



HAL
open science

Stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement de la maladie de Wilson

Laura Gauthier

► **To cite this version:**

Laura Gauthier. Stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement de la maladie de Wilson. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV060 . tel-03510236

HAL Id: tel-03510236

<https://theses.hal.science/tel-03510236>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie organique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laura GAUTHIER

Thèse dirigée par **Christelle GATEAU** et co-encadrée par
Isabelle TEXIER-NOGUES

préparée au sein du **Laboratoire SYstèmes Moléculaires et
nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé** et le **Département
Technologies pour la Biologie et la Santé**
dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**.

Stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement de la maladie de Wilson

Thèse soutenue publiquement le **15 Novembre 2019** devant le jury
composé de :

Pr. Françoise CHUBURU

Professeur à l'Université de Reims, Rapporteur

Dr. Christine CONTINO-PEPIN

Maitre de conférences à l'Université d'Avignon, Rapporteur

Dr. Jean-Luc COLL (président du jury)

Directeur de recherche à l'IAB, UGA-CNRS-INSERM Grenoble, Examineur

Dr. Aurélia POUJOIS

Médecin neurologue à l'Hôpital Lariboisière Paris, Examineur

Pr. Olivier RENAUDET

Professeur à l'Université Grenoble Alpes, Examineur

Dr. Christelle GATEAU

Ingénieur de recherche au CEA Grenoble, Directrice de thèse, membre invité

Dr. Isabelle TEXIER-NOGUES

Ingénieur de recherche au CEA-Grenoble, Co-encadrante de thèse, membre invité



Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier la région Auvergne-Rhône-Alpes ainsi que le labex ARCANE d'avoir financé ma thèse et ainsi permis qu'elle se déroule dans de si bonnes conditions. Les évènements organisés par le labex ont été très enrichissants, autant pour l'esprit de cohésion qu'elles ont su créer entre les doctorants, que pour toutes les opportunités offertes au travers des journées ou de la fête de la science.

Je remercie **Frédéric Chandezon** de m'avoir intégrée au sein du laboratoire Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES). Merci à **Séverine Vignoud** de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire Chimie Capteurs et Biomatériaux (L2CB).

Un grand merci à ma directrice de thèse **Christelle Gateau** du SyMMES pour m'avoir suivie, épaulée et encouragée tout au long de ces 3 années de thèse. Merci pour ta patience et ton engagement. Tu m'as appris une certaine forme de patience (et on partait de loin), la rigueur et tu m'as fourni des outils afin de mieux exprimer mes idées, donc un grand merci à toi. Je n'aurai pas pu rêver mieux pour m'accompagner pendant cette aventure. Un grand merci à ma co-directrice de thèse **Isabelle Texier-Nogues** du L2CB, pour ton investissement pendant ces années. Merci de m'avoir conseillée, de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'exprimer mes opinions. Vous êtes parfaitement complémentaires avec Christelle, mon encadrement s'est donc passé de la meilleure des façons.

Je remercie **Annabelle Gèze** et **Olivier Renaudet** d'avoir accepté d'être les membres de mon Comité de Suivi de Individuel (CSI) et d'avoir suivi mes travaux au cours de ces 3 années. Merci pour tous vos conseils et votre investissement.

Je remercie **Christine Contino-Pepin** et **Françoise Chuburu** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à **Aurélia Poujois**, **Jean-Luc Coll** et **Olivier Renaudet** d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Merci à toutes les personnes qui ont collaboré sur ce projet. Tout d'abord au LCBM, merci **Aurélien Deniaud** et **Mireille Chevallet** pour leur travail titanesque sur les études cellulaires. Merci également à **Peggy Chabonnier** pour m'avoir formée à la culture. Merci à vous trois pour toute votre implication et pour toute votre aide. Merci également à **Véronique Collin-Faure** pour toute ton aide au FACS. Au SyMMES, merci tout particulièrement à **Colette Lebrun**, j'ai été tellement chanceuse de pouvoir travailler avec toi, merci pour toute ton aide. Merci également à **Jacques Pécaut** qui a repris la relève de Colette, à **Christine St-Pierre** et à **Pierre-Alain Bayle** pour son aide et ses conseils en RMN. A BIG,

merci à **Corinne Deniaud** et **Franck Fieschi** pour tout le travail de SPR. Merci de m'avoir permis de découvrir toute cette chimie qui m'était encore inconnue.

Je souhaite ensuite remercier l'ensemble des équipes CIBEST et L2CB. Grâce à vous, j'ai vécu des moments inoubliables, merci pour tout votre soutien, votre passion, votre investissement et pour toute la convivialité dont vous avez su faire preuve. Merci de m'avoir permis d'expérimenter de nouvelles choses (on se souviendra du bleu de méthylène ou encore de l'avocat) et d'avoir toujours été aussi chaleureux et aussi bienveillants. Très brièvement (et parce que vous savez que je vous aime tous), merci **Pascale Delangle** pour tous tes conseils et tes petits excès de folie (je ne dirai rien promis). Merci **Morgane Revol**, sans toi la thèse, ça ne serait pas pareil, merci pour ces fous rires ! Merci également à **Sylvain Caillat**, qu'est-ce qu'on ferait sans toi ? Merci pour toutes ces blagues et toutes ces astuces. Merci à tous les copains ! Ceux qui sont partis, **Eline**, **Michael**, vous avez apporté énormément au laboratoire, merci pour toute votre aide. Ceux qui sont partis en même temps que moi, **Giovanna** pitié ne change pas, tu es une telle boule d'énergie, c'était un bonheur de se voir tous les jours. **Bertrand**, **Xavier** (bon a demi parti), **Sarah**, **Leslie**, merci pour tous ces moments formidables ! Parti en même temps que moi et avec qui j'ai passé ces trois années, merci **Jérémy** de m'avoir supportée, aidée, encouragée. Merci **Fanny**, **Antonia**, courage, la thèse ça passe plus vite que prévu. Merci pour tout votre soutien et toutes ces aventures passées ensemble ! Merci **David** pour ta patience devenue légendaire, et désolée d'avoir squatté ton bureau si souvent. Merci également à **Marie Carrière**, **Jean-Luc Ravanat** et **Thierry Douki** pour vos conseils et votre bienveillance. A **Sarah**, **Charly** et **Rachel**, merci pour tout. Vous avez toujours su répondre à toutes mes questions, merci infiniment pour votre aide. Merci à **Marie Escude**, je ne sais pas ce que je serai devenue sans toi ! Toujours là pour répondre à mes questions, autant scientifiques qu'existentielles. Merci pour tout, nos discussions vont vraiment me manquer. Egalement un grand merci à **Véro**, **Dorothee**, **Dom**, **Fanny**, **Emilie** et **Antoine** ainsi que **Raph** et **Mathilde**, toujours là pour me soutenir après des heures passées sur l'UPLC.

Enfin, pour tout leur soutien et pour m'avoir toujours poussée à faire des études, je souhaite remercier avec tout mon cœur **mes parents** et **ma tante**. Sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci également à **Thibault**, pour toute ton aide et tes conseils (et aussi de me supporter au quotidien). Merci enfin aux copines, pour tout le soutien moral. Qui aurait cru que j'en arriverai là hein **Marine**, **Sarah** ? Merci pour tout les morues, ces années étudiantes ont été fantastiques

TABLE DES MATIERES

CH I. INTRODUCTION

17

CUIVRE & MALADIE DE WILSON.....	17
1. BIOLOGIE DU CUIVRE.....	17
1.1 Le cuivre	17
1.2 Homéostasie du cuivre	18
1.2.1. Foie.....	18
1.2.2. Cerveau	20
2. MALADIE DE WILSON.....	22
2.1 Définition et épidémiologie	22
2.2 Génétique.....	22
2.3 Pathogénèse.....	23
2.3.1. Foie.....	24
2.3.2. Cerveau	24
2.4 Diagnostic et symptômes.....	25
2.4.1. Signes physiques et présentation clinique.....	26
2.4.2. Diagnostic Génétique.....	30
2.4.3. Paramètres biologiques	31
2.4.4. Mise en place du diagnostic.....	31
3. TRAITEMENTS	32
3.1 Chélateurs actuellement utilisés	33
3.1.1. D-penicillamine.....	34
3.1.2. Trientine	35
3.2 Sels de zinc	36
3.3 Récents développements.....	37
3.3.1. Tétrathiomolybdate d'ammonium (TTM)	37
3.3.2. DPM-1001.....	38
3.3.3. Autres traitements d'intérêt en développement.....	39
4. TRAVAUX ANTERIEURS EFFECTUES AU LABORATOIRE SYMMES	39
4.1 Du vivant aux chélateurs de cuivre efficaces et sélectifs	40
4.1.1. S'inspirer du vivant	40
4.1.1. Chélateurs cyclodécapeptides.....	41
4.1.2. Chélateur NTA(CysNH ₂) ₃	42
4.2 Vectorisation de chélateurs vers les hépatocytes.....	43
4.2.1. ASGPR cible de choix pour la vectorisation vers les cellules hépatiques	43
4.2.2. Conception des pro-drogues à base de cyclodécapeptide (Chel1) et de NTA (Chel2 à Chel6)	47
4.2.3. Internalisation dans les cellules hépatiques et chélation du cuivre	49
NANOMEDECINE & NANOPARTICULES	52
1. INTRODUCTION.....	52
2. LES NANOPARTICULES UTILISEES EN NANOMEDECINE	54
2.1 Nanoparticules inorganiques	55
2.1.1. Nanoparticules d'or	55
2.1.2. Quantum Dots	56
2.2 Nanoparticules organiques	57
2.2.1. Nanoparticules polymériques	57
2.2.2. Dendrimères.....	59
2.3 Nanoparticules lipidiques	60

2.3.1.	Les Liposomes.....	61
2.3.2.	Nanoparticules Lipidiques Solides (SLN).....	64
2.3.3.	Nanocapsules lipidiques.....	67
2.3.4.	Transporteurs lipidiques nanostructurés.....	70
2.3.5.	Résumé.....	74
3.	TRAVAUX ANTERIEURS AU LABORATOIRE DTBS SUR LES NLC	75
3.1	Composition, formulation & structure	75
3.2	Encapsulation	77
3.3	Biodistribution.....	78
3.4	Toxicité.....	79
3.5	Fonctionnalisation	80
3.5.1.	Fonctionnalisation par un anti-gène.....	80
3.5.2.	Fonctionnalisation par un peptide cyclique (cRGD)	81
	OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	83

CH II. FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES LIPIDIQUES PAR DES MOTIFS GALNAC POUR LA DELIVRANCE VERS LE FOIE **84**

FONCTIONNALISATION PAR DES MOTIFS GALNAC ET QUANTIFICATION **84**

1.	OBJECTIFS ET DEMARCHE	84
2.	FORMULATION DES NLC FONCTIONNALISEES PAR DES GALNAC	85
2.1	Stratégie.....	85
2.2	Synthèse du surfactant SA-PEG ₁₀₀ fonctionnalisé par un GalNAc.....	87
2.2.1.	Synthèse du SA-PEG ₁₀₀ -maleimide	89
2.2.2.	Synthèse du GalNAc-SSPy 6	89
2.2.3.	Couplage.....	91
2.3	NLC - Formulation et caractérisation.....	92
2.3.1.	Formulation.....	93
2.3.2.	Caractérisation des NLC	94
3.	QUANTIFICATION DES MOTIFS GALNAC A LA SURFACE DES NLC.....	97
3.1	Optimisation de la méthode de séparation	97
3.1.1.	Appareillage et méthodes.....	98
3.1.2.	Analyse de chaque constituant	99
3.2	Calibration des surfactants PEGylés	102
3.2.1.	SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc 10	102
3.2.2.	Myrj TM S40	103
3.2.3.	Destruction des nanoparticules	104
3.2.4.	Analyse du surnageant.....	105
3.2.5.	Analyse des précipités	106
3.3	Quantification des surfactants PEGylés	107
3.4	Densité de surface en ligand GalNAc.....	108
4.	CONCLUSION	109

EVALUATION DE L'INTERACTION DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES AVEC DES CELLULES HEPATIQUES..... **111**

1.	OBJECTIFS ET DEMARCHE	111
2.	ETUDE DE L'EFFICACITE D'INTERNALISATION PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	111
2.1	Cytométrie en flux	112
2.1.1.	Principe & Appareillage.....	112
2.1.2.	Données collectées & exploitation.....	114
2.1.3.	Analyse des données	115
2.1.4.	Sélection & Réglages.....	115
2.2	Choix du type cellulaire, des nanoparticules et du fluorophore.....	116

2.2.1.	Cellules	116
2.2.2.	Nanoparticules	117
2.2.3.	Fluorophore.....	118
2.3	Mise au point des expériences de cytométrie en flux.....	120
2.3.1.	Expérimentation FACS	120
2.3.2.	Evaluation des résultats.....	121
2.4	Expérience & résultats	122
2.4.1.	Toxicité des nanoparticules.....	122
2.4.2.	Saturation des récepteurs des cellules HepG2	123
2.5	Conclusion	126
3.	EVALUATION DE L'ACCESSIBILITE DES LIGANDS GALNAC A LA SURFACE DES NLC PAR RESONANCE DE PLASMONS DE SURFACE	127
3.1	La résonance de plasmons de surface	127
3.1.1.	Principe	128
3.1.2.	Choix des lectines et établissement des voies	130
3.1.3.	Acquisition des résultats	131
3.2	Mise au point de l'expérience.....	132
3.2.1.	Fonctionnalisation de la surface de dextran	133
3.2.2.	Contrôles des voies.....	133
3.3	Expériences et analyse des résultats.....	135
3.4	Conclusion	138
DISCUSSION GENERALE		139
CONCLUSIONS & PERSPECTIVE.....		147

CH III. CHARGEMENT DE NANOVECTEURS POUR LA DELIVRANCE DE CHELATEURS DE CUIVRE VERS LE FOIE **149**

CHARGEMENT PAR UN DERIVE LIPOPHILE DU CHELATEUR DE CUIVRE ET QUANTIFICATION		149
1.	OBJECTIFS ET DEMARCHE	149
2.	CHARGEMENT DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES PAR UN DERIVE LIPOPHILE DU CHELATEUR DE CUIVRE	151
2.1	Synthèse des dérivés lipophiles.....	151
2.1.1.	Synthèse du chélateur NTA(CysNH ₂) ₃ 12	151
2.1.2.	Synthèse du dérivé lipophile lien disulfure	152
2.1.3.	Dérivé lipophile avec un lien thioester	153
2.2	Formulation de NLC chargées	154
2.2.1.	Formulation.....	154
2.2.2.	Caractérisation	155
3.	QUANTIFICATION DES CHELATEURS LIPOPHILES ENCAPSULE	156
3.1	Appareillage HPLC/UV vis et méthode	156
3.2	Calibration des chélateurs lipophiles.....	157
3.2.1.	NTA(Cys(COC ₈ H ₁₇)NH ₂) ₃ 13	157
3.2.2.	NTA(Cys(SC ₈ H ₁₇)NH ₂) ₃ 15	159
3.3	Quantification.....	161
3.3.1.	Préparation des échantillons.....	161
3.3.2.	Analyse de NLC formulées en présence des chélateurs lipophiles	163
4.	CONCLUSION	167
EVALUATION DE LA CAPACITE DE NANOPARTICULES A DELIVRER UN CHELATEUR DE CUIVRE AU NIVEAU CELLULAIRE		169
1.	OBJECTIF ET DEMARCHE.....	169
2.	EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE	169
2.1	Principe du test MTT.....	170

2.2	Cytotoxicité	170
2.3	Effet protecteur des chélateurs	173
2.3.1.	Viabilité sur cellules C3A	173
2.3.2.	Viabilité sur cellules C8	175
3.	EVALUATION DE L'EXPRESSION DES METALLOTHIONEINES PAR RT-qPCR	176
3.1	Principe de la RT-qPCR	177
3.2	Evaluation de l'expression des métallothionéines par RT-qPCR.....	179
3.2.1.	Expérimentation	180
3.2.2.	Résultats.....	181
3.3	Conclusion	182
DISCUSSION		183
CONCLUSION & PERSPECTIVES		187
CH IV. CONCLUSION GENERALE		189
PARTIE EXPERIMENTALE		193
SYNTHESE ORGANIQUE		193
1.	INFORMATIONS GENERALES	193
2.	SYNTHESE DU SURFACTANT PEGYLE SA-PEG ₁₀₀ -GALNAC 10	194
3.	SYNTHESE DES DERIVES LIPOPHILES	200
FORMULATION DE NANOPARTICULES ET CARACTERISATION		204
1.	GENERAL INFORMATIONS.....	204
2.	FORMULATION	204
3.	QUANTIFICATION DES SURFACTANTS PEGYLES SA-PEG ₁₀₀ -GALNAC 10	205
4.	QUANTIFICATION DU TAUX D'ENCAPSULATION	206
EXPÉRIENCES CELLULAIRES.....		207
RESONNANCE DES PLASMONS DE SURFACE – INTERACTION DES NLC AVEC UNE LECTINE.....		210
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		211
ANNEXES		229

Abréviations

Ac₂O : anhydride acétique

Ac : acétyle

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

Arg : arginine

ASGP : asialoglycoprotéine

ASGPR : récepteur aux asialoglycoprotéines

Asp : aspartate

ATP : adénosine triphosphate

BAL : british anti lewisite

BET : bromure d'éthydiium

BF₃.Et₂O : etherate de trifluorure de bore

BHE : barrière hémato-encéphalique

Bn : benzyle

Boc : tert-butyloxy-carbonyle

BSA : bovine serum albumine

CDP : cyclodécapeptide

Cp : céruloplasmine

Cy5 : sulfo-cyanine 5

Cys : cystéine

CTR : copper transporter

CuEXC : quantité de cuivre échangeable

DBCO : dibenzocyclooctyne

DCC : N,N-dicyclohexylcarbodiimide

DC-SIGN : cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin

DiD : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt

DIPEA : diisopropyléthylamine

DL50 : dose létale médiane

DLS : dynamic light scattering

DMEM : modified eagle's medium

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT : divalent metal transporter

D-Pen : D-pénicillamine

DTBS : Département Technologies et Biologie pour la Santé

CRD : carbohydrate recognition domain

EC50 : concentration efficace médiane

EDCI : 1-ethyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

ELSD : détecteur à diffusion de lumière

Eq. : équivalent

ES-MS : electrospray ionisation mass spectrometry

EPR : enhanced permeability and retention

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FBS : fetal bovin serum

FDA : food and drug administration

FSC : diffusion aux petits angles, forward scatter

Gal : galactose

GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine

Gln : glutamine

His : histidine

LCBM : Laboratoire de Chimie et Biologie des Metaux

LCR : liquide céphalorachidien

LDL : low density lipoprotein

Met : methionine

MGL : macrophage galactose-type lectin

MFI : mean fluorescence intensity
MT : métallothionéines
MTF : metal transcription factor
MW : molecular weight
NHS : N-hydroxysuccinimide
NLC : nanostructured lipid carrier
NMR : nuclear magnetic resonance
NOTA : acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
NP40 : Nonidet P-40 détergent non dénaturant
NTA : acide nitrilotriacétique
PAMAM : polyamidoamine
PBS : phosphate buffered saline
PC : phosphatidylcholine
PCR : polymerase chain reaction
PDI : indice de polydispersité
PE : phosphatidyléthanolamine
PEG : polyéthylène glycol
PGA : poly-(acide glycolique)
PLA : poly-(acide lactique)
PLGA : poly-(lactide-co-glycolide)
PMT : photomultiplicateur
PYS : 2-pyridyl-sulfanyl
PyBOP: benzotriazole-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
QDs : quantum dots
RE : reticulum endoplasmique
REC : relative exchangeable copper
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROS : reactive oxygen species
RP-HPLC: reverse phase high pressure liquid chromatography
RT : reverse transcriptase
SA : acide stéarique
SLN : nanoparticules lipidiques solides
SOD : superoxyde dismutase
SPE : solid phase extraction
SPR : surface plasmon resonance
SPys : 2-pyridyl-sulfanyl
SSC : side scatter (diffusion aux grands angles)
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM : transmission electron microscopy
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TIS : triisopropylsilyle
TLC : thin layer chromatography
TMSOTf : trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
Trt : trityl
TTM : tétrathiomolybdate
Trp : tryptophane
UPLC : ultra high performance liquid chromatography
VIH : virus d'immunodéficience humaine
WD : Wilson diseases

Préambule

La maladie de Wilson est l'une des principales anomalies génétiques du métabolisme du cuivre. Des mutations au niveau du gène codant pour la protéine de transport du cuivre ATP7B se traduisent par une accumulation de ce métal à un niveau toxique dans le foie, et également dans le cerveau. Les symptômes sont multiples allant de l'insuffisance hépatique aux troubles neurologiques. Les traitements actuels, principalement des chélateurs de cuivre, permettent de ralentir l'évolution de cette maladie. Cependant ces molécules sont peu efficaces pour un grand nombre de patients. Ces chélateurs ne sont pas spécifiques du cuivre, doivent être pris à vie en quantité importante et génèrent de nombreux effets secondaires.

Afin de traiter les troubles hépatiques de la maladie de Wilson, il est donc nécessaire de développer des molécules capables de piéger le cuivre en excès de manière spécifique à l'intérieur des cellules du foie.

Dans ce but, un chélateur de cuivre, le NTA(CysNH₂)₃, a été développé au laboratoire SyMMES. Son excellente affinité et sa sélectivité importante pour le cuivre intracellulaire, sous forme cuivreux (Cu(I)), font de cette molécule un chélateur prometteur pour traiter les surcharges en cuivre. Afin de cibler spécifiquement le foie, des unités de ciblage N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) ont été introduites sur ce chélateur via des liens disulfures (pro-drogue Chel2), dans une géométrie adaptée pour la reconnaissance efficace par les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). Ces protéines, exprimées à la surface des cellules hépatiques de manière abondante et quasi-exclusive, reconnaissent préférentiellement les structures multivalentes en GalNAc. La pro-drogue Chel2, ainsi développée, est internalisée de façon efficace et sélective dans les cellules hépatiques via les ASGPR et est capable de piéger le cuivre en excès à l'intérieur de ces cellules. Ce candidat médicament, dont la preuve de concept a été établie chez la souris, a été breveté et est actuellement en cours de transfert vers un industriel.

Afin d'améliorer la biodisponibilité du chélateur de cuivre, de permettre une meilleure accumulation dans les cellules hépatiques ainsi qu'une libération contrôlée de la drogue encapsulée, une stratégie similaire a été envisagée en transposant cette approche moléculaire à des nanoparticules lipidiques.

Depuis plusieurs années, le Département Technologies et Biologie pour la Santé (DTBS) s'intéresse à la conception de transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC), pour des applications médicales variées allant de l'imagerie de fluorescence à la délivrance d'anticancéreux, ainsi qu'au développement de vaccins. Ces nanoparticules présentent plusieurs avantages : grande stabilité, biocompatibilité, haute capacité de chargement. De plus, la possibilité de les fonctionnaliser afin de les vectoriser font de ces NLC des objets pertinents pour assurer la délivrance ciblée de chélateurs de cuivre.

L'objectif de cette thèse est la conception de nouveaux vecteurs lipidiques nanostructurés capables de délivrer de manière efficace et sélective le chélateur de cuivre $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ au niveau du foie.

Pour cela, les NLC ont été dans un premier temps fonctionnalisées par des sucres GalNAc afin de cibler spécifiquement les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). La quantification de la densité de surface en sucre et l'étude de l'internalisation de ces nanoparticules par cytométrie en flux, a permis d'évaluer l'impact des sucres et une meilleure compréhension des phénomènes régissant l'internalisation des NLC dans les cellules hépatiques.

L'encapsulation de pro-chélateurs lipophiles dans le cœur des NLC a également permis d'évaluer la capacité de ces nanoparticules à délivrer le chélateur $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ dans les cellules hépatiques et induire un effet protecteur vis-à-vis de la présence de cuivre en excès.

Ce projet pluridisciplinaire a été financé par la Région Auvergne Rhône-Alpes, le Labex ARCANE (CBH-EUR-GS, ANR-17-EURE-0003), et le CDP "Investissement d'avenir" Glyco@Alps (IDEX-UGA, ANR-15-IDEX-02). Il a été effectué en collaboration avec trois laboratoires aux expertises diverses et complémentaires :

- La coordination du projet et la synthèse des surfactants fonctionnalisés par des unités de ciblage GalNAc ainsi que les versions lipophiles du chélateur $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ ont été effectuées au laboratoire des Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES) sous la supervision de Christelle GATEAU.
- La formulation, la caractérisation et la quantification des NLC ont été réalisées au Département Technologies et Biologie pour la Santé (DTBS) sous la supervision d'Isabelle TEXIER-NOGUES.

- Les études cellulaires d'internalisation des nanoparticules et de chélation du cuivre ont été effectuées au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) sous la supervision d'Aurélien DENIAUD et Mireille CHEVALLET.

De plus, les expériences SPR afin d'évaluer l'interaction de ces NLC fonctionnalisées par des GalNAc et des protéines reconnaissant ce motif de ciblage ont été effectuées en collaboration avec Corinne DENIAUD et Franck FIESCHI à l'Institut de Biologie Structurale (IBS). Ces travaux ont également été évalués lors de 2 comités de suivi de thèse par Annabelle GEZE (DPM) et Olivier RENAUDET (DCM).

Ch I.Introduction

Cuivre & Maladie de Wilson

En 1912, Samuel Alexander Kinnier Wilson publie pour la première fois dans **Brain** un article dans lequel il décrit une « dégénérescence lenticulaire progressive ». ¹ Ses recherches portent alors sur l'étude d'une maladie nerveuse familiale associée à une cirrhose du foie. Avec seulement 4 patients dans cette publication originale, Wilson décrit la majorité des symptômes connus aujourd'hui et caractéristiques de la maladie de Wilson (Wilson's Disease, WD). Les 30 années suivantes ont quant à elles permis une meilleure compréhension de la maladie, une plus grande efficacité de diagnostic et le développement de nouveaux traitements.

Le cuivre, au cœur de la maladie de Wilson, s'accumule à un niveau toxique dans le foie et dans le cerveau. Il est à l'origine des symptômes hépatiques et neurologiques. Afin d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans la maladie de Wilson, il est dans un premier temps nécessaire de connaître la chimie du cuivre ainsi que les mécanismes impliqués dans son homéostasie.

1. Biologie du cuivre

1.1 Le cuivre

Le cuivre est un élément essentiel à tous les organismes. Souvent impliqué en tant que cofacteur, il est nécessaire au fonctionnement de plus de 30 protéines telles que la céruloplasmine (Cp) ou la superoxyde dismutase cytosolique (SOD1). Il participe à d'importants processus cellulaires notamment le métabolisme énergétique, la défense contre le stress oxydant ou encore le métabolisme du fer. Le cuivre est le 3^{ème} métal de transition le plus abondant dans le corps humain, précédé par le zinc et le fer. ² De configuration $[Ar] 3d^{10} 4s^1$, il est présent sous deux états d'oxydation : l'ion cuivrique Cu(II) et l'ion cuivreux Cu(I). Ces différents états d'oxydation lui confèrent des propriétés oxydo-réductrices, à l'origine de son activité catalytique.

A cause de son activité redox, le cuivre peut être toxique pour les cellules. Il participe aux réactions de type Fenton entraînant la formation du radical hydroxyle OH^\bullet , une espèce réactive de l'oxygène (ROS) (Figure 1). Ce radical extrêmement réactif peut réagir avec les biomolécules environnantes et peut notamment entraîner des mutations ou des cassures de l'ADN ou des peroxydations des membranes lipidiques. ^{3,4}

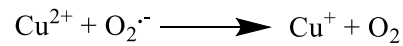
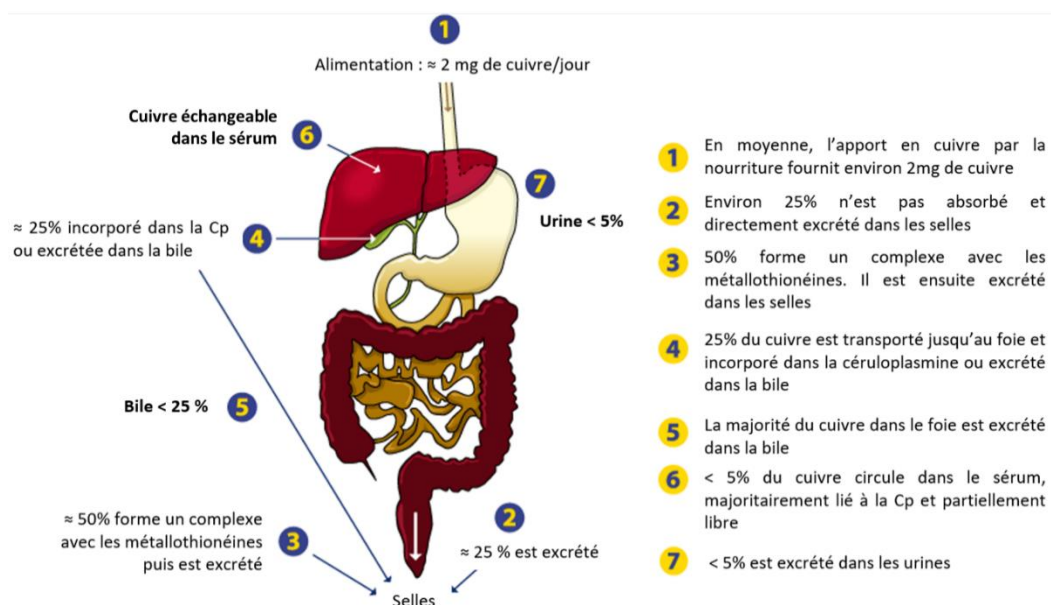


Figure 1 : Réaction de Fenton

Afin de maintenir l'homéostasie du cuivre, les cellules ont développé des mécanismes de régulation. Ils permettent de maintenir une concentration en cuivre appropriée au bon fonctionnement de l'organisme tout en évitant la présence d'ions cuivre libres en excès.

1.2 Homéostasie du cuivre

Essentiellement apporté par l'alimentation, l'estomac absorbe chaque jour entre 1,5 et 2,5 mg de cuivre.⁵ Il est ensuite lié sous sa forme Cu(II) à des protéines, des peptides ou des acides aminés tels que l'albumine, dans des domaines contenant des histidines. Il est ensuite acheminé jusqu'au foie où il sera redistribué dans tout l'organisme *via* la circulation sanguine. L'excès de cuivre est quant à lui excrété majoritairement dans les canalicules biliaires (Figure 2).

Figure 2 : Apports et excrétion du cuivre chez un sujet sain.⁶

1.2.1. Foie

Au niveau des cellules du foie (hépatocytes), le Cu(II) est dans un premier temps converti en Cu(I) par une oxydo-réductase membranaire. L'entrée du cuivre dans les hépatocytes s'effectue ensuite via le

« copper transporter 1 » (CTR1). A l'intérieur de la cellule, le cuivre n'est jamais sous sa forme libre mais toujours lié à des protéines (chaperonnes, métallothionéines) ou peptides tel que le glutathion. Les chaperonnes à cuivre ont une haute affinité pour le cuivre et le transportent jusqu'à une protéine cible (Figure 3).

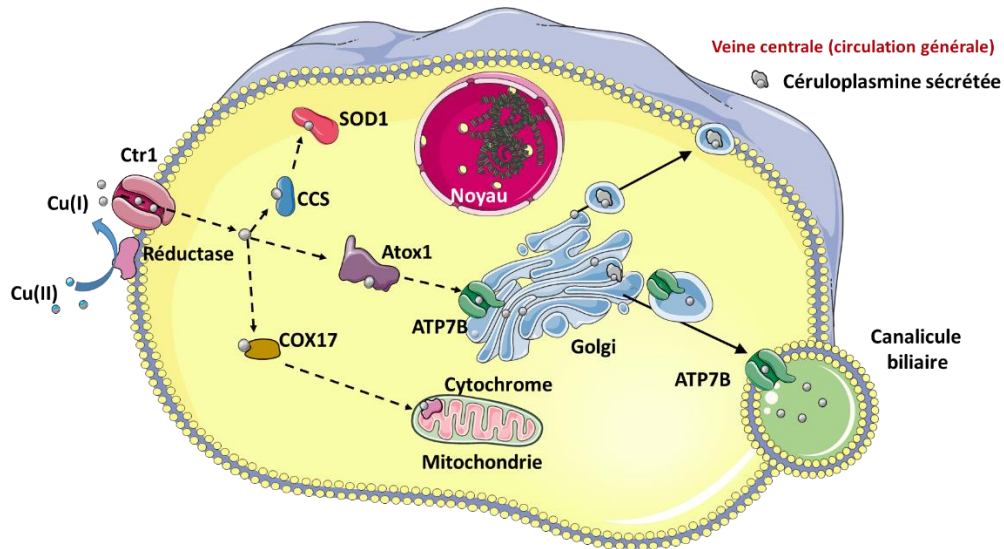


Figure 3 : Homéostasie du cuivre au sein de la cellule hépatique.⁷

Trois protéines chaperonnes assurent la distribution du cuivre : CCS1, Cox17 et Atox1. CCS1 délivre le cuivre à la superoxyde dismutase cytosolique (SOD1).⁸ Cox17 permet la formation d'un pool de cuivre dans la matrice mitochondriale essentiel pour la maturation de la cytochrome c oxydase.⁹ Enfin, Atox1 délivre le cuivre à l'ATP7B (protéine de Wilson).¹⁰ Cette protéine, localisée dans la membrane de l'appareil de Golgi, est une ATPase de type P. Elle transporte le cuivre à travers les membranes cellulaires grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP. En condition basale, la protéine ATP7B transporte le cuivre à l'intérieur de l'appareil de Golgi où celui-ci sera incorporé à des protéines telles que la céruloplasmine (Cp). En cas d'excès de cuivre dans les hépatocytes, la protéine ATP7B migre de l'appareil de Golgi vers les canalicules biliaires *via* des vésicules lysosomales.¹¹ Le cuivre en excès est ainsi éliminé de l'organisme via les canalicules biliaires (Figure 3).

La céruloplasmine (Cp) est une ferroxidase qui participe au transport du cuivre. Cette molécule peut contenir entre 6 et 8 atomes de cuivre et contient ainsi près de 95% du cuivre présent dans le plasma. Majoritairement synthétisée dans le foie, la céruloplasmine n'a pas besoin de cuivre pour être synthétisée. L'absence du métal rend cependant la protéine instable avec un temps de demi-vie très court.¹² La céruloplasmine assure le lien entre le métabolisme du cuivre et celui du fer et catalyse l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) couplée à la réduction d'O₂ en H₂O. En effet, le fer amené par l'alimentation est sous la forme Fe²⁺ et la transferrine transporte le fer dans le sérum sous la forme

Fe³⁺. La céruloplasmine contrôle donc l'oxydation du fer afin que celui-ci puisse être incorporé dans la transferrine. Un déficit en cuivre réduit son activité de ferroxidase et la conversion du Fe²⁺ en Fe³⁺ est alors diminuée pouvant générer la production de ROS.

Dans des conditions physiologiques, la concentration en cuivre libre dans la cellule est maintenue à environ 10⁻¹⁸ M, représentant moins d'un atome de cuivre libre par cellule.⁸ En cas d'excès, le cuivre peut être piégé par les métallothionéines (MTs). Ces protéines riches en cystéines et présentes dans tous les types cellulaires, lient des métaux physiologiques tels que le zinc et le cuivre ainsi que des métaux toxiques comme le cadmium ou le mercure. Les MTs participent ainsi à la détoxification. L'expression des gènes codant pour les MTs est régulée par divers mécanismes et notamment par la concentration intracellulaire en ions métalliques. En présence d'un excès de cuivre, elles forment des clusters stables pouvant contenir jusqu'à 12 ions métalliques en libérant des ions Zn(II) faiblement liés. Ces derniers se lient alors au facteur de transcription MTF1 (Metal transcription factor-1) pour induire, entre autres, l'expression des MTs. Ces protéines ont donc un rôle de séquestration du cuivre et de protection contre le stress métallique.¹³

1.2.2. Cerveau

Le cuivre est indispensable au développement et au fonctionnement du cerveau. Il est nécessaire comme cofacteur pour de nombreuses enzymes impliquées dans des processus vitaux du système nerveux central comme la respiration, la synthèse de neurotransmetteurs, la protection des dommages oxydatifs... La proportion en cuivre dans le cerveau humain adulte est estimée à 7-10% de la quantité totale dans l'organisme, semblable à celle du foie. La quantité de cuivre diffère selon les régions et reflète les différents besoins métaboliques.^{14,15} A titre d'exemple, l'apport en cuivre dans l'hippocampe (95,0 ± 23,4 µL/sec/g) est significativement plus élevé que dans le cervelet (43,4 ± 8,1 µL/sec/g) selon une étude de Choi *et al.*¹⁶

Les mécanismes de transport du cuivre n'ont pas encore été totalement élucidés. Néanmoins l'échange du cuivre entre la périphérie et le cerveau est fortement régulé par les barrières cérébrales. Le cuivre libre, non lié aux protéines comme l'albumine ou à la céruloplasmine, est l'espèce du cuivre prédominante qui traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière sang-LCR (liquide céphalorachidien).¹⁶ De plus, le taux de cuivre plus important dans le parenchyme cérébral par rapport au liquide céphalorachidien (LCR) retrouvé après perfusion cérébrale chez le rat, suggère que la BHE est la principale voie d'entrée du cuivre dans le cerveau.¹⁶ Cette barrière composée de cellules endothéliales séparées par des jonctions serrées, des péricytes, des cellules musculaires lisses, et les

pieds astrocytaires, tapisse les parois des vaisseaux sanguins et régule finement les échanges sang-cerveau (Figure 4).¹⁷

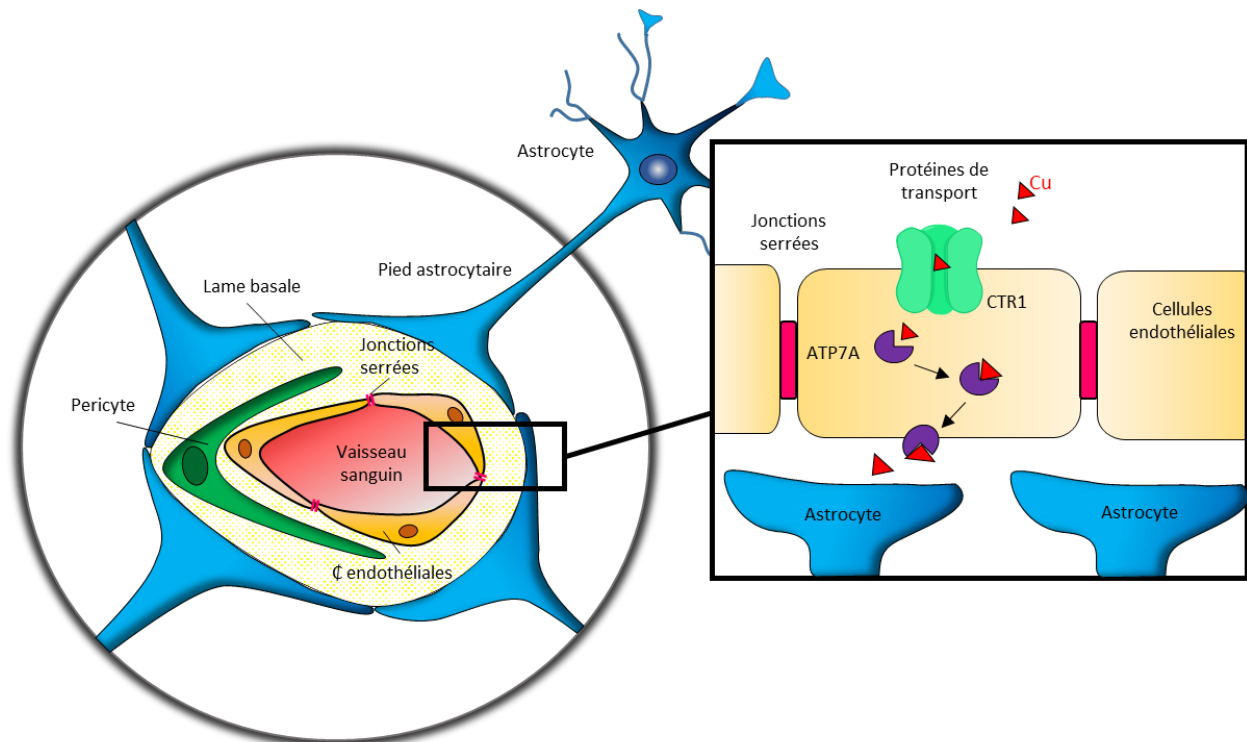


Figure 4 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) - Transport du cuivre à l'intérieur du cerveau.

L'entrée du cuivre dans le cerveau est régulée par plusieurs transporteurs, principalement CTR1, DMT1, ATP7A et ATP7B exprimés au niveau de la BHE et des plexus choroïdes,¹⁸ et également présents au niveau du foie. CTR1, exprimé à la surface de la BHE et des plexus choroïdes, participe, comme dans les hépatocytes, à l'entrée du cuivre. Une étude de Lee *et al* a en effet montré une diminution de 50 % de la quantité de cuivre dans le cerveau sur des souris KO pour le gène *Ctr1*.¹⁹ DMT1 (Divalent metal transporter) est, comme son nom l'indique, une protéine qui transporte les métaux divalents : Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , et Cu^{2+} et pourrait être également impliqué dans le transport du cuivre à l'intérieur du cerveau.¹⁶ L'ATP7A et l'ATP7B ont une double fonction : celle d'approvisionnement et d'élimination du cuivre. L'ATP7A est omniprésente dans le cerveau notamment au niveau de la BHE et des plexus choroïdes.²⁰ Elle semble également jouer un rôle clé dans la distribution du cuivre des astrocytes aux neurones.²¹ L'ATP7B est également exprimée dans le cerveau mais son rôle dans l'homéostasie du cuivre reste mal compris. Il a été proposé que l'ATP7B joue un rôle de médiateur pour la synthèse d'enzymes dépendantes du cuivre.²¹

2. Maladie de Wilson

2.1 Définition et épidémiologie

La maladie de Wilson est l'une des principales anomalies génétiques du métabolisme du cuivre chez l'Homme. Elle est provoquée par des mutations du gène *atp7b* codant pour la protéine du même nom. Comme décrit précédemment (Cf Ch I.1.2.1), cette protéine est en charge de la distribution et de l'excrétion du cuivre. Comme elle ne remplit plus correctement ses fonctions, une surcharge en cuivre apparaît alors principalement au niveau du foie et du cerveau. Les malades développent alors deux types de syndromes principaux : hépatiques (cirrhoses, hépatites) et neurologiques (dysarthrie, dystonie, syndromes dépressifs). Les symptômes hépatiques apparaissent généralement chez l'enfant vers l'âge de 4-5 ans alors que les symptômes neurologiques sont généralement plus tardifs et apparaissent vers l'âge de 20-25 ans. Les signes cliniques de la maladie ne sont pas visibles plus tôt car l'accumulation toxique de cuivre dans le foie ou le cerveau prend plusieurs années.

Les estimations mondiales concernant le nombre de personnes touchées par la maladie ne cessent d'être revues à la hausse. En 1968, date de la première estimation mondiale, la prévalence de la maladie de Wilson était de 5 naissances sur 1 million.²² En 1981, cette valeur a atteint les 33/million.²³ Aujourd'hui, on estime que la fréquence est de 142 naissances sur 1 million.²⁴ En France, une première étude épidémiologique menée par F. Woimant en 2016 avait permis de recenser 906 cas de patients atteints de la maladie de Wilson, soit une prévalence de 14/million.²⁵ Pendant de nombreuses années et encore maintenant, les études épidémiologiques sous-estiment le nombre de personnes atteintes par la maladie de Wilson car il ne prend pas en compte les patients pour lesquelles le diagnostic n'a pas été établi et ceux n'ayant que peu ou pas de symptômes. Un perfectionnement des méthodes de diagnostic et du dépistage de cette maladie permet, au fil du temps, d'améliorer ce recensement.

2.2 Génétique

Dans le cadre de la maladie de Wilson, les mutations génétiques concernent le gène *atp7b* codant pour la protéine ATP7B. C'est aujourd'hui le seul gène connu impliqué dans la maladie. On ne parle d'ailleurs pas de "la" mutation mais "des" mutations, environ 600 ayant été identifiées à ce jour.²⁶

La maladie de Wilson est dite "autosomique récessive". "Autosomique" signifie que le gène muté, à l'origine de la maladie, n'est pas porté par un chromosome sexuel. La maladie touche donc équitablement les femmes et les Hommes. Ensuite, elle est dite "récessive" car il est nécessaire que

les 2 allèles du gène soient mutés pour que la maladie se manifeste. Dans le cas où les deux parents portent l'allèle muté sur un seul chromosome, seuls les enfants ayant reçu le gène muté des deux parents sont malades. La probabilité d'avoir un enfant atteint de la maladie est de 1 chance sur 4 pour chaque grossesse (Figure 5). De plus, la majorité des personnes atteintes de la WD sont hétérozygotes composites, c'est-à-dire qu'elles possèdent 2 allèles mutés différents.

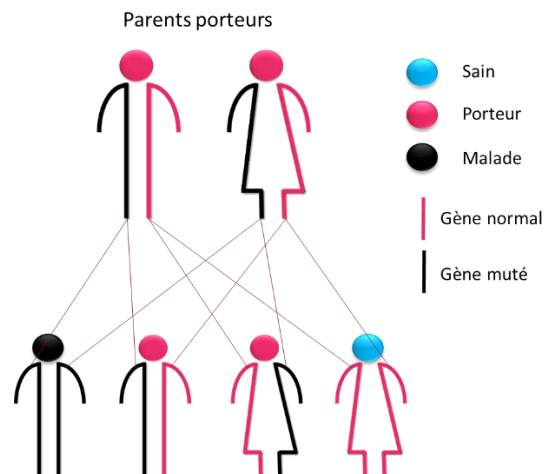


Figure 5 : Schéma de la transmission de la mutation du gène ATP7B de la maladie de Wilson.

La maladie étant héréditaire, les populations isolées où le taux de consanguinité est plus élevé sont plus touchées par ce type de maladie. La maladie de Wilson a par exemple été diagnostiquée dans un village crétois proche de Héraklion à 6 naissances sur 90 sur une période de 25 ans. Une étude sur 200 habitants de familles différentes a révélé une fréquence de mutation de 1/11.²⁷

2.3 Pathogénèse

La maladie de Wilson est due à des mutations du gène codant pour l'ATPase de type P, ATP7B. Ces mutations entraînent le dysfonctionnement de ce transporteur et donc des défauts dans l'homéostasie du cuivre au niveau du foie et du cerveau (Figure 6).²⁸

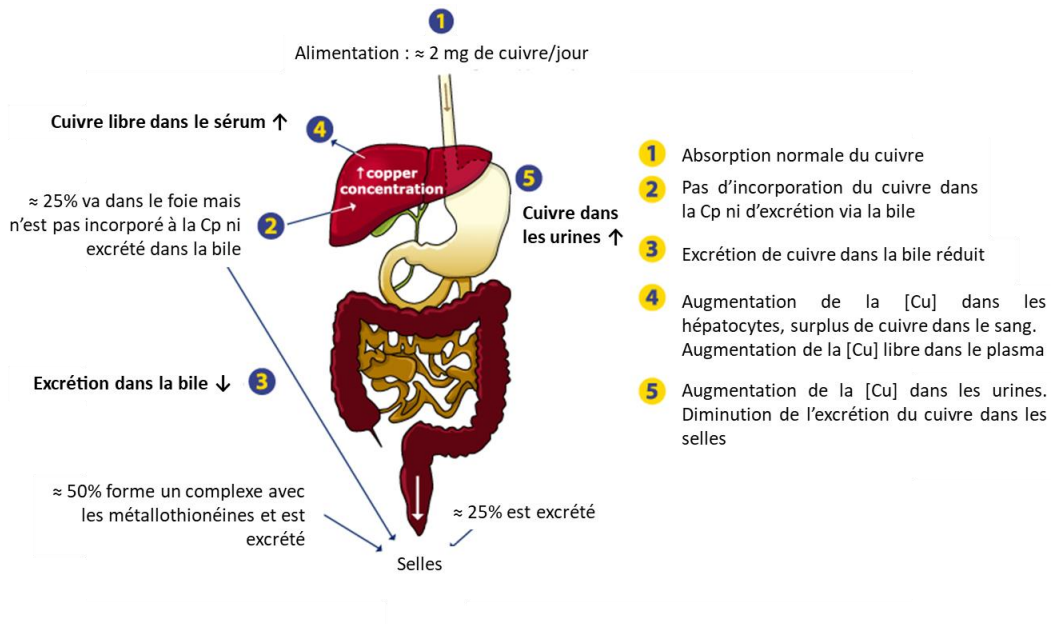


Figure 6 : Elimination réduite et accumulation du cuivre dans la maladie de Wilson.⁶

2.3.1. Foie

Les mutations de la protéine ATP7B sont diverses et ont différents effets fonctionnels (inactivation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP, inhibition de l'activité de transport du cuivre, impact sur son repliement, sa localisation intracellulaire et/ou son trafic intracellulaire en réponse à un stress cuivre).²⁹ Néanmoins, l'excrétion du cuivre via les canalicules biliaires étant le seul mécanisme permettant son élimination, les concentrations hépatiques en cuivre chez les patients WD atteignent des niveaux supérieurs à la normale avec $250 \mu\text{g/g}$ contre $15-55 \mu\text{g/g}$ chez une personne saine (matière sèche).³⁰ A l'inverse, des dysfonctions au niveau du chargement en cuivre de la céruloplasmine (Cp) occasionnent la sécrétion de la protéine sous sa forme apo (sans cuivre). Il a été découvert en 1952 que les patients atteints de la WD possédaient cette protéine seulement en très faible quantité.^{31,32} Chez une personne saine, la Cp contient 95% du cuivre présent dans le plasma³³, il y a donc généralement chez les patients atteints de la WD une concentration plasmatique en cuivre réduite (ou à défaut une forte concentration en cuivre labile).

2.3.2. Cerveau

Dans le cas de la maladie de Wilson, des quantités en cuivre pouvant atteindre jusqu'à $450 \mu\text{g/g}$ contre $7-60 \mu\text{g/g}$ pour les sujets sains ont été observées dans le cerveau.³⁴ Le cuivre en excès participe alors à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont endommager les biomolécules environnantes, les barrières et les neurones. Il existe un lien direct entre la quantité de cuivre accumulé

dans le cerveau et les dommages que celui-ci a subi.³⁵ Les mutations de l'*atp7b* induisent une accumulation non homogène du cuivre dans le cerveau. Certaines régions accumulent plus de cuivre et y sont plus sensibles. C'est le cas par exemple de la substance noire, des ganglions de la base, du putamen et du globus pallidus.³⁶ Il faut noter que toutes ces régions sont connues pour leur implication dans le contrôle des mouvements. Le putamen est généralement la région la plus sévèrement affectée par le stress oxydant généré par le cuivre (Figure 7). Des dystonies observées chez des patients wilsoniens ont été corrélées avec des nécroses dans le putamen dues à une forte accumulation de cuivre.³⁷

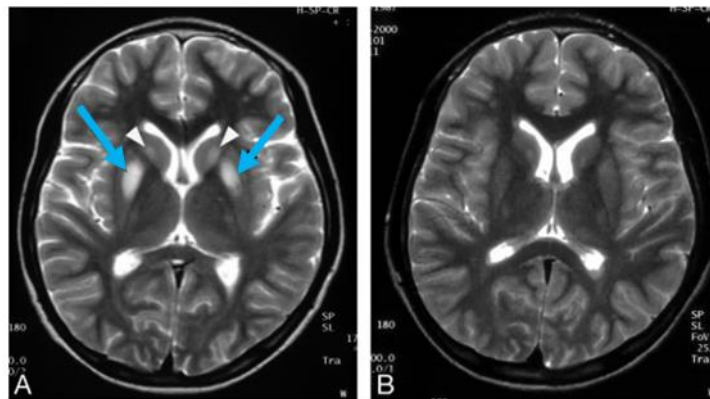


Figure 7 : Exemple de lésions réversibles du putamen chez une patiente de 14 ans: A, IRM montrant un signal plus intense dans le noyau (Δ) et putamen (\blacktriangledown). B, IRM après 3 ans de traitement montrant une rémission totale des lésions. Les symptômes neurologiques du patient ont également été améliorés.³⁸

2.4 Diagnostic et symptômes

Comme le cuivre s'accumule dans plusieurs organes, les symptômes cliniques sont nombreux, de l'insuffisance hépatique aiguë à des manifestations neuropsychiatriques, et certains sont peu spécifiques. Le diagnostic d'un cas de Wilson est donc difficile et établi généralement entre l'âge de 11 et 20 ans (Figure 8). Si les symptômes hépatiques sont la première manifestation de la maladie, il s'écoule en moyenne un délai de 6 mois avant le diagnostic d'un Wilson. Si ce sont les symptômes neurologiques, le diagnostic prend environ 1,5 ans et le délai moyen est de 2,5 ans si les premiers symptômes sont psychiatriques.³⁹

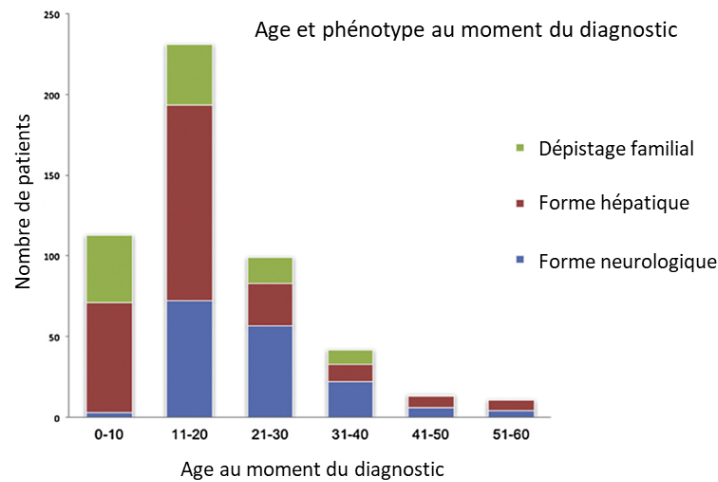


Figure 8 : Age et phénotype des patients au moment du diagnostic de la maladie de Wilson – 604 patients.⁴⁰

Pour établir ce diagnostic, plusieurs paramètres doivent être pris en compte : symptômes cliniques, génétique, mesure de la céruloplasmine, quantification du cuivre.

2.4.1. Signes physiques et présentation clinique

2.4.1.(a) Symptômes hépatiques (42%)

Les symptômes hépatiques sont souvent la première manifestation clinique de la maladie de Wilson (40% - 60%)⁴¹ et se manifestent principalement sous la forme de stéatoses, fibroses et cirroses qu'il est possible de détecter par une biopsie du foie. En effet, le cuivre accumulé dans les hépatocytes peut être détecté par marquage histochimique à la rhodanine (Figure 9).⁴²

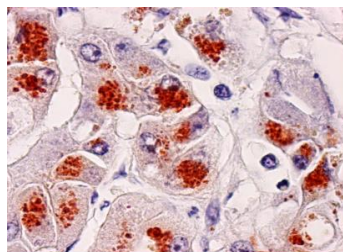


Figure 9 : Coloration à la rhodanine de dépôts de cuivre.⁴³

Stéatoses du foie :

La stéatose hépatique est une accumulation de lipides dans le foie formant des "gouttelettes" (Figure 10). Elle est considérée comme l'une des présentations les plus communes de la maladie de Wilson et touche environ 50% des personnes atteintes de cette maladie.⁴⁴

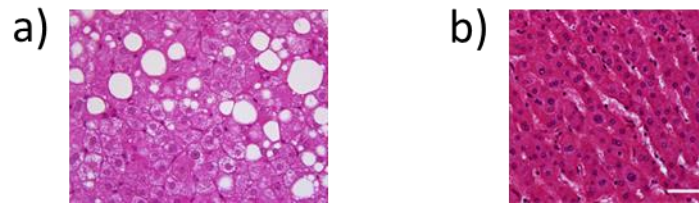


Figure 10 : Coupe histologique de foie a- présentant des stéatoses non alcoolique b- sain.

Fibrose et cirrhose

Les inflammations dues à la toxicité du cuivre génèrent un tissu cicatriciel qui remplace les cellules du foie endommagées. On parle alors de fibrose hépatique. Il existe plusieurs stades de fibrose, allant du stade 1 (fibrose légère) au stade 3 (fibrose sévère). Lorsqu'elle atteint le stade 4, on utilise le terme de cirrhose pour désigner la quantité excessive de tissu cicatriciel sur l'ensemble du foie (Figure 11).⁴⁴

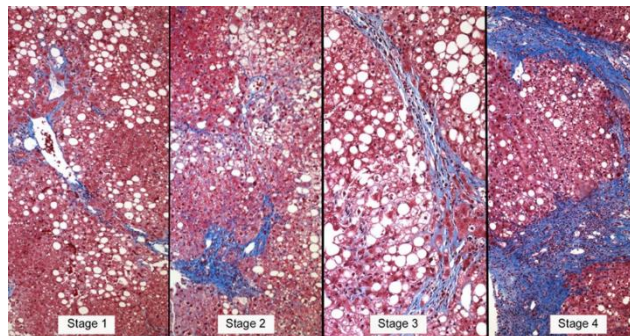


Figure 11 : Stades de la fibrose dans des stéatoses hépatiques non alcooliques. Stade 1 (gauche): Les fibres de collagène (bleues) délimitent les sinusoides entourant la veine centrale. Stade 2 (milieu gauche): De fines fibres de collagène se déposent autour des sinusoides dans la partie supérieure du champ, le collagène plus dense s'étend dans la partie inférieure du champ. Stade 3 (milieu droite) : fibrose pontante. Des tissus fibreux vascularisés traversent le parenchyme hépatique. Stade 4 (droite): cirrhose.⁴⁵

2.4.1.(b) Neurologiques (34%)

L'apparition des symptômes neurologiques peut être progressive, comme foudroyante (Figure 12).



Figure 12 : Patientes du Dr Wilson avant et après déclaration de la maladie. 2 ans séparent le cliché de gauche du cliché de droite.¹

Parmi les symptômes les plus communs se trouvent les dysarthries, les dystonies, les tremblements et les mouvements involontaires. Ils peuvent ensuite s'ajouter à d'autres symptômes : convulsions, trouble de la coordination des mouvements (ataxie), mouvements involontaires (chorée, myoclonie), bave, mouvements des yeux anormaux.

Dysarthries

Les dysarthries sont les symptômes neurologiques le plus commun dans la maladie de Wilson qui touchent environ 90% des patients souffrant d'atteintes cérébrales.⁴⁶ Ces sont des troubles de la parole, la personne n'est plus capable d'articuler correctement. Les dysarthries peuvent être parkinsoniennes (élocution lente et monotone), cérébelleuses (discours explosif, scandé) ou encore paralytiques (voix nasale, élocution lente, problèmes de déglutition).

Dystonies

Les dystonies sont des contractions involontaires des muscles, souvent réfractaires à tout traitement.⁴⁷ Dans le cas de la WD, ces contractions touchent en particulier le visage. Les patients présentent donc souvent un sourire bouche bée ou totalement figé.

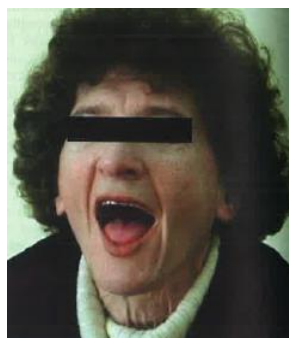


Figure 13 : Dystonie faciale d'une patiente WD.¹⁴

D'autres dystonies localisées peuvent également affecter le cou, les mains, les jambes, la langue. Avec la progression de la maladie, la dystonie peut se généraliser au corps entier. Les patients souffrent alors de contractures et entrent dans un "état dystonique".

Tremblements

Les tremblements observés peuvent être uni- ou bi-latéraux avec des intensités équivalentes ou non. Ils peuvent augmenter en intensité ou toucher d'autres parties du corps avec l'évolution de la maladie. Le tremblement le plus caractéristique de la maladie de Wilson est le "tremblement des ailes", irrégulier et de grande amplitude. Le patient ci-dessous ne peut pas conserver ses mains l'une en face de l'autre sans que ceci n'induisse de forts mouvements incontrôlés (Figure 14).



Figure 14 : "Tremblement des ailes" d'un patient de la maladie de Wilson.

Mouvements involontaires

La myoclonie (contraction musculaire rapide) ou la chorée (mouvements répétitifs qui se déplace d'une partie du corps à une autre) sont des mouvements involontaires retrouvés dans la maladie de Wilson. Ils peuvent être lents ou rapides et empêchent souvent la marche ou la plupart des gestes du quotidien.

2.4.1.(c) Psychiatriques (10%)

La dépression est l'un des symptômes les plus courants chez les patients souffrant de la maladie de Wilson.⁴⁸ Généralement décrit au début de la maladie, ce trouble de l'humeur n'est ici pas dû à la fatigue psychologique qu'engendre cette maladie mais est bien un symptôme. Certains patients présentent également de l'anxiété pouvant aller jusqu'à une panique chronique.⁴⁹

Les patients peuvent également présenter des symptômes psychotiques.⁵⁰ Ils sont alors traités grâce à des antipsychotiques et des effets secondaires inhabituels peuvent mener au diagnostic de la maladie

de Wilson. Dans certains cas, les patients peuvent passer des années dans des centres psychiatriques avant que la maladie ne soit diagnostiquée.

2.4.1.(d) Hématologiques (12%)

L'anémie hémolytique est un symptôme plus rare de la maladie de Wilson. Il n'est présent que dans 10 à 15% des cas⁵¹ et se traduit par la destruction prématurée des globules rouges dans le sang. Ces symptômes hématologiques sont variables et leur gravité dépend souvent de la concentration en cuivre dans la circulation sanguine.⁵² Il arrive que cette anémie soit le premier symptôme de la maladie et précède les atteintes hépatiques et neurologiques.

2.4.1.(e) Anneau Kayser-Fleisher

Décrit pour la première fois en 1902, l'anneau de Kayser-Fleischer n'a été lié à la maladie de Wilson qu'en 1922. Cet anneau est un dépôt de cuivre au niveau de l'œil, entre la cornée et la sclère (le "blanc" de l'œil). Cet anneau est présent chez 95% des patients présentant des symptômes neurologiques et 60% des patients ne les ayant pas déclarés.⁵³ Uniquement visible grâce à une lampe à fente, cet anneau est de couleur marron-dorée (Figure 15).

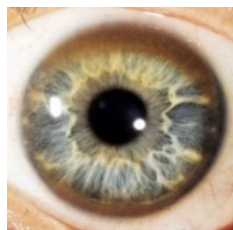


Figure 15 : Anneau de Kayser-Fleischer chez un patient atteint de la maladie de Wilson.

Il n'est cependant pas spécifique de la maladie Wilson et a pu être observé (plus rarement) dans des cas de cholestases chroniques ou encore d'hépatites auto-immunes.⁵⁴ Sa présence seule ne suffit donc pas à confirmer le diagnostic.

2.4.2. Diagnostic Génétique

Jusqu'à dans les années 2000, le test de référence était le "séquençage Sanger" du gène *atp7b*.²⁴ Même s'il est encore utilisé de nos jours, les technologies de séquençage nouvelle génération permettent un diagnostic plus rapide et plus complet. Il est également possible d'effectuer le séquençage des parents

asymptomatiques afin de déterminer quelles sont exactement les mutations génétiques présentes chez le patient. De plus, le test sur les frères et sœurs peut permettre de diagnostiquer la maladie chez ces membres de la famille n'ayant pas encore de manifestation clinique.

2.4.3. Paramètres biologiques

2.4.3.(a) Le dosage de la céruloplasmine sanguine

Chez une personne saine, la concentration normale en céruloplasmine dans le sérum a pour minimum 0,2 g/L. Chez les patients WD ayant des troubles neurologiques, cette valeur est inférieure à 0,1 g/L. Il est possible de mesurer le niveau de la céruloplasmine dans le sérum par réaction enzymatique ou grâce à des tests mettant en jeu des anticorps. Cependant, chez les patients présentant uniquement les symptômes hépatiques, les niveaux de céruloplasmine sont, dans 50% des cas, basses, mais dans la norme. De plus, d'autres paramètres tels que l'inflammation du foie ou la grossesse peuvent affecter ce taux. Le dosage seul de la céruloplasmine n'est donc pas suffisant pour diagnostiquer ou exclure la maladie de Wilson et doit être couplé à d'autres tests.

2.4.3.(b) Bilan cuivrique

Face aux difficultés de diagnostic de la WD, le "Relative Exchangeable Copper" (REC) a été proposé comme paramètre de diagnostic en 2011.⁵⁵ Le REC est la quantité de cuivre échangeable (CuEXC) divisée par le cuivre total dans le sérum (obtenu par dosage) : $REC = CuEXC / Cu_{total}$. Ce cuivre échangeable est obtenu après incubation du sérum en présence d'EDTA (chélateur de cuivre) suivi par une ultrafiltration. Un REC supérieur à 18,5% permet un diagnostic fiable et spécifique de la WD et ainsi d'éviter des faux positifs ou faux négatifs.⁵⁵

2.4.4. Mise en place du diagnostic

Outre le séquençage génétique (relativement onéreux et difficile pour des mutations non classiques), les tests utilisés pour le diagnostic de la maladie de Wilson ne peuvent confirmer à 100% que le cas présent est bien un Wilson. Au cours de la 8^{ème} réunion annuelle sur la maladie de Wilson à Leipzig en 2001, un score de diagnostic basé sur plusieurs tests disponibles a été proposé.⁵⁶ Ce système prend en compte différents symptômes ainsi que les tests génétiques et les analyses biologiques des quantités de Cp et de cuivre dans le foie et les urines (Figure 16).

Symptômes cliniques et signes	Points	Autres tests	
Anneau de Kayser-Fleischer		Cuivre dans le foie	
Présent	2	> 250 µg /g	2
Absent	0	50 – 249µg /g	1
Symptômes neurologiques		< 50 µg /g	-1
Sévères	2	Test à la rhodanine positif	1
Léger	1	Cuivre urinaire	
Absent	0	Normal	0
Céruoplasmine dans le sérum		1-2 x sup à la normale	1
Normal (>0,2 g/L)	0	> 2 x sup à la normale	2
0,1-0,2 g/L	1	> 5 x sup à la normale après D-Pen	2
< 0,1 g/L	2	Analyse des mutations	
Anémie hémolytique		Détectée sur les 2 chromosomes	4
Présente	1	Détectée sur 1 chromosome	1
Absente	0	Non détectée	0
Score total	Evaluation		
4 ou plus	Diagnostic établi		
2-3	Diagnostic possible, plus de tests nécessaires		
0-1	Diagnostic très peu probable		

Figure 16 : Score de Leipzig pour le diagnostic de la maladie de Wilson.⁵⁶

3. Traitements

Le seul traitement curatif de la maladie de Wilson est une transplantation hépatique. Très efficace pour la restauration de la céruoplasmine et l'excrétion biliaire, cette opération chirurgicale reste cependant très invasive et ne doit être effectuée qu'en cas d'insuffisance hépatique aigue ou de cirrhose avancée. De plus, suite à la transplantation, le patient devra prendre à vie des immunosuppresseurs. Cet acte n'est donc pas anodin et ne constitue pas un traitement à envisager en première intention.

Des traitements médicamenteux ont été développés afin de limiter l'absorption du cuivre et de ne pas atteindre un stade d'insuffisance hépatique aigue nécessitant obligatoirement une greffe du foie.

En 1951, Cumings démontre que la maladie de Wilson est due à une accumulation de cuivre dans le foie et le cerveau.⁵⁷ En cette période post-guerre, il propose un traitement avec le "British Anti-Lewisite" (BAL, dimercaprol), un anti-arsenic (Figure 17). Cette molécule a été développée pendant la seconde guerre mondiale pour anticiper une attaque chimique. En effet, elle devait permettre la chélation de l'arsenic et son excrétion dans les urines. Des études avec le traitement par le BAL sur des patients présentant des symptômes neurologiques (dont un atteint de la WD) ont montré de forts taux d'excrétion du cuivre dans les urines.⁵⁸ Cette observation a ensuite été reportée par Cumings, Denny Brown et Porter en 1951 comme le premier traitement de la maladie de Wilson.



Figure 17 : Ampoule de BAL, solution injectable.⁵⁹

Cependant, le BAL devait être pris à haute dose et devenait de moins en moins efficace avec le temps. De plus, la douleur des injections ainsi que la multitude d'effets secondaires ont rapidement mis fin à ce traitement et de nouveaux médicaments ont vu le jour.

3.1 Chélateurs actuellement utilisés

Les traitements les plus utilisés à ce jour sont des chélateurs de cuivre parfois associés aux sels de zinc (Figure 18). Les chélateurs du grec "chele", pince, sont des molécules capables de former un complexe stable et non toxique avec un ion métallique. Dans le cas de la maladie de Wilson, ils sont administrés pour induire l'élimination du cuivre par voie rénale.

« Start slow and go slow »

Ces différents traitements doivent être introduits progressivement chez le patient et doivent impérativement être pris à vie. L'arrêt du traitement ou sa non-observance mène à des insuffisances hépatiques et la résurgence, voire l'apparition, de symptômes neurologiques.⁶⁰

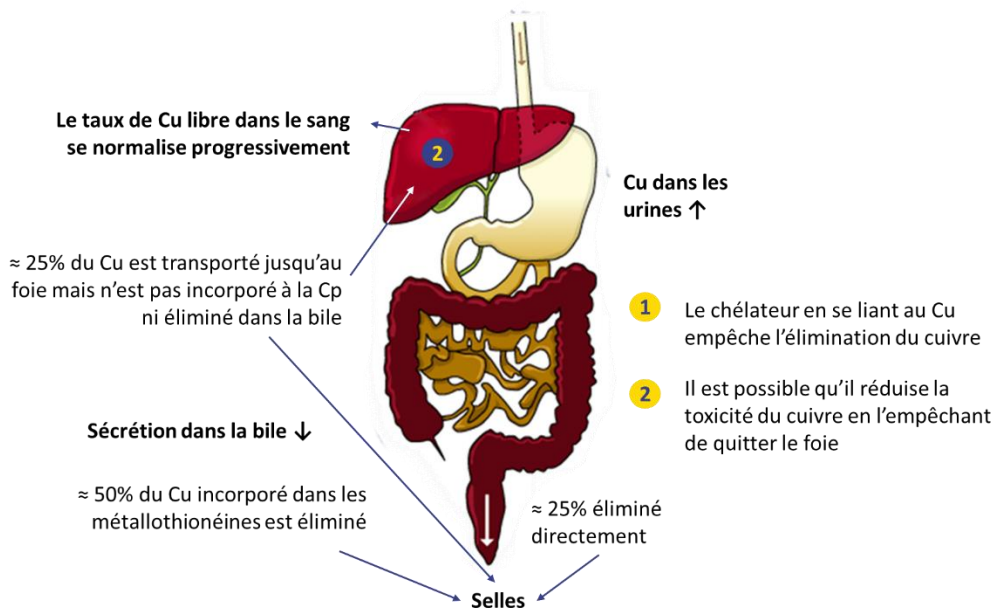


Figure 18 : Schéma du mode d'action d'un chélateur de cuivre sur un patient WD.⁶

3.1.1. D-penicillamine

Pour faire face aux problèmes rencontrés avec le BAL, Walshe a introduit en 1956 la D-pénicillamine (D-Pen, Trolovol®) afin de détoxifier le foie dans la maladie de Wilson.^{61,62} Ce médicament est encore aujourd'hui le traitement de référence, le plus utilisé à travers le monde (Figure 19). Il est issu de la dégradation de la pénicilline et permet d'excréter une quantité beaucoup plus importante de cuivre dans les urines. Pour l'anecdote, Walshe, après avoir obtenu 2 g de D-Pen, a lui-même pris 1 g (pour prouver sa non-toxicité) et a administré 1 g à un patient souffrant de la maladie de Wilson. Cette procédure marque alors le début de la thérapie à la D-Pen.

