0,22 \mu\text{m}$ afin d'éliminer les agrégats éventuels.

Figure 90 : Voie d'obtention des Au@PFDT encapsulées dans les micelles fluorées PFTD-PEG (Au@PFTD-PEG).



La formulation Au@PFTD-PEG a été caractérisée par MET et la bande SPR déterminée par spectroscopie UV-visible. Les clichés de microscopie électronique mettent en évidence des objets de taille conservée, soit environ 5 nm mais également la présence de quelques structures de plus grand diamètre ($10\text{-}15 \text{ nm}$) (Figure 91). La spectroscopie UV-visible ne montre pas d'altération du profil de la bande SPR. Ces observations suggèrent que les différentes étapes de fonctionnalisation et d'encapsulation micellaire ne dégradent globalement pas la qualité des nanoparticules et permettent d'obtenir une suspension colloïdale d'or en phase aqueuse.

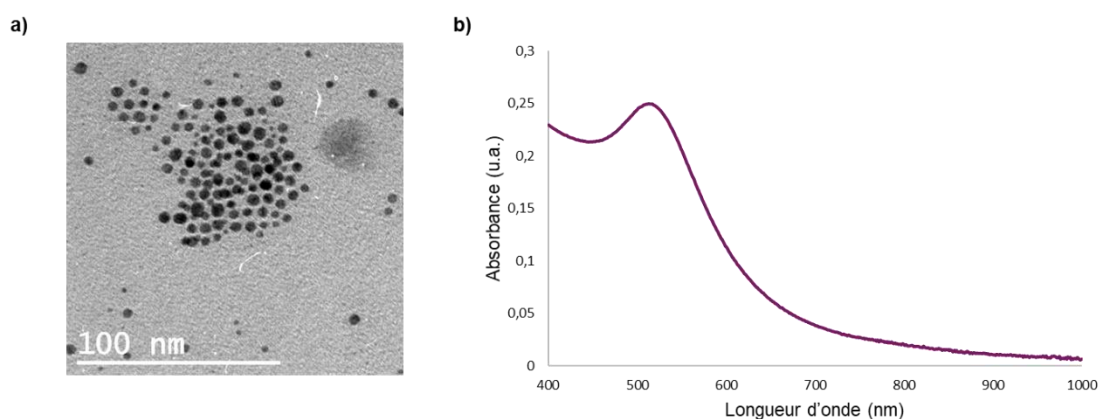


Figure 91 : a) Image MET et b) bande SPR de nanoparticules d'or encapsulées dans des micelles PFTD-PEG.

3- Quantification de l'or

Pour les différents types d'applications visées, il est important de connaître la quantité d'or dans la formulation Au@PFTD-PEG. Cette dernière peut être déterminée par deux méthodes :

- Une méthode directe utilisant la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) qui permet de détecter la présence de métaux ou de nanoparticules à de très faibles concentrations. L'analyse est réalisée (après calibration de l'appareil à l'aide d'une gamme étalon) à partir d'échantillons dilués et préalablement dissous dans de l'eau régale (mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique en proportions 3:1). Les différentes mesures ont été réalisées par Elodie Barruet (CEA/NIMBE).
- Une méthode indirecte par spectroscopie UV-visible qui exploite les propriétés optiques de l'or pour sa quantification dans les micelles.¹⁴⁹ Cette méthode de quantification est dite « indirecte » puisqu'elle se base sur des concentrations préalablement déterminées par ICP-MS. Pour cela, des échantillons d'Au@PFTD-PEG ont été préparés à différentes concentrations puis l'or a été dosé par ICP-MS. Les différentes formulations ont ensuite été analysées par spectroscopie UV-visible suite à une dilution par 100 dans l'eau. La mesure de l'absorbance à 513 nm a permis d'établir une droite d'étalonnage qui servira de référence pour la suite des mesures réalisées en routine au laboratoire (Figure 92).

¹⁴⁹ Amendola, V.; Meneghetti, M. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 4277-4285.

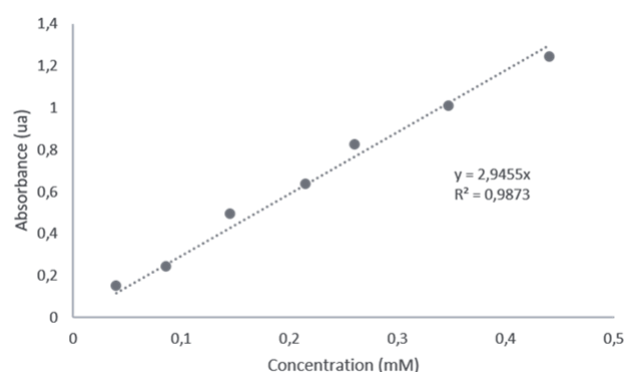


Figure 92 : droite d'étalonnage obtenue par spectroscopie UV-visible d'Au@PFTD-PEG après dilution par 100 dans l'eau des échantillons. Les concentrations en or ont préalablement été obtenue par ICP-MS

Une concentration en or de 8,64 mM (soit 8,64 μmol dans 1 mL) a été ainsi mesurée pour la formulation Au@PFTD-PEG, soit un taux de chargement massique de 14 % et une efficacité d'encapsulation de 90 % (calculée à partir de la quantité d'or initialement introduite de 9,6 μmol). Ces premières données nous confortent donc sur le potentiel des micelles PFTD-PEG à prendre en charge une quantité relativement importante de nanoparticules d'or et sur la possibilité de les utiliser pour des applications biomédicales.

En revanche, comme le montre le Tableau 6, cette concentration en or de 8,64 mM (soit 1,7 mg mL^{-1}) n'est pas suffisante pour des applications d'imagerie *in vivo*. En effet, un survol de la littérature indique que des quantités d'or injectées d'environ 2-3 mg (souris) sont nécessaires pour obtenir un contraste satisfaisant aux rayons X. Si nous souhaitons pouvoir injecter 2 mg à partir de notre solution stock, cela représente un volume > 1 mL qui est incompatible avec la taille des souris. Il est donc nécessaire de concentrer notre formulation.

Tableau 6 : comparaison des quantités administrées *in vivo* pour de l'imagerie par tomодensitométrie.

	Nanoparticules	Taille (nm)	[Au]
1	Au@PFTD-PEG	5	1,7 mg mL^{-1}
2	Au@DTDTPA ¹⁵⁰	2,4	10 mg mL^{-1} (300 μL , i.v.)
3	AuGSH ¹⁵¹	2,8	12 mg mL^{-1} (200 μL , i.p.)

Cinq millilitres de notre formulation Au@PFTD-PEG contenant 8,64 mM d'or ont donc été lyophilisés puis repris dans 1,4 mL d'une solution tampon (type NaCl 0,9 % ou PBS) pour aboutir

¹⁵⁰ Alric, C.; Taleb, J.; Le Duc, G. r.; Mandon, C. l.; Billotey, C.; Le Meur-Herland, A.; Brochard, T.; Vocanson, F.; Janier, M.; Perriat, P.; Roux, S. p.; Tillement, O. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5908-5915.

¹⁵¹ Zhang, X.-D.; Luo, Z.; Chen, J.; Song, S.; Yuan, X.; Shen, X.; Wang, H.; Sun, Y.; Gao, K.; Zhang, L.; Fan, S.; Leong, D. T.; Guo, M.; Xie, J. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 8669.

à une concentration en or colloïdal théorique de 30,8 mM. Une étape de filtration sur membrane 0,45 μm permet d'obtenir une suspension limpide de concentration en or mesurée de 28 mM (6 mg mL^{-1}), ce qui nous semble satisfaisant compte tenu des données de la littérature pour une utilisation *in vivo*.

4- Caractérisations

4.2- Analyses de SAXS

Des analyses par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS – *Small angle X-rays scattering*) ont été réalisées dans le but d'obtenir des informations sur la structure des particules en suspension. Réalisées en collaboration avec le Dr. Fabienne Testard (CEA/NIMBE), ces expériences sont basées sur l'interaction des rayons X avec les électrons de la matière. Toute modification de la taille ou des distances inter-nanoparticules aura une influence sur le profil du signal recueilli.

Différents échantillons ont été analysés, à savoir : i) la formulation aqueuse de Au@PFTD-PEG contenant des nanoparticules d'or (AuNP) et du PFTD-PEG (à 10 mg mL^{-1}) auto-assemblés en micelles (Au@PFTD-PEG, [Au] = 8,64 mM), ii) Au@TOAB dans du toluène contenant des AuNP stabilisés par du TOAB, et iii) une solution de micelles de PFTD-PEG vides à 10 mg mL^{-1} dans l'eau (Figure 93).

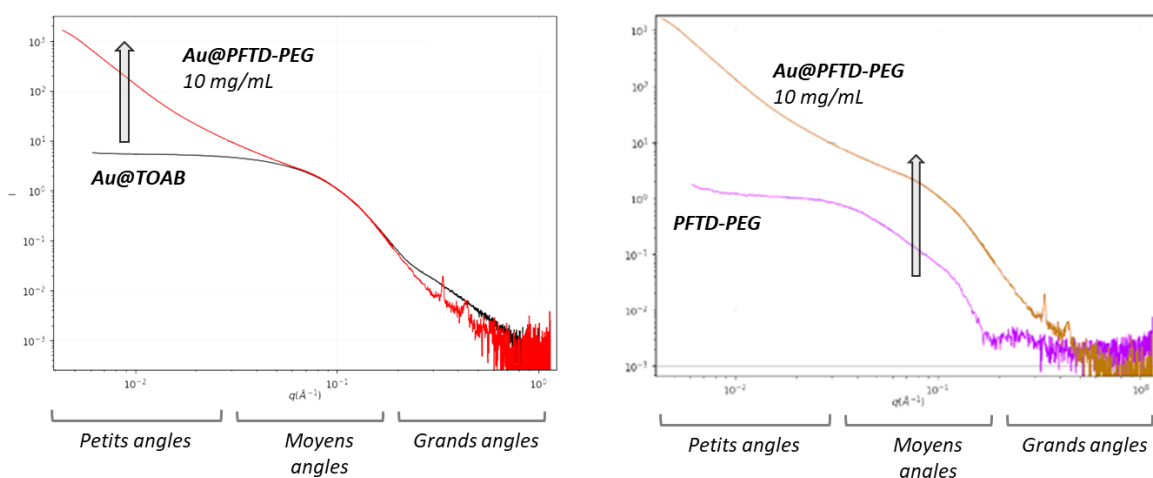


Figure 93 : Diagrammes de diffusion obtenus pour les Au@TOAB dans du toluène, les micelles PFTD-PEG dans l'eau (10 mg mL^{-1}), comparés à la formulation Au@PFTD-PEG (10 mg mL^{-1}).

Le diagramme de diffusion des Au@TOAB est caractéristique d'une suspension de nanoparticules. L'intensité diffusée dépend du nombre de particules, de leur taille et du contraste électronique entre les particules et le solvant. Dans le cas de nos suspensions de nanoparticules d'or, l'intensité diffusée peut être modélisée par une équation mathématique.¹⁵² L'application de cette dernière permet d'identifier une double population centrée sur les tailles de 4 nm et 1 nm,

¹⁵² P. Lindner et T. Zemb, *Neutrons, X-rays and Light: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Elsevier, 2002.

avec une population majoritaire pour les nanoparticules de 4 nm. Des micelles seules ont ensuite été analysées (PFTD-PEG, 10 mg mL⁻¹) et une valeur de diamètre moyen de 12 nm a été obtenue. Ces données corrélerent assez bien les caractérisations faites en amont sur les nanoparticules d'or (ex. MET) et les micelles (ex. DLS).

Dans un deuxième temps, les diagrammes SAXS des mélanges ont été analysées. Sur le diagramme de la suspension Au@PFTD-PEG, on retrouve aux moyens angles le signal des nanoparticules d'or (qui correspond à une fraction du signal de Au@TOAB). Des nanoparticules d'or sont donc bien présentes dans cette suspension.

On constate également une augmentation du signal aux petits angles. Cette augmentation peut résulter d'une interaction attractive entre les nanoparticules d'or ou de la formation d'agrégats entre ces particules qui indiquerait l'encapsulation de plusieurs nanoparticules d'or par micelle. Cette augmentation peut aussi résulter d'une modification de la forme des micelles.

Nous avons donc comparé le diagramme de la solution micellaire avant et après encapsulation des nanoparticules d'or. Nous observons une forte augmentation du signal de diffusion entre la suspension de micelles de PFTD-PEG et la formulation Au@PFTD-PEG suggérant une modification structurale de l'auto-assemblage lors de l'encapsulation des nanoparticules d'or. A ce stade plusieurs hypothèses peuvent être formulées, à savoir que i) les micelles gonflent du fait de la présence de plusieurs nanoparticules d'or dans leur cœur de la micelle ou ii) de la présence de solvant fluoré résiduel (PFMC). D'autre part, l'augmentation du signal aux petits angles pourrait provenir d'un mélange hétérogène de nanoparticules d'or agrégées dans des micelles et de micelles vides.

A ce stade, il n'est pas possible de conclure sur la nature fine de l'auto-assemblage et des analyses complémentaires doivent être effectuées comme par exemple des analyses de cryo-TEM qui permettraient de visualiser l'état d'agrégation des nanoparticules d'or ou de la diffusion de neutrons aux petits angles qui permettrait de séparer les contributions des micelles et des AuNPs.

4.3- Études de stabilité

Les nanoparticules doivent souvent faire face à des problèmes d'agrégation et de précipitation lorsqu'elles sont dans des environnements contenant de fortes concentrations en sels. Cette agrégation peut survenir au moment de la préparation des nanoparticules ou au moment des études *in vitro/in vivo*. *In vivo*, elle peut avoir un impact sur la biodistribution des nanoparticules et sur leur toxicité. C'est pourquoi il est important d'évaluer en amont cette stabilité.

Des analyses par spectroscopie UV-visible des différents échantillons testés permettra d'accéder à la bande SPR qui, pour rappel, est dépendante de la taille des nanoparticules et de leur état d'agrégation. Par conséquent un déplacement et/ou élargissement de cette dernière sera observé dans le cas d'une agrégation. Les phénomènes d'agrégation sont visualisables à partir du moment où la distance entre particules est inférieure à 5 fois le rayon des particules.¹⁵³

¹⁵³ Ghosh, S. K.; Pal, T. *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 4797-4862.

Cette étude de stabilité a été réalisée dans 3 milieux différents, sur 7 jours à 25 °C. Les nanoparticules ont été mises en présence d'une solution de NaCl à 0,9 %, de PBS ou testées dans de l'eau et les concentrations en or sont identiques pour chaque échantillon de manière à pouvoir comparer la bande de SPR ([Au] = 0,2 mM). Nous constatons que les spectres d'absorbance obtenus sont très proches les uns des autres, quel que soit le milieu testé. L'addition de sels n'induit donc aucun effet d'agrégation sur nos formulations Au@PFTD-PEG et les micelles sont stables pendant plusieurs jours à 25 °C (Figure 94).

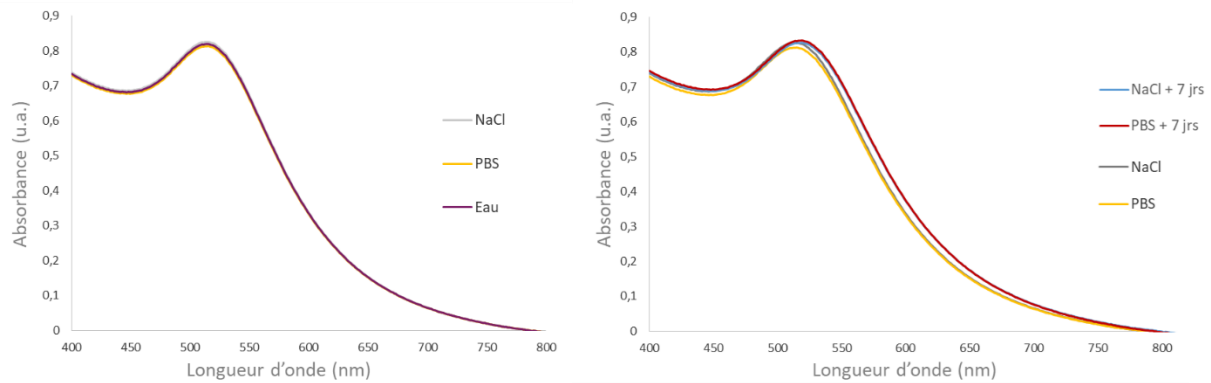


Figure 94 : Évolution des spectres d'absorbance des formulations Au@PFTD-PEG dans de l'eau, du NaCl et du PBS sur 7 jours.

Des études de stabilité sur la formulation concentrée en or (Au@PFTD-PEG conc, [Au] = 28 mM) ont également été effectuées. L'étape de lyophilisation puis de redispersion de la suspension de nanoparticules ne permet pas d'obtenir ici des formulations stables sur le long terme. En effet, après 5 jours de stockage à 25 °C, des agrégats se forment.

Nous souhaitons pouvoir valoriser les nanoparticules d'or encapsulées dans les micelles à des fins diagnostiques (imagerie par tomodynamométrie) et thérapeutiques (radio-sensibilisation). Nous allons maintenant décrire les premiers essais réalisés pour de l'imagerie *in vivo* par tomodynamométrie.

III – Imagerie par tomodynamométrie

Avant de passer à des études *in vivo*, il est important d'effectuer des études préliminaires, notamment de propriétés de contraste. Elles devraient nous permettre de déterminer la concentration minimale en nanoparticules d'or (encapsulées dans les micelles), visualisable par tomodynamométrie. Les expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr Charles Truillet (CEA/SHFJ) sur un scanner préclinique multimodal TEP/CT de chez Siemens Healthcare.

1- Mise au point par tomodynamométrie

Afin de déterminer le seuil de détection, 2 échantillons de Au@PFTD-PEG incorporant des concentrations croissantes (déterminées par ICP-MS) en nanoparticules d'or ont été préparées. La capacité de nos formulations de nanoparticules d'or à absorber les rayons X a été comparée à

celle d'un composé iodé utilisé en clinique, le iopamidol, disponible commercialement sous le nom de Iopamiron 370. Des dilutions d'une solution de iopamidol ($[I] = 370 \text{ mg mL}^{-1}$) dans de l'eau ont été effectuées et la concentration en iode pour chaque dilution a été calculée. En effet, afin de comparer le potentiel absorbant de l'iode et de l'or, la concentration en iode des différentes dilutions préparées doit être identique à la concentration en or de nos formulations. Les différentes solutions préparées ont été introduites, en triplicat, dans une plaque 96 puits. La plaque a ensuite été positionnée dans l'imageur et visualisée avec des protocoles d'imagerie développés pour des études *in vivo* (Figure 95).

Afin de faciliter l'interprétation des résultats, l'évolution du contraste exprimé en unité Hounsfield (UH) a été représentée en fonction de la concentration en or ou iode. L'échelle Hounsfield est une échelle quantitative qui permet de décrire la capacité d'un rayonnement (ici les rayons X) à traverser les matériaux. Généralement l'unité Hounsfield d'un os dense est autour de 2000 alors que celle d'un muscle est autour de 30. Cette valeur est obtenue après traitements d'images : des zones d'intérêts sont isolées puis les valeurs de UH pour chaque pixel présent dans la zone d'intérêt sont moyennées, nous permettant d'obtenir les valeurs représentées sur le graphique.

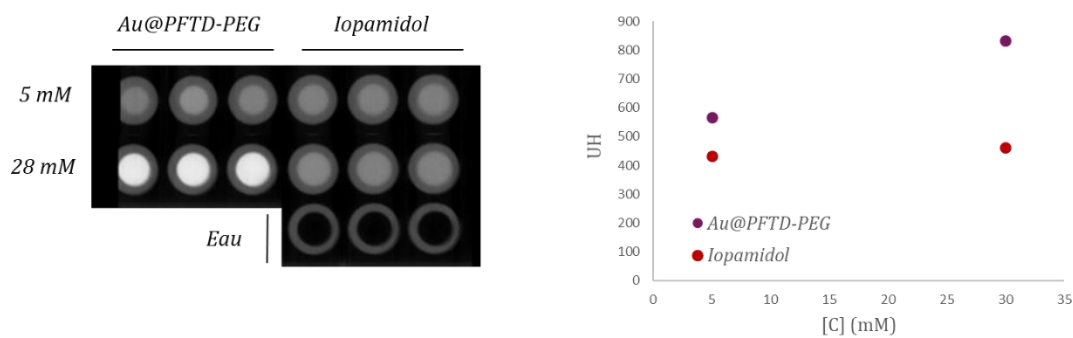


Figure 95 : Image CT-scan de la plaque 96 puits contenant notre formulation d'Au@PFTD-PEG et de l'iopamidol à 5 et 28 mM (80 kVp). Représentation de l'évolution du contraste (Unité Hounsfield, UH) en fonction de la concentration en or et iode.

Dans un premier temps, nous pouvons constater que l'UH de l'or est supérieur à l'UH de l'iode pour les 2 concentrations testées (5 mM et 28 mM). Ce résultat nous conforte dans l'idée de pouvoir utiliser les nanoparticules d'or dans les micelles comme agent de contraste. Une augmentation nette de l'UH à 28 mM est observée avec un contraste important visible au niveau de l'image CT-scan (UH > 800).

Les résultats obtenus mettent en avant le potentiel contrastant de la formulation Au@PFTD-PEG. Les seuils de concentration détectables sont compatibles avec une exploitation *in vivo*, c'est ce que nous avons tenté de faire dans une étude préliminaire.

2- Expériences de tomодensitométrie *in vivo*

Compte tenu des résultats encourageants obtenus en plaque 96 puits, nous avons souhaité pouvoir injecter nos micelles chargées en nanoparticules d'or à un modèle de souris et visualiser

la biodistribution par tomographie par ordinateur. La formulation Au@PFTD-PEG la plus concentrée en or (28 mM) a donc été utilisée pour cette étude et administrée à deux souris C57BL/6. La voie d'administration intrapéritonéale a été retenue. Les quantités de micelles injectées ont été fixées à 150 μL de micelles ($[\text{micelles}] = 35 \text{ mg mL}^{-1}$) contenant 28 mM d'or. La dose injectée correspond donc à 0,82 mg d'or + 5 mg de micelles.

Des images par tomographie par ordinateur ont été enregistrées avant administration des micelles encapsulant les nanoparticules d'or, 1 h puis 4 h post-injection (Figure 96). Plusieurs régions ont été observées : le cœur, le foie, les reins, le muscle et le péritoine.

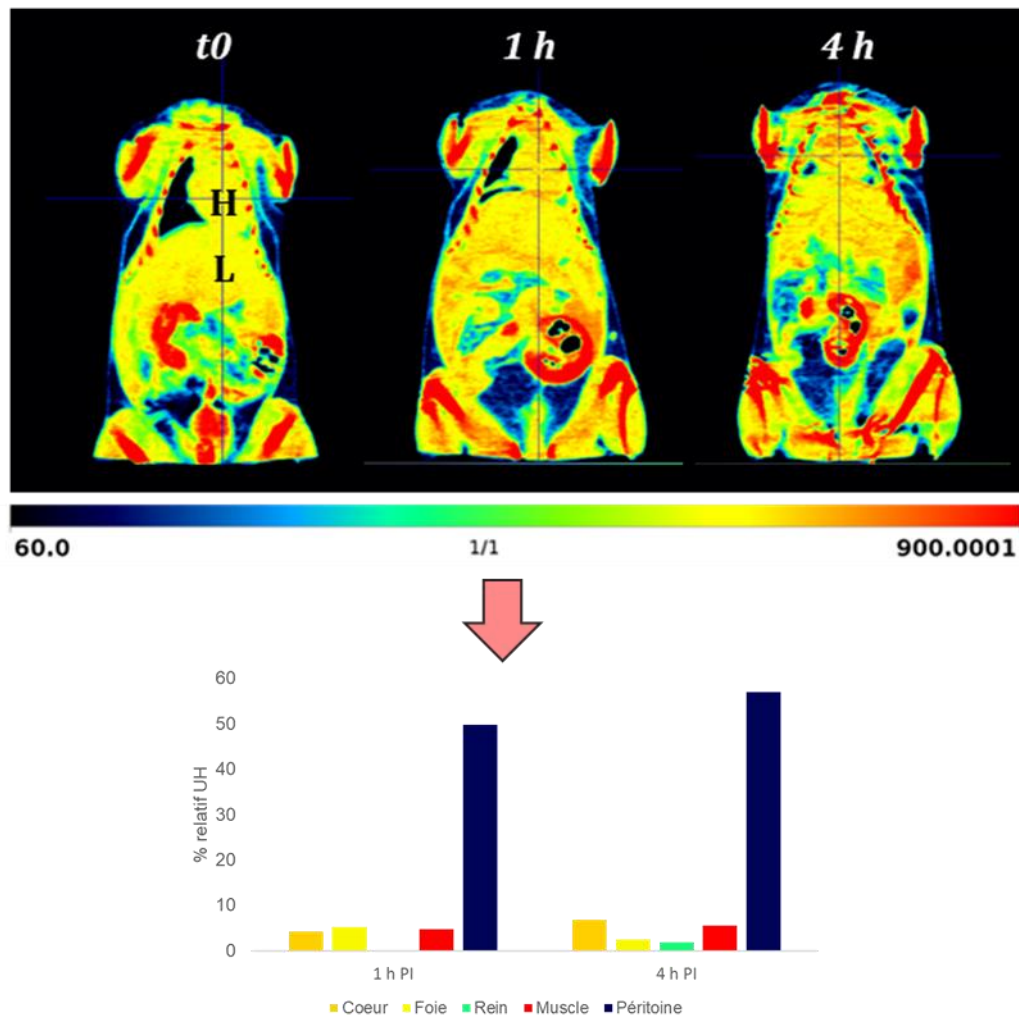


Figure 96 : Image obtenue par tomographie par ordinateur après administration des micelles Au@PFTD-PEG et évolution des UH en fonction du temps.

Différentes zones colorées apparaissent sur les images correspondant aux valeurs UH (bleu : 60 UH → rouge : 900 UH). Afin de faciliter l'interprétation des résultats, le pourcentage d'augmentation du signal (par rapport au signal à t_0) pour chacune des régions d'intérêt a été reporté en fonction du temps (Figure 96). La première observation est une forte augmentation du contraste au niveau du péritoine avec près de 50% d'augmentation du signal à 1 h. Ce résultat, n'est pas surprenant dans la mesure où le péritoine correspond à la zone d'injection des micelles,

il nous conforte également dans notre capacité à visualiser le contraste induit par Au@PFTD-PEG *in vivo*. Un signal plus faible est détecté au niveau du cœur (H), du foie (L) et des muscles 1 h post injection. Le signal se maintient dans les différents organes au cours du temps et nous observons à 4 h l'apparition d'un contraste au niveau des reins. Les contrastes observés pourraient laisser entrevoir des perspectives intéressantes, cependant les deux animaux sur lesquels ont été réalisées les expériences n'ont pas survécu au-delà de 4 h. Notre formulation induit donc un choc toxique qui nous a conduit à reconsidérer l'utilisation des micelles comme agent de contraste. En effet, les concentrations en or requises pour obtenir une image X se concrétisent par des colloïdes micellaires très concentrés et visqueux. Cette viscosité est probablement à l'origine de l'effet délétère observé.

Suite à ce constat, nous avons décidé d'abandonner l'utilisation des particules d'or comme agent de contraste X et de nous concentrer sur leur potentiel radio-sensibilisant. En effet, la radio-sensibilisation par des AuNP est classiquement observée à des concentrations en or bien inférieures à celles requises pour du contraste. Nous avons également dans l'idée de pouvoir potentialiser cet effet en utilisant la phase fluorée du cœur des micelles comme un réservoir à oxygène capable d'alimenter l'environnement hypoxique des tumeurs. La présence d'oxygène permettra de générer des quantités plus importantes d'espèces réactives de l'oxygène et de potentialiser l'effet de la radiothérapie.

La modalité d'imagerie par tomодensitométrie n'étant plus d'actualité, nous avons envisagé de modifier la structure des micelles pour y incorporer un élément rapporteur (zirconium 89) pour pouvoir imager le vecteur nanoparticulaire par tomographie par émission de positons (TEP-scan). Cette méthode très sensible permet d'obtenir des informations quantitatives.

La section suivante sera donc dédiée i) à la conception d'un nouvel amphiphile fluoré incorporant dans sa structure un motif complexant du zirconium 89, ii) à l'assemblage des micelles et à l'encapsulation des nanoparticules d'or, iii) à l'évaluation du pouvoir solubilisant de l'oxygène des micelles fluorées pour de futures applications en radiothérapie.

IV – Conception de micelles pour la radiothérapie

Afin d'adapter les micelles PFTD-PEG à une nouvelle modalité d'imagerie (TEP), nous avons envisagé de modifier la structure des amphiphiles qui entrent dans leur composition.

1- Imagerie TEP-scan et choix du radionucléide

L'imagerie TEP-scan est une technique d'imagerie nucléaire non-invasive très largement utilisée en oncologie. Elle permet notamment d'obtenir des informations quantitatives *in vivo* et nécessite obligatoirement l'administration d'un agent de contraste marqué par des radionucléides (carbone-11, azote-13, fluor-18...). Tous les isotopes utilisés sont radioactifs avec un temps de décroissance rapide. La plupart des examens cliniques des cancers se font aujourd'hui à l'aide de ¹⁸F-FDG (fluorodésoxyglucose) qui possède un temps de demi-vie de 110 minutes.¹⁵⁴

¹⁵⁴ Miele, E.; Spinelli, G. P.; Tomao, F.; Zullo, A.; De Marinis, F.; Pasciuti, G.; Rossi, L.; Zoratto, F.; Tomao, S. *Journal of experimental & clinical cancer research* **2008**, *27*, 52.

Pour le marquage de nos micelles, nous avons retenu le zirconium-89 ($t_{1/2} = 78,2$ h) qui est couramment utilisé pour le radio-marquage d'anticorps monoclonaux. Il présente l'avantage de posséder un temps de demi-vie assez long permettant de suivre *in vivo* la pharmacocinétique des molécules radiomarquées.¹⁵⁵ Pour être utilisé efficacement, le zirconium-89 (^{89}Zr) doit être complexé car sous sa forme libre, il s'accumule dans les os.

Parmi les agents chélatants, on trouve la deferoxamine (DFO) qui se lie de manière très efficace avec le ^{89}Zr . Néanmoins, plusieurs études ont montré que le complexe ^{89}Zr -DFO n'était pas stable *in vivo*.¹⁵⁶ Dans la famille des tetraazamacrocycles, on trouve le DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tetraacétique) qui permet de former un complexe stable *in vivo*.¹⁵⁷ En nous appuyant sur ce constat, nous avons envisagé de modifier la structure des amphiphiles fluorés afin d'y introduire un agent chélatant du ^{89}Zr . L'amphiphile « Zr » pourra être incorporé à la structure de la micelle et offrir la possibilité de suivre les nanoparticules d'or encapsulées par TEP-scan.