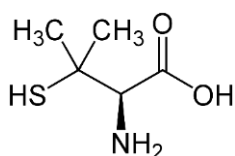


Figure 19 : Structure de la D-Penicillamine.

La D-Pen se présente sous forme de poudre blanche et doit être prise par voie orale. Chez un adulte, la posologie stipule l'ingestion de 1 000 - 1 500 mg de Trolovol® par jour.

Grâce à ce traitement, les fonctions du foie sont améliorées en 2 à 6 mois tandis que les fonctions cérébrales se rétablissent jusqu'à 3 ans après le début du traitement. Cependant, environ 25 % des patients ayant reçu de la D-Pen ne répondent pas ou peu au traitement sans qu'aucune cause à cette résistance ne soit identifiée.⁶³ Il est connu que l'isomère L de la pénicillamine (L-Pen) est toxique⁶⁴. Cependant, au début de la thérapie, aucun effet secondaire lié à la D-Pen n'avait été reporté.⁶⁵ Ces effets sont aujourd'hui nombreux et varient d'un individu à un autre sans aucune raison apparente. Généralement, les effets observés à court terme (après 3 semaines de traitement) sont la fièvre, érosion cutanée, augmentation de la taille des ganglions lymphatiques, diminution des plaquettes, baisse des neutrophiles (globules blancs) dans le sang. L'apparition de ces effets secondaires à un stade précoce dans le traitement de la maladie peut conduire à la substitution de la D-Pen par un autre traitement. Les effets secondaires à long terme apparaissent entre 3 semaines et 1 an après le début du traitement. Il est courant d'observer un mauvais fonctionnement des reins tels que le syndrome de Goodpasture ou la présence de sang dans les urines. Egalement, des effets au niveau de la peau : éruptions cutanées,⁶⁶ apparition de bulles,⁶⁷ mais aussi au niveau de la bouche (ulcères et aphtes), ont été reportés. L'inflammation des muscles, la perte de goût, l'anémie aplasique viennent compléter cette liste non exhaustive d'effets secondaires de la D-Pen. Outre ces effets secondaires, la D-Pen

n'améliore pas systématiquement les fonctions cérébrales ; une détérioration des symptômes neurologiques est observée dans 20 – 25 % des cas ayant commencé leur traitement avec la D-Pen.^{68,69} Une explication possible à ce phénomène est la mobilisation rapide de cuivre libre dans le plasma venant des différents tissus. Cette quantité de cuivre augmentée dans le sérum peut induire une augmentation du cuivre dans le cerveau générant un stress oxydant plus important et des dommages cérébraux.⁷⁰

3.1.2. Trientine

Les effets secondaires de la D-Pen sont devenus apparents à la fin des années 60 avec la nécessité de développer un autre traitement tout aussi efficace et mieux toléré par l'organisme. Walshe a ainsi développé la trientine en 1982.⁷¹

La trientine est la N,N'-bis(2-aminoéthyl)-1,2-éthanediamine dihydrochlorure. Cette molécule est un chélateur de cuivre(II) avec un mode d'action similaire à la D-Pen ; elle piège le cuivre extracellulaire (Figure 20).

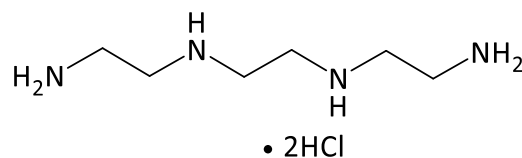


Figure 20 : Structure de la trientine

La trientine, en tant que "drogue orpheline" a été autorisée pour le traitement de la maladie de Wilson sans que des études pharmacocinétiques approfondies n'aient été effectuées. La majorité des données obtenues sont consignées par Walshe⁷¹ et l'association européenne pour l'étude du foie (European Association for Study Liver, EASL).⁷²

La posologie classique de la trientine est de 900 à 2 700 mg/jour en 2 ou 3 doses. Une faible quantité de trientine est absorbée par le tube digestif et seulement 1 % de la trientine absorbée et 8 % des métabolites apparaissent dans les urines. La trientine n'est pas spécifique du cuivre, elle chélate également le fer avec lequel elle produit un complexe toxique. Les patients sous trientine doivent donc éviter une supplémentation en fer.

Le principal inconvénient de la trientine est son instabilité, le produit devant impérativement être conservé entre 2 et 8°C. Elle présente toutefois moins d'effets secondaires que la D-Pen avec une efficacité similaire au niveau du foie.

3.2 Sels de zinc

C'est en 1961, dans sa thèse de doctorat, que le neurologue néerlandais Schouwink a envisagé pour la première fois les sels de zinc comme traitement alternatif à la maladie de Wilson (Figure 21). Ces sels de zinc sont généralement sous forme d'acétate, du sulfate ou encore du gluconate de zinc ; l'acétate et le gluconate étant mieux tolérés que le sulfate. Ils sont administrés par voie orale à raison de 150 mg de zinc élémentaire chez l'adulte répartis en 2 à 3 doses par jour.

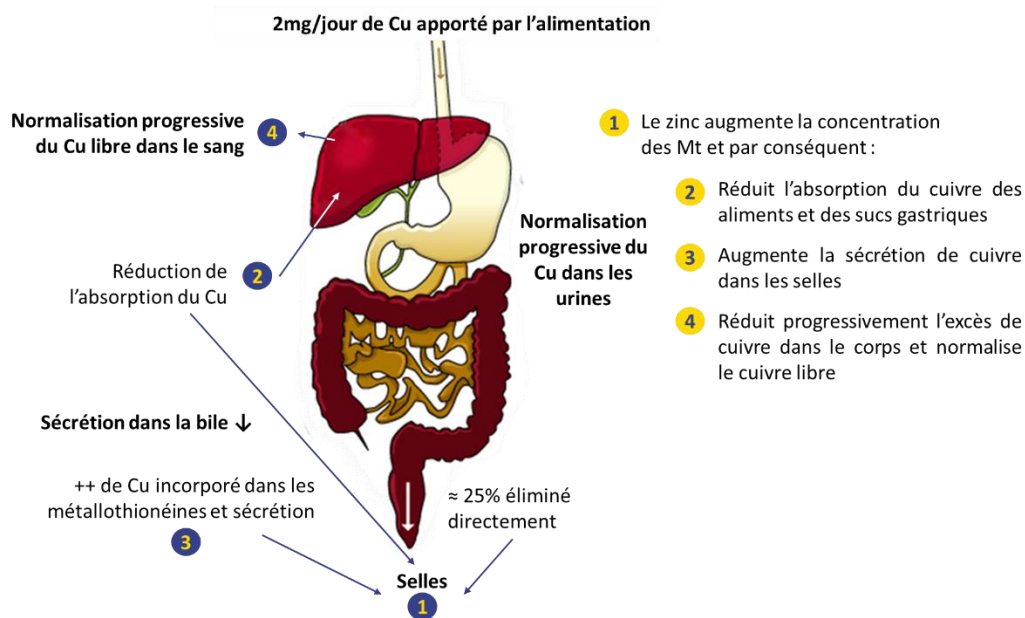


Figure 21 : Elimination accrue du cuivre dans les selles par thérapie au zinc chez un patient atteint de la maladie de Wilson.⁶

Les sels de zinc ont un mécanisme d'action différent des deux autres médicaments présentés ci-dessus. Il ne s'agit pas là d'un chélateur de cuivre. Le zinc induit la production de MTs, ces protéines dont le rôle est la séquestration des ions métalliques libres. Les MTs dont la production est induite par le zinc vont se lier au cuivre amené par l'alimentation et présent dans l'intestin. Le métal ne peut donc pas sortir de l'intestin et être absorbé dans le sang. Il est donc ensuite éliminé dans les selles. Ainsi le zinc bloque l'absorption du cuivre par les intestins. Il induit ainsi progressivement une balance en cuivre négative.⁷³

Cette stratégie thérapeutique nécessite cependant plus de 6 mois de traitement en zinc pour atteindre un effet significatif. De plus, elle peut provoquer des irritations gastriques. La dose doit donc être limitée mais peut amener certains patients à arrêter le traitement.⁷⁴ Outre ces problèmes, les sels de zinc induisent peu d'effets secondaires. Des cas de détériorations neurologiques ou d'anémies ont été observés mais les mécanismes n'étant pas clairs, il est difficile de se prononcer quant à une éventuelle toxicité des sels de zinc.

Les sels de zinc et les chélateurs oraux ayant des modes d'action différents, il est avantageux de les combiner.

3.3 Récents développements

3.3.1. Tétrathiomolybdate d'ammonium (TTM)

Le molybdène est un élément naturel présent dans les sols. Avant d'être administré chez l'Homme, il était connu de la médecine vétérinaire.⁷⁵ Dans les années 50, certains pâturages rendaient le bétail malade, causant parfois leur mort. Des études ont alors révélé que la présence de molybdène dans les herbages était associée à des insuffisances en cuivre chez des moutons qui paissaient dans ces pâturages.⁷⁶ En 1957, il a donc été postulé que le molybdène sous sa forme de sel d'ammonium pouvait être utilisé dans le traitement de la maladie de Wilson en tant que décorporant du cuivre.⁷⁷ Cependant le molybdate n'a pas montré de résultat probant et les essais cliniques ont été stoppés au bout de 2 mois. Il a par la suite été montré que les moutons pâturaient dans des champs riches en soufre et que, au niveau de leur estomac (environnement réducteur), le molybdate était converti en tétrathiomolybdate (TTM). Cette molécule a donc été identifiée comme un puissant décorporant du cuivre. Contrairement aux moutons, l'estomac humain n'est pas capable de réduire le molybdate en TTM et le molybdate ne possède aucune propriété chélatrice du cuivre.

Après la D-Pen et la trientine, Walshe a obtenu en 1986 quelques grammes de TTM et se l'est lui-même administré pendant 4 jours. Le composé n'étant pas toxique, il l'a donné oralement à l'un de ses patients atteint de la WD ne répondant pas aux traitements classiques.⁷³ Après 1 an sous TTM, son foie était redevenu normal.

Ces résultats s'expliquent par la formation de complexes de cuivre non toxiques dans l'intestin, limitant ainsi l'absorption du cuivre par les cellules du tube digestif.

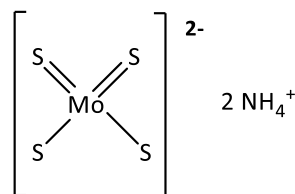


Figure 22 : Structure chimique du tétrathiomolybdate d'ammonium.

Après le rejet par la FDA du TTM sous forme de sels d'ammonium, une nouvelle formule associée à la bis-choline, connue sous le nom de WTX101 est actuellement en phases d'études cliniques afin d'évaluer son efficacité et son innocuité.⁷⁸

3.3.2. DPM-1001

Le DPM-1001 (Figure 23) a été proposé récemment par Krishnan et al.⁷⁹ comme un chélateur puissant, hautement sélectif du cuivre et biodisponible oralement. Selon cette étude, cette molécule est composée d'une extrémité servant à la partie chélation du cuivre et d'une partie stéroïde qui assure la sélectivité pour ce métal.

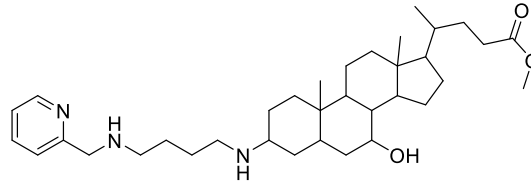


Figure 23 : Structure du DPM-1001.

Des tests sur des modèles cellulaires et des fibroblastes de patients ont montré la capacité de cette molécule à diminuer les effets associés à l'accumulation de cuivre. De plus, le traitement avec le DPM-1001 sur des souris modèles (« Toxic milk mouse models ») diminue la quantité de cuivre de manière significative au niveau du foie, des reins et du cerveau. La quantité de cuivre dans les selles est quant à elle augmentée (Figure 24).

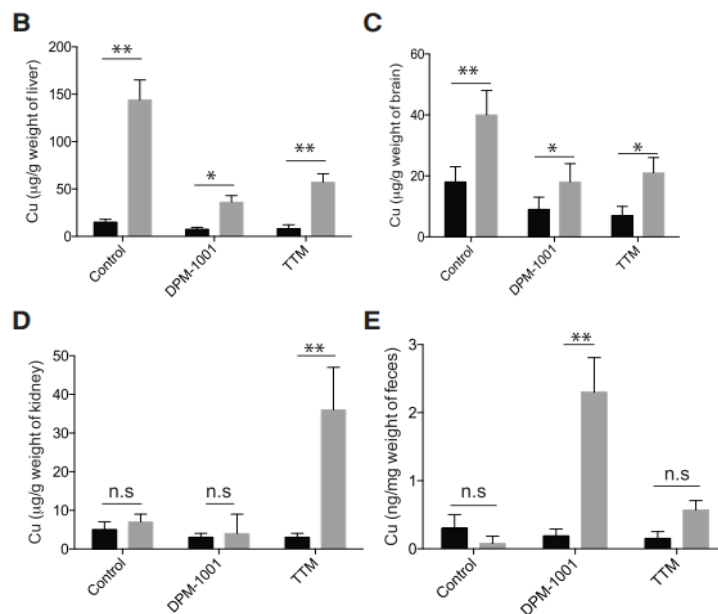


Figure 24 : Quantité de cuivre mesurée dans des organes et les selles de souris "Toxic Milk Mouse" sans traitement ou traité par du DPM-1001 ou du TTM à 5 mg/kg.⁷⁹

Ce composé fait encore l'objet d'une étude approfondie pour évaluer son potentiel en tant que médicament pour le traitement de la maladie de Wilson.

3.3.3. Autres traitements d'intérêt en développement

Thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules afin de soigner une maladie. Appliquée à la maladie de Wilson, le transfert de gène *atp7b* pourrait restaurer le métabolisme du cuivre au niveau hépatique. Il est pour cela nécessaire de considérer le transfert de gène à un stade précoce du développement embryonnaire.

Des études utilisant des vecteurs lentiviraux (LV) ont permis de montrer que le transfert du gène lentiviral *atp7b* était possible chez le rat Long-Evans (modèle de WD)⁸⁰ et permet de diminuer la quantité de cuivre dans le foie et les fibroses associées. Une autre étude récente utilisant des adénovirus recombinants (rAAV) a montré une correction à long terme de l'homéostasie du cuivre chez la souris WD. Une petite partie du gène *atp7b* (mini-*atp7b*) est ici transférée et l'excrétion de cuivre est mesurée dans les selles, les urines et le foie.⁸¹

Thérapie cellulaire

Il est également possible d'introduire dans le foie malade des cellules hépatiques saines afin de rétablir le fonctionnement du foie.⁸² Cette transplantation permet, sur les rats LEC (modèle de Wilson) une repopulation du foie et ainsi une excrétion biliaire et un taux de céruloplasmine normal.⁸³

4. Travaux antérieurs effectués au laboratoire SyMMES

Comme nous venons de le voir, les médicaments prescrits actuellement pour traiter la maladie de Wilson sont essentiellement des chélateurs de cuivre couplés à des sels de zinc. Ces molécules piègent le cuivre et permettent de stimuler son excrétion dans les urines. Cependant, ces traitements sont systémiques, doivent être pris à vie et présentent un certain nombre d'effets indésirables.

Une alternative développée au laboratoire SyMMES pour accéder à des solutions thérapeutiques plus efficaces et présentant moins d'effets indésirables consiste à piéger sélectivement le cuivre là où il s'accumule, à savoir les cellules hépatiques. En raison de la présence de glutathion dans les cellules hépatiques en quantité millimolaire, le degré d'oxydation le plus stable du cuivre disponible en excès est le degré +1. C'est donc celui-ci qui a été ciblé.

4.1 Du vivant aux chélateurs de cuivre efficaces et sélectifs

4.1.1. S'inspirer du vivant

Les modèles biologiques qui distribuent ou séquestrent le cuivre sont des modèles pertinents pour la conception de chélateurs efficaces. De façon générale, les principales protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre lient cet ion au degré d'oxydation +1 grâce aux atomes d'azote de résidus histidine ou aux atomes de soufre de résidus cystéines ou méthionines.

Les métallochaperonnes à cuivre sont des protéines qui transportent le Cu(I) dans les cellules. Plusieurs exemples de métallochaperonnes impliquées dans l'homéostasie du cuivre ont été présentés précédemment (Cf Ch I.1.2.1). Il est intéressant ici d'étudier la structure de ces protéines afin de comprendre comment elles parviennent à lier cet ion métallique. Dans le cas de l'Atx1 (homologue hautement conservé de Atox1 chez la levure), la structure du site de fixation du cuivre, résolue par diffraction des rayons X, a mis en évidence la structure Met-X-Cys-XX-Cys (Figure 25).⁸⁴

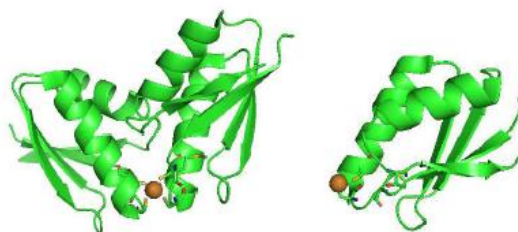


Figure 25 : Structure cristallographique de Atx1 d'après Wernimont et al. A gauche : complexe Cu(Atox1)₂, coordination CuS3/CuS4 ; à droite : complexe Cu(Atox1), coordination CuS2.⁸⁴

Cette structure est conservée chez toutes les métallochaperonnes et permet la chélation du cuivre par la formation d'un dimère : un Cu(I) est lié aux deux cystéines de deux protéines Atox1.

Comme cela a été présenté précédemment (Cf Ch I.1.2), les métallothionéines sont des protéines impliquées dans la séquestration du cuivre ou d'autres métaux toxiques en excès dans les cellules hépatiques.⁸⁵ Découvertes dans le rein du cheval par Vallee en 1957, ces protéines sont présentes chez les mammifères, les plantes, les levures, les crustacés ou encore les champignons.⁸⁶ Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (6000 – 7000 Da soit 60 à 70 acides aminés) qui peuvent contenir jusqu'à 20 résidus cystéine (30 %)⁸⁷ organisés de manière à lier certains ions métalliques dans des clusters avec une affinité extrêmement élevée pour le Cu(I) ($K_d \sim 10^{-19}$). Les structures des complexes formés dans les métallothionéines décrites dans la littérature sont organisées essentiellement autour d'unités CuS3 formant des clusters Cu4S6 ou Cu6S9.⁸⁸ Des études ont également montré que, en

condition de forte concentration en cuivre, la MT peut se lier à 12 ions Cu(I).⁸⁹ Dans ces clusters, les atomes de cuivre sont toujours entourés de trois atomes de soufre pontants ou terminaux dans une géométrie trigonale (Figure 26).

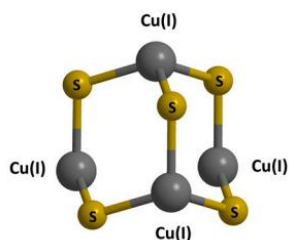


Figure 26 : Cluster métal-thiolate dans les métallothionéines. Model du cluster $Cu(I)_4CysS_5$. Les ions métalliques (représentés en sphères grises) sont liés aux ligands thiolates des cystéines.⁹⁰

4.1.2. Chélateurs cyclodécapeptides

En s'inspirant des sites de liaison connus des métallochaperones, un cyclodécapeptide (CDP) contraint par la présence de deux coudes Pro-Gly possédant deux résidus cystéines sur la face inférieure a été conçu précédemment au laboratoire SyMMES en collaboration avec le DCM (Figure 27).⁹¹

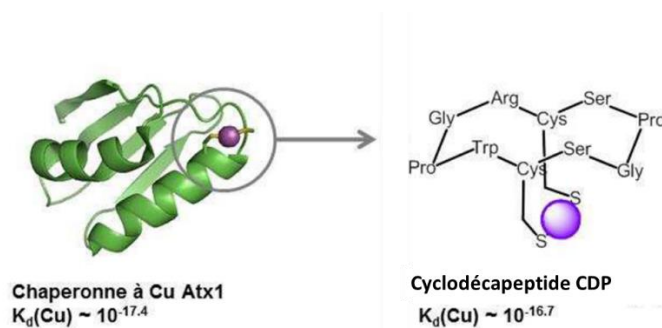


Figure 27 : Cyclodécapeptide (CDP) mimant la boucle de liaison du Cu(I) par la métallochaperonnes Atx1.⁹¹

Dans cette structure pro-drogue, les cystéines du CDP présentes sur la face inférieure sont oxydées sous forme de pont disulfure. Cela permet de masquer ses fonctions chélatantes en milieu extracellulaire et de les libérer uniquement après leur entrée dans les cellules hépatiques afin de piéger le cuivre.

Ce peptide CDP est capable de piéger le Cu(I) pour former un complexe de stœchiométrie 1 : 1 avec une constante de dissociation (K_d) de $10^{-16,7}$ à pH 7,4. Cette valeur est proche de celle décrite pour la protéine Atox1 ($10^{-17,4}$). De plus, ce peptide est spécifique pour le Cu(I). Des tests d'affinité ont été effectués avec divers ions métalliques et en particulier avec le Zn(II). En effet, ce dernier, abondamment présent dans le corps humain peut également être piégé par les métallothionéines. La sélectivité du CDP pour le Cu(I) est plus grande de 10 ordres de grandeur par rapport au Zn(II).

Sur la face supérieure, les chaînes latérales des autres acides aminés peuvent être fonctionnalisées afin de cibler spécifiquement les hépatocytes.

4.1.3. Chélateur NTA(CysNH₂)₃

Les sites de liaison de haute affinité des métallothionéines ont également été pris comme modèles pour concevoir des architectures moléculaires contenant plusieurs résidus cystéines capable de promouvoir une géométrie de coordination favorable autour du cuivre au degré d'oxydation +1. Pour cela, des tri- et tétrapodes contenant 3 et quatre résidus cystéines ont été synthétisés en utilisant les plateformes NTA (acide nitrilotriacétique), NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique) et EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) (Figure 28).⁹²

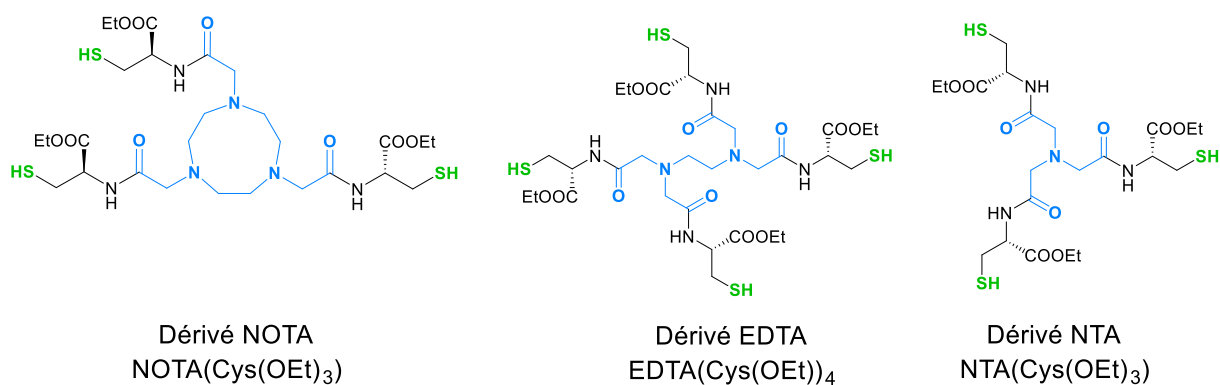


Figure 28 : Structure des 3 familles de chélateurs podants développés.⁹²

Ces différentes architectures moléculaires ont permis d'évaluer l'influence de la géométrie et le nombre de thiols sur la chélation du cuivre. D'autres chélateurs de cuivre ont également été conçus en remplaçant les cystéines par d'autres acides aminés naturels ou synthétiques (Figure 29).

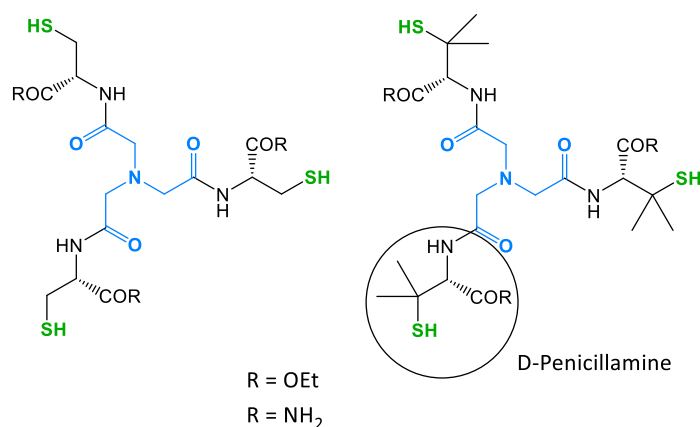


Figure 29 : Chélateurs de cuivre à base de NTA développés pour la chélation du Cu(I).

De cette chimiothèque, le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** s'est démarqué (Figure 30). Il piège de manière efficace le Cu (I) avec une affinité ($\log K \sim 19$) similaire à celle décrite pour les métallothionéines.⁹³ Il est également sélectif du Cu (I) par rapport au Zn (II).⁹⁴

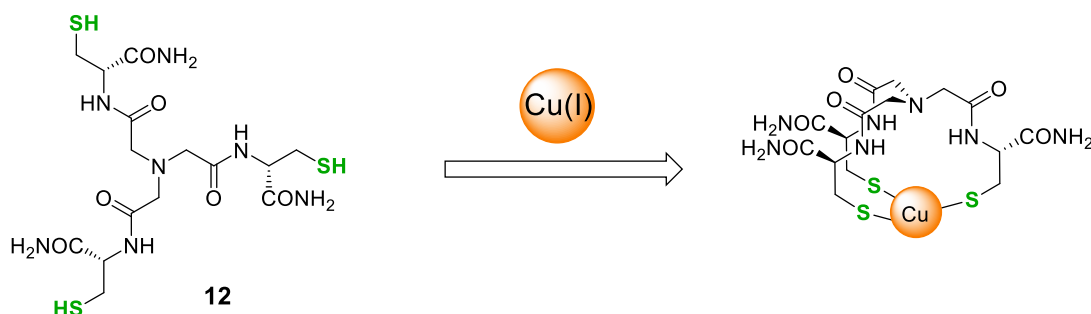


Figure 30 : Chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12**.

4.2 Vectorisation de chélateurs vers les hépatocytes

Dans le cadre de la maladie de Wilson, la surcharge en cuivre apparaît majoritairement au niveau du foie. Il est donc intéressant de piéger cet ion métallique Cu(I) directement dans les hépatocytes. Pour cela, les chélateurs d'intérêt cités ci-dessus, cyclodécapeptide (CDP) et NTA(CysNH₂)₃ **12** ont été fonctionnalisés afin d'être délivrés de manière spécifique au sein de ces cellules.

4.2.1. ASGPR cible de choix pour la vectorisation vers les cellules hépatiques

Une stratégie efficace pour cibler les cellules hépatiques est d'utiliser des récepteurs spécifiques, les récepteurs aux asialoglycoprotéines ASGPR, principalement et abondamment exprimés à la surface des hépatocytes.

4.2.1.(a) Structure et fonction

Les ASGPR sont des lectines de type C et reconnaissent spécifiquement des motifs saccharidiques avec une liaison dépendante du calcium. Elles sont composées de 2 polypeptides différents homologues. Chaque récepteur possède 3 sous-unités : 2 sous unités H1 et une 1 sous unité H2, possédant des séquences identiques à 55 %.⁹⁵ Ces sous-unités forment des complexes trimériques transmembranaires (Figure 31).

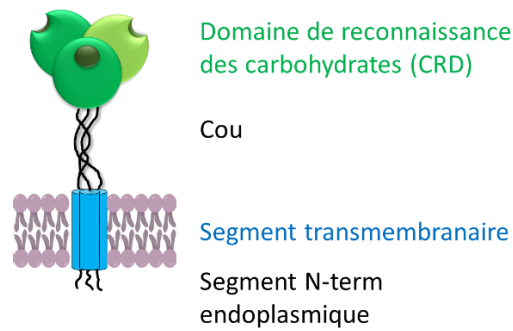


Figure 31 : Représentation de l'assemblage des sous-unités des ASGPR.

Le récepteur est composé de différentes parties :

Le segment N-Term, présents à l'extrémité et favorisant la formation de vésicules d'endocytoses.

Le cou, comportant de nombreux acides aminés chargés (c) et des résidus hydrophobes (h) répétés selon un motif H-XX-H-C-X-C. Cette répétition de sept molécules induit la formation d'une hélice par trimérisation du polypeptide.

L'extrémité C-Term contenant les domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD ; les sous unités H1 et H2).

Les ASGPR ont pour rôle l'internalisation de glycoprotéines désialylées : des glycoprotéines dont l'acide sialique a été clivé par des sialidases. Ils permettent ainsi de contrôler l'homéostasie de ces protéines dans le sérum. Le mécanisme d'internalisation de ligands médié par les ASGPR débute par la reconnaissance par les CRDs de résidus D-galactose ou N-acétyl-D-galactosamine présents à l'extrémité des glycoprotéines. Cette reconnaissance déclenche un mécanisme en chaîne dépendant des clathrines : la membrane s'invagine, formant des vésicules d'endocytose. Elles sont ensuite refermées et dirigées vers les endosomes. Le ligand est alors séparé du récepteur puis ce dernier est recyclé à la surface de la cellule (Figure 32). Ce cycle dure environ une dizaine de minutes pour une demi-vie des ASGPR de 30h.⁹⁶

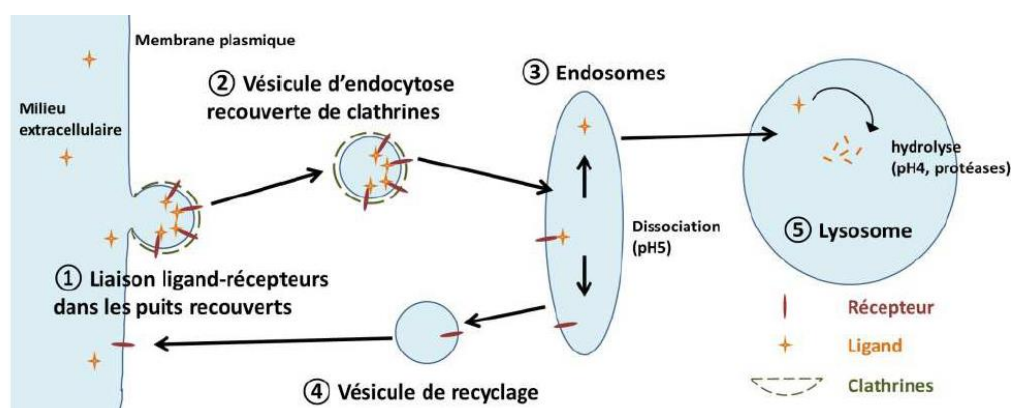


Figure 32 : Internalisation de ligands par endocytose médié par les ASGPR.⁹⁷

L'étape clé de cette internalisation est la reconnaissance des sucres dans laquelle les deux sous-unités H1 et H2 sont impliquées.

4.2.1.(b) Reconnaissance du GalNAc

Les ASGPR reconnaissent les résidus D-galactose ou N-acétyl-D-galactosamine, avec une affinité plus grande pour le GalNAc (10-50 fois supérieure).⁹⁸

L'interaction monovalente est la ligation d'un seul sucre au niveau des CRD. Celle-ci s'effectue par des liaisons hydrogène entre les hydroxyles du sucre et les résidus de la protéine. Il est également possible que des interactions hydrophobes se forment entre la face apolaire du sucre (α ou β), ou le N-acétyle, et les chaînes latérales d'acides aminés aromatiques.

Le CRD de l'ASGPR n'ayant pas été cristallisé en présence d'un ligand, les différentes interactions entre le sucre et le CRD ont été déterminées par analogie avec d'autres lectines similaires (RHL-1 particulièrement ; "ASGPR" de rat).

Sur RHL-1, les acides aminés Gln239 et Asp241 forment des liaisons hydrogène avec les hydroxyles 3 et 4 du galactose (Figure 33). Ces acides aminés sont responsables de la spécificité du récepteur pour le galactose par rapport au mannose ; ils favorisent l'approche d'un sucre possédant un 3-OH équatorial et un 4-OH axial. De plus, le calcium participe à la liaison du sucre : les OH 3 et 4 ainsi que les acides aminés Gln239 et Asp241 participent à la sphère de coordination du calcium.⁹⁹

Ces interactions ne suffisent cependant pas à établir la sélectivité et l'affinité connue des galactosides pour l'ASGPR. En plus des liaisons hydrogènes, le résidu Trp243 interagit avec la face apolaire du sucre grâce à sa chaîne latérale indolique. Ces interactions hydrophobes permettent d'augmenter l'affinité du récepteur pour les galactosides.¹⁰⁰ Enfin la boucle riche en glycine permet de générer une contrainte structurale ne laissant l'accès à la poche de reconnaissance uniquement aux galactosides (Figure 33).¹⁰¹

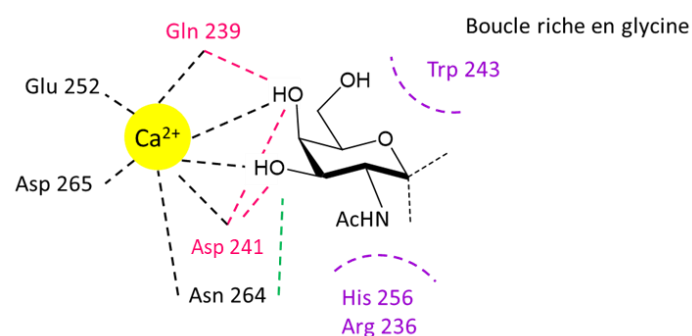


Figure 33 : Schéma récapitulant le mode de liaison du sucre dans le domaine de reconnaissance de la sous-unité majoritaire de l'ASGPR ; mise en évidence des interactions induisant la spécificité pour les galactosides et la préférence pour le GalNAc.

La plus grande affinité des ASGPR pour le GalNAc par rapport au Gal vient de l'interaction entre le N-acétyl avec une région hydrophobe de la protéine, notamment au travers des acides aminés His256 et Arg236. Le cycle imidazole de l'histidine est impliqué dans des interactions de Van der Waals avec le N-acétyl. Le même type d'interaction est observé pour l'arginine. La substitution de ces acides aminés entraîne une diminution de l'affinité relative pour le GalNAc de près de 25 fois.¹⁰²

L'affinité de l'ASGPR pour un galactoside monovalent est cependant faible, avec des Kd de l'ordre de 10^{-3} . Pour pallier cela, ces récepteurs utilisent le phénomène de multivalence pour lier plus fortement leurs ligands et induire un signal.

Les interactions multivalentes sont des interactions beaucoup plus fortes utilisées par les lectines afin d'augmenter leur sélectivité et l'affinité pour leur ligand. L'avidité des ASGPR augmente avec le nombre de sucres présents sur le ligand. En effet des études faisant varier le nombre de galactoses d'un ligand ont permis de mettre en évidence une affinité supérieure pour les motifs bi- < tri- ≤ tetra-valents.¹⁰³

Un ligand possédant un motif multivalent en GalNAc peut donc être reconnu par les ASGPR, sous réserve de respecter au mieux la géométrie du récepteur. En effet, les sucres sont reconnus par les domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD), il faut donc qu'ils présentent de préférence une géométrie trigonale et que la distance entre chacun des GalNAc corresponde à la distance entre les CRD. Cette distance a été évaluée à environ 20 Å pour une reconnaissance optimale (Figure 34).¹⁰⁴

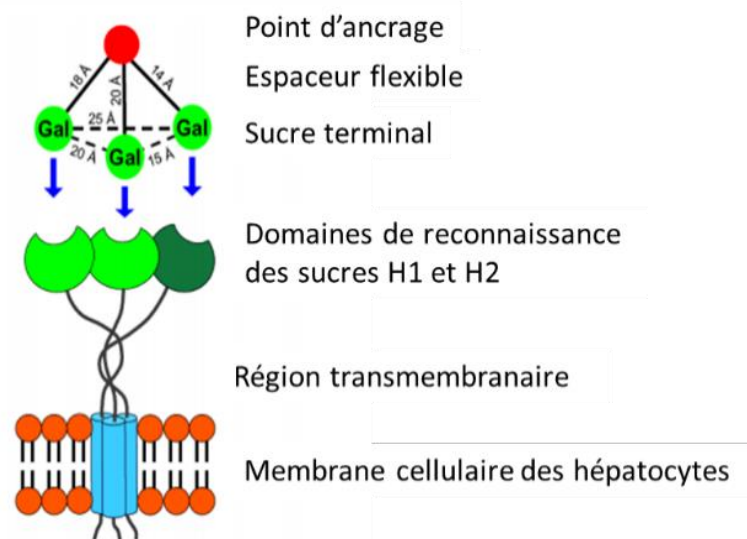


Figure 34 : Schéma de la reconnaissance des GalNAc par les sous-unités des ASGPR.

4.2.2. Conception des pro-drogues à base de cyclodécapeptide (Chel1) et de NTA (Chel2 à Chel6)

4.2.2.(a) Chel1

Afin de vectoriser le cyclodécapeptide (CDP) vers les hépatocytes, quatre lysines ont été introduites sur la face supérieure.¹⁰⁵ Grâce à l'amine présente sur les chaînes latérales de ces acides aminés, quatre sucres GalNAc ont été greffés via un lien oxime. Cette molécule, appelée Chel1, est présentée Figure 35.

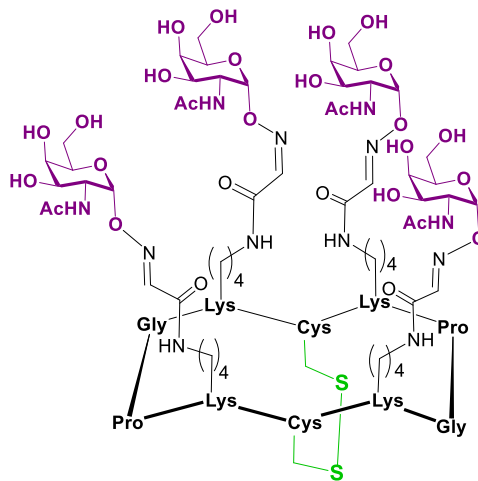


Figure 35 : Structure du glycoconjugué Chel1, pro-chélateur du Cu(I) vectorisé vers les cellules hépatiques.

L'espacement entre les sucres (20 Å) et la flexibilité des bras espaceurs correspondent aux exigences géométriques des ASGP-R. Afin de masquer les fonctions chélatrices et ne piéger le cuivre qu'en milieu intracellulaire, les thiols des deux cystéines sont oxydés en lien disulfure. Ces ponts seront réduits suite à l'entrée de la molécule dans les cellules grâce au glutathion présent dans le cytoplasme. Chel1 est ainsi une pro-drogue dont le mécanisme d'action est présenté Figure 36.

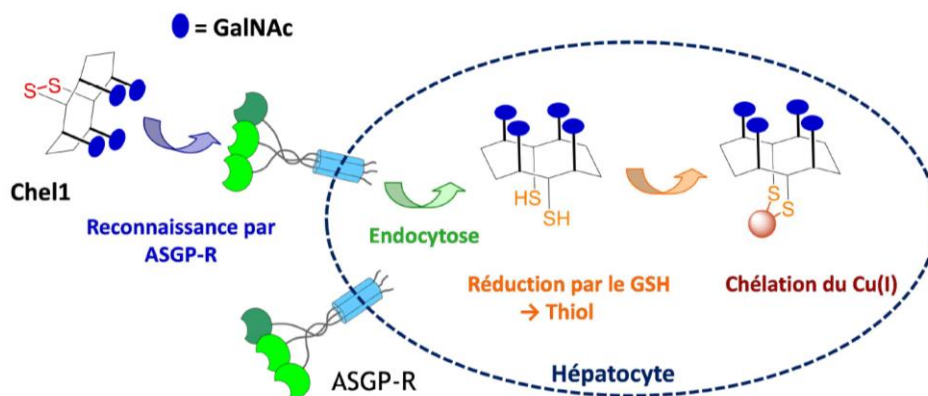
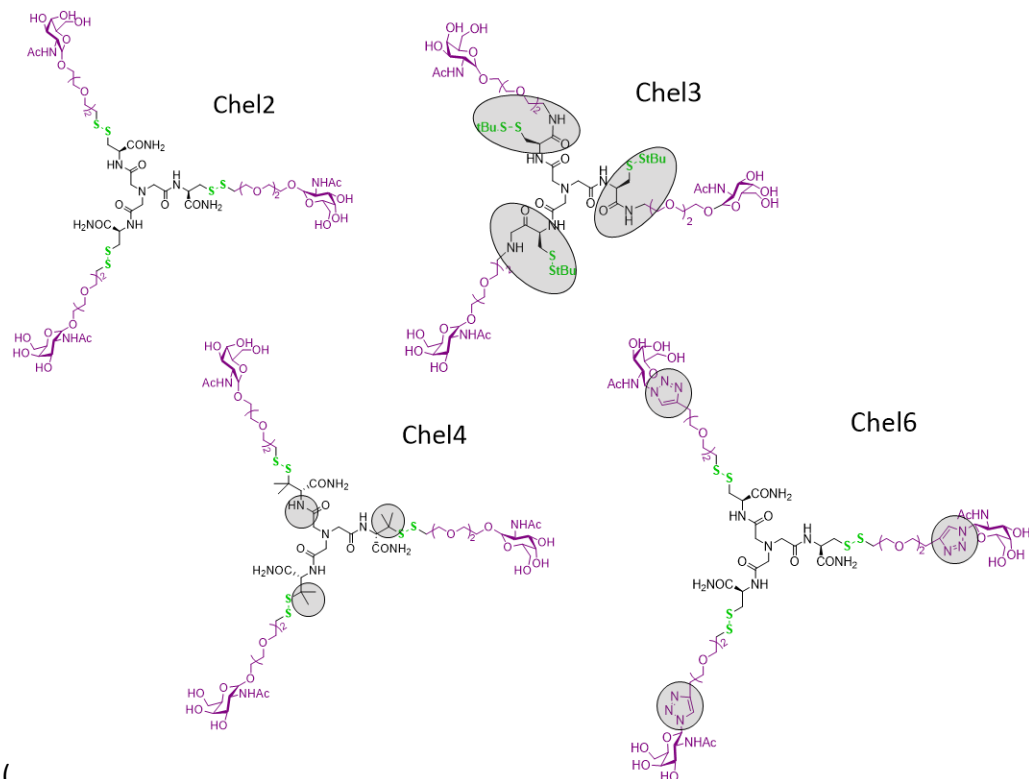


Figure 36 : Mécanisme d'action de Chel1 sur les cellules hépatiques.

4.2.2.(b) Chel2 à Chel6

De la même manière et afin de cibler spécifiquement les ASGPR, 3 résidus GalNAc ont été greffés sur le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**.

Afin de se rapprocher au mieux de la géométrie optimale pour la reconnaissance via les ASGPR proposée par Khorev et al,¹⁰⁶ un bras espaceur d'environ 12-13 Å a été choisi. En plus de sa longueur, la nature de cet espaceur et du lien avec le chélateur sont importants. Le lien polyéthylène glycol (PEG) présente de nombreux avantages : flexibilité, stabilité, biocompatibilité et pas de cytotoxicité.^{106,107} L'espaceur choisi est le 2[2-(2-chloroethoxy)éthoxy]éthanol. De plus, les thiols des cystéines pouvant former des liens disulfures dans le milieu biologique, il est nécessaire de les masquer avant leur entrée dans la cellule. Le lien utilisé entre les thiols et le motif de ciblage doit être clivé dans les hépatocytes afin de libérer le chélateur. Les fonctions thiols du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** ont donc été masquées par la formation d'un lien disulfure. Celui-ci sera rompu à l'entrée dans la cellule par le glutathion, libérant ainsi le chélateur de cuivre. Plusieurs pro-drogues Chel2, Chel3, Chel4 et Chel6 ont ainsi été



développées (

Figure 37).¹⁰⁸

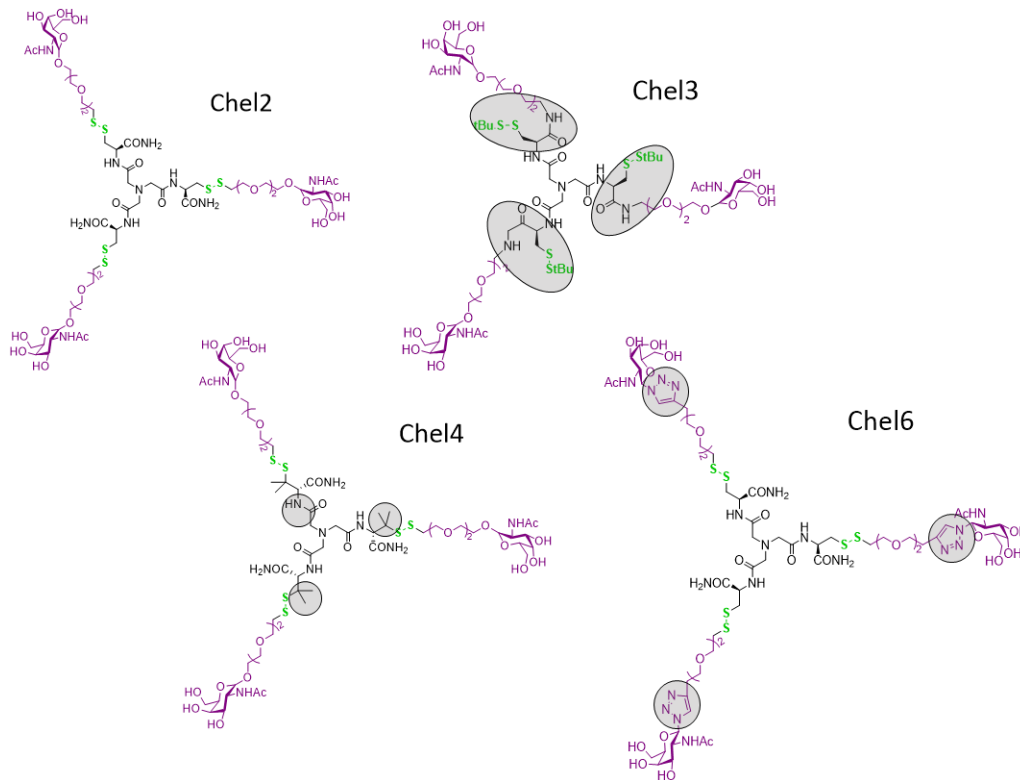


Figure 37 : Structure des glycoconjugués Chel2, Chel3, Chel4 et Chel6 ; les unités de ciblage sont représentées en violet, les liens disulfure masquant les fonctions chélatrices en vert et enfin les différences entre les glycoconjugués sont repérés par des cercles gris.¹⁰⁸

Le mécanisme d'action pour le pro-chélateur Chel2 est décrit Figure 38 à titre d'exemple.

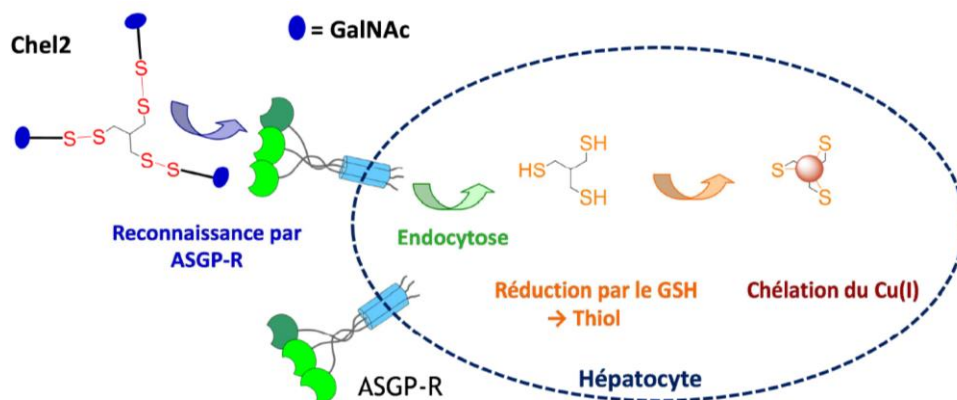


Figure 38 : Mécanisme d'action de Chel2 sur les cellules hépatiques.

4.2.3. Internalisation dans les cellules hépatiques et chélation du cuivre

Afin d'évaluer la capacité des différentes pro-drogues (exemple de Chel2 et Chel1 marqués par un fluorophore, respectivement T3 β et CP-Cy5) à entrer dans les hépatocytes et délivrer un chélateur de cuivre, des études cellulaires ont été effectuées par cytométrie en flux.¹⁰⁹ Les ASGPR ont été saturées en glycoconjugués et l'internalisation de ces molécules marquées par le fluorophore Cy5 a été suivie (Figure 39).

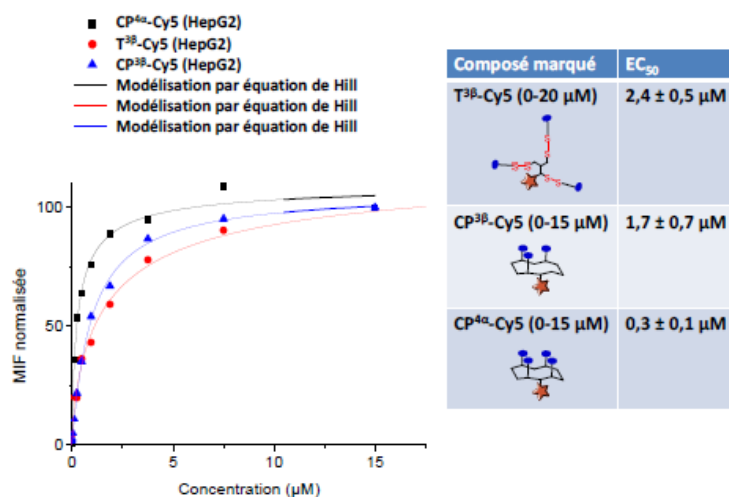


Figure 39 : Courbes de saturation des récepteurs ASGPR par les glycoconjugués T3 β -Cy5 alias Chel2 (●), CP3 β -Cy5 (Δ) et CP4 α -Cy5 alias Chel1 (□) de 0 à 20 μ M sur cellules HepG2 modélisées par une équation de Hill ; MIF = Moyenne d'Intensité de Fluorescence.

Il a ainsi été démontré que ces composés marqués par un fluorophore étaient internalisés efficacement dans les hépatocytes. Des études de compétition ont également été effectuées et ont permis de confirmer une internalisation médiée par les ASGPR.¹⁰⁹

La capacité de Chel1 et Chel2 à délivrer un chélateur de cuivre efficace a quant à elle été évaluée sur des cellules WIF-B9 dont l'ATP7B, l'appareil de Golgi et les canalicules biliaires ont été marquées. Les résultats obtenus pour Chel2 sont présentés à titre d'exemple Figure 40.

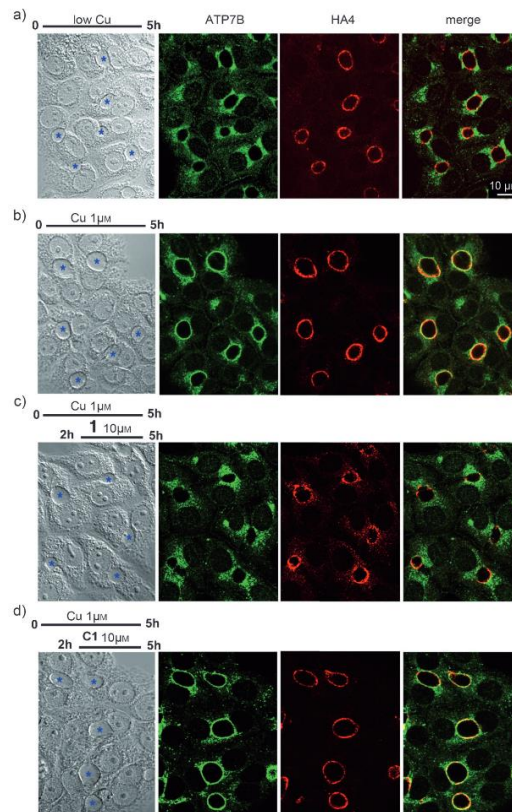


Figure 40 : Evaluation de la chélation du cuivre du glycoconjugué Chel2 sur cellules WIF-B9 par déplacement de l'ATP7B - Images obtenues par microscopie confocale avec ATP7B (vert), HA4 (un marqueur des membranes des canalicules) (rouge) détectés par immunofluorescence indirecte et la somme des deux. a) Cellules en conditions normales de Cu (5h) ; b) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl_2 (5h) ; c) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl_2 (2h) puis ajout de 10 μM de 1 (Chel2) (3h) ; d) cellules supplémentées avec 1 μM de CuCl_2 (2h) puis ajout de 10 μM de C1 (3h).¹⁰⁸

Dans ces expériences, les cellules sont préalablement incubées avec une forte concentration en cuivre. L'ATP7B se situe alors au niveau des canalicules pour excréter le cuivre en excès. Lorsque les prodrogues Chel1 ou Chel2 sont ajoutées au milieu, l'ATP7B migre vers l'appareil de Golgi. Cette expérience montre la capacité de ces composés à libérer un chélateur de cuivre dans les cellules hépatiques et réduire la charge en cuivre intracellulaire.¹¹⁰

Dans cette thèse, l'approche moléculaire précédemment développée avec le composé Chel2 sera transposée à des nanoparticules lipidiques. La suite de ce chapitre introduit donc les nanoparticules, avec un accent sur les nanoparticules lipidiques utilisées dans ce projet de recherche.

Nanomedicine & Nanoparticules

1. Introduction

*"There's plenty of room at the bottom"*¹¹¹

Dans son discours de 1959, Richard Feynman évoquait ainsi la miniaturisation, ou comment la physique et le contrôle des atomes pouvait servir la chimie et la biologie. Ce concept visionnaire a vu le jour quelques années plus tard avec le développement des premiers nanomatériaux.

En 2011, la commission européenne a publié une définition de ces nanomatériaux : *"On entend par «nanomatériau» un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm"* (Figure 41).¹¹²

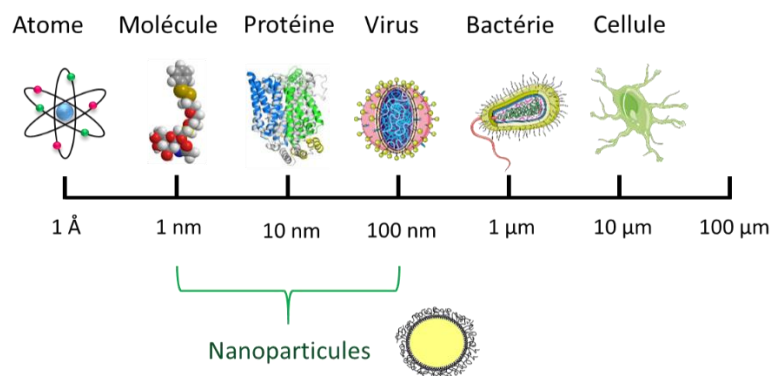


Figure 41 : Echelle de taille incluant les nanoparticules ; 1-100 nm.

Aujourd'hui les nanoparticules sont largement répandues dans notre quotidien : alimentation (TiO_2 ¹¹³), écrans (quantum dots¹¹⁴), cosmétiques (TiO_2 ¹¹⁵), peintures (SiO_2 ¹¹⁶) etc... Présentes à l'état naturel depuis des millions d'années (au travers d'éruptions volcaniques par exemple), les nanoparticules ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la thérapie et du diagnostic médical à travers la nanomédecine. Notamment, l'encapsulation de médicaments dans ces nano-objets permet de mieux contrôler leur délivrance et ainsi améliorer leur efficacité thérapeutique en limitant leurs effets secondaires. Depuis les travaux de Peter Paul Speiser en 1973 sur des microcapsules pour la libération retardée et contrôlée d'un principe actif,¹¹⁷ ce domaine n'a cessé de se développer, en particulier pour la vectorisation d'anticancéreux. En 1995, le Doxil™ est le premier anti-cancéreux à base de nanoparticules approuvé par la FDA et mis sur le marché. Depuis, 50 nanomédicaments ont été

approuvés par la FDA et plus d'une centaine sont actuellement en cours d'études cliniques (Figure 42).¹¹⁸

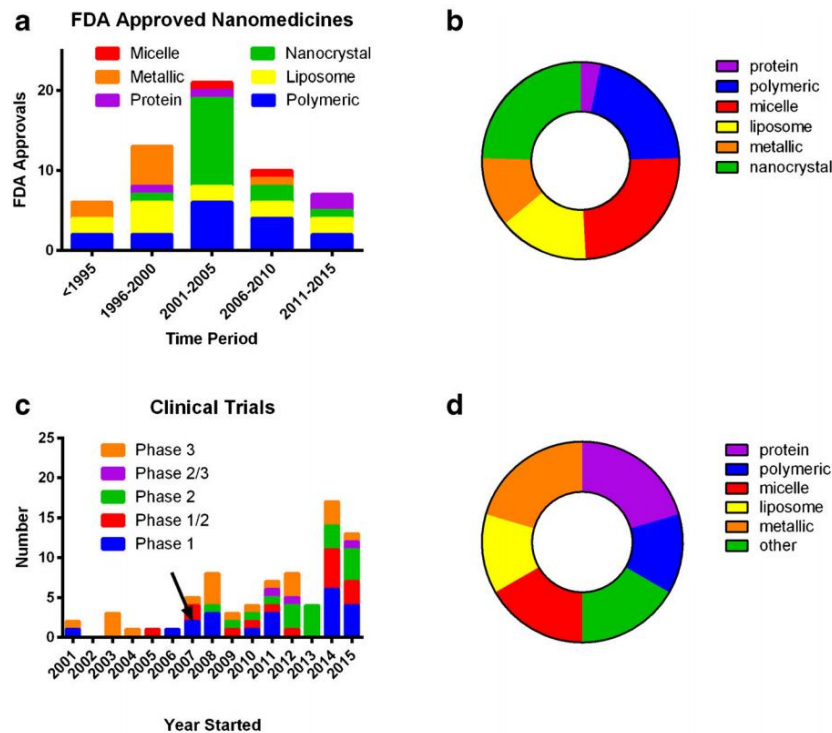


Figure 42 : Evolution dans le développement de nanomédecine, a-b- Nanomédecine approuvée par la FDA, c- essais cliniques en nanomédecine identifiés sur clinicaltrials.gov de 2001 à 2015, d- essais cliniques en nanomédecine en cours.¹¹⁸

Parmi les études en cours, il existe encore une forte prévalence pour les nanoparticules polymériques, les liposomes ou encore les nanocristaux. Cependant, des nanomatériaux plus complexes tels que les nanoparticules inorganiques et lipidiques, et les nanoparticules à base de biomolécules (protéines, oligosaccharides...) ont permis d'explorer de nouvelles propriétés à l'échelle nanométrique et font l'objet de nouveaux développements en nanomédecine.

Une des utilisations importantes des nanoparticules en nanomédecine est le ciblage de tumeurs dans le cadre de chimiothérapies. Pour cela, l'effet EPR ("Enhanced Permeability and Retention") est utilisé. Les nanoparticules ont tendance à s'accumuler davantage dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains. Cet effet s'explique par la structure anormale des vaisseaux sanguins et la faible efficacité du drainage lymphatique (Figure 43).¹¹⁹

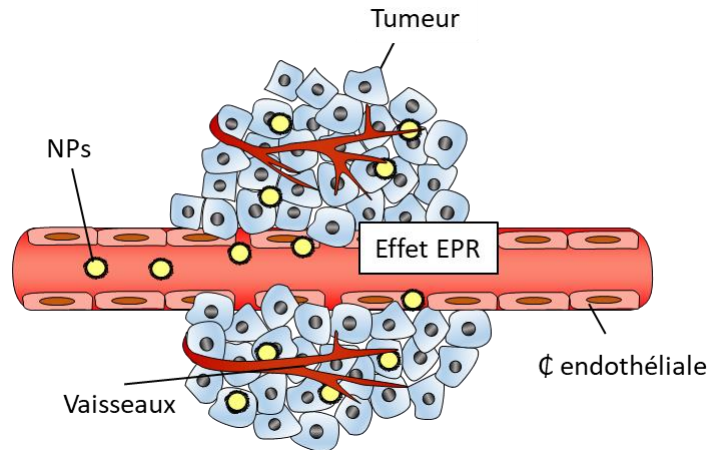


Figure 43 : Entrée de nanoparticules dans la tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).

Cette accumulation passive peut être observée pour tout type de nanoparticules mais ne s'observe généralement que pour des particules dont le diamètre est inférieur à 200 nm.

2. Les nanoparticules utilisées en nanomédecine

Pour être utilisées à des fins diagnostiques ou thérapeutiques, les nanoparticules doivent être non toxiques et biocompatibles. Différents types de nanoparticules sont utilisés aujourd'hui. Elles sont classées en 2 grandes catégories : les nanoparticules inorganiques et les nanoparticules organiques. Elles diffèrent par leur composition, leur forme ou leur structure (Figure 44).

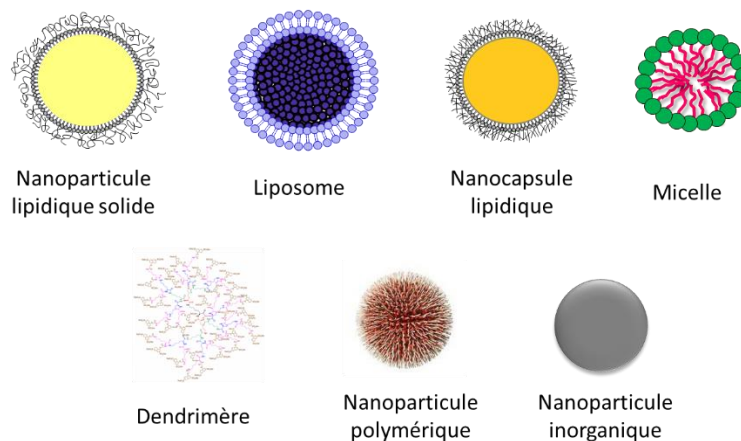


Figure 44 : Illustration de différents types de nanoparticules.

2.1 Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques les plus courantes sont les nanoparticules d'or ou d'argent, les nanoparticules de silice, les nanoparticules magnétiques ou encore des nanocristaux semi-conducteurs. Elles sont généralement de petites tailles (entre 2 nm et 25 nm). L'exploration de leurs propriétés physiques, notamment optiques et magnétiques, ont conduit à un essor croissant de ces nanoparticules en nanomédecine. Cependant, leur grande stabilité entraîne une métabolisation limitée et parfois une rétention longue dans l'organisme, constituant un risque accru de toxicité. Pour illustrer leur intérêt en nanomédecine, deux types de nanoparticules inorganiques sont présentées ci-dessous : les nanoparticules d'or et les quantum dots.

2.1.1. Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont des nanoparticules métalliques composées d'atomes d'or qui s'associent. Ces particules sont biocompatibles et inertes. Les nanoparticules d'or ont des applications en nanomédecine notamment dans le cadre de lutte contre le cancer avec la thérapie par photothermie.¹²⁰ En effet, après injection de nanoparticules d'or, l'excitation de l'or par une onde infrarouge permet une augmentation locale de l'énergie et donc de chaleur. Si les nanoparticules sont spécifiquement localisées au niveau des tumeurs, cette augmentation de température entraîne la mort des cellules cancéreuses (Figure 45).

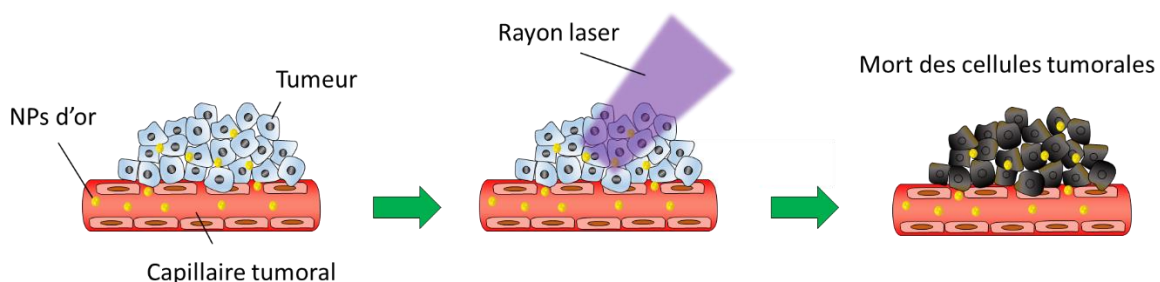


Figure 45 : Principe de la thérapie par photothermie.

Pour permettre un ciblage plus spécifique et une meilleure internalisation dans les cellules tumorales, ces nanoparticules ont également été fonctionnalisées (grâce notamment à l'affinité des thiols pour l'or) par des peptides TAT ou d'autres ligands.¹²¹

2.1.2. Quantum Dots

Les nanocristaux semi-conducteurs connus sous le nom de quantum dots (QDs), ou "boîtes quantiques" ont été décrits pour la première fois en 1981.¹²² Ces petites nanoparticules (2-10 nm) de structure plus ou moins complexe, sont composées d'un cœur (le plus couramment à base de sulfure ou sélénure de cadmium) et d'une coquille (généralement à base de sulfure ou sélénure de zinc et/ou cadmium) (Figure 46). Leur surface peut être recouverte de surfactants amphiphiles et fonctionnalisée par des ligands de ciblage pour des applications en biologie (Figure 46).



Figure 46 : Structure de Quantum Dots à base de cadmium (Cd), soufre (S), sélénium (Se) et zinc (Zn).¹²³

La propriété la plus exploitée dans le domaine de la nanomédecine est leur fluorescence. En effet, la longueur d'onde de la lumière émise par un QD, après excitation par une source lumineuse, peut être contrôlée en ajustant sa taille (Figure 47).

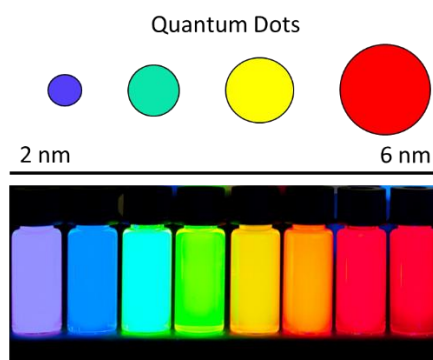


Figure 47 : Fluorescence des Quantum Dots en fonction de leur taille.

La fonctionnalisation de ces nanoparticules a également permis leur adressage spécifique. Par exemple, Gao et al. ont décoré des QDs avec un anticorps spécifique des antigènes de la membrane prostatique.¹²⁴ Ces nanoparticules ont montré un ciblage efficace dans les cellules tumorales C4-2 exprimant ces antigènes et une rapide accumulation dans la tumeur de la prostate chez la souris (Figure 48).

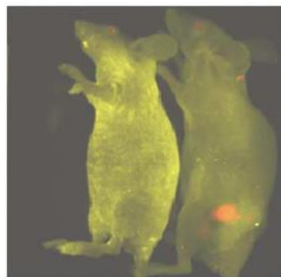


Figure 48 : Ciblage et imagerie *in vivo* d'une tumeur de la prostate (en rouge) chez la souris après injection de QDs développés par Gao *et al.*¹²⁴

Ces nanoparticules présentent donc un intérêt grandissant pour l'imagerie *in vivo*. Cependant, le plus gros frein à leur développement est leur toxicité.¹²⁵ En effet, les QDs peuvent subir diverses transformations : agrégation, perte de la coquille, dissolution du cadmium, production de ROS. Des études toxicologiques ainsi que le développement de nouveaux nanocristaux « safer by design » sont actuellement en cours.¹²⁶

2.2 Nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques les plus courantes sont les nanoparticules polymériques, les dendrimères et les nanoparticules lipidiques. Elles sont généralement de tailles plus importantes que les nanoparticules inorganiques (> 30 nm). De par leur structure, ces nano-objets permettent l'encapsulation de médicaments et ainsi un meilleur contrôle de leur délivrance. Ceci a notamment permis d'améliorer de façon significative l'efficacité thérapeutique et de limiter les effets secondaires de médicaments déjà approuvés.

Deux types de nanoparticules organiques, les nanoparticules polymériques et les dendrimères, sont présentées ci-dessous. Les nanoparticules lipidiques : liposomes, nanoparticules solides, nanocapsules lipidiques et les transporteurs lipidiques nanostructurés qui ont été utilisés au cours de cette thèse feront l'objet d'une partie plus détaillée allant de leur structure à leur intérêt pour l'encapsulation et la vectorisation de principe actif.

2.2.1. Nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques, composées d'un ou plusieurs polymères, synthétiques ou naturels, sont généralement de forme sphérique et rigide.

Les premières nanoparticules polymériques, composées de poly-(alkyl-cyanoacrylates), ont été développées en 1979 par Couvreur *et al.*¹²⁷ Aujourd'hui, les polymères les plus couramment utilisés

sont des polymères synthétiques, en particulier le poly-(acide glycolique) (PGA), le poly-(acide lactique) (PLA) et le copolymère le poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA).¹²⁸ D'autres polymères naturels tels que le chitosan ou l'albumine sont utilisés. Ces polymères ont l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables. Leur stabilité permet une utilisation avec un risque limité dans le domaine médical pour l'encapsulation de nombreuses substances thérapeutiques.¹²⁹ L'intérêt de ces nanoparticules polymériques sera illustré ci-dessous à travers l'exemple de l'Abraxane[®], un anticancéreux mis sur la marché en 2006. Ce médicament est composé de nanoparticules d'albumine encapsulant le paclitaxel[®], un agent anti-tumoral utilisé en particulier contre le cancer du sein et le cancer des ovaires.¹³⁰ Malgré son indéniable efficacité, le paclitaxel possède de nombreux effets secondaires, inhérents à sa nature d'agent cytotoxique. De plus, l'utilisation d'huile de ricin polyéthoxylée (CrEL) dans sa formule commerciale (Taxol[®]) entraîne des effets indésirables supplémentaires comme des réactions d'hypersensibilité aiguë et des neuropathies périphériques.¹³¹ Pour s'affranchir de l'utilisation de cette huile, le paclitaxel[®] a donc été encapsulé dans des nanoparticules à base d'albumine, commercialisées sous le nom d'Abraxane[®] (Figure 49a). L'albumine, la protéine la plus abondante dans le plasma, est en effet un candidat idéal pour la conception de tels nanovecteurs.