Dans ce contexte, nous allons nous intéresser i) à la synthèse de nouveaux amphiphiles fluorés comportant un motif DOTA, chélatant du zirconium 89, ii) à l'assemblage de ces amphiphiles en micelles qui seront constituées d'un mélange d'amphiphiles « simples » PFTD-PEG et d'amphiphiles PFTD-DOTA, iii) à la chélation de zirconium modèle, non radioactif, et iv) à des essais d'encapsulation de nanoparticules d'or dans les micelles mixtes.

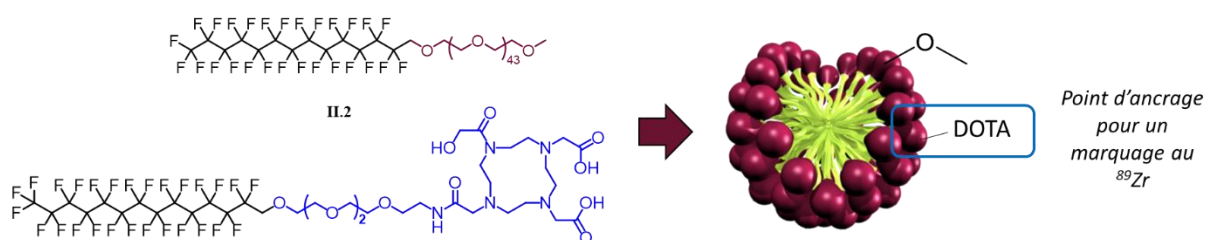


Figure 97 : Structure des amphiphiles et assemblage des micelles PFTD-PEG/DOTA.

2- Synthèse des amphiphiles

La voie de synthèse retenue pour les amphiphiles incorporant le DOTA fait intervenir comme étape clé un couplage peptidique entre la molécule PFTD-PEG-NH₂ **III.4** et un dérivé du DOTA commercialement disponible sous forme d'ester triple *tert*-butylique (Figure 98).

¹⁵⁵ Abou, D. S.; Ku, T.; Smith-Jones, P. M. *Nuclear Medicine and Biology* **2011**, *38*, 675-681.

¹⁵⁶ Raavé, R.; Sandker, G.; Adumeau, P.; Jacobsen, C. B.; Mangin, F.; Meyer, M.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L. n.; Dubois, A.; Goncalves, V.; Gustafsson, M.; Rijpkema, M.; Boerman, O.; Chambron, J.-C.; Heskamp, S.; Denat, F. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2019**, *46*, 1966-1977.

¹⁵⁷ Pandya, D. N.; Bhatt, N.; Yuan, H.; Day, C. S.; Ehrmann, B. M.; Wright, M.; Bierbach, U.; Wadas, T. J. *Chemical Science* **2017**, *8*, 2309-2314.

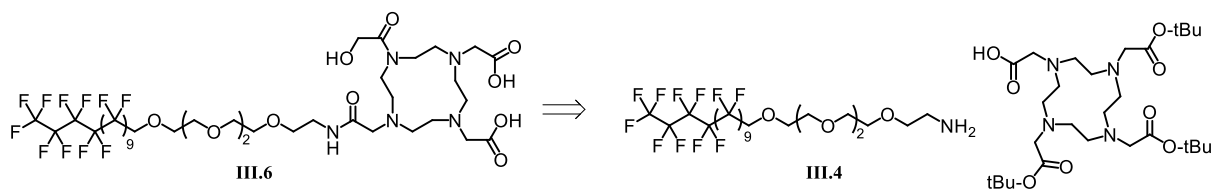
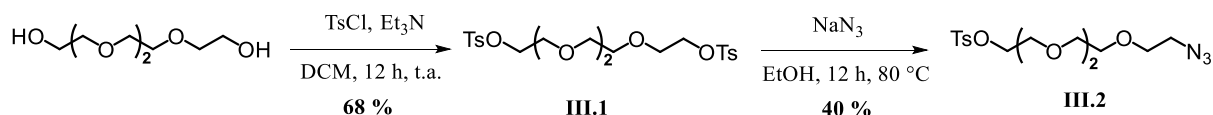


Figure 98 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention des amphiphiles PFTD-DOTA.

La synthèse de l'amine perfluoré-PEG-NH₂ **III.4** se fait en plusieurs étapes linéaires. La première étape consiste à activer, sous forme de tosylate, les deux fonctions alcool du tétraéthylène glycol (Schéma 20). La réaction s'opère dans du dichlorométhane en présence de chlorure de tosyloxy et de triéthylamine, à température ambiante pendant 12 h. Le composé di-tosylé **III.1** issu de cette réaction est engagé dans une réaction de mono-substitution par de l'azoture de sodium (0,8 équiv.) dans de l'EtOH à 80 °C pendant 12 h. Cette étape conduit au dérivé mono-azido mono-tosyl **III.2** avec un rendement de 40 %.


 Schéma 20 : Voie d'obtention du dérivé tétraéthylène glycol **III.2**

Une substitution nucléophile de **III.2** par l'alcoolate du perfluorotetradecanol (obtenu par déprotonation de l'alcool correspondant par NaH) conduit au composé **III.3** après 48 h au reflux du THF (Schéma 21). Finalement le groupement azido est réduit à l'aide de Pd sur charbon sous atmosphère de dihydrogène dans du THF pendant 12 h. Cette réduction conduit à l'amine perfluoré-PEG-NH₂ attendue **III.4** avec un rendement de 80 %.

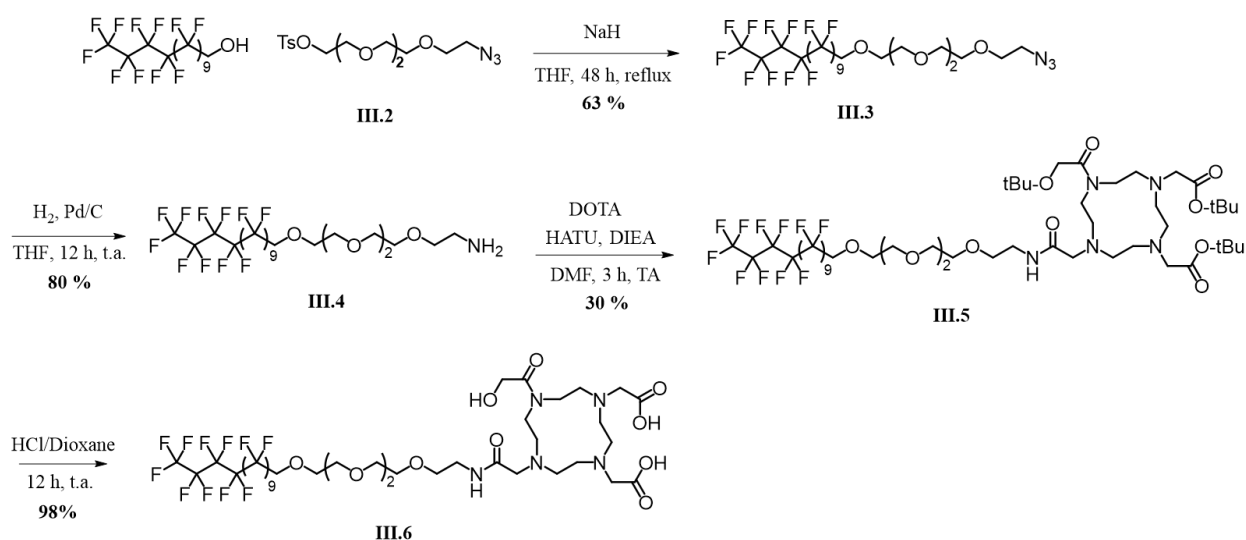


Schéma 21 : Synthèse de l'amphiphile PFTD-DOTA.

Il nous reste alors à coupler l'amine perfluorée **III.4** avec le DOTA. L'acide carboxylique libre du DOTA ($3 \times$ *tert*-butyl ester) est activé en présence de HATU et DIEA dans du DMF puis mis au contact de **III.4** pendant 3 h à température ambiante. La réaction de couplage conduit au composé **III.5** qui est finalement déprotégé au niveau des acides carboxyliques par du HCl (4 N) dans du dioxane pendant 12 h à température ambiante. L'amphiphile complexant du zirconium **III.6** est finalement obtenu avec 98 % de rendement pour cette dernière étape.

3- Essais de chélation du zirconium

La chélation du zirconium non radioactif a ensuite été mise en œuvre. Cette étape permet de mettre au point des conditions réactionnelles qui devront être transposables au réactif radioactif mais également de confirmer la formation du complexe. La complexation du Zr a été réalisée dans une solution contenant un mélange de l'amphiphile-DOTA **III.6** et du $(Zr(AcAc)_4)$ dans du MeOH au reflux pendant 3 h.¹⁵⁷ Au bout de trois heures de réaction, les amphiphiles PFTD-Zr-DOTA sont purifiés sur colonne d'exclusion stérique afin d'éliminer la fraction de zirconium non complexé. Une caractérisation du complexe-Zr a été réalisée par spectrométrie de masse qui montre sans ambiguïté la formation d'un produit de poids moléculaire 1348 Da, ce qui correspond au complexe attendu (Figure 99).

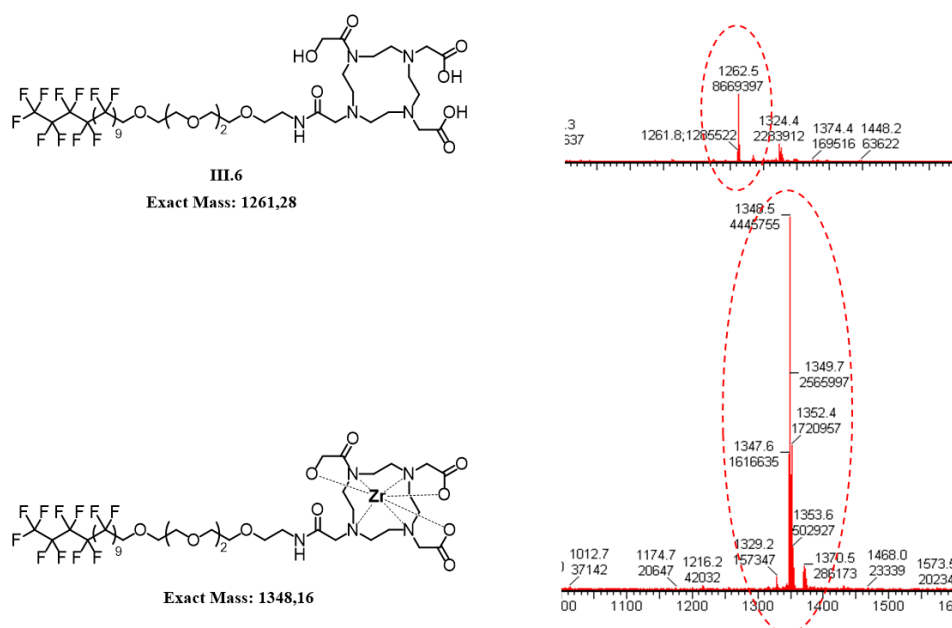


Figure 99 : Spectres de masse (ES+) des amphiphiles DOTA avant et après complexation du zirconium.

Après avoir complexé le zirconium non radioactif dans les amphiphiles DOTA, des micelles ont été formées selon le protocole préalablement établi, en mélangeant dans un rapport 9:1 les amphiphiles PFTD-PEG et les amphiphiles PFTD-Zr-DOTA. Des micelles de 10 nm de diamètre en moyenne ont été obtenues après 10 minutes de sonication puis filtration sur membrane 0,2 μ m.

4- Assemblage des micelles et caractérisations

Pour former les micelles de seconde génération, les molécules PFTD-PEG (II.2) et PFTD-DOTA (III.6, sans zirconium)) sont dispersées en phase aqueuse dans une proportion massique 9:1 à une concentration totale en amphiphiles de 10 mg mL⁻¹. Ainsi, une solution de micelles à 10 mg mL⁻¹ préparée dans de l'eau milliQ ou dans NaCl (0,9 %) a été obtenue après traitement aux ultrasons. Des analyses de DLS ont permis de confirmer la présence de micelles de 13 nm de diamètre.

5- Encapsulation des nanoparticules d'or

En parallèle, des essais d'encapsulation de nanoparticules d'or ont été réalisés sur des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DOTA complexées ou non avec du zirconium. Le protocole d'encapsulation des nanoparticules d'or décrit dans le paragraphe II.3 a été suivi dans ce cas pour les deux formulations. Les nanoparticules Au@PFDT en phase solvant fluoré (PFMC) sont additionnées à des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DOTA (9:1, avec ou sans zirconium, 10 mg mL⁻¹/H₂O). Le système biphasique est soumis à un traitement aux ultrasons ce qui active le transfert de l'or dans le cœur de la micelle. Les échantillons de nanoparticules d'or encapsulées sont finalement obtenus après filtration sur membrane 0,2 µm. Les deux formulations (avec et sans zirconium) ont été caractérisées par MET et par mesure de la bande SPR (Figure 100). Aucune différence n'est à observer entre les deux formulations au niveau de la bande de SPR. La présence du zirconium ou de la tête polaire DOTA ne semble pas déstabiliser le processus d'encapsulation des nanoparticules d'or dans le cœur de la micelle.

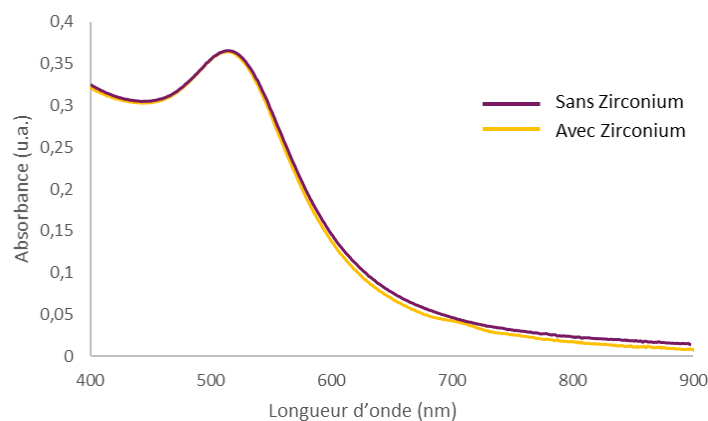


Figure 100 : Détermination de la bande SPR de nanoparticules d'or encapsulées dans des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DOTA en présence ou en absence de Zirconium.

6- Solubilisation du dioxygène

La capacité des micelles à solubiliser du dioxygène a ensuite été évaluée par mesure directe à l'aide d'une sonde à oxygène. Cette sonde est constituée d'une cathode et d'une anode en contact avec un électrolyte et séparés du milieu par une membrane perméable au dioxygène. Le dioxygène présent en solution traverse la membrane et est réduit à la cathode. Ces réactions

d'oxydoréduction vont créer une tension entre la cathode et l'anode et le courant produit est proportionnel à la quantité de dioxygène dans le milieu. L'appareil de mesure nous donne directement accès à la quantité de dioxygène en solution, en ppm ou en % O₂ calibrée par rapport à la quantité de dioxygène présent dans l'air (100 %).

Pour cette étude, nous nous sommes basé sur un protocole décrit dans la littérature qui permet de quantifier la quantité d'oxygène transportée dans des compartiments nanométriques.¹⁵⁸ Des micelles PFTD-PEG à 1 mg mL⁻¹ dans de l'eau ont été préparées et soumises à trois traitements différents : i) un bullage à l'azote pour dégazer la solution, ii) un bullage avec de l'oxygène pendant 25 min pour charger les micelles, iii) un témoin laissé sous pression atmosphérique d'air. 1 mL de chacune des différentes suspensions micellaires est ensuite transféré dans 25 mL d'eau dégazée. Cette dilution des micelles fait passer leur concentration en dessous de la valeur de la CMC (0,051 mg mL⁻¹), induit une dissociation des micelles et une libération de l'oxygène dans le milieu. Le taux d'oxygène de chaque solution est mesuré une minute après le mélange des micelles à l'eau dégazée (Tableau 7).

Tableau 7 : Quantité de dioxygène mesurée dans des solutions de micelles ([micelles] = 0,04 mg mL⁻¹) sous pression atmosphérique, sous N₂ et sous O₂.

	Atm	N ₂	O ₂
Quantité d'O ₂ (mg L ⁻¹)	5,4	0	6

La comparaison des différents taux de chargement nous permettra de valider la capacité des micelles à prendre en charge du dioxygène. Cette étude très préliminaire montre que les micelles ayant été mis au contact de l'oxygène gaz possèdent un taux de chargement supérieur aux micelles « témoins », respectivement de 6 mg L⁻¹ et 5,4 mg L⁻¹, juste après dissociation des micelles dans de l'eau dégazée. Cependant, ces données ne prennent pas en compte la capacité de l'eau elle-même à solubiliser l'oxygène. Il est donc difficile de confirmer que l'effet observé est effectivement dû à la présence de nos micelles. Ces essais nécessitent d'être poursuivis pour être comparées à des échantillons contenant seulement de l'eau et où la quantité de dioxygène aura été déterminée. Par ailleurs, il serait également intéressant de comparer ces mesures à des surfactants non fluorés afin de confirmer le potentiel des phases fluorées des micelles à encapsuler de l'oxygène.

V – Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons souhaité développer un outil théranostique qui soit capable d'imager les tissus cancéreux par contraste aux rayons X et de potentialiser la radiothérapie en apportant localement de l'oxygène au tissu hypoxique. Pour cela, des nanoparticules d'or incorporant des ligands de surface fluorés ont été développés. Ces nanoparticules ont ensuite été encapsulées dans des micelles possédant un cœur fluoré et une surface PEGylée, ce qui a permis d'accéder à une formulation colloïdale stable.

De premiers essais d'imagerie aux rayons X ont mis en avant le potentiel contrastant des micelles Au@PFTD-PEG, supérieur à celui d'une molécule iodée de référence, le iopamidol.

¹⁵⁸ An, Y.-J.; Carraway, E. R.; Schlautman, M. A. *Water Research* **2002**, *36*, 300-308.

Cependant, des expériences *in vivo* sur un modèle de souris ont entraîné la mort des animaux quelques heures après administration des micelles. La concentration élevée en or et en vecteur, nécessaire à l'imagerie, est probablement en cause ici. Sur ce constat, il a donc été envisagé d'utiliser les nanoparticules d'or seulement pour de la radio-sensibilisation, qui nécessite des concentrations en or inférieures à celles requises pour du contraste aux rayons X.

Afin d'apporter une nouvelle modalité d'imagerie, les unités constitutives de la micelle ont été modifiées de telle sorte à pouvoir y incorporer un élément rapporteur (zirconium-89) pour le suivi *in vivo* par tomographie par émission de positons. La synthèse de ce nouvel amphiphile, sa complexation au ^{89}Zr « froid », son assemblage en micelles et l'encapsulation de nanoparticules d'or ont été validées dans ce chapitre.

En parallèle, la capacité des micelles fluorées à transporter de l'oxygène a été évaluée dans une expérience préliminaire qui montre un effet solubilisant des micelles vis-à-vis du gaz considéré. Cet effet reste cependant à confirmer.

Nous avons aujourd'hui en main différents éléments qui nécessitent d'être assemblés puis complétés afin de valider le potentiel de ces nouvelles formulations, aussi bien dans le ciblage des tissus tumoraux, que dans l'effet thérapeutique observé (radio-sensibilisant). En particulier, une étude devra être conduite pour évaluer l'apport de la micelle « oxygénée » dans la potentialisation de l'effet radiothérapeutique.

Conclusion Générale

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux familles de micelles et à leurs applications dans les domaines thérapeutiques (ciblage de la plaque d'athérome et effet radiosensibilisant) et diagnostiques (IRM et contraste X).

Dans une première partie, des micelles polydiacétyléniques ont été chargées avec un principe actif anti-inflammatoire et étudiées vis-à-vis de leur capacité à induire un effet thérapeutique *in vitro* et *in vivo*. Ces micelles ont été conçues afin de transporter le GW3965 au niveau de la plaque d'athérome par ciblage non seulement passif mais également actif, par l'intermédiaire du ligand RXP470.1. Une première formulation du GW3965 en micelles a été testée, mais cette dernière a démontré une forte instabilité en milieu physiologique avec la libération rapide de la cargaison médicamenteuse. Ce constat nous a conduit à réaliser une optimisation structurale de la molécule GW3965 en la rendant plus lipophile par adjonction d'une chaîne grasse. Les analogues structuraux du GW3965 possèdent de bonnes propriétés d'encapsulation dans les micelles et ont permis d'activer de manière satisfaisante l'expression des gènes cibles du LXR *in vitro* et de façon plus modérée *in vivo*. Nous avons également souhaité améliorer la capacité de ciblage de nos micelles en y adjoignant le ligand RXP470.1 qui est dirigé contre les populations de macrophages présents au niveau de la plaque. Ce ligand est également un inhibiteur de la MMP-12 qui intervient dans le processus athérosclérotique. Cette nouvelle formulation a été évaluée sur des modèles murins d'athérosclérose et a permis d'obtenir une accumulation sélective des micelles fonctionnalisées au niveau de zones riches en macrophages par rapport à des micelles « nues ». L'effet synergique du RXP470.1 et du dérivé GW3965 sur la progression de la plaque reste cependant à être validé sur un modèle murin d'athérosclérose.

Dans une deuxième partie, des micelles fluorées ont été assemblées à partir d'unités amphiphiles constituées d'une chaîne hydrophobe perfluorée, constituant le cœur de la micelle, et d'une tête polaire polyéthylène glycol, faisant l'interface avec le milieu. Ces micelles ont été conçues pour la prise en charge d'une sonde IRM-¹⁹F, le PERFECTA qui présente la particularité d'incorporer 36 atomes de fluor chimiquement et magnétiquement équivalents. Les micelles ont été chargées en PERFECTA et évaluées *in vivo* pour le ciblage de tissus cancéreux (par effet EPR) et leur visualisation par IRM du fluor. Le protocole établi permet de suivre la biodistribution des micelles chez la souris et leur accumulation dans la zone d'intérêt avec environ 3,6 % de la dose cumulée injectée qui a pu être localisé dans la tumeur à 72 h. Il est à noter que la sensibilité et la résolution spatiale des séquences développées sont supérieures à celles décrites dans la littérature, ce qui permet une visualisation fine des zones d'intérêt.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié des systèmes de nanoparticules d'or associées à des micelles fluorées. Cette approche a nécessité la synthèse de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des ligands de surface fluorés pour permettre l'encapsulation dans les micelles. Cette formulation originale a été conçue dans le but d'améliorer le contraste aux rayons X et de potentialiser l'effet radio-sensibilisant de l'or sous irradiation par apport d'oxygène. Des expériences *in vivo* par tomographie par émission de positrons ont permis de valider l'effet contrastant de l'or encapsulé dans les micelles mais les souris sur lesquelles ont été réalisés les expériences n'ont pas survécu au-delà de 4 h. Les concentrations importantes administrées (micelle + or), nécessaires à l'imagerie, en sont probablement la cause. Afin de contourner ce problème, une modification structurale de la micelle a été envisagée pour y incorporer un atome de Zr-89 pour le suivi de la micelle, non plus par contraste X, mais par TEP-scan. Des amphiphiles complexant ont été synthétisés, chélatés avec du zirconium, assemblés en micelles et chargés avec des nanoparticules

d'or. En parallèle, la capacité des micelles à solubiliser de l'oxygène a été évaluée favorablement. Reste cependant à confirmer ces résultats, à valider l'effet radio-sensibilisant des formulations, et à évaluer les nanoparticules d'or encapsulées dans les micelles fluorés pour le ciblage de tumeurs avec un suivi par tomographie par émission de positons.

Experimental section

General informations

All commercially available reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich, VWR, Fluorochem or Acros Organic and were used without further purification. All reactions sensitive to air and moisture were performed under nitrogen in oven-dried glassware. Anhydrous DMF was purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen atmosphere and DCM was distilled from calcium hydride under nitrogen. Reactions with photosensitive compounds were performed isolated from light in aluminium foil-covered glassware. Reaction were monitored by TLC (silica 230-240 mesh, 0,25 mm, Merck) and organic compounds were visualized using UV light (254 nm), Ninhydrine and potassium permanganate as developing agent. Purifications by column chromatography were performed using Silica Gel 60 (0.040–0.063 mm).

^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (100 MHz), ^{19}F NMR (376 MHz) were performed on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvent peaks and coupling constants were reported in Hertz (Hz). Splitting patterns were designated as singlet (s), broad singlet (br.s), doublet (d), triplet (t). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized were designated as multiplet (m). Spectra were analysed using MestRenova software.

Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (UPLC-MS) analyses were performed using a Waters system equipped with an ELSD detector (SEDEX 100, SEDERE), a diode array detector (Acquity PDA e λ Detector) coupled with a simple quadripole detector (SQ detector 2). The system is also equipped with a BEH Xbridge C18 (50 \times 2,1 mm; 1,7 μm) column (Solvent A : MilliQ water + 0.1% HCO_2H ; Solvent B : MeCN + 0.1% HCO_2H). Mass spectra were recorded in positive and negative ion mode in a range of 100–2000 m/z and were treated with MassLynx software.

Electrospray mass spectra were performed on a ESI-Quadripole autopurify from Waters (pump 2545, mass : ZQ2000) Mass Spectrometer.

Quantifications were performed a Waters Autopurify system equipped with a DEDL detector (PL-ELS 1000), a diode array detector (Diode 2996) coupled with a quadripole mass analyser (Micromass ZQ). The system is also equipped with a BEH Xbridge C18 (100 \times 4.6 mm; 3.5 μm) column (Solvent A : MilliQ water + 0.1% HCO_2H ; Solvent B : MeCN + 0.1% HCO_2H). Mass spectra were recorded in positive and negative ion mode in a range of 100–2000 m/z and were treated with MassLynx software.

Micelles were purified using NAPTM-25 columns sold by GE Healthcare. Columns were prepacked with Sephadex G-25 DNA Grade resin and compound were eluted using distilled water by gravity. Micelles were also purified by dialysis using SnakeSkinTM Dialysis Tubing (3.5 kDa cut off, 22 mm \times 35, 3.7 mL/cm) sold by Thermo Scientific.

IR spectra were acquired using a Spectrum 2 FT-IR spectrometer (PerkinElmer) and recorded using PerkinElmer Spectrum software. Wavenumbers were given in cm^{-1} at their maximum intensity.

UV-vis absorbance spectra were recorded using Agilent (Varian) Carry 50 (Scan mode) UV-vis spectrometer and recorded using the Cary WinUV software. Measurements were performed in 1 cm quartz cells.

Ultrasonic mixing was achieved using a Branson sonifier 550 system using a 3 mm tapered microtip (300 ms/s pulses, Output power 50%).

Photo-polymerization experiments were performed using a 40 W low pressure mercury UV lamp (Heraeus) emitting light at 254 nm.

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a VascoFlex instrument from Cordouan Technologies using a laser diode ($\lambda = 450$ nm).

Electron microscopy observations were acquired using a Philips CM12 microscope operated at 100 kV. Pictures were analysed using ImageJ software.

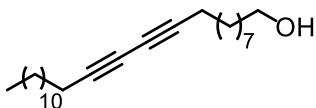
ICP-MS analyses were performed on an iCap Q spectroscope from Thermo Scientific and data were analysed with Qtegra software.

Experimental part: “Chapitre 1”

Synthetic procedures and analytical data

Pentacos-10,12-diyne-1-ol

(I.1)



$C_{25}H_{44}O$
MW: 360.63 g/mol
White solid
97%

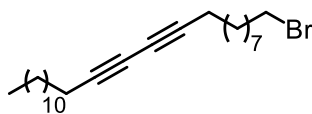
At 0 °C under nitrogen atmosphere, to a stirred suspension of lithium aluminium hydride (200 mg, 5.34 mmol, 2 equiv.) in THF (10 mL), was added a solution of 10,12-pentacosadiynoic acid (1 g, 2.67 mmol, 1 equiv.) in THF (50 mL). The resulting mixture was stirred for 90 min at room temperature. The reaction was quenched with the addition of 15% NaOH solution (200 μ L) and water (600 μ L). Diethyl ether was then added (50 mL) and the mixture was filtered on Celite®. The organic layer was washed with 1 N HCl (2 \times 30 mL) and dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum to afford compound I.1 as a white solid (930 mg, 97%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 1.62 – 1.18 (m, 34H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 77.7, 77.6, 65.4, 65.2, 63.2, 32.9, 32.1, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 28.2, 25.7, 22.6, 19.2, 14.1 ppm.

1-bromopentacos-10,12-diyne

(1.2)

 $C_{25}H_{43}Br$

MW: 423.52 g/mol

Yellow oil

100%

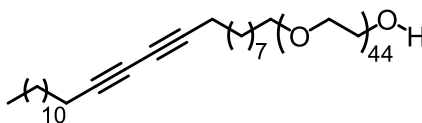
Under nitrogen atmosphere, triphenylphosphine (354 mg, 1.35 mmol, 1.5 equiv.) and compound I.1 (324 mg, 0.9 mmol, 1 equiv.) were solubilized in dry dichloromethane (3 mL). Tetrabromomethane (448 mg, 1.35 mmol, 1.5 equiv.) was added in portions and the reaction was stirred at room temperature for 15 min. The reaction was quenched by the addition of cold water (2 mL), the organic layer was separated, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography eluted with pure dichloromethane. The desired product was obtained as a yellow oil after concentration under reduced pressure (373 mg, quantitative yield).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.43 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 1.93–1.81 (m, 2H), 1.61–1.21 (m, 32H), 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 77.7, 77.6, 65.4, 65.2, 33.7, 32.9, 32.1, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 28.2, 25.7, 22.6, 19.2, 14.1 ppm.

DA-PEG amphiphile

(I.3)

 $C_{113}H_{220}O_{45}$

MW: 2298.96 g/mol

Beige solid

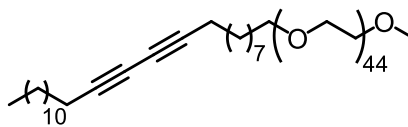
25%

Under nitrogen atmosphere, to a stirred suspension of sodium hydride (67 mg (95% in oil), 2.68 mmol, 2.2 equiv.) in dry ACN (8 mL) was added a solution of polyethylene glycol (Mn = 2000, 2.7 g, 1.34 mmol, 1.1 equiv.) in dry ACN (10 mL). The reaction mixture was protected from light and stirred for 30 min at 85 °C. A solution of compound I.2 (516 mg, 1.22 mmol, 1 equiv.) in dry ACN (3 mL) was added at room temperature to the above mixture. After 3 days at room temperature, the reaction was quenched by the addition of water (200 μ L), filtered, dried over anhydrous $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 96:4) and the pure product was obtained as a pale beige solid (380 mg, 25%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.88–3.40 (m, 200H), 2.30–2.21 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.64–1.46 (m, 6H), 1.44–1.21 (m, 32H), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

DA-PEG methoxy ether amphiphile

(I.4)



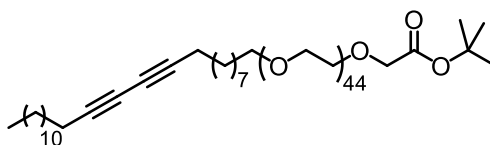
$C_{114}H_{222}O_{45}$
MW: 2312.99 g/mol
Beige solid
40%

Under nitrogen atmosphere, to a stirred suspension of sodium hydride (94 mg (60% in oil), 1.98 mmol, 2.2 equiv.) in dry THF (8 mL) was added a solution of polyethylene glycol methoxy ether ($M_n = 2000$, 2 g, 1 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (10 mL). The reaction mixture was protected from light and was stirred for 30 min at 85 °C. A solution of compound I.2 (380 mg, 0.9 mmol, 1 equiv.) in dry THF (3 mL) was added at room temperature to the above mixture. After 3 days at room temperature and under nitrogen atmosphere, the reaction was quenched with the addition of water (200 μ L), filtered, dried over anhydrous $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 96:4) and the pure product was obtained as a pale beige solid (1 g, 40%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.78–3.33 (m, 212H), 3.31 (s, 3H), 2.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.54–1.37 (m, 6H), 1.35–1.10 (m, 32H), 0.81 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm.