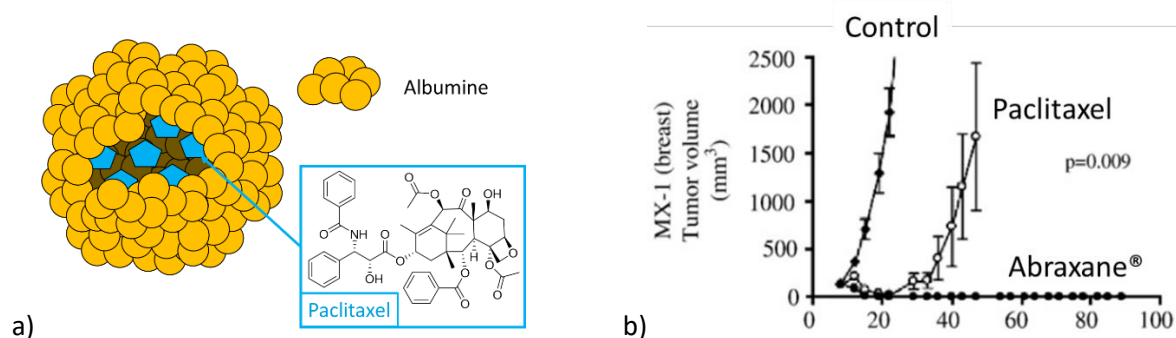


Figure 49 : a - Représentation schématique de paclitaxel encapsulé dans une nanoparticule d'albumine (Abraxane[®]) b - Activité anti-tumorale de l'Abraxane[®] (30 mg/kg/d) et du Taxol[®] (solution injectable) (13.4 mg/kg/d) sur le modèle de xéno greffe de tumeur MX-1.¹³²

En plus de réduire les effets secondaires dus à l'huile de ricin polyéthoxylée, l'Abraxane[®] possède une activité anti-tumorale supérieure au Taxol[®] (Figure 49b). Ce résultat est en partie expliqué par une interaction entre l'albumine et les récepteurs membranaires des cellules tumorales médiant l'endocytose des nanoparticules.¹³³

L'utilisation de nanoparticules à base de polymères présente donc de nombreux avantages. Cependant la production de ces nanoparticules nécessite souvent l'utilisation d'agents réticulants toxiques. L'élimination complète de ces composés est difficile du fait des méthodes de purification imparfaite de ces nano-objets.

2.2.2. Dendrimères

L'étymologie du mot "dendrimère" vient du grec « dendri- » (du grec dendros) faisant référence à l'arbre et « -mère » (du grec meros) "une portion". Les dendrimères sont des macromolécules arborescentes composées de polymères branchés entre eux formant une structure sphérique tridimensionnelle (Figure 50).

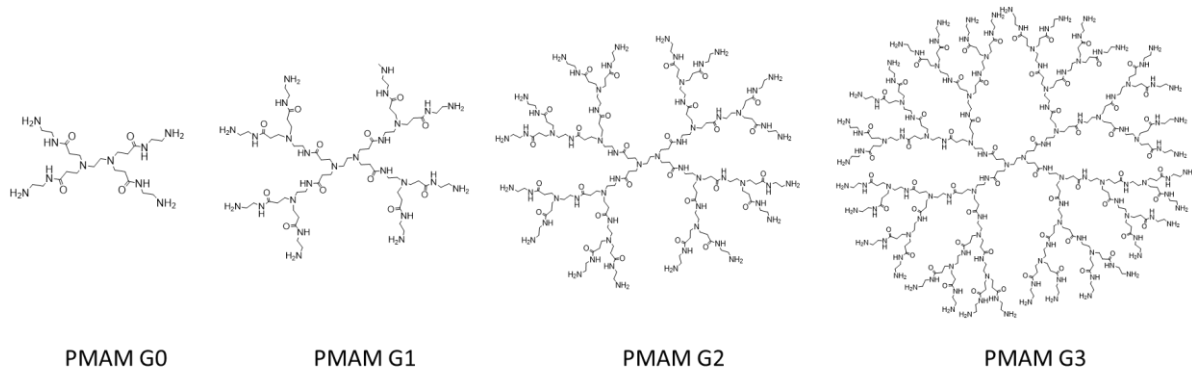


Figure 50 : Synthèse de dendrimères à partir de PAMAM.

Ces nanoparticules sont composées de 3 parties :

- Un cœur, constituant le point central permettant de moduler la forme et les propriétés de ces assemblages
- Une cavité interne composée de séquences répétitives de polymères (dendrons) et permettant d'encapsuler un principe actif
- Les groupements terminaux en surface qu'il est possible de fonctionnaliser.¹³⁴

Les dendrimères les plus courants et utilisés aujourd'hui en biologie sont composés de polyamidoamine (PAMAM, Figure 50). Leur taille et la possibilité de fonctionnalisation de leur surface font des dendrimères des nano-objets prometteurs et versatiles dans le domaine de la nanomédecine. Par exemple, le VivaGel[®], commercialisé pour la première fois en Australie en 2019, est un médicament contre la vaginose bactérienne, une infection par des micro-organismes. Ce dendrimère est formé à partir d'un cœur L-lysine amide benzhydrylamine sur lequel sont greffées 4 couches successives de L-lysine (Figure 51). Sa surface comporte ainsi 32 fonctions amines qui ont été fonctionnalisées via un lien amide par des motifs 1- (carboxyméthoxy) naphthalène-3,6-disulfonate(Figure 51).¹³⁵

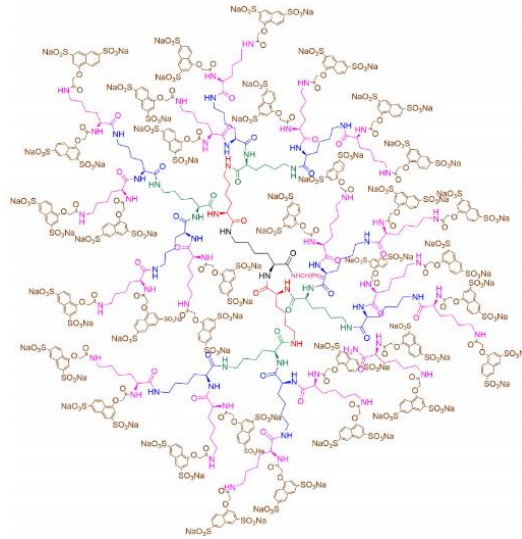


Figure 51 : Structure de dendrimère à base de poly-lysine.¹³⁶

Ce dendrimère, mélangé à un gel (Carbopol®) est capable de recouvrir la paroi vaginale et ainsi prévient l'adhésion de bactéries ou de virus. Il est également en cours d'étude pour la prévention de l'infection par le VIH. Des études sur primates ont en effet montré un effet viruside contre celui-ci.^{135,137}

2.3 Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont, comme leur nom l'indique, des nanoparticules à base de lipides. Les lipides sont une famille de composés comprenant les graisses (acides gras), cires, ou phospholipides. Ils sont composés d'une ou plusieurs chaînes carbonées de longueur variables portant à leur extrémité un groupement polaire. A température ambiante, les lipides peuvent se présenter sous forme solide (cires) ou liquide (huiles). L'avantage de l'utilisation de lipides pour la conception de nanoparticules est leur biocompatibilité et leur faible toxicité. En effet, les lipides sont présents en grande quantité dans l'organisme et en particulier au niveau des membranes cellulaires ("bicouche lipidique"). De plus, une des fonctions principales des lipides est le stockage d'énergie sous forme d'acide gras dans les adipocytes. Les lipides sont donc largement reconnus et tolérés par l'organisme, permettant aux nanoparticules lipidiques de bénéficier d'un temps de circulation dans l'organisme accru par rapport aux autres nanoparticules décrites précédemment. Les nanoparticules lipidiques sont constituées d'un cœur pouvant accueillir des molécules actives et d'une couronne pouvant apporter de nouvelles fonctions, notamment de stabilité en milieu biologique ou d'adressage spécifique.

Les nanoparticules lipidiques peuvent être formulées en milieu aqueux, des tensioactifs sont alors utilisés afin de stabiliser leur dispersion. Ces composés sont des molécules amphiphiles, possédant une

tête hydrophile et une queue hydrophobe. Leur nature et la quantité utilisée permettent de contrôler des paramètres tels que la taille et la stabilité des particules. De plus, ces nanoparticules possèdent des capacités de chargement accrues par rapport notamment aux nanoparticules polymériques et dendrimères ; ceci grâce au grand volume qu'offre leur cœur. Ces nanoparticules peuvent également être fonctionnalisées par des surfactants PEGylés ; couramment des stéarates de PEG₂₀₀₀ qui leur confèrent une meilleure stabilité colloïdale¹³⁸, un temps de circulation plus long¹³⁹ et une augmentation de la biocompatibilité et de la biodisponibilité.¹⁴⁰

Ces propriétés prometteuses ont conduit à la conception d'une large gamme de nanoparticules lipidiques : liposomes, nanoparticules solides (SLN), nanocapsules lipidiques ou transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC) pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou d'imagerie.

2.3.1. Les Liposomes

Les liposomes sont les premières nanoparticules utilisées en nanomédecine. Ils ont été introduits en 1965¹⁴¹ et le nombre de publications dont elles font l'objet n'a cessé d'augmenter depuis les années 70 (Figure 52).

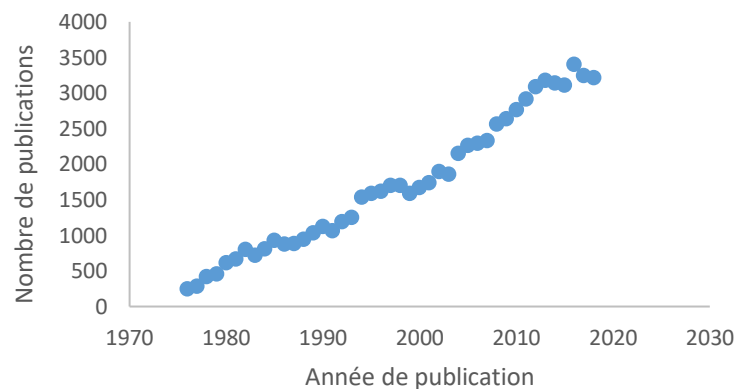


Figure 52 : Evolution du nombre de publications contenant le terme "Liposome" (référence Scopus).

2.3.1.(a) Composition & Structure

Les liposomes sont constitués d'un cœur aqueux entouré d'une bicouche lipidique généralement composée de phospholipides et de stérols (Figure 53).

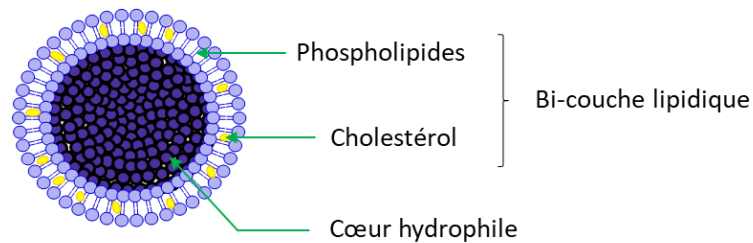


Figure 53 : Structure et composition d'un liposome.

Alors que les phospholipides servent à former la bicouche lipidique, les stérols, généralement le cholestérol, permettent de moduler sa stabilité, sa rigidité, son épaisseur et sa fluidité.¹⁴² La simplicité de ces systèmes leur confère une grande versatilité (nature et quantité des lipides utilisés). Il est ainsi possible de formuler des liposomes de 10 nm jusqu'à plusieurs microns tout en modulant leur potentiel de surface ou encore leur perméabilité.

En plus des caractéristiques liées à la composition lipidique, l'avantage majeur des liposomes est la large gamme de composés qu'il est possible d'encapsuler. En effet, les molécules hydrophiles peuvent être encapsulées dans leur cœur aqueux alors que les composés hydrophobes peuvent être encapsulés dans la bicouche lipidique. Il existe aujourd'hui un grand nombre de liposomes reportés dans la littérature pour l'encapsulation de différents agents thérapeutiques tels que des anti-cancéreux^{143,144}, des antibiotiques,¹⁴⁵ des anti-inflammatoires,¹⁴⁶ des anesthésiques...¹⁴⁷

2.3.1.(b) Formulation

Il existe plusieurs méthodes permettant de préparer des liposomes.¹⁴⁸ Ces méthodes reposent toutes sur la dispersion de lipides en milieu aqueux après élimination d'un solvant organique.

A petite échelle, la majorité des liposomes sont formulés par une méthode mécanique de dispersion des fluides et plus précisément, par hydratation du film lipidique (Figure 54).

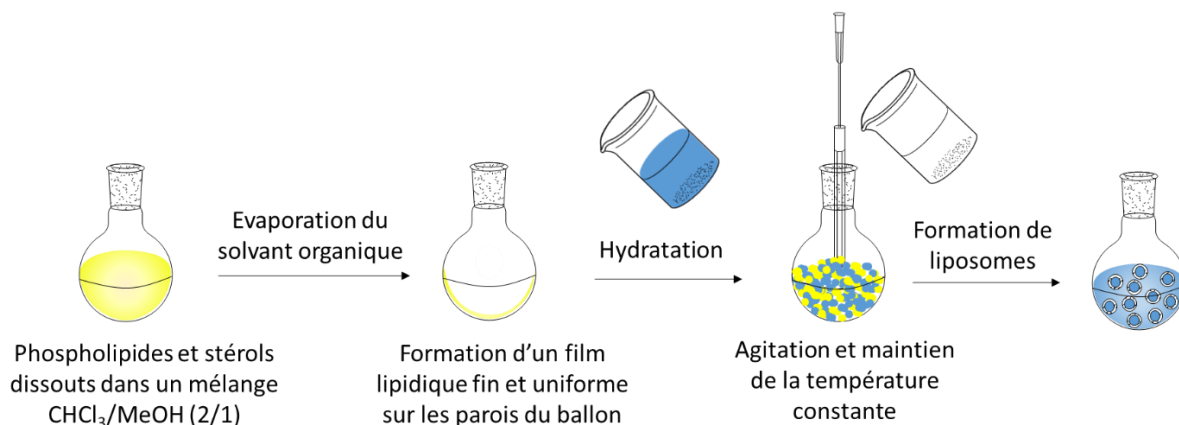


Figure 54 : Formation de liposome par hydratation de film lipidique.

Les phospholipides et stérols sont dissouts dans un, ou un mélange, de solvants organiques. L'évaporation du ou des solvants permet la formation d'un film lipidique, hydraté par ajout de la phase aqueuse. La drogue, dépendamment de sa solubilité, peut être ajoutée à la phase lipidique ou aqueuse. Un contrôle constant de la température lors de cette étape permet la formation de liposomes. Cette méthode, simple et rapide, présente cependant plusieurs inconvénients, notamment des taux d'encapsulation faibles et une distribution de taille très hétérogène.¹⁴¹ Il est donc nécessaire de coupler cette méthode avec des méthodes d'homogénéisation et de réduction de taille par sonication, extrusion ou microfluidisation. En plus de cette large distribution de taille et du faible taux d'encapsulation, les formulations ainsi obtenues ont une faible stabilité lors du stockage. L'incorporation d'une molécule d'intérêt dans la bicouche de phospholipides peut également déstabiliser ces nanoparticules et occasionner la libération rapide du composé *in vivo*. Pour gagner en stabilité, des liposomes de 2^{ème} génération, fonctionnalisés par des surfactants PEGylés (polyéthylène glycol) ont permis d'améliorer significativement leur temps de conservation ainsi que leur temps de circulation *in vivo*.

2.3.1.(c) Exemple de liposome mis sur le marché

La doxorubicine est un agent anti-cancéreux étudié et utilisé depuis les années 70. En plus d'agir au niveau du cycle cellulaire, la doxorubicine augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène entraînant la mort cellulaire programmée (apoptose). Comme toute chimiothérapie, la doxorubicine présente de nombreux effets secondaires : suppression des cellules hématopoïétiques, nausées, vomissements, alopecie. L'un des plus sérieux et dangereux à long terme est la cardiomyopathie irréversible.¹⁴⁹ Afin d'atténuer ces effets indésirables, des formulations liposomales encapsulant la

doxorubicine et fonctionnalisées par des surfactants PEGylés, ont été développées et commercialisées sous le nom de DOXIL[®] (Figure 55).

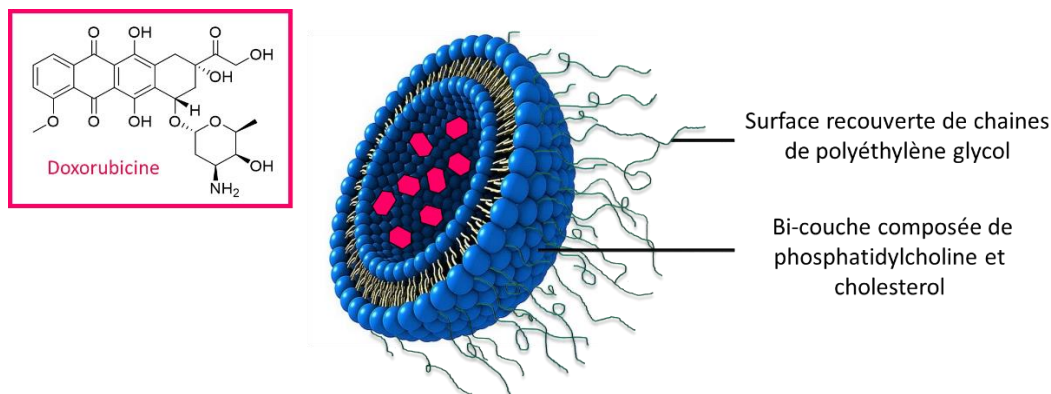


Figure 55 : Représentation schématique de liposomes PEGylés chargés en doxorubicine (DOXIL[®]).

Alors que la doxorubicine seule a un temps de demi-vie de 10 minutes, la concentration sanguine du DOXIL[®] diminue de moitié après 74 h.¹⁵⁰ Cette rétention plus longue facilite leur absorption par les tissus tumoraux grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Ainsi la concentration en doxorubicine à l'intérieur de ces cellules est 10 fois supérieure à celle des tissus sains voisins.¹⁵¹ La concentration plasmatique est également réduite. Ces formulations contenant la doxorubicine ont permis d'augmenter son activité thérapeutique et de limiter ses effets secondaires.

2.3.2. Nanoparticules Lipidiques Solides (SLN)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) ont été développées dans les années 90 par les groupes de Muller¹⁵² et Gasco¹⁵³. Comme leur nom l'indique, ces nanoparticules sont composées de lipides solides à température ambiante. Les SLN présentent, grâce à leur composition et leur structure, de nombreux avantages pour l'encapsulation d'agents thérapeutiques^{154,155} ou d'agents d'imagerie.¹⁵⁶

2.3.2.(a) Composition & Structure

Les SLN sont composées de phospholipides et de triglycérides ou acides gras. Les phospholipides sont généralement de l'acide phosphatidique, la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) ou la phosphatidylsérine. La lécithine est la forme de phospholipides la plus utilisée à ce jour et est formée de PC et PE majoritairement. Ces phospholipides sont utilisés en tant que surfactants afin de stabiliser les nanoparticules lipidiques.¹⁵⁷

Les triglycérides et acides gras entrant dans la composition des SLN sont sous forme solide. Ils sont à l'état cristallin dans le cœur des nanoparticules conférant à ces particules une très grande stabilité.

Le cœur des SLN étant très structuré, peu d'espace est disponible pour l'incorporation de molécules et le taux de charge de composé d'intérêt est limité (principe actif par exemple) (Figure 56).¹⁵⁸

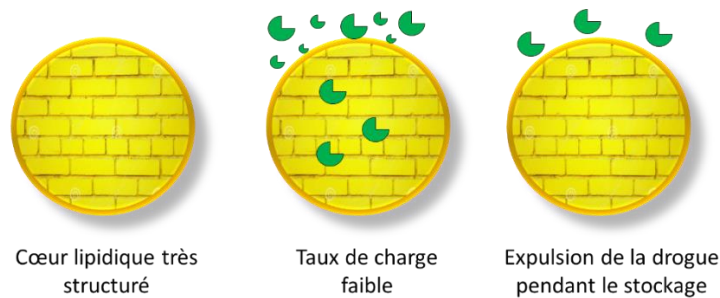


Figure 56 : Schéma de la structure interne des SLN. Le cœur très structuré ne permet pas un taux de charge élevé en principe actif. Les composés ayant réussi à être encapsulés ne resteront pas de manière durable dans le cœur des SLN.

De plus, la rigidité de la structure interne des SLN tend à expulser le composé encapsulé pendant leur stockage.¹⁵⁹

2.3.2.(b) Formulation

Comme les liposomes, les méthodes utilisées pour l'obtention des SLN sont nombreuses et ont été largement décrites dans la littérature¹⁶⁰⁻¹⁶² :

- sonication / homogénéisation à grande vitesse
- homogénéisation à haute pression
- homogénéisation à chaud
- émulsification par évaporation du solvant.

Le principe de ces méthodes repose sur l'apport ou non d'énergie. Cependant pour toutes, la stratégie est identique : une nanoémulsion est obtenue à partir d'un mélange eau/huile à une température supérieure à la température de fusion du lipide. Une étape de cristallisation du lipide est ensuite nécessaire afin d'obtenir des nanoparticules lipidiques solides à température ambiante (Figure 57).

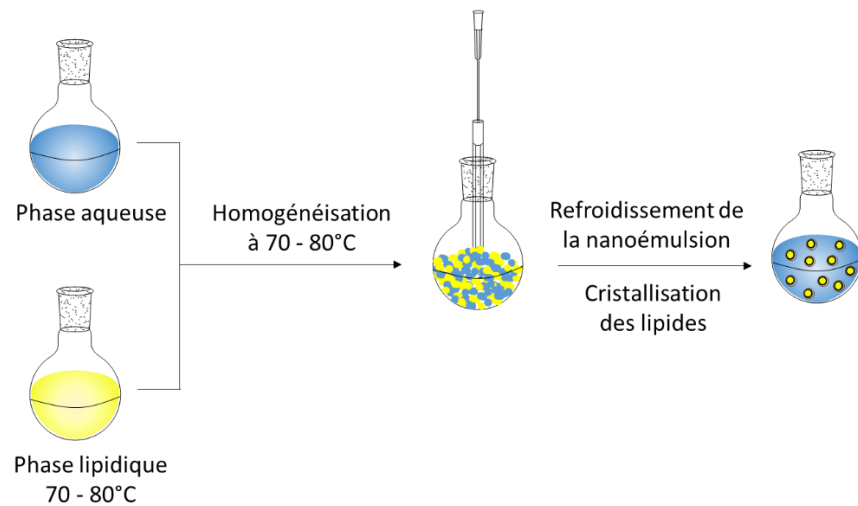


Figure 57 : Principe de préparation de nanoparticules lipidiques solides (SLN).

Le principal inconvénient des SLN est la quantité relativement faible de principe actif qu'il est possible d'encapsuler, majoritairement dû à la structure et l'état polymorphique du cœur lipidique.

2.3.2.(c) Exemple de SLN en cours de développement

Suite aux problèmes d'instabilité et de libération rapide de certaines drogues lorsque vectorisées par des liposomes, de nombreux anti-cancéreux¹⁶³⁻¹⁶⁶ ont été encapsulés dans les SLN afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces drogues.

C'est le cas notamment de la doxorubicine, décrite précédemment (Cf Ch I.2.3.1).¹⁶⁶ Dans cette étude, Kang et al. ont développé des SLN chargées en doxorubicine (SLN-Dox). Ces nanoparticules ont été incubées avec des cellules tumorales MCF-7/ADR, un modèle cellulaire connu pour sa résistance au traitement de la doxorubicine. Les résultats de viabilité cellulaire sont présentés Figure 58.

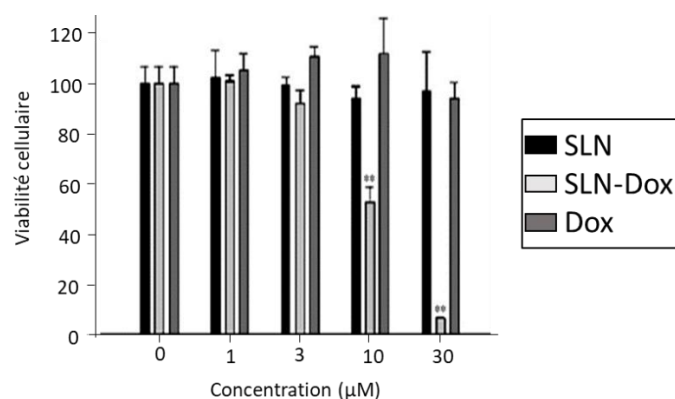


Figure 58 : Viabilité des cellules MCF-7/ADR incubées avec la doxorubicine (Dox) ou des SLN chargée en doxorubicine (SLN-Dox). La viabilité est déterminée par le test au cristal violet 24 h après exposition.¹⁶⁶

La comparaison des résultats de viabilité des différents composés testés a permis de mettre en évidence une activité cytotoxique très largement accrue pour la doxorubicine encapsulée dans les SLN. D'après les auteurs, cette nette amélioration est due à une meilleure accumulation de la drogue à l'intérieur des cellules cancéreuses. L'encapsulation de la drogue dans des SLN a donc permis l'apoptose de cellules résistantes à la doxorubicine.

2.3.3. Nanocapsules lipidiques

Les nanocapsules lipidiques ont été introduites au début des années 2 000 par Heurtault *et al.*^{167,168} pour leur capacité à encapsuler une grande quantité de principe actif. Contrairement aux SLN, ces nanoparticules possèdent un cœur lipidique liquide. Des tensioactifs hydrophiles et hydrophobes permettent la formation et la stabilisation des nanocapsules.

2.3.3.(a) Composition & Structure

Les lipides liquides utilisés dans le cœur sont généralement des mélanges de triglycérides d'acides gras de longueur moyenne (C8 caprylique et C10 caprique). Les tensioactifs hydrophobes sont la lécithine (comme pour les SLN) avec en plus l'ajout de co-surfactants hydrophiles : des surfactants PEGylés (le 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol ; HSPEG par exemple). Ces nanoparticules ont donc un cœur liquide et une coquille très rigide. Cette rigidité est permise grâce aux phospholipides mais également au HSPEG qui possède des chaînes courtes de 660 g/mol et est présent en grande quantité.¹⁶⁹ De plus, le recouvrement de la surface par ces chaînes PEGylées permet de rendre les nanocapsules furtives dans la circulation sanguine (Figure 59).

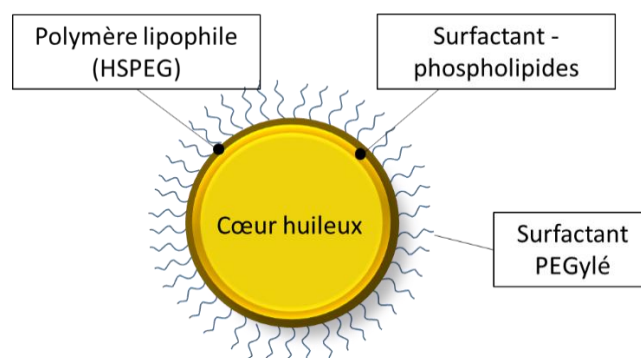


Figure 59 : Structure des nanocapsules lipidiques.

Leur cœur liquide accorde aux nanocapsules une grande capacité de chargement et les surfactants PEGylés présents en grande quantité permettent une très grande stabilité colloïdale aux nanocapsules (< 18 mois).¹⁶⁷

2.3.3.(b) Formulation

Les nanocapsules lipidiques sont formulées selon un procédé d'inversion de phase (huile/eau). Les différents ingrédients (lipidiques et aqueux) sont mélangés et soumis à différents cycles de température allant de 90°C à 35°C (selon le protocole Heurtault *et al*).¹⁶⁷ Les nanocapsules sont ensuite trempées dans l'eau froide afin de stabiliser la suspension colloïdale (Figure 60).

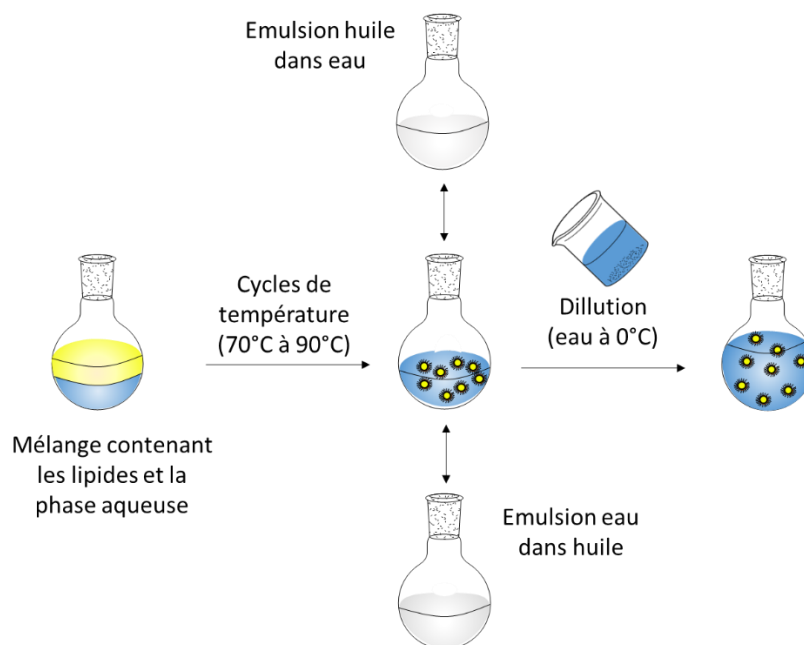


Figure 60 : Processus de préparation des nanocapsules lipidiques.

Grâce à cette méthode de formulation, de nombreux principes actifs ont pu être encapsulés dans les nanocapsules : ibuprofène,¹⁷⁰ paclitaxel,¹⁷¹ étoposide¹⁷² ainsi que des molécules fluorescentes.¹⁷³

2.3.3.(c) Exemple de nanocapsules en cours de développement

La thérapie génique a aujourd'hui pour objectif le développement de vecteurs capables de délivrer de manière spécifique des acides nucléiques à des cellules cibles. Dans le cadre d'une étude sur la transfection de gène par Morille *et al.*,¹⁷⁴ les hépatocytes ont été choisis comme cible afin de sécréter une protéine modèle : la luciférase.

Des nanocapsules lipidiques, chargées en ADN, ont donc été développées par Morille *et al.*¹⁷⁴ La fonctionnalisation de la surface des nanocapsules, nécessaire au ciblage spécifique des récepteurs ASGPR présents à la surface des cellules du foie, a ensuite été effectuée par la méthode de post-insertion. Pour cela, les nanocapsules chargées en ADN ont été co-incubées avec différents surfactants galactosylés : le DSPE-PEG₂₀₀₀-Gal et le F108-Gal (Figure 61).

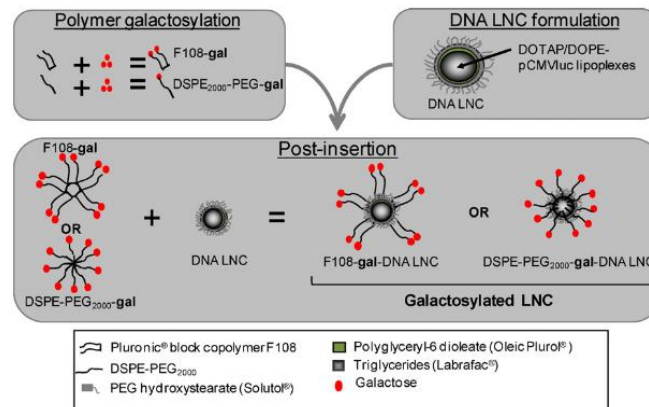


Figure 61 : Structure des nanocapsules lipidiques fonctionnalisées développées par Morille *et al.*¹⁷⁴

Ces nanocapsules ont un diamètre de 130 – 140 nm. L'efficacité de transfection a ensuite été évaluée sur hépatocytes primaires (Figure 62).

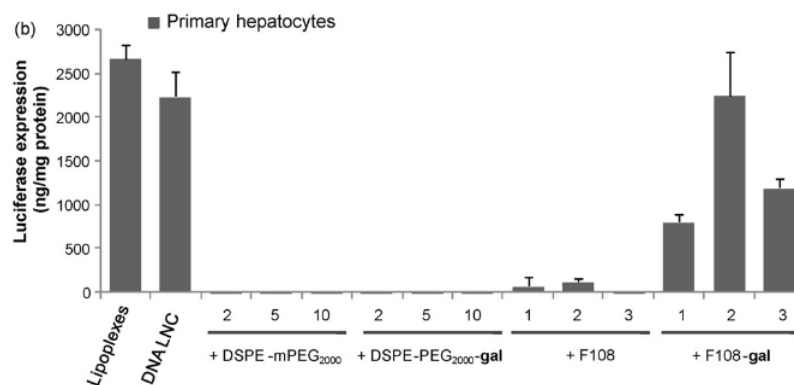


Figure 62 : Résultats d'expression de la luciférase après transfection de plasmide encapsulé dans des nanocapsules lipidiques.¹⁷⁴

Ces résultats montrent une faible internalisation dans les hépatocytes pour les nanocapsules fonctionnalisées par le DSPE-PEG₂₀₀₀-Gal et une meilleure internalisation pour les F108-Gal. En revanche, une excellente capacité de transfection est observée pour les nanocapsules chargées en ADN "nues" (DNA-LNC). Les nanocapsules ont donc un potentiel pour la délivrance de gène dans le cadre de thérapie génique.

2.3.4. Transporteurs lipidiques nanostructurés

Les premiers transporteurs lipidiques nanostructurés (*en anglais Nanostructured Lipid Carriers, NLC*) ont été développés par Muller *et al.* en 2002¹⁷⁵ pour répondre aux limitations des autres systèmes lipidiques notamment la stabilité, le faible taux d'encapsulation et les problématiques de relargage des principes actifs lors du stockage.

2.3.4.(a) Composition & Structure

De par leur composition et leur structure, les transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC) sont des nanoparticules à mi-chemin entre les SLN et les nanocapsules lipidiques.¹⁷⁶ Leur cœur est composé d'un mélange de lipides solides et de lipides liquides (huiles). Leur surface est recouverte de surfactants (souvent des phospholipides) ainsi que de co-surfactants (généralement des surfactants PEGylés¹³⁸). Une liste de lipides et surfactants utilisés dans le cadre de la fabrication de NLC a été établie par Kaur *et al.*¹⁷⁷ et est présentée Tableau 1.

Ingrédients	Composés
Lipides solides	Tristearin, acide stéarique, cétyle palmitate, cholestérol, Precirol® ATO 5, Compritol® 888 ATO, Dynasan®116, Dynasan® 118, Softisan® 154, Cutina® CP, Imwitor® 900 P, Geleol®, Gelot® 64, Emulcire® 61
Lipides liquides	Chaines moyennes de triglycérides, huile de paraffine, 2-octyl dodecanol, acide oléique, squalène, isopropyl myristate, vitamine E, Miglyol® 812, Transcutol® HP, Labrafil Lipofile® WL 1349, Labrafac® PG, Lauroglycol® FCC, Capryol® 90
Surfactants hydrophiles	Pluronic® F68 (poloxamer 188), Pluronic® F127 (poloxamer 407), Tween 20, Tween 40, Tween 80, alcool polyvinyle, Solutol® HS15, tréhalose, déoxycholate de sodium, glycocholate de sodium, oléate de sodium, polyglycerol methyl glucose distearate
Surfactants lipophiles	Myverol® 18-04K, Span 20, Span 40, Span 60
Surfactants amphiphiles	Lécithine d'oeuf, lécithine de soja, phosphatidylcholines, phosphatidyl éthanolamines, Gelucire® 50/13

Tableau 1 : Exemples d'ingrédients utilisés pour la préparation de NLC.¹⁷⁷

Le diamètre des NLC, généralement entre 30 à 200 nm, est modulable suivant la quantité de surfactants et le ratio de surfactants/lipides investis dans la formulation.¹⁷⁸ De par le mélange lipides solides à température ambiante et huile (liquide à température ambiante) utilisé lors de la formulation, le cœur des NLC n'est ni cristallin ni liquide mais plus ou moins « visqueux ». Cette viscosité est

modulable en fonction du ratio huile/cire utilisé. Dépendamment de la nature des lipides et de la méthode de fabrication, la matrice obtenue peut être un cristal imparfait, de type amorphe ou de type multiple (la matrice lipidique solide contient des nanocompartiments d'huile liquide) (Figure 63).

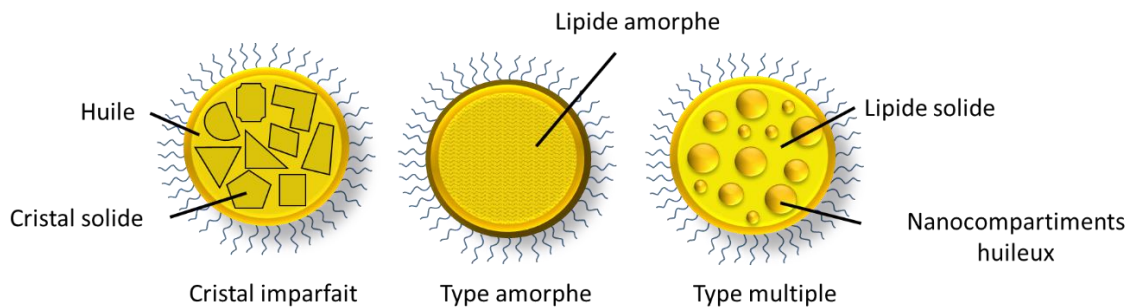


Figure 63 : Structure des différents types de cœurs lipidiques des NLC : cristal imparfait, type amorphe et type multiple.

Les NLC ont donc les avantages liés aux nanoparticules lipidiques (biocompatibilité, délivrance contrôlée...) mais également les propriétés liées aux nanoparticules furtives : stabilité et temps de circulation long. La structure du cœur lipidique offre une grande stabilité, un taux de chargement élevé et permet de limiter les problèmes liés à l'expulsion de la drogue.¹⁷⁹

2.3.4.(b) Formulation

Selon Muller *et al.*¹⁷⁵, la formulation des NLC de type cristal imparfait ou de type amorphe peut être effectuée à partir du processus de fabrication des SLN.

Pour obtenir des NLC avec un cristal imparfait, il est nécessaire d'utiliser différents composés lipidiques afin de construire cette structure imparfaite. Le processus de formulation reste cependant le même que pour les SLN (Figure 57).

Pour obtenir des NLC de type amorphe, l'étape de cristallisation, nécessaire à la formation de SLN, est supprimée. La matrice lipidique obtenue est donc solide mais pas cristalline.

Aujourd'hui, de nombreuses techniques ont été développées afin de produire des NLC.¹⁷⁷ La méthode est choisie en fonction de la solubilité et la stabilité de la drogue à encapsuler. Il est également nécessaire qu'elle soit compatible avec la matrice lipidique utilisée. Les techniques les plus utilisées (notamment pour la production à grande échelle) sont l'homogénéisation à haute pression (à chaud ou à froid) ainsi que la microémulsion (Figure 64).¹⁸⁰

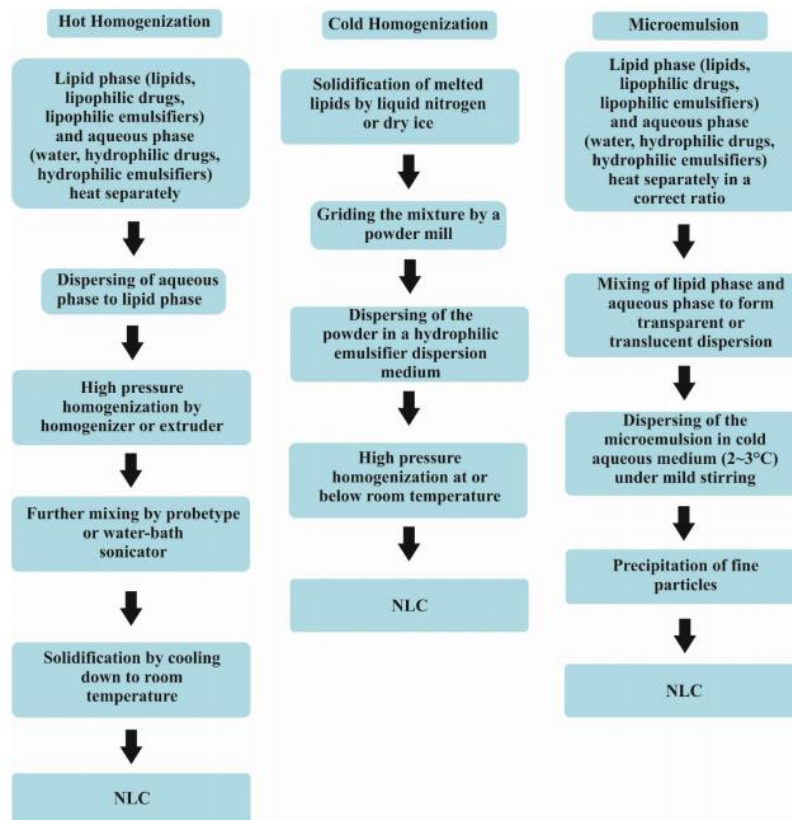


Figure 64 : Différents types d'homogénéisations pour la préparation de NLC : à chaud, à froid et la microémulsion.¹⁸⁰

Il existe cependant beaucoup d'autres méthodes de fabrication :

- emulsification – évaporation du solvant
- emulsification – diffusion du solvant
- injection de solvant
- température d'inversion de phase
- ultrasonication

Cette dernière méthode, sera détaillée par la suite.

2.3.4.(c) Exemple de NLC en cours de développement

Des NLC chargées ont été développées pour une application topique (à la surface de la peau) dans le cadre de traitements contre les troubles musculo-squelettiques.¹⁸¹ Ces troubles sont par exemple de la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose et la spondylarthrite ankylosante et peuvent être traités par Naproxen (NAP) et Ketoprofen (KET). Ces traitements ne traversent pas les différentes couches de la peau et ont donc été encapsulés dans les NLC.

Ces nanoparticules ont été préparées par la technique d'ultrasonication et d'homogénéisation à chaud avec ajout, dans la phase lipidique, de 80 mg de KET ou NAP (1,4 % w/w du contenu total en lipides). Les résultats d'encapsulation sont présentés Tableau 2.

Sample	Preparation method	Mean particle size \pm S.D. (nm)	Drug content (%)
KET loaded NLC	US	335.1 \pm 12.9	1.12
KET loaded NLC	HPH	215.7 \pm 89.9	0.66
NAP loaded NLC	US	380.0 \pm 13.6	1.25
NAP loaded NLC	HPH	404.2 \pm 49.9	1.39

Tableau 2 : Efficacité d'encapsulation des drogues ketoprofen et naproxen dans les NLC par la technique d'homogénéisation à chaud (HPH) et d'ultrasonication (US).¹⁸¹

L'effet anti-inflammatoire des NLC et drogues seules a été évalué sur l'Homme. Pour cela, les différents composés sont appliqués sur la peau puis des érythèmes (rougeurs de la peau) sont induits par exposition aux UVB. La mesure de l'étendue de l'érythème par spectrométrie de réflectance permet d'évaluer la capacité des composés à protéger la peau. Le pourcentage **d'inhibition** de l'érythème est ainsi mesuré (Figure 65).

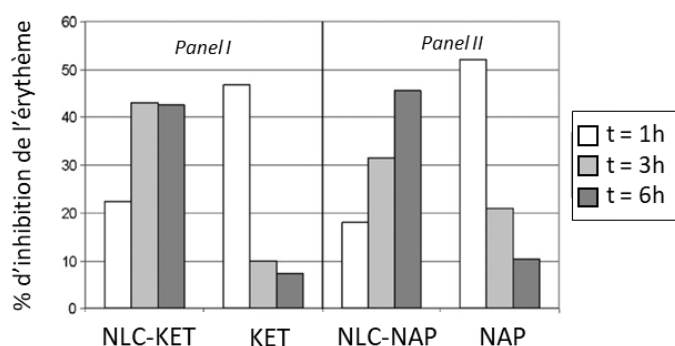


Figure 65 : Pourcentage d'inhibition de l'érythème par différentes formulations topiques contenant KET ou NAP.¹⁸¹

Il apparaît ici que les NLC chargées en drogue ont un effet réduit 1h après application des particules par rapport à la drogue seule. Cet effet s'inverse ensuite à partir de 3h. Ce comportement des drogues libres s'explique en partie par la grande quantité de drogue présente au bout d'1h dans la peau. Les UVB ne pénétrant que les couches supérieures de la peau, la concentration en drogue est à ce moment suffisante pour inhiber la formation d'érythème. Cet effet disparaît ensuite rapidement. Les NLC en revanche montrent un effet d'inhibition prolongé, pouvant s'expliquer par une délivrance prolongée des drogues et une accumulation dans la peau. Ces nanoparticules sont donc également des vecteurs de choix pour des applications topiques.

2.3.5. Résumé

Les avantages et les inconvénients de chacun de ces systèmes à base de nanoparticules sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3) :

Avantages des liposomes	Inconvénients des liposomes
Biocompatibilité, biodégradabilité, non-immunogène	Formulations polydisperses
Diminution de la toxicité de la drogue	Faible stabilité pendant le stockage
Possibilité de fonctionnalisation pour un ciblage actif	Demi-vie courte dans la circulation sanguine
	Faible taux d'encapsulation
	Libération de la drogue rapide
	Coût de production élevé
Avantages des SLN	Inconvénients des SLN
Biocompatibilité, biodégradabilité, non-immunogène	Faible taux d'encapsulation
Diminution de la toxicité de la drogue	Expulsion de la drogue pendant le stockage
Possibilité de fonctionnalisation pour un ciblage actif	Echantillons très dilués
Grande stabilité	
Formulation sans solvant organique	
Avantages des nanocapsules	Inconvénients des nanocapsules
Biocompatibilité, biodégradabilité, non-immunogène	Encapsulation de composés lipidiques liquides à
Diminution de la toxicité de la drogue	TA ou totalement solubles dans l'huile
Possibilité de fonctionnalisation pour un ciblage actif	
Grande stabilité	
Formulation sans solvant organique	
Cœur huileux pour l'encapsulation de composés lipophiles	
Avantages des NLC	Inconvénients des NLC
Biocompatibilité, biodégradabilité, non-immunogène	Adapté uniquement aux molécules lipophiles
Diminution de la toxicité de la drogue	Caractérisation difficile due à la composition
Possibilité de fonctionnalisation pour un ciblage actif	complexe du cœur lipidique
Grande stabilité	
Formulation sans solvant organique	
Cœur amorphe pour l'encapsulation de composés lipophiles	

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes nanoparticules lipidiques : liposomes, SLN, nanocapsules et NLC.

Les NLC possèdent donc les avantages des SLN et nanocapsules lipidiques combinées, plus particulièrement des stabilités élevées, des taux d'encapsulation importants et un meilleur contrôle du relargage prolongé des principes actifs. Ces nanoparticules sont donc des candidats de choix pour la vectorisation de principe actif et ont fait l'objet de nombreuses études au DTBS.

3. Travaux antérieurs au laboratoire DTBS sur les NLC

Depuis plusieurs années, le laboratoire DTBS s'intéresse à la conception de nanoparticules lipidiques de cœur amorphe appelées Lipidots® pour des applications médicales variées, allant de l'imagerie de fluorescence à la délivrance d'anticancéreux, ainsi qu'au développement de vaccins. Ces NLC sont constituées d'un cœur lipidique composé d'un mélange de lipides liquides et solides, stabilisé par une couche de surfactants. La totalité des ingrédients commerciaux engagés lors de leur formulation sont non toxiques, biocompatibles et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) ou la EMA (European Medicines Agency). Leur production par émulsification en utilisant les ultrasons permet une faible dispersion en taille (< 20 %) des formulations (à l'échelle du mL). L'homogénéisation à haute pression (HPH) est utilisée pour une montée en échelle de la production des nanoparticules (production de l'ordre du litre dans le laboratoire DTBS). De plus, ces nanoparticules sont également extrêmement stables (> 12 mois, contrôle de taille et PDI) et permettent la libération prolongée de principe actif.

3.1 Composition, formulation & structure

Les Lipidots® sont composés de (Figure 66) :

- Suppocire NC™, un mélange de mono, di ou triglycérides saturés avec des chaînes aliphatiques allant de C8 à C16.
- Huile de soja « super raffinée » contenant des triglycérides saturés et insaturés avec des chaînes acyles de C16 à C18.
- Lécithine, une combinaison d'acides gras et de phospholipides : phosphatidylethanolamine et phosphatidylcholine (surfactants lipophiles).
- Myrj™ S40, un mélange de PEG-OH, stéarate de PEG et palmitate de PEG (surfactants hydrophiles).¹³⁸

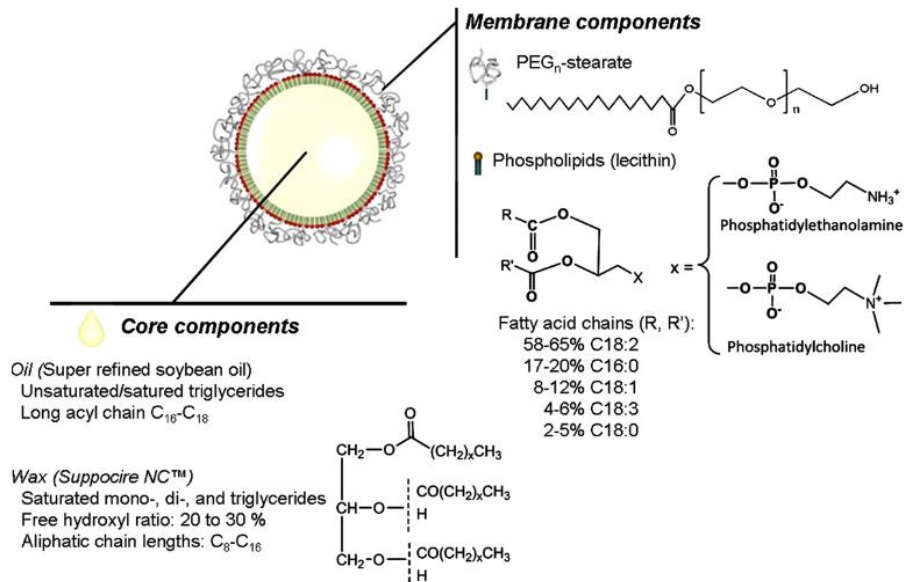


Figure 66 : Représentation schématique des NLC. Structure moléculaire des composés formant le cœur et la membrane des NLC.¹³⁸

Généralement, leur taille varie de 30 à 120 nm et est modulable en ajustant les proportions d'ingrédients investies dans la formulation.¹⁷⁸ De par la nature des ingrédients qui le constitue (Suppocire et huile de soja), le cœur de ces nanoparticules est amorphe et de viscosité variable en fonction du ratio huile/cire utilisé.¹³⁸

Dans ce travail, les NLC ont été formulées par la technique d'ultrasonication (Figure 67). Le mélange de lipides est ajouté à la phase aqueuse contenant les surfactants PEGylés. Le mélange est placé au niveau d'un sonotrode qui va permettre le cisaillement de la phase lipidique dans la phase aqueuse. Des cycles de sonications sont effectués jusqu'à stabilisation (taille et PDI) de la suspension colloïdale.

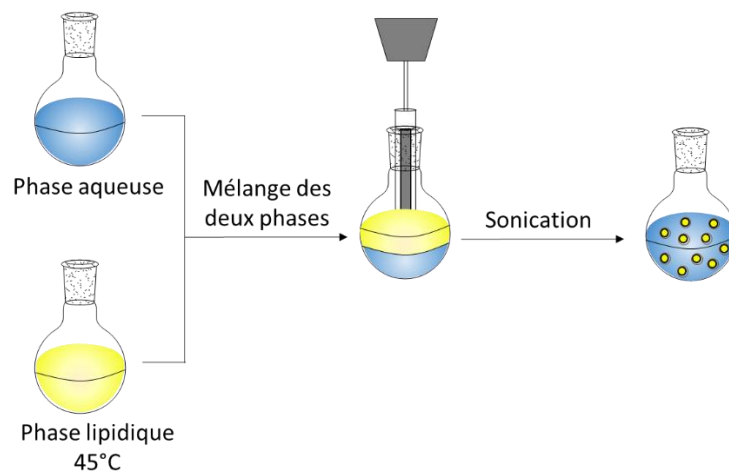


Figure 67 : Formulation des NLC par ultrasonication.

3.2 Encapsulation

Ces nanoparticules ont été conçues à l'origine pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles pour l'imagerie de fluorescence *in vivo* de tumeurs pour l'assistance à la chirurgie.

Dans un premier temps, des NLC chargées en fluorophores lipophiles à base de cyanine (DiD, DiI, DiO, DiR) ont été développés (Figure 68).^{182,183}

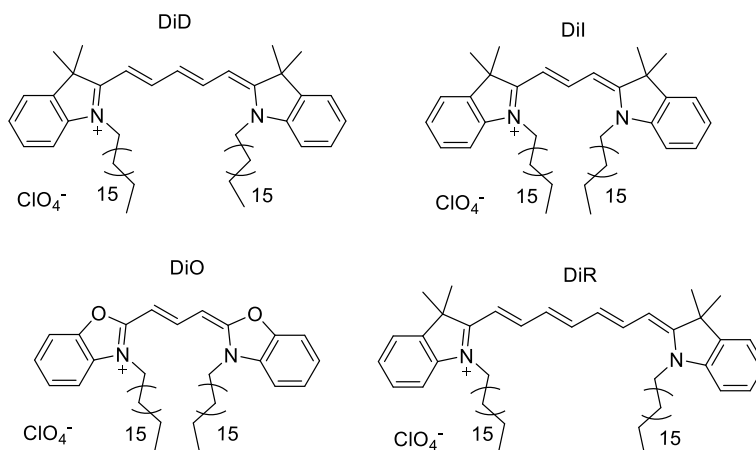


Figure 68 : Structure des fluorophores utilisées pour le chargement de NLC (DiD, DiI, DiO, DiR).

Les chaînes lipophiles en C18 présentes sur ces fluorophores ont permis leur encapsulation de manière très efficace, avec un taux d'encapsulation moyen de 94 %. De plus, le chargement n'affecte ni la taille des particules, ni leur stabilité qui reste supérieure à 12 mois. Les spectres d'absorption et d'émission de ces fluorophores ne sont pas modifiés suite à leur encapsulation.¹⁸² Contrairement aux fluorophores seuls, les taux de photoblanchiment sont très faibles (2 % à 3% pour une illumination de 1h).¹⁸³ Suite à ces excellents résultats, un autre fluorophore, le IR780 modifié par des chaînes en C18 afin de le rendre lipophile (Figure 69), a été encapsulé de la même manière dans les Lipidots®. Le taux d'encapsulation pour ce composé est d'environ 80 % et la stabilité supérieure à 6 mois. Ce nouvel agent de nano-imagerie, nommé LipImage™, a été publié en 2013.¹⁸⁴

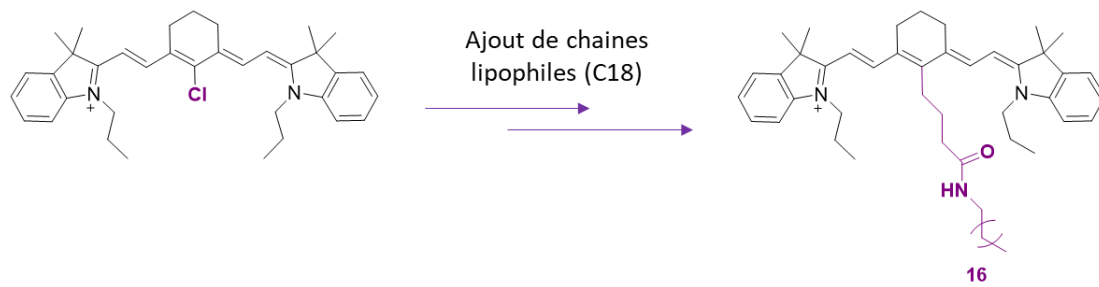


Figure 69 : Modification du fluorophore IR780 par l'ajout de chaînes C18 afin de le rendre lipophile et permettre son encapsulation dans les NLC.

Ces résultats soulignent la capacité des NLC à encapsuler de manière très efficace des molécules lipophiles en conservant une bonne stabilité. De plus, ils suggèrent que la lipophilie des composés encapsulés peut être modulée par l'ajout de chaînes alkyles de longueur adaptée.

3.3 Biodistribution

De précédentes études de biodistribution ont également été effectuées au laboratoire DTBS.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ Pour cela, des NLC chargées avec un fluorophore (le DiD) et contenant l'oléate de cholestérol marqué au ¹⁴C ont été injectées dans un modèle murin. La répartition des nanoparticules dans les différents organes a ainsi pu être établie en mesurant les intensités de fluorescence et la radioactivité. Elles ont permis de mettre en avant les organes de prédilection pour l'accumulation de ces nanoparticules, à savoir le foie, les ovaires et les glandes surrénales (Figure 70).

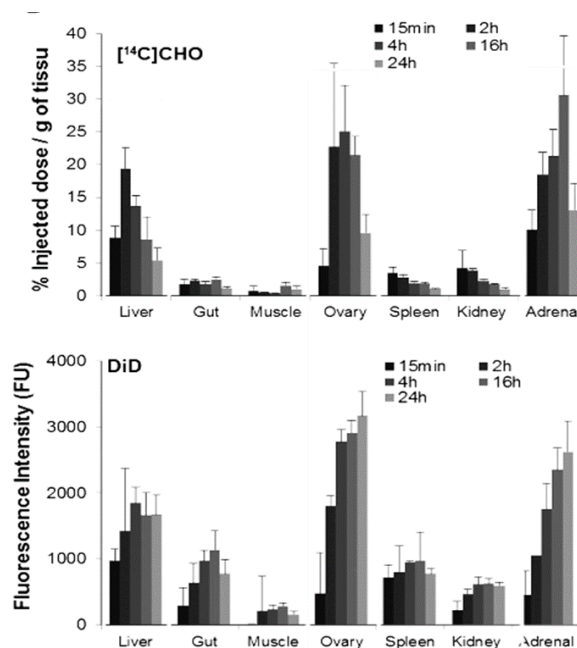


Figure 70 : Accumulation de DiD et [¹⁴C]CHO après injection en intra-veineuse de nanoparticules chargées en DiD et [¹⁴C]CHO dans des souris femelle FVB.¹⁸⁵

La dose maximale en DiD retrouvée dans les ovaires était 30 % de la dose injectée / g de tissu, pour les surrénales 30 % et pour le foie 20 %, 48 h après injection.

Contrairement aux nanoparticules artificielles communes (liposomes,¹⁸⁹ nanoparticules polymériques,¹⁹⁰ ou nanoparticules d'or¹⁹¹), ces NLC s'accumulent dans le foie mais ne sont pas présents dans la rate. Cette biodistribution est proche de celle observée avec les lipoprotéines.¹⁹² La composition lipidique des NLC semble leur conférer un comportement proche de ces nanostructures naturellement présentes dans l'organisme. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de Mérian *et al.*¹⁸⁶ où l'accumulation de NLC dans les ovaires et les surrénales est une conséquence de la composition lipidique des nanoparticules. L'hypothèse émise alors est que les NLC seraient transformées dans la circulation sanguine en particules de type "Very Low Density Lipoprotein" (VLDL). Elles seraient ensuite reconnues par les récepteurs aux lipoprotéines surexprimés dans les glandes surrénales et le foie.¹⁹³ Ces hypothèses mécanistiques doivent cependant être confirmées mais suggèrent une accumulation médiée par la composition lipidique des NLC.

Dans le cas de notre projet, la métabolisation de ces nanoparticules par le foie est donc encourageante pour la vectorisation de nos chélateurs de cuivre vers cet organe.

3.4 Toxicité

Les nanoparticules lipidiques sont connues pour leur faible toxicité, 10 fois inférieure à celle des nanoparticules polymériques.¹⁹⁴ Pour appuyer ces résultats, des essais de toxicité ont précédemment été effectués *in vitro* et *in vivo*.^{183,184}

Sur la lignée cellulaire de fibroblastes (3T3), ces tests ont montré la faible toxicité des NLC avec une IC50 supérieure à 1 000 µg/mL de lipides (Figure 71).^{184,187}

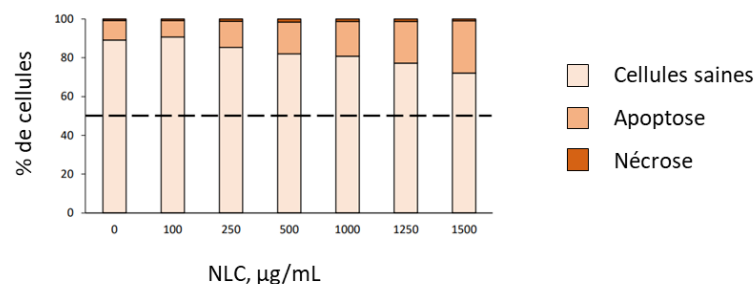


Figure 71 : Cytotoxicité des NLC sur lignée de fibroblastes NIH/3T3 après exposition de 24h suite au marquage des cellules en apoptose (annexinV-FITC) et des cellules en nécrose (iodure de propidium).¹⁸⁷

Les études effectuées sur le modèle murin après injection de 150 mg/kg de NLC n'ont montré aucun signe de toxicité. Tous les animaux ont survécu au moins 6 semaines après l'administration des nanoparticules et n'ont montré aucun signe d'une potentielle toxicité.^{188,195} Des études sur modèle

canin, dans le cadre de la chirurgie assistée par fluorescence en présence de nanoparticules fluorescentes, n'ont révélé aucun effet lié à l'injection de nanoparticules. Aucun signe d'hypersensibilité ou de douleur n'a été observé. De plus, aucune perte de poids, d'appétit ou aucun comportement anormal n'a été mis en évidence chez ces animaux dans les jours suivants l'opération.¹⁹⁶

Ces nanoparticules présentent donc une faible toxicité, compatible avec le développement de nouvelles solutions thérapeutiques notamment dans le cadre de la maladie de Wilson.

3.5 Fonctionnalisation

3.5.1. Fonctionnalisation par un anti-gène

Dans le cadre de la lutte contre le SIDA, des NLC décorées à leur surface par l'antigène p24 ont été conçus.¹⁹⁷ Cette protéine p24 est la cible de nombreuses études immunologiques^{198,199} et est un candidat intéressant pour le développement de vaccin à base de NLC.

Pour lier ces antigènes, des fonctions maléimides permettant un couplage avec un thiol, ont été dans un premier temps introduites à la surface des NLC. Pour cela, un surfactant PEG-maléimide a été utilisé lors de la formulation. Ensuite, l'antigène p24 sur lequel des fonctions thiol ont été introduites (p24-SH) a pu réagir de manière spécifique avec les fonctions maléimides en surface (Figure 72). Cette stratégie "post-synthèse" a permis d'accéder à des NLC fonctionnalisées à raison de 50 protéines p24 par particule (NLC-p24).

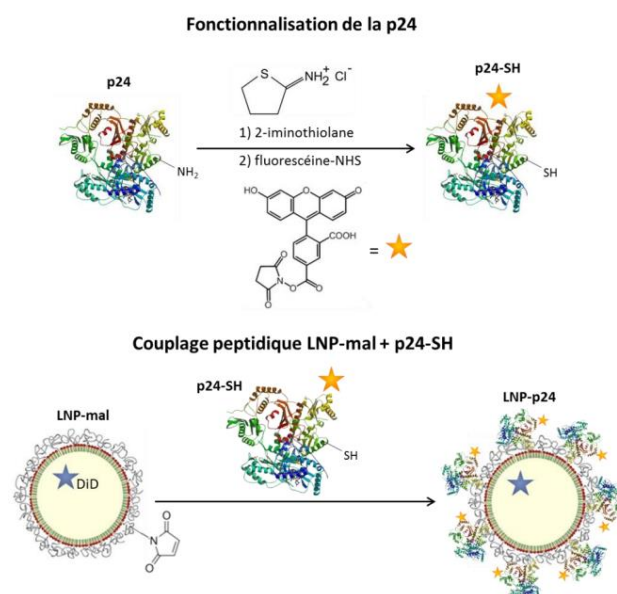


Figure 72 : Greffage de la protéine p24 à la surface des NLC par réaction spécifique thiol-maléimide. La p24, marquée par un fluorophore (fluorescéine) est modifiée par greffage d'un thiol à l'aide du 2-iminothiolane ; les fonctions amine sont converties en thiols.¹⁸⁷

De plus, il est connu que l'ajout d'adjuvant (tel que le CpG, répétitions de cytosine-guanine non méthylés) dans les formulations vaccinales permet une stimulation de la réponse immunitaire.²⁰⁰ Afin d'obtenir une réponse immunitaire maximale, le motif CpG (chargé négativement) a été greffé à la surface de NLC cationiques par interaction électrostatique (NLC-CpG).

Un mélange de ces nanoparticules NLC-p24 et NLC-CpG, p24 seul, ou adjuvant CpG seul, ont été co-injectés chez le macaque afin d'évaluer la réponse immunitaire au travers de la quantité d'anticorps anti-p24 produite (Figure 73).

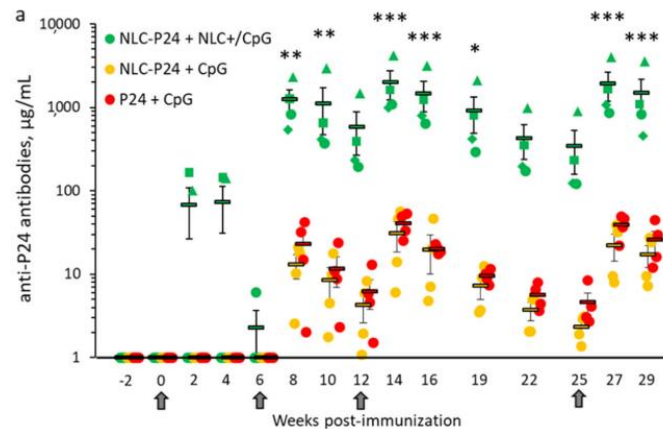


Figure 73 : Réponses immunitaires chez le macaque ($n=4$) suite à 4 immunisations intradermales avec des formulations en NLC contenant un équivalent de 64 μg p24 et 253 μg CpG. Chaque macaque est représenté par un cercle, triangle, carré ou diamant. Les tirets représentent la moyenne pour chaque groupe, et les barres indiquent l'erreur standard à la moyenne. Les flèches sous l'axe des abscisses indiquent les immunisations.¹⁹⁷

La quantité d'anticorps anti-p24 produite suite à la co-injection NLC-p24 + CpG n'est pas significativement différente du p24 + CpG. En revanche, l'utilisation des deux nano-formulations NLC-p24 et NLC-CpG augmente significativement la quantité d'anticorps produite.

3.5.2. Fonctionnalisation par un peptide cyclique (cRGD)

Dans le domaine de la lutte contre le cancer, les NLC ont été fonctionnalisées par des peptides cycliques RGD (cRGD) connus pour cibler les intégrines $\alpha\beta_3$.^{188,201} Ces intégrines sont des récepteurs surexprimés au niveau des vaisseaux formés pendant le développement de la tumeur ce qui en fait des candidats pertinents pour la délivrance d'agent anticancéreux ou d'imagerie des tumeurs.

Les NLC ont été fonctionnalisées par la stratégie de "post-synthèse" grâce, dans un premier temps, à l'ajout de surfactants PEG-maléimide. Après formulation des NLC-maléimide, le peptide cRGD est ensuite ajouté à la solution de nanoparticules. Grâce au lien spécifique thiol-maléimide, les NLC-cRGD ont été formés.¹⁸⁸

La fonctionnalisation de nanoparticules combinée au chargement avec un fluorophore (DiD) ont ainsi permis l'étude de la distribution de ces particules ciblées chez le modèle murin xenogreffé. Les résultats présentés Figure 74 reportent les intensités de fluorescence après injection de NLC-cRGD (A), NLC-RAD (B ; RAD un peptide non reconnu utilisé comme contrôle négatif) et NLC-OH (C ; particules non ciblées).

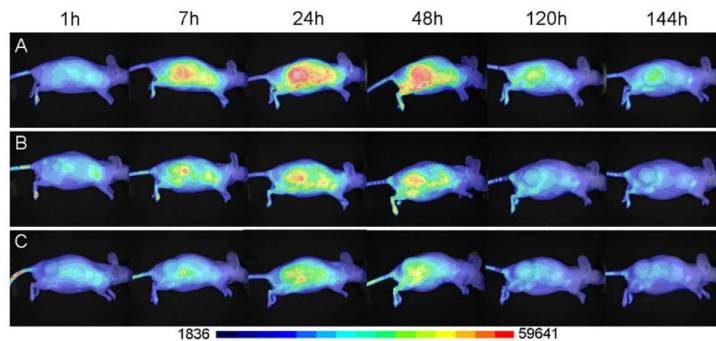


Figure 74 : Injection in-vivo de NLC-cRGD (A), NLC-cRAD (B), NLC-OH (C) (10 nmol DiD, 7.1 mg de lipides dispersés dans 200 mL) sur cellules HEK293(b3) xenografted Nudemice. Les images de fluorescence sont enregistrées à différents temps après injection.¹⁸⁸

Cette étude a mis en évidence une accumulation accrue de NLC décorées par les motifs RGD dans la tumeur par rapport aux autres nanoparticules.

Ces différentes études soulignent l'intérêt des NLC et de leur fonctionnalisation par des ligands pour la délivrance spécifique de principes actifs médiée par une cible biologique. Elles laissent présager des développements prometteurs pour la délivrance de chélateurs du cuivre vers le foie médié par les récepteurs aux asialoglycoprotéines.

Objectifs du projet de thèse

Dans ce chapitre introductif, nous avons vu que la maladie de Wilson est due à une accumulation de cuivre, majoritairement dans le foie, conduisant à des dommages au niveau des tissus. Face à la faible tolérance des patients pour les traitements actuellement utilisés, des pro-chélateurs ont été développés précédemment au laboratoire SyMMES afin d'entrer spécifiquement dans les cellules du foie et piéger efficacement le cuivre en excès. Ces molécules, fonctionnalisées par des résidus GalNAc, ont montré leur efficacité au niveau cellulaire et sont à l'heure actuelle des candidats médicaments prometteurs pour le traitement de la maladie de Wilson. Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques du chélateur de cuivre $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ **12**, l'approche moléculaire précédemment utilisée a été transposée à des nanoparticules lipidiques développées au laboratoire DTBS. Cette stratégie permet ainsi de tirer profit des avantages innés de ces nanoparticules : biocompatibilité, stabilité, grande capacité de chargement, libération contrôlée de la drogue encapsulée.

Ce projet de thèse s'articule donc autour de deux grands axes

- **La fonctionnalisation de nanoparticules lipidiques par des motifs GalNAc pour la délivrance vers le foie** qui fera l'objet du Chapitre II de ce manuscrit de thèse (pp 81-148)
Pour cela, les transporteurs lipidiques nanostructurés ont été formulés avec différentes quantités de surfactants GalNAc. La quantification précise de la densité de surface en GalNAc a été déterminée par Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance (UPLC) couplée à un détecteur à diffusion de lumière (ELSD). L'internalisation de ces NLC fonctionnalisées a ensuite été évaluée sur des cellules hépatiques par cytométrie en flux. Cette étude permettra d'évaluer l'impact de la quantité de GalNAc sur la capacité de ces NLC à entrer dans les cellules hépatiques
- **Le chargement de NLC par des dérivés lipophiles du chélateur $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ et l'étude de leur capacité à délivrer le chélateur dans les hépatocytes** (Chapitre III pp 149-185)
Pour cela des dérivés lipophiles du chélateur $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ ont été synthétisés, encapsulés dans les NLC puis quantifiés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplée à un détecteur UV-Vis. L'effet protecteur du chélateur vis-à-vis de la présence de cuivre en excès a été évalué par des expériences cellulaires.