DA-PEG *tert*-butyl ester

(1.5)



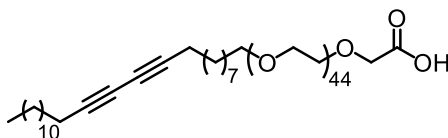
$C_{119}H_{230}O_{47}$
MW: 2413.10 g/mol
Yellow solid
55%

Under nitrogen atmosphere, to a stirred suspension of sodium hydride (25 mg (95% in oil), 0.954 mmol, 6 equiv.) in dry ACN (8 mL) was added a solution of compound I.3 (372 mg, 0.159 mmol, 1 equiv.) in dry ACN (10 mL). The reaction was protected to light and was stirred for 30 min at room temperature. A solution of *tert*-butyl bromoacetate (116 μ L, 0.795 mmol, 5 equiv.) in dry ACN (3 mL) was added and the reaction was stirred for 2 days at room temperature. The reaction was quenched by the addition of water (200 μ L), filtered, dried over anhydrous $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 96:4) and the pure product was obtained as a yellow solid (208 mg, 55%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.98 (s, 2H), 3.72–3.40 (m, 212H), 2.17 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.57–1.34 (m, 15H), 1.31–1.10 (m, 32H), 0.81 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

DA-PEG carboxylic acid amphiphile

(I.6)



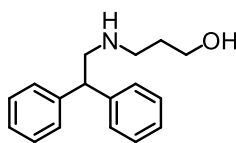
$C_{115}H_{222}O_{47}$
MW: 2356.99 g/mol
Beige solid
75%

Compound I.5 (207 mg, 0.084 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DCM (10 mL) and trifluoroacetic acid was added (1 mL). The reaction was protected from light and was stirred for 2 h at room temperature and under nitrogen atmosphere. The solvent was evaporated under reduced pressure and compound I.6 was obtained as a beige solid (149 mg, 75%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.18 (s, 2H), 3.78–3.33 (m, 212H), 2.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.54–1.37 (m, 6H), 1.32–1.08 (m, 32H), 0.81 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm.

3-((2,2-diphenylethyl)amino)propan-1-ol

(I.10)

 $C_{17}H_{21}NO$

MW: 255.56 g/mol

Colorless oil

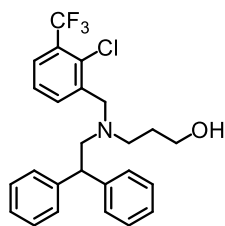
50%

To a stirred suspension of 3-amino-1-propanol (500 μ L, 6.5 mmol, 1 equiv.) in MeOH (15 mL) was added sodium acetate (500 mg, 6.5 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred for 10 min, then diphenylacetaldehyde (2.3 mL, 13 mmol, 2 equiv.) and acetic acid (740 μ L, 13 mmol, 2 equiv.) were added to the reaction mixture which was stirred for another 10 min. The reaction was cooled down to 0 °C and sodium cyanoborohydride (815 mg, 13 mmol, 2 equiv.) was added portionwise. The reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water (20 mL) and the aqueous phase extracted with EtOAc (3 \times 20 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 95:5) and the desired product was obtained as a colourless oil (700 mg, 50%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44–7.18 (m, 10H), 4.44 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.67 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.54 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 3.19–3.05 (m, 2H), 1.83–1.70 (m, 2H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 139.9, 129.25, 127.9, 62.3, 52.4, 49.2, 48.4 ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), m/z = 256 [M+H]⁺

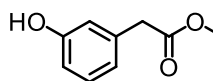
3-((2-chloro-3-(trifluoromethyl)benzyl)(2,2-diphenylethyl)amino)propan-1-ol (I.11)

C₂₅H₂₅ClF₃NO
MW: 447.93 g/mol
Colorless oil
50%

To a stirred suspension of compound I.10 (700 mg, 2.7 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (8 mL) was added 2-chloro-3-(trifluoromethyl)benzaldehyde (1.13 g, 5.4 mmol, 2 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 10 min. The reaction was cooled down to 0 °C and sodium triacetoxyborohydride (1.14 g, 5.4 mmol, 2 equiv.) was added portionwise. The reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water (10 mL) and the aqueous phase extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO₄ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by column chromatography (silica gel, pentane/Et₂O 8:2) and the desired product was obtained as a colourless oil (613 mg, 50%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40–7.03 (m, 2H), 4.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.58 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.15 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.78–1.67 (m, 1H) ppm.

<i>methyl-2-(3-hydroxyphenyl)-acetate</i>	(I.12)
---	--------

C₉H₁₀O₃

MW: 166.18 g/mol

Yellow oil

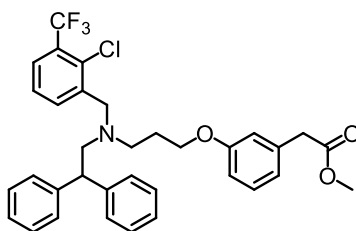
95%

To a solution of 3-hydroxyphenylacetic acid (2 g, 13 mmol, 1 equiv.) in MeOH (15 mL) was added sulphuric acid (500 μ L). The reaction mixture was stirred 2 h under reflux. The solvent was evaporated and the residue dissolved in EtOAc (20 mL) and washed with water (3 x 20 mL) and brine and dried (MgSO₄). The solvent was evaporated under vacuum. The product was obtained as a yellow oil (2,04 g, 95%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (t, 1H), 6.89–6.71 (m, 3H), 3.98 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.58 (s, 3H) ppm.

GW-OMe

(I.13)

 $C_{34}H_{33}ClF_3NO_3$

MW: 596.09 g/mol

White solid

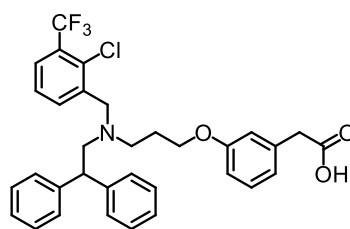
45%

To a solution of compound I.11 (80 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (70 mg, 0.27 mmol, 1.5 equiv.) in DCM dry (3 mL) was dropwise added DIAD (53 μ L, 0.27 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was stirred 15 min at room temperature and under nitrogen atmosphere. Compound I.12 (30 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) was then added and the mixture was stirred for another 12 h at room temperature. The reaction was quenched with 10% HCl and the organic layer was washed with a saturated K_2CO_3 solution. The aqueous layer was then extracted with diethyl ether. The organic layer was collected, dried on $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 95:5) and the desired product was obtained as a white solid (48 mg, 45%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.33–7.11 (m, 12H), 6.90 (dd, $J = 16.5, 7.9$ Hz, 2H), 6.76–6.60 (m, 2H), 4.16 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.74–3.65 (m, 4H), 3.62 (s, 2H), 3.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.86 (dt, $J = 12.4, 6.2$ Hz, 2H) ppm.

GW3965

(I.14)

 $C_{33}H_{31}ClF_3NO_3$

MW: 582.06 g/mol

White solid

98%

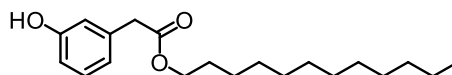
To a solution of compound I.13 (400 mg, 0,6 mmol, 1 equiv.) in THF (10 mL) was added lithium hydroxide (50 mg, 2.1 mmol, 3.5 equiv.) and water (3 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. A solution of HCl (3 N) was added until the pH was below 2 and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layer was collected, dried over $MgSO_4$ and then evaporated under vacuum. The desired product was obtained as a white solid (340 mg, 98%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.37–7.11 (m, 6H), 6.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.68 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.16 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.72 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.92–1.79 (m, 12H) ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 583.2$ $[M+H]^+$

Dodecyl 2-(3-hydroxyphenyl)acetate

(I.15)

 $C_{20}H_{32}O_3$

MW: 320.47 g/mol

Colorless oil

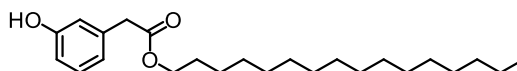
75%

To a solution of 3-hydroxyphenylacetic acid (359 mg, 2.36 mmol, 2 equiv.) and dodecanol (220 mg, 1.18 mmol, 1 equiv.) in THF (15 mL) was added sulphuric acid (500 μ L). The reaction mixture was stirred 2 h under reflux. Solvents are evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, pentane/Et₂O 8:2) and the pure product was obtained as a colourless oil (284 mg, 75%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (t, 1H), 6.89–6.71 (m, 3H), 4.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 1.62 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.28 (s, 18H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H) ppm.

Hexadecyl 2-(3-hydroxyphenyl)acetate

(I.16)

 $C_{24}H_{40}O_3$

MW : 376.58 g/mol

Pale yellow oil

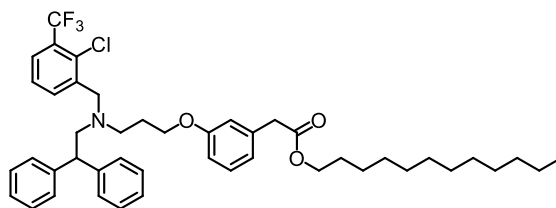
80 %

To a solution of 3-hydroxyphenylacetic acid (359 mg, 2.63 mmol, 2 equiv.) and hexadecanol (318 mg, 1.31 mmol, 1 equiv.) in THF (15 mL) was added sulphuric acid (500 μ L). The reaction mixture was stirred 2 h at reflux. Solvents are evaporated under vacuum. The crude product was purified on column chromatography (silica gel, pentane/Et₂O 8:2) and the pure product was obtained as a colorless oil (395 mg, 80%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (t, 1H), 6.89–6.71 (m, 3H), 4.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 1.62 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.28 (s, 26H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H) ppm.

GW-OC12

(I.17)

 $C_{45}H_{55}ClF_3NO_3$

MW: 750.38 g/mol

Colorless oil

43%

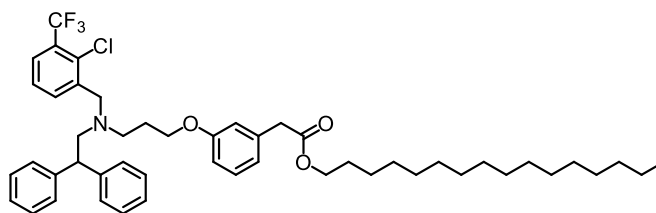
To a solution of compound I.11 (80 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (70 mg, 0.27 mmol, 1.5 equiv.) in DCM dry (3 mL), DIAD (53 μ L, 0.27 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature and under nitrogen atmosphere. Compound I.15 (58 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) was then added and the mixture was stirred for another 12 h at room temperature. The reaction was quenched with 10% HCl and the organic layer was washed with a saturated K_2CO_3 solution. The aqueous layer was then extracted with diethyl ether. The organic layer was dried on $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified on column chromatography (silica gel, Cyclohex/EtOAc 95:5) and the pure product was obtained as a colourless oil (58 mg, 43%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.31–7.13 (m, 14H), 6.91 (dd, $J = 13.1, 7.5$ Hz, 2H), 6.73–6.63 (m, 2H), 4.16 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.71 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.18 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.91–1.82 (m, 2H), 1.63 (dd, $J = 13.8, 6.8$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 27.0$ Hz, 22H), 0.91 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H) ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 751.3$ [M+H]⁺

GW-OC16

(I.18)

 $C_{49}H_{63}ClF_3NO_3$

MW: 806.49 g/mol

Colorless oil

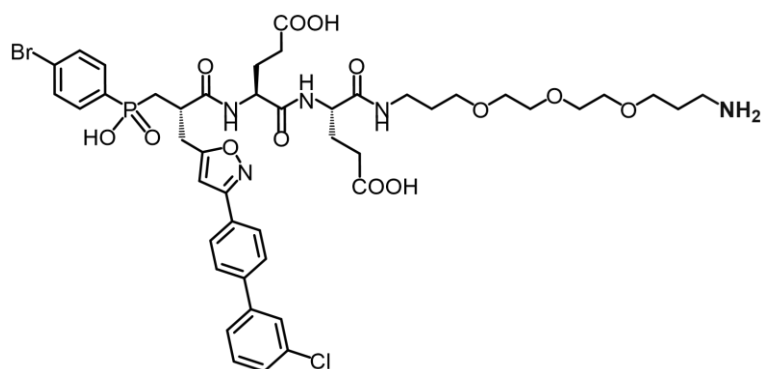
52%

To a solution of compound I.11 (80 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (70 mg, 0.27 mmol, 1.5 equiv.) in DCM dry (3 mL), DIAD (53 μ L, 0.27 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature and under nitrogen atmosphere. Compound I.16 (58 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) was then added and the mixture was stirred for another 12 h at room temperature. The reaction was quenched with HCl solution and the organic layer was washed with a K_2CO_3 saturated solution. The aqueous layer was then extracted with diethyl ether. The organic layer was dried on $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified on column chromatography (silica gel, Cyclohex/EtOAc 95:5) and the pure product was obtained as a colourless oil (58 mg, 43%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.31–7.12 (m, 13H), 6.90 (dd, $J = 13.2, 7.5$ Hz, 2H), 6.72–6.61 (m, 2H), 4.16 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.70 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.91–1.81 (m, 2H), 1.68 – 1.55 (m, 5H), 1.28 (s, 33H), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H) ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 807.2$ [M+H]⁺

RXP470.1



$C_{45}H_{56}BrClN_5O_{13}P$
 MW: 1019,25 g/mol
 White solid
 30%

600 mg (138 μ mol) of PEG NovaTag™ resin was swollen into DCM (5 mL) during 10 min. Amine function was deprotected with piperidine (20% in DMF, 4 mL 3 \times 3 min, 60 °C, 25 W). The resin was then washed (2 \times DMF, 2 \times DCM). The first residue Fmoc-Glu(OtBu)-OH (294 mg, 690 μ mol, 5 equiv.) was preactivated using *N,N*-diisopropylcarbodiimide (108 μ L, 690 μ mol, 5 equiv.) and 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole di-hydrate (117 mg, 690 μ mol, 5 equiv.) in DMF ([C] = 35 mM). The reaction mixture was added to the resin and the peptide coupling reaction was performed under microwave radiation at 60 °C during 10 min (25 W). A second coupling step without any washing intermediate step was performed under the same conditions. The second residue Fmoc-Glu(OtBu)-OH is added according to the same procedure. The phosphinic block (115 mg, 165 μ mol, 1.2 equiv.) is preactivated with DIC (65 μ L, 414 μ mol, 3 equiv.) and Cl-HOBt (70 mg, 414 μ mol, 3 equiv.) ([C] = 70 mM) and the coupling reaction was performed under microwave radiation at 60 °C during 60 min. The resin was then washed (2 \times DMF, 2 \times DCM) and the compound was cleaved from the resin using TFA/H₂O 95:5 (8 mL, 2 \times 45 min). The resin was washed with TFA/DCM 1:1 (8 mL, 60 min). TFA solutions were then evaporated under argon flux. The crude product was purified using RP-HPLC system (H₂O/CH₃CN 1:1) and the desired product was obtained as a white solid (30%).