Ch II. Fonctionnalisation de nanoparticules lipidiques par des motifs GalNac pour la délivrance vers le foie

Fonctionnalisation par des motifs GalNac et quantification

1. Objectifs et démarche

L'objectif de ce projet est l'adressage de chélateurs du cuivre vers le foie via les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). Comme présenté dans l'introduction (Cf Ch I.4.2.1), ces lectines de type C principalement et abondamment exprimées à la surface des cellules hépatiques, ont fait l'objet de nombreuses études en tant que candidats prometteurs pour la délivrance de médicaments vers le foie.^{202,203} Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement le galactose (Gal) et la N-acétyl-D-galactosamine (GalNac), sans distinction d'anomérisation, avec une affinité environ 50 fois plus élevée pour ce dernier.⁹⁸ Cependant l'affinité entre le récepteur et un monosaccharide reste faible. Afin d'améliorer l'efficacité ainsi que la sélectivité du processus de reconnaissance par les ASGPR, la stratégie « multivalence » s'est avérée prometteuse.¹⁰³ Dans cette approche, plusieurs paramètres structuraux tels que la nature, le nombre et l'orientation des monosaccharides jouent un rôle clé comme discuté dans l'introduction (Cf Ch I.4.2.1.(b)). Ces interactions de multivalence peuvent être obtenues en "décorant" la surface de nanoparticules à l'aide de motifs ciblant tels que le Gal ou le GalNac.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de décorer la surface de NLC par des motifs ciblant GalNac afin d'adresser ces nanoparticules vers le foie via les ASGPR. Cette partie est donc consacrée à la formulation de ces nanoparticules avec des quantités variables de GalNac. La quantification précise des sucres permettra l'étude de l'impact de la quantité de GalNac sur leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques.

2. Formulation des NLC fonctionnalisées par des GalNac

2.1 Stratégie

La taille des nanoparticules a une influence significative sur le processus de reconnaissance via les ASGPR. Il est cependant difficile d'établir une taille maximale de reconnaissance. En effet, Rensen *et al.* ont rapporté que les liposomes ayant une taille supérieure à 70 nm ne peuvent être reconnus²⁰⁴ alors que des liposomes de 220 nm décrits par Maitani *et al.*²⁰⁵ sont internalisés dans les hépatocytes. Ces différentes observations ne semblent pas liées à la taille des endosomes formés lors de l'endocytose des nanoparticules médiée par les ASGPR, leur distribution de taille étant large : de 50 à 350 nm.²⁰⁶ Il est cependant assumé que les nanoparticules de petite taille (< 100 nm) sont mieux internalisées dans les hépatocytes. La taille des NLC peut être ajustée en faisant varier le ratio entre les composants de la phase lipidique et de la phase aqueuse.¹³⁸ Au cours de ce projet, nous avons donc choisi de nous focaliser sur l'étude des nanoparticules de diamètre cible 50 nm. De plus, des études préliminaires (Cf annexe 1) ont permis de confirmer la meilleure internalisation cellulaire de ces nanoparticules en comparaison à des nanoparticules de diamètre plus élevé (120 nm).

Afin d'introduire des motifs GalNac à la surface des nanoparticules, deux stratégies sont possibles :

- la fonctionnalisation "post-synthèse" qui consiste à introduire les motifs ciblant directement sur des fonctions réactives disponibles à la surface des nanoparticules formulées préalablement,
- et la fonctionnalisation "pré-synthèse" des nanoparticules, qui consiste à introduire les motifs ciblant sur un surfactant. Le surfactant ainsi fonctionnalisé est incorporé lors de la formulation des nanoparticules.

La stratégie "post-synthèse" est préférée pour le greffage de motifs ciblant à la surface de nanoparticules synthétisées par une stratégie bottom-up, c'est-à-dire des nanoparticules inorganiques ou polymériques.¹³⁴ A titre d'exemple, cette stratégie a été mise en œuvre pour l'introduction sur des nanoparticules d'or de motifs RGD connus pour cibler les intégrines $\alpha v \beta 3$ dans les thérapies anticancéreuses (Figure 75A). Cette stratégie est plus versatile et permet d'économiser et de préserver les (bio)molécules complexes, coûteuses, et fragiles, comme par exemple des anticorps. Cependant, la quantification des motifs introduits à la surface des nanoparticules est plus complexe.

La fonctionnalisation "pré-synthèse" est quant à elle plutôt réservée aux nanoparticules synthétisées par auto-assemblage telles que les liposomes, les micelles ou les nanoparticules lipidiques solides.²⁰⁷ Elle permet une caractérisation précise des surfactants fonctionnalisés avant leur incorporation lors de l'étape de formulation des nanoparticules, ainsi qu'un meilleur contrôle de la quantité de motifs ciblant incorporée. Il est cependant possible lors de cette stratégie d'occasionner une dégradation du

ligand pendant l'étape de formulation. Cette stratégie a, à titre d'exemple, été utilisée avec succès pour l'introduction d'aptamères liés à un cholestérol à la surface de liposomes (Figure 75B).

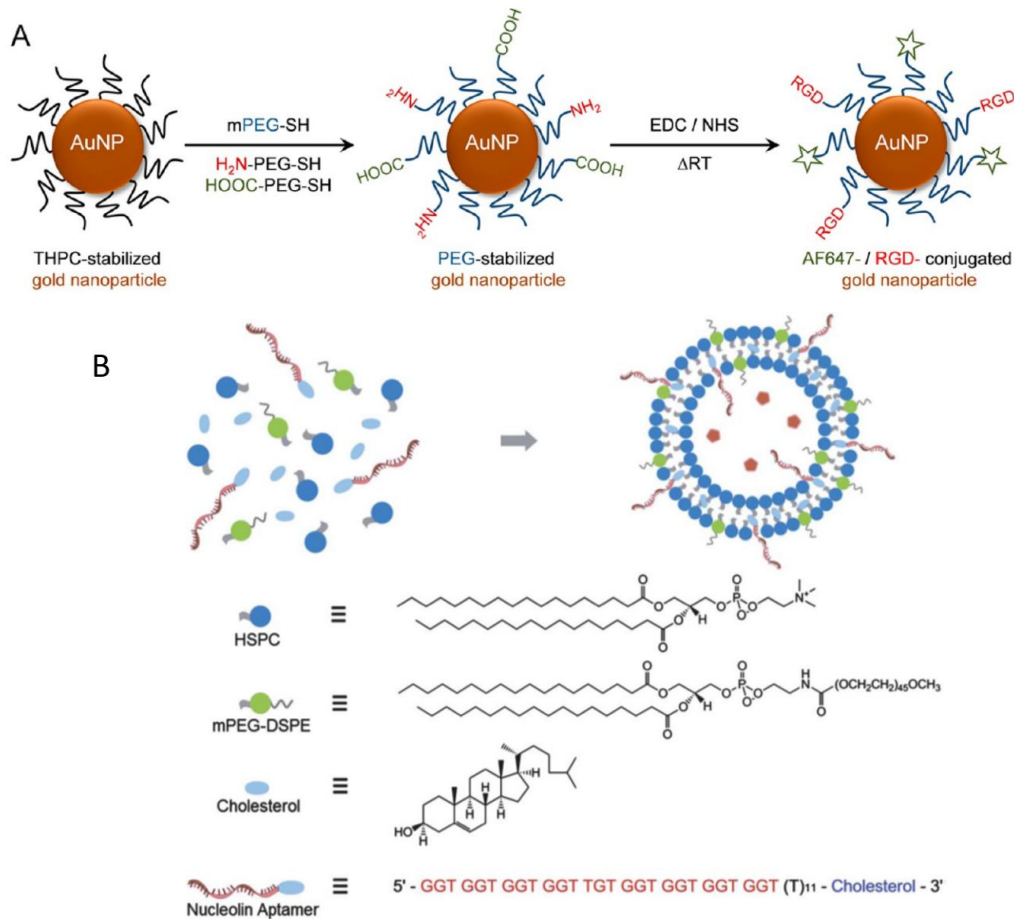


Figure 75 : A titre d'exemple - A - Stratégie post-synthèse : synthèse de nanoparticules d'or fonctionnalisées par un motif peptide (RGD)⁷ B - Stratégie pré-synthèse : synthèse de liposomes fonctionnalisés par des aptamères.¹⁵¹

Les avantages et inconvénients de ces deux stratégies sont répertoriés ci-dessous (Tableau 4) :

	Avantages	Inconvénients
Stratégie pré-synthèse	Caractérisation précise des surfactants Contrôle de la quantité incorporée	Possible dégradation du surfactant fonctionnalisé pendant la formulation
Stratégie post-synthèse	Versatile Economie et préservation de (bio)molécules couteuses et rares	Quantification complexe Quantité de ligands incorporés inconnue

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des stratégies pré- et post-synthèses.

Les NLC utilisées dans le cadre de cette thèse sont des nanoparticules assemblées. Nous avons donc opté pour la stratégie pré-synthèse. Pour cela le motif ciblant GalNac a été préalablement introduit sur un surfactant incorporé lors de la formulation.

Ces NLC sont communément formulées en utilisant en tant que surfactant du Myrj™ S40, un mélange de 3 composés : PEG₄₀-OH, PEG₄₀-C16 et PEG₄₀-C18 possédant des chaînes PEG de même longueur (40 unités d'éthylène glycol). Afin de favoriser la reconnaissance par les ASGPR, nous avons choisi de lier le motif GalNac à un surfactant plus long (SA-PEG₁₀₀ comportant 100 unités d'éthylène glycol) que le Myrj™ S40 utilisé classiquement. En greffant le sucre GalNac à l'extrémité d'un surfactant comportant seulement 40 unités d'éthylène glycol, l'enchevêtrement des chaînes PEG à la surface de la nanoparticule pourrait gêner l'accessibilité des motifs GalNac. L'utilisation d'un surfactant comportant 100 unités d'éthylène glycol, devrait permettre d'éloigner ces motifs et de les rendre plus accessibles vis-à-vis des récepteurs (Figure 76).

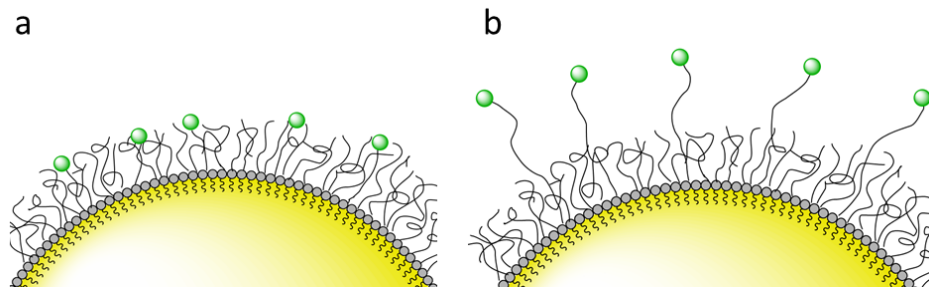


Figure 76 : Représentation schématique de l'accessibilité des GalNac à la surface des NLC. a - cas du greffage des GalNac sur un surfactant PEG₄₀ b - sur un surfactant PEG₁₀₀.

2.2 Synthèse du surfactant SA-PEG₁₀₀ fonctionnalisé par un GalNac

Il a été choisi de fonctionnaliser le SA-PEG₁₀₀ par un GalNac grâce à un lien covalent. Les réactions classiques les plus couramment utilisées dans le cadre de la fonctionnalisation de nanoparticules sont la formation de liaison amide,¹⁷⁴ l'addition de Michael thiol-maléimide,²⁰⁸ la formation de lien disulfure,²⁰⁹ la ligature d'hydrazine et d'oxime²¹⁰ ainsi que la réaction de Huisgen (cycloadditions 1,3-dipolaires azoture-alcyne) catalysée ou non au cuivre²¹¹ (Figure 77).

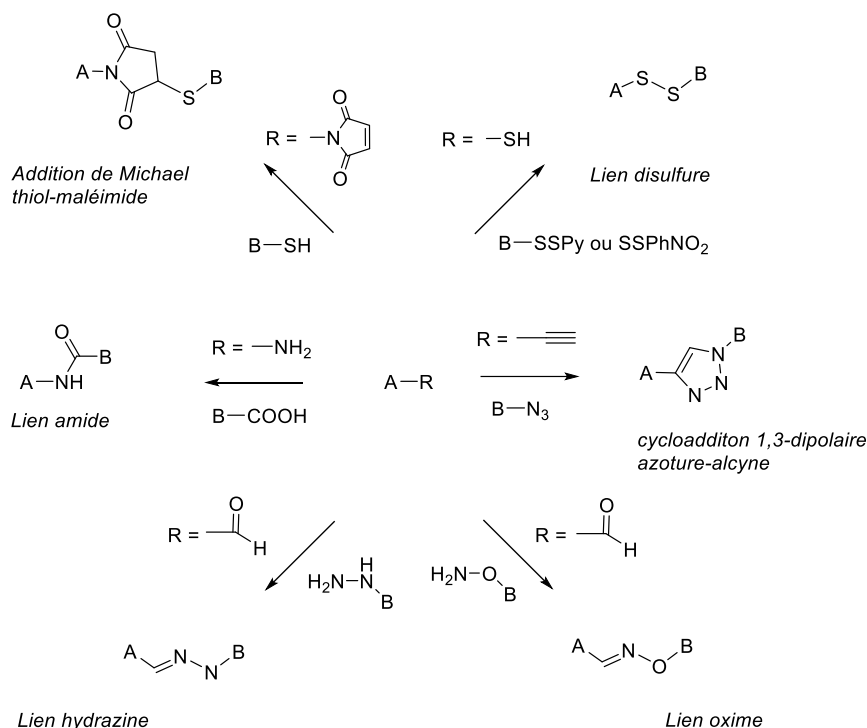


Figure 77 : Schéma des différents types de liens utilisés dans le cadre de nanoparticule.

Dans le cadre de cette thèse, la stratégie adoptée est l'addition de Michael thiol-maléimide, déjà mise en œuvre au laboratoire DTBS pour le greffage de peptides à la surface des NLC.¹⁹⁷ Pour réaliser ce couplage, deux intermédiaires ont été synthétisés : un surfactant SA-PEG₁₀₀ portant une fonction maléimide (SA-PEG₁₀₀-maléimide **9**) et un dérivé du GalNac portant un motif SSPy **6** (Figure 78).

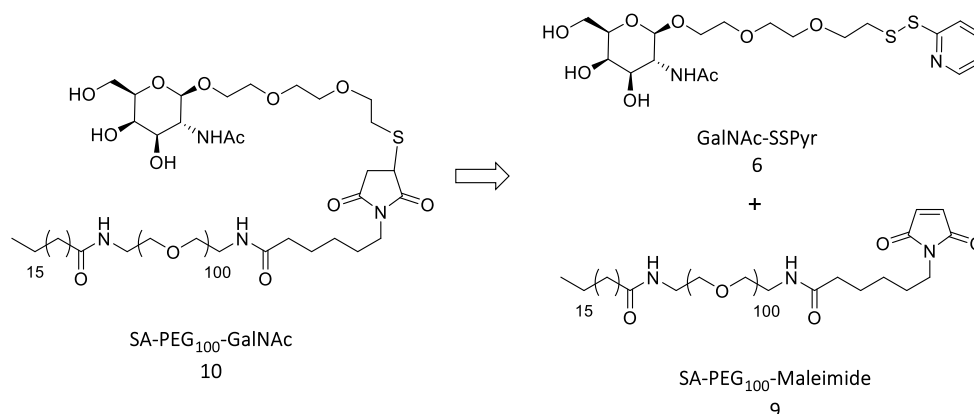


Figure 78 : Schéma rétrosynthétique du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

La synthèse de ces intermédiaires fait l'objet des parties suivantes. Elles seront suivies d'une partie concernant l'étape de couplage thiol maléimide permettant d'accéder au surfactant fonctionnalisé SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** qui sera incorporé dans la formulation.

2.2.1. Synthèse du SA-PEG₁₀₀-maleimide

La synthèse du SA-PEG₁₀₀-maleimide **9** s'effectue en 3 temps : tout d'abord le greffage de la chaîne stéarate SA à l'une des extrémités du PEG₁₀₀, protégé à l'autre extrémité, suivi des étapes de déprotection et de l'introduction de la fonction maléimide à l'autre extrémité (Figure 79). Le produit de départ de cette synthèse est le NH₂-PEG₁₀₀-NHBoc commercial (*Iris Biotech*) et a été utilisé tel quel.

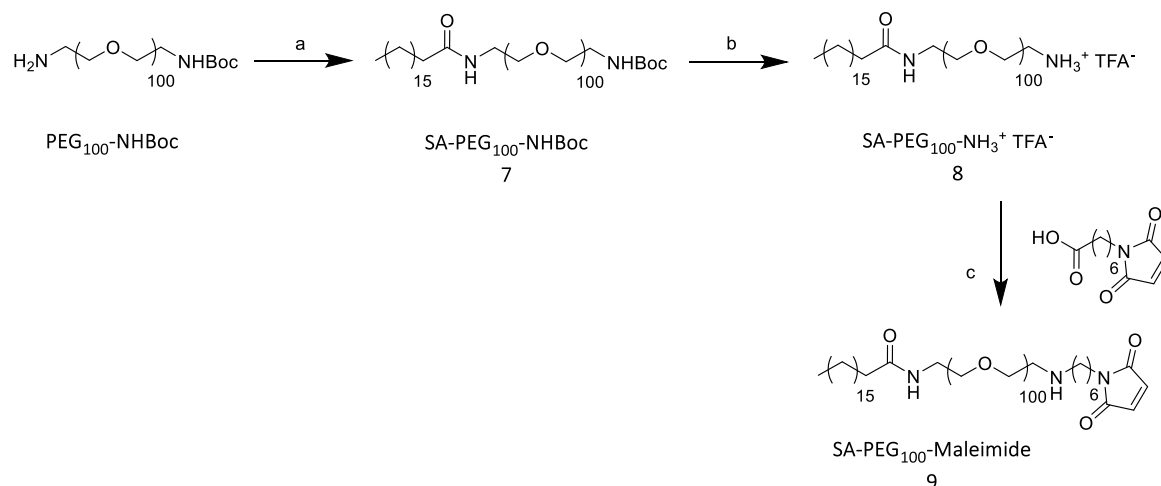


Figure 79 : Réactifs et conditions : a – Acide stéarique, PyBOP, DIPEA, CH₂Cl₂, 85 % b - TFA, CH₂Cl₂, 86 % ; c – 6-acide maléimidohexanoïque, PyBOP, DIPEA, CH₂Cl₂, 94%.

La chaîne stéarate, permettant un ancrage stable du surfactant PEG à la surface des nanoparticules, est introduite par un couplage de type peptidique en présence d'un agent de couplage (PyBOP) et de DIPEA sur la fonction amine libre du NH₂-PEG₁₀₀-NHBoc commercial. Après clivage du groupement protecteur Boc par traitement acide à l'aide de TFA, l'acide 6-maléimidohéxanoïque réagit avec la fonction amine primaire du composé SA-PEG₁₀₀NH₂ **8** pour former un lien amide en présence d'un agent de couplage (PyBOP) et de DIPEA. Le SA-PEG₁₀₀-maleimide **9** est ainsi obtenu, après purification par précipitation dans un grand volume d'éther éthylique, sous la forme d'une poudre beige en 3 étapes avec un rendement global de 69 %.

2.2.2. Synthèse du GalNAc-SSPy **6**

La stratégie de ligation entre le sucre GalNAc et le SA-PEG₁₀₀ choisie est l'addition de Michael thiol-maléimide. Un motif 2-pyridyl-sulfanyl (SSPy) en position 1 du sucre, permettant d'accéder à la fonction thiol réactive, a donc été introduit sur le sucre N-acétyl-D-galactosamine commercial en 6

étapes selon le schéma ci-dessous (Figure 80). La synthèse de ce dérivé a été mise au point et optimisée au laboratoire dans le cadre de la synthèse de la pro-drogue Chel2.¹¹⁰

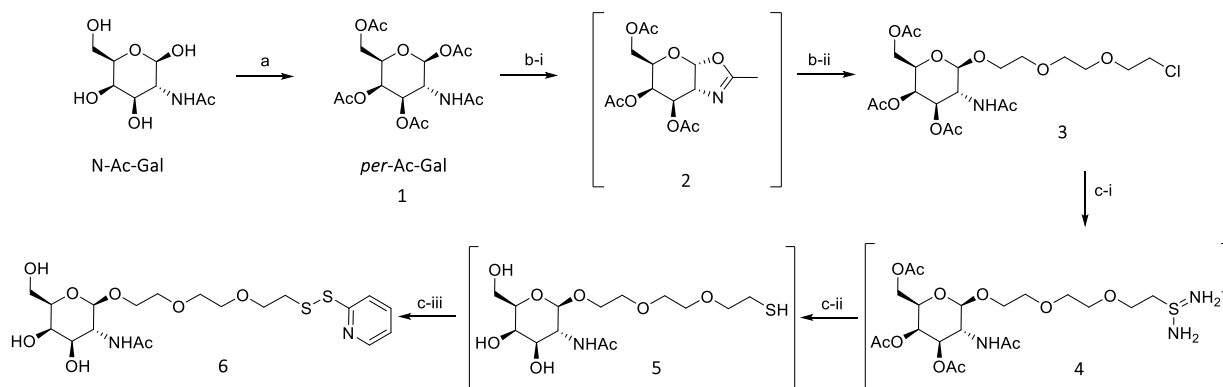


Figure 80 : Réactifs et conditions : a – Ac_2O , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 98 % b - i) TMSOTf , CH_2Cl_2 , ii) 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol, TMSOTf , CH_2Cl_2 , 34 % ; c – i) thiourée, H_2O , ii) NaOH (1M), iii) CH_3OH , aldrithiol, CH_3OH , 19 % (en 3 étapes).

Dans un premier temps, les fonctions hydroxyles libres du sucre GalNac sont protégées par des groupements acétyles grâce à un traitement à l'anhydride acétique en présence de pyridine suivant une réaction décrite dans la littérature.²¹² Ce composé **1** complètement protégé est ensuite engagé dans une réaction de glycosylation. Comme précédemment étudié au laboratoire, l'anomère β a été choisi pour sa capacité à être reconnu par les ASGPR et aussi sa synthèse plus efficace que celle permettant l'accès à l'anomère α . Lors de cette étape de glycosylation, le composé GalNac *per*-acétylé **1** est dans un premier temps activé sous forme d'oxazoline par réaction avec le TMSOTf .²¹³ La face inférieure du sucre (α) étant ainsi encombrée, une attaque nucléophile sur la face supérieure en β est privilégiée (Figure 81). Ce phénomène, mettant en jeu la participation d'un groupement voisin, est connu sous le nom d'assistance anchimérique.

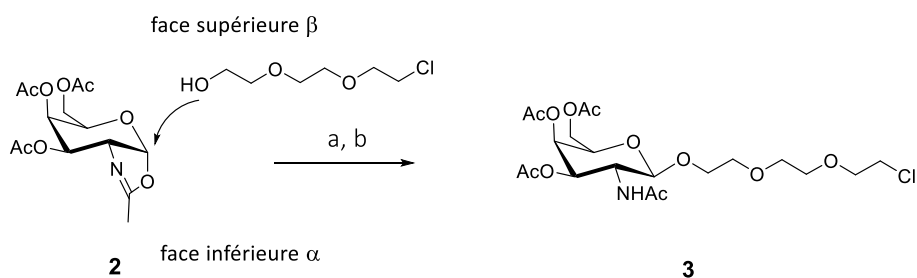


Figure 81 : Formation préférée du composé β grâce à l'assistance anchimérique. Réactifs et conditions : a – Ac_2O , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 98 % b - i) TMSOTf , CH_2Cl_2 , ii) 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol, TMSOTf , CH_2Cl_2 , 34 %

Ainsi l'attaque du nucléophile 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol sur l'intermédiaire oxazoline **2** conduit majoritairement au produit de glycosylation d'anométrie β (ratio β/α : 8/2). Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le produit **3** (anomère β) est obtenu avec un rendement de 34 % sur 3 étapes.

Les étapes suivantes réalisées « one-pot » consistent en la substitution du chlore par la thiourée formant ainsi un sel d'isothiourée **4** qui est ensuite hydrolysé par traitement à la soude. Cette étape permet de manière simultanée la déprotection des groupements hydroxyles du sucre GalNac. Lors de cette étape, le pH est rigoureusement maintenu à 9,6 et contrôlé tout au long de la réaction afin de ne pas cliver la fonction acétyle présente sur l'amine en position 2 du sucre.²¹⁴ Le thiol ainsi obtenu **5** est rapidement protégé par un motif SSPys afin d'éviter la formation de disulfures intermoléculaires.²¹⁵ Le dérivé GalNac-SSPys **6** est ainsi obtenu, après purification par HPLC préparative, sous la forme d'une huile marron avec un rendement de 19 % à partir du dérivé chloré. Il est ensuite engagé dans une réaction de Michael avec le SA-PEG₁₀₀-maléimide **9** pour former le surfactant SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

2.2.3. Couplage

Le dérivé GalNac-SSPys **6** obtenu précédemment est ensuite couplé au SA-PEG₁₀₀-maléimide **9**. Cette réaction de couplage est réalisée en présence de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), un agent réducteur capable de réduire *in situ* le lien disulfure et ainsi libérer le thiol libre.²¹⁶ Ce dernier, maintenant disponible, peut réagir de manière spécifique avec la fonction maléimide par une addition de Michael et former le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (Figure 82). L'évolution de cette réaction est suivie par RMN avec la disparition des protons caractéristiques du maléimide (Cf annexe 2).

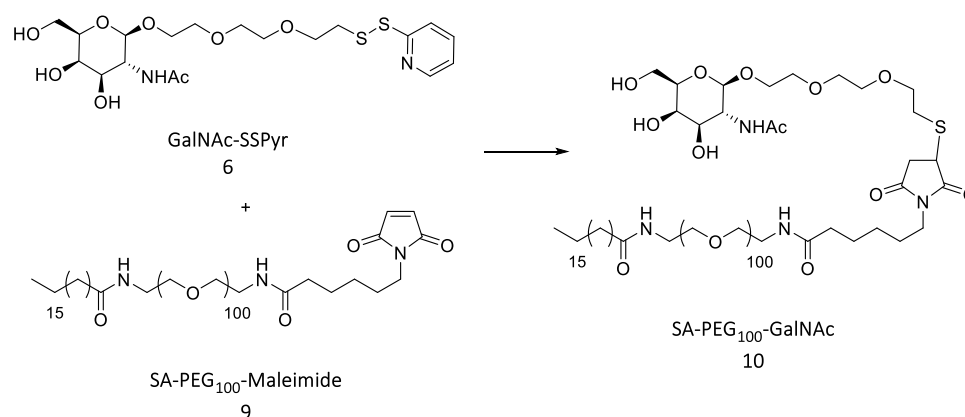


Figure 82 : Réactifs et conditions : TCEP, H₂O/ACN (1/3) (v/v) 87 %.

Finalement le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** est obtenu après purification par dialyse sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 87 %. Ce surfactant GalNac sera ensuite incorporé lors de la formulation des nanoparticules.

Il faut noter que des essais de couplage utilisant une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne ont également été réalisés (Figure 83). Pour cela, un dérivé GalNac portant une fonction azoture **16** et un surfactant à terminaison dibenzocyclooctyne (DBCO) **17** commercial ont été engagés dans une réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne contraint sans cuivre. L'utilisation du DBCO comme alcyne contraint, proposé par Bertozzi en 2004²¹⁷ permet, en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à la formation du cycle triazole, de s'affranchir de l'utilisation de cuivre. Cependant ces tentatives ont été rapidement arrêtées en raison de la faible stabilité du dérivé DBCO **17** en milieu aqueux.

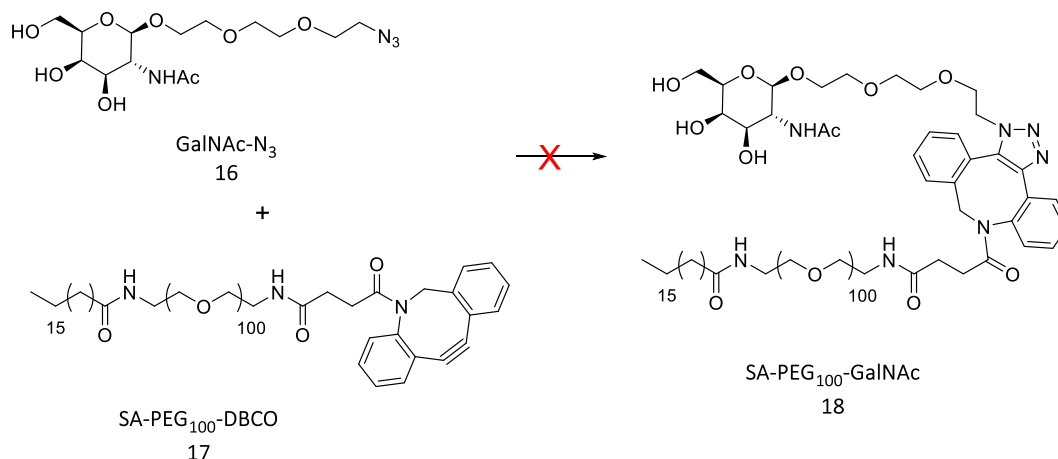


Figure 83 : Réactifs et conditions : eau/ACN (1/1).

2.3 NLC - Formulation et caractérisation

Afin d'évaluer l'influence du nombre de motifs GalNac à la surface des nanoparticules sur la capacité à entrer dans les cellules hépatiques, différents lots de nanoparticules lipidiques (NLC) ont été formulés :

- Des NLC fonctionnalisées avec un mélange de MyrjTM S40 et de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**, notés lots B, C et D.
- Des NLC contrôles, utilisant uniquement du MyrjTM S40 ou un mélange de MyrjTM S40/ MyrjTM S100 notés lots A, B', C' et D'.

Les lots formulés avec le MyrjTM S100 servent ici de contrôle négatif du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**. De la même manière que le MyrjTM S40 possède 40 unités d'éthylène glycol, le MyrjTM S100 possède 100 unités d'éthylène glycol et a donc une taille similaire au SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

Les quantités de surfactants utilisés, SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ou MyrjTM S100, sont 2,1 %, 5,3 % et 13,6 % molaires par rapport à la quantité totale de surfactants PEGylés investie à la formulation ; 13,6 % étant la quantité maximum de SA-PEG₁₀₀-GalNac qu'il a été possible d'utiliser pour la formulation des NLC. Des essais de formulation avec des quantités supérieures de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (27 %) n'ont pas permis d'obtenir des nanoparticules stables et monodisperses.

2.3.1. Formulation

Comme présenté précédemment (Cf Ch I.2.3.4), les NLC sont des nanoparticules lipidiques formulées en mélangeant une phase organique, contenant de l'huile de soja, de la suppicire^{NB} et du lipoid s75TM (ou lécithine) avec une phase aqueuse contenant les surfactants PEGylés (MyrjTM S40 et le cas échéant SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ou MyrjTM S100) solubilisé dans un tampon phosphate (10 mM phosphate, NaCl 154 mM, pH 7,4 noté PBS 1X).

Différents lots de particules contenant différents pourcentages molaires : 0 %, 2,1 %, 5,3 % et 13,6 % de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ou de MyrjTM S100 ont été formulés. Ces pourcentages molaires sont calculés en prenant en compte l'intégralité des surfactants PEGylés introduits lors de la formulation (Cf annexes 3). Les quantités d'ingrédients utilisées pour chacune des formulations sont présentées dans le Tableau 5 pour le contrôle (A), les formulations contenant 2,1 %, 5,3 % et 13,6 % de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (respectivement B, C, D) ou de MyrjTM S100 (respectivement B', C', D').

		A	B	C	D	B'	C'	D'
Phase lipidique								
Huile de soja TM	mg	85	85	85	85	85	85	85
SuppicireNB (cire)	mg	245	245	245	245	245	245	245
Lipoid s75 TM (lécithine)	mg	65	65	65	65	65	65	65
Phase aqueuse								
Myrj TM S40	mg	345,0	327,0	298,3	241,1	327,0	298,3	241,1
SA-PEG ₁₀₀ -GalNac 10	mg	0	18,7	46,7	105,4	-	-	-
% _{mol} SA-PEG ₁₀₀ -GalNac 10		0 %	2,1 %	5,3 %	13,6 %	-	-	-
Myrj TM S100	mg	0	-	-	-	18,7	46,7	105,4
% _{mol} Myrj TM S100		-	-	-	-	2,1 %	5,3 %	13,6 %

Tableau 5 : Composition des formulations A : formulation contrôle ; B, C et D contenant respectivement 2,1, 5,3 et 13,6 % de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ; B', C' et D' contenant respectivement 2,1, 5,3 et 13,6 % de MyrjTM S100.

Afin d'obtenir une phase lipidique homogène, les composés lipophiles (cire, huiles et lécithine et éventuellement DiD comme fluorophore lipophile) sont solubilisés dans du dichlorométhane, qui est ensuite éliminé par évaporation à 45°C sous un flux d'argon. Après ajout de la phase aqueuse contenant les ingrédients hydrophiles, les nanoparticules sont formées par des cycles de sonication de 5 min à l'aide d'un processeur à ultrasons VCX750. Cette étape permet le cisaillement de la phase lipidique dans la phase aqueuse (Figure 84).¹⁷⁸

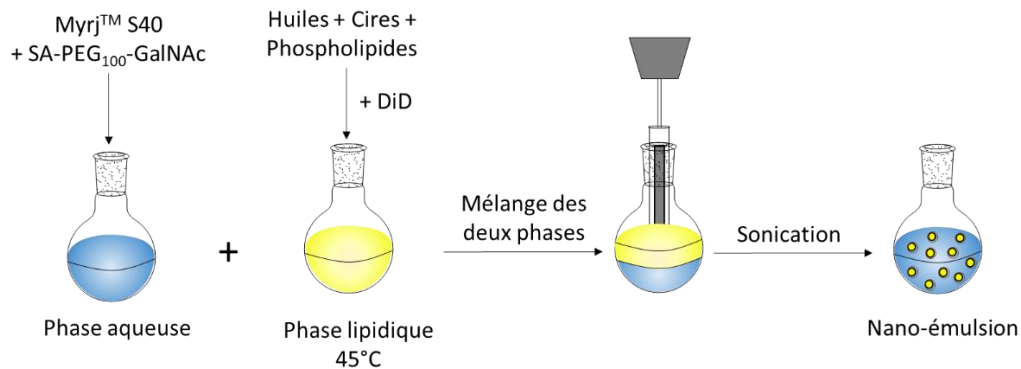


Figure 84 : Procédé de formulation des NLC par ultra-sonication.

Afin de rendre ces nanoparticules fluorescentes pour étudier par la suite leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques, un fluorophore lipophile (DiD) a été incorporé dans le cœur lipidique des NLC. Après formulation, les nanoparticules lipidiques sont purifiées par dialyse afin d'éliminer tous les ingrédients non incorporés pendant la formulation.

2.3.2. Caractérisation des NLC

Les nanoparticules lipidiques formulées et dialysées sont caractérisées par 3 paramètres principaux : le diamètre hydrodynamique, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta.

Le diamètre hydrodynamique est contrôlé par diffusion dynamique de la lumière (en anglais Dynamic Light Scattering ou DLS). Ce diamètre mesuré, qualifié d'hydrodynamique, représente la taille de la nanoparticule plus sa sphère d'hydratation.²¹⁸ Le PDI, également mesuré par DLS, représente la dispersion de taille des nanoparticules dans un même lot. Un PDI inférieur à 0,2 indique que la population de particules est monodisperse c'est-à-dire que toutes les particules ont une taille similaire. Le potentiel zêta est quant à lui mesuré par diffusion électrostatique de la lumière (en anglais Electrostatic Light Scattering ou ELS). Ce potentiel prend en compte les charges des différentes couches de solvatation et est représentatif des charges de surface des nanoparticules en solution.

La stabilité des nanoparticules en suspension a été évaluée par mesure DLS du diamètre hydrodynamique et du PDI sur une période de 1 an. Une variation du diamètre hydrodynamique et du PDI par rapport à la mesure initiale indique une déstabilisation colloïdale des nanoparticules.

Ces paramètres déterminés pour les différents lots de NLC obtenus sont reportés ci-dessous (Tableau 6 et Tableau 7)

	A 0 %	B 2,1 %	C 5,3 %	D 13,6 %
Diamètre hydrodynamique (nm)	42 ± 1	37 ± 1	52 ± 1	60 ± 1
PDI	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Potentiel Zeta	- 4 ± 1	- 6 ± 2	- 6 ± 2	- 6 ± 2
Stabilité colloïdale - Stockage à 4°C	1 an	5 mois	3 mois	3 semaines

Tableau 6 : Caractérisation des lots ; A : formulation contrôle ; B, C et D contenant respectivement 2,1, 5,3 et 13,6 % de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

	B' 2,1 %	C' 5,3 %	D' 13,6 %
Diamètre hydrodynamique (nm)	37 ± 1	50 ± 1	64 ± 1
PDI	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Potentiel Zeta	- 5 ± 2	- 6 ± 2	- 4 ± 2
Stabilité colloïdale - Stockage à 4°C	4 mois	4 mois	1 mois

Tableau 7 : Caractérisation des lots B', C' et D' contenant respectivement 2,1, 5,3 et 13,6% de MyrjTM S100.

Les NLC contrôles 0 % (Formulation A) et les NLC ayant un faible pourcentage en SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (Formulation B, 2,1 %) ou en MyrjTM S100 (Formulation B', 2,1 %) ont une taille similaire d'environ 40 nm et un PDI relativement faible de 0,11 ± 0,02 indiquant des particules homogènes en taille. En revanche, une augmentation du diamètre des particules est observée avec l'augmentation du pourcentage de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (< 50 nm Formulations C et D) ou de MyrjTM S100 (Formulations C' et D'). Cette augmentation de la taille est attribuée à une quantité plus importante de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ou MyrjTM S100. Pour rappel, ces surfactants fonctionnalisés par le motif GalNac possèdent une chaîne de polyéthylène glycol 2,5 fois plus longue que les chaînes de MyrjTM S40. La formulation de lots contrôle contenant des pourcentages identiques en MyrjTM S100 a permis de confirmer cette hypothèse. Les nanoparticules contrôles ainsi obtenues présentent, pour le même pourcentage de surfactants « longs », des diamètres identiques et croissants avec le pourcentage incorporé lors de la formulation (Figure 85).

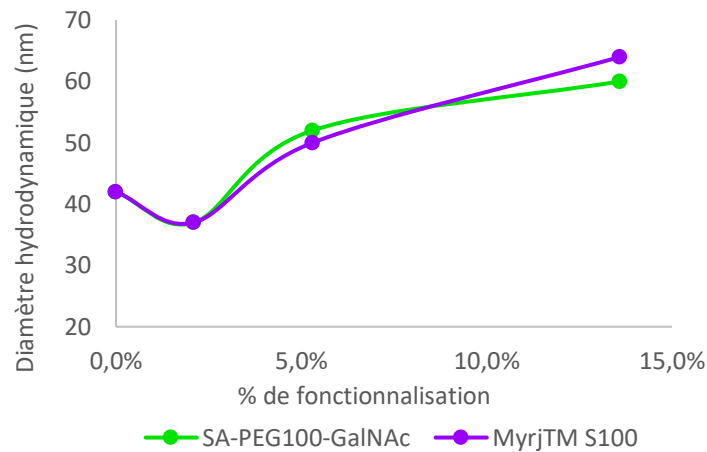


Figure 85 : Evolution du diamètre des NLC en fonction du pourcentage des surfactants PEGylés.

La taille des nanoparticules mesurée par DLS est une mesure du diamètre hydrodynamique ; c'est-à-dire qu'elle prend en compte le diamètre du cœur des particules mais également de la couche formée par les surfactants PEGylés à la surface des nanoparticules. A de faibles pourcentages d'incorporation de surfactants « longs » (2,1 %, formulations B et B'), la quantité de Myrj™ S100 n'est pas suffisante pour impacter de façon significative leur diamètre. A des pourcentages plus importants (5,3 % et 13,6 % ; formulations C, C', D, D'), les surfactants PEGylés forment une couronne autour des nanoparticules suffisamment denses pour influencer le diamètre des nanoparticules.

De plus, l'incorporation des surfactants SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et Myrj™ S100 dans la formulation tend à déstabiliser ces nanostructures, surtout à de forts pourcentages. La présence du sucre GalNac ne semble cependant pas être la cause de cette déstabilisation, les formulations B', C' et D' ayant sensiblement les mêmes stabilités que respectivement les formulations B, C et D. Il semble donc que la longueur de la chaîne PEGylée soit la cause de la déstabilisation colloïdale. Toutefois, la stabilité des particules fonctionnalisées est suffisante (3 semaines pour les nanoparticules formulées avec 13,6 % de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et > 3 mois pour les nanoparticules formulées avec un pourcentage inférieur ou égal à 5,3 %) pour effectuer les différentes expériences de quantification et d'évaluation de la capacité de ces nanoparticules à entrer dans les cellules hépatiques.

Des images effectuées par microscopie électronique à transmission (TEM) ont également permis d'obtenir une idée de la dispersion de la suspension de nanoparticules (Figure 86).

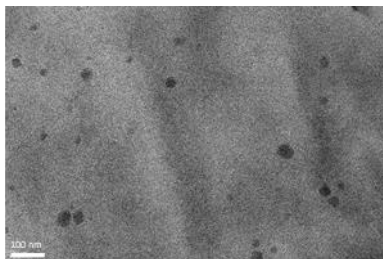


Figure 86 : Images TEM de NLC formulation D obtenues par coloration négative.

Les NLC apparaissent ici sous la forme de gouttelettes gris foncé dont la forme est circulaire.

3. Quantification des motifs GalNAc à la surface des NLC

Le principal challenge dans le développement et le design de nanoparticules fonctionnalisées est l'accès à une caractérisation correcte et précise de ces nano-objets. De nombreuses études présentent d'excellents résultats d'internalisation cellulaire sans toutefois quantifier de manière précise le pourcentage exact de ligands à la surface des nanoparticules fonctionnalisées.^{219–221} Dans le domaine des nanoparticules glycoconjuguées i.e. fonctionnalisées par des mono-, di ou polysaccharides, des tests qualitatifs sont parfois effectués à l'aide de lectines. En effet, lors de l'ajout de telles protéines à la solution contenant les nanoparticules fonctionnalisées, la reconnaissance spécifique des lectines pour leurs sucres présents à la surface des nanoparticules conduit à leur agrégation.²²² La solution devient alors trouble ce qui atteste de l'accessibilité des sucres à la surface des nanoparticules. Cependant cette méthode n'est pas quantitative et ne donne donc aucune information sur le rendement d'incorporation ou la densité de surface en sucres. A notre connaissance, aucune méthode quantitative sur des liposomes ou des nanoparticules lipidiques n'a, à ce jour, été établie. C'est pourquoi au cours de ce projet, une méthode de quantification a été développée afin d'évaluer de manière précise le taux d'incorporation et la quantité de SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** présent à la surface des NLC. Cette méthode repose sur la technique de Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance (UPLC) couplée à un détecteur à diffusion de lumière (ELSD).

3.1 Optimisation de la méthode de séparation

La quantification des surfactants incorporés dans les formulations a été réalisée par UPLC couplé à un détecteur à diffusion de lumière (ELSD). Cette méthode de chromatographie liquide repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire composée de particules de taille inférieure à 2 μm . Elle permet, en plus d'augmenter le débit et donc la vitesse d'analyse sans altérer les performances de séparation,

l'étude de molécules de haut poids moléculaire (5000 g/mol pour le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**). De plus le recours à un détecteur à diffusion de lumière (ELSD) permet la détection des surfactants MyrjTM S40 et SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** qui ne sont pas détectables par absorption UV-visible.

3.1.1. Appareillage et méthodes

Le détecteur ELSD comprend 3 étapes pour l'analyse de composés : nébulisation, évaporation et détection (Figure 87).

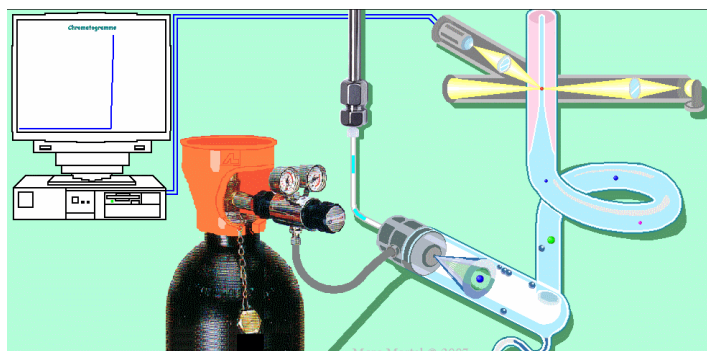


Figure 87 : Détecteur de lumière diffusée (ELSD).²²³

Nébulisation : Après passage et séparation sur la colonne, l'éluant contenant les molécules à analyser est mélangé à un gaz inerte puis entre dans le nébuliseur où il est converti en très fines gouttelettes.

Évaporation : Le solvant de la phase mobile est ensuite évaporé. Pour cela, le flux de gaz inerte entraîne les gouttelettes dans un tube de chauffage à basse température. Les composés ainsi isolés peuvent ensuite être détectés.

Détection : Ces particules solides entrent ensuite dans une cellule composée d'une source lumineuse et d'un photomultiplicateur. La lumière entre alors en contact avec les particules. Elle est alors déviée en fonction de la taille des molécules et cette déviation est analysée grâce à un photomultiplicateur.

La réponse de l'ELSD dépend de la composition de la phase mobile. Les facteurs sont par exemple la tension de surface, la densité ou la viscosité. Ces paramètres déterminent la taille et le nombre des gouttelettes produites pendant la nébulisation et ainsi la taille des particules qui atteignent la cellule de détection.²²⁴ L'interaction complexe de ces différents facteurs conduit à une réponse non linéaire du détecteur ELSD. Il est ainsi nécessaire d'établir des courbes de calibration pour chaque produit afin de relier l'aire mesurée à la concentration du composé.

Afin de quantifier précisément la quantité de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et MyrjTM S40 incorporés dans les formulations de NLC obtenues, une méthode UPLC-ELSD précédemment mise au point au laboratoire a été optimisée afin de séparer distinctement les pics correspondant aux chaînes de MyrjTM S40 et SA-

PEG₁₀₀-GalNac **10**.²²⁵ Une colonne C18 est utilisée pour la séparation des différents composés et les paramètres utilisés pour cette analyse sont répertoriés dans le Tableau 8.

UPLC :

Temps (min)	Débit (mL/min)	A eau	B MeOH	C iPrOH/ACN
0	0,25	30	70	0
3	0,3	10	90	0
15	0,3	0	100	0
22	0,3	0	35	65
25	0,3	0	35	65
25,1	0,25	30	70	0
30	0,25	30	70	0

ELSD :

Température	55,0°C
Débit gazeux	1,5 L/min
Gain	4

Tableau 8 : Paramètres UPLC et ELSD pour la détection des différents surfactants PEGylés.

Dans la première partie de la méthode de séparation (de 0 à 15 min), les surfactants PEGylés (MyrjTM S40, le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**) ainsi que les phospholipides sont séparés grâce à un gradient eau/méthanol. Dans la 2ème partie (de 15 min à 25 min), les lipides sont élués grâce à un mélange MeOH/iPrOH/ACN.

3.1.2. Analyse de chaque constituant

Dans un premier temps, les différents composés entrant dans la composition des NLC sont analysés séparément par UPLC-ELSD. Le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et le MyrjTM S40 sont dissouts dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL. Les huiles, cires et phospholipides sont quant à eux dissouts dans un mélange chloroforme/méthanol 3/1 (v/v) à une concentration de 1 mg/mL. Chaque composé a été injecté en triplica. Les chromatogrammes (Figure 88) montrent que la méthode utilisée est parfaitement reproductible avec une superposition « parfaite » des 3 chromatogrammes pour chaque ingrédient.

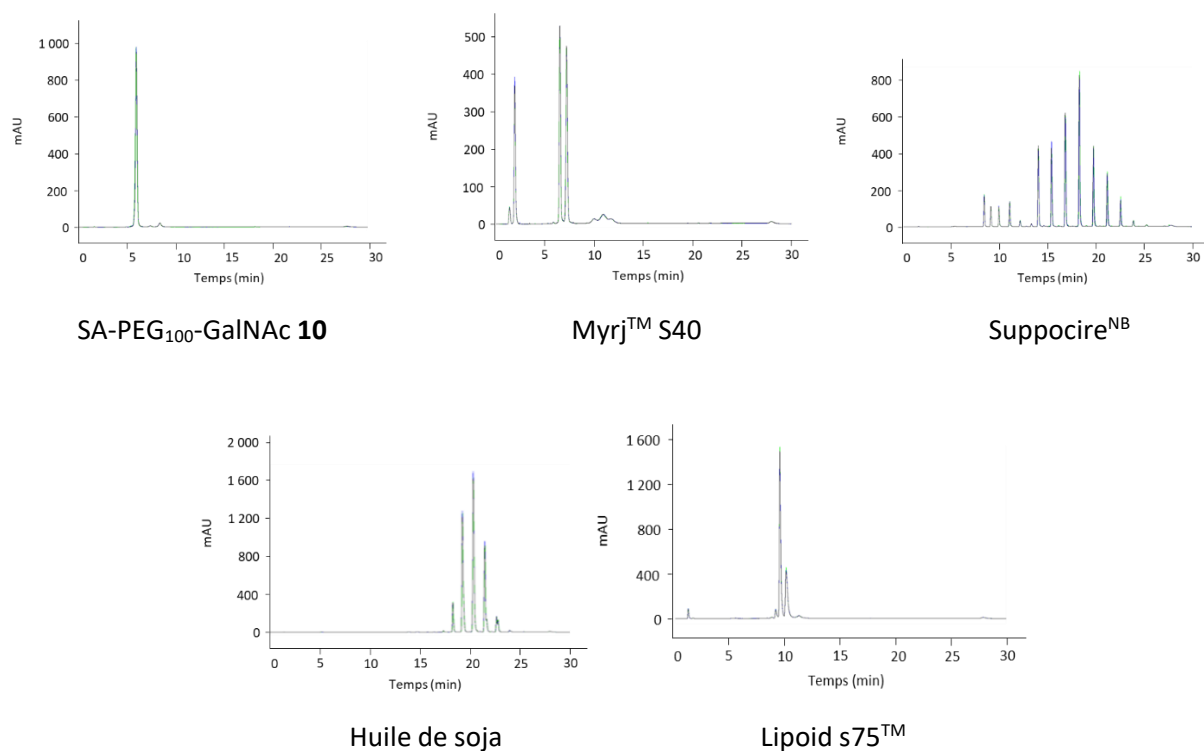


Figure 88 : Superposition de 3 chromatogrammes pour chaque composé entrant dans la composition des NLC.

Le SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** apparaît sous la forme d'un seul pic avec un temps de rétention de 5,8 min. Le Myrj[™] S40 est, selon le fournisseur, un mélange de 3 différents composés : PEG-OH sans chaîne lipophile, PEG-C16 avec une chaîne carbonée C16 (palmitate) et PEG-C18, un polyéthylène glycol lié à une chaîne carbonée C18 (PEG-stéarate). Les pics correspondants à ces 3 composés ont été précédemment attribués respectivement à 1,9 min, 6,4 min et 7,2 min.²²⁵ La suppocire^{™NB} est composée d'un mélange de mono-, di- et triglycérides possédant différentes longueurs de chaîne acyles (C8-C18). Sur le chromatogramme, elle apparaît sous la forme de 15 pics entre 8 min et 26 min. L'huile de soja est un mélange de triglycérides insaturés C16-C18 et apparaît sous la forme de 8 pics entre 17 min et 24 min. Enfin le lipoid s75[™] (ou lécithine) est un mélange de phospholipides majoritairement composés de phosphatidylcholine avec une petite portion de phosphatidyléthanolamine et lysophosphatidylcholine. Ils se présentent comme un groupe de pics correspondant respectivement à 9,6 min, 10,3 min et 9,2 min.²²⁵

La superposition de ces différents chromatogrammes (Figure 89) montre que les pics correspondants au SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** et au Myrj[™] S40 sont suffisamment éloignés entre eux et des autres correspondant aux phospholipides et à la cire pour permettre leur quantification sans ambiguïté.

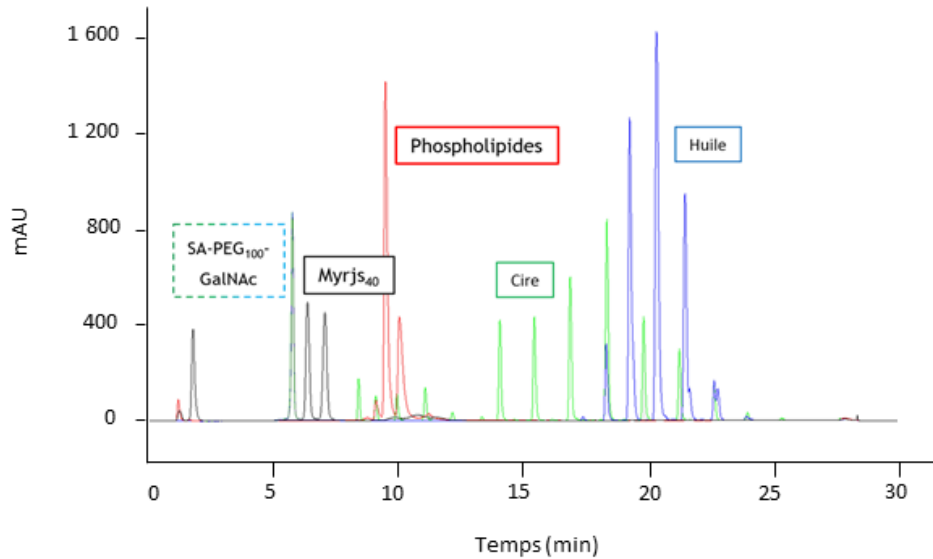


Figure 89 : Superposition des chromatogrammes des différents ingrédients composant les NLC.

Pour vérifier d'éventuelles interférences dans les nanoparticules désassemblées qui modifieraient les temps de rétention, des mélanges de différents ratios de MyrjTM S40 et SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ont été analysés par UPLC-ELSD (Figure 90).

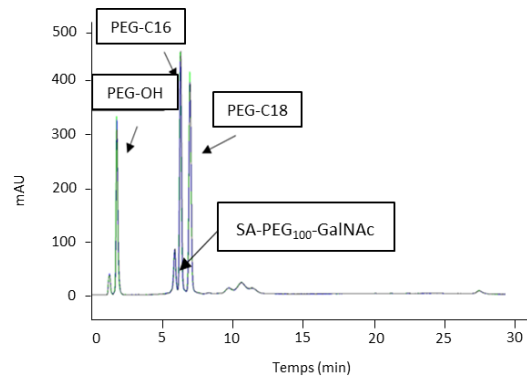


Figure 90 : Chromatogramme d'un mélange 90/10 (w/w) MyrjTM S40 et SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

Aucune interférence au niveau des pics n'a été observée sur les chromatogrammes. Ces résultats démontrent donc l'influence négligeable de la matrice sur le procédé de quantification du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et du MyrjTM S40.

3.2 Calibration des surfactants PEGylés

Afin de déterminer précisément la quantité de SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** incorporée lors de la formulation des nanoparticules, les courbes de calibration du SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** et du MyrjTM S40 ont, dans un premier temps, été établies.

3.2.1. SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10**

Une courbe de calibration est établie pour le SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** en solubilisant ce dernier dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL. Les 6 autres concentrations de 15,6 µg/mL à 500 µg/mL sont obtenues par dilution en cascade au demi (Figure 91).

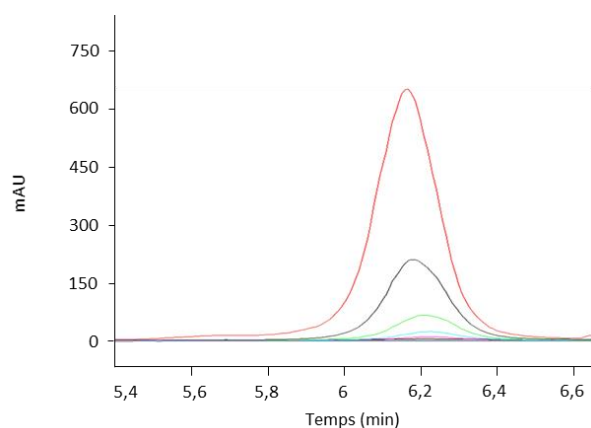


Figure 91 : Chromatogrammes correspondant à l'injection du SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** pour une gamme de concentration de 15,6 µg/mL à 1 mg/mL.

L'intégration de l'aire du pic correspondant au SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** reportée en fonction de la concentration en µg/mL permet d'obtenir une courbe de calibration (Figure 92). Chaque point de la courbe est obtenu en triplicatas afin de valider la reproductibilité et d'améliorer la précision de la quantification. Cette courbe a pour équation $y = 6,2424x^2 + 1851,6x - 50827$ et présente un excellent coefficient de régression $R^2 = 0.9999$. Cette équation sera utilisée par la suite pour la quantification du SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** effectivement présent à la surface des NLC.

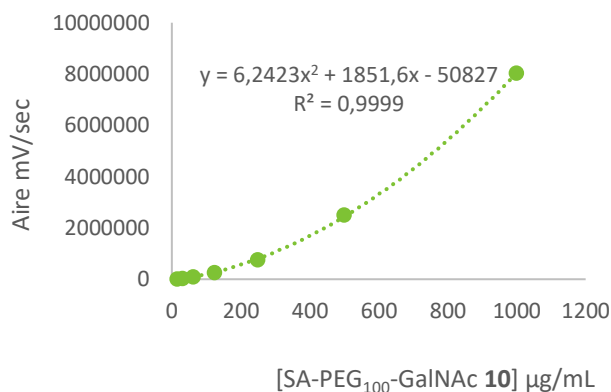


Figure 92 : Courbe de calibration du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** établie pour une gamme de concentration de 15,6 µg/mL à 1 mg/mL.

3.2.2. MyrjTM S40

Comme énoncé précédemment, le MyrjTM S40 est un mélange de 3 composés : PEG-C18, PEG-C16 et PEG-OH. Une quantification précise de la composition du MyrjTM S40 a précédemment été effectuée²²⁵ et a permis de déterminer la composition suivante : 35,3 % (w/w) de PEG-C18, 34,6 % (w/w) de PEG-C16 et 30,1 % (w/w) de PEG-OH (Tableau 9).

	Masse molaire	% _{w/w} dans le Myrj TM S40
PEG-OH	1778	30,1
PEG-C16	2016	34,6
PEG-C18	2044	35,3

Tableau 9 : Caractéristiques du MyrjTM S40.

Il est donc nécessaire, dans le processus de quantification, de quantifier précisément l'incorporation de chacun de ces composés. Pour cela, 3 courbes de calibration ont été établies : une première courbe en intégrant l'aire du 1^{er} pic (PEG-OH), une deuxième courbe en intégrant l'aire du 2^{ème} pic (PEG-C16) et une troisième courbe en intégrant l'aire du 3^{ème} pic (PEG-C18). Pour la concentration, les ratios déterminés précédemment²²⁵ ont permis d'établir la concentration de chacun des composés. Ainsi une solution à 1 mg/mL en MyrjTM S40 contient 0,353 mg de PEG-C18 (0,173 mmol) ; 0,346 mg de PEG-C16 (0,171 mmol) et 0,313 mg de PEG-OH (0,176 mmol).

La courbe de calibration pour le PEG-C18 est présentée ci-dessous (Figure 93). Les autres courbes de calibration correspondant au PEG-C16 et au PEG-OH sont reportées en annexe 4.

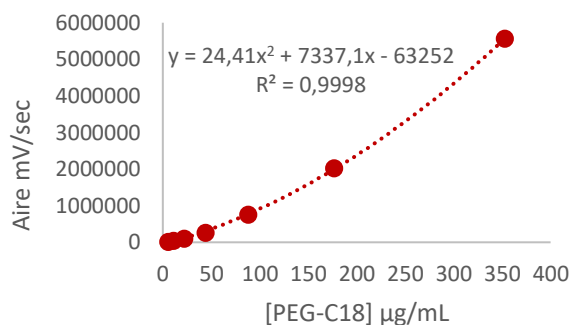


Figure 93 : Courbe de calibration du PEG-C18 établie pour une gamme de concentration de 5,5 µg/mL à 352,8 µg/mL.

Afin d'injecter les échantillons de NLC en UPLC et déterminer la quantité de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et de MyrjTM S40, les particules ont été désassemblées. Cette étape est indispensable, les nanoparticules ne peuvent pas être injectées sous leur forme intègre dans la colonne C18 à cause de la petite taille des pores (environ 90 Å) ; celles-ci boucheraient la colonne.

3.2.3. Destruction des nanoparticules

Pour désassembler les particules, les lipides sont dans un premier temps précipités dans l'acétonitrile (Figure 94). Après centrifugation, le surnageant contenant les surfactants PEGylés est séparé du culot composé des lipides. Il est ensuite concentré sous vide afin d'éliminer le solvant puis dissout dans un volume adéquate de méthanol permettant d'obtenir une concentration en surfactants d'environ 1 mg/mL (pour permettre l'analyse UPLC). Les lipides sont quant à eux dissouts dans un mélange chloroforme/méthanol (3/1) (v/v).

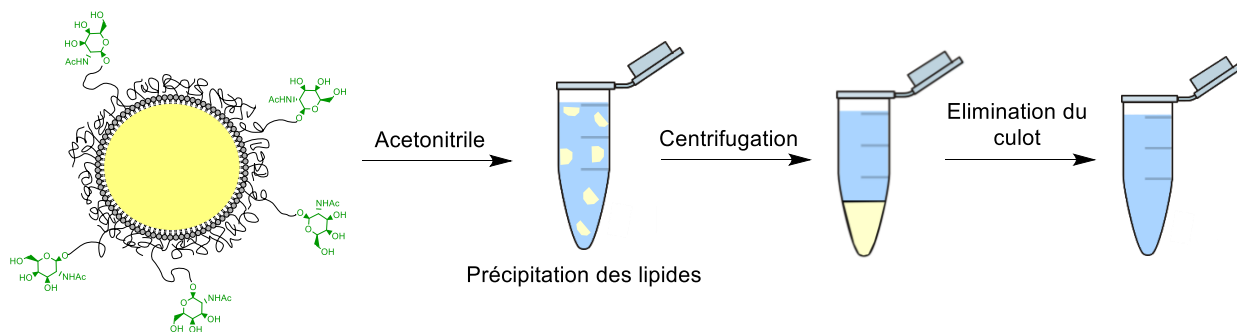


Figure 94 : Désassemblage des nanoparticules par précipitation des lipides dans l'acétonitrile.

Pour évaluer la stabilité des composés d'intérêt, le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et le MyrjTM S40 standards ont subi le même traitement que les nanoparticules. Les chromatogrammes obtenus sont conformes à

ceux obtenus lors de l'injection des ingrédients de façon séparée. La précipitation n'occasionne aucune dégradation de ces 2 produits.

3.2.4. Analyse du surnageant

Le surnageant contenant le MyrjTM S40 et/ou le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** est injecté en UPLC-ELSD. Les chromatogrammes obtenus pour les différentes formulations sont présentés ci-dessous (Figure 95) avec un focus sur la formulation D (13.6 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**).

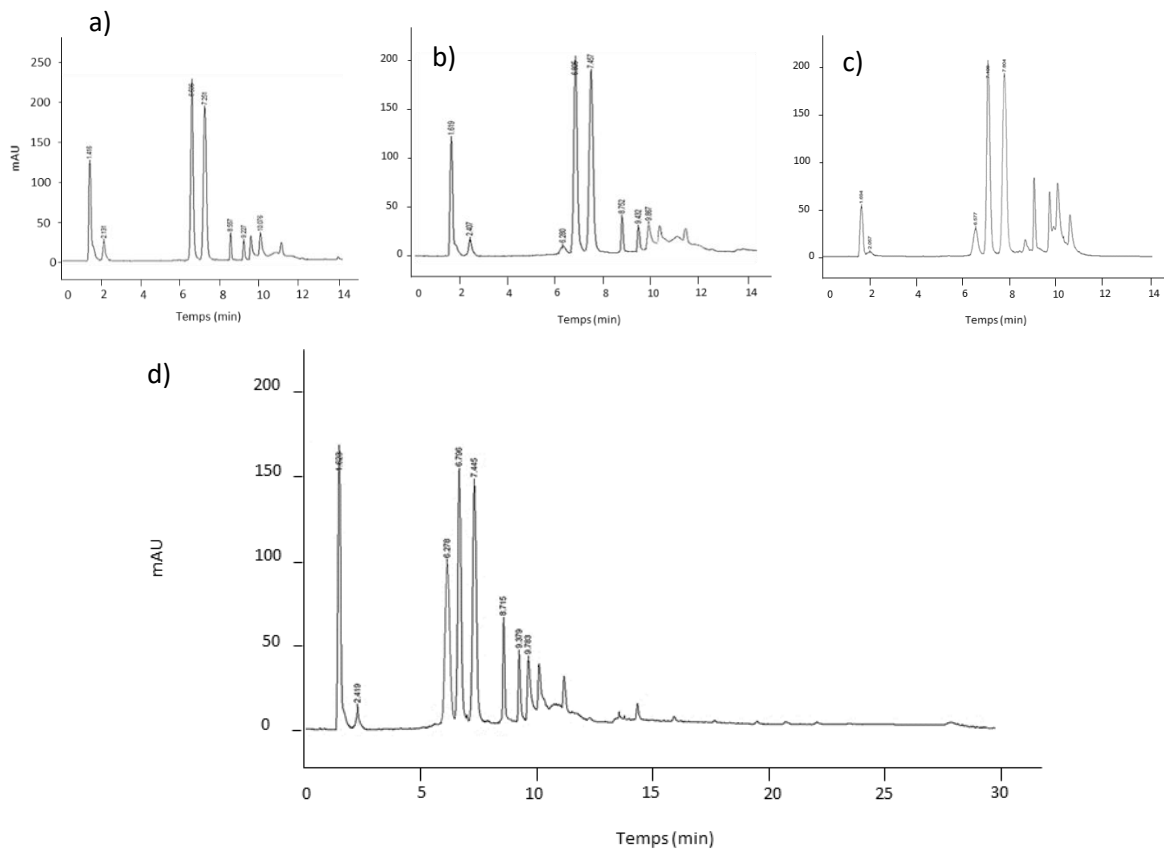


Figure 95 : Chromatogramme du surnageant des formulations a - A (0 %), b - B (2,1 %), c - C (5,3 %), d - D (13,6 %).

Les pics correspondant au MyrjTM S40 ont ici un temps de rétention de 2,4 min pour le PEG-OH, 6,8 min pour le PEG-C16 et 7,4 min pour le PEG-C18. Lors du passage des standards, ces 3 composés étaient présents en quantités égales (30,1 %, 34,6 % et 35,3 % (w/w)). Or le pic correspondant au PEG-OH est, sur le chromatogramme du surnageant, très faible. En l'absence d'une chaîne alkyle permettant l'ancrage à l'interface cœur lipidique/phase aqueuse, ce composé PEG-OH est très faiblement incorporé dans la formulation et est en grande partie éliminé lors de l'étape de dialyse. Le pic

correspondant au SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** a un temps de rétention de 6,3 min conforme à l'analyse réalisée précédemment (Cf Ch II.3.1.2).

Les autres pics entre 8 min et 13 min correspondent à des résidus de cire et de phospholipides non éliminés pendant l'étape de précipitation. Ces pics n'occasionnent cependant pas de gêne pour la quantification du MyrjTM S40 et du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**.

3.2.5. Analyse des précipités

Afin de vérifier que le MyrjTM S40 ou le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** n'ont pas co-précipité avec les lipides, le culot composé des lipides est analysé en UPLC-ELSD après dissolution dans un mélange chloroforme/méthanol (3/1) (v/v). A titre d'exemple, le chromatogramme correspondant à l'analyse du culot obtenu lors du désassemblage de la formulation D (13,6 %) est présenté ci-dessous (Figure 96). Il présente plusieurs pics correspondants aux lipides, de 11 min à 26 min, et aucun pic dans la zone du MyrjTM S40 ou SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**, de 0 à 8 min. Les chromatogrammes correspondants aux autres formulations (B et C) sont reportés en annexe 5. L'étape de précipitation permet donc de récupérer l'intégralité des surfactants PEGylés à quantifier.

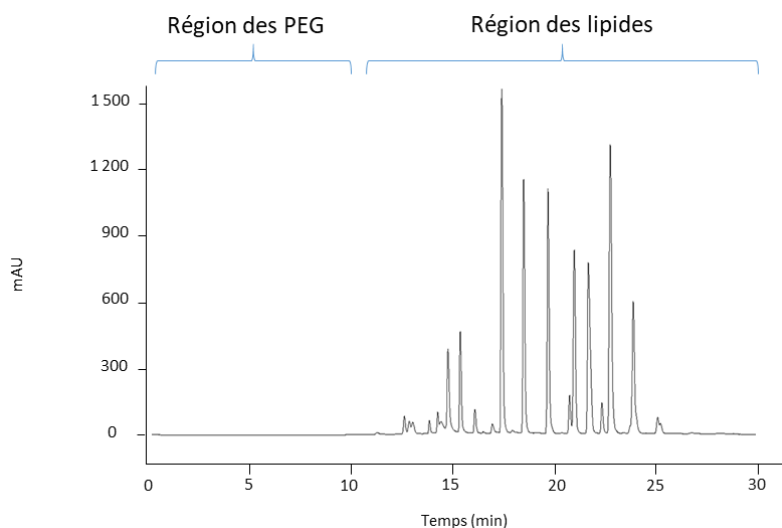


Figure 96 : Chromatogramme des lipides précipités lors de l'étape de désassemblage des NLC formulation D.

3.3 Quantification des surfactants PEGylés

Pour chaque chromatogramme de surnageants obtenus après désassemblage des formulations A, B, C et D (Figure 95), les pics correspondants au SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et aux composants du MyrjTM S40 sont intégrés et les aires sont reportées dans le Tableau annexe 6. Grâce aux courbes de calibration établies précédemment, la quantité exacte de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et de chaque composé du MyrjTM S40 ayant été incorporée dans les particules est déterminée. Le pourcentage d'incorporation peut donc être calculé, pour l'ensemble des formulations A, B, C et D (Tableau 10). Le pourcentage d'incorporation est d'environ 7 % pour le PEG-OH, 47 % pour le PEG-C16 et 54 % pour le PEG-C18 (soit globalement une moyenne de 36 % pour le MyrjTM S40). Pour les formulations B, C et D, le pourcentage d'incorporation du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** est d'environ 85 %.

		A	B	C	D
% incorporation	PEG-OH	8,3	8,3	3,5	6,8
	PEG-C16	45,7	54,3	34,6	54,2
	PEG-C18	44,5	57,7	53,6	62,0
	Myrj TM S40	32,6	39,9	30,4	40,7
	SA-PEG₁₀₀-GalNac 10	0	89,5	87,4	78,9

Tableau 10 : Pourcentage d'incorporation des surfactants PEGylés des NLC.

Le SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** a donc une excellente incorporation dans les NLC fonctionnalisées. Cela peut s'expliquer par sa chaîne stéarate C18 permettant un bon ancrage dans le cœur lipidique. Le MyrjTM S40 a quant à lui une incorporation bien plus faible dans les 4 différentes formulations. Ce faible pourcentage peut en partie s'expliquer par la composition de ce surfactant. Comme précisé plus haut, le MyrjTM S40 contient 3 composés différents en quantité égales (PEG-OH, PEG-C16 et PEG-C18 respectivement à hauteur de 30,1 %, 34,6 % et 35,3 % (w/w)). Grâce à leur chaîne aliphatique en C16 et C18, les PEG-C16 et PEG-C18 peuvent interagir avec les phospholipides Lipoid s75TM ainsi qu'avec les triglycérides. Ces deux composés sont donc bien ancrés à l'interface cœur lipidique/phase aqueuse des nanoparticules. A contrario, le PEG-OH ne s'incorpore pas à cause de l'absence d'ancre lipophile. Il est donc éliminé lors de l'étape de purification par dialyse. Ainsi, après purification, le ratio moléculaire SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** / MyrjTM S40 n'est plus celui calculé avant formulation (Tableau 11). Le pourcentage molaire de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** est ainsi supérieur à celui introduit lors de la formulation (**4,6 %** versus **2,1 %** pour la formulation **B**, **13,9 %** versus **5,3 %** pour la formulation **C** et **23,3 %** versus **13,6 %** pour la formulation **D**).

	A	B	C	D
%_{mol} SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 introduit à la formulation	0	2,1	5,3	13,6
%_{mol} SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 quantifié	0	4,6	13,9	23,3

Tableau 11 : Quantification du pourcentage de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 à la surface des NLC après formulation et purification par dialyse.

3.4 Densité de surface en ligand GalNac

Grâce à la méthode de quantification établie ci-dessus, les quantités précises de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 sur la surface développée totale des NLC ont pu être calculées pour chaque formulation. A partir de ces données, il est possible de déterminer approximativement le nombre de résidus GalNac à la surface de chaque nanoparticule ainsi que leur densité à la surface des particules.

Le nombre de particules est déterminé grâce au diamètre hydrodynamique établi par DLS ainsi que la masse des particules obtenue après lyophilisation (Tableau 12). L'augmentation de la taille des particules n'est pas due à un cœur lipidique plus volumineux (Figure 85), la masse totale du cœur (huile + cire + phospholipides) restant constante. Il a donc été décidé de prendre comme valeur de diamètre des particules celui mesuré pour les nanoparticules présentant un faible pourcentage de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 ou MyrjTM S100. Cette valeur a donc été fixée à 40 nm. Grâce à ce diamètre, le volume du cœur d'une particule peut être calculé (34 000 nm³). La densité des NLC est assimilée à celle des huiles (1,05) et la masse d'une particule peut ainsi être calculée (3,5.10⁻¹⁷ g). En divisant la masse totale des particules par la masse d'une seule particule, on obtient le nombre total de particules (1,4.10¹⁶ particules/100 mg de lipides). Le nombre total de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 divisé par le nombre total de particules permet d'avoir une valeur approximative du nombre de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 par particule. Les résultats sont précisés ci-dessous (Tableau 12).

		A	B	C	D
%_{mol} de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10		0	4,6	13,9	23,3
Diamètre fixé des NLC	(nm)	40	40	40	40
Volume des NLC	(cm ³)	3,35.10 ⁻¹⁷	3,35.10 ⁻¹⁷	3,35.10 ⁻¹⁷	3,35.10 ⁻¹⁷
Masse de 1 NLC	(g)	3,52.10 ⁻¹⁷	3,52.10 ⁻¹⁷	3,52.10 ⁻¹⁷	3,52.10 ⁻¹⁷
Masse totale des NLC	(g)	0,493	0,5056	0,486	0,5067
Nombre de NLC / 100 mg de lipide		14,01.10 ¹⁵	14,37.10 ¹⁵	13,81.10 ¹⁵	14,40.10 ¹⁵
Nombre total de SA-PEG ₁₀₀ -GalNac 10		0	19,14.10 ¹⁷	46,01.10 ¹⁷	93,64.10 ¹⁷
SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 / NLC		0	135	333	650

Tableau 12 : Calculs du nombre de nanoparticules dans un échantillon de 5mL.

Pour déterminer la densité de GalNac en surface, l'augmentation de la taille des particules (de 40 nm à 60 nm) due à une quantité plus importante en SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 (de 136 à 650) a cette fois-ci été prise en compte. En divisant le nombre de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 / particule par la surface hydrodynamique de chaque lot, on obtient la densité de surface en GalNac pour les nanoparticules des formulations B, C et D. Les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 13).

		A	B	C	D
%_{mol} de SA-PEG₁₀₀-GalNac 10		0	4,6	13,9	23,3
SA-PEG₁₀₀-GalNac 10 / NLC		0	136	333	650
Diamètre hydrodynamique	(nm)	42	37	52	60
Surface hydrodynamique	(nm ²)	5 489	4 347	8 626	11 234
Surface / 1 GalNac	(nm²)	0	32	26	17

Tableau 13 : densité de GalNac en surface des NLC.

Ainsi, les formulations de nanoparticules ont donc 1 GalNac tous les 32 nm² (B), 1 GalNac tous les 26 nm² (C) et 1 GalNac tous les 17 nm² (D). L'ensemble de ces calculs ont également été effectués pour tous les composants du MyrjTM S40 et sont disponibles en annexe 6 et 7.

4. Conclusion

Des nanoparticules lipidiques de 50 nm décorées par des motifs ciblant GalNac ont été formulées. Une stratégie "fonctionnalisation pré-synthèse" a été utilisée pour incorporer de manière efficace le surfactant SA-PEG₁₀₀-GalNac 10, synthétisé à partir de NH₂-PEG₁₀₀-NHBoc commercial. Afin de

quantifier précisément la quantité de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et de MyrjTM S40 incorporée dans les formulations, une méthode UPLC-ELSD a été optimisée. Différents lots initialement formulés avec 0 %, 2,1 %, 5,3 % et 13,6 % (molaires) de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** présentaient effectivement après dialyse 0 %, 4,6 %, 13,9 % et 23,3 % (molaires) de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**. Cette augmentation du pourcentage d'incorporation est expliquée par une excellente incorporation du SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (≈ 90 %) par rapport au MyrjTM S40 (en moyenne 35 %). Cette quantification précise et la taille des NLC nous a permis d'accéder à des densités de surface en motifs GalNac comprise entre 136 et 650 motifs par particule suivant les formulations. La comparaison avec d'autres nanoparticules reportées dans la littérature^{174,219,226,227} sera abordée dans la discussion générale à la fin de ce chapitre mais laisse présager une reconnaissance efficace des NLC décorées par des motifs ciblands GalNac par les ASGPR. Des études sur des cellules hépatiques par cytométrie en flux permettront d'évaluer la capacité de ces nanoparticules NLC-GalNac à être reconnues par les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR) et entrer dans ces cellules. De plus des expériences par résonance plasmonique de surface (SPR) nous donneront des informations quant à l'accessibilité des motifs ciblands GalNac présents à la surface de ces nanoparticules.

Evaluation de l'interaction de nanoparticules fonctionnalisées avec des cellules hépatiques

1. Objectifs et démarche

Les nanoparticules lipidiques développées dans le cadre de ce projet de thèse ont été formulées avec différents pourcentages en SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** afin d'évaluer l'influence du nombre de motifs GalNac sur leur capacité à interagir avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). En effet, les interactions de multivalence obtenues en "décorant" la surface de nanoparticules à l'aide de ce motif de ciblage GalNac devraient permettre une meilleure internalisation à l'intérieur des cellules hépatiques. L'efficacité de ce processus de reconnaissance par les ASGPR dépend de nombreux paramètres structuraux tels que la nature, le nombre et l'orientation des monosaccharides comme discuté dans l'introduction (Cf Ch I.4.2).

Au cours de cette thèse, l'internalisation des NLC a été évaluée par cytométrie en flux (*en anglais Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*) grâce à des expériences de saturation et de compétition. De plus, l'interaction des motifs GalNac, présents à la surface des NLC, avec une lectine modèle a été évaluée par des expériences de résonance de plasmons de surface (*en anglais Surface Plasmon Resonance ou SPR*).

Ces études ont donc permis d'évaluer la capacité des NLC à être internalisées dans les cellules hépatiques en fonction de la densité de surface en sucre GalNac. Cette relation structure/activité permettra également une meilleure compréhension des processus d'internalisation de ces nanoparticules.

2. Etude de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de choix pour évaluer l'internalisation de composés fluorescents dans des cellules. Elle a d'ailleurs été utilisée précédemment au laboratoire afin d'évaluer l'internalisation de glycoconjugués pour la délivrance ciblée de chélateurs du cuivre via une approche moléculaire.¹⁰⁸ Cette technique permet l'analyse d'un grand nombre de cellules avec une grande vitesse d'acquisition.

2.1 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse qui permet l'étude de particules, ici des cellules selon plusieurs paramètres morphologiques ou de fluorescence et ce, de manière simultanée. Il est possible d'obtenir les caractéristiques de chaque cellule pour une grande population (plusieurs milliers). La morphologie des cellules (taille, granulométrie) permet d'obtenir des informations sur leur structure et viabilité. Leurs propriétés de fluorescence (correspondant aux fluorophores incorporés dans les NLC) permettent quant à elles de mesurer la propension de ces nanoparticules à entrer dans les cellules.

2.1.1. Principe & Appareillage

Les cellules individualisées passent une à une devant une source lumineuse, le plus fréquemment un laser. Ce dernier est préféré aux lampes à vapeur de mercure ou au xénon pour sa plus grande puissance et la finesse du faisceau. Les données optiques résultant de cette excitation de la cellule par la source laser (diffusion, réflexion, réfraction et fluorescence) sont ensuite collectées et analysées. Le traitement des données est ensuite réalisé à l'aide du logiciel Cell Quest Pro.

Le cytomètre utilisé dans le cadre de cette thèse est le Beckman Coulter FACsCalibur. Ce cytomètre est composé de 4 parties distinctes (Figure 97) :

Fluidique : Individualise et aligne les cellules avant leur passage devant la source laser

Optique : récolte les informations optiques notamment les perturbations du faisceau laser suite à son interaction et l'émission de fluorescence

Electronique : Collecte et analyse des signaux optiques

Analyse des données

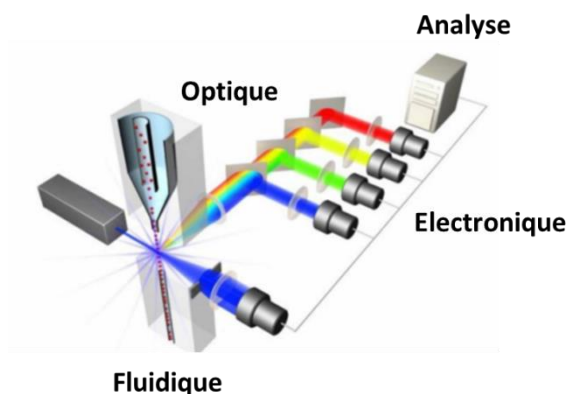


Figure 97 : Appareillage de cytométrie en flux.

Certains cytomètres possèdent également un système de tri cellulaire qui permet la séparation de cellules selon des paramètres définis.

En pratique, l'échantillon contenant les cellules en suspension dans un tampon est fixé hermétiquement à une tige creuse connectée à l'appareil. De l'air injecté dans ce tube permet ensuite de les injecter dans une gaine liquide pressurisée. Ce liquide vecteur est composé d'eau distillée ou de solution saline (PBS, eau de mer filtrée). Grâce à la sous-pression de la gaine par rapport à celle de l'échantillon, les cellules se séparent et s'alignent pour passer individuellement devant le laser. La vitesse du flux laminaire (entre 6 et 40 m/s) peut être adaptée en fonction de l'échantillon et en particulier de sa concentration. Les appareils peuvent analyser jusqu'à 2000 cellules par seconde.

Une fois alignées, les cellules passent une par une à travers un faisceau laser. Les cytomètres peuvent avoir 1, 2 ou même 5 lasers pour les modèles les plus récents, permettant ainsi de couvrir un plus grand nombre de longueurs d'ondes (18 pour 5 lasers contre 3 pour 1 laser). Le FACSCalibur possède deux lasers : 488 nm et 635 nm. Le faisceau est focalisé sur la cellule. La lumière émise, suite à l'excitation par la source laser, suit ensuite un canal optique jusqu'aux détecteurs. Des filtres et miroirs dichroïques permettent la séparation et sélection des longueurs d'ondes allant jusqu'aux détecteurs (Figure 98).

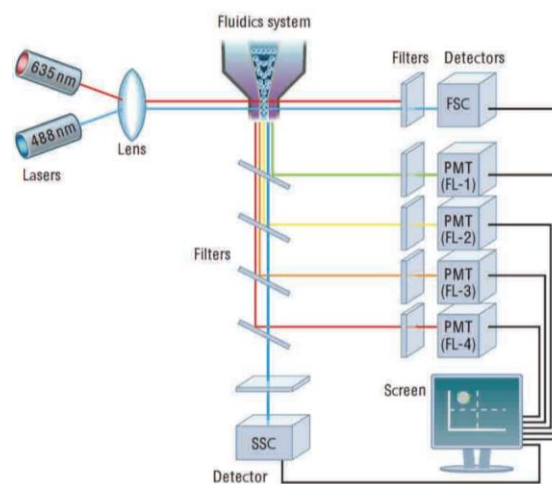


Figure 98 : Chemin optique du FACSCalibur.

Il est également possible d'obtenir des informations sur la fluorescence émise par la cellule analysée après excitation par le laser. Les fluorophores utilisés pour ces expériences sont généralement détectés dans un canal unique de fluorescence. Les filtres et les miroirs dichroïques assurent la sélectivité des longueurs d'ondes d'émission et la détection est alors spécifique.

Le système électronique permet de contrôler les détecteurs (varier le voltage ou le gain). Il permet de convertir les données optiques en données électroniques et ainsi de traiter les signaux obtenus par les détecteurs. Les données collectées peuvent être représentées de différentes manières : histogramme, points, densité, 3D, etc...

2.1.2. Données collectées & exploitation

2.1.2.(a) Morphologie

Chaque cellule qui passe à travers le faisceau laser est un évènement. La lumière émise par cet évènement est collectée grâce au système optique puis analysée par le système électronique. Il est ainsi possible d'obtenir des données relatives à la diffusion aux petits angles (*en anglais Forward Scatter FSC*) ou aux grands angles (*en anglais Side Scatter SSC*) (Figure 99).

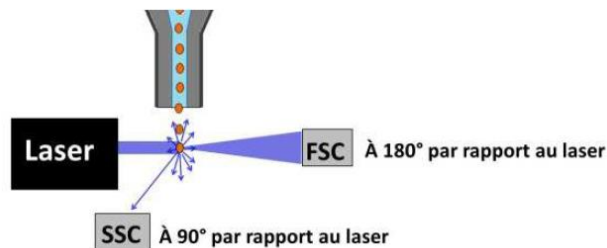


Figure 99 : Principe de la diffusion aux petits angles (*en anglais Forward Scatter FSC*) ou aux grands angles (*en anglais Side Scatter SSC*).

La lumière diffractée aux petits angles (FSC) est collectée sous un angle de 1 à 10°. Elle renseigne sur la taille des cellules. Il s'agit là d'une valeur approximative qui ne permet pas de mesurer avec précision la taille des cellules mais permet de comparer les cellules entre elles. Elle permet ainsi de discriminer les débris (très petite taille) ou les doublets de cellules (grande taille).

La lumière diffractée aux grands angles (SSC) est collectée à un angle de 90°. Elle donne des informations sur la structure cellulaire (morphologie, rapport du volume noyau/cytoplasme) et traduit ce que l'on appelle la granulométrie.

2.1.2.(b) Fluorescence

De manière simultanée, il est possible d'acquérir, en plus de ces informations morphologiques, des données de fluorescence. Collectées à un angle de 90°, les émissions de fluorescence peuvent être

dues à l'autofluorescence de la cellule ou au marquage par un fluorophore. Ces signaux émis après excitation du fluorophore par le laser sont concentrés par une lentille puis séparés selon leur longueur d'onde grâce aux miroirs dichroïques. Ils sont ensuite sélectivement captés par les filtres des photorécepteurs puis amplifiés et convertis en données électroniques par les photomultiplicateurs. Ici, le voltage est proportionnel à la quantité de photons reçus.

2.1.3. Analyse des données

Les données collectées décrites ci-dessus peuvent être analysées et exprimées sous différentes formes par le logiciel CellQuestPro® (Figure 100). La plus commune est l'histogramme qui représente le nombre d'évènements ("counts") exprimé en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée pour chaque évènement. Le diagramme point par point permet de mettre en relation 2 paramètres comme l'intensité de fluorescence et la taille des cellules (Figure 100).

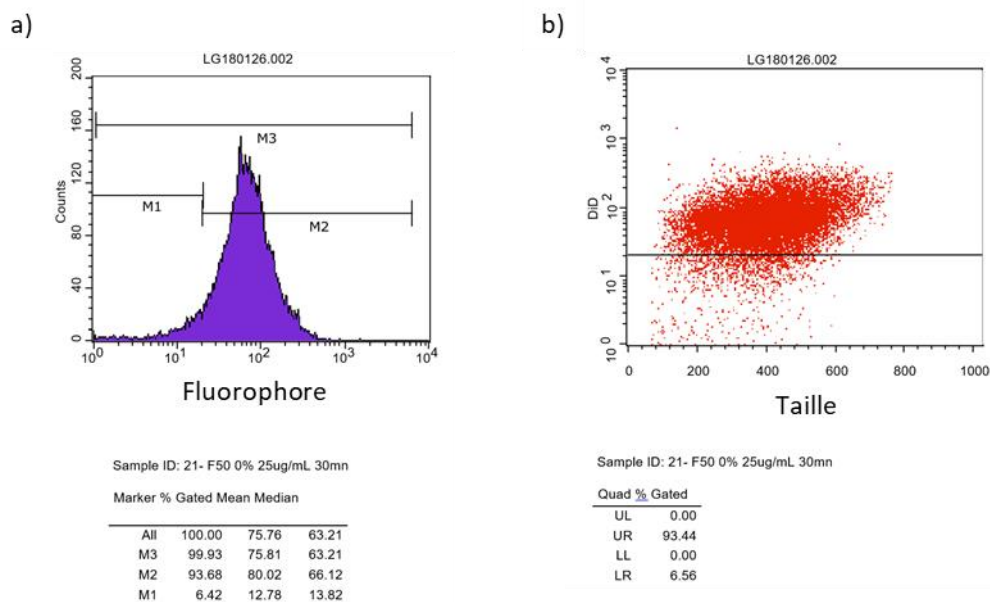


Figure 100 : Exemples de résultats obtenus pour l'incubation (30mn) de nanoparticules lipidiques chargées en fluorophore (DiD) sur des cellules HepG2, a – nombre d'évènements en fonction de l'intensité de fluorescence b - Taille des cellules en fonction de l'intensité de fluorescence (indique le pourcentage de cellules positives).

2.1.4. Sélection & Réglages

Les cellules en nécrose ou en apoptose ont des tailles plus petites et produisent plus de débris, conduisant à des valeurs de FSC plus petites que pour des cellules saines. De plus, leurs membranes perdent leur intégrité ; des changements morphologiques s'opèrent et les cellules deviennent plus granuleuses conduisant à des SSC plus grandes (Figure 101).

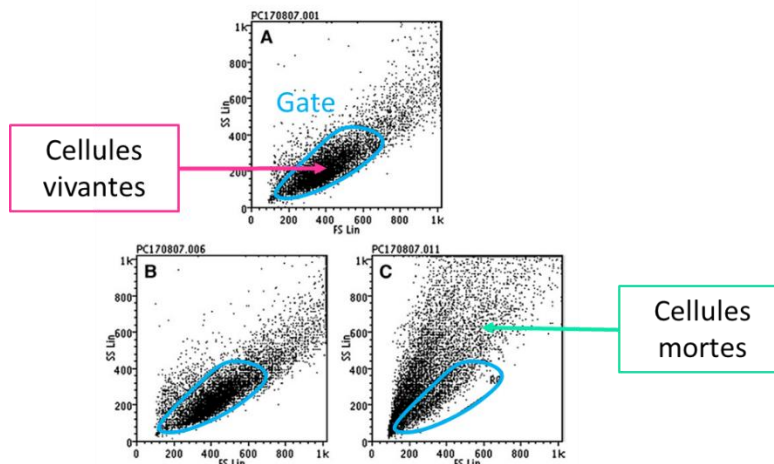


Figure 101 : Exemple de sélections de population de cellules vivantes.

Afin de s'affranchir des évènements correspondant à des cellules mortes, en apoptose, aux débris ou encore à des doublets de cellules (taille supérieure), il est nécessaire de sélectionner une population de cellules vivantes. Ceci est réalisé au préalable sur des cellules contrôle en analysant uniquement les paramètres structurels de taille (FSC) et la granulométrie (SSC). Une sélection, appelée « gate » est ainsi effectuée autour de la population de cellules vivantes (Figure 101A). Cette gate permet d'évaluer la viabilité des cellules en présence d'un composé cytotoxique. A titre d'illustration, les Figure 101B et Figure 101C représentent le diagramme point par point FSC/SSC des mêmes cellules après incubation avec une quantité croissante de composé cytotoxique. En présence d'une quantité d'agent cytotoxique plus importante (Figure 101C) une nette augmentation de la granulométrie et l'apparition d'évènements de petites tailles sont détectées. Le nuage de point s'oriente différemment. Le nombre d'évènements dans la gate sélectionnée pour la population de cellules contrôles permet de calculer le pourcentage de cellules vivantes.

2.2 Choix du type cellulaire, des nanoparticules et du fluorophore

2.2.1. Cellules

Pour ces expériences de cytométrie en flux, la lignée cellulaire HepG2 a été choisie. Une lignée est issue d'une isolation clonale, elle correspond donc à un type cellulaire bien défini qui évolue peu au cours du temps et qui a été immortalisée ; les cellules peuvent se diviser indéfiniment. L'immortalité peut être due à la nature des cellules cancéreuses ou les cellules ont pu être modifiées génétiquement ("immortalisées"). Les cellules HepG2 sont des cellules hépatiques humaines cancéreuses prélevées

par biopsie d'un hépatocarcinome en 1979.²²⁸ Elles sont très largement utilisées en tant que modèle d'hépatocytes humains pour des essais de cytotoxicité²²⁹ ou de délivrance ciblée vers le foie.

Ces cellules possèdent à leur surface et de manière abondante, le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR). Plus de 75 000 lectines, capables de reconnaître les motifs GalNac, sont présentes par cellule ; faisant des cellules HepG2 un des modèles les plus décrits pour l'étude des mécanismes d'internalisation médiés par ce récepteur.²³⁰

L'avantage d'utiliser une lignée cellulaire est la possibilité de reproduire facilement une expérience avec un modèle biologique relativement stable dans le temps. De plus, ces cellules ont un temps de génération d'environ 20h, relativement rapide. Ce sont également des cellules adhérentes, ce qui signifie qu'elles s'attachent au support sur lequel elles sont cultivées, un aspect pratique pour les étapes de rinçage où les cellules en suspension peuvent être perdues. Par contre, ces cellules ont une certaine propension à s'agréger, compliquant l'analyse par cytométrie en flux où les cellules doivent être séparées et alignées.

2.2.2. Nanoparticules

Les nanoparticules conçues dans le cadre de ce projet pour la délivrance de chélateurs de cuivre vers le foie ont un diamètre hydrodynamique de 50 nm. En effet, il a été montré que les nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm présentent un intérêt tout particulier pour la délivrance de médicaments.²³¹ Leur petite taille leur permet de réduire leur prise en charge par les macrophages. Ces particules ont donc un temps de circulation dans le sang plus long. Elles peuvent également entrer en contact avec les hépatocytes en passant par les pores des sinusoides. Ceux-ci sont composés, entre autres, de cellules endothéliales perforées par des fenêtres de 150-175 nm.²³² Les particules de moins de 100 nm ont donc de manière générale une meilleure internalisation cellulaire. De plus, une étude sur la taille optimale pour l'internalisation de liposomes fonctionnalisés par des motifs Gal ou GalNac a montré qu'un maximum d'internalisation était atteint pour des particules de 70 nm.²⁰⁴

Les nanoparticules lipidiques développées dans le cadre de ce projet de thèse ont été formulées avec différents pourcentages en SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** quantifiés dans la partie précédente : Formulation A (0 %), Formulation B (4,6 %), Formulation C (13,9 %) et Formulation D (23,3 %).

Ceci nous permettra d'évaluer l'influence du nombre de motifs GalNac sur leur capacité à interagir avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR).

Des nanoparticules contrôles F50-MyrjTM S100, présentant des pourcentages similaires en MyrjTM S100 (Formulation B', C' et D'), ont également été formulées. Comme nous l'avons vu précédemment (Cf Ch

II.2.1), le MyrjTM S100 possède une taille similaire au SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10**. Elles serviront de contrôles afin d'évaluer l'impact de la présence des sucres GalNAc sur la reconnaissance par les ASGPR (Figure 102).

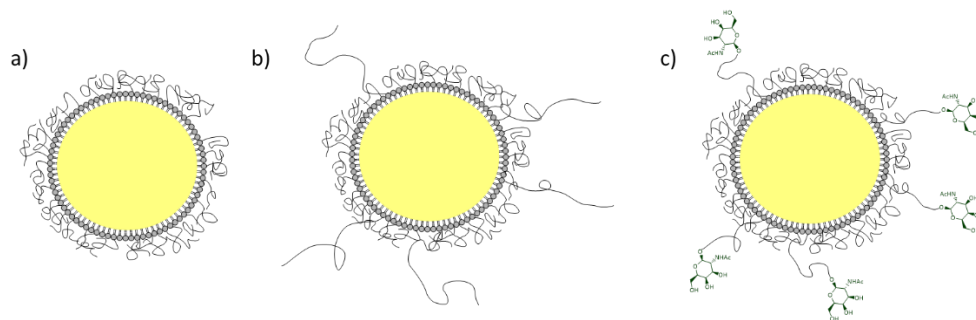


Figure 102 : Nanoparticules évaluées par cytométrie en flux a - F50-0 % ; b - F50-MyrjTM S100 ; c - F50-GalNAc.

2.2.3. Fluorophore

Afin d'évaluer la quantité de NLC effectivement internalisée dans les cellules HepG2 par cytométrie en flux, un fluorophore, le DiD (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine, 4-Chlorobenzenesulfonate Salt), est encapsulé à l'intérieur des NLC. Le DiD est un dérivé lipophile de la cyanine 5 utilisé classiquement pour le marquage des LipidotsTM (Cf Ch I.3.2). Il est encapsulé à plus de 99 % dans le cœur des nanoparticules sans modifier leur diamètre ni les déstabiliser (Figure 103).¹⁸² De plus, le DiD conserve ses propriétés de fluorescence et ne diffuse pas à l'extérieur des nanoparticules.

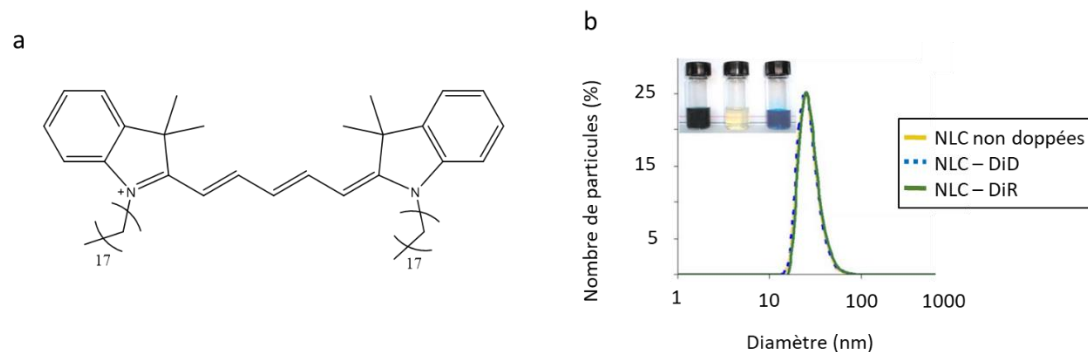


Figure 103 : a – Structure du fluorophore 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine, 4-Chlorobenzenesulfonate Salt (DiD), b - Distribution de taille de nanoparticules non-dopées et chargées en fluorophore (DiD ou DiR) mesurée par DLS dans un tampon PBS 0,1X. Sur la photo – gauche : NLC chargées en DiR, milieu : NLC non-dopées, droite : NLC chargées en DiD.

Le DiD a une longueur d'onde d'excitation à 644 nm et d'émission à 663 nm, compatible avec le cytomètre. De plus, l'autofluorescence des cellules est minimale dans cette gamme de longueurs d'ondes. Ceci permet donc d'avoir une détection spécifique en optimisant le rapport signal/bruit.

Pour permettre son encapsulation dans les NLC, le fluorophore est solubilisé dans du dichlorométhane et ajouté à la phase lipidique contenant la cire, l'huile et les phospholipides. Après évaporation sous pression réduite du solvant, les nanoparticules sont formulées comme décrit dans la Figure 67.

Tous les lots utilisés pour ces analyses par cytométrie en flux contiennent une quantité identique en DiD encapsulé et leur fluorescence est systématiquement mesurée avant chaque expérience afin de contrôler d'éventuels pertes ou photoblanchiment du fluorophore.

Des images obtenues par microscopie confocale ont permis d'observer le devenir des NLC chargées en DiD sur la lignée cellulaire HepG2 (Figure 104).

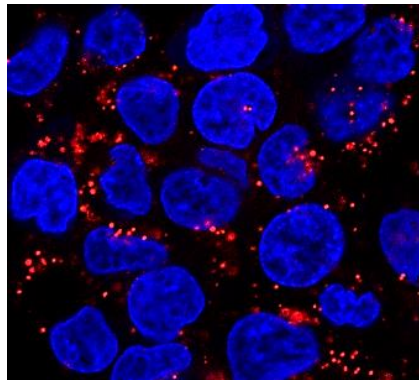


Figure 104 : Cellules HepG2 dont l'ADN contenu dans les noyaux a été marqué au Hoechst (bleu). Observation de la fluorescence émise par le DiD (rouge) encapsulé dans les NLC au sein de cellules après 30 min d'incubation, 37 °C, 5 % CO₂, et fixation des cellules.

Les NLC semblent ici s'accumuler dans des vésicules à l'intérieur des cellules hépatiques. De plus, aucune fluorescence n'est visible au niveau des membranes cytoplasmiques. Les NLC ne restent donc pas accrochées à l'extérieur des cellules et la fluorescence mesurée en cytométrie en flux sera due uniquement aux NLC ayant été effectivement internalisées.

2.3 Mise au point des expériences de cytométrie en flux

2.3.1. Expérimentation FACS

Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules sont mises en culture dans des plaques 12 puits puis incubées avec les nanoparticules pendant 30 min, 37 °C, 5 % CO₂ (Figure 105). Le cycle d'internalisation des ASGPR est d'environ 10 min,²³⁰ ce temps de 30 min est donc théoriquement suffisant pour permettre l'internalisation des NLC. Les cellules sont ensuite lavées afin d'éliminer les particules n'ayant pas été incorporées, puis détachées de leur support. Pour cela, un traitement trypsine-EDTA est appliqué. La trypsine est une protéase du suc pancréatique qui hydrolyse les liaisons peptidiques, responsables de l'adhésion des cellules. L'EDTA quant à lui favorise la déstabilisation des protéines d'adhérence, facilitant ainsi l'activité de la trypsine. Une fois décrochées, les cellules sont mises en suspension dans du tampon de dissociation afin d'éviter que les hépatocytes ne s'agrègent. Celui-ci est composé de PBS et d'EDTA et ne comporte pas de calcium ni de magnésium afin de bloquer les mécanismes d'adhésion.

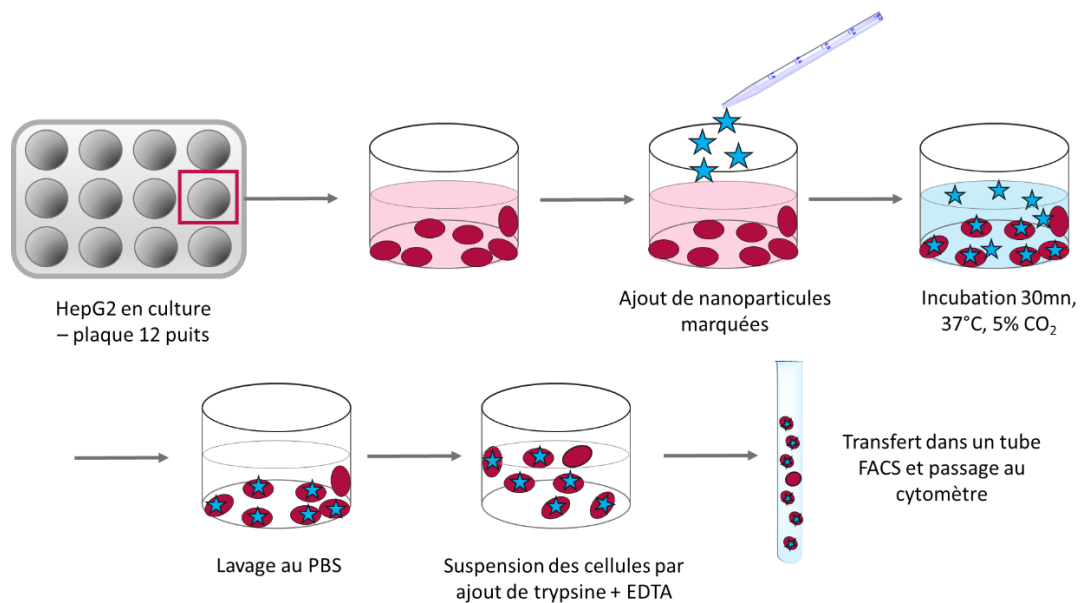


Figure 105 : Préparation des échantillons pour le FACS

Les cellules en suspension dans le tube polypropylène sont conservées dans la glace avant leur passage au cytomètre. Le froid permet de ralentir les mécanismes cellulaires et évite un éventuel relargage des nanoparticules.

2.3.2. Evaluation des résultats

Les résultats obtenus en cytométrie en flux sont analysés sur 20 000 cellules vivantes collectées par le cytomètre. Pour chaque expérience, un contrôle composé de cellules n'ayant pas été incubées avec les nanoparticules est systématiquement réalisé. Il représente la répartition de taille et granulométrie d'une population cellulaire vivantes ou « gate » comme discuté précédemment (Figure 101).

Afin d'évaluer la capacité de particules à entrer dans les cellules hépatiques, l'intensité de fluorescence des hépatocytes est mesurée. Aux longueurs d'onde du DiD (644/663 nm), les cellules auto-fluorescent faiblement. Lorsque celles-ci sont incubées avec des NLC chargées en DiD (NLC-DiD), on peut voir une augmentation de la fluorescence correspondant à l'internalisation de particules dans la cellule. On peut voir en Figure 106 que même à faible concentration (25 µg/mL), la quasi-totalité des cellules ont internalisé des NLC. L'utilisation du pourcentage de cellules positives n'est donc pas l'outil adéquat pour comparer les NLC-GalNac avec les autres nanoparticules.

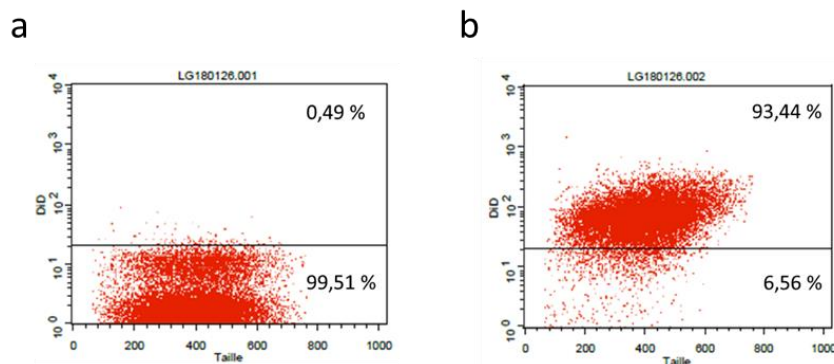


Figure 106 : Pourcentage de cellules HepG2 positives évalué par cytométrie en flux a – cellules contrôles, observation de l'autofluorescence des cellules b – cellules incubées pendant 30 min avec des NLC Formulation A (0 %) à 25 µg/mL en lipides. 93,44 % des cellules sont dites "positives" ; elles ont incorporé suffisamment de NLC pour passer le seuil de fluorescence choisi.

Pour les différentes conditions testées, la Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) peut également être comparée.²³³ Dans le cas de NLC et à concentration égale, une MFI plus grande signifie qu'une plus grande quantité de nanoparticules a été internalisée. Généralement, les données de fluorescence peuvent être source d'erreurs car dépendantes de nombreux paramètres : pH, potentiel oxydo-réducteur du milieu. Ici, comme le fluorophore est incorporé à l'intérieur des NLC, il n'est pas en contact direct avec le milieu extérieur et de ce fait, est moins affecté par les changements qui peuvent survenir en contact direct avec le milieu intracellulaire.

En plus d'analyser les MFI, la comparaison des concentrations efficaces médianes (EC50) de saturation de fluorescence peut être intéressante. L'EC50 est la concentration en nanoparticules à laquelle 50 %

de l'intensité maximale de fluorescence est atteinte. Cet indicateur est un paramètre pertinent pour comparer l'efficacité d'internalisation des NLC lorsque le même mécanisme est mis en jeu. Il permet également de mettre en évidence des mécanismes différents.

2.4 Expérience & résultats

2.4.1. Toxicité des nanoparticules

La toxicité des NLC développées au DTBS a déjà été évaluée précédemment dans de nombreuses études^{138,183,184,234} mais jamais sur des cellules HepG2. Les nanoparticules contrôles (Formulation A, 0 %) sont toxiques à environ 1000 µg/mL en lipides sur cellules MCF-7 (lignée tumorale mammaire) après 24h d'incubation.²³⁴ Pour les expériences de cytométrie en flux, il a donc été décidé de travailler sur une gamme de concentration où les nanoparticules n'entraînent pas de toxicité au niveau des cellules. Cette gamme a donc été fixée de 0 µg/mL à 500 µg/mL en particules.

La toxicité négligeable des NLC à la plus forte concentration (500 µg/mL) a été confirmée par cytométrie en flux pour un temps d'incubation de 30 min (Figure 107).

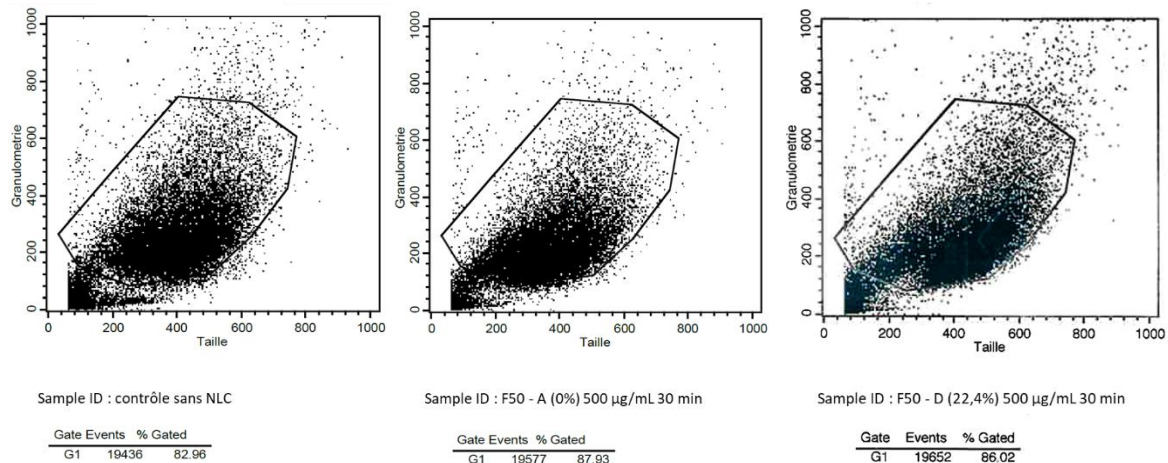


Figure 107 : Diagrammes point par point de la granulométrie (SSC) des cellules HepG2 en fonction de leur taille (FSC, 20 000 cellules). La région de cellules viables déterminée sur le contrôle est ici entourée et dupliquée sur les analyses en présence de NPs (incubation 30 min). Gauche : cellules contrôles ; Milieu : cellules incubées avec les NLC A (0%), à 500 µg/mL ; Droite : cellules incubées avec les NLC D (23,3% GalNAC) à 500 µg/mL.

La fenêtre effectuée autour de la population de cellules vivantes sur le contrôle sans NLC indique un pourcentage de cellules vivantes de 83 %. Cette même fenêtre, appliquée aux diagrammes correspondants aux populations de cellules incubées avec les formulations A et D, indique des

pourcentages de cellules viables de 88 % pour la formulation A et 86 % pour la formulation D. Les différents lots de nanoparticules utilisés ne sont donc pas toxiques pour les cellules HepG2 à la concentration maximale utilisée 500 µg/mL pour un temps d'incubation de 30 min.

2.4.2. Internalisation des NLC dans les cellules HepG2

L'internalisation des différents lots de nanoparticules dopées en fluorophore est étudiée par cytométrie en flux sur les cellules humaines HepG2 exprimant les ASGPR. Cette étude donne des éléments de compréhension sur les mécanismes d'internalisation des NLC dans les cellules hépatiques.

2.4.2.(a) Comparaison des MFI

Les cellules sont incubées pendant 30 min en présence des NLC décorées par des motifs GalNac (Formulations B, C et D), des formulations contrôles (Formulations B', C', D') et des F50-0 % (Formulation A) dans une gamme de concentration de 0 à 500 µg/mL en lipides. Les courbes représentant l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) en fonction de la concentration en NLC sont reportées Figure 108. Ces courbes donnent des indications sur la capacité des NLC à entrer dans les cellules HepG2 et le processus d'internalisation.

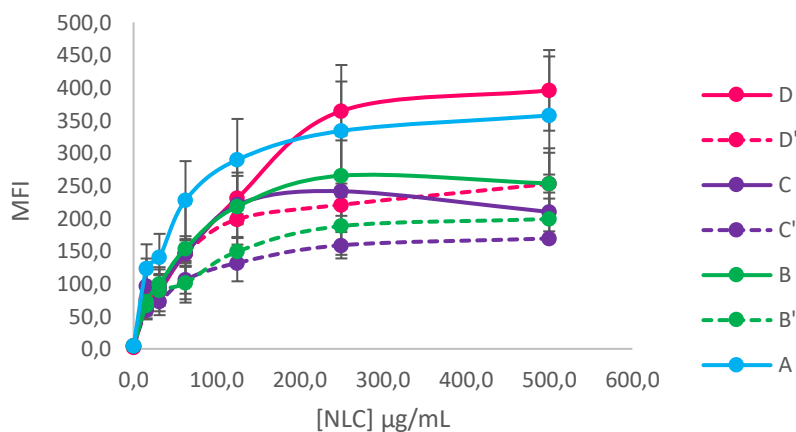


Figure 108 : Courbe d'internalisation des NLC (dopées en fluorophore DiD) de 0 à 500 µg/mL dans les cellules HepG2 après 30 min d'incubation. MFI = Mean Fluorescence Intensity, n=3.

Pour chaque lot de NLC testé, une hyperbole est obtenue. Ce type de courbe est souvent obtenu dans le cadre de l'internalisation de nanoparticules lipidique¹⁹³ et montre ici que, quel que soit la formulation, les NLC entrent bien dans les cellules hépatiques.

Les moyennes des intensités de fluorescence maximales (MFI-max) pour les formulations D (23,3 % GalNac) et A (0 %) sont supérieures aux autres formulations (395 et 350 respectivement contre 250 à 170). Les formulations B, C et les contrôles B', C' et D' sont internalisés avec la même efficacité. Il semble donc que dans le cas de ces dernières formulations les motifs GalNac n'aient pas d'influence sur le processus d'internalisation. Par contre une meilleure internalisation est obtenue avec les formulations A (0%) et D (23,3 % GalNac).

Les NLC de la formulation A sont de petite taille et surtout, ne possèdent pas de surfactants « longs » PEGylés₁₀₀, ce qui pourrait être à l'origine de cette meilleure internalisation. La comparaison des courbes pour la formulation D (23,3 %) et le contrôle D' correspondant (présentés Figure 109) met en évidence une différence significative d'internalisation. La composition et la taille de ces nanoparticules est la même. La seule différence est la présence, ou non, du ligand GalNac à l'extrémité des surfactants PEGylés.

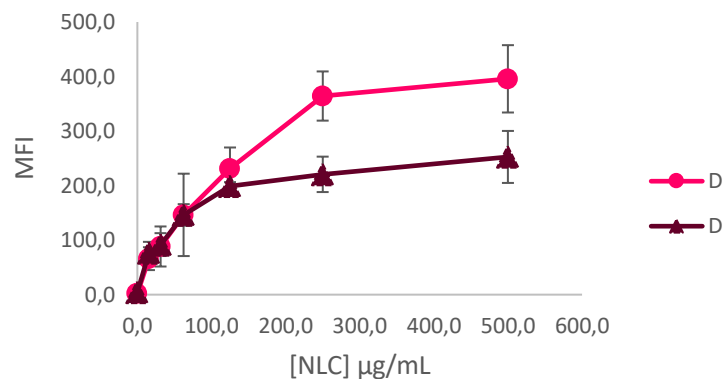


Figure 109 : Courbe d'internalisation des NLC Formulation D (23,3 % GalNac) et D' (23,3 % Myrj™ S100) de 0 à 500 µg/mL en lipides dans les cellules HepG2 après 30 min d'incubation, n=3.

Ceci montre que la présence de motifs GalNac, en quantité importante, a une influence notable sur l'internalisation des NLC dans les cellules hépatiques. Comme discuté précédemment, de nombreux paramètres structuraux jouent un rôle clé dans les interactions de multivalence avec les ASGPR. Il est donc possible que le nombre et l'orientation des motifs GalNac dans la formulation D permettent une géométrie adaptée pour la reconnaissance par les ASGPR.

2.4.2.(b) Détermination et comparaison des EC50

Pour comparer les différents types de NLC, les EC50 ont été déterminés grâce à la modélisation de l'équation de Hill.²³⁵ Cette équation est classiquement utilisée en pharmacologie pour représenter des résultats d'expériences de liaison d'un ligand à son récepteur.

Equation de Hill :

$$y = \frac{y_{max} \times x^n}{(EC50^n + x^n)}$$

y_{max} est la valeur maximale de y (intensité de fluorescence)

x est la concentration en lipides de nanoparticules

EC50 est la valeur de x à 50 % du plateau (soit pour $y = \frac{y_{max}}{2}$)

n est le coefficient de Hill, il reflète le nombre de ligands liés par récepteurs ou peut être considéré comme un coefficient "d'interaction". Il reflète alors la coopérativité entre plusieurs sites de liaison de ligands.

Si $n = 1$, un ligand se lie simplement à un récepteur, comme dans l'équation de Michaelis et Menten.

Si $n > 1$, il y a plus d'un site de liaison par récepteur. Ce nombre peut également être interprété comme une coopération positive. La liaison d'un ligand facilite la liaison du ligand suivant au niveau d'autres sites de liaison du récepteur.

Si $n < 1$, il y a théoriquement moins d'un site de liaison par récepteur. Il peut ici y avoir une coopération négative. La liaison d'un ligand diminue l'affinité du récepteur pour des liaisons ultérieures d'autres ligands.

Grâce à cette équation, il est donc possible de déterminer les EC50 des différentes courbes. Un exemple de modélisation de cette équation pour la Formulation D est présenté en Figure 110.

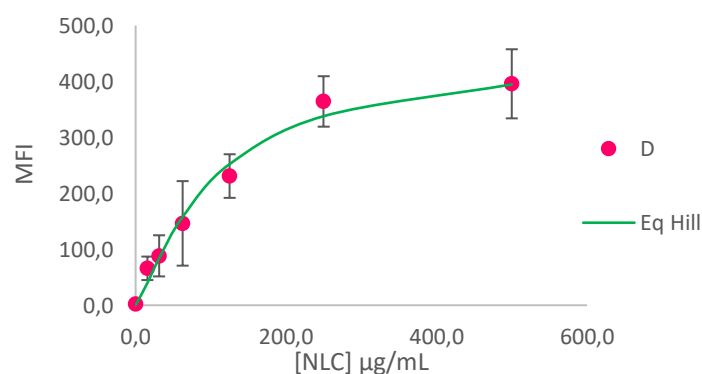


Figure 110 : Courbe d'internalisation des nanoparticules lipidiques Formulation A (23,3 % GalNAC) de 0 à 500 µg/mL en lipides de NLC dans les cellules HepG2 (•) modélisées par une équation de Hill (-).

Les données d'EC50 et du coefficient de Hill n , obtenus grâce aux fits effectués à l'aide de l'équation de Hill, sont répertoriés dans le Tableau 14.

	Coefficient de Hill n	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A (0 %)	$1,3 \pm 0,2$	36 ± 8
B (4,6 % GalNAc)	$1,5 \pm 0,6$	43 ± 7
C (13,9 % GalNAc)	$1,5 \pm 0,5$	41 ± 4
D (23,3 % GalNAc)	$1,5 \pm 0,6$	70 ± 15
B' (4,6 % Myrj TM S100)	$1,0 \pm 0,2$	47 ± 6
C' (13,9 % Myrj TM S100)	$1,3 \pm 0,6$	44 ± 10
D' (23,3 % Myrj TM S100)	$1,7 \pm 0,7$	45 ± 20

Tableau 14 : Résultats d'EC50 et de coefficient de Hill modélisés grâce à l'équation de Hill.

Les valeurs d'EC50 et de coefficient de Hill sont similaires pour tous les lots ($43 \pm 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ et $1,4 \pm 0,9$ respectivement) à l'exception de la Formulation D dont l'EC50 est de $70 \pm 15 \mu\text{g}/\text{mL}$. Cette valeur, très différente des autres, suggère alors que les NLC de la formulation D ne sont pas internalisés par le même récepteur que les autres formulations de nanoparticules.

L'étude des MFI_{max} montre une meilleure internalisation des NLC de la formulation D. Ces résultats vont donc également dans le sens d'un mécanisme d'entrée différent pour la Formulation D par rapport aux autres formulations. Il est donc possible que pour ce lot de NLC (formulation D), l'accessibilité et l'orientation spatiale des motifs GalNAc permettent une reconnaissance par les ASGPR, et que le mécanisme d'internalisation des autres NLC soit différent.

2.5 Conclusion

Dans les expériences précédentes, la quantité de GalNAc présents à la surface des nanoparticules lipidiques (NLC) a été déterminée avec précision par UPLC couplé à une détection ELSD.

L'évaluation de l'internalisation dans les cellules HepG2 des NLC décorées par des GalNAc par cytométrie en flux a montré que :

- Toutes les NLC sont très rapidement et facilement internalisés dans les hépatocytes

- Les sucres GalNac n'ont pas d'influence significative sur l'internalisation des NLC pour les formulations B et C (respectivement 4,6 % et 13,9 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**)

- En quantité plus importante (Formulation D ; 23,3 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**), ces sucres ont un impact significatif sur le processus d'internalisation. Ceci suggère un mécanisme différent pour ces nanoparticules qui pourrait être médié par les ASGPR.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de processus d'internalisation :

- La densité de surface en GalNac (et l'organisation spatiale des sucres) dans la formulation D permet une reconnaissance multivalente par les ASGPR alors que celle-ci n'est pas suffisante dans le cas des formulations B et C.

- Les sucres GalNac à l'extrémité des surfactants des formulations B et C ne sont pas accessibles pour la reconnaissance des ASGPR (conformation champignon par exemple (Figure 122)).

Afin d'évaluer l'accessibilité des GalNac à la surface des NLC, des expériences de résonance des plasmons de surface ont été effectuées.

3. Evaluation de l'accessibilité des ligands GalNac à la surface des NLC par résonance de plasmons de surface

La résonance de plasmons de surface (SPR) est une technique de choix pour étudier l'interaction d'un ligand avec son récepteur. Dans le cadre de cette thèse, une lectine reconnaissant spécifiquement les motifs GalNac, la *macrophage galactose-type lectin* (MGL)²³⁶ et la *Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin* (DC-SIGN), utilisée comme contrôle négatif, ont été greffées sur une surface d'or. L'interaction entre les sucres GalNac présents à la surface des NLC et le récepteur est ensuite évaluée par SPR sur un système Biacore T200 sur puce CM3 série S. Pour ces expériences, les formulations B, C et les contrôles incorporant un pourcentage identique de MyrjTM S100, B' et C' ont été analysées. La formulation D, dégradée après les expériences de cytométrie en flux, n'a malheureusement pas pu être testée. Ces travaux ont été effectués à l'IBS dans l'équipe de Franck Fieschi en collaboration avec Corinne Deniaud.

3.1 La résonance de plasmons de surface

La résonance de plasmons de surface (SPR) permet d'obtenir des informations sur des interactions entre des molécules. Dans le cas ci-présent, une lectine (la MGL) est immobilisée sur une surface d'or recouverte d'un polymère de glucose, le dextran. Les NLC fonctionnalisées par des GalNac sont ensuite

injectées. La SPR permet l'analyse de cette interaction grâce à un changement de l'angle du rayon réfléchi θ .

3.1.1. Principe

Avant d'aborder en détail le principe de la SPR, il est nécessaire de rappeler certaines notions.

Les plasmons de surface

Dans les métaux tels que l'or ou l'argent, les électrons libres peuvent générer une oscillation de la densité de charge. Cette onde distincte est appelée onde plasma. Un plasma est composé d'atomes ou de molécules partiellement voire totalement ionisés, mais dont la charge globale reste neutre. A titre d'exemple, un plasma d'hydrogène est composé d'atomes d'hydrogène H, de protons hydrogène H^+ et d'électrons e^- . L'oscillation des électrons, induite par le couplage avec des photons, sont appelés les plasmons. Les plasmons de surface (SPs) sont donc des ondes de surface. Elles se propagent selon une composante longitudinale à une interface métal (or) et milieu diélectrique (verre ; non conducteur mais polarisable).

Notion de lumière polarisée et onde évanescente

Un faisceau de lumière polarisée monochromatique, lorsqu'il traverse deux milieux possédant des indices de réfractions différents, est réfléchi et réfracté (Figure 111a). Il est cependant possible d'obtenir une réflexion totale de la lumière en ajustant l'angle du rayon réfléchi θ (à la résonance). Malgré cette réflexion totale, une onde se propage à travers l'interface des deux milieux, l'onde évanescente (Figure 111b).

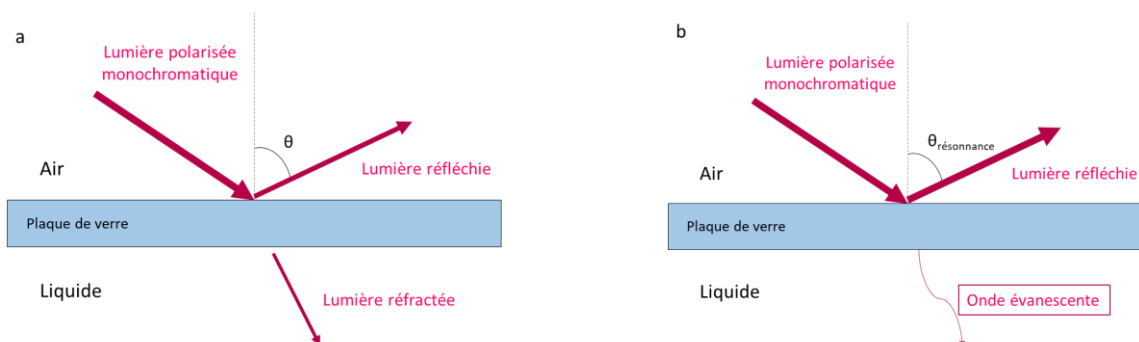


Figure 111 : Principe de réfraction de la lumière et génération d'onde évanescente a – Réflexion partielle de la lumière b – Réflexion totale de la lumière à l'angle de résonance et génération d'une onde évanescente.

En pratique, une fine couche d'or est déposée sur une surface. Un prisme est utilisé afin de réaliser le couplage entre les photons de la lumière incidente et les électrons du métal. A la résonance, les plasmons de surface ainsi générés sont une onde évanescente. Cette onde évanescente est le point

clé des mesures d'interactions. Une perturbation même infime de cette onde induit une modification de l'angle de résonance.

Dans le cadre de ce projet, la StrepTactine est d'abord immobilisée sur la surface d'or, recouverte de dextran, d'une puce CM3 série S. Elle permettra ensuite la fonctionnalisation de la surface par les lectines MGL et portant une étiquette StrepTagII (Figure 112).

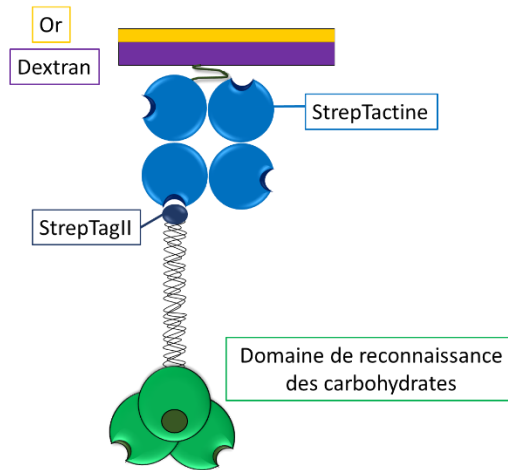


Figure 112 : Fonctionnalisation de la surface de dextran par la StrepTactine permettant le greffage d'une lectine-StrepTagII possédant 3 domaines de reconnaissance des carbohydrates.

Ensuite, un flux continu de tampon chargé en nanoparticules lipidiques permet de mettre en contact les NLC avec les récepteurs. L'interaction entre les NLC-GalNAC et les lectines entraîne une perturbation dans l'onde évanescente ayant pour conséquence un changement de l'angle SPR. Cette variation est enregistrée par un détecteur. Il est alors possible de suivre en temps réel la fixation des ligands (Figure 113).

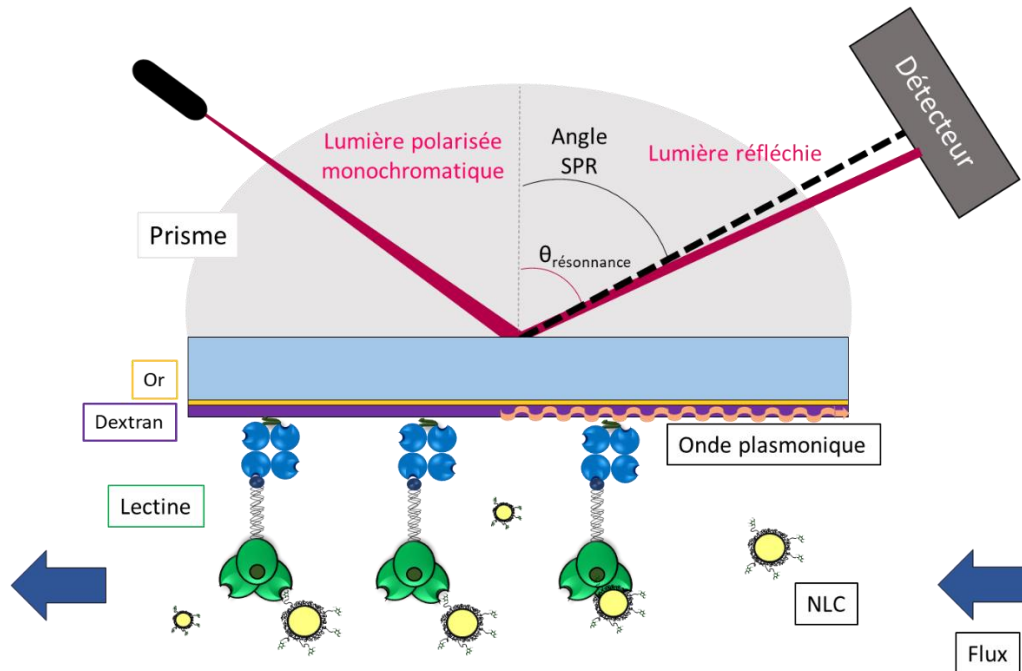


Figure 113 : Principe de l'analyse SPR. Le système SPR est composé d'une partie fluïdique permettant l'injection de composés en solution au niveau d'une surface d'or où sont greffés les récepteurs. Une source de lumière polarisée génère une onde plasmonique induisant des changements au niveau de l'angle de la lumière réfléchi. Ce faisceau est ensuite collecté par un détecteur optique convertissant les données optiques en sensorgramme.

3.1.2. Choix des lectines et établissement des voies

La technique de SPR sur le Biacore permet d'analyser en série un échantillon sur plusieurs surfaces fonctionnalisées de manière différentes. Ceci permet d'évaluer et de comparer l'interaction d'un même composé avec différents récepteurs.

Comme présenté précédemment, les lectines utilisées dans le cadre de ces expériences de SPR sont la *macrophage galactose-type lectin* (MGL)²³⁶ et la *Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin* (DC-SIGN).²³⁷ Ces lectines de type C possèdent un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) impliquant un atome de calcium lors de l'interaction protéine-sucre.

Macrophage galactose-type lectin MGL

La MGL humaine est une lectine transmembranaire reconnaissant les monosaccharides galactose et GalNAc. Elle est présente à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. Deux isoformes de la MGL existent et ont été clonés séparément par deux équipes. L'isoforme 1 a été obtenue à partir de cellules dendritiques (DC) et appelée DC-ASGPR pour sa sélectivité similaire à celle de l'ASGPR.²³⁸ L'isoforme 2 a quant à elle été obtenue à partir de macrophages : la MGL.²³⁹ La MGL et la DC-ASGPR possèdent des CRD identiques, suggérant qu'elles reconnaissent les mêmes sucres.

Le domaine extracellulaire de la lectine humaine MGL (MGL S ECD) a été cloné à partir de la séquence de l'isoforme 2. Cette lectine, utilisée ici pour les expériences de SPR, possède des domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD).²³⁶ Elle reconnaît spécifiquement les motifs N-acétyl-D-galactosamine et sera utilisée pour la reconnaissance des sucres GalNac sur les NLC fonctionnalisées. Elle permettra alors de déterminer l'accessibilité de ces sucres en surface des nanoparticules.

Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin DC-SIGN

La DC-SIGN est une lectine membranaire possédant 4 CRD permettant ainsi de reconnaître des motifs multivalents.²⁴⁰ Ces domaines reconnaissent spécifiquement les résidus mannose. Cette lectine est présente à la surface des cellules dendritiques et est notamment connue pour son rôle de protéine récepteur du VIH.²⁴¹ Elle servira ici de contrôle de sélectivité, afin de vérifier que l'interaction observée entre la MGL et les NLC est spécifiquement due aux GalNac.

Ces lectines, portant une étiquette StrepTagII, ont été greffées à la surface d'or recouverte de dextran par liaison spécifique avec la StrepTactine. Les différents canaux résultants sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 15).

FC1	StrepTactine
FC2	StrepTactine/MGL S ECD
FC3	StrepTactine/MGL S ECD
FC4	StrepTactine/DC-SIGN S ECD

Tableau 15 : Correspondances des canaux utilisés en SPR avec la fonctionnalisation effectuée.

Le canal FC1 est un canal contrôle, fonctionnalisé uniquement par la StrepTactine. Les canaux FC2 et FC3 sont les canaux où les puces ont été fonctionnalisées par la lectine MGL reconnaissant spécifiquement les GalNac. La présence de ces deux canaux identiques permettra un double des résultats. Le canal FC4 est fonctionnalisé par la lectine DC-SIGN S ECD reconnaissant spécifiquement les sucres mannoses et servira de contrôle négatif.

3.1.3. Acquisition des résultats

L'injection d'un composé interagissant avec le récepteur greffé à la surface d'une puce génère un sensorgramme représentant le signal obtenu en fonction du temps (Figure 114).

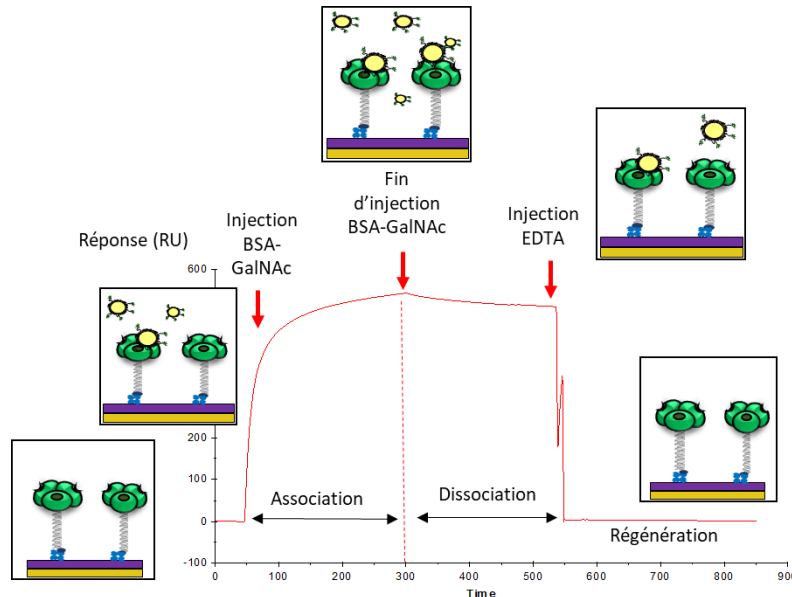


Figure 114 : Sensorgramme obtenu pour le passage de BSA-GalNac sur biocapteurs fonctionnalisés par la lectine MGL.

Durant la phase d'association, les ligands GalNac se lient au récepteur.

Un palier est ensuite atteint lorsque l'on atteint l'équilibre.

Le flux de ligand est ensuite stoppé et une décroissance est observée, indiquant un début de dissociation des ligands.

L'EDTA est ensuite ajouté. Ce composé permet de chélater les ions Ca^{2+} présents dans le milieu. Les lectines utilisées dans cette expérience étant calcium dépendantes, cette injection d'EDTA permet la dissociation totale des ligands GalNac de leur récepteur.

La surface est ainsi régénérée et peut à nouveau être utilisée.

Les composés à analyser sont donc passés successivement sur les différentes voies (de FC1 à FC4). Pour analyser les résultats, le logiciel BIAeval permet de soustraire la piste FC1 (contrôle StrepTactine) aux différentes pistes afin de s'affranchir des interactions non spécifiques. Par exemple, l'analyse de l'interaction observée en FC3 est présentée sous la forme de FC3 - FC1.

La FC2 et FC3 ayant montré des résultats identiques pour toutes les expériences, seule la FC3 sera présentée ici.

3.2 Mise au point de l'expérience

Les puces sont recouvertes d'une surface de dextran sur laquelle il est d'abord nécessaire de greffer la StrepTactine. Ensuite, les voies FC2, FC3 et FC4 sont fonctionnalisées avec les lectines.

3.2.1. Fonctionnalisation de la surface de dextran

Pour greffer la StrepTactine sur la surface de dextran, 80 μL d'un mélange d'EDC/NHS à 0,05 M sont injectés sur les pistes FC1, FC2, FC3 et FC4 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. En conservant le même débit, 195 μL de StrepTactine à 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont injectés sur les différentes pistes. La surface est ensuite inactivée par ajout de 80 μL d'éthanolamine. Le lavage de la surface est réalisé à un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec 100 μL de HCl 10 mM et 100 μL de NaCl 1 M / NaOH 50 mM.

Le sensorgramme obtenu est identique pour les 4 pistes et caractéristique de ce type de fonctionnalisation (Cf annexe 8).

Les lectines MGL S ECD et DC-SIGN S ECD sont ensuite greffées sur la surface StrepTactine. Ces étapes concernent donc uniquement les canaux FC2, FC3 et FC4 et sont identiques. Bien que la fixation des lectines se fasse via l'interaction entre la StrepTactine et le StrepTagII présent en NTer des protéines, une activation EDC/NHS est tout de même réalisée afin d'obtenir un couplage covalent qui assure la stabilité de la surface. A un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 50 μL de EDC/NHS sont injectés. Ensuite, 45 μL de lectine (MGL S EDC ou DC-SIGN S ECD) à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont ajoutés. La surface est ensuite inactivée par 50 μL d'éthanolamine pH 8 1 M puis lavée avec 20 μL de NaCl 1 M / NaOH 50 mM à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.2.2. Contrôles des voies

Afin de vérifier la fonctionnalisation effective des différents canaux, une titration de ligands connus des lectines est réalisée. Sur la surface MGL S ECD, la BSA-GalNac est titrée et sur la surface DC-SIGN S ECD, on utilise la BSA-Man.

Les titrations sont effectuées par dilutions en cascade au demi de solutions stock de BSA-GalNac (1 μM à 5,6 pM) et BSA-Man (266 nM à 0,26 nM) dans du tampon de course. Celui-ci est composé de : 1xPBS 1 mM CaCl_2 , 0,05 % Tween20.

3.2.2.(a) Titration BSA-GalNac

La BSA-GalNac est une protéine de sérum albumine bovin galactosylée. Elle possède 28 GalNac à sa surface et est utilisée ici pour évaluer l'interaction entre la MGL S ECD et la BSA-GalNac. Les sensorgrammes obtenus pour les **FC3** - FC1 et **FC4** – FC1 sont présentés Figure 115.

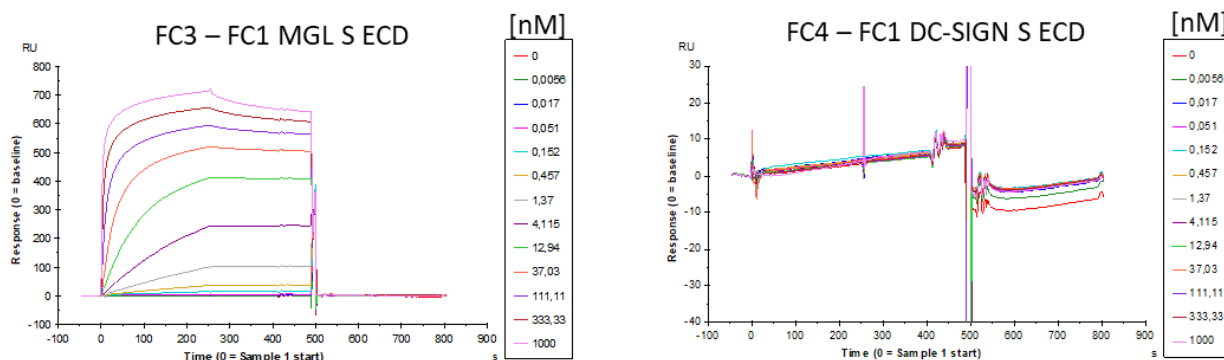


Figure 115 : Titration de la BSA-GalNac (de 0 à 1 000 nM) sur les surfaces MGL S ECD (FC3) et DC-SIGN S ECD (FC4).