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 1020.2$ [M+H]⁺

Formulations

Micelles PDA-PEG formulations

A mixture of DA-PEG-OMe I.4 (45 mg, 19.5 μmol) and DA-PEG-COOH I.6 (5 mg, 2.12 μmol) were suspended in distilled water (5 mL). The solution was sonicated using an ultrasonic probe for 10 min (300 ms pulse per second, output 45%) providing a pale-yellow clear solution. The solution was filtered on a 0.2 μm nylon membrane. Colloids were subjected to UV irradiation at 254 nm for 4 h and a yellow solution was obtained. The colloidal photo-polymerized solution was then filtered on 0.2 μm nylon membrane.

GW3965 and analogues encapsulation protocol – GW3965@PDA-PEG, GW-OC16@PDA-PEG

GW3965, and its analogues, were encapsulated following the same procedure. GW3965 was suspended in chloroform (5 mg/mL) and 200 μL of this solution was added to 1 mL of polymerized micelles suspension in water. The biphasic mixture was sonicated using an ultrasonic probe for 30 min (300 ms pulse per second, output 45%) and filtered on a 0.2 μm nylon membrane. A yellow clear suspension was obtained.

DiD dye encapsulation protocol – DiD@PDA-PEG

DiD was suspended in EtOH (10 mg/mL) and 10 μL was added to 1 mL of polymerized micelles suspension. The mixture was sonicated using an ultrasonic probe for 30 min (300 ms pulse per second, output 45%) and was filtered on a 0.2 μm nylon membrane. A green colloid suspension was obtained.

Size measurement by Dynamic Light Scattering

Ten acquisitions of 60 s were performed for each suspension analysed. The hydrodynamic diameter of non-polymerized micelles is around 11 nm and polymerized micelles 12 nm. The hydrodynamic size of other formulation is reported in Table S1.

Quantification methods

Quantification of GW3965 was performed on a High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (HPLC-MS) system. Different concentrations of GW3965 were used to plot a calibration curve. The variation in absorbance at 280 nm was reported as a function of the GW3965 concentration.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	% A	% B
0	1.0	95	5
25	1.0	0	100
30	1.0	0	100

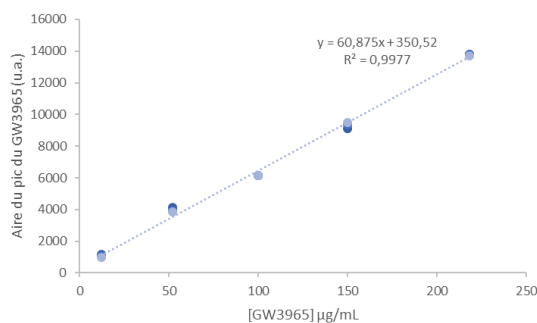


Figure S1: Gradient used for GW3965 quantification using HPLC-MS and calibration curve obtained.

The quantification was performed using 10 μL samples diluted in 100 μL of MeOH. The concentration was determined by reporting absorbance peak intensity to the calibration curve.

Quantification of GW3965 analogues was carried out using UV-visible spectroscopy. A calibration curve was plotted with the compound absorbance at 272 nm. The quantification was achieved using 10 μL samples diluted in 100 μL EtOH and was determined using the calibration curve.

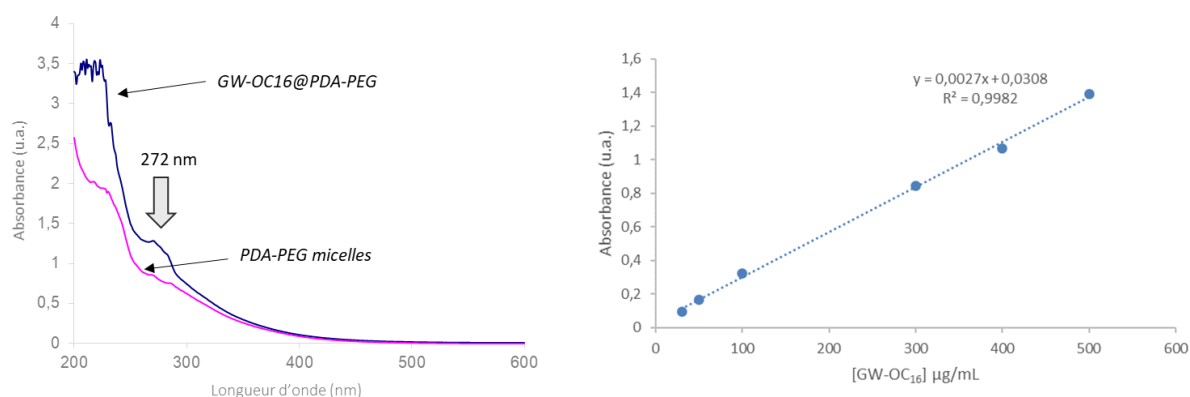


Figure S2: micelles PDA-PEG UV-visible spectrum (in EtOH, measure blank) and GW-OC16@PDA-PEG formulation in EtOH, with GW-OC16 absorbance peak at 272 nm. Calibration curve obtained.

Quantification of DiD was carried out using UV-visible spectroscopy. The quantification was achieved using 10 μL samples diluted in 1 mL MeOH and was determined using the molar attenuation coefficient of DiD dye ($193\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ in MeOH) at 644 nm.

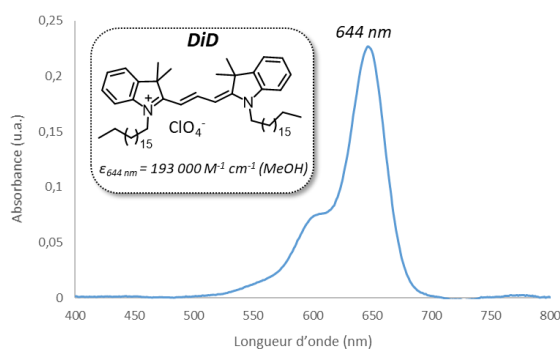


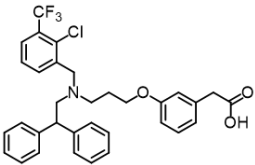
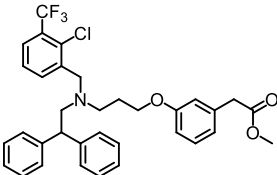
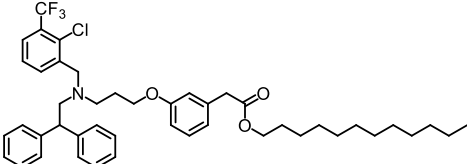
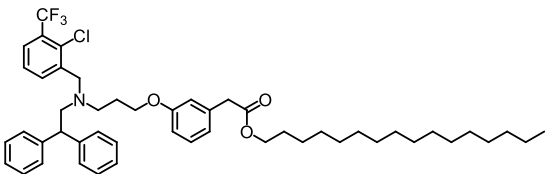
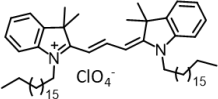
Figure S3: DiD@PDA-PEG UV-Visible spectrum after dissociation of PDA-PEG micelles in MeOH.

The loading capacity (LC) and encapsulation efficiency (EE) were evaluated following formulas (1) and (2). LC and EE were calculated for each compound and were reported on Table S1.

$$(1) \quad \% \text{ LC} = 100 \times \frac{m \text{ (active compound)}}{m \text{ (active compound)} + m \text{ (amphiphile)}}$$

$$(2) \quad \% \text{ EE} = \frac{m \text{ (entrapped active compound)}}{m \text{ (active compound added)}}$$

Table S1: Hydrodynamic sizes, encapsulation efficiency (EE %) and loading capacity (LC %) of different formulations.

Formulation	Encapsulated compound	HD size	EE (%)	LC (%)
GW3965@PDA-PEG		12 nm	86	8
GW-OMe@PDA-PEG		20 nm	70	7
GW-OC12@PDA-PEG		14 nm	80	8
GW-OC16@PDA-PEG		12 nm	90	8
DiD@PDA-PEG		12 nm	100	1

Stability studies

In vitro drug release studies using dialysis method were performed to evaluate the stability of the GW3965 formulation before *in vivo* evaluation. 2 mL of GW3965@PDA-PEG micelles was added in dialysis tubing (cut-off 8 kDa; 1.8 mL/cm). The dialysis tube was immersed in water (2 L) under gentle stirring at 25 °C. At each time point, 10 µL of the solution in the dialysis tubing was collected, diluted in MeOH and GW3965 concentration was determined by HPLC-MS (Figure S1).

Functionalization of micelles with RXP470.1

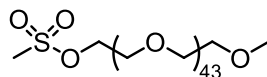
To a solution of EDCI·HCl in PBS (52 mM, 160 µL, 10 equiv.) was added 2 mL of polymerized micelle and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. Then, a solution of *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) in PBS (46 mM, 180 µL, 10 equiv.) was added to the mixture. After 30 min stirring, a solution of mercaptoethanol in H₂O/1% PBS (142 mM, 58 µL, 10 equiv.) was added. The reaction was stirred for 30 min and RXP470.1 (10 mg/mL in water, 169 µL, 2 equiv.) was added. The pH was adjusted to 8 with NaOH. After 24 h at room temperature, the excess of RXP470.1 was eliminated by dialysis (cut off 10 kDa; 3.3 mL/cm; 3 L bath of distilled water, 3 days). The elimination of free RXP470.1 was followed by HPLC/MS over time. The micelle suspension was purified by NAP-25 (Sephadex) and the resulting colloid was lyophilised. The lyophilised micelles were dispersed in distilled water (10 mg/mL) and analysed by DLS. The mean hydrodynamic diameter of functionalized micelles was 10 nm.

Experimental part: “Chapitre 2”

Synthetic procedures and analytical data

PEG 2000 mono mesyl monomethyl ether

(II.1)



$C_{92}H_{186}O_{48}S$

MW: 2092.51 g/mol

White solid

90%

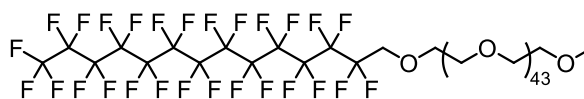
Under N_2 , polyethylene glycol monomethyl ether (Mn 2000, 2 g, 1 mmol, 1 equiv.) in 20 mL of CH_2Cl_2 was treated sequentially with NEt_3 (0.69 mL, 5 equiv.) and methanesulfonyl chloride (0.4 mL, 5 equiv.). The solution was stirred for 48 h at RT and treated with 5% HCl (3×20 mL) and brine (30 mL). The organic phase was collected, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. Purification was carried out by precipitation of the product with Et_2O at -20 °C for 30 min. The mesylated PEG₂₀₀₀ monomethyl ether was obtained as a white solid (90% yield).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.41 (s, 3 H), 3.35 (s, 3 H), 3.44–3.70 (m, 10 H), 4.15 (t, $J = 4.6$ Hz, 2 H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 69.5 (multiple C), 58.0, 36.5 ppm.

Perfluorinated amphiphile PFTD-PEG

(II.2)

 $C_{103}H_{181}F_{27}O_{45}$

MW: 2642.59 g/mol

White solid

68%

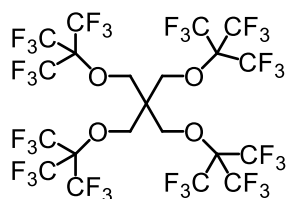
Under N_2 , NaH (75 mg (60% in oil), 4 equiv.) in 8 mL of THF was slowly added to perfluorotetradecanol (1.33 g, 4 equiv.) in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at reflux for 30 min before the above mesylated PEG₂₀₀₀ monomethyl ether (1 g, 0.48 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 2 days at 70 °C. THF was evaporated, the residual oil was solubilized in CH_2Cl_2 and filtered over Celite. The PFTD-PEG amphiphile was obtained as a white solid (68% yield) by precipitation with Et_2O at -20 °C for 30 min.

1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.07 (t, 2H), 3.55 (s, 186H), 3.23 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ 69.5 (multiple C) ppm.

^{19}F -NMR (376 MHz, D_2O) δ -83.38, -123.16 ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), m/z = 1327 $[M+H]^2+$



MW: 1007 g/mol

White solid

45%

This compound was synthesized according to the procedure reported by Tirota *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8524). At 0 °C and under N₂, to a stirred mixture of pentaerythritol (0.14 g, 1.03 mmol, 1 equiv.) and triphenylphosphine (1.6 g, 6.18 mmol, 6 equiv.) in 10 mL of anhydrous THF, was added dropwise diisopropylazodicarboxylate (DIAD, 1 mL, 6.18 mmol, 6 equiv.). After 30 min at room temperature, perfluoro-*tert*-butanol (0.862 mL, 6.18 mmol, 6 equiv.) was added in one portion. The mixture was stirred at 45 °C for 72 h, until a fluorinated layer separated. The mixture was then cooled to 0 °C, filtered and washed with THF, acetone and water. The product was obtained as a white solid (45%). NMR characterization was performed by adding little amounts of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to the deuterated solvent in order to solubilize PERFECTA.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/HFIP) δ 3.59 (s, HFIP), 4.17 (s), 4.45-4.36 (m, HFIP) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 120.6 (q, $J = 280$ Hz), 119.1 (HFIP), 79.5 (m), 69.5 (HFIP), 65.5, 46.0 ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -70.85 (s), -76.14 (s, HFIP) ppm.

Assembly and characterization of PERFECTA@PFTD-PEG

Assembly of the PFTD-PEG micelles

A solution of compound II.2 (60 mg) in 0.9% NaCl (3 mL) was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 45%) for 10 min leading to a final micelle concentration of 20 mg mL⁻¹. The solution was finally filtered on a 0.2 µm nylon membrane. The hydrodynamic diameter was evaluated by DLS at 20 °C, which indicated a mean diameter of 13 nm.

Determination of the Critical Micelle Concentration

The CMC was evaluated by measuring the surface tension of micelle suspensions. Suspensions at different concentrations of amphiphilic units (from 1 mg/mL to 7.8 µg/mL) were prepared in water and the surface tension was measured (in triplicate), using the du Noüy ring method. The CMC value was obtained at the intersection of the two lines and was found to be 0.051 mg/mL.

Loading of the PFTD-PEG micelles with PERFECTA

PERFECTA (20 mg) was added to a solution of PFTD-PEG micelles in 0.9% NaCl (1 mL – 20 mg.mL⁻¹) and the mixture was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 45%) for 20 min. The suspension was then filtered on a 0.22 µm membrane to remove insoluble aggregates. Encapsulation efficiency was 70%.

Determination of the number of amphiphilic units per micelle

The number of amphiphilic units per micelle was evaluated by static light scattering (SLS) experiments. Suspensions of PFTD-PEG micelles were prepared at different concentrations ranging from 1 mg mL⁻¹ to 10 mg mL⁻¹ and analyzed. A molecular mass of 80.3 ± 5.77 kDa corresponding to the PFTD-PEG micelle was extrapolated, which corresponds to approximately 30 amphiphilic units per micelle.