Sensorgramme obtenu avec surface de référence FC1 soustraite.

Les sensorgrammes pour la **FC3** – 1 montre une interaction entre la lectine MGL S ECD et la BSA-GalNac (Intensité maximale de 700 RU). La MGL S ECD reconnaît donc les motifs GalNac. Par contre, le sensorgramme **FC4** – FC1 ne montre aucune interaction entre le récepteur et la protéine. La DC-SIGN S ECD ne reconnaît donc pas les motifs GalNac. Les pistes FC2 et FC3 sont donc fonctionnelles.

3.2.2.(b) Titration BSA Man

La BSA-Man possède 12 sites de trisaccharides branchés ($\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}$) et est utilisée ici pour évaluer l'interaction entre la protéine mannosylée et la lectine DC-SIGN S ECD greffée.

Les sensorgrammes obtenus pour les **FC3** - FC1 et **FC4** – FC1 sont présentés Figure 116.

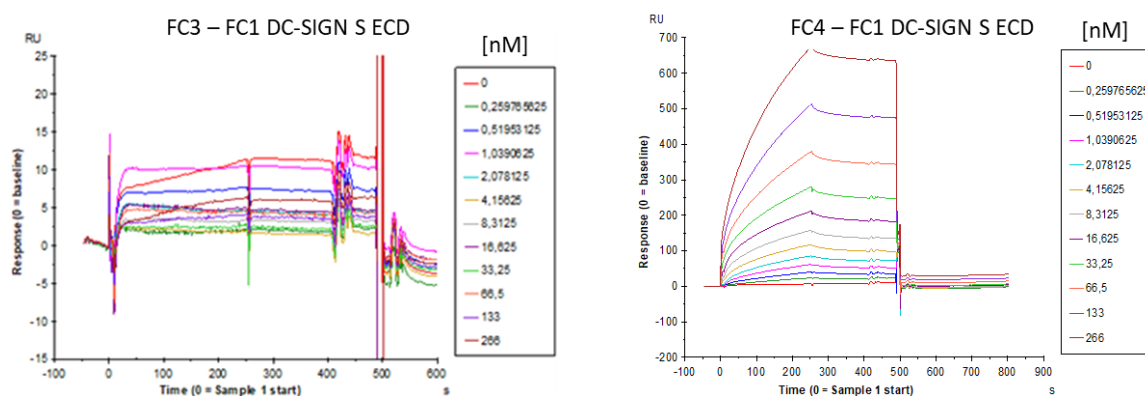


Figure 116 : Titration de la BSA-Man (de 0 à 1 000 nM) sur les surfaces MGL S ECD (FC3) et DC-SIGN S ECD (FC4).

Sensorgrammes obtenus avec surface de référence FC1 soustraite.

Les sensorgrammes pour la **FC3** – FC1 ne montrent pas d'interaction entre la lectine MGL S ECD et la BSA-Man (Intensité maximale de 15 RU). La lectine ne reconnaît donc pas les sucres mannosés présents

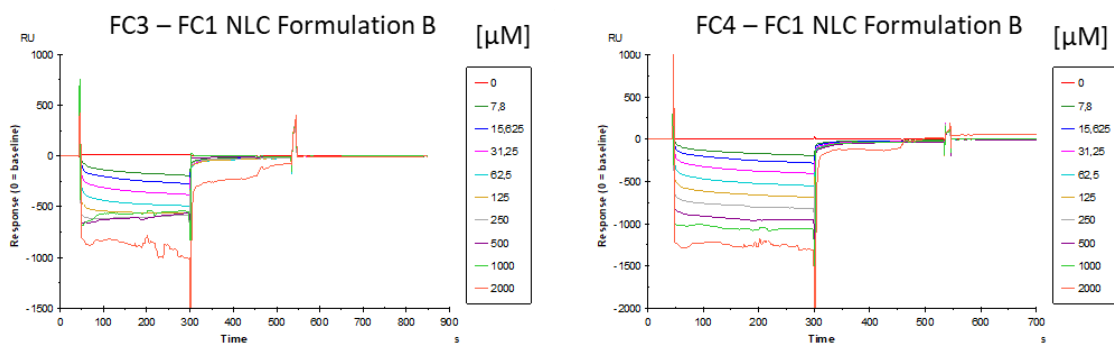
à la surface de la protéine. En revanche, les sensorgrammes **FC4** – FC1 montre une courbe de saturation atteignant environ 700 RU. Ce sensorgramme est caractéristique d'une interaction avec un récepteur. La BSA-Man est donc effectivement reconnue par la DC-SIGN S ECD. La piste FC4 fonctionnalisée par la DC-SIGN S ECD est donc fonctionnelle.

3.3 Expériences et analyse des résultats

Les nanoparticules analysées dans le cadre de ce projet sont les NLC décorées par des motifs GalNac (Formulation B 4,6 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** et Formulation C 13,9 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**) ainsi que leurs contrôles respectifs, Formulation B' (4,6 % MyrjTM S100) et Formulation C' (13,9 % MyrjTM S100). La Formulation D n'a pas pu être analysée, les lots formulés précédemment s'étant dégradés.

Une gamme de concentration est établie de 7,8 μ M à 2 mM par dilution en cascade (au demi) de solutions stock à 2 mM. Ces concentrations molaires sont les concentrations en GalNac calculées dans le chapitre précédent (Cf 0). Pour les NLC contrôles ne possédant pas de GalNac, le même facteur de dilution que la formulation correspondante en NLC-GalNac est appliqué. Les concentrations en GalNac utilisées pour la titration représentent une concentration en lipides de NLC de 97 μ g/mL à 80 mg/mL.

Les différents lots de nanoparticules contenant des motifs GalNac à différentes concentrations ont été injectés sur les 4 pistes de l'appareil SPR. Les sensorgrammes correspondants aux formulations B et C sont présentées ci-dessous (Figure 117).



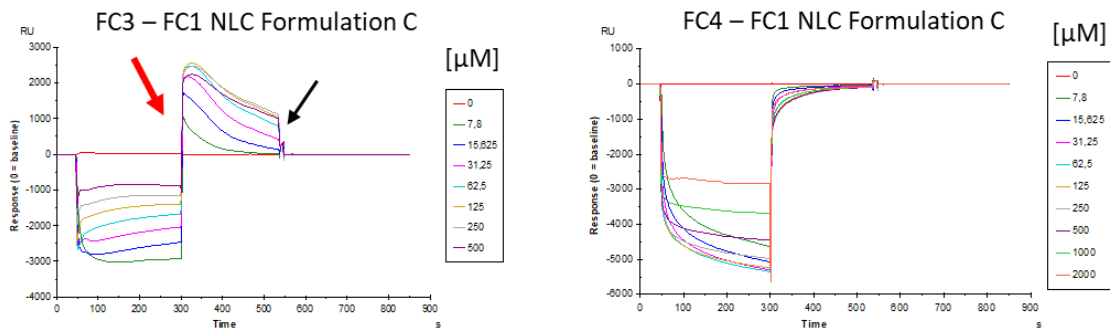


Figure 117 : Interaction des NLC-GalNac Formulations B (haut) et C (bas) sur les surfaces de MGL S ECD (FC3) et DC-SIGN S ECD (FC4). Sensorgrammes obtenus avec surface de référence FC1 soustraite.

A première vue, ces spectres semblent très différents des spectres caractéristiques obtenus pour les tests à la BSA-GalNac ou la BSA-Man. Tout d'abord, que ce soit pour la formulation B ou C, l'interaction mesurée est négative.

Pour rappel, les données sont obtenues par soustraction des mesures du contrôle FC1 aux mesures des FC2, FC3 et FC4 (FC2 – FC1 etc...). Habituellement, les interactions sur la FC1 sont bien inférieures aux interactions obtenues avec les autres pistes et ne sont pas considérées comme une véritable interaction entre la StrepTactine et le composé à analyser. Ici il semble cependant que les NLC interagissent avec cette surface comme en témoigne le sensorgramme de la FC1 (Figure 118).

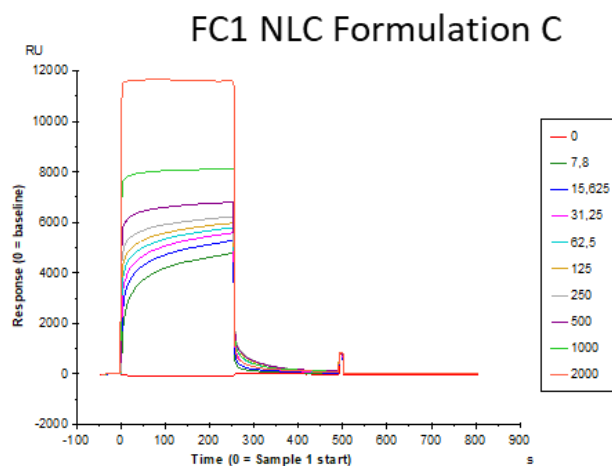


Figure 118 : Interaction des NLC-GalNac Formulation C sur la surface StrepTactine (FC1). Sensorgramme obtenu avec la piste FC1.

On reconnaît ici les étapes association – pallier – dissociation caractéristiques d'une interaction avec la surface. Le ligand lié à la surface est libéré au moment où les NLC ne sont plus injectées dans les voies (à 250 s). Les NLC sont donc capables d'interagir avec la surface de dextran ou la StrepTactine.

Les interactions entre NLC – FC1 étant plus intenses que NLC – FC2, FC3 et FC4, la différence FC3 – FC1 donne donc des signaux négatifs. Les sensorgrammes des FC3 et FC4 pour la formulation C, en s'affranchissant de la FC1, sont présentés Figure 119.

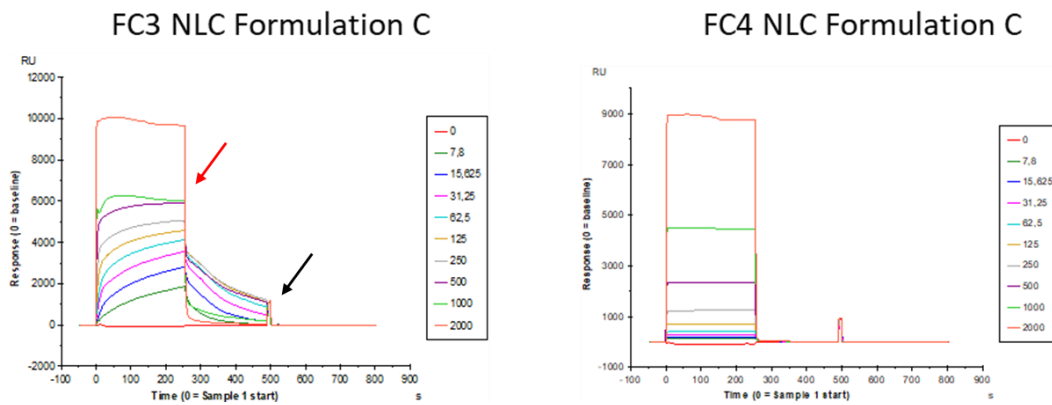
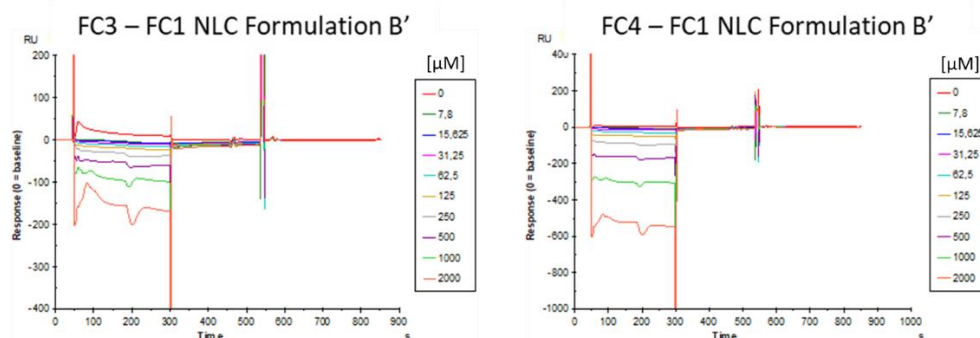


Figure 119 : Sensorgrammes des FC3 et FC4 sans soustraction de la FC1

Les sensorgrammes présentés précédemment (Figure 117) montrent la dissociation de ligand juste après la fin de l'injection (↘) à 300 s ainsi que la régénération totale des surfaces après ajout d'EDTA (↘) à 550 s uniquement dans le cas de la formulations C et de la voie 3 (et 2) (**FC3 – FC1**). Ceci témoigne d'une interaction Ca^{2+} dépendante spécifique avec la lectine MGL pour la formulation C. Aucune interaction n'est observée avec la formulation moins concentrée B ou avec la lectine DC-SIGN (FC4).

Les différents lots de NLC contrôles contenant le MyrjTM S100, à différentes concentrations (facteur de dilution identique aux formulations B et C correspondant à 7,8 μM à 2 mM en "GalNac") ont également été analysés. Les sensorgrammes correspondant aux formulations B' et C' sont présentés ci-dessous (Figure 120).



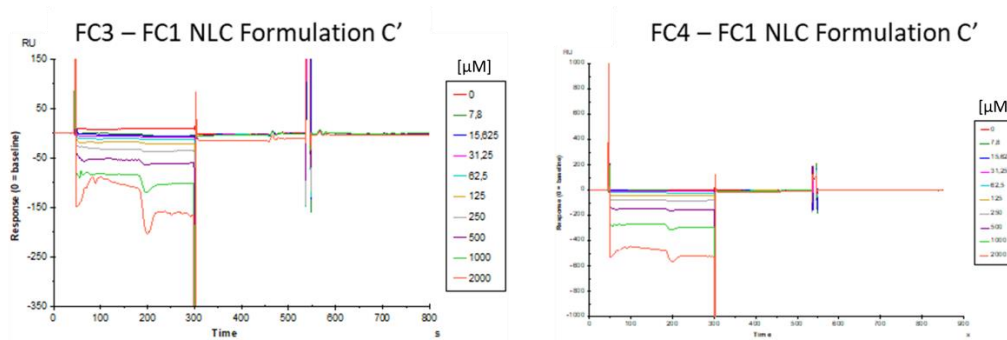


Figure 120 : Interaction des NLC-MyrjTM S100 Formulations B' (haut) et C' (bas) sur les surfaces de MGL S ECD (FC3) et DC-SIGN S ECD (FC4). Sensorgrammes obtenus avec surface de référence FC1 soustraite.

A nouveau, les interactions observées sont négatives. Contrairement à l'analyse de la Formulation C, aucune dissociation ni aucune régénération n'est observée après l'ajout d'EDTA pour chacune des pistes testées. Les NLC contrôles fonctionnalisées par le MyrjTM S100 n'interagissent donc pas spécifiquement avec les lectines.

3.4 Conclusion

Les résultats obtenus par SPR tendent à montrer que les motifs GalNAC pour la formulation C, celle présentant la plus grande densité de surface en sucre (13,9 % SA-PEG₁₀₀-GalNAC **10**) qui a été testée, sont suffisamment accessibles pour être reconnus par la lectine MGL et non la lectine DC-SIGN. Les autres lots de NLC des formulations B, B' et C' ne montrent pas d'interaction spécifique. Cependant la forte interaction non spécifique des NLC à la surface des puces ne permet pas d'exploiter plus en détails ces résultats.

Pour de futures études, il sera donc nécessaire de minimiser les interactions non-spécifiques. L'utilisation de puces C1, sans dextran, pourraient être un premier paramètre à modifier afin de minimiser ces interactions non spécifiques et évaluer plus justement l'interaction spécifique des NLC-GalNAC avec les lectines.

Discussion générale

Dans ce projet, l'adressage de chélateurs du cuivre vers le foie est envisagé via les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR) ayant déjà démontré leur intérêt pour le ciblage des hépatocytes.^{202,203} Comme présenté en introduction (Cf Ch I.4.2.1), ces récepteurs sont des complexes hétérooligomériques composés de deux sous unités notées H1 et H2 différentes mais hautement homologues. Ces deux sous unités noté H1 et H2 forment majoritairement un complexe trimérique avec des stœchiométries 2-5 : 1.¹⁰⁶ De par leur structure, l'affinité de ces récepteurs généralement faible avec les monosaccharides est significativement augmentée par des interactions multivalentes. Il faut souligner que la multivalence augmente également la sélectivité. Dans ce contexte, la structure des systèmes moléculaires ou nanoparticulaires envisagés est déterminante pour le processus de reconnaissance. Des études empiriques ont été réalisées pour évaluer l'effet de la multivalence. Elles ont montré que l'affinité pour les ASGPR était fortement dépendant du nombre de motifs Gal ou GalNAc ainsi que de leur arrangement spatial (distance entre les sucres et flexibilité). Notamment Khorev et al¹⁰⁶ ont déterminé les distances « optimales » entre les sucres (environ 15 à 25 Å) pour une interaction par effet multivalent avec le récepteur (Figure 121).

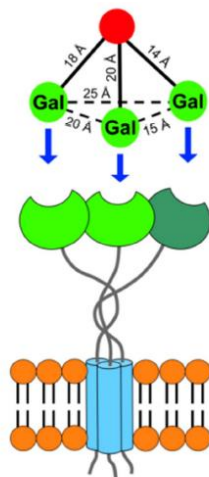


Figure 121 : Architecture optimale pour la reconnaissance via les ASGPR.¹⁰⁶

Dans le cas des nanoparticules, la reconnaissance par le récepteur via des interactions multivalentes, et donc l'efficacité du ciblage, peut être dépendante de la densité de surface en Gal ou GalNAc. Les nanoparticules lipidiques développées dans le cadre de ce projet de thèse ont été formulées avec différents pourcentages en SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** afin d'évaluer l'influence du nombre de motifs GalNAc sur leur capacité à interagir avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). La

quantification de ligands GalNac par UPLC couplé à l'ELSD a permis de déterminer avec précision la densité de surface en GalNac de ces nanoparticules lipidiques. L'internalisation des NLC a été évaluée grâce à des expériences de cytométrie en flux. De plus, l'interaction des motifs GalNac présents à la surface des NLC avec la lectine MGL a été évaluée par des expériences SPR.

Les expériences de cytométrie en flux ont permis d'évaluer l'effet de la fonctionnalisation sur l'internalisation dans des cellules HepG2. Il était plutôt attendu que les NLC-Myrj™ S100 ne soient pas, ou faiblement, internalisés dans ces cellules. Cependant, contrairement aux études déjà décrites avec des nanoparticules similaires,^{174,227,242} toutes les nanoparticules ont été internalisées dans les cellules hépatiques, indépendamment de leur fonctionnalisation (Figure 108). Les MFI et EC50 n'ont pas montré de différence significative d'internalisation ou d'affinité pour le récepteur entre les formulations B et C et leurs contrôles B' et C'. Ces nanoparticules semblent donc être internalisées par un mécanisme qui ne serait pas médié par l'ASGPR. Des hypothèses peuvent être émises quant à la nature du mécanisme médiant l'internalisation des NLC (Formulations B, C, B' et C'). Il est connu que les nanoparticules à base de lipides sont internalisées par endocytose à médiation clathrine.²⁴³ Ce phénomène semble être dû en partie à la formation d'une couronne protéique autour des particules qui peut, dépendamment de la nature de ces protéines, être reconnue par des récepteurs.²⁴⁴ Les nanoparticules lipidiques tendent par exemple à adsorber sur leur surface des apolipoprotéines.²⁴⁵ Les apolipoprotéines peuvent ensuite être reconnues par des récepteurs aux HDL ("high density lipoproteins", LDL ("low density lipoproteins" etc...) présents à la surface des hépatocytes. Le revêtement de surfactants PEGylés en surface des NLC permet généralement d'éviter ces phénomènes et font écran face aux protéines du milieu biologique. Les NLC contrôles de la formulation A (0 %) ont montré une internalisation similaire aux NLC fonctionnalisées avec le pourcentage le plus important de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (23,3 % - Formulation D) et plus efficace que les autres lots. Ces nanoparticules ne possèdent pas de surfactants « longs » PEGylés₁₀₀. Il est donc possible qu'une couronne protéique se forme plus facilement autour de ces NLC, par rapport aux autres lots possédant des chaînes PEGylées plus longues, et favorise ainsi leur entrée dans les cellules hépatiques. Ces paramètres, ainsi que leur petit diamètre hydrodynamique (40 nm) peuvent en partie expliquer la meilleure internalisation des nanoparticules de la formulation A.

La formulation D (23,3 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**), quant à elle, présente une intensité de fluorescence significativement plus grande par rapport à son contrôle D'. Le calcul des EC50 a donné un EC50 différent pour la formulation D (70 µg/mL) de celui des autres formulations (40 µg/mL). Ces résultats suggèrent que l'internalisation des NLC dont la densité de surface en GalNac est la plus élevée (D ; 1

GalNac pour 17 nm²) a lieu selon un mécanisme de reconnaissance différent des autres NLC (Formulation B, C, B' et C'), qui pourrait être médié en partie par les ASGPR.

Indépendamment de la compétition entre les deux mécanismes, la faible accessibilité des sucres à la surface des NLC pour les formulations B et C pourraient être une piste pour expliquer leur internalisation similaire au NLC contrôles B' et C'. Pour cela des expériences par SPR ont été réalisées. Les surfactants PEGylés peuvent adopter plusieurs conformations à la surface des nanoparticules : la chaîne peut être totalement repliée et l'extrémité se retrouve alors proche du cœur des particules (conformation champignon) ou les chaînes peuvent être droites, l'extrémité est alors en surface (conformation en brosse). Ces différentes conformations ainsi que les conformations intermédiaires sont présentées Figure 122.²⁴⁶

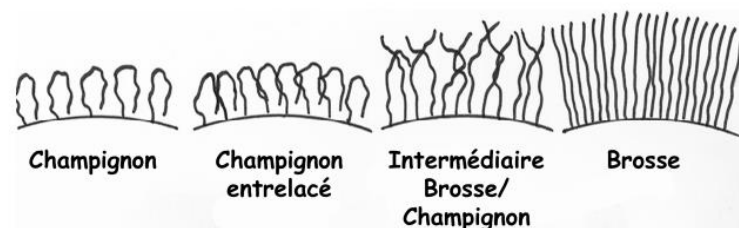


Figure 122 : Représentation schématique des différentes conformations de surfactants PEGylés observées à la surface de nanoparticules lipidiques.²⁴⁶

Des expériences de SPR ont donc été effectuées en immobilisant une lectine reconnaissant les GalNac (MGL) sur une surface d'or recouverte de dextran. Les expériences réalisées avec les différentes nanoparticules (Formulations B, C et B', C') tendent à montrer que les motifs GalNac pour la formulation C (13,9 % SA-PEG₁₀₀-GalNac **10**) sont suffisamment accessibles pour être reconnus par la lectine MGL, qui reconnaît spécifiquement les motifs GalNac. Cependant, cette interaction n'est visible qu'à forte concentration en particules. Les concentrations utilisées en cytométrie en flux, largement inférieures, ne semblent pas suffisantes pour permettre la reconnaissance par les ASGPR.

Il faut garder à l'esprit que la lectine MGL ne présente pas la même structure que les ASGPR. En effet, les interactions multivalentes nécessaires à la reconnaissance de ligands par les ASGPR sont des processus complexes impliquant de nombreux paramètres (Cf Ch I.4.2.1). Les domaines de reconnaissance de carbohydrates (CRD) sont identiques à l'ASGPR, selon les modèles de structure 3D de MGL développés, les acides aminés interagissant avec le sucre sont les mêmes que ceux de l'ASGPR.²⁴⁷ Cependant la topologie des CRD n'est pas la même. Un exemple concret est la mesure d'interaction par SPR de la BSA-GalNac (également utilisée lors de cette thèse en tant que contrôle) avec la MGL ainsi que l'ASGPR (Figure 123).²⁴⁷

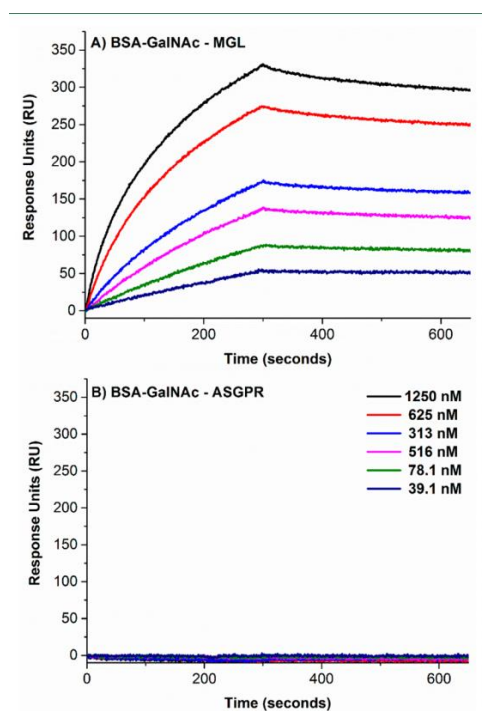


Figure 123 : Sensorgramme SPR de la liaison de BSA-GalNac à la MGL (haut) et l'ASGPR (bas).²⁴⁷

La BSA-GalNac est reconnue par la MGL mais pas par l'ASGPR, car elle ne possède pas les paramètres structuraux adéquats. Les expériences de SPR effectuées dans le cadre de cette thèse permettent donc d'avoir des informations sur l'accessibilité des sucres GalNac mais pas de conclure quant à l'affinité apparente des NLC-GalNac pour les ASGPR.

Il est intéressant de comparer les résultats d'internalisation obtenus avec les NLC-GalNac avec d'autres études décrites dans la littérature. En effet, il existe plusieurs études rapportant l'internalisation efficace de nanoparticules dans des cellules hépatiques grâce à leur fonctionnalisation par des motifs Gal ou GalNac.^{220,221,227,248} Dans ces travaux, des tests de reconnaissance par des lectines et/ou d'internalisation dans des cellules hépatiques ou sur des souris ont mis en évidence l'intérêt de ces nanoparticules fonctionnalisées pour la délivrance de substances thérapeutiques vers le foie.¹⁷⁴ Cependant, la fonctionnalisation effective par les motifs Gal ou GalNac n'a pas été quantifiée de façon précise dans ces études.^{6,39-42} Il est généralement admis que la totalité des surfactants introduits lors de la formulation de ces nano-objets est incorporée à la surface des particules.

Par exemple, Hashida *et al.* ont développé des liposomes de 85 nm fonctionnalisés par un pourcentage molaire en galactose croissant : de 0 à 7,5 %_{mol}.^{219,226,227} Les formulations contenant 3,5 %, 5 % et 7,5 % de Gal s'accumulent efficacement dans le foie de souris (environ 85 % de la dose injectée contre 12 % pour les nanoparticules non fonctionnalisées). Pour évaluer la densité en Gal en surface de ces liposomes, il est nécessaire de faire certaines approximations. Les liposomes sont des vésicules dont la membrane est composée d'une bicouche lipidique couplée à des molécules de cholestérol. La taille

des chaînes lipidiques utilisées est d'environ 3 nm. Grâce aux données disponibles dans cet article, il est possible de déterminer la surface de la cavité et la surface extérieure du liposome (Figure 124) et d'estimer, de manière approximative, la densité de surface en Gal. Ceci permet de comparer ces données à nos résultats quantifiés concernant la densité en GalNac à la surface des NLC.

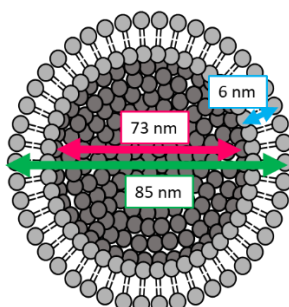


Figure 124 : Représentation de la taille des liposomes, de la cavité interne et de l'épaisseur de la bicouche lipidique.

La surface totale des liposomes fonctionnalisés par 1%_{mol} en Gal est de 38 748 nm² (Tableau 16). Une occupation de 1 % de cette surface (387 nm²) en Gal (5,6 nm² pour 1 Gal) représente donc environ 70 Gal sur la totalité du liposome. La surface extérieure représentant 58 % de la surface totale du liposome, ce sont en fait en première approximation 40 galactoses qui sont orientés vers l'extérieur. Nous pouvons ainsi faire une grossière estimation de la densité en galactose : 1 galactose pour 552 nm² pour l'exemple de 1 %_{mol}. Les résultats estimés pour les autres formulations sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 16).

% _{mol} Galactose		1	2,5	3,5	5	7,5
Diamètre des liposomes	nm	84,3	87,7	86,8	87,9	78,5
Diamètre de la cavité interne	nm	72,3	75,7	74,8	75,9	66,5
Surface de l'extérieur des liposomes	nm ²	22 326	24 163	23 670	24 273	19 359
Surface totale des liposomes	nm ²	38 748	42 166	41 247	42 371	33 252
Surface totale occupée par les Gal	nm ²	387	1 054	1 444	2 119	2 494
Nombre total de galactoses		70	190	260	381	449
Nombre de galactoses en surface		40	110	151	221	260
Surface / galactose	nm²	552	220	157	110	74

Tableau 16 : Calcul de densité de surface en galactose pour des Liposomes de 85 nm fonctionnalisés par différents pourcentages de galactose.

Les valeurs obtenues de densité de surface pour ces liposomes sont inférieures à celles obtenues pour les NLC formulées dans le cadre de cette thèse (pour rappel, formulations B, C et D respectivement 1 GalNac pour 32 nm², 26 nm², 17 nm²). Cette comparaison suggère que les NLC fonctionnalisées avec

des GalNac pourraient être internalisées de façon efficace dans les cellules hépatiques, d'autant que le motif GalNac possède une affinité environ 50 fois plus élevée que le Gal. Cependant, il faut garder à l'esprit que les nanoparticules décrites par Hashida *et al.*^{219,226,227} sont des liposomes de 85 nm, différents des NLC de 50 nm développées ici et que le comportement de ces nanoparticules peut être différent. En effet, les liposomes sont composés d'une bicouche lipidique (phospholipides) dans lesquels sont insérés des molécules de cholestérol afin de stabiliser la structure de la nanoparticule. Il est connu que, au niveau de la membrane cellulaire, le cholestérol et les sphingolipides présents dans la bicouche lipidique interagissent et forment des "rafts lipidiques".²⁵³ Ces rafts sont des agrégats de protéines et molécules lipidiques qui "flottent" sur la bi-couche lipidique. Il se pourrait que similairement, la surface des liposomes puisse se réorganiser pour former des domaines riches en surfactants cholestérol-Gal (tel que le "Gal-C4-Chol" utilisé par Hashida *et al.*).²¹⁹ Ces domaines, riches en Gal à la surface des liposomes, pourraient alors permettre l'interaction multivalente de galactoses avec les ASGPR et l'internalisation des liposomes dans la cellule.²⁵⁴

Une autre étude se rapprochant de ces travaux de thèse est celle de Morille *et al.*¹⁷⁴ Cette équipe a conçu des nanocapsules lipidiques de 110 à 180 nm de diamètre, fonctionnalisées par des galactoses pour la thérapie génique.¹⁷⁴ Pour rappel (*Cf* Ch I.2.3.3), les nanocapsules lipidiques sont composées d'un cœur lipidique liquide de triglycérides (alors que le cœur des NLC est visqueux) entouré d'une couronne de tensioactifs amphiphiles contenant de courtes chaînes PEG (HS-PEG₆₆₀). Elles ont de ce fait une structure et des propriétés physico-chimiques distinctes mais assez proches des NLC. Afin de concevoir ces nanocapsules lipidiques fonctionnalisés par des Gal, deux stratégies ont été établies utilisant deux types de surfactants différents (Figure 125) :

- Le DSPE-PEG₂₀₀₀-Gal constitué d'une chaîne de PEG₄₅ (45 unités de PEG) liée à une extrémité à un phospholipide hydrophobe, le distéaroylphosphatidyléthanolamine, et à l'autre extrémité un motif galactose
- Le F108, un copolymère amphiphile ayant une structure tri-séquencée de type A-B-A : OEx-OPy-OEx (OE oxyde d'éthylène hydrophile et OP oxyde de propylène hydrophobe avec des valeurs de x et y variables respectivement de 132 et 50 unités).

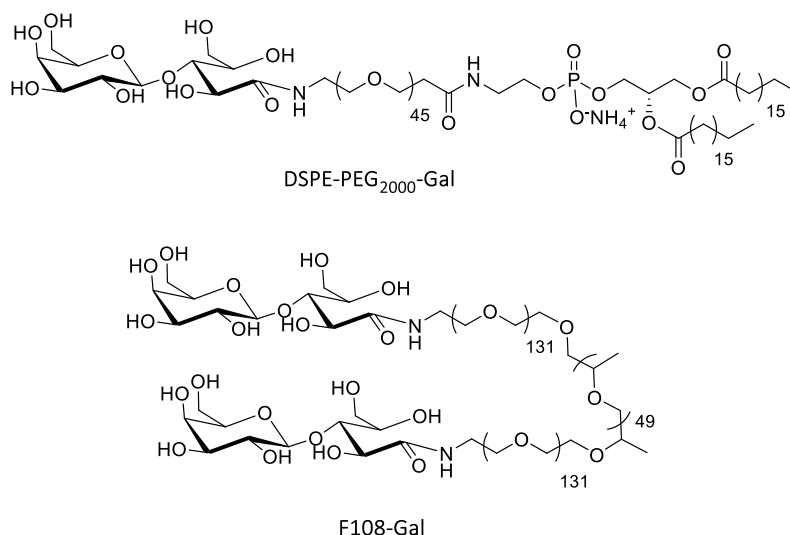


Figure 125 : Structures du DSPE-PEG₂₀₀₀-Gal et F108-Gal.¹⁷⁴

Les nanocapsules ont été obtenues par post-insertion de DSPE-mPEG₂₀₀₀Gal et F108-Gal (entre 25 et 30 % massique).¹⁹⁵ Nous avons calculé le nombre de galactose présents à la surface des nanocapsules et leur densité de surface à partir des données fournies dans cet article, reposant sur l'hypothèse d'une incorporation totale des surfactants à la surface des nanocapsules (Tableau 17). Les résultats sont présentés avec, à titre de comparaison, les résultats calculés pour les NLC développées dans le cadre de cette thèse.

	DPSE-PEG ₂₀₀₀ -Gal (mM)			F108-Gal (mM)			SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc 10 (mM)		
	2	5	10	1	2	3	0,6 (B)	1,5 (C)	3,1 (D)
Nb de sucres par NP	324	813	1 627	324	648	972	136	333	650
Diamètre des NPs (nm)	132	136	172	129	138	182	37	52	60
Surface des NPs (nm ²)	54 739	58 107	92 941	52 279	59 828	104 062	4 347	8 626	11 234
Surface / sucre (nm²)	169	71	57	161	92	107	32	26	17

Tableau 17 : calculs théoriques du nombre de Gal présents à la surface des nanocapsules. Comparaison avec les résultats obtenus pour la fonctionnalisation des NLC par le GalNAc.

Des tests d'agrégation par une lectine (Soybean agglutinin, SBA) ont mis en évidence une interaction spécifique 3 fois plus importante avec les nanocapsules fonctionnalisées avec le F108-Gal qu'avec celles fonctionnalisées par le DSPE-PEG₂₀₀₀-Gal, suggérant une différence d'accessibilité des sucres à la surface de ces nanocapsules. De plus, des études sur des hépatocytes primaires de rat ont montré que l'introduction du F108-Gal à la surface permet une augmentation significative (18 x) de la transfection par rapport aux NCL non fonctionnalisées. En revanche, l'introduction de motifs Gal via le DPSE-PEG₂₀₀₀-Gal n'a pas d'influence significative.

Ces résultats ne peuvent pas être directement corrélés à la densité de surface qui est similaire pour les deux systèmes. Ils suggèrent que la longueur des chaînes PEG et la présentation des motifs Gal à la surface ont un impact important sur les interactions avec les récepteurs ASGPR. En effet la longueur des chaînes PEG du F108 plus importante permet d'éloigner plus les motifs galactose de l'environnement fortement PEGylé présent à la surface des nanocapsules. A l'inverse, le galactose greffé au surfactant PEGylé n'est pas accessible et serait, d'après Morille et al., dans une conformation champignon (Figure 122).¹⁷⁴ Ces résultats soulignent également la complexité de ces systèmes et de leur comparaison.

Dans notre cas, l'utilisation d'un surfactant comportant 100 unités d'éthylène glycol aurait dû permettre d'éloigner les motifs GalNac de la couronne de MyrjTM S40 et les rendre plus accessibles vis-à-vis des ASGPR. De plus, leur taille inférieure aux nanocapsules décrites par Morille et al¹⁷⁴, leur densité de surface supérieure et l'utilisation de GalNac possédant une affinité 50 fois plus élevée que le Gal aurait dû conduire à une reconnaissance spécifique plus efficace.

Les interactions ligand/récepteur sont régies par de nombreux paramètres discutés précédemment en introduction (Cf Ch I.4.2.1.(b)). La surface des nanoparticules possède une structure complexe, dépendante de nombreux paramètres qui ont un impact important sur la présentation du ligand au récepteur. La littérature ainsi que les expériences menées sur les NLC nous ont montré que la densité en ligand, seule, ne suffit pas pour comparer différents systèmes de nanoparticules. De plus, dans le cas des NLC, un autre processus d'entrée dans les hépatocytes a été mis en évidence. L'internalisation des nanoparticules probablement médiée par un autre mécanisme concurrent de la reconnaissance par les ASGPR, s'est révélée efficace. Ainsi, dans le cadre de la vectorisation de drogues (en particulier pour le traitement de la maladie de Wilson) vers le foie, les NLC apparaissent comme des nanostructures de choix et ce, même sans fonctionnalisation de surface. Dans la suite de ces travaux, ce sont donc les NLC non fonctionnalisées qui ont été choisies pour la délivrance de prochélateurs lipophiles dans les hépatocytes.

Conclusions & perspective

Dans ce chapitre, des nanoparticules lipidiques fonctionnalisées par des surfactants SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** ont été développées, caractérisées et évaluées au niveau cellulaire. L'étude de leur internalisation sur lignée d'hépatocytes humains a révélé une internalisation médiée par un/des récepteur(s) pour tous les lots testés. La nature lipidique de ces nanoparticules leur permet d'être internalisées dans les HepG2 par des récepteurs spécifiques, par exemple les récepteurs aux apolipoprotéines. Seule la formulation D contenant le pourcentage le plus important de SA-PEG₁₀₀-GalNac **10** (23,3 %) a révélé un effet significatif de la présence des sucres sur l'internalisation. L'évaluation de l'accessibilité des sucres par SPR sur MGL a mis en évidence une densité en GalNac insuffisante pour la formulation B et modérée pour la formulation C.

Afin d'optimiser la reconnaissance par les ASGPR, il est donc nécessaire d'accéder à des systèmes possédant localement une haute densité de surface en GalNac avec une meilleure organisation spatiale des sucres pour obtenir des interactions multivalentes. Cela peut être obtenu en modulant la longueur et la structure des surfactants PEGylés afin d'améliorer l'accessibilité des sucres GalNac à la surface des NLC. Une autre stratégie pourrait être de concevoir des NLC fonctionnalisées avec un surfactant portant un motif triantennique à base de GalNac (Figure 126). Cette stratégie a déjà été mise en œuvre sur des liposomes²⁰⁴ afin de délivrer un anticancéreux dans des hépatocytes.

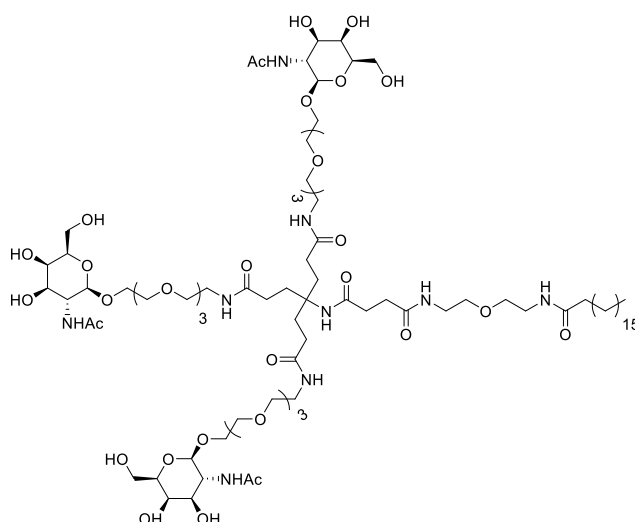


Figure 126 : Structure du surfactant PEGylé possédant un motif tri-antenne de GalNac (SA-PEG₁₀₀-(GalNac)₃) afin d'améliorer la reconnaissance par les ASGPR.

Les NLC contrôles de la formulation A (0 %) ont montré une bonne internalisation dans les cellules hépatiques. De plus, elles sont plus stables, plus faciles à formuler que les autres formulations de NLC

et ont pour ces raisons été choisies pour l'encapsulation des dérivés lipophiles du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**. Les prochaines études consisteront donc en la synthèse de ces dérivés lipophiles, leur encapsulation dans les NLC, ainsi que la quantification du rendement d'encapsulation. La capacité de ces nano-objets à délivrer un chélateur efficace du cuivre sera ensuite évaluée au niveau cellulaire.

Ch III. Chargement de nanovecteurs pour la délivrance de chélateurs de cuivre vers le foie

Chargement par un dérivé lipophile du chélateur de cuivre et quantification

1. Objectifs et démarche

Comme discuté dans l'introduction (Cf Ch I.2.3), les nanoparticules lipidiques ont fait l'objet de nombreux développements en tant que réservoirs pour le chargement de substances thérapeutiques (agents anticancéreux, agents d'imagerie, acides nucléiques...). Cette stratégie de vectorisation permet de protéger le composé encapsulé de la dégradation en milieu biologique et maximiser ensuite sa biodisponibilité et son efficacité thérapeutique. En raison de leur nature lipidique, les NLC (nanostructured lipid carriers) offrent de nombreux avantages en termes de biocompatibilité, sécurité des ingrédients utilisés, coût de production et libération prolongée du principe actif. Comme vu en introduction (Cf Ch I.2.3.4.(a)), le cœur des nanoparticules développées au laboratoire DTBS est composé d'un mélange de cire et d'huile. Il est visqueux et amorphe et de taille suffisante pour permettre l'encapsulation de molécules d'intérêt thérapeutique. Les NLC, dont la formulation est basée sur l'utilisation exclusive d'ingrédients approuvés par la FDA, ont déjà révélé leur potentiel notamment pour l'encapsulation de fluorophores^{183,184} et plus récemment pour le développement de vaccins dans le cadre du VIH (Cf Ch I.3.5.1).¹⁹⁷ En particulier, les études de biodistribution réalisées chez la souris ou chez le chien ont démontré leur très grand tropisme pour le foie.^{183,184,186,196} Dans le chapitre précédent, nous avons montré que ces NLC sont internalisées de manière efficace dans les cellules hépatiques et ce, même en l'absence d'agent de ciblage à la surface des nanoparticules. Ces nanoparticules, du fait de leur longue stabilité colloïdale et de leur grande capacité d'encapsulation des composés lipophiles, sont donc des candidats prometteurs pour la délivrance contrôlée de chélateurs du cuivre vers le foie, et ce même sans fonctionnalisation de surface.

Afin d'exploiter leurs avantages (protection, délivrance ciblée et libération contrôlée du principe actif encapsulé), nous avons choisi d'encapsuler le chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** dans des NLC « nues » de 50 nm de diamètre (F50 0 %). Ce chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** (Figure 127) développé au laboratoire SyMMES et inspiré des métallothionéines (MTs), s'est révélé très efficace et sélectif pour la chélation du cuivre au degré d'oxydation +1.⁹⁴ Cependant la nature hydrophile de ce composé NTA(CysNH₂)₃ **12** ne permet pas son encapsulation directe. Afin d'accéder à un chargement suffisant pour obtenir une activité thérapeutique, il est indispensable de modifier ce composé pour le rendre

lipophile. Pour cela, nous avons choisi d'introduire 3 chaînes octyles C_8H_{17} sur les fonctions thiols du chélateur via un lien disulfure ou thioester (Figure 127).

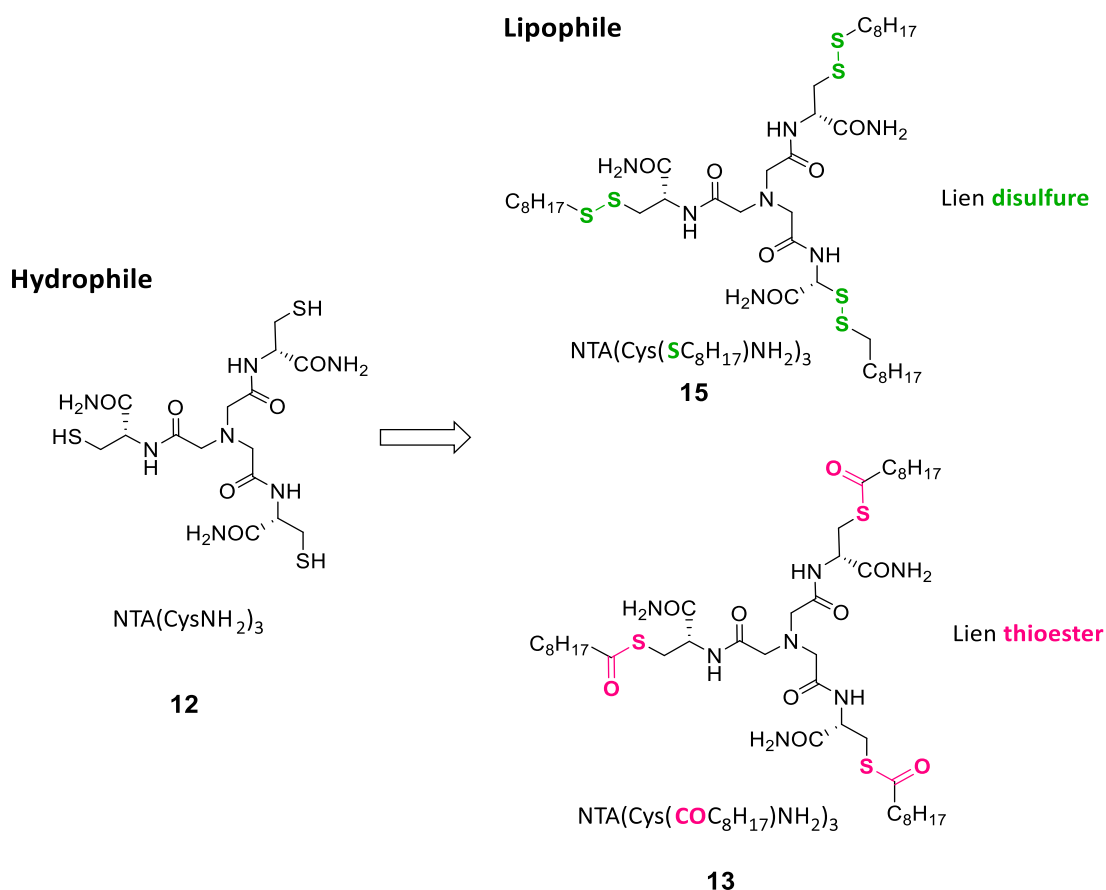


Figure 127 : Chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** et analogues lipophiles NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**.

Dans le cas de la molécule pro-drogue Chel2, la stratégie de délivrance impliquait la réduction de liens disulfures à l'intérieur de cellules hépatiques, entraînant la libération du chélateur pouvant alors piéger le cuivre en excès. Cette approche fructueuse est reprise ici dans le cas de l'analogue lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** (Figure 127). Une autre stratégie utilisant un lien thioester avec le composé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** a également été envisagée (Figure 127). En effet, de nombreuses pro-drogues utilisant un lien ester^{5,6} et, dans une moindre mesure, thioester²⁵⁷ pouvant être clivés par les (thio)estérasés, sont reportées dans la littérature. De plus, ces enzymes sont présentes de manière abondante dans les hépatocytes.^{258–260}

Ce chapitre s'articule donc autour de trois parties. La première sera consacrée à la synthèse des deux analogues lipophiles NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** présentés ci-dessus (Figure 127). Ensuite la formulation de NLC chargées avec ces composés ainsi que la quantification du rendement d'encapsulation seront détaillées. Enfin des études sur des cellules hépatiques présentant

une surcharge en cuivre permettront d'évaluer la capacité de ces nanovecteurs à délivrer le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** à l'intérieur des cellules hépatiques et de piéger le cuivre de manière efficace.

2. Chargement des nanoparticules lipidiques par un dérivé lipophile du chélateur de cuivre

2.1 Synthèse des dérivés lipophiles

Afin d'accéder aux analogues lipophiles NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, des chaînes octyles C₈H₁₇ ont été introduites sur les fonctions thiols via un lien disulfure ou thioester à partir du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**.

2.1.1. Synthèse du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**

Dans un premier temps, le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** a été synthétisé en deux étapes selon un protocole développé et optimisé au laboratoire SYMMES (Figure 128).⁹⁴

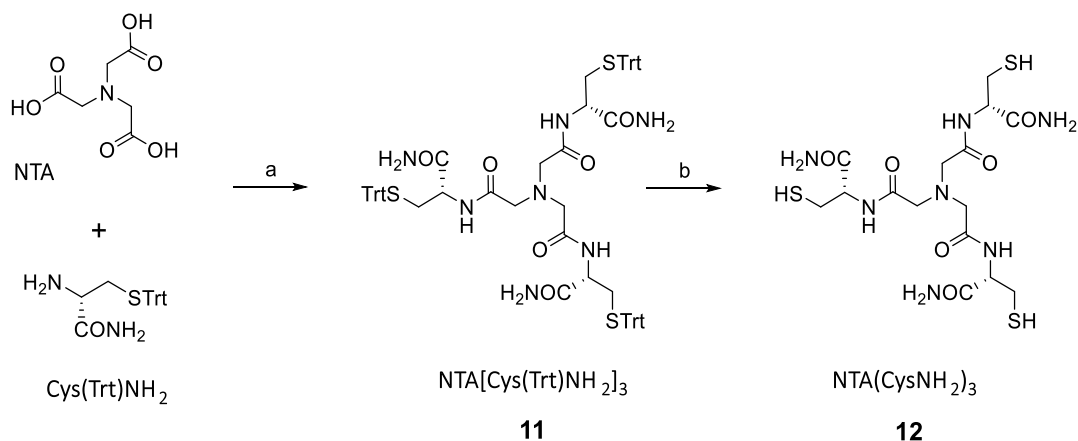


Figure 128 : Synthèse du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**; a- Cys(Trt)-NH₂ (3 eq.), EDCl (3 eq.), HOBT (3 eq.), CH₃CN, 72h, t.a. (61 %); b- TFA (50 eq.), Et₃SiH (6 eq.), CH₂Cl₂, 1,5h, t.a. (82 %).

La première étape consiste en un couplage de type peptidique entre l'acide nitrilotriacétique (NTA) et trois équivalents de cystéinamide tritylée (Cys(Trt)NH₂). Cette réaction en présence de EDCl et HOBT comme agents de couplage permet d'obtenir le composé NTA[Cys(Trt)NH₂]₃ avec un rendement de 61 %. La déprotection des fonctions thiols par traitement acide à l'aide de TFA permet d'obtenir le

chélateur d'intérêt NTA(CysNH₂)₃ **12** avec un rendement de 82 % après purification par HPLC préparative.

2.1.2. Synthèse du dérivé lipophile lien disulfure

Afin de lier les 3 chaînes octyles C₈H₁₇ via un lien disulfure sur les fonctions thiols du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**, une stratégie identique à celle utilisée pour la synthèse du composé Chel2 a été envisagée (Figure 129).¹⁰⁸ Cette stratégie utilise un motif SPyridine connu pour favoriser la formation de disulfure dissymétrique.^{261,262} Le dérivé lipophile octanethiol commercial est dans un premier temps activé par réaction avec le 2,2'-dithiodipyridine ou aldrithiol afin de former le produit **14** avec un rendement quantitatif. Ce dérivé thiol activé réagit ensuite avec les fonctions thiols du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** dans un mélange eau/THF. Après 24h d'agitation sous argon, le produit est purifié par précipitation dans l'éther et obtenu avec un rendement de 67 %.

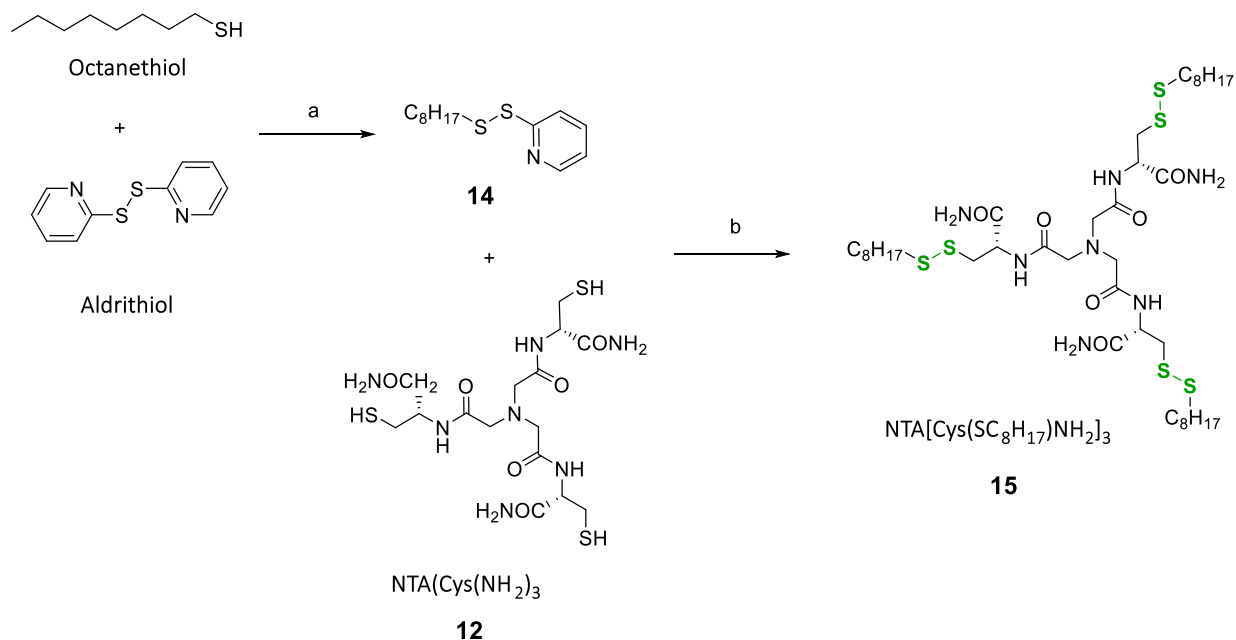


Figure 129 : Synthèse du dérivé lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃. Réactifs et conditions : a – MeOH, 2h, t.a (quantitative), b – THF/H₂O (5/1), 24h, t.a (67 %).

Cependant, malgré plusieurs précipitations successives dans l'éther, le produit NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** obtenu n'est pas pur. Les analyses par RMN et spectrométrie de masse indiquent la présence du composé monosubstitué possédant un lien disulfure intramolécule (Figure 130) à hauteur d'environ 8 % (déterminé par RMN), accompagné du produit résultant de la coupure du motif SSPyridine à environ 5 % (déterminé par RMN).

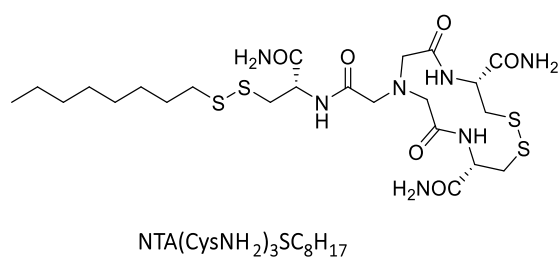


Figure 130 : Produit monosubstitué obtenu en mélange.

Plusieurs tentatives de purification par chromatographie sur colonne de cet analogue lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** ont été entreprises mais se sont révélées infructueuses, principalement à cause de la faible solubilité de ce composé dans les solvants organiques et aqueux (eau, méthanol, éthanol, dichlorométhane, chloroforme, acétonitrile etc...). Il a donc été décidé de poursuivre cette étude en utilisant ce composé impur pour son encapsulation dans les nanoparticules lipidiques en gardant à l'esprit une pureté estimée par RMN à 87 %.

2.1.3. Dérivé lipophile avec un lien thioester

Afin d'introduire les 3 chaînes octyles C₈H₁₇ via un lien thioester, une réaction de couplage entre le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** et l'acide nonanoïque commercial a été réalisée (Figure 131).²⁶³

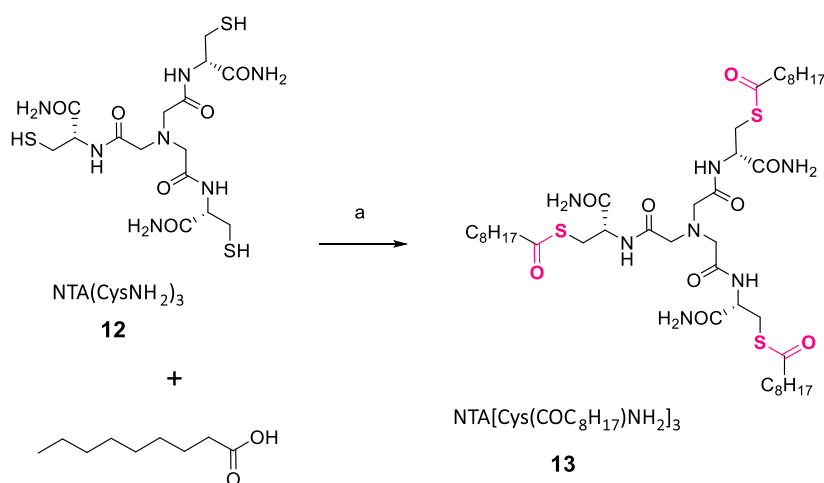


Figure 131 : Synthèse de **13** a –acide nonanoïque (4 eq), CH₂Cl₂, triéthylamine (6 eq), PyBOP (4eq), NTA(CysNH₂)₃ **12** (1 eq).

Cette réaction en présence de PyBOP comme agent de couplage permet, après 4 jours sous agitation suivis d'une précipitation dans l'éther, d'obtenir le produit souhaité NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** pur avec un rendement de 26 %.

Deux analogues lipophiles NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** ont été synthétisés en respectivement 2 et 1 étapes avec des rendements modérés à médiocres. Ces rendements sont principalement dus à la très faible solubilité de ces dérivés. Si ces composés s'avèrent prometteurs, les rendements de ces synthèses pourront être améliorés en optimisant les conditions de couplage, principalement au niveau des solvants utilisés ainsi que des techniques de purification. De plus, la pureté d'environ 87 % du composé NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** sera prise en compte par la suite notamment pour la quantification et le calcul du rendement d'encapsulation.

2.2 Formulation de NLC chargées

Les analyses de cytométrie en flux précédemment effectuées ayant montré une excellente internalisation des F50-0 %, ces particules non fonctionnalisées ont été choisies pour l'encapsulation des analogues lipophiles. Des formulations incorporant le dérivé NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** ou NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** ont donc été effectuées puis la quantification de la drogue effectivement encapsulée ainsi que les rendements d'encapsulation ont été déterminés par HPLC.

2.2.1. Formulation

Dans un premier temps, des essais de solubilisation des dérivés NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** ont été réalisés. Ainsi il est possible de dissoudre ces dérivés lipophiles dans du méthanol, à chaud (45°C) et/ou à faible concentration (1 mg/mL). Les solvants chlorés (dichlorométhane et chloroforme) permettent également de solubiliser ces composés à faible concentration (2 mg/mL).

Comme présenté précédemment (Cf Ch 1.2.3.4.(b)), les NLC sont des nanoparticules lipidiques formulées en mélangeant une phase organique, contenant de l'huile de soja, de la suppocire^{NB} et du lipoid s75TM (ou lécithine) avec une phase aqueuse contenant un surfactant MyrjTM S40 solubilisé dans un tampon PBS 1X. Différents lots de particules contenant différentes quantités de NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** ont été formulés afin de tenter d'encapsuler un maximum de chélateur. Il est commun pour ce type de nanoparticule d'effectuer des formulations avec 1 % à 10 % (w/w par rapport à la quantité de lipides) de composé à encapsuler, les formulations au-delà de 5 % étant généralement fortement déstabilisées.²⁶⁴ Pour les formulations comprenant les dérivés lipophiles NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, les quantités maximales

incorporées correspondent à 4 % (w/w) par rapport à la quantité en lipides. Les quantités d'ingrédients utilisées pour chacune des formulations sont présentées dans le Tableau 18.

	I	II	III
<i>Phase lipidique (mg)</i>			
NTA(Cys(CO C ₈ H ₁₇)NH ₂) 13	5,1	13,5	-
NTA(Cys(SC ₈ H ₁₇)NH ₂) 3 15	-	-	13,1
Huile de Soja™	85,0	85,0	85,0
Suppocire NB™	245,0	245,0	245,0
Lipoid s75™ (lécithine)	65,0	65,0	65,0
<i>Phase aqueuse (mg)</i>			
Myrj™ S40	345,0	345,0	345,0
PBS (mL) qsp 2 mL	qsp 2 mL	qsp 2 mL	qsp 2 mL

Tableau 18 : Formulations des NLC chargées en chélateurs lipophiles. Quantités en mg.

Les composés lipophiles (cire, huiles et phospholipides) ainsi que NTA(Cys(**SC**₈H₁₇)NH₂)**3****15** ou NTA(Cys(**CO**C₈H₁₇)NH₂)**3****13** sont solubilisés dans du dichlorométhane. Pour parvenir à solubiliser ces composés faiblement solubles, la phase lipidique est passée aux ultrasons pendant environ 20 minutes dans un bain chauffé à 45°C. Pour les formulations les plus concentrées (II et III), le dérivé lipophile n'a pas pu être totalement dissout. Après élimination du solvant sous vide, la phase aqueuse contenant le Myrj™ S40 est ajoutée et les nanoparticules sont formées par des cycles de sonication comme décrit précédemment (Figure 84).

Après sonication, les dérivés lipophiles des formulations II et III qui n'étaient pas totalement dissouts semblent avoir été incorporés aux nanoparticules ; aucun précipité ou solide n'est visible dans l'échantillon. Les nanoparticules lipidiques sont ensuite purifiées par dialyse afin d'éliminer tous les ingrédients non incorporés pendant la formulation. Une partie de la suspension de nanoparticules brutes est prélevée pour des expériences d'extraction en phase solide (SPE).

2.2.2. Caractérisation

Les nanoparticules lipidiques ainsi formulées et dialysées sont caractérisées par leur diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité (PDI). La stabilité des nanoparticules en suspension a également été évaluée par mesure DLS, une variation dans la taille ou le PDI des NPs indiquant une

dégradation des systèmes. Les paramètres mesurés pour les différents lots de NLC obtenus sont reportés ci-dessous (Tableau 19).

	I	II	III
Diamètre hydrodynamique (nm)	55 ± 1	49 ± 1	55 ± 1
PDI	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Stabilité colloïdale – Stockage à 4°C	> 4 mois	> 4 mois	3 mois

Tableau 19 : Caractérisation des lots de NLC.

L'encapsulation des dérivés lipophiles NTA(Cys(**S**C₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(**CO**C₈H₁₇)NH₂)₃ **13** ne semblent pas avoir influé sur la taille des NLC de manière significative. De plus, les stabilités sont excellentes, avec plus de 3 mois quel que soit le dérivé lipophile utilisé, et permettent ainsi de pratiquer différents tests sur une longue période.

3. Quantification des chélateurs lipophiles encapsulé

Dans la partie précédente, nous venons de montrer qu'il est possible de formuler des nanoparticules en présence des chélateurs lipophiles NTA(Cys(**S**C₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(**CO**C₈H₁₇)NH₂)₃ **13**. Cependant il est crucial de déterminer avec précision la quantité de ces composés effectivement chargés à l'intérieur des NLC. En effet, l'effet « thérapeutique » observé est dépendant de la dose réellement administrée. Afin de quantifier la quantité de dérivé lipophile effectivement encapsulée dans les NLC, une méthode par HPLC couplée à un détecteur UV-Vis a été mise au point.

3.1 Appareillage HPLC/UV vis et méthode

Il a été choisi, pour la quantification des dérivés lipophiles, d'utiliser l'HPLC plutôt que l'UPLC précédemment utilisée pour la quantification de SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** à la surface des NLC. Ce choix s'explique par la difficulté d'optimiser des méthodes de quantification de nanoparticules sur un tel système. Les nombreuses suppressions rencontrées et la très grande sensibilité de l'UPLC ont orienté notre choix vers l'HPLC, un système plus robuste. De plus, les dérivés lipophiles absorbant dans l'UV, l'utilisation du détecteur à diffusion de lumière (ELSD) n'était pas nécessaire et donc il était possible d'effectuer les analyses sur l'HPLC possédant uniquement une détection UV-Vis.

La colonne utilisée est une colonne chromolith® composée de silice sur laquelle sont greffées des chaînes C18. Cette colonne a l'avantage de retenir suffisamment les composés à analyser. Ces

composés peuvent être détectés par absorption UV-Vis à 235 nm du fait de la présence de fonctions amides et thioesters dans le cas du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**.

La méthode HPLC utilisée ici est inspirée de la méthode UPLC optimisée précédemment pour la quantification du surfactant fonctionnalisé SA-PEG₁₀₀GalNAc (Figure 132). Les proportions de solvants A et B sont conservées, seul le débit est ajusté à 1 mL/min. Il est important de noter que les MyrjTMs40 et les phospholipides seront présents dans ces échantillons. Il est donc nécessaire de conserver, dans la méthode utilisée, des conditions permettant leur élution d'autant qu'ils ne sont pas détectables par absorption UV-Vis à 235 nm.

Temps (min)	A (MeOH)	B (eau)
0	70	30
3	90	10
7	100	0
11	100	0
13	70	30
15	70	30

Figure 132 : Méthode HPLC utilisée pour l'analyse des chélateurs lipophiles incorporés dans les NLC, débit 1mL/min.

3.2 Calibration des chélateurs lipophiles

Afin de quantifier la quantité effectivement encapsulée dans les NLC, des courbes de calibration pour chacun des composés lipophiles NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** et NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂) **13** ont été établies.

3.2.1. NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂) **13**

Le composé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂) **13** est solubilisé dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL, passés aux ultrasons pour une dissolution totale puis injecté en HPLC. Le chromatogramme obtenu, reporté ci-dessous (Figure 134), présente un pic correspondant au composé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** à un temps de rétention de 9,1 min.

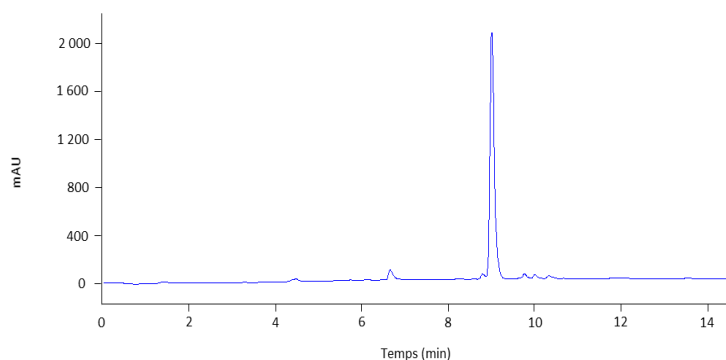


Figure 133 : Chromatogramme du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, détection UV à 235nm.

Des pics supplémentaires d'intensité faible aux alentours de 6,5 et 10 min sont également observés. Ces pics correspondent vraisemblablement à des traces de résidus de réactifs de couplage utilisés pour greffer les chaînes lipophiles non visible sur le spectre RMN. En effet l'agent de couplage utilisé, PyBOP possède un motif benzotriazole qui confère à ce composé et ses résidus, un coefficient d'absorption molaire très supérieur à celui du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**. Il n'est donc pas aberrant d'observer en HPLC de tels pics parasites correspondant à des traces de ces composés.

La courbe de calibration du dérivé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** est établie à partir d'une solution stock de 1,1 mM dans le MeOH. Cinq autres concentrations sont obtenues par dilution en cascade au demi afin d'obtenir une gamme de concentrations de 0,03 à 1,1 mM.

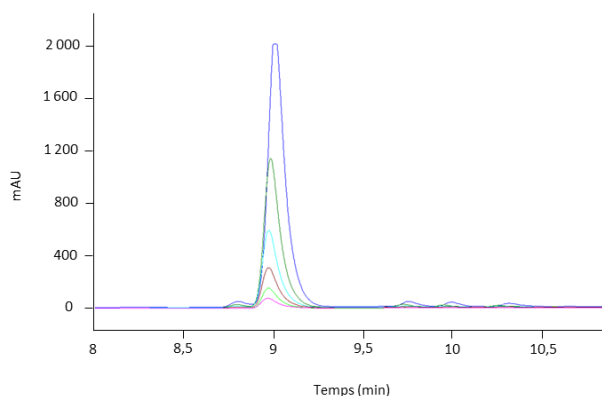


Figure 134 : superposition des chromatogrammes obtenus pour l'établissement de la courbe de calibration du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** de 0,03 mM à 1,1 mM). Détection UV à 235 nm.

L'intégration de l'aire du pic correspondant au composé à quantifier NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** reportée en fonction de la concentration permet d'obtenir une courbe de calibration (Figure 135). La courbe ainsi obtenue a pour équation $y = 27\,253\,649x + 264\,848$ et présente un excellent coefficient

de régression linéaire $R^2 = 1,00$. Cette équation sera utilisée par la suite pour la quantification du chélateur lipophile $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** effectivement encapsulé dans les NLC.

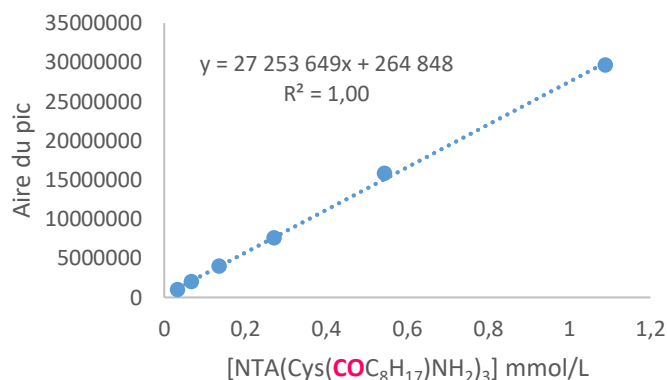


Figure 135 : Courbe de calibration du $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** de 0,03 à 1,1 mM.

3.2.2. $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15**

De la même manière, le composé $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** est solubilisé dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL, passé aux ultrasons pour une dissolution totale puis injecté en HPLC.

Le chromatogramme obtenu reporté ci-dessous (Figure 136) présente un pic correspondant au composé $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** à un temps de rétention de 8,8 min. Comme cela avait déjà été observé par RMN, le chromatogramme indique la présence de plusieurs impuretés notamment le produit de monosubstitution (Figure 130) et la 2-thiopyridine. Il est également possible que le procédé de solubilisation de l'échantillon ait entraîné des dégradations du $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15**. La courbe de calibration du dérivé $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** a été établie en intégrant uniquement l'aire du pic à 8,8 min et en tenant compte d'une pureté estimée à 87 % par RMN. Une solution stock de 1,1 mM de $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** dans le MeOH est préparée. Cinq autres concentrations sont ensuite obtenues par dilution en cascade pour obtenir une gamme de concentration de 0,03 à 1 mM.