Cryo-electron microscopy of PFTD-PEG micelles and PERFECTA@PFTD-PEG micelles

PFTD-PEG and PERFECTA@PFTD-PEG micelles samples were vitrified using a ThermoFisher VitroBot Mark IV. Around 4 µL of the sample ([PFTD-PEG] = 20 mg/mL, [PERFECTA@PFTD-PEG] = 20 mg/mL + 14 mg of PERFECTA) was deposited onto an electron microscopy grid with a lacey support film, with or without additional graphene oxide films in the VitroBot chamber at room temperature with 100% relative humidity. Imaging was performed on a ThermoFisher Tecnai F20 microscope at 200 keV in a low-dose setting and images were recorded with a Ceta camera.

Quantification of PERFECTA by ¹⁹F-NMR spectroscopy

The measurement of PERFECTA concentration in micelles was performed on different samples of PERFECTA@PFTD-PEG micelles that were prepared by varying the loading of PERFECTA from 2.5 to 20 mg in a 20 mg mL⁻¹ PFTD-PEG micelle solution. Potassium fluoride (KF) was used as internal standard. For each experiment, 400 µL of a 0.082 M KF solution in D₂O (corresponding to 32.74 µmol) was introduced in a NMR tube containing 100 µL of PERFECTA@PFTD-PEG micelles. The amount of PERFECTA in the sample was measured by comparative integration of the peak at -76.17 ppm (corresponding to PERFECTA) and that of the KF internal standard set at -125.3 ppm.

Stability studies

The stability of PERFECTA-loaded micelles was evaluated by measuring the hydrodynamic sizes distribution of samples (20 mg mL⁻¹ in 0,9% NaCl at 25 °C) over time. There was no aggregation and PERFECTA remained in the micelle core after filtration step after 1 month.

Stability of PERFECTA@PFTD-PEG micelles in serum and at different pH was assessed by ¹⁹F-NMR. In brief, PERFECTA@PFTD-PEG micelles (20 mg/mL of micelles containing 14 mg of PERFECTA) were incubated in either 10% FBS/D₂O, pH 5 or pH 9 D₂O solutions. KF was introduced as internal standard (see above section *c.*), and ¹⁹F-NMR were recorded at different time intervals. Intensity of the ¹⁹F-NMR signal of PERFECTA was used as a probe to look at the colloidal integrity of the system. The PERFECTA signal remained constant for more than 96 h, which suggested that neither leaching of the payload nor precipitation of the micelle had taken place and that the colloidal system remained unaffected under the conditions studied.

In vitro cell proliferation assay and cell internalization studies

These experiments were performed By Guillaume Pinna from the CEA/SBIGEM.

Cell proliferation/survival assay on HEK-293 and MC38 cells

Immortalized human embryonic kidney HEK-293 cells (ATCC) were routinely maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (PAA), Penicillin (100 U mL⁻¹) and Streptomycin (100 µg mL⁻¹). Murine colon carcinoma MC38 cells were routinely maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (PAA), glutamin (2 mM, Sigma), non essential amino acids (0.1 mM, Sigma), sodium pyruvate (1 mM, Sigma), Hepes (10 mM, Sigma), gentamycin sulfate (50 µg mL⁻¹, Sigma), Penicillin (100 U mL⁻¹) and Streptomycin (100 µg mL⁻¹). Cell proliferation/survival assay of cells exposed to PFTD-PEG micelles was conducted in the same way as previously described (see M.-D. Hoang et al., *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 4331–4338). In short, HEK-293 or MC38 cells suspended in culture medium were seeded into the wells of an optical 96-well culture plate (Costar #3904) at a final density of 1000 (MC38) and 1500 cells/well (HEK-293). Plates were then incubated for 6 h at 37 °C, 5% CO₂ to allow cell adhesion. Micelles (or PBS as vehicle) were then diluted in PBS and immediately layered on top of the culture wells to achieve the indicated final concentrations, and plates were incubated for 72 h at 37 °C, 5% CO₂. Cells were then fixed by addition of paraformaldehyde (4% [w/v] final) and nuclear DNA was fluorescently labeled by Hoechst 33342 (2 µg mL⁻¹ final). After an overnight incubation at 4 °C, supernatants were removed by aspiration, replaced by 100 µL PBS, and plates were imaged on a high-content imaging device (Operetta, Perkin Elmer) in the blue channel (Ex. 360–400 nm, Em. 410–480 nm, 10 × magnification, 9 fields acquired/well). Using a high-content imaging analysis software (Harmony 3.0, Perkin-Elmer), DNA-labeled nuclei were segmented, and the absolute amount of nuclei per condition was quantitated. Results are expressed as the relative amount of cells in micelle-treated wells relative to the average amount of cells in the controls treated with vehicle (PBS).

Cell internalization studies

Fluorescently labelled micelles were prepared as follows: 20 μL of a 1 mg mL^{-1} solution of DiD (1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine) in EtOH were added to PFTD-PEG micelles (20 mg mL^{-1} , 1 mL). The mixture was tip sonicated for 3×10 min. The clear colloid was filtered through a 0.22 μm membrane and stored in the dark.

MC38 cells suspended in culture medium were seeded into the wells of an optical 96-well culture plate (Costar #3904) at a final density of 4000 cells/well. Plates were then incubated for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 to allow cell adhesion. PFTD-PEG micelles alone or encapsulating DiD were then diluted in PBS and immediately layered on top of the culture wells to achieve the indicated final micelle concentrations, and plates were incubated for 18 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . Cells were then fixed and DNA stained with Hoechst 33342 as described above. Plates were imaged on a high-content imaging microscope (Operetta, Perkin Elmer) in the blue (Hoechst) channel (Ex. 360–400 nm, Em. 410–480 nm) and in the red (DiD) channel (Ex. 620–640 nm, Em. 650–760 nm) at $20 \times$ magnification.

^{19}F MRI Experiment

^{19}F -MRI was performed in vitro with a 7 T Biospec preclinical scanner (Bruker) using fluorinated micelles at different concentrations of PERFECTA (0.660, 0.155, 0.074, 0.046, 0.044, 0.037, 0.026, 0.022 M) that were previously determined by ^{19}F -NMR. This experiment allowed the evaluation of the linearity between the concentration in fluorine and the signal obtained by ^{19}F -MRI, as well as to determine the detection threshold in terms of fluorine concentration. For MRI acquisition, two sequences were used. The first one was a Multi-Slice Multi-Echoes sequence (MSME) with the following parameters: TR = 2500 ms; TE = 8 ms; 40 echoes spaced by 8 ms; voxel size = 0.3 mm \times 0.3 mm \times 12 mm; matrix = 88 \times 88 \times 1; acquisition time = 73 min 20 s; 20 averages. The second one was a Rapid Acquisition with Refocused Echoes sequence (RARE) with the following parameters: TR = 2500 ms; effective TE = 15 ms; RARE factor = 8; voxel size = 0.3 mm \times 0.3 mm \times 12 mm; matrix = 88 \times 88 \times 1. This sequence was run with 2 averages (RARE2, acquisition time = 55 s), 10 averages (RARE10, acquisition time = 4 min 35 s) and 20 averages (RARE20, acquisition time = 9 min 10 s).

To determine the T_1 , T_2 and T_2^* relaxation times of PERFECTA-loaded micelles, several parametric sequences were acquired on a tube filled with fluorinated micelles at 0.5 M. For T_1 estimation, an Inversion Recovery Fast Gradient Echo sequence (IR-FGE) with the following parameters was used: TR₁ = 5 ms; TR₂ = 10 s; TE = 2.5 ms; 6 segments; flip angle = 5 $^{\circ}$; 132 inversion times spaced by 60 ms from 60 ms to 7920 ms; voxel size = 0.4 mm \times 0.4 mm \times 8 mm; matrix = 72 \times 72 \times 4; acquisition time = 6 h; 90 averages. After images reconstruction, the T_1 relaxation time was computed by fitting the signal intensity versus echo time using Bloch equations. For T_2 estimation, a MSME sequence with the following parameters was used: TR = 2500 ms; TE = 8 ms; 40 echoes spaced by 8 ms from 8 ms to 320 ms; voxel size = 0.4 mm \times 0.4 mm \times 8 mm; matrix = 72 \times 72 \times 4; acquisition time = 4 h 30 min; 90 averages. After images reconstruction, the T_2 relaxation time was computed by fitting the signal intensity versus echo time using Bloch equations. For T_2^* estimation, a Multi Gradient Echo sequence (MGE) with the following parameters was used: TR = 800 ms; TE = 2.5 ms; 30 echoes spaced by 2.5 ms from 2.5 ms to 75 ms; voxel size = 0.4 mm \times 0.4 mm \times 8 mm; matrix = 72 \times 72 \times 4; acquisition time = 21

min 36 s; 30 averages. After images reconstruction, the T_2^* relaxation time was computed by fitting the signal intensity versus echo time using Bloch equations.

In vivo MRI experiments

Animal model

MC38 cell line was grown in Dulbecco's modified MEM with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM Hepes, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamycin sulfate, pen/strep and sub-cultured twice a week at 1:10 during 3 weeks after defrost. Two-month old female mice (C57Bl/6, 20 g, purchased from Janvier Labs) were subcutaneously implanted with 106 MC38 cells in 100 μL of DPBS.

In vivo MRI investigation

Ten days after MC38 cells implantation (mean tumor volume = $138 \pm 26 \text{ mm}^3$, $N = 9$), a solution of PERFECTA@PFTD-PEG micelles was injected intravenously (150 μL - $[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 0.50 \text{ M}$) in the tail of the anesthetized animals ($N = 9$ C57Bl/6-MC38 mice) every day during 4 days. $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRI images of the mice abdomen (from the heart to the bladder) were acquired immediately (0+) and 6 hours after injection (6+), then one ($N = 6$) and three days ($N = 3$) after the last injection.

MRI acquisitions were performed with mice under isoflurane anesthesia (1–2%) with an air/ O_2 mixture (50:50). Biological parameters of the animal (respiratory frequency and temperature) were monitored during the whole imaging session. Two tubes containing known concentrations of PERFECTA@PFTD-PEG micelles ($[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 0.044$ and 0.66 M) were placed next to each mouse abdomen and used as reference for fluorine concentration.

Then 150 μL of PERFECTA@PFTD-PEG micelles were injected in the tail vein and the animal was placed in a dedicated cradle inside a 7 T Biospec preclinical scanner (Bruker). ^1H high resolution MR images were first acquired for future segmentation of organs of interest using a flow-compensated Fast Low Angle Shot sequence (FcFLASH) with the following parameters: TR = 475 ms; TE = 3 ms; voxel size = $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$; matrix = $160 \times 160 \times 30$; 6 averages; acquisition time = 7 min 36 s). Then ^{19}F MR images were acquired to detect PERFECTA-loaded micelles using a RARE sequence with the following parameters: TR = 2500 ms; effective TE = 15 ms; RARE factor = 8; voxel size = $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$; matrix = $40 \times 40 \times 6$; 40 averages; acquisition time = 8 min 20 s). The total acquisition time for each mouse was around 30 min including calibration steps and respiratory triggering.

After the last scanning session, organs of interest were collected (tumor, heart, liver, muscle) after mouse exsanguination.

Extraction of PERFECTA from selected organs and ^{19}F NMR experiment

Mice were sacrificed and exsanguinated after the MRI experiments and the organs of interest were collected (tumor, heart, liver, muscle) and kept at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Frozen organs were grinded using a ball milling system in the presence of an extraction solvent (HFIP) which was added to reach a final concentration of 0.2 g of organs in 1 mL of solvent. The homogenate was centrifuged ($20\,000 \times g$, $2 \times 10 \text{ min}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$), the supernatant was collected, filtered on Celite, and the solvent evaporated. CDCl_3 was added to the residue and ^{19}F -NMR was recorded. PERFECTA was detected in liver and tumor tissues, but not in muscle tissues.

Ex vivo experiment using ^{19}F MRI

Ex vivo quantification of PERFECTA@PFTD-PEG micelles was achieved by performing MRI acquisitions on resected liver, using a reference tube of known fluorine concentration ($[^{19}\text{F}] = 660$ mM). The resected liver was placed in a dedicated tube inside a 7 T Biospec preclinical scanner (Bruker). One ^1H high resolution MR image was first acquired for future segmentation of liver using a MSME sequence with the following parameters: TR = 4500 ms; TE = 5 ms; 24 echoes spaced by 5 ms; voxel size = 0.3 mm \times 0.3 mm \times 0.9 mm; matrix = 138 \times 105 \times 24; 1 average; acquisition time = 7 min 52 s. Then one ^{19}F MR image was acquired to detect PERFECTA-loaded micelles using a MSME sequence with the following parameters: TR = 4000 ms; TE = 4 ms; 48 echoes spaced by 4 ms; voxel size = 0.9 mm \times 0.9 mm \times 1.8 mm; matrix = 46 \times 35 \times 12; acquisition time = 59 h 44 min; 64 averages. *Ex vivo* measurements indicated $[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 89$ mM, which is in good agreement with *in vivo* data ($[^{19}\text{F}_{\text{PERF}}] = 92$ mM at 144 h, just before sacrifice).

Post-processing of MR images

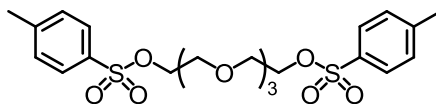
Images were reconstructed from raw data using home-made Matlab codes (The Mathworks). Regions of interest (ROIs), corresponding to the investigated organs (tumor, liver, heart) and the reference tube, were manually segmented on each slice of the ^1H images. ^{19}F images were oversampled to reach the spatial resolution and field-of-view of ^1H images. Then, ROIs were applied on oversampled ^{19}F images to quantify the fluorine signal. ^{19}F concentrations were calculated thanks to the signal measured in the reference tube with the highest concentration of fluorine (0.66 M).

Experimental part : “Chapitre 3”

Synthetic procedures and analytical data

bis tosylated tetraethyleneglycol

(III.1)



$C_{22}H_{30}O_9S_2$

MW: 502.59 g/mol

Colorless oil

68%

To a solution of tetraethyleneglycol (1 g, 5.25 mmol, 1 equiv.) in DCM was added tosyl chloride (2 g, 10.5 mmol, 2 equiv.) and triethylamine (2.19 mL, 15.75 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. DCM was then evaporated and diethyl ether was added. The solution was washed with water (3 ×) and brine. The organic phase was isolated, dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. After a silica gel column chromatography (EtOAc/Hexane 4:1), the pure product was obtained as a colourless oil (1.79 g, 68%).

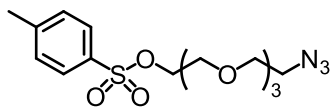
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.35 (d, 4H), 4.19–4.13 (m, 4H), 3.72–3.66 (m, 4H), 3.57 (s, 8H), 2.45 (s, 6H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 144.85, 132.95, 129.85, 127.99, 70.74, 70.56, 69.28, 68.69, 21.67 ppm.

IR (cm^{-1}): 2882, 1597, 1451, 1353, 1174, 1096, 1014, 919, 816, 775, 663, 554.

2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate

(III.2)

 $C_{15}H_{23}N_3O_6S$

MW: 373.42 g/mol

Colorless oil

40%

To a solution of compound III.1 (568 mg, 1.13 mmol, 1 equiv.) in EtOH (15 mL) was added sodium azide (59 mg, 0.904 mmol, 0.8 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at 80 °C. Cold water was added, and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The collected organic phase was washed with water, brine, dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. After silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc 1:1) the pure product was obtained as a colourless oil (151 mg, 40%).