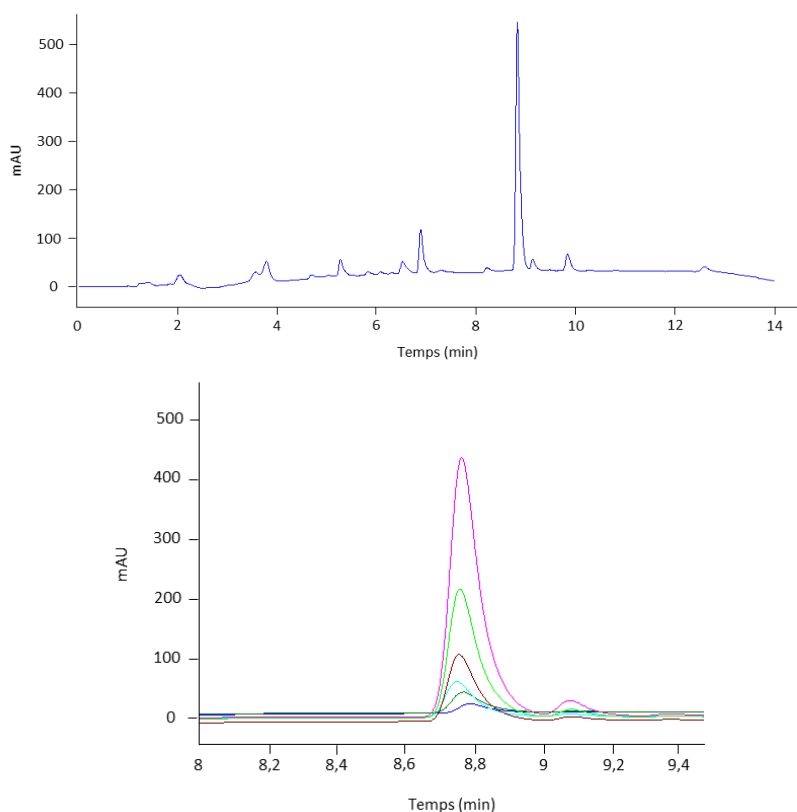


Figure 136 : Chromatogrammes du NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, détection UV 235nm a – à une concentration de 1 mM b – superposition des chromatogrammes obtenus pour l'établissement de la courbe de calibration (de 0,03 mM à 1 mM).

Comme précédemment, l'intégration de l'aire du pic correspondant au composé à quantifier NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** reportée en fonction de la concentration permet d'obtenir une courbe de calibration. La courbe ainsi obtenue a pour équation $y = 57\,942\,609x + 860\,537$ et possède également un excellent coefficient de régression linéaire $R^2 = 1,00$ (Figure 137). Cette équation sera utilisée par la suite pour la quantification du chélateur lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** effectivement encapsulé dans les NLC.

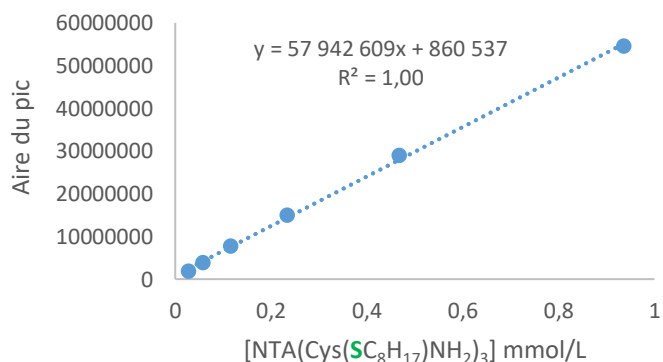


Figure 137 : Courbe de calibration du NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, établie de 0,03 à 1 mM.

3.3 Quantification

Grace aux courbes de calibration établies précédemment, il est possible de quantifier la quantité de chélateurs lipophiles NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** effectivement encapsulée dans les nanoparticules lipidiques. La quantification de ces composés a été réalisée pour les 3 différents lots de NLC chargées mais ici seront uniquement présentés les résultats obtenus pour les lots les plus concentrés : II (13,5 mg NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**) et III (13,1 mg NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**).

3.3.1. Préparation des échantillons

Pour déterminer précisément le rendement d'encapsulation des chélateurs lipophiles NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, les NLC formulées précédemment ont été extraites en phase solide (SPE) avant et après dialyse. L'extraction en phase solide (Surface Phase Extraction, SPE) est une technique permettant d'extraire un composé d'intérêt. Elle a déjà été appliquée aux nanoparticules notamment pour déterminer le rendement d'incorporation de docetaxel dans les liposomes²⁶⁵ ainsi que celui de la cyclosporine dans les NLC.²⁶⁶ Le but ici est de séparer efficacement les nanoparticules formulées des chélateurs lipophiles qui n'ont pas été encapsulés pendant la formulation et pourraient rester accrochés aux surfactants PEGylés.

L'extraction en phase solide (SPE), au même titre que la chromatographie, est composée de deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire contient un mélange de vinylpyrrolidone (polaire) et de divinylbenzène (apolaire) possédant ainsi la juste balance hydrophile-lipophile pour la rétention d'une large gamme de composés (Oasis® HLB). La phase mobile quant à elle dépend du composé à éluer. La phase mobile utilisée pour cette étude est une solution de tampon phosphate (10 mM, pH 7,4 noté PBS 1X), dans lequel les nanoparticules sont en suspension. Les caractéristiques de la phase stationnaire sont présentées Figure 138.

- Specific Surface Area: 800 m²/g
- Average Pore Diameter: 80 Å
- Specific Pore Volume: 1.3 mL/g
- Average Particle Diameter: 30 µm *



Figure 138 : Caractéristiques de la phase stationnaire Oasis® HLB et montage de l'extraction en phase solide (SPE).

Le processus se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, la phase stationnaire est conditionnée par un solvant organique, afin d'activer les sites de rétention, puis par le tampon dans lequel les NLC sont en suspension. Ensuite, l'échantillon de NLC chargés est déposé sur la colonne. Les nanoparticules ne sont pas retenues par la colonne et sont donc récoltées dans la fraction notée F1 (Figure 139). L'éluution des composés retenus par la colonne est ensuite réalisée par ajout de méthanol. La fraction suivante notée F2 contient ainsi les chélateurs lipophiles $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}\text{C}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** ou $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** non incorporés lors de la formulation, ou qui ont fui à travers les nanoparticules (Figure 139).

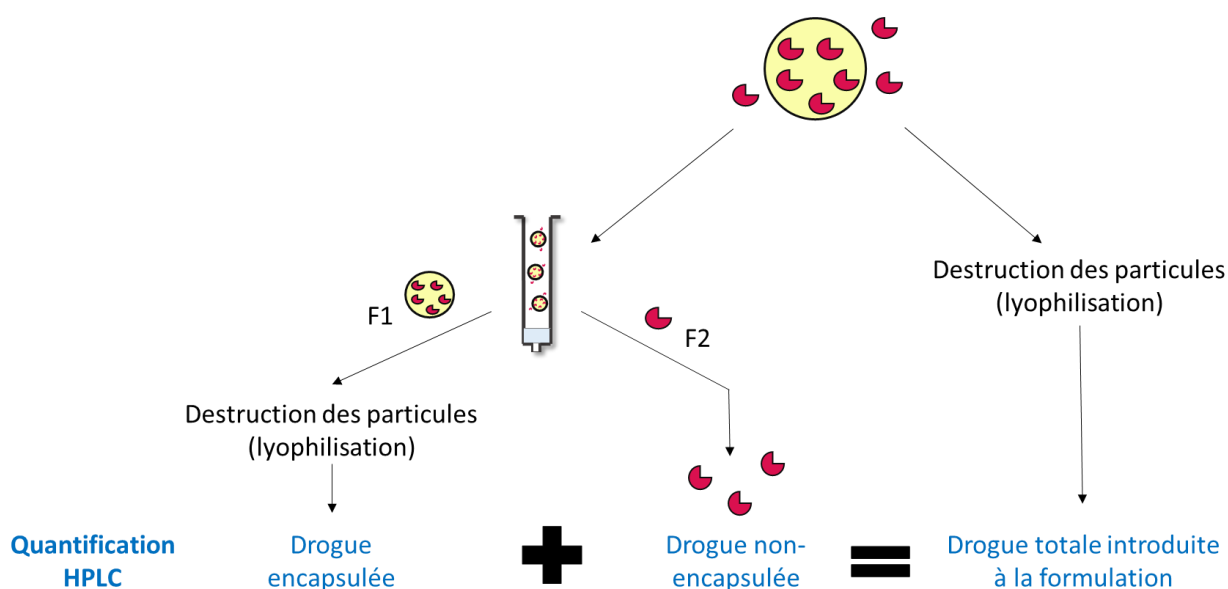


Figure 139 : Principe de la quantification de la drogue encapsulée dans les NLC par méthode SPE adaptée aux nanoparticules.

Ensuite les nanoparticules chargées en chélateurs lipophiles de la fraction F1 sont détruites par congélation dans l'azote liquide puis lyophilisation. Le solide obtenu est ensuite dissout dans un volume connu de méthanol afin d'obtenir une concentration en dérivé lipophile théorique de 1 mg/mL. Les ingrédients lipidiques des NLC étant insolubles dans le méthanol, la filtration des échantillons permet leur élimination avant injection en HPLC. La fraction F2 contient quant à elle les composés non encapsulés pendant l'étape de formulation (et/ou qui n'auraient pas été éliminés pendant l'étape de dialyse). Cette fraction est donc concentrée sous vide, solubilisée dans un volume connu de MeOH et filtrée avant injection en HPLC.

L'analyse de ces différentes fractions permettra de déterminer la quantité de chélateurs lipophiles effectivement encapsulés ainsi que les rendements d'encapsulation. Elle permettra également de détecter une éventuelle fuite du chargement. En effet, il est possible que le dérivé lipophile ne

s'encapsule pas correctement dans le cœur des NLC mais soit par exemple inséré dans les phospholipides. Cela entraîne alors une déstabilisation de la particule et peut conduire à l'expulsion de la molécule. Egalement, comme cela peut être le cas avec certaines nanoparticules lipidiques de type SLN (Solid Lipid Nanoparticle),¹⁵⁹ il est possible que la drogue cristallise à l'intérieur des nanoparticules entraînant son éjection.²⁶⁷

La quantité totale en chélateurs lipophiles dans les échantillons de nanoparticules a été évaluée avant dialyse et sans passage SPE. Cette étape permet la validation de la méthode de quantification ; la quantité déterminée expérimentalement doit être égale à la quantité introduite à la formulation. Une différence entre ces deux valeurs indiquerait un problème au niveau de la solubilisation des échantillons dans le méthanol (insolubilité du dérivé lipophile).

3.3.2. Analyse de NLC formulées en présence des chélateurs lipophiles

La quantification de composés encapsulés NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** a été réalisée pour les lots de NLC chargées II (13,5 mg NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**) et III (13,1 mg NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**), par analyse HPLC des différents échantillons préparés comme décrit plus haut (3.3.1).

3.3.2.(a) Quantification du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**

Les fractions F1 et F2 avant et après dialyse sont analysées par HPLC ainsi que les NLC détruites sans passage SPE. Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 140) et les résultats des NLC détruites sont reportées sous le terme "quantité totale" (Tableau 20).

CHARGEMENT PAR UN DERIVE LIPOPHILE DU CHELATEUR DE CUIVRE ET QUANTIFICATION

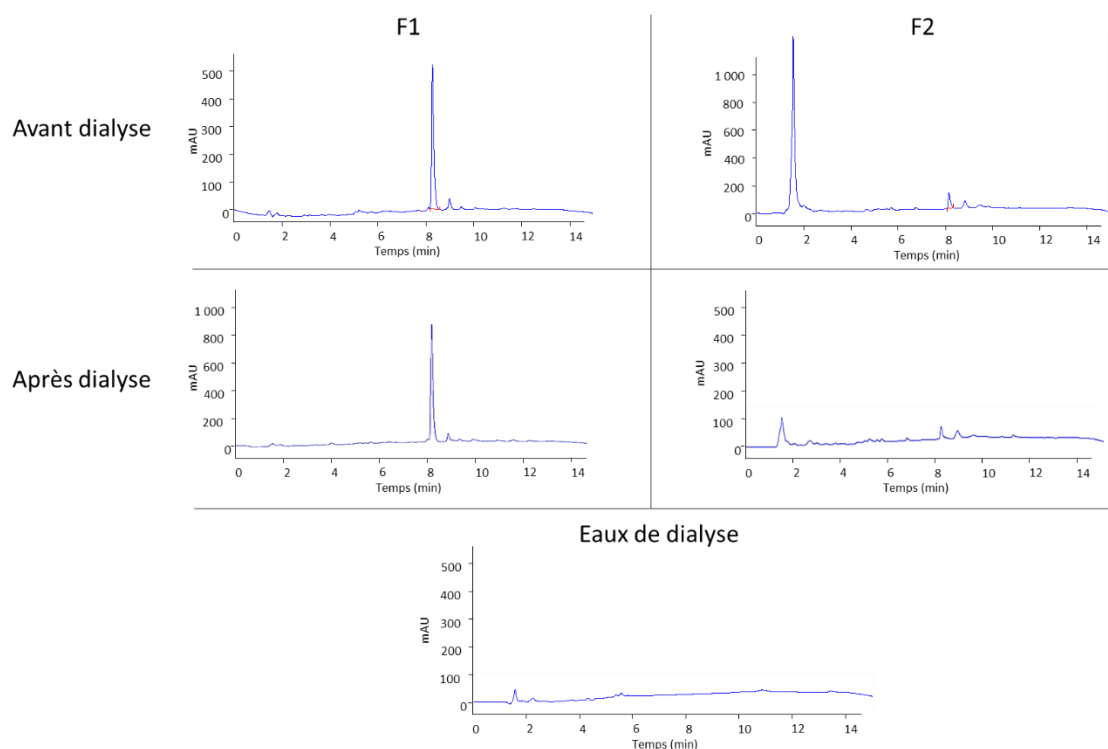


Figure 140 : Chromatogramme des fractions obtenues après passage des NLC chargées en $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** après passage par SPE (F1 et F2) avant ou après dialyse des NLC. Chromatogramme de l'analyse des eaux de dialyse.

Le pic à 8,3 min correspondant au chélateur lipophile $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** est présent dans tous les échantillons analysés avec des intensités variables. Pour chaque chromatogramme, l'aire du pic correspondant à ce chélateur lipophile est intégrée. Grâce à la courbe de calibration établie précédemment (Figure 135 et Figure 137), la quantité de chélateur lipophile peut être déterminée pour chaque échantillon et le rendement d'incorporation calculé. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 20). Le contenu total des nanoparticules évalué sur les échantillons avant dialyse et sans passage SPE est également répertorié dans le Tableau 20 sous le terme "quantité totale". Les quantités ainsi obtenues permettent d'évaluer des concentrations effectives en chélateur lipophile également reportées dans le Tableau 20.

Lot II - 13,5 mg de $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ 13					
	Quantité totale	SPE			
		F1 non dia	F2 non dia	F1 dia	F2 dia
Quantité finale (mg)	12,8	11,3	0,3	8,5	0,1
Rendement	95 %	83 %	2 %	63 %	1 %

Tableau 20 : Quantification de $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{CO}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13** dans les F50-lot N°II.

Le taux de récupération déterminé grâce la quantité totale en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** est de 95 %. Les étapes de lyophilisation, solubilisation et filtration entraînent donc une perte de 5 % en produit, soit ici de 0,7 mg.

Les deux fractions F1 avant et après dialyse contiennent la majorité du chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** respectivement 83 % et 63 %. Des quantités très faibles (2 % et 1 %) sont présentes dans les fractions F2. Ceci indique que ce chélateur lipophile est encapsulé de façon efficace dans les NLC. Cependant, la différence observée sur les deux fractions F1 avant et après dialyse suggère une possible fuite du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** à travers la nanoparticule pendant l'étape de dialyse. La possibilité d'une fuite de dérivé lipophile pendant le stockage des NLC à 4°C a été évaluée sur les nanoparticules chargées, 2 semaines après leur formulation. En effet, une diminution de la quantité de NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** dans la fraction F1 au cours du temps signifierait que le dérivé lipophile est relargué de la nanoparticule.

Après passage sur SPE, congélation et lyophilisation, la fraction F1 dialysée obtenue et analysée par HPLC a permis de quantifier la quantité de NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** encore présente dans les NLC deux semaines après formulation. Une valeur de 10,9 mg (2,4 mM) pour la totalité d'échantillon de NLC est obtenue (Cf annexe 9). Cette valeur est supérieure à celle mesurée précédemment (8,5 mg ; 1,9 mM). La quantité déterminée en premier lieu dans les NLC a donc visiblement été sous-estimée. Ce résultat montre donc ici l'incertitude sur la mesure due à la perte de produit pouvant être occasionnée par les différents traitements subis par les nanoparticules (SPE, lyophilisation puis re-solubilisation). Il est cependant important de noter que la quantité déterminée en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** est supérieure. Il semble donc que l'encapsulation du chélateur lipophile **13** dans les NLC soit stable sur de courtes périodes (2 semaines).

L'encapsulation du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13 dans les NLC a donc été un succès avec un rendement d'encapsulation de l'ordre de 60 - 65 %. Cette valeur correspond à une quantité en dérivé lipophile de 2,5 % de la quantité totale en lipide (w/w) et est un très bon résultat d'encapsulation.**

3.3.2.(b) Quantification du NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**

Concernant l'étude des NLC chargées avec NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, les fractions F1 et F2 avant et après dialyse ainsi que les NLC détruites sans passage SPE sont analysées par HPLC. Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 141).

CHARGEMENT PAR UN DERIVE LIPOPHILE DU CHELATEUR DE CUIVRE ET QUANTIFICATION

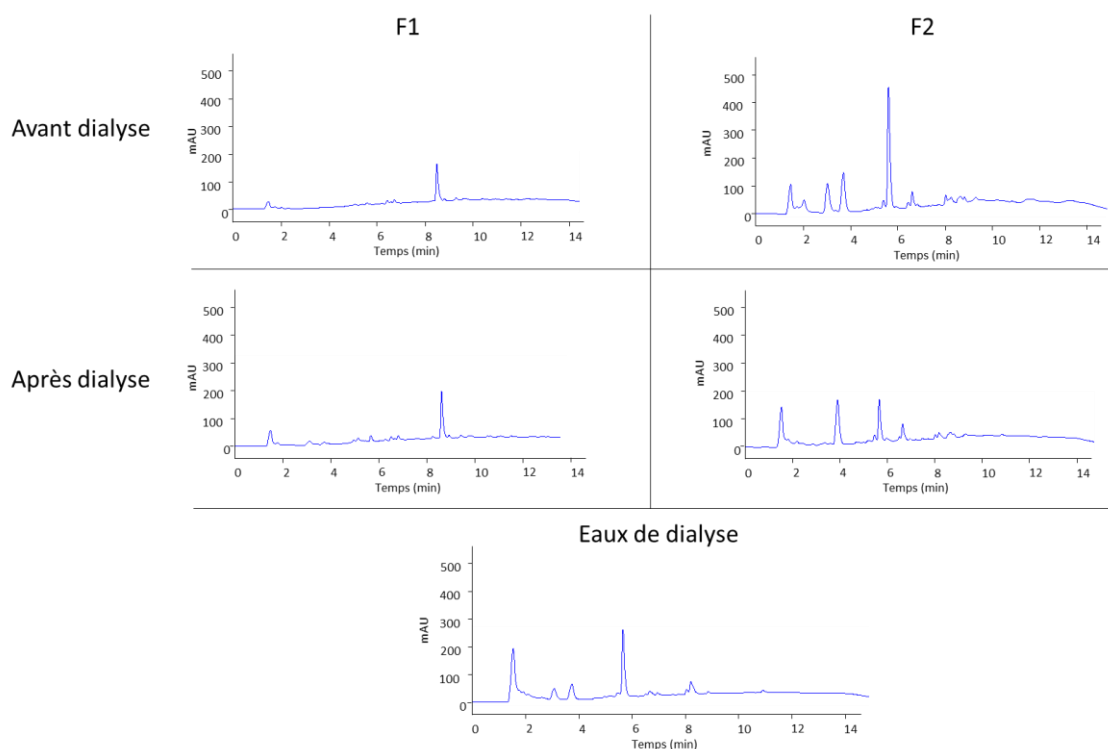


Figure 141 : Chromatogramme des fractions obtenues après passage des NLC chargées en NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** après passage par SPE (F1 et F2) avant ou après dialyse des NLC. Chromatogramme de l'analyse des eaux de dialyse.

Le pic à 8,8 min correspondant au chélateur lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** est présent dans les fractions F1 avant et après dialyse. L'intégration de l'aire de ce pic et la courbe de calibration établie précédemment (Cf Ch II.3.2.1) permettent de déterminer la quantité de chélateur lipophile et le rendement d'incorporation. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 21)

Lot III - 13,1 mg de NTA(Cys(SC ₈ H ₁₇)NH ₂) ₃ 15			
	Quantité totale	SPE	
		F1 non dia	F1 dia
Quantité finale (mg)	12,0	7,4	6,0
Rendement	92 %	57 %	46 %

Tableau 21 : Quantification NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** dans les NLC lot N°III

Aucun pic à 8,8 min correspondant au chélateur lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** n'est observé dans les fractions F2 avant et après dialyse (Figure 141). En revanche, de nombreux pics de forte intensité, qui n'étaient pas présents lors de l'analyse du composé NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, sont présents sur ces chromatogrammes. Une analyse des eaux de dialyse donne un résultat similaire. Il semble donc que

ce dérivé NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** ne soit pas stable au contact de la SPE ou de la membrane de dialyse et se dégrade. Cette dégradation rend impossible la quantification du chélateur lipophile non incorporé pendant la formulation.

Avec un rendement d'incorporation de l'ordre de 50 %, le chélateur lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** est également encapsulé, de façon moindre que le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, mais tout de même efficace dans les NLC.

Comme précédemment la possibilité d'une fuite de dérivé lipophile pendant le stockage des NLC à 4°C a été évaluée sur les nanoparticules chargées, 2 semaines après leur formulation. Après passage sur SPE, congélation et lyophilisation, la fraction F1 dialysée obtenue est analysée par HPLC et permet d'évaluer une quantité de NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** de 7,5 mg soit une concentration de 1,6 mM (Cf annexe 9). Comme pour le composé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, cette valeur est supérieure à celle précédemment calculée pour la fraction F1 après dialyse (6,0 mg ; 1,3 mM), certainement pour les mêmes raisons de pertes pendant les manipulations et incertitudes de mesures.

L'encapsulation du NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15 dans les NLC a donc également été un succès un rendement de 45 - 50 % pour un taux de charge en drogue relativement élevé (1,7 % w/w). De plus, les NLC montrent ici leur capacité à protéger la drogue incorporée ; le NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** encapsulé n'ayant pas été dégradé lors des étapes de dialyse et SPE.**

4. Conclusion

Deux analogues lipophiles (composé **13** et composé **15**) du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12**, contenant 3 chaînes octyles C₈H₁₇ introduites via un lien disulfure ou thioester ont été synthétisés. Des NLC chargées avec ces chélateurs lipophiles ont été formulées avec succès et leur grande stabilité (< 3 mois) a permis leur caractérisation et la quantification du principe actif encapsulé. La quantité de chélateurs lipophiles à l'intérieur des NLC a été déterminée par une méthode de quantification alliant la séparation par SPE et la quantification par HPLC analytique. Deux lots de NLC II et III contenant respectivement une concentration de 2,1 ± 0,4 mM de NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et 1,5 ± 0,2 mM de NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** ont été obtenus. Des études sur des cellules hépatiques présentant une surcharge en cuivre permettront d'évaluer la capacité de ces nanovecteurs à délivrer le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** et de piéger le cuivre de manière efficace

Evaluation de la capacité de nanoparticules à délivrer un chélateur de cuivre au niveau cellulaire

1. Objectif et démarche

Les versions lipophiles du chélateur $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ **12** portant des chaînes aliphatiques lipophiles C_8H_{17} liées par un lien disulfure ($\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** ou thioester $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{COC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13**) ont été encapsulées dans des transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC) et quantifiées. Leur capacité à être délivrés dans des cellules hépatiques et à protéger les cellules des effets toxiques du cuivre en excès a ensuite été évaluée.

Pour cela des expériences de viabilité en l'absence ou en présence d'un excès de cuivre, et de quantification de la production de métallothionéines comme marqueur de la présence de cuivre intracellulaire en excès, ont été réalisées sur des deux lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain :

- la lignée HepG2/C3A, dérivé de la lignée HepG2 possédant la capacité à former des canalicules biliaires mimant ainsi le système d'excrétion du cuivre
- la lignée C8 pour laquelle la protéine ATP7B a été délétée. Cette dernière représente un modèle pertinent de la maladie de Wilson.

En effet, comme nous l'avons vu en introduction (Cf Ch I.2), cette maladie est provoquée par des mutations du gène *atp7b* codant pour cette protéine. A titre de comparaison, ces expériences ont également été réalisées avec les chélateurs ($\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** et $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{COC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13**) non encapsulés et les traitements de référence utilisés ou en cours de développement pour le traitement de la maladie de Wilson (D-Pen, Trientine et TTM, Cf Ch I.3).

Ces expériences ont permis d'évaluer la capacité des NLC à délivrer dans les cellules hépatiques un chélateur du cuivre efficace pour les protéger des effets toxiques d'une surcharge en ion métallique.

2. Evaluation de la viabilité cellulaire

L'impact de la chélation du cuivre médiée par les NLC peut être évalué en comparant la toxicité d'une surcharge en cuivre en l'absence ou en présence d'un agent potentiellement chélatant. Pour cela des tests de viabilité ont été réalisés en utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Ce test colorimétrique permet une quantification rapide des cellules vivantes. Afin de discuter les résultats obtenues avec les NLC chargées, l'effet du chargement seul

(NTA(Cys(CO₈H₁₇))NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇))NH₂)₃ **15**), des NLC non chargées et des traitements de référence utilisés ou en cours de développement (D-Pen, Trientine et TTM) a également été évaluée.

2.1 Principe du test MTT

Le test MTT est classiquement utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire, basé sur la mesure de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale.²⁶⁸ Dans une cellule vivante, le processus de respiration cellulaire est assuré dans la mitochondrie. Le bon fonctionnement de la mitochondrie est donc indispensable à la survie de la cellule et l'évaluation d'une de ses activités enzymatiques permet de suivre la viabilité cellulaire.

Dans les cellules viables, l'enzyme la succinate déshydrogénase réduit le MTT (jaune) en formazan insoluble dans l'eau, conduisant à la formation de cristaux (violets) (Figure 142).

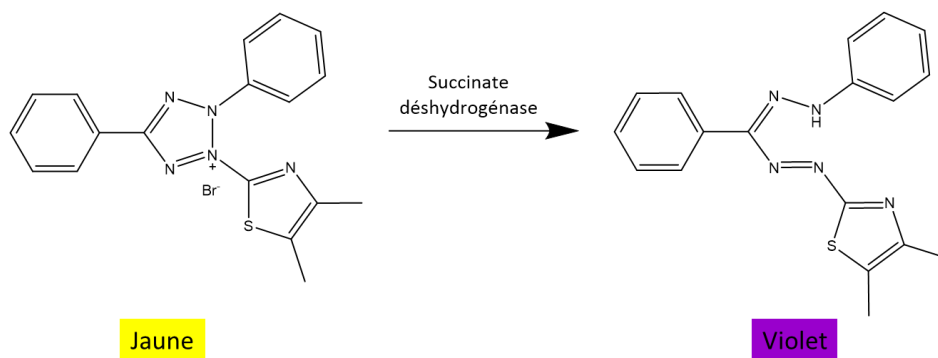


Figure 142 : Principe de réduction du réactif MTT en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale.

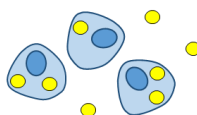
Si le MTT (jaune) est réduit en formazan (violet), alors la cellule est vivante. A contrario, si le milieu reste jaune, les cellules sont mortes. Pour quantifier ces résultats, les cristaux de formazan ayant précipité sont dissouts puis quantifiés par spectrophotométrie. La valeur de l'absorbance à 570 nm, correspondant au formazan est proportionnelle à la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus sont normalisés en pourcentage par rapport à un contrôle non exposé à un stress induit par le cuivre.

2.2 Cytotoxicité

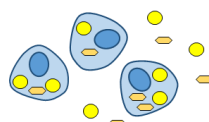
Avant d'évaluer les effets sur la chélation du cuivre et de s'affranchir des effets de toxicité directe des nanoparticules et/ou de leur chargement, il est nécessaire de déterminer une concentration pour laquelle les nanoparticules ne seront pas cytotoxiques et également d'estimer la toxicité des dérivés lipophiles seuls.

Dans un premier temps des expériences de cytotoxicité en condition basale de cuivre, ont donc été réalisées avec les dérivés lipophiles, les nanoparticules chargées et non chargées comme contrôles (F50 0 %). Le protocole utilisé est présenté ci-dessous (Figure 143).

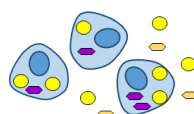
1) Incubation 24 h avec les composés à tester ●



2) Ajout de réactif MTT, incubation 1 h



3) Formation de cristaux de formazan



4) Lyse des cellules, dissolution des cristaux et lecture de l'absorbance à 570 nm

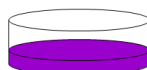


Figure 143 : Principe du test MTT.

Les cellules sontensemencées à 20 000 cellules par puits, 48 h avant le test. Elles sont ensuite incubées pendant 24 h avec des doses croissantes de :

- dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** de 0 à 400 μM
- NLC chargées en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** (NLC-**SCO**) et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** (NLC-**SS**) de 0 à 6,4 mg/mL en lipides de NLC, correspondant aux concentrations de 0 à 400 μM en dérivés lipophiles
- ou NLC contrôles (F50 0 %) de 0 à 6,4 mg/mL en lipides de NLC.

Après incubation et rinçages, le milieu cellulaire est remplacé par une solution de MTT avec laquelle les cellules sont incubées pendant 1h. La solution de MTT est ensuite éliminée et les cristaux de formazan sont solubilisés dans un mélange isopropanol, HCl (4 mM), 0,1 % NP40. L'absorbance de la solution de chaque puit est ensuite mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaque.

Les résultats obtenus, exprimés en pourcentage de survie cellulaire pour chaque composé testé sont reportés ci-dessous (Figure 144a). La dose causant la mort de 50 % des cellules (DL50) a été déterminée

graphiquement et les valeurs obtenues pour les différents composés testés sont présentés (Figure 144b).

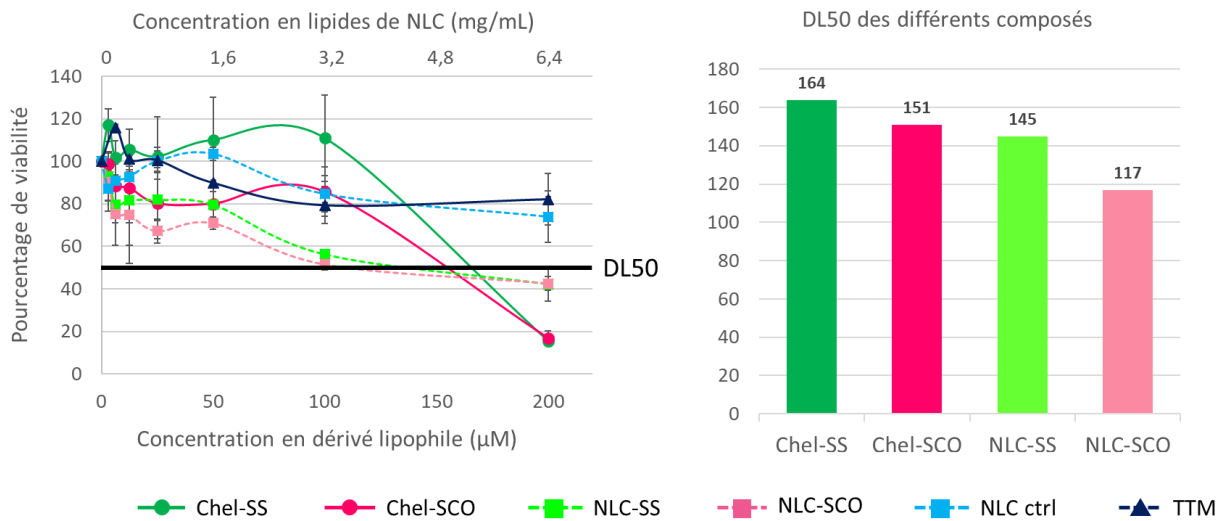


Figure 144 : Evaluation de la viabilité cellulaire des différents composés par test MTT sur cellules C3A, n=2. Etablissement des DL50 des différents composés testés.

Comme nous l'avons vu précédemment, les NLC contrôle (---) sont peu toxiques (la DL50, dose permettant de tuer 50 % des cellules, n'est pas atteinte ici). Par contre, leur toxicité tend à augmenter lorsqu'elles sont chargées avec les chélateurs lipophiles NTA(Cys(CO₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, avec des valeurs de DL50 de 117 µM pour les NLC-SCO et 145 µM pour les NLC-SS. Cependant cette toxicité est relativement faible à 25 µM, 0,8 mg/mL équivalent en lipides de NLC (Figure 145).

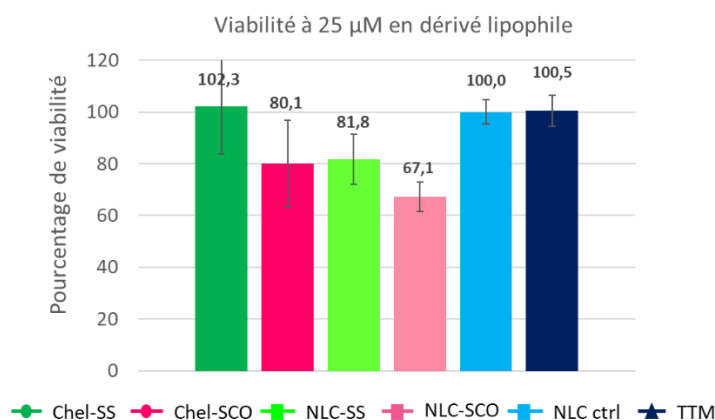


Figure 145 : Viabilité cellulaire des différents composés à 25 µM ou 0,8mg/mL équivalent en lipides de NLC.

La concentration a donc été fixée à 25 µM / 0,8 mg/mL pour les tests de viabilité effectués en présence de cuivre.

2.3 Effet protecteur des chélateurs

Pour évaluer la capacité des NLC à délivrer dans les cellules hépatiques le chélateur du cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** et protéger les cellules des effets toxiques de cet ion métallique en excès, des tests de viabilité ont été réalisés en exposant les cellules à des concentrations croissantes en cuivre. Comme présenté précédemment, deux lignées cellulaires HepG2/C3A capable de former des canalicules biliaires, et C8, pour laquelle la protéine ATP7B a été délétée, ont été utilisées. Le test MTT permet ici de déterminer une dose létale en cuivre causant la mort de 50 % des cellules (DL50) en présence ou en absence des différents composés testés.

Les cellules sont co-incubées pendant 24h avec des doses croissantes en cuivre (de 0 à 800 µM) et :

- les dérivés lipophiles NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** à une concentration de 25 µM
- les NLC chargées en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** (NLC-SCO) et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** (NLC-SS) à une concentration de 25 µM en dérivés lipophiles ; 0,8 mg/mL équivalents en lipides
- ou les NLC contrôles (F50 0 %) à 0,8 mg/mL en lipides de NLC.

Après incubation et rinçages, le milieu cellulaire est remplacé par une solution de MTT avec laquelle les cellules sont incubées pendant 1h. La solution de MTT est ensuite éliminée et les cristaux de formazan sont solubilisés. L'absorbance de la solution de chaque puit est ensuite mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaque.

2.3.1. Viabilité sur cellules C3A

La capacité des NLC à piéger le cuivre et protéger les cellules de ses effets toxiques, a d'abord été évaluée sur la lignée HepG2/C3A.

Les valeurs de DL50 sont déterminées en reportant la concentration en cuivre où l'on observe 50 % de mort cellulaire. L'exemple du contrôle de cellules C3A exposées uniquement au cuivre est présenté ci-dessous (Figure 146).

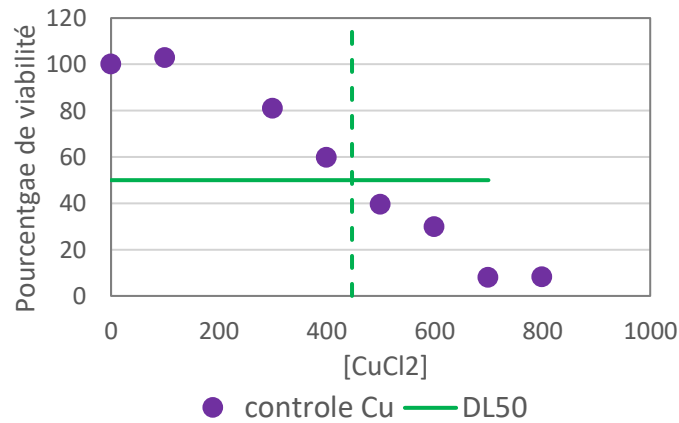


Figure 146 : détermination de la DL50 en cuivre par test MTT pour le contrôle de cellules HepG2/C3A exposées uniquement au cuivre.

Une valeur de DL50 significativement supérieure à ce contrôle traduit un effet protecteur du chélateur de cuivre. Ici, la DL50 déterminée pour le contrôle est de $438 \pm 26 \mu\text{M}$ en CuCl_2 . Les résultats de DL50 obtenues pour ces NLC chargées en chélateurs lipophiles ($\text{NTA}(\text{Cys}(\text{SC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **15** et $\text{NTA}(\text{Cys}(\text{COC}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2)_3$ **13**) sont présentés Figure 147. A titre de comparaison, les valeurs obtenues avec les chélateurs non encapsulés et les traitements de référence utilisés ou en cours de développement pour le traitement de la maladie de Wilson (D-Pen, Trientine et TTM) sont également reportées.

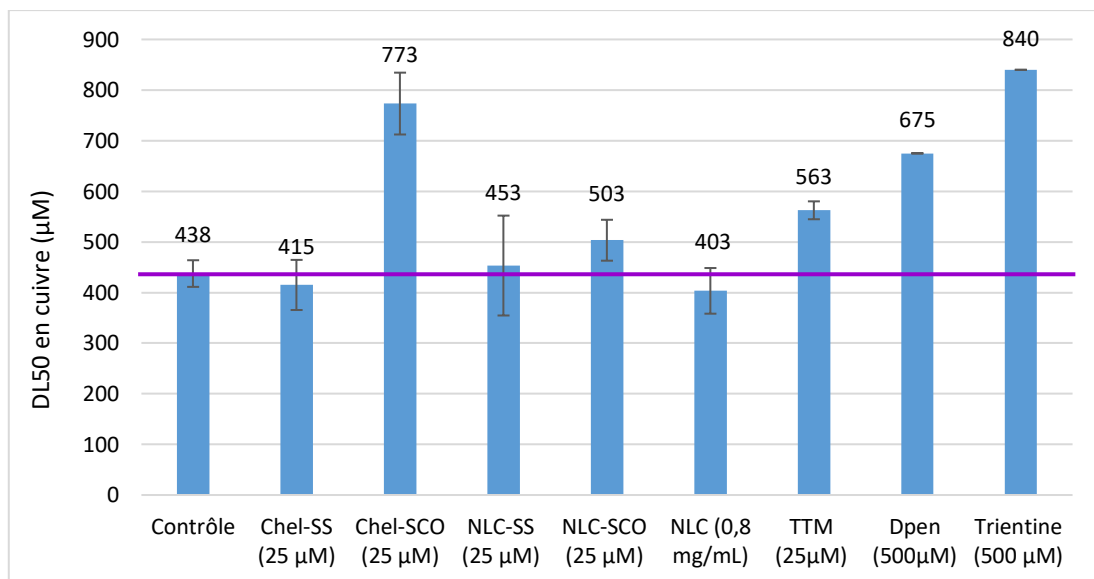


Figure 147 : DL50 cuivre sur cellules C3A déterminées par test MTT, n=3. La valeur de DL50 correspondant au contrôle sans cuivre est représentée par la droite violette.

Les valeurs de DL50 obtenues avec le dérivé lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** (415 ± 50 μM) et les NLC chargées en NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** (NLC-SS) (453 ± 99 μM) sont similaires au contrôle (438 ± 26 μM). Il n'y a donc pas d'effet protecteur significatif lorsque le chélateur lipophile portant des chaînes aliphatiques C₈H₁₇ liées par un lien disulfure est utilisé. Par contre, les valeurs de DL50 obtenues pour le dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** de 773 ± 61 μM et, dans une moindre mesure, les NLC chargées en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** (NLC-SCO) de 503 ± 40 μM en CuCl₂, sont supérieures à la valeur contrôle (438 ± 26 μM). Ceci suggère un effet protecteur avec le chélateur lipophile portant des chaînes aliphatiques lipophiles C₈H₁₇ liées par un lien thioester NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et sa version encapsulée dans les NLC (NLC-SCO).

Cet effet est particulièrement prononcé pour le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** seul. De plus, la valeur de DL50 (773 ± 61 μM) et donc l'efficacité de chélation du cuivre, est supérieure à celles obtenues pour les traitements de référence à savoir le TTM (562 ± 18 μM), la DPen (675 μM) et la trientine (840 μM). Grâce à ses chaînes lipidiques, le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** semble entrer par diffusion de manière efficace dans les cellules hépatiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, les estérases permettraient de couper les liens thioesters, libérant ainsi le chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** qui pourrait alors piéger le cuivre en excès.

L'efficacité des (NLC-SCO) est inférieure à celle du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** seul. Comme nous l'avons vu précédemment (Cf Ch II.2.4.2), ces NLC sont efficacement internalisées dans les cellules hépatiques. Cependant la libération du chélateur et/ou son transfert dans le cytosol est peut-être limitée, ou prend du temps, ce qui explique l'effet protecteur plus faible que pour la molécule lipophile seule.

2.3.2. Viabilité sur cellules C8

Des expériences similaires ont été effectuées sur des cellules C8, un mutant de la lignée hépatique C3A dont le gène codant pour l'ATP7B a été délété (ATP7B knock-out, KO). Ces cellules sont plus représentatives de la maladie de Wilson. Pour rappel (Cf Ch I.2.2), cette maladie est provoquée par des mutations du gène *atp7b* qui rendent la protéine du même nom dysfonctionnelle. Les résultats de DL50 obtenues pour ces NLC chargées en chélateurs lipophiles NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**, sont présentés Figure 148. A titre de comparaison, les valeurs obtenues avec le chélateur non encapsulé NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et les traitements de référence sont également reportées (Figure 148). Pour ces tests, le dérivé lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** s'est révélé trop cytotoxique sur cette lignée cellulaire et n'a pas pu être étudié.

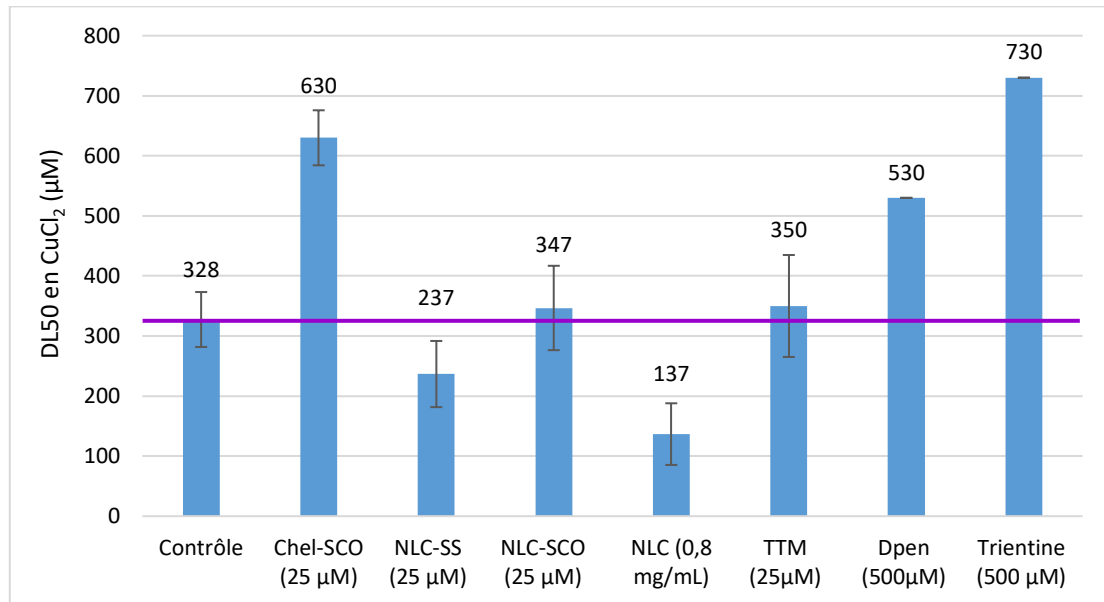


Figure 148 : DL50 cuivre sur cellules C8 (*ATP7B KO*) déterminées par test MTT, n=3. La valeur de DL50 correspondant au contrôle sans cuivre est représentée par la droite violette.

Comme attendu, la DL50 pour le contrôle, est plus faible que précédemment avec une valeur de $328 \pm 46 \mu\text{M}$ sur cellules C8 contre $438 \pm 26 \mu\text{M}$ sur les cellules C3A. En effet, du fait de la délétion du gène *atp7b*, les cellules C8 sont plus sensibles à la présence de cuivre. La tendance obtenue sur cette lignée est la même que précédemment. Aucun effet protecteur n'est observé lorsque les NLC-SS sont utilisées. Ces nanoparticules sont même toxiques pour les cellules (DL50 de $237 \mu\text{M}$). Par contre, la valeur de DL50 obtenue pour le dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** de $630 \pm 46 \mu\text{M}$ en CuCl₂ est très largement supérieure à la valeur contrôle ($328 \pm 46 \mu\text{M}$). Ceci confirme l'effet protecteur du chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**. Sa version encapsulée dans les NLC, NLC-SCO, a une DL50 ($347 \pm 70 \mu\text{M}$) similaire à celle du contrôle. Il ne semble donc pas y avoir un effet à l'utilisation de NLC sur cette expérience. Cependant, il est possible que l'efficacité plus faible des NLC-SCO soit due à la sensibilité plus importante des cellules C8 vis-à-vis des nanoparticules, comme le montre la DL50 des NLC à 0,8 mg/mL de $137 \pm 51 \mu\text{M}$.

3. Evaluation de l'expression des métallothionéines par RT-qPCR

L'impact des NLC chargées en chélateurs lipophiles sur la chélation intracellulaire du cuivre peut également être évalué en mesurant l'expression des gènes codant pour les métallothionéines (MTs). En effet, ces protéines riches en cystéines lient des métaux physiologiques (zinc, cuivre) et d'autres métaux non essentiels (cadmium, mercure). L'expression des gènes codant pour les MTs est régulée

par la concentration intracellulaire en ions métalliques. En cas de surcharge métallique, l'ion Zn(II) lié à la MT est déplacé par le métal en excès et se lie alors au facteur de transcription MTF1 (Metal transcription factor-1) pour induire notamment l'expression des MTs. Pour suivre cette réponse de protection contre un excès toxique de cuivre, l'ARN messager (ARNm) codant pour une MT peut être quantifié par RT-qPCR.

Avant de présenter et commenter les résultats obtenus, il est nécessaire de décrire le principe de la RT-qPCR.

3.1 Principe de la RT-qPCR

L'étude de l'expression des gènes par RT-qPCR (Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction) permet d'obtenir, à partir d'un extrait biologique complexe, des quantités importantes, amplifiées, d'un fragment spécifique d'ADN. Cette technique nécessite dans un premier temps l'extraction de l'ARN des cellules et la dégradation de l'ADN génomique. L'ARN ainsi extrait est ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse (*en anglais Reverse Transcription, RT*) (Figure 149).

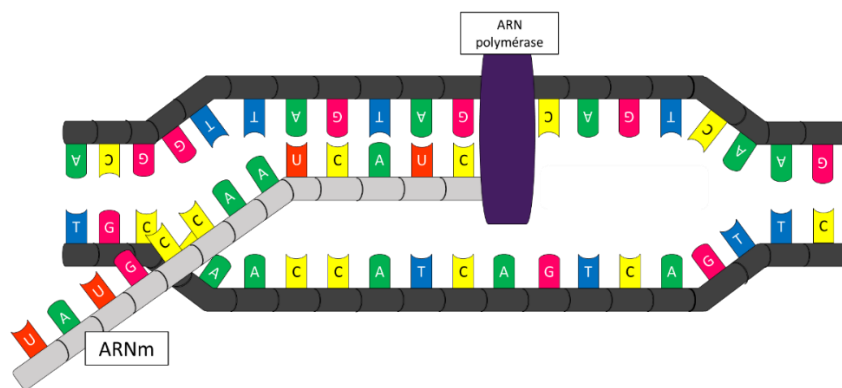


Figure 149 : Transcription de l'ADN pour former l'ARN messager (ARNm) par l'ARN polymérase.

C'est cet ADN complémentaire qui est ensuite amplifié et quantifié par qPCR. Cette amplification est réalisée par des réactions en chaîne grâce à une polymérase (*en anglais Polymerase Chain Reaction PCR*). Elle permet de répliquer la séquence d'ADN et d'obtenir un million de copies de la séquence choisie en quelques heures.

Elle se déroule pour chaque cycle en 3 étapes :

- Dénaturation (Figure 150) : à une température de 95°C, l'ADN est dénaturé en cassant les liaisons hydrogène qui maintiennent la structure de la double hélice

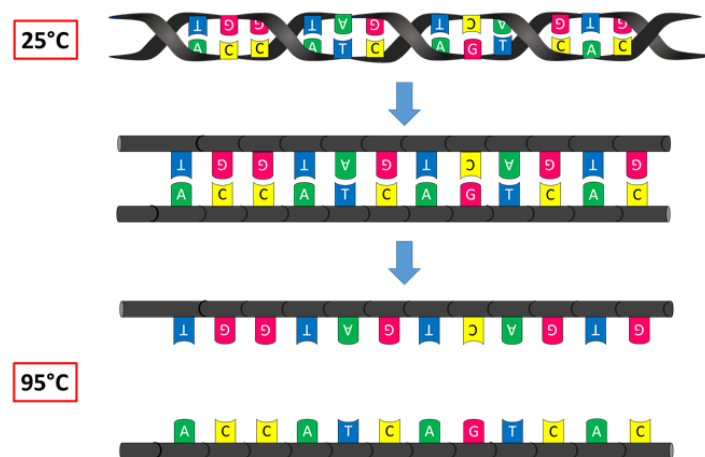


Figure 150 : Etape de dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C.

- Hybridation (Figure 151) : Deux amorces (directe et indirecte) sont choisies de manière à encadrer la séquence d'ADN à amplifier et s'hybrident sur la séquence d'ADN par complémentarité des bases.

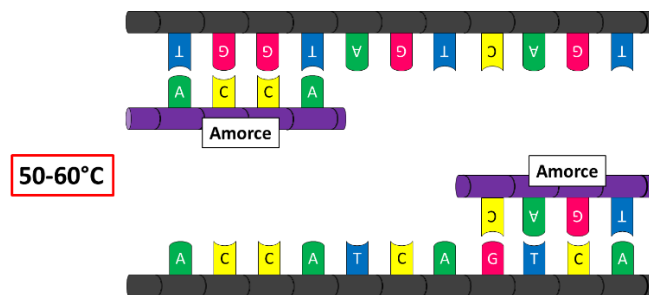


Figure 151 : Etape d'hybridation de l'amorce sur le brin d'ADN complémentaire.

- Elongation (Figure 152) : la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN. Cette enzyme est stable et active à température élevée. Elle est extraite d'une bactérie (*Thermusaquaticus*) vivant uniquement dans les sources chaudes et a une température optimale d'action de 72°C.

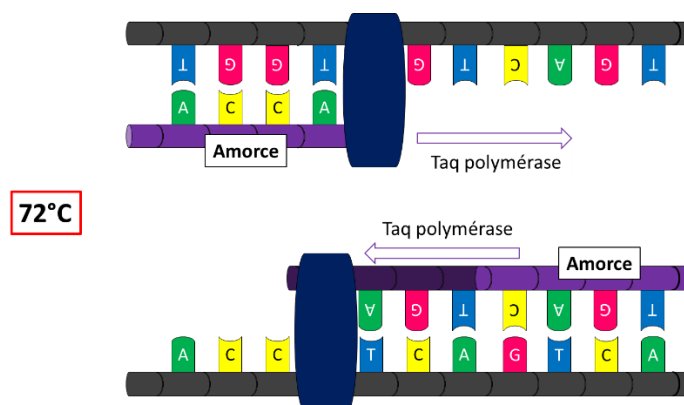


Figure 152 : Etape d'élongation par la Taq polymérase.

Toutes ces étapes, réalisées dans un thermocycleur, constituent un cycle. Le cycle suivant reprend la dénaturation, hybridation, élongation avec le double brin d'ADN nouvellement synthétisé. En théorie, à la fin de chaque cycle, la quantité d'ADN de départ est doublée.

L'intérêt de la PCR quantitative (qPCR) par rapport à la PCR classique est qu'il est possible de suivre précisément la quantité d'ADN produite tout au long de l'amplification. Pour cela, le thermocycleur est couplé à un spectrofluorimètre et un fluorophore est ajouté dans le milieu réactionnel. Les fluorophores les plus couramment utilisés sont des agents intercalant de l'ADN double-brin comme par exemple le SYBR-GREEN®. Ces agents se lient à chacun de ces doubles brins d'ADN et l'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à la quantité d'ADN synthétisée. L'étude de la courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles permet de déterminer la quantité initiale d'ADN cible dans l'échantillon. L'expression en conditions basales des gènes des MTs est normalisée à 1. La quantité de fragments d'ADN synthétisée obtenue dans les autres conditions est comparée à cette référence. Ainsi une valeur > 1 indique une augmentation de l'expression alors qu'une valeur < 1 indique sa diminution.

3.2 Evaluation de l'expression des métallothionéines par RT-qPCR

Pour évaluer la capacité du chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et des NLC chargées NLC-**SCO** à protéger les cellules du stress métallique induit par un excès de cuivre, les expériences de RT-qPCR ont été effectuées sur la lignée cellulaire HepG2/C3A uniquement. La quantification d'ARNm permet ici d'évaluer l'expression du gène codant pour une MT (MT1) et de comparer les effets de chélation du cuivre de ces systèmes moléculaires et nanoparticulaires avec les traitements en cours. Suite aux résultats précédents obtenus dans le cadre des tests de viabilité, nous avons choisi de ne pas

tester le chélateur lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** ainsi que les NLC-SS et de nous concentrer sur le chélateur NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et les particules NLC-SCO.

3.2.1. Expérimentation

L'analyse de l'expression de l'ARNm impliqué dans l'expression du gène codant pour les MTs par RT-qPCR est basée sur le protocole suivant. Les cellules HepG2/C3A sont incubées pendant 2h avec :

- Le dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** à 25 µM
- Les NLC chargées en NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** (NLC-SCO) à 25 µM correspondant à 0,8 mg/mL en lipides de NLC
- Ou les traitements en développement (TTM à 25 µM) ou de référence (D-Pen et trientine) aux concentrations utilisés dans le cadre de la maladie de Wilson (500 µM).

Le milieu cellulaire est ensuite éliminé et les cellules sont incubées pendant 6h dans un milieu contenant 50 µM de CuCl₂ afin d'initier un stress oxydant (Figure 153). Ceci permet de s'affranchir de la chélation extracellulaire et de mettre en évidence la chélation intracellulaire.

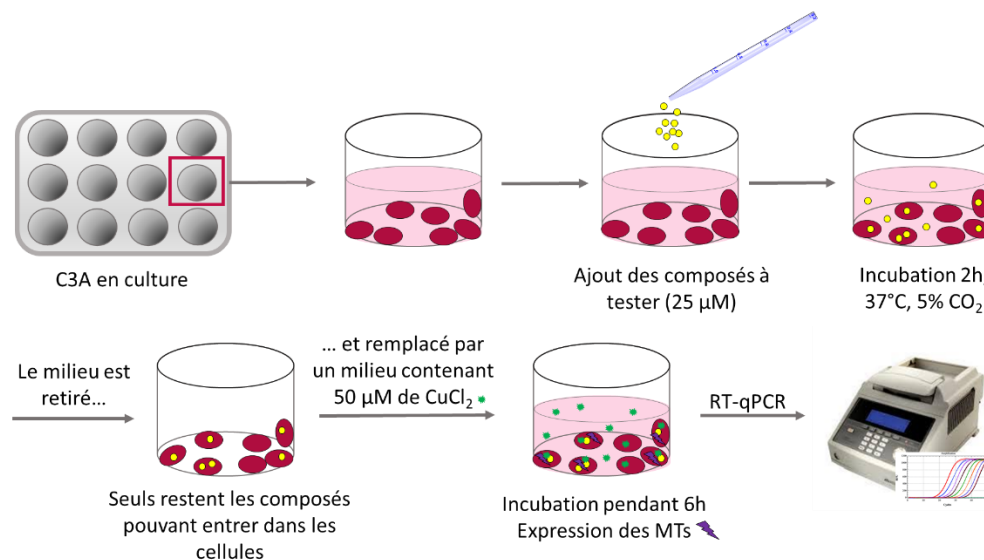


Figure 153 : Principe de l'expérience d'évaluation de l'expression des métallothionéines dans des cellules C3A en présence de cuivre.

Les résultats obtenus sont normalisés par rapport aux gènes de référence dont le taux d'expression ne varie pas entre les conditions d'étude.

3.2.2. Résultats

L'expression des métallothionéines évaluée par RT-qPCR pour le chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et les NLC chargées avec ce même chélateur (NLC-SCO) est présenté Figure 154. A titre de comparaison, les résultats obtenus avec les traitements de référence (D-Pen, Trientine et TTM) sont également reportés (Figure 154). Pour ces expériences, deux contrôles sont effectués. Le premier est un contrôle négatif : les cellules n'ont pas été en contact avec le cuivre, il s'agit ici de la représentation de l'expression normale des gènes et a été normalisée à 1. Le second est un contrôle positif : les cellules ont été incubées uniquement avec le cuivre. La valeur d'expression des gènes des MTs ont été déterminées en fonction du contrôle sans cuivre et est de 16,0. L'expression des gènes des MTs induite par une exposition à 50 μ M en cuivre est donc 16 fois supérieure à celle des cellules en conditions basales.

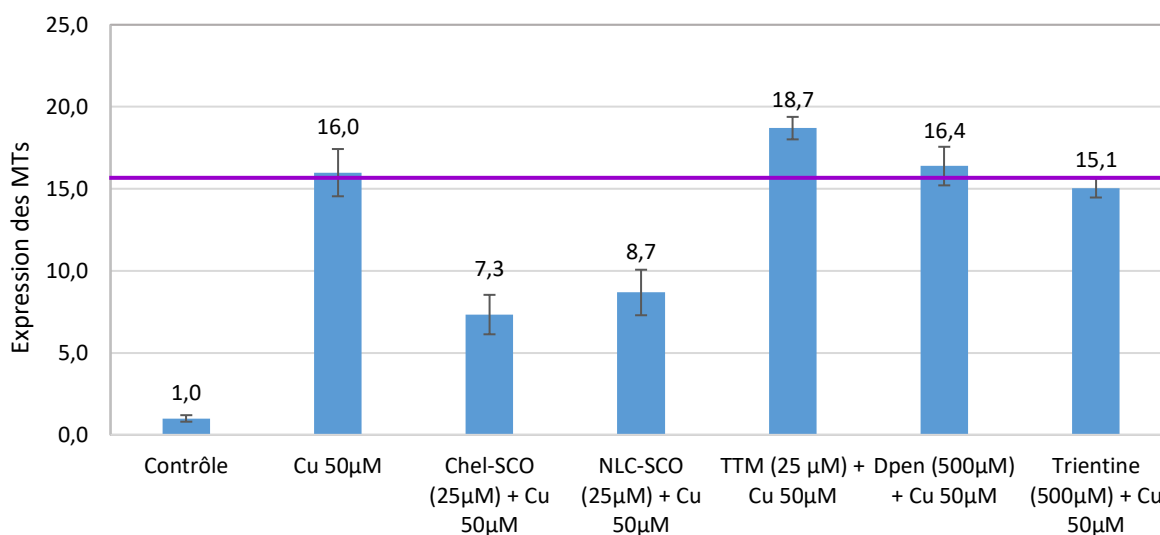


Figure 154 : Evaluation de l'expression des métallothionéines par RT-qPCR suite à l'incubation de dérivés lipophiles du chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** seul (25 μ M) ou encapsulé dans les NLC (25 μ M, 0,8 mg/mL en lipides), suivi de l'ajout de CuCl₂ (50 μ M) afin de générer un stress métallique.

Pour rappel, l'effet observé par RT-qPCR au niveau de l'expression des MTs est due uniquement à la fraction de composé ayant pu entrer à l'intérieur des cellules hépatiques (Figure 153). Une haute expression de la MT1 traduit un stress induit par le cuivre important, alors qu'une expression de la MT1 réduite reflète une diminution de ce stress. Autrement dit, un effet de chélation du cuivre intracellulaire conduira à une baisse de l'expression de la MT1.

Les résultats obtenus montrent que les traitements de référence : trientine, D-Pen et le TTM n'ont pas d'influence sur l'expression de la MT1. Ceci est vraisemblablement expliqué par leur faible propension à entrer dans les cellules hépatiques.

Au contraire, le chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et les nanoparticules chargées avec ce même chélateur (NLC-SCO) diminuent de manière significative l'expression des MTs ($7,3 \pm 1,2$ et $8,7 \pm 1,4$ respectivement) par rapport au contrôle positif ($16,0 \pm 1,4$).

3.3 Conclusion

Ces expériences confirment la capacité du chélateur lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et des nanoparticules chargées avec ce même chélateur à piéger le cuivre en excès et mettent en avant le caractère intracellulaire de cette chélation. Ces deux systèmes moléculaires et nanoparticulaires sont donc capables de pénétrer dans les cellules hépatiques et de libérer au sein de ces cellules un chélateur efficace du cuivre.

Discussion

Dans ce chapitre, nous avons montré que la modification du chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** par l'introduction de 3 chaînes octyles C₈H₁₇ sur les fonctions thiols du chélateur via un lien disulfure ou thioester, permet d'accéder à des composés suffisamment lipophiles pour être encapsulés de manière efficace dans les NLC. La quantification de ces dérivés par HPLC a permis d'évaluer les rendements d'encapsulation à 63 % pour le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et 46 % pour le NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**.

Les résultats de quantification ont permis de mesurer une petite perte de dérivé lipophile lors de la purification par dialyse (ex : pour le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13**, 11,3 mg avant dialyse et 8,5 mg après dialyse). Il est possible, à cause de la nature amphiphile des dérivés lipophiles (chélateur NTA(CysNH₂)₃ **12** hydrophile et chaînes C8 hydrophobes), que les molécules encapsulées se situent en partie au niveau des chaînes de phospholipides plutôt qu'au cœur des particules. Cette localisation pourrait alors entraîner l'expulsion d'une fraction des composés pendant l'étape de dialyse. Cependant, les quantifications effectuées afin d'évaluer la fuite pendant le stockage des NLC à 4°C n'ont pas montré de diminution de la quantité de dérivés lipophiles encapsulés pendant 2 semaines. Les nanoparticules et les pro-drogues encapsulées semblent donc stables pendant le stockage. Ces expériences seraient à compléter par des suivis de formulation sur de plus longues durées de stockage. Cependant, nous avons préféré concentrer nos efforts et les produits existants sur les tests biologiques.

Suite à la quantification de la drogue encapsulée, des études cellulaires ont été effectuées avec les NLC chargées NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**. Les dérivés lipophiles seuls, ainsi que les traitements en développement/actuels de la maladie de Wilson (TTM, trientine et D-Pen) ont également été testés afin de comparer les résultats obtenus avec les NLC.

Les mesures de viabilité cellulaire ont mis en évidence une toxicité accrue pour le dérivé lipophile NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** seul ainsi que les NLC-SS. La structure des deux dérivés lipophiles est très similaire, seul le lien entre le chélateur et les chaînes lipidiques est différent. La toxicité du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** étant modérée dans toutes les études cellulaires, il se pourrait que la cytotoxicité ne soit pas due au NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** directement, mais à ses produits de dégradation. En effet, dès les premières analyses (comme par exemple le chromatogramme Figure 136), il était présagé que cette molécule ne serait pas stable en milieu biologique. Le lien disulfure est connu pour subir des réactions de substitution avec les molécules soufrées présentes dans le milieu de culture ou la circulation sanguine. Il semble donc que le NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15** se dégrade et

génère des espèces chimiques cytotoxiques. Pour l'ensemble de ces raisons, cette molécule n'a pas été utilisée pour les tests de RT-qPCR.

En revanche, les mesures de viabilité cellulaire ont mis en évidence un effet protecteur du dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** pour les cellules vis-à-vis du cuivre, significativement plus grand (DL50 773 ± 61 µM) que sa version encapsulée dans les NLC (NLC-SCO, DL50 503 ± 40 µM) pour des concentrations identiques en chélateur (25 µM). Plusieurs hypothèses concernant cette différence peuvent être émises.

Tout d'abord, il peut y avoir un effet synergique entre la toxicité générée par les NLC et le stress induit par le cuivre. Il y aurait alors une balance entre l'effet protecteur du chélateur de cuivre et la mort des cellules due à une trop grande toxicité des NLC. Cependant, les valeurs de DL50 du contrôle (cellules seules + cuivre) de 438 ± 26 µM en CuCl₂ et celle des NLC seules de 403 ± 45 µM ne sont pas significativement différentes. L'écart observé entre les NLC-SCO et le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** seul ne peut donc pas s'expliquer par la toxicité des NLC seules.

Il se peut également que le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** entre plus facilement dans les cellules hépatiques grâce à ses chaînes lipidiques. Une plus grande quantité de chélateur se retrouve donc en intracellulaire et chélate une plus grande quantité de cuivre.

Enfin, il est possible que la totalité du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** encapsulé dans les NLC, n'ait pas été totalement libérée au moment de la mesure de viabilité (24h). Ces nanoparticules sont connues et utilisées pour leur capacité à libérer la drogue lentement, il n'est donc pas rare qu'à 24h, la totalité de la drogue n'ait pas été relarguée. C'est le cas par exemple de NLC chargés en paclitaxel (PTX) développées par Shao et al.²⁶⁹ et fonctionnalisées par la transferrine (Tf). Des profils de libération de la drogue ont été établis *in vitro* pour les différentes nanoparticules testées et sont présentés Figure 155 avec le Taxol en comparaison.

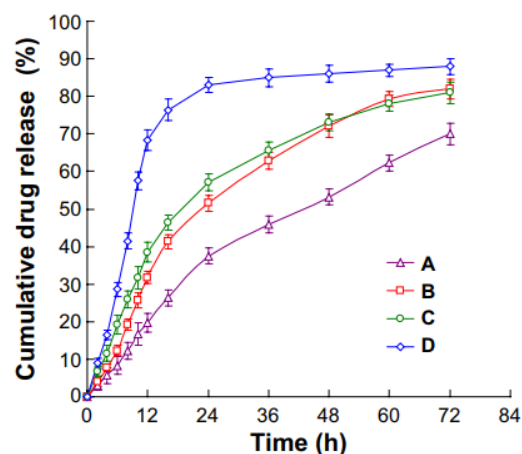


Figure 155 : Profil de libération de paclitaxel (PTX) *in vitro* de différentes formulations de NLC. Profils de (A) Tf_{10k}-PTX-DNA-NLC, (B) Tf_{5k}-PTXDNA-NLC, (C) PTX-DNA-NLC, et (D) Taxol®.²⁶⁹

Pour les formulations de NLC-PTX (courbes A, B et C), la totalité de la drogue n'a pas été libérée, même au temps maximal de 72h. A 24h, temps utilisé pour effectuer les analyses de viabilité cellulaire sur les NLC, seulement 40 – 60 % du paclitaxel a été libéré. La différence d'efficacité entre le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et les NLC-SCO pourrait donc s'expliquer par la libération lente du chélateur de cuivre. Il serait alors intéressant de refaire ces différents tests à des temps plus longs (48h – 72h). Les NLC-SCO ont donc montré leur capacité à entrer dans les cellules hépatiques et libérer un chélateur de cuivre en intracellulaire. Il serait donc intéressant d'effectuer ces mêmes études sur le petit animal. Le dérivé lipophile NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** pourrait alors être rapidement dégradé ou ne pas atteindre sa cible hépatique en forte concentration. Les NLC-SCO pourraient en revanche démontrer leur grande capacité d'accumulation dans le foie et les effets de la libération contrôlée pourraient être observés.

Conclusion & Perspectives

Les dérivés lipophiles, synthétisés à partir du chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** par ajout de chaînes lipidiques C₈H₁₇, ont été encapsulés avec succès dans les NLC, avec des rendements d'encapsulation de 63 % pour le NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** et 46 % pour le NTA(Cys(SC₈H₁₇)NH₂)₃ **15**. Les quantités de dérivés lipophiles encapsulés représentent respectivement 2,5 % et 1,7 % par rapport à la quantité totale en lipides pour les NLC-**SCO** et NLC-**SS**. La quantité de drogue encapsulée dans les NLC dépasse rarement les 1-2 %, ces résultats sont donc excellents et pourraient encore être améliorés. Pour cela, des essais de formulation introduisant des quantités plus grandes en dérivés lipophiles seront effectués afin d'établir une limite maximale de chargement. De plus, il peut être intéressant de greffer sur le chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** différents types de chaînes lipidiques (chaîne stéarate C₁₆H₃₃ par exemple) afin d'augmenter la lipophilie du dérivé lipophile et augmenter encore les rendements d'encapsulation.

Les tests au niveau cellulaire effectués sur cellules hépatiques C3A ont montré la capacité du NTA(Cys(COC₈H₁₇)NH₂)₃ **13** à entrer dans ces cellules et diminuer la toxicité induite par le cuivre. Les résultats cellulaires des NLC-**SCO**, plus mitigés en termes d'effet protecteur contre le cuivre, ont quant à eux montré un effet sur l'expression des métallothionéines par RT-qPCR. Les NLC-**SCO** sont en effet capables d'être internalisées dans les cellules hépatiques et d'agir au niveau de l'expression des métallothionéines. Il serait intéressant de reproduire ces expériences de RT-qPCR sur cellules C8, ne possédant pas le gène *atp7b*.

De plus, des études sur le petit animal permettraient également d'apprécier plus justement la capacité des NLC à franchir les différentes barrières biologiques et à s'accumuler dans le foie pour y délivrer leur charge en chélateur.