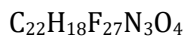
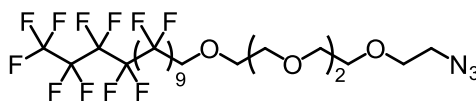
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.18 (dd, J = 5.4, 4.3 Hz, 2H), 3.77–3.57 (m, 18H), 3.40 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.47 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 144.8, 132.9, 129.8, 128, 70.8, 70.7, 70.1, 69.3, 68.7 ppm.

IR (cm^{-1}): 2873, 2102, 1597, 1450, 1354, 1293, 1176, 1110, 1016, 921, 817, 775, 663, 554.

1-azido-heptacosafluoro-tetraoxahexacosane

(III.3)



MW: 901.36 g/mol

White solid

63%

Under nitrogen, to a solution of sodium hydride (147 mg, 6.4 mmol, 4 equiv. 60% in oil) in THF dry (8 mL) was added perfluorotetradecanol (4.48 g, 6.4 mmol, 4 equiv.) previously solubilized in hot THF (12 mL). The reaction mixture was heated at 75 °C for 30 min. Then a solution of compound III.2 (600 mg, 1.6 mmol, 1 equiv.) in THF (8 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 2 days at 75 °C. THF was then evaporated and the resulting solid was solubilized in DCM for a filtration step on Celite®. The filtrate was evaporated and the crude product purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2 → 1:1) to afford the desired compound as a white solid (906 mg, 63%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (t, *J* = 14.0 Hz, 2H), 3.81 (dd, *J* = 5.6, 3.6 Hz, 2H), 3.73–3.65 (m, 11H), 3.43–3.37 (m, 2H) ppm.

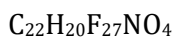
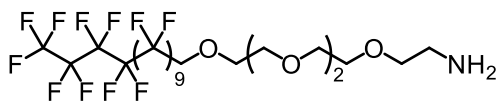
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 50.66 (CH₂N₃), 68.27, 70.68, 72.30 (CH₃) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -80.94, -119.89, -121.84, -122.85, -123.51, -126.28 ppm.

IR (cm⁻¹): 2871, 2105, 1203, 1146, 911, 733, 647, 554, 528.

Heptacosafuoro-tetraoxahexacosan-amine

(III.4)



MW: 875.36 g/mol

White solid

80%

Under argon, to a solution of compound III.3 (100 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in THF (6 mL) was added Pd/C. The suspension was stirred for 10 min under argon bubbling. The argon atmosphere was replaced by hydrogen which was bubbled into the solution for 10 min. The reaction mixture was stirred under hydrogen gas overnight at room temperature. The reaction mixture was then filtered over Celite® and washed many times with EtOAc and MeOH. The filtrate was evaporated to provide the desired product as a white solid (96 mg, 80%).

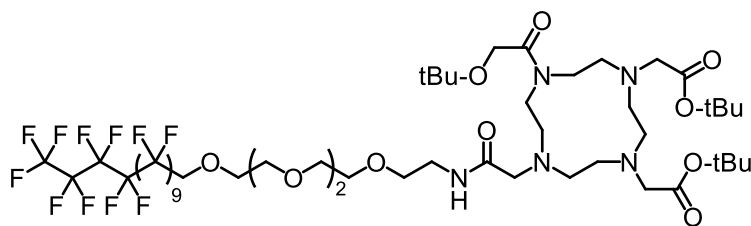
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.97 (t, *J* = 14.0 Hz, 2H), 3.72 (dd, *J* = 5.5, 3.5 Hz, 2H), 3.64–3.50 (m, 10H), 3.43 (dd, *J* = 9.8, 4.5 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 41.78 (CH₂NH₂), 70.66, 72.33 (CH₃), 73.46 ppm.

Mass (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 876.3 [M+H]⁺.

PFTD-DOTA(3xtBu)

(III.5)

 $C_{50}H_{70}F_{27}N_5O_{11}$

MW: 1429.46 g/mol

Beige solid

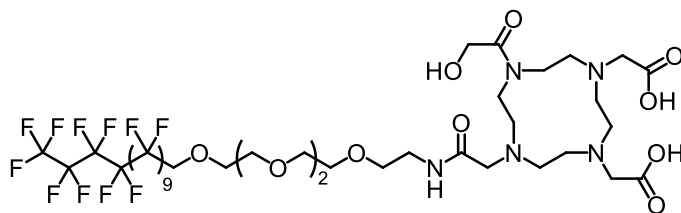
30%

To a solution of tri-*tert*-butyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate (95 mg, 0.165 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (3 mL) was added DIEA (280 μ L, 1.65 mmol, 15 equiv.) and HATU (54 mg, 0.143 mmol, 1.3 equiv.). The solution was stirred for 10 min and a solution of compound III.4 (100 mg, 0.11 mmol – 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added to the activated acid. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. DMF was then evaporated and the residue solubilized in DCM to be washed with water (\times 2) and brine. The organic layer was collected, dried over $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:2 to 90:10) and the desired compound was obtained as a beige solid (47 mg, 30%).

Mass (MeOH): ESI(+), $m/z = 1430$ [M+H]⁺.

PFTD-DOTA

(III.6)

 $C_{38}H_{46}F_{27}N_5O_{11}$

MW: 1261.77 g/mol

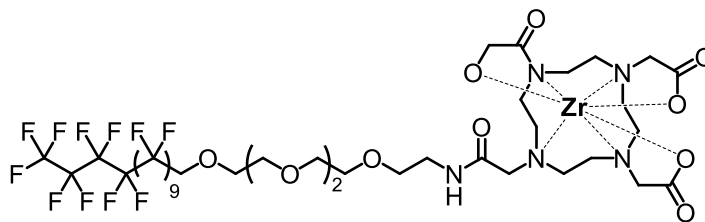
White solid

>99%

To a solution of compound III.5 (165 mg, 0.115 mmol) in DCM (3 mL) was added 3 mL of HCl in dioxane 4 N. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was evaporated under vacuum to afford the desired product as a white powder in quantitative yield.

Mass (MeOH): ESI(+), $m/z = 1262$ [M+H]⁺.

PFTD-Zr-DOTA



$C_{38}H_{43}F_{27}N_5O_{11}Zr$
MW: 1348.16 g/mol
Pink solid

To a solution of compound III.6 (30 mg, 0.024 mmol, 1 equiv.) in MeOH (8 mL) was added zirconium acetylacetonate (13 mg, 0.026 mmol, 1.1 equiv.). The reaction was stirred for 3 h at 70 °C. The mixture was evaporated under vacuum. The residue was dissolved in water (2 mL) and a purification step using NAP-25 column was performed in order to obtain the desired product as a pale pink solid after lyophilisation.

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 1348.5 [M+H]^+$

Gold nanoparticles synthesis and characterization

Synthesis of Au@TOAB according to Brust-Schiffrin protocol

To a 30 mM solution of H₂AuCl₄ (2,5 mL) in ultrapure water was added a solution of tetraoctylammonium bromide (50 mM, 7 mL) in toluene. The biphasic system was stirred vigorously for 5 min and a freshly prepared solution of sodium borohydride (0.75 M, 850 µL) in cold ultrapure water, was added dropwise under vigorous stirring. The mixture was stirred for 4 h and the red-wine coloured toluene phase containing gold nanoparticles was isolated and stored at room temperature.

Ligand exchange and encapsulation in the PFTD-PEG micelles

To 1 mL of freshly prepared Au@TOAB in toluene (10 mM) was added 1H,1H,2H,2H,perfluorodecanethiol (6 µL, 2 equiv.) in PFMC (1 mL). The biphasic system was cooled down to 4 °C and then stirred vigorously until the red-wine colour of gold nanoparticles was transferred to the PFMC phase. The colourless toluene phase was discarded and the fluorinated solvent washed with water. After vigorous stirring, the water phase was discarded and a 10 mg mL⁻¹ solution of PFTD-PEG micelles in water (1 mL) was added. The biphasic system was sonicated with an ultrasonic probe (20 min, 300 ms pulse per second, output 45%) and encapsulated gold nanoparticles were filtered on 0.2 µm membrane.

Concentration of gold nanoparticles in PFTD-PEG micelles

5 mL of Au@PFTD-PEG suspension was lyophilized. The residue was then redispersed in 1.4 mL of water and the suspension was sonicated using an ultrasonic bath at 30 °C for 2 min. The suspension was filtered using a 0.45 µm membrane.

Stability study using UV-visible spectroscopy

The stability of Au@PFTD-PEG micelles was evaluated by measuring the SPR band, using UV-visible spectroscopy, over time. Samples of Au@PFTD-PEG were diluted in water, NaCl 0,9% and PBS ([Au] = 0,2 mM). 1 mL of Au@PFTD-PEG were directly analysed using UV-visible spectroscopy over time (400–900 nm). Suspensions were stored at room temperature. There was no aggregation observed over 7 days.

TEM observation of gold nanoparticles

Electron microscopy observations were acquired using a Philips CM12 microscope operated at 100 kV. 5 µL samples were deposited on carbon grids and were analysed after overnight drying at room temperature.

Quantification by ICP-MS

50 µL of Au@PFTD-PEG were digested overnight using aqua regia (3 mL HCl + 1 mL HNO₃) and then diluted in water (V_f = 5 mL). The resulting solution was analysed by ICP-MS.

CT-scan experiments

CT-scan was performed *in vitro* with a multimodal PET/CT scanner (Siemens Healthcare) using Au@PFTD-PEG micelles at different concentrations of gold (5, 28 mM) that were previously determined by ICP-MS. Results were compared to Iopamidol ([I] = 5, 28 mM).

In vivo experiments were performed on C57BL/6 mice after intraperitoneal administration of 150 μL Au@PFTD-PEG micelles ($[\text{Au}] = 28 \text{ mM}$).

PFTD-Zr-DOTA assembly and characterization

Assembly of PFTD-DOTA micelles

A suspension of compound II.2 PFTD-PEG (60 mg) and compound III.6 PFTD-DOTA (7 mg) in milliQ water (6 mL) was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 45%) for 10 min leading to a final micelle concentration of 10 mg mL^{-1} . The suspension was finally filtered on a $0.2 \mu\text{m}$ membrane. The hydrodynamic diameter (HD) was evaluated by dynamic light scattering (DLS) which indicated a mean diameter of 13 nm.

Assembly of PFTD-Zr-DOTA micelles

A suspension of compound II.2 PFTD-PEG (60 mg) and PFTD-Zr-DOTA amphiphile (7 mg) in milliQ water (6 mL) was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 45%) for 10 min leading to a final micelle concentration of 10 mg mL^{-1} and the colloid was filtered on a $0.2 \mu\text{m}$ membrane. The hydrodynamic diameter was evaluated by dynamic light scattering which indicated a mean hydrodynamic diameter of 10 nm.

Encapsulation of gold nanoparticles in PFTD-Zr-DOTA micelles

Gold nanoparticles (Au@PFTD in PFMC) were first prepared according to the procedure described previously. 1 mL of a 10 mg mL^{-1} solution of PFTD-Zr-DOTA micelles in water was added to 1 mL of Au@PFDT (in PFMC). The biphasic system was sonicated with an ultrasonic probe (20 min, 300 ms pulse per second, output 45%) and encapsulated gold nanoparticles were filtered on a $0.2 \mu\text{m}$ membrane.

Quantification of oxygen in PFTD-PEG micelles

PFTD-PEG micelles (1 mg mL^{-1}) were air saturated and 25 mL of water was degassed using nitrogen for 25 min. Then 1 mL of micellar suspensions were diluted to monomeric concentrations with degassed water (25 mL, $[\text{micelles}] = 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$). Dissolved oxygen was measured promptly (t_0) using an oxymetric probe (WTW- StirrOx[®] G). This procedure was followed for degassed micelles and for micelles under atmospheric pressure in order to compare results.

Titre : Micelles fluorées et polydiacétyléniques pour la thérapie et le diagnostic.

Mots clés : Nanomédecine, micelles, imagerie médicale, fonctionnalisation, nanoparticules d'or.

Résumé : Ces dernières années, la médecine est un domaine dans lequel les nanotechnologies se sont révélées très prometteuses, en particulier pour les applications de diagnostic et de délivrance de médicaments. Le défi de la nanomédecine consiste à faire passer des molécules actives à travers les différentes barrières biologiques et à atteindre des cibles spécifiques de manière efficace et non toxique. Au laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement à des nanoparticules micellaires. Les micelles sont constituées de molécules amphiphiles constituées de deux régions distinctes ayant des affinités opposées. Elles s'auto-assemblent sous forme de particules colloïdales avec un noyau hydrophobe et une enveloppe hydrophile. Lorsqu'elles sont utilisées comme support aqueux, les micelles peuvent solubiliser efficacement les produits pharmaceutiques dans leur noyau et ainsi améliorer leur activité thérapeutique et/ou diagnostique. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Dans une première partie, nous discuterons de la synthèse de micelles polydiacétyléniques stabilisées. Ces micelles seront utilisées pour la prise en charge d'un composé anti-inflammatoire et la formulation sera validée *in vitro* et *in vivo* pour le traitement de l'athérosclérose.

Les micelles seront également associées à un ligand à des fins de ciblage actif de la plaque. Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons au développement de micelles incorporant un cœur perfluoré pour une application diagnostique. Nous exploiterons ici la capacité des objets micellaires à cibler les tissus tumoraux par effet EPR et l'accumulation des micelles sera visualisée par IRM du fluor-19 *in vivo*. Enfin, dans une dernière partie, des nanoparticules d'or seront encapsulées dans des micelles fluorées et utilisées à des fins d'imagerie par tomographie par émission de positons ciblant les tissus tumoraux. La présence de l'or assure un contraste aux rayons-X et les phases fluorées une solubilisation de dioxygène. Nous souhaiterions pouvoir exploiter cette dernière propriété afin de transporter du dioxygène au niveau des tissus cancéreux (qui sont le plus souvent hypoxiques) et potentialiser ainsi les traitements par radiothérapie en générant des quantités plus importantes d'espèces réactives de l'oxygène cytotoxiques.

Title : Fluorinated and polydiacetylenic micelles for therapy and diagnosis.

Keywords : Nanomedicine, micelles, medical imaging, functionalization, gold nanoparticles.

Abstract : In recent years, medicine is an area in which nanotechnologies have shown great promise, particularly for diagnostic and drug delivery applications. The challenge of nanomedicine is to pass active molecules through the various biological barriers and reach specific targets in an effective and non-toxic way. In the laboratory, we are particularly interested in micellar nanoparticles. Micelles are amphiphilic molecules consisting of two distinct regions with opposite affinities. They self-assemble as colloidal particles with a hydrophobic core and a hydrophilic corona. When used as an aqueous carrier, micelles can effectively solubilize pharmaceuticals in their core and thus enhance their therapeutic and/or diagnostic activity. It is in this context that my thesis work is part of. In a first part, we will discuss the synthesis of stabilized polydiacetylenic micelles. These micelles will be used for the management of an anti-inflammatory compound and the formulation will be validated *in vitro* and *in vivo* for the treatment of atherosclerosis.

The micelles will also be combined with a ligand for active plaque targeting. In a second part, we will focus on the development of micelles incorporating a perfluorinated core for diagnostic application. Here we will exploit the ability of micellar objects to target tumor tissues by EPR effect and the accumulation of micelles will be visualized by fluorine-19 MRI *in vivo*. Finally, in a last part, gold nanoparticles will be encapsulated in fluorinated micelles and used for CT-scan imaging targeting tumor tissues. The presence of gold ensures X-ray contrast and the fluorinated phases provide oxygen solubilization. We would like to exploit the latter property in order to transport oxygen to the cancerous tissues (which are most often hypoxic) and thus potentiate radiotherapy treatments by generating larger quantities of reactive cytotoxic oxygen species..