Ch IV. Conclusion générale

Durant ce projet de thèse, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées dans le cadre de la maladie de Wilson. Cette maladie génétique, se traduisant par une accumulation toxique de cuivre dans le foie et le cerveau, ne bénéficie pas à l'heure actuelle de traitements complètement satisfaisants pour les patients. En effet, la thérapie est généralement basée sur l'administration de chélateurs de cuivres. Malheureusement, ces traitements sont peu efficaces, peu sélectifs et entraînent de nombreux effets secondaires.

Afin de lutter contre le stress métallique induit par ces excès en cuivre, un chélateur de cuivre, efficace et sélectif, a précédemment été développé au laboratoire SyMMES. La fonctionnalisation de ce chélateur par des motifs de ciblage GalNAc afin de le vectoriser vers le foie a permis la chélation efficace du cuivre intracellulaire en excès. Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques (accumulation et libération contrôlée), une stratégie similaire a été développée au cours de cette thèse en transposant cette approche moléculaire à des nanoparticules lipidiques.

La vectorisation de principes actifs connus, par l'intermédiaire des nanoparticules lipidiques, est en essor constant à travers la nanomédecine. Dans ce contexte, des transporteurs lipidiques nanostructurés ont été fonctionnalisés par des motifs de ciblage GalNAc afin de vectoriser les nanoparticules vers le foie. Le chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃, modifié par des chaînes alkyles pour le rendre lipophile, a ensuite été encapsulé dans les NLC. Cette stratégie, en vue de la délivrance ciblée de chélateur de cuivre vers le foie, a été appréhendée selon deux axes :

- d'une part l'internalisation de NLC décorées par des motifs de ciblage GalNAc
- et d'autre part l'aptitude de NLC chargées par une version lipophile du chélateur de cuivre NTA(CysNH₂)₃ **12** à délivrer ce chélateur dans les cellules hépatiques et piéger le cuivre intracellulaire en excès.

Cette stratégie ainsi que les challenges de ce projet sont présentés Figure 156.

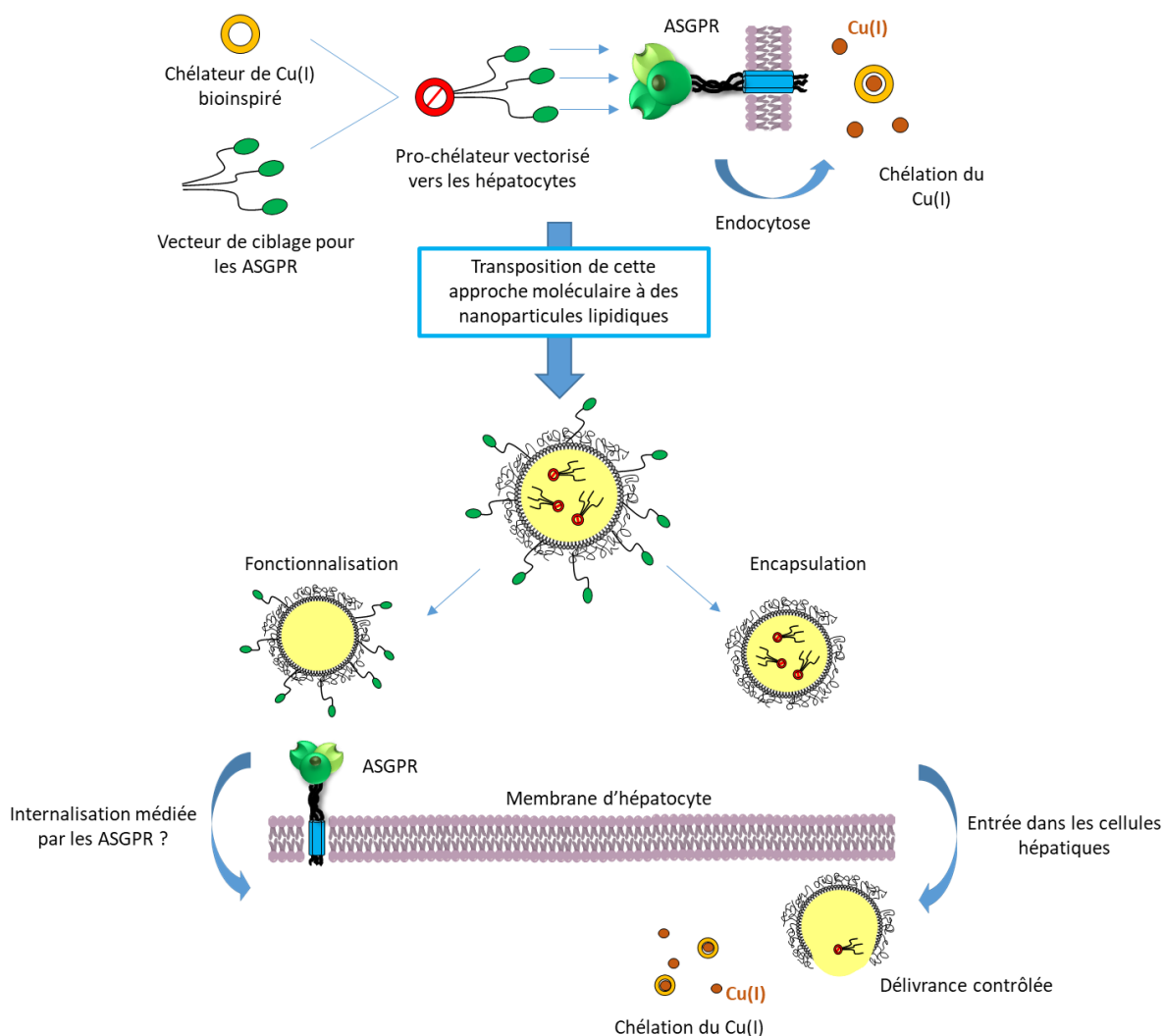


Figure 156 : Stratégie de vectorisation d'un chélateur de cuivre vers les hépatocytes par une approche nanoparticulaire. Etapes de conception de nanoparticules lipidiques vectorisées pour le ciblage des ASGPR et de nanoparticules chargées en dérivé lipophile d'un chélateur efficace du cuivre.

La stratégie envisagée dans le cadre de cette thèse pour cibler les cellules hépatiques est d'utiliser les récepteurs aux asialoglycoprotéines ASGPR, quasi-exclusivement et abondamment exprimés à la surface de ces cellules. Ces récepteurs reconnaissent les résidus glycosidiques en particulier le galactose et la N-acétylgalactosamine avec une nette préférence pour cette dernière. L'affinité peut être grandement améliorée (de 100 à 1000 fois à chaque sucre supplémentaire) par des interactions multivalentes. Plusieurs paramètres structuraux tels que la nature, le nombre et l'organisation spatiale du monosaccharide, jouent un rôle clé dans le processus de reconnaissance par l'ASGPR. Dans les systèmes moléculaires, une reconnaissance optimale est obtenue lorsque les monosaccharides sont espacés d'environ 20 Å. La fonctionnalisation des NLC par les motifs de ciblage GalNAc conçu au cours de ce projet devait donc répondre à différents critères pour envisager une internalisation spécifique médié par les ASGPR, à savoir :

- Une densité de surface suffisante et une géométrie adaptée pour mimer la multivalence efficace pour la reconnaissance par le récepteur
- L'accessibilité des motifs de ciblage GalNAc à la surface des NLC

Lors de ce travail de thèse, des nanoparticules lipidiques de 50 nm décorées par différentes quantités de motifs ciblant GalNAc ont été formulées. La quantification précise par une méthode UPLC-ELSD de ces motifs, réalisée pour la première fois sur de tels nano-objets, nous a permis d'accéder à des densités de surface comprise entre 136 et 650 motifs par particule. Des études sur des cellules hépatiques par cytométrie en flux ont ensuite permis d'évaluer la capacité de ces nanoparticules NLC-GalNAc à entrer dans ces cellules hépatiques et être reconnues par les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR). Cette technique a permis de mettre en évidence une excellente internalisation des NLC dans les cellules hépatiques. Ces nanoparticules, indépendamment de leur densité de surface en GalNAc, entrent de manière efficace dans les hépatocytes, probablement via un mécanisme médié par un récepteur. Il est ici supposé que la nature lipidique de ces nanoparticules leur permet d'être internalisées par des récepteurs spécifiques des lipoprotéines. Seule la formulation possédant la plus grande densité de surface en GalNAc (23,3 %) a révélé un effet significatif de la présence des motifs GalNAc sur l'internalisation dans les HepG2. De plus, des expériences réalisées par résonance plasmonique de surface (SPR) tendent à montrer que les motifs GalNAc sont suffisamment accessibles pour être reconnus par la lectine MGL, qui reconnaît spécifiquement les motifs GalNAc. Cependant, cette interaction n'est visible qu'à forte concentration en particules.

Ces résultats suggèrent un mécanisme d'internalisation différent pour les NLC contenant la plus grande densité de surface en GalNAc, qui pourrait être médié par les ASGPR. Cependant l'internalisation médiée par les AGPR est dépendante de nombreux paramètres structuraux et la densité en ligand, seule, ne suffit pas pour comparer différents systèmes complexes telles que des nanoparticules. Il est donc difficile de tirer de plus amples conclusions sur le mécanisme d'entrée dans les cellules de ces NLC.

D'autres questions sur le comportement *in cellulo* de ces NLC restent encore en suspens et mériteraient d'être approfondies :

- Quels récepteurs sont impliqués dans l'internalisation des NLC contenant les plus faibles densités de surface en GalNAc ?
- Quel est le devenir de ces NLC après leur entrée dans les cellules ? Quelle est l'influence du mécanisme mis en jeu ?

Des études de microscopie confocale ont permis de visualiser et localiser les NLC dans des vésicules au sein du cytoplasme. Cependant nous ne possédons actuellement pas d'informations complémentaires concernant la localisation effective de ces nanoparticules à l'intérieur des cellules hépatiques.

Ce travail a permis de mettre en avant que la présence des motifs de ciblage GalNAc influence le mécanisme d'entrée de ces NLC, probablement via les ASGPR mais que de nombreux paramètres sont à prendre en compte pour la vectorisation efficace et spécifique. Comme l'augmentation de la densité de surface en GalNAc de ces NLC tend à limiter leur stabilité, une manière d'optimiser l'internalisation médiée les ASGPR, pourrait être de concevoir des systèmes possédant une meilleure organisation spatiale des sucres pour induire des interactions multivalentes. Cela peut être obtenu en utilisant un surfactant portant un motif triantennique à base de GalNAc possédant une géométrie adaptée comme cela a été discuté dans la discussion précédente (Cf Ch II Discussion générale).

De par leur nature nanométrique et lipidique, les NLC entrent efficacement dans les cellules hépatiques. La propension de ces nanoparticules à délivrer le chélateur à l'intérieur de ces cellules et piéger le cuivre en excès a donc été évaluée sur des NLC de 50 nm non fonctionnalisés chargés en dérivés lipophiles du chélateur NTA(CysNH₂)₃. Ces dérivés lipophiles, obtenus par ajout de chaînes alkyles ont été encapsulés avec succès dans les NLC avec des taux de chargement de l'ordre de 2 % (par rapport à la quantité totale en lipide). Les NLC résultant de cette encapsulation sont stables dans le temps. Ces résultats déjà encourageants pourront par la suite être améliorés en établissant une limite maximale de chargement et/ou en faisant varier la longueur des chaînes lipidiques utilisées. Les tests cellulaires de protection des cellules face à un stress métallique induit par une forte concentration en cuivre et d'expression des métallothionéines ont mis en avant l'intérêt du dérivé lipophile possédant un lien thioester encapsulé dans les NLC. Ces nanoparticules lipidiques sont capables d'entrer dans les cellules hépatiques et de libérer le chélateur de cuivre en intracellulaire NTA(CysNH₂)₃. Il serait donc intéressant d'aller plus loin dans cette étude en optimisant le chargement de ces NLC. De plus, des études sur le petit animal permettraient également d'apprécier plus justement l'effet protecteur de ces NLC pour lutter contre les surcharges hépatiques en cuivre.

Enfin, l'objectif ultime sera de combiner les deux stratégies innovantes initiées lors de ce projet de thèse pour répondre aux besoins thérapeutiques concernant la maladie de Wilson et ouvrir de nouveaux champs d'investigations dans le domaine de la nanomédecine dédiés à d'autres pathologies. Ainsi des approches similaires pourraient être envisagées pour la vectorisation de médicaments déjà connus vers le foie afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et également la délivrance des chélateurs du cuivre vers le cerveau afin de traiter les atteintes neurologiques liées à la maladie de Wilson mais également dans le cas des maladies neurodégénératives.

Partie expérimentale

Synthèse organique

1. Informations générales

Solvents and reagents were purchased from Sigma Aldrich, Acros, Alfa Aesar, Carlo Erba, Fluka, and VWR, and were used without further purification unless specified.

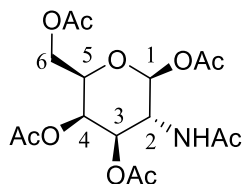
All water solutions were prepared from ultra-pure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore Milli-Q cartridge system (resistivity 18.2 MΩ.cm at 25 °C).

BocNH-PEG₁₀₀-NH₂ was purchased from Iris Biotech.

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on Silica gel 60 plates, coated with fluorescent indicator F254 from Merck Millipore. The detection was done under UV light, at 254 or 365 nm, KMnO₄ solution, 10 % H₂SO₄ solution in ethanol or 1 % ninhydrin solution in ethanol. Organic compounds were purified when specified on a silica gel column with silica gel Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, Merck).

Analytical HPLC were performed with a VWR system fitted with a Chromolith RP18e column (L = 100 mm, Ø = 4.6 mm), with flow rates of 1 mL/min. Preparative HPLC were performed with a VWR system fitted with Chromolith RP18e column (L = 100 mm, Ø = 25 mm) with flow rates of 30 mL/min. Used solvents were water, acetonitrile, and solvents A and B (A : H₂O / 0.01 % TFA ; B : CH₃CN / 0.01 % TFA / 10 % H₂O). Samples were filtered before injection on 13 mm syringe filters (w/ 0.45 µm PTFE) from VWR international.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer. Chemical shifts (δ) were reported in ppm with the solvent as the internal reference, except for ¹³C NMR spectra in D₂O, which were referenced to external DSS. Mass spectra were acquired with a Finigan LXQ-linear ion trap (THERMO Scientific, San Jose, USA) equipped with an electrospray source.

2. Synthèse du surfactant PEGylé SA-PEG₁₀₀-GalNAc 10**Compound 1**

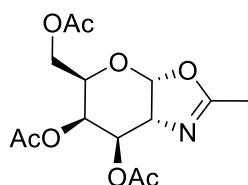
C₁₆H₂₃NO₁₀
MW: 389.36

per-Ac-Gal

To a solution of commercial N-acetyl-D-Galactosamine (4.00 g, 18.1 mmol) in acetic anhydride (15 mL, 157 mmol, 8.7 eq.) under inert atmosphere, pyridine (25 mL, 325 mmol, 18 eq.) was added. The reaction was stirred for 12 hours at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate). Then, the reaction mixture was poured into ice water (200 mL), and this mixture was extracted twice with CH₂Cl₂ (200 mL). The organic fraction was washed with brine (2 × 150 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude compound **1** (6.35 g, 90 %, R_f = 0.6) as an orange oil was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.22 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1); 5.43 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.37 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH); 5.23 (dd, J = 3.2 and 11.5 Hz, 1H, H-3); 4.74 (ddd, J = 3.6 Hz, 9.2 Hz and 11.5 Hz, 1H, H-2); 4.21-4.23 (m, 1H, H-5); 4.07, 4.12 (ABX, J_{BX} = 6.6 Hz, J_{AX} = 6.9 Hz, J_{AB} = 11.2 Hz, 2H, H-6); 2.18 (s, 6H, 2×COCH₃); 2.04 (s, 6H, 2×COCH₃); 1.95 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 171.53 (CO); 170.68 (CO); 170.522 (CO); 170.30 (CO); 169.07 (CO); 91.69 (C-1); 68.87 (C-5); 68.15 (C-3); 67.01 (C-4); 61.60 (C-6); 47.33 (C-2); 23.53 (CH₃); 21.28 (2×CH₃); 21.00 (2×CH₃).

Compound 2

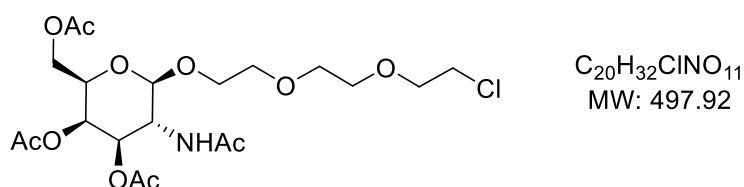
C₁₄H₁₉NO₈
MW: 329.31

To a solution of compound **1** (7.00 g, 18.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (150 mL) under argon, TMSOTf (9.5 mL, 52.2 mmol, 2.9 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at 45° C and monitored by TLC (SiO₂, CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, v/v). Then at 0°C, Et₃N (13.1 mL, 94 mmol, 5.2 eq.) was slowly added. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (250 mL) and washed with saturated

aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 3 × 150 mL) and brine (2 × 150 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated concentrated under vacuum. The crude product **2** (6.00 g, Qtt) was used without purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 5.99 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-1); 5.46 (t, J = 3.0 Hz, 1H, H-4); 4.91 (dd, J = 3.3 and 7.4 Hz, 1H, H-3); 4.23-4.27 (m, 1H, H-5); 4.11 and 4.20 (ABX, JAX = 5.8 Hz, JBX = 7.0 Hz, JAB = 11.2 Hz, 2H, H-6); 3.98-4.02 (m, 1H, H-2); 2.12 (s, 3H, CH₃); 2.07 (s, 6H, 2×CH₃); 2.06 (s, 3H, CH₃).

Compound 3

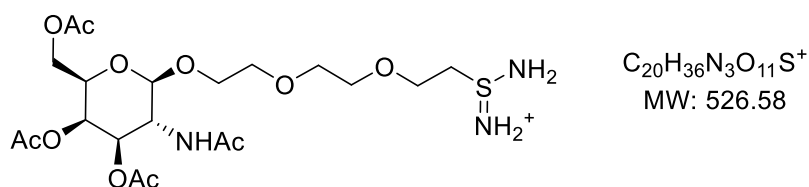


To a solution of the crude product **2** (18.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (100 mL), molecular sieves 4 Å and 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (4.5 ml, 30.6 mmol, 1.7 eq.) were added under argon. The reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Then, TMSOTf (2 ml, 10.9 mmol, 0.6 eq.) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature and monitored by TLC (SiO₂, ethyl acetate/EtOH/AcOH, 8/0.2/0.2, v/v/v). Then, at 0°C, Et₃N (2 mL, 14.4 mmol, 0.8 eq.) was added. The mixture was filtered, diluted in CH₂Cl₂ (200 mL) and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (until basic pH, 2 × 150 mL) and brine (3 × 150 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate/AcOH/EtOH: 8/0.2/0.2) to give the compound **3** (4.50 g, 50 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 6.22 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NH); 5.30-5.33 (d broad, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 5.00 (dd, J = 3.4 and 11.2 Hz, 1H, H-3); 4.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-1); 4.24-4.34 (m, 1H, H-2); 4.12 and 4.19 (ABX, JAX = 6.5 Hz, JBX = 6.9 Hz, JAB = 11.2 Hz, 2H, H-6); 3.63-3.91 (m, 13H, 6×CH₂ and H-5); 2.16 (s, 3H, COCH₃); 2.05 (s, 6H, 2×COCH₃); 1.99 (s, 3H, NHCOCH₃).

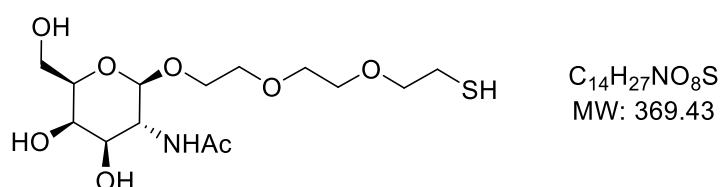
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 171.01, 170.91, 170.85, 170.76 (4×CO); 102.80 (C1); 72.25, 71.69, 71.45, 70.04, 70.97, 70.66 (4×CH₂, C3 and C5); 68.00 (CH₂); 67.05 (C4); 61.96 (C6); 50.93 (CH, C2); 43.28 (CH₂Cl); 23.70 (3×COCH₃); 21.02 (NHCOCH₃).

ES-MS: calculated mass = 497.17; found m/z = 520.3 [M+Na]⁺

Compound 4

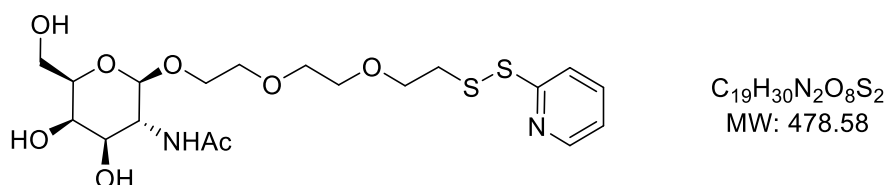
To a solution of **3** (1.55 g, 3.11 mmol) in degased water (25 mL), thiourea (0.521 g, 6.85 mmol, 2.2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 24h at reflux (110°C) under argon and then directly engaged in the following step of the synthesis.

1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K, portion of reaction mixture): δ ppm = 5.35 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4); 5.05 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-3); 4.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-1); 3.98-4.28 (m, 4H, $2 \times CH_2$, H-5, H-6, H-2); 3.92 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2O); 3.72-3.82 (m, 8H $4 \times CH_2$); 3.31 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2S); 2.17 (s, 3H, $COCH_3$); 2.05 (s, 3H, $COCH_3$); 1.97 (s, 3H, $COCH_3$); 1.94 (s, 3H, $COCH_3$).

Compound 5

After dilution of the previous mixture (compound **4**) (3.11 mmol) in degased MeOH (50 mL), NaOH (1M) was added until pH 9.6 under argon. The reaction was stirred at 85°C for 7 hours. To maintain a pH at 9.6 during the reaction, an electrode was used (reference: Ag/AgCl in KCl 3 mol.L⁻¹). The pH was controlled every 2 hours at room temperature and NaOH (1M) was added if pH < 9.6. Then, the pH was adjusted at 7 by adding HCl (1M) and the reaction mixture was concentrated under vacuum. Crude product **5** (1.14 g, Qtt) was used without further purification.

1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K) : δ ppm = 4.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1); 3.96-4.00 (m, 1H, H-5); 3.96 (d, $J = 3.2$, 1H, H-4); 3.68-3.87 (m, 14H, $5 \times CH_2$, H-2, H-3, H-6,); 2.77 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2-SH); 2.07 (s, 3H, $NHCOCH_3$).

Compound 6

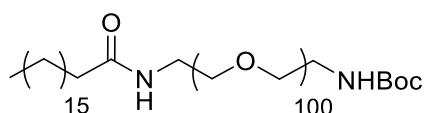
To a solution of product **5** (3.11 mmol) in degassed MeOH (30 mL), aldrithiol (1.36 g, 6.17 mmol, 2 eq.) was added. The reaction was stirred for 4 hours at room temperature under argon and was monitored by analytical RP-HPLC (gradient water/acetonitrile : 100/0 for 6 min and from 100/0 to 50/50 in 16 min and 5 min at 50/50; Rt = 16.2 min). After completion of the reaction, the mixture was concentrated under vacuum and purified on RP-HPLC. Product **6** was obtained as a white solid (0.283 g, 19 % over 3 steps) after lyophilisation. This product is sensitive to oxygen.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.40-8.44 (m, 1H, CH, H_{pyr}); 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH, H_{pyr}); 7.86 (td, J = 1.8 Hz and 7.4 Hz, 1H, CH H_{pyr}); 7.25 (ddd, J = 0.8 Hz, 4.8 Hz and 7.2 Hz, 1H, CH, H_{pyr}); 4.46 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1); 3.90-3.97 (m, 1H, H-3); 3.81 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4); 3.70-3.76 (m, 5H, H-2, 2×CH₂); 3.72 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂O); 3.58-3.65 (m, 4H, 2×CH₂); 3.53- 3.57 (m, 2H, H-6); 3.48 (ddd, J = 1.2 Hz, 5.2Hz and 6.4 Hz, 1H, H-5); 3.02 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂SS); 1.97 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K) : δ ppm = 175.49 (CONH); 163.10 (C_{pyr}); 140.83, 123.74, 123.59, 122.56 (4×CH_{pyr}); 104.50 (CH, C-1); 78.12, 74.94, 72.97, 72.78, 71.11, 71.02, 63.88 (C-3, C-4, C-5, C-6 5×OCH₂); 55.68 (C-2); 41.20 (CH₂SS); 24.43 (CH₃).

ES-MS: calculated mass: 478.12; found m/z: 479.2 [M+H]⁺; 501.3 [M+Na]⁺; 517.3 [M+K]⁺; 276.2

Analytical RP-HPLC: purity = 99 %, Rt = 16.2 min

Compound 7

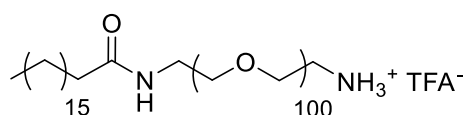
SA-PEG₁₀₀-NHBoc

To a solution of stearic acid (0.566 g, 2 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP; 0.9 g, 1.7 mmol) was added. After complete dissolution, commercially available BocNH-PEG₁₀₀-NH₂ **1** (2.48 g, 0.51 mmol) and N,N-Diisopropylethylamine (DIEA; 445 mg, 3.4 mmol) were added. After stirring for 2 hours at room temperature, the resulting mixture was concentrated under reduced pressure. Precipitation was

obtained upon addition of cold diethyl ether. The precipitate was filtered, dissolved in water and purified by dialysis for 48 hours versus large volume of water (MW cut-off 1 kDa). After lyophilisation, SA-PEG₁₀₀-NHBoc **7** was obtained as a white powder (2.2 g, 0.43 mmol, 85 % yield).

¹H NMR (300 MHz ; CDCl₃) - δ: 0.87 (t, J = 7.2 Hz ; 3H), 1.13 – 1.36 (m, 28H), 1.44 (s, 9H), 1.60 (quint, J = 15.1, 7.6 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.30 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.48-3.80 (m, 360H), 3.87 (t, J=5.0 Hz, 2H), 7.79 (bs, 1H)

Compound 8

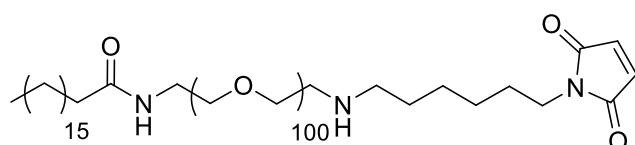


SA-PEG₁₀₀-NH₃⁺ TFA⁻

To a solution of SA-PEG₁₀₀-NHBoc **7** (2.2 g, 0.43 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL), trifluoroacetic acid (TFA ; 22.3 g, 195 mmol) was added. After stirring for 1 hour at room temperature, the resulting mixture was concentrated under reduced pressure and precipitation was obtained upon addition of cold diethyl ether. The precipitate was filtered, dissolved in water, and purified by dialysis (MW cut-off 1 kDa) for 48 hours versus large volume of water (Mw cut-off 1 kDa). After lyophilisation, SA-PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ **8** was obtained as a white powder (1.9 g, 0.37 mmol, 86 % yield).

¹H NMR (400 MHz ; CDCl₃) - δ: 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.13 – 1.36 (m, 28H), 1.60 (quint, J = 15.1, 7.6 Hz, 2H), 2.15 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.17 (bt, 2H), 3.4 (m, 4H), 3.48-3.80 (m, 360H), 3.87 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 6.14 (bs, 1H), 7.90 (bs, 2H)

Compound 9



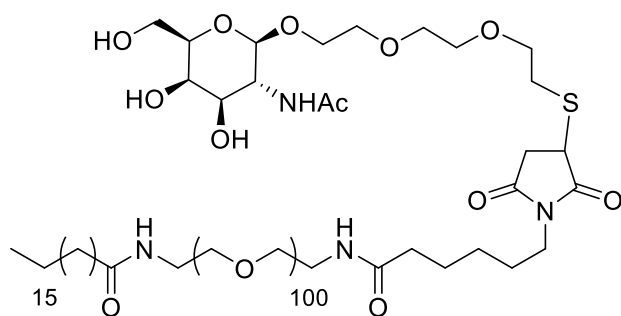
SA-PEG₁₀₀-Maleimide

To a solution of 6-maleimidohexanoic acid (0.16 g, 0.74 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL), PyBOP (0.42 g, 0.81 mmol) was added. After stirring for 10 min under argon atmosphere, SA-PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ **8** (1.9 g, 0.37 mmol) and DIEA (0.11 g, 0.81 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 1 hour. The resulting mixture was concentrated under reduced pressure and precipitation was obtained upon

addition of cold diethyl ether. SA-PEG₁₀₀-maleimide **9** was obtained as a white powder (97.6 mg, 0.02 mmol, 94 % yield)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) - δ: 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 1.13 – 1.36 (m, 28H), 1.62 (qd, J = 15.1, 7.6 Hz, 6H), 1.80 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.15 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 3.04 – 3.21 (m, 4H), 3.40 – 3.48 (m, 5H), 3.50 – 3.75 (m, 360H), 3.81 (t, J = 5.6 Hz 3H), 6.14 (s, 1H), 6.68 (s, 2H)

Compound 10



SA-PEG₁₀₀-GalNAc

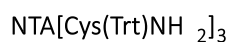
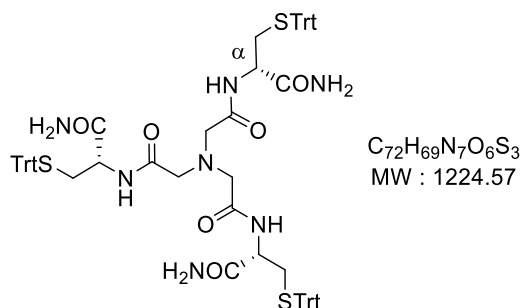
To a solution of SA-PEG₁₀₀-maleimide **9** (97.6 mg, 0.02 mmol) and TCEP (23.5 mg, 0.1 mmol) in CH₃CN (3 mL), a solution of GalNAc-SSPy derivative **6** (18 mg, 0.04 mmol) in H₂O (0.5 mL) was added dropwise under argon atmosphere. The resulting yellow solution was stirred at room temperature for 5 hours. The mixture was concentrated under reduced pressure and purified by dialysis (MW cut-off 1 kDa) for 48h versus large volume of water. After lyophilisation, SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** was obtained as a white powder (87.2 mg, 0.016 mmol, 87 % yield).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 0.82 (t, J = 6.4 Hz, 3H), 1.21 (s, 28H), 1.42 – 1.61 (m, 5H), 2.08 – 2.20 (m, 3H), 2.38 (dd, J = 17.4, 9.3 Hz, 1H), 2.43 – 2.55 (m, 4H), 2.56 – 2.68 (m, 4H), 3.12 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.19 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 3.30 (t, J = 5.4 Hz, 3H), 3.41 – 3.47 (m, 3H), 3.50 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.52 – 3.56 (m, 2H), 3.62 (s, 360H), 3.80 (dd, J = 5.4, 3.5 Hz, 3H), 4.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H)

3. Synthèse des dérivés lipophiles

NTA(CysNH₂)₃ **12** was obtained according to already published procedure.⁹³

Compound 11

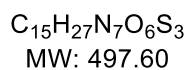
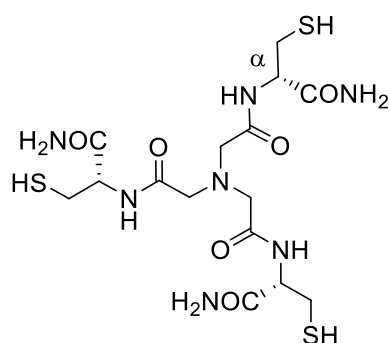


To a suspension of commercial nitrilotriacetic acid (NTA; 0.351 g, 1.84 mmol) in acetonitrile (50 mL), EDCI.HCl (1.10 g, 5.70 mmol, 3.1 eq.), HOBt (0.770 g, 5.70 mmol, 3.1 eq.) and commercial Cys(Trt)-NH₂ (2.0 g, 5.52 mmol, 3 eq.) were added. After stirring for 2 days at room temperature under argon, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (300 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 × 150 mL) and brine (1 × 150 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Crude product (m = 3.5 g) was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOH, 98/2, v/v) to afford the compound **11** as a white solid (1.39 g, 61 %).

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz, 298 K): δ ppm = 7.85 (d, J = 7.2 Hz, 3H, 3xNH); 7.16-7.32 (m, 45H, 3xSC(C₆H₅)₃); 6.24 (s, 3H, 3xNH₂); 5.70 (s, 3H, 3xNH₂); 4.00-4.06 (m, 3H, 3xCH_α); 3.14 and 3.19 (AB, J_{AB} = 16.4 Hz, 6H, 3xCH₂CO); 2.37-2.44 (m, 6H, 3xCH₂S).

¹³C NMR (CD₃CN, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 176.15 and 178.074 (6×CO); 150.03 (3×C(C₆H₅)₃); 132.37, 133.56, 134.89 (3×C(C₆H₅)₃); 63.18 (3×CH₂CO); 57.78 (3×CH); 38.89 (3×CH₂SH).

ES-MS: calculated mass: 1223.45; found m/z: 1223.8 [M+H]⁺

Compound 12

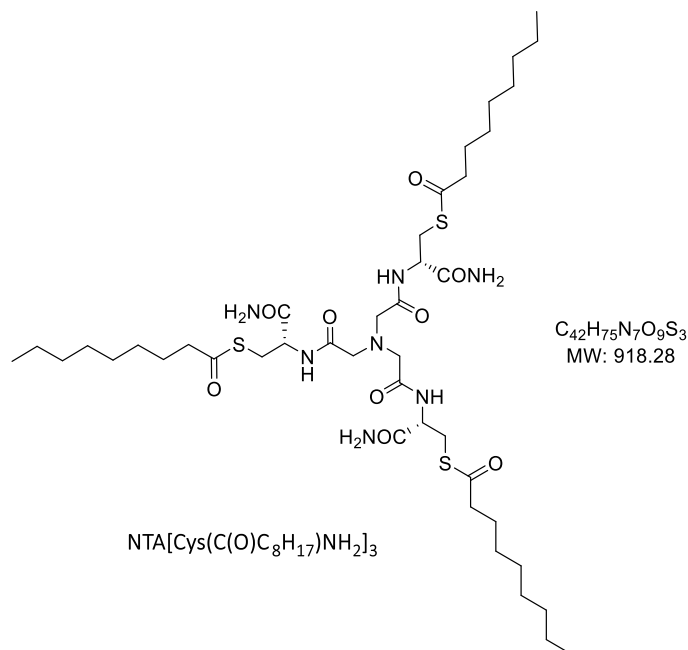
To a solution of compound **11** (0.970 g, 0.792 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL), TFA (3.0 mL, 39.6 mmol, 50 eq.) and triethylsilane (1.15 mL, 7.21 mmol, 9.1 eq.) were added. After stirring 2 hours at room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The resulting crude product was purified by preparative RP-HPLC (gradient A/B from 95/5 to 80/20 in 15 min and 5 min at 80/20) followed by lyophilisation to yield the compound **12** (0.322 g, 82 %) as a white solid.

^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 4.57 (dd, $J = 5.2$ Hz and 7.6 Hz, 3H, $3\times\text{CH}_\alpha$); 3.57 (s, 6H, $6\times\text{CH}_2\text{CO}$); 2.80 and 3.01 (ABX, $J_{\text{AX}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{BX}} = 7.6$ Hz, $J_{\text{AB}} = 14.3$ Hz, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{SH}$).

^{13}C NMR (CD_3CN , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 175.98 and 177.04 ($6\times\text{CO}$); 60.85 ($3\times\text{CH}_2\text{CO}$); 57.93 ($3\times\text{CH}$); 28.18 ($3\times\text{CH}_2\text{SH}$).

Analytical RP-HPLC: purity = 97 %, $R_t = 6.7$ min

ES-MS: calculated mass: 497.12; found m/z : 498.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 520.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound 13

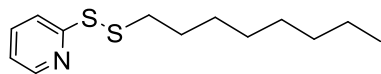
To a solution of nonanoic acid (0.318 g, 2.01 mmol, 5 eq.) in CH_2Cl_2 (40mL), triethylamine (0.56 mL, 4.02 mmol, 10 eq.) was added. After stirring for 10 min, PyBOP (1.05 g, 2 mmol, 5 eq.) was added to the reaction mixture and the solution was stirred at room temperature under argon for 2 hours. Then $\text{NTA}(\text{CysNH}_2)_3$ **12** (0.200 g, 0.402 mmol, 1 eq.) was added to the mixture and stirring was maintained during 5 days. The resulting mixture was concentrated under reduced pressure and precipitation was obtained upon addition of cold diethyl ether. Resulting solid was rinsed with water (3x20mL) and ethanol (3x5mL). $\text{NTA}[\text{Cys}(\text{C}(\text{O})\text{C}_8\text{H}_{17})\text{NH}_2]_3$ **13** was obtained as a white electrostatic powder (97 mg, 26 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.36 (d, J = 8.6 Hz, 3H, 3xNH); 7.45 (s, 3H, 3xNH₂); 7.22 (s, 3H, 3xNH₂); 4.35 (t, J = 4.6 Hz, 3H, 3xCH), 3.38-3.22 (m, 6H, 3xCH₂); 3.01 (dd, J = 8.6, 13.3 Hz, 6H, 3xCH₂); 2.56-2.47 (m, 6H, 3xCH₂); 1.53 (t, J =6.9 Hz, 6H, 3xCH₂); 1.23 (s broad, 30H, 15xCH₂ aliphatic chain); 0.85 (t, J = 6.9 Hz, 9H, 3xCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 298 K): δ ppm = 198.20 (3xSCO), 171.52, 170.45 (6xCO), 57.39 (3xCH), 51.53, 43.33, 43.11, 31.23, 30.39, 28.65, 28.52, 28.27, 25.03 and 22.07 (27xCH₂), 13.95 (3xCH₃)

ES-MS: calculated mass: 917.5; found m/z : 918.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 940.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Analytical RP-HPLC: purity = 88.5 %, R_t = 8.3 min (gradient: from 70/30 (MeOH/water) to 90/10 (MeOH/water) in 3 min, then 100 % MeOH in 4 min and during 4 min).

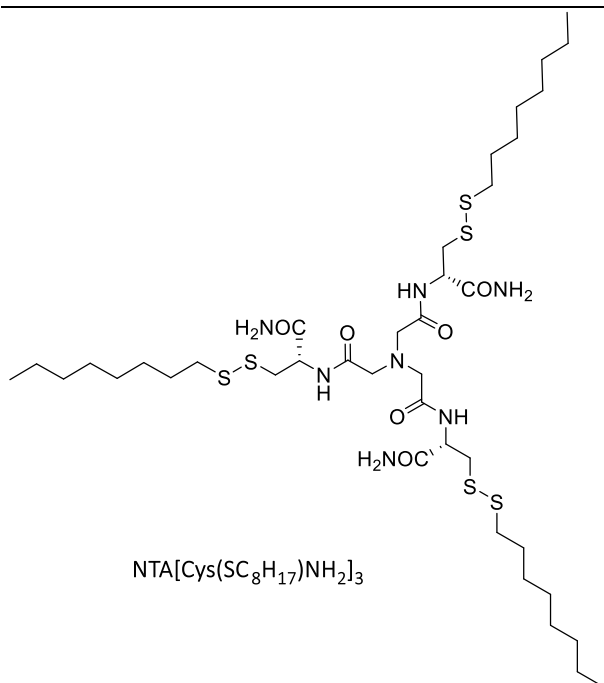
Compound 14

$C_{13}H_{21}NS_2$
MW: 255.44

$C_8H_{17}SSPy$

To a solution of 1-octanethiol (0.245 g, 1.67 mmol) in methanol (50mL) was added aldrithiol (0.933 g, 4.18 mmol, 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 2 hours. Crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/Ethyl acetate: 9/1) to give the compound **14** (360 mg, 84 %)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm = 8.44 (ddd, J = 0.8, 1.6, 4.8 Hz, 1H, Hpyr); 7.72 (dt, J = 8.1, 1.0 Hz, 1H, Hpyr); 7.65–7.58 (m, 1H, Hpyr); 7.05 (ddd, J = 1.0, 4.8, 7.3 Hz, 1H, Hpyr); 2.81–2.74 (m, 2H, CH_2); 1.67 (dt, J = 14.9, 7.4 Hz, 2H, CH_2); 1.41 (s, 2H, CH_2); 1.39 – 1.31 (m, 2H, CH_2); 1.31 – 1.16 (m, 8H, 4x CH_2); 0.89 – 0.83 (m, 3H, CH_3).

Compound 15

$C_{39}H_{75}N_7O_6S_6$
MW: 930.43

$NTA[Cys(SC_8H_{17})NH_2]_3$

To a solution of compound **14** (0.179 g, 0.700 mmol) in MeOH (20mL), $NTA(CysNH_2)_3$ **12** (0.100 g, 0.200 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 24 hours. The resulting mixture was concentrated under reduced pressure and precipitation was obtained upon addition of cold diethyl ether. $NTA[Cys(SC_8H_{17})NH_2]_3$ **15** was obtained as a white electrostatic powder (125 mg, 67 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K): δ ppm = 8.44 (d, J = 8.5 Hz, 3H, 3xNH); 7.49 (s, 3H, 3xNH $_2$); 7.22 (s, 3H, 3xNH $_2$); 4.48 (td, J = 4.6, 9.0 Hz, 3H, 3xCH), 3.48-3.22 (m, 6H, 3xCH $_2$); 2.85 and 3.10 (ABX, J_{AX} = 4.6 Hz, J_{BX} = 9.5 Hz, J_{AB} = 13.4 Hz, 6H, 3xCH $_2$); 2.69 (t, J = 7.1 Hz, 6H, 3xCH $_2$); 1.58 (quint, J =7.1 Hz, 6H, 3xCH $_2$); 1.38–1.17 (m, 30H, 15xCH $_2$); 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 9H, 3xCH $_3$).

^{13}C NMR (CD $_3$ OD, 100 MHz, 298 K): δ ppm = 175.18, 173.36 (6xCO), 59.56 (3xCH), 53.61, 42.21, 39.57, 33.02, 30.38, 30.21, 29.54, 23.74 (27xCH $_2$), 14.46 (3xCH $_3$).

ES-MS: calculated mass: 930.4; found m/z : 929.4 ; 930.3 [M+Na] $^+$; 952.3 [M+Na] $^+$

Formulation de nanoparticules et caractérisation

1. General informations

Chemical reactants and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and were used without further purification unless specified. Suppocire NB $^{\text{TM}}$ and Labrafac were purchased from Gattefossé (Saint-Priest, France). Myrj $^{\text{TM}}$ S40 and Myrj $^{\text{TM}}$ S100 (poly(ethylene glycol) stearate surfactants with respectively 40 and 100 ethylene glycol motifs), and Super-refined Soybean oil $^{\text{TM}}$ were supplied by CRODA (Chocques, France). Lipoid s75 $^{\text{TM}}$ was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). SpectraPor dialysis membrane 12-14.000 was purchased from Roth Sochiel EURL (Lauterbourg, France)

The hydrodynamic diameter and zeta potential of the NLC were measured at 22°C with a Malvern Zeta Sizer Nanoinstrument (NanoZS, Malvern, UK) in 0.1X PBS buffer. Physical stability was investigated by DLS measurements over 4 months with samples stored at 4°C. At least three different NLC batches (2 mL, lipid dispersed phase weight fraction: 10 %) were used per condition. Mean average diameters and polydispersity indices reported were obtained from scattered light intensity results. Data were expressed in terms of mean and standard deviation of all the samples for each condition, each sample result being the mean of three independent measurements performed at 25°C.

SPE system used was from Supelco : Visiprep $^{\text{TM}}$ 12-Port Vacuum Manifolds. The SPE-cartridges Oasis HLB $^{\text{TM}}$ SPE tube (1mL, 80 Å pore size, 30 μm particle size) were provided by Waters.

2. Formulation

The lipid phase was prepared by mixing solid (Suppocire $^{\text{TM}}$ NB) and liquid (Super-refined Soybean oil $^{\text{TM}}$) glycerides as well as the lipophilic surfactant Lipoid s75 $^{\text{TM}}$, and eventually DiD and lipophilic derivative,

while the aqueous phase was composed of the hydrophilic surfactant, MyrjTM S40, eventually SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10** or MyrjTM S100 and 1X PBS aqueous buffer (100 mM phosphate, NaCl 154 mM, pH 7.4). After homogenization at 45°C, both lipid and aqueous phases were crudely mixed and sonication cycles were performed at 45°C during a 20 min period, amounting to 5 min of actual sonication (10 s sonication/30 s without sonication). A sonication probe VCX750 Ultrasonic processor (power output 190 W, 3-mm probe diameter, Sonics) was used. A conical tip sonicator instrument (AV505 Ultrasonic processor, Sonics) with a 3 mm diameter probe was used. Non encapsulated components were separated from NLC by dialysis versus large volume of 1X PBS (1L, dialysis membrane MWCO: 12 kDa, , 24h, changed 2 times). Prior to characterization, NLC dispersions were filtered through a 0.22 µm cellulose Millipore membrane.

Particle concentration was assessed by weighting freeze-dried samples of NLC obtained from a known volume. Typically, 300 µL NLC suspension were introduced in a lyophilisation vial.

3. Quantification des surfactants PEGylés SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10**

Sample preparation

Each of the standards (MyrjTM S40, SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10**, SuppocireTM NB, Super-refined Soybean oilTM and Lipoid s75TM) was weighed on a calibrated, analytical balance and dissolved in a mixture of CHCl₃/MeOH 2/1 (v/v) to give 1 mg/mL stock solutions.

For UPLC-ELSD analysis, nanoparticles were disassembled. 300 µL of nanostructured lipid carriers were added to 1700 µL of acetonitrile. Samples were centrifuged to pellet the lipids after precipitation. 500 µL of supernatant were added to 1500 µL acetonitrile and the samples were centrifuged once more to remove any remaining lipid in the supernatant. 250 µL of supernatant were concentrated under reduced pressure and dissolved in 500 µL of a mixture of CHCl₃/MeOH 2/1 (v/v) to yield solutions with approximatively 1mg/mL concentration of PEGylated surfactants (MyrjTM S40 and SA-PEG₁₀₀-GalNAc **10**) before UPLC-ELSD analysis.

Chromatographic conditions

The chromatographic analysis of the NLC ingredients was performed using an Acquity UPLC[®] HClass system (Waters) coupled with an Alltech 3300 Evaporating Light Scattering detector (ELSD, Grace). Separation of the different components was achieved using a CORTECS RP-18 column (1.6 µm, 150 x 2.1 mm). The drift tube was set at 45°C with a flow of N₂ set at 2.0 L/min and a gain at 4. The injected volume was 5 µL and the column temperature was set at 40°C. Eluents were solvent A: deionized

water, B: methanol and C: mixture of isopropanol/acetonitrile 75/25 (v/v) and gradients are displayed below.

Time (min)	Flow (mL/min)	A	B	C
0	0.25	30	70	0
3	0.3	10	90	0
15	0.3	0	100	0
22	0.3	0	35	65
25	0.3	0	35	65
25.1	0.25	30	70	0
30	0.25	30	70	0

4. Quantification du taux d'encapsulation

Sample preparation

Prior to analysis, SPE separations were performed. Methanol (4 mL) followed by PBS-1X (6 mL) were first introduced into the SPE-cartridges for cleaning and equilibration prior to introduction of the formulated samples. The nanoparticles were eluted in a first fraction (F1) adding PBS 1X (4 mL) as eluent into the SPE-cartridge. The free drug was eluted in a second fraction (F2) using methanol (4mL) as a second eluent. The nanoparticles eluted in F1 could further be disintegrated to release entrapped drug. Briefly, the disintegration step consisted in freezing the nanoparticle sample in liquid nitrogen prior to lyophilisation. The resulting solid was solubilized in methanol to reach a theoretical drug concentration of 1 mg/mL. The drug content was quantified using a suitable HPLC method. The free drug eluted in F2 could be directly quantified by HPLC. The total drug content was determined for a sample without being passed through SPE but directly prepared as previously described in the disintegration step. The released entrapped drug and the free drug were quantified by HPLC.

Chromatographic condition

The chromatographic analysis of the NLC drug content was performed using a VWR Lachrom system equipped with a UV monitor. Separation of the different components was achieved using Chromolith Performance RP-18 endcapped column (100-4.6 i.d. mm, Macropore size 200 Å and mesopore size 13 Å, Merck Millipore). (1.6 µm, 150 x 2.1 mm). The injected volume was 5 µL and the column temperature was set at 40°C. Eluents were solvent A: deionized water, B: methanol. Gradients are displayed below.

Time (min)	Flow (mL/min)	A (MeOH)	B (water)
0	1	70	30
3	1	90	10
7	1	100	0
11	1	100	0
13	1	70	30
15	1	70	30

Expériences cellulaires

Cell culture equipment (cell culture medium, buffers, enzymes, serum and antibiotics) were purchase at Life Technologies and Eurobio. Cell lines were purchase from ATCC: HepG2/C3A (ATCCR CRL-10741™) and HeLa (ATCCR CCL-2™). Supplies were purchase from Greiner Bio One, Dominique Dutscher and Becton Dickinson. Reagents and solvents were purchase from Sigma Aldrich and Roche. Cell culture was performed in sterile conditions under laminar flow. HepG2 cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM) containing L-glutamine supplemented with 10 % v/v fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and amphotericin B 0.25 µg/mL. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. They were plated at 3 to 4 × 10⁴ cells/cm² on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm). Cells were counted and their viability was evaluated using the Trypan Blue dye and a TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad). Cells were suspended in calcium-free and magnesium-free phosphate-buffered saline (PBS) for flow cytometry measurements.

The cell line HepG2 was preserved in liquid nitrogen (-80°C) in MEM supplemented HepG2 culture medium (FBS and antibiotics) containing 10 % DMSO as cryoprotectant to prevent formation of crystals which otherwise lyse the cells. Frozen cells were directly incubated in a 37°C bath. After complete defrosting (1 mL), cells were centrifuged (2 min, 1000 rpm) to pellet the cells, and washed twice with cell culture medium (2 mL). Then, cells were plated at 5 × 10⁴ cells /cm² (on round plastic tissue culture dishes 60 × 15 mm) and incubated at 37°C, 5 % CO₂. This incubation at high concentration is performed during 4 days in order to let them go back to a dynamic growth. Then cells were cultured on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm). HepG2 cells were passaged every 2-3 days at 80-90 % confluency using a 0.25 % Trypsin- EDTA solution. Cells were washed with phosphate buffer saline 1×

(PBS : 3×10 mL) and then treated with a 0.25 % Trypsin-EDTA (2 mM) solution (2 mL, 3-4 minutes) to detach them from the support. The trypsin was inactivated by adding HepG2 culture medium (1 mL) and the detached cells were collected in a 15 mL centrifugation tube. Cells were centrifuged (3 minutes, 1000 rpm) and suspended in culture medium. Eventually, cells were plated at 3 to 4×10^4 cells/cm² on round plastic tissue culture dishes (100 × 20 mm).

Incubation des cellules et expériences de cytométrie en flux

HepG2 cells were seeded in 12-well plates with the same methodology explained above, at seeding density of 1.5×10^5 cells/well (3.5 cm²/well; 4.3 cells/cm²) 24 hours before addition of the nanoparticles.

The culture medium was removed and cells were washed twice with PBS before incubation in HepG2 cell culture medium (total incubation volume/well = 500 μL), supplemented with different concentrations of nanoparticles. After 30 min, HepG2 cells were washed with PBS (3×10 mL) and treated with 0.25 % Trypsin-EDTA solution as before. Cells were centrifuged (3 min, 5000 rpm) to pellet the cells that were then washed with PBS (200 μL) before suspending in fresh cell dissociation buffer (100 μL). The cell suspensions were put on ice and analyzed using a Beckman Coulter FACsCalibur flow cytometer with 488 and 635 nm laser excitation wavelengths. Fluorescence was collected with a FL4-H detector (661 nm). Gating during flow analysis was based on normalized fluorescence of untreated cells. An average of 20,000 healthy cells (gated events) was analyzed for each experimental condition, and the mean fluorescence of this population was taken as the background. The uptake of a compound into cells was evaluated by comparing the shift in Mean Fluorescence Intensity (MFI) between untreated cells (background fluorescence) and treated cells to evaluate cellular internalization of the nanoparticles. This was repeated for each treatment as a function of nanoparticles' functionalization, concentration. The interpretation of the collected data is performed thanks to the Cell Quest Pro software. Further analysis, EC50 calculations were done with Excel. Each EC50 and was evaluated in at least two independent experiments.

Viabilité cellulaire par test MTT

Cytotoxicity evaluation of lipophilic derivatives, nanoparticles and Wilson disease treatments was performed using MTT assay. Approximately 1×10^4 cells (C3A and C8) were seeded in a flat-bottomed 96-well plate and were incubated for 48 hrs at 37°C with 5 % CO₂. Series of dilution (0 – 800 μM) of CuCl₂ in the medium and compounds to test (NLC 0.8 mg/mL lipids and free molecules 25 μM or 500

μM for reference treatments) were added to the plate in triplicate. After 24 hours of incubation, medium is discarded, cell were rinsed with PBS and 50 μL of MTT reagent was added to each well and was further incubated for 1 hour. MTT solution is discarded and formazan crystals formed after 1 hour in each well were dissolved in 150 μL of 4 mM HCl, 0.1 % NP40 in isopropanol and the plates were read immediately in a microplate reader (Tecan microplate reader-550) at 570 nm. Wells with complete medium, CuCl_2 and MTT reagent, without cells were used as blanks. Untreated C3A and C8 cells as well as the cells treated with NLC (0 to 6.4 mg/mL lipids) and free compounds (0 to 200 μM) for 24 hrs were subjected to the MTT assay for cell viability determination.

RT-qPCR

At the indicated timepoints, cells were harvested and mRNA were isolated using Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) for 2D cultures. The RNA concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000). RNA were reverse transcribed with the Affinity script qPCR cDNA synthesis kit (Agilent), according to the manufacturer's instructions using random primers. Quantitative PCR reactions were run in triplicate, and quantification was performed using comparative regression (Cq determination mode) using Cfx (Bio-Rad Cfx manager) with GAPDH and HPRT amplification signals as housekeeping genes to correct for total RNA content, and labelling the untreated sample as the "calibrator". At least three biological replicates were performed for the presented data. The primers used are :

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
HPRT	ATGGACAGGACTGGACGTCTTGCT	TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
MT1X	GCTTCTCCTTGCCTCGAA	TGACGTCCCTTTGCAGATG

Résonnance des plasmons de surface – interaction des NLC avec une lectine

Sugars binding lectin MGL S ECD and DC-SIGN S ECD were provided by the "Membrane and Immunity" team at the IBS institute. Surface Plasmon Resonance analysis (SPR) competition assay: SPR experiments were performed on a Biacore 3000 using a CM4 chip, functionalized at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. DC-SIGN S ECD or MGL S ECD were immobilized on flow cells using a StrepTag coupling method. Fc1 was prepared as reference surface. The final interaction of bound ligand, expressed in response units (RU), is calculated by subtracting the reference RU from the ligand.

Streptactine functionalization

Flow cell (Fc) 1, 2, 3, and 4 were activated with 80 μL of a 0.2 M EDC/0.05 M NHS mixture followed by 195 μL StrepTactin (170 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Remaining activated groups were blocked with 80 μL of 1 M ethanolamine. After blocking, the four Fc were treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unspecific bound proteins.

Lectin functionalization

Flow cell (Fc) 1, 2, 3, and 4 were activated with 80 μL of a 0.2 M EDC/0.05 M NHS mixture. MGL S ECD or DC-SIGN ECD (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each lectin) were then bound to StrepTactin. Remaining activated groups were blocked with 80 μL of 1 M ethanolamine. After blocking, the four Fc were treated with 5 μL of 10 mM HCl to remove unspecific bound proteins. The final immobilization levels for the Fc1, 2, 3, and 4 are, respectively, 3175 RU, 2333 RU, 2533 RU, and 2148 RU. For interaction studies, BSA-Man (0.26 to 266 nM), BAS-GalNAc (15.82 nM to 16.2 μM) and NLC (from 97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 80 mg/mL corresponding, for the GalNAc functionalized NLC, to a GalNAc concentration of 7.8 μM to 2 mM). All the solutions were prepared in a running buffer composed of 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 3.8 mM CaCl_2 , 0.05 % P20 surfactant, and 10 μL of each sample was injected onto the surfaces at a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. The resulting sensorgrams were reference surface corrected.

Références Bibliographiques

1. Wilson, S. A. K. Progressive lenticular degeneration : a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* **34**, 295–507 (1912).
2. Lewińska-Preis, L., Jabłońska, M., Fabiańska, M. J. & Kita, A. Bioelements and mineral matter in human livers from the highly industrialized region of the Upper Silesia Coal Basin (Poland). *Environ. Geochem. Health* **33**, 595–611 (2011).
3. Sandmann, G. & Böger, P. Copper-mediated Lipid Peroxidation Processes in Photosynthetic Membranes. *Plant Physiol.* **66**, 797–800 (1980).
4. Linder, M. C. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutat. Res.* **733**, 83–91 (2012).
5. Culotta, V. & Scott, R. A. *Metals in cells.* (2016).
6. eurowilson.org - Le métabolisme du cuivre. Available at: <http://www.eurowilson.org/fr/living/guide/pathway/index.phtml>.
7. Deniaud, A. Homéostasie du cuivre dans un hépatocyte. (2019).
8. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science* **284**, 805–808 (1999).
9. Maxfield, A. B., Heaton, D. N. & Winge, D. R. Cox17 Is Functional When Tethered to the Mitochondrial Inner Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 5072–5080 (2004).
10. Wernimont, A. K., Yatsunyk, L. A. & Rosenzweig, A. C. Binding of Copper(I) by the Wilson Disease Protein and Its Copper Chaperone. *J. Biol. Chem.* **279**, 12269–12276 (2004).
11. Polishchuk, E. V. *et al.* Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis. *Dev. Cell* **29**, 686–700 (2014).
12. Holtzman, N. A. & Gaumnitz, B. M. Studies on the Rate of Release and Turnover of Ceruloplasmin and Apoceruloplasmin in Rat Plasma. *J. Biol. Chem.* **245**, 2354–2358 (1970).
13. Nordberg, M. & Nordberg, G. F. 1: Metallothioneins: Historical Development and Overview. in *Metallothioneins and Related Chelators* 1–29 (2009).
14. Członkowska, A. & Schilsky, M. L. *Handbook of clinical neurology. Wilson Disease.* **42**, (2017).
15. Skjørringe, T., Møller, L. B. & Moos, T. Impairment of Interrelated Iron- and Copper Homeostatic Mechanisms in Brain Contributes to the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
16. Choi, B.-S. & Zheng, W. Copper Transport to the Brain by the Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier. *Brain Res.* **1248**, 14–21 (2009).

17. Lutsenko, S., Bhattacharjee, A. & Hubbard, A. L. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* **2**, 596–608 (2010).
18. Fu, X. *et al.* Regulation of Copper Transport Crossing Brain Barrier Systems by Cu-ATPases: Effect of Manganese Exposure. *Toxicol. Sci.* **139**, 432–451 (2014).
19. Lee, J., Prohaska, J. R. & Thiele, D. J. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6842–6847 (2001).
20. Zheng, W. & Monnot, A. D. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* **133**, 177–188 (2012).
21. Telianidis, J., Hung, Y. H., Materia, S. & Fontaine, S. L. Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front. Aging Neurosci.* **5**, (2013).
22. Sternlieb, I. & Scheinberg, I. H. Prevention of Wilson's disease in asymptomatic patients. *N. Engl. J. Med.* **278**, 352–359 (1968).
23. Saito, T. An assessment of efficiency in potential screening for Wilson's disease. *J. Epidemiol. Community Health* **35**, 274–280 (1981).
24. Coffey, A. J. *et al.* A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain J. Neurol.* **136**, 1476–1487 (2013).
25. Woimant, F. *et al.* Première étude épidémiologique française sur la maladie de Wilson. *Rev. Neurol. (Paris)* **172**, A108–A109 (2016).
26. Chang, I. J. & Hahn, S. H. The genetics of Wilson disease. *Handb. Clin. Neurol.* **142**, 19–34 (2017).
27. Dedoussis, G. V. Z. *et al.* Wilson Disease: High Prevalence in a Mountainous Area of Crete. *Ann. Hum. Genet.* **69**, 268–274 (2005).
28. Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y. & Dmitriev, O. Y. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiol. Rev.* **87**, 1011–1046 (2007).
29. Huster, D. *et al.* Diverse Functional Properties of Wilson Disease ATP7B Variants. *Gastroenterology* **142**, 947–956.e5 (2012).
30. Patil, M., Sheth, K. A., Krishnamurthy, A. C. & Devarbhavi, H. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **3**, 321–336 (2013).
31. Bearn, A. G. & Kunkel, H. G. Abnormalities of Copper Metabolism in Wilson's Disease and Their Relationship to the Aminoaciduria. *J. Clin. Invest.* **33**, 400–409 (1954).
32. Scheinberg, I. H. & Gitlin, D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science* **116**, 484–485 (1952).
33. Hellman, N. E. & Gitlin, J. D. Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 439–458 (2002).

34. Mikol, J. *et al.* Extensive cortico-subcortical lesions in Wilson's disease: clinico-pathological study of two cases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **110**, 451–458 (2005).
35. Horoupian, D. S., Sternlieb, I. & Scheinberg, I. H. Neuropathological findings in penicillamine-treated patients with Wilson's disease. *Clin. Neuropathol.* **7**, 62–67 (1988).
36. Krebs, N. *et al.* Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **28**, 1–7 (2014).
37. Svetel, M. *et al.* Dystonia in Wilson's disease. *Mov. Disord.* **16**, 719–723 (2001).
38. Kim, T. J. *et al.* MR Imaging of the Brain in Wilson Disease of Childhood: Findings Before and After Treatment with Clinical Correlation. *Am. J. Neuroradiol.* **27**, 1373–1378 (2006).
39. Zimbrea, P. C. & Schilsky, M. L. Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *Gen. Hosp. Psychiatry* **36**, 53–62 (2014).
40. Poujois, A. & Woimant, F. Wilson's disease: A 2017 update. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **42**, 512–520 (2018).
41. Czlonkowska, A. *et al.* Nature Reviews Disease Primers article: Wilson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 21 (2018).
42. Mounajjed, T., Oxentenko, A. S., Qureshi, H. & Smyrk, T. C. Revisiting the topic of histochemically detectable copper in various liver diseases with special focus on venous outflow impairment. *Am. J. Clin. Pathol.* **139**, 79–86 (2013).
43. Zhenhong, Q. Coloration à la rhodanine de dépôts de cuivre.
44. Stättermayer, A. F. *et al.* Hepatic steatosis in Wilson disease – Role of copper and PNPLA3 mutations. *J. Hepatol.* **63**, 156–163 (2015).
45. Goodman, Z. D., Becker, R. L., Pockros, P. J. & Afdhal, N. H. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatol. Baltim. Md* **45**, 886–894 (2007).
46. Machado, A. *et al.* Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov. Disord.* **21**, 2192–2196 (2006).
47. Burke, J. F. *et al.* Prognostic significance of neurologic examination findings in Wilson disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **17**, 551–556 (2011).
48. Carta, M. G. *et al.* The risk of bipolar disorders and major depressive disorders in Wilson's disease: results of a case-control study. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **28**, e61 (2012).
49. Svetel, M. *et al.* Neuropsychiatric aspects of treated Wilson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**, 772–775 (2009).
50. Huang, C. C. & Chu, N. S. Wilson's disease: clinical analysis of 71 cases and comparison with previous Chinese series. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* **91**, 502–507 (1992).

51. Sharma, S., Toppo, A., Rath, B., Harbhajanka, A. & Lalita Jyotsna, P. Hemolytic Anemia as a Presenting Feature of Wilson's Disease: A Case Report. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **26**, 101–102 (2010).
52. Forman, S. J., Kumar, K. S., Redeker, A. G. & Hochstein, P. Hemolytic anemia in Wilson disease: clinical findings and biochemical mechanisms. *Am J Hematol* **9**, 269–275 (1980).
53. Steindl, P. *et al.* Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* **113**, 212–218 (1997).
54. Kayser-Fleischer Ring - an overview. Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/kayser-fleischer-ring>.
55. El Balkhi, S. *et al.* Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clin. Chim. Acta* **412**, 2254–2260 (2011).
56. Ferenci, P. *et al.* Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease¹. *Liver Int.* **23**, 139–142 (2003).
57. Cumings, J. N. The effects of B.A.L. in hepatolenticular degeneration. *Brain J. Neurol.* **74**, 10–22 (1951).
58. Mandelbrote, B. M. & Stanier, M. W. Studies on copper metabolism in demyelinating diseases of the central nervous system. *Brain J. Neurol.* **71**, 212–228 (1948).
59. Vilensky, J. A. & Redman, K. British anti-Lewisite (dimercaprol): An amazing history. *Ann. Emerg. Med.* **41**, 378–383 (2003).
60. Walshe, J. M. & Dixon, A. K. Danger of non-compliance in Wilson's disease. *The Lancet* **327**, 845–847 (1986).
61. Walshe, J. M. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am. J. Med.* **21**, 487–495 (1956).
62. Walshe, J. M. Treatment of Wilson's disease with penicillamine. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 188–192 (1960).
63. Walshe, J. M. & Yealland, M. Chelation treatment of neurological Wilson's disease. *Q. J. Med.* **86**, 197–204 (1993).
64. Smith, S. W. Chiral toxicology: it's the same thing...only different. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **110**, 4–30 (2009).
65. Walshe, J. M. Penicillamine Neurotoxicity: An Hypothesis. *International Scholarly Research Notices* (2011).
66. Polańska, A. *et al.* Elastosis perforans serpiginosa: a review of the literature and our own experience. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* **33**, 392–395 (2016).
67. Bernard, P. & Charneux, J. Pemphigoïde bulleuse : revue de la littérature. (2011).
68. Brewer, G. J. Penicillamine should not be used as initial therapy in Wilson's disease. *Mov. Disord.* **14**, 551–554 (1999).

69. Brewer, G. J. Treatment of Wilson's disease: our patients deserve better. *Expert Opin. Orphan Drugs* **2**, 1245–1248 (2014).
70. Stuerenburg, H. J. CSF copper concentrations, blood-brain barrier function, and ceruloplasmin synthesis during the treatment of Wilson's disease. *J. Neural Transm.* **107**, 321–329 (2000).
71. Walshe, J. M. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *The Lancet* **319**, 643–647 (1982).
72. Liver, E. A. for the S. of the. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J. Hepatol.* **56**, 671–685 (2012).
73. Walshe, J. M. The conquest of Wilson's disease. *Brain* **132**, 2289–2295 (2009).
74. Wiernicka, A. *et al.* Gastrointestinal side effects in children with Wilson's disease treated with zinc sulphate. *World J. Gastroenterol.* **19**, 4356–4362 (2013).
75. Ferguson, W. S., Lewis, A. H. & Watson, S. J. Action of Molybdenum in Nutrition of Milking Cattle. *Nature* **141**, 553 (1938).
76. Dick, A. T. The Control of Copper Storage in the Liver of Sheep by Inorganic Sulphate and Molybdenum. *Aust. Vet. J.* **29**, 233–239 (1953).
77. Bickel, H., Neale, F. C. & Hall, G. A clinical and biochemical study of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Q. J. Med.* **26**, 527–558 (1957).
78. Weiss, K. H. *et al.* WTX101 in patients newly diagnosed with Wilson disease: final results of a global, prospective phase 2 trial. *J. Hepatol.* **66**, S88 (2017).
79. Krishnan, N., Felice, C., Rivera, K., Pappin, D. J. & Tonks, N. K. DPM-1001 decreased copper levels and ameliorated deficits in a mouse model of Wilson's disease. *Genes Dev.* **32**, 944–952 (2018).
80. Merle, U. *et al.* Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 974–982 (2006).
81. Murillo, O. *et al.* Liver Expression of a MiniATP7B Gene Results in Long-Term Restoration of Copper Homeostasis in a Wilson Disease Model in Mice. *Hepatology* **70**, 108–126 (2019).
82. Roy-Chowdhury, J. & Schilsky, M. L. Gene therapy of Wilson disease: A 'golden' opportunity using rAAV on the 50th anniversary of the discovery of the virus. *J. Hepatol.* **64**, 265–267 (2016).
83. Irani, A. N. *et al.* Correction of Liver Disease Following Transplantation of Normal Rat Hepatocytes into Long-Evans Cinnamon Rats Modeling Wilson's Disease. *Mol. Ther.* **3**, 302–309 (2001).
84. Wernimont, A. K., Huffman, D. L., Lamb, A. L., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 766–771 (2000).

85. Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, Ò. & Atrian, S. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 46–62 (2012).
86. Margoshes, M. & Vallee, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813–4814 (1957).
87. Stillman, M. J. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.* **144**, 461–511 (1995).
88. Presta, A., Fowle, D. A. & Stillman, M. J. Structural model of rabbit liver coppermetallothionein. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 977–984 (1997).
89. Calvo, J., Jung, H. & Meloni, G. Copper metallothioneins. *IUBMB Life* **69**, 236–245 (2017).
90. Vašák, M. & Meloni, G. Mammalian Metallothionein-3: New Functional and Structural Insights. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
91. Pujol, A. M. *et al.* Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocylopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 286–296 (2011).
92. Pujol, A. Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson. (2010).
93. Pujol, A. M., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6928–6929 (2009).
94. Pujol, A. M., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. A Series of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Soluble Chelators that are Highly Selective for Copper(I). *Chem. – Eur. J.* **17**, 4418–4428 (2011).
95. Meier, M., Bider, M. D., Malashkevich, V. N., Spiess, M. & Burkhard, P. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J. Mol. Biol.* **300**, 857–865 (2000).
96. Schwartz A. L., Geuze H. J., Lodish H. F. & Northcote D. H. Recycling of the asialoglycoprotein receptor: biochemical and immunocytochemical evidence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **300**, 229–235 (1982).
97. Taylor, M. E. & Drickamer, K. *Introduction to Glycobiology*. (Oxford University Press, 2011).
98. Connolly, D. T., Townsend, R. R., Kawaguchi, K., Bell, W. R. & Lee, Y. C. Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation. *J. Biol. Chem.* **257**, 939–945 (1982).
99. Iobst, S. T. & Drickamer, K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 15512–15519 (1994).
100. Kolatkar, A. R. & Weis, W. I. Structural Basis of Galactose Recognition by C-type Animal Lectins. *J. Biol. Chem.* **271**, 6679–6685 (1996).
101. Kawasaki, T., Ii, M., Kozutsumi, Y. & Yamashina, I. Isolation and characterization of a receptor lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine from macrophages. *Carbohydr. Res.* **151**, 197–206 (1986).

102. Iobst, S. T. & Drickamer, K. Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 6686–6693 (1996).
103. Lee, Y. C. *et al.* Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J. Biol. Chem.* **258**, 199–202 (1983).
104. Lee, R. T., Lin, P. & Lee, Y. C. New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin of mammalian liver. *Biochemistry (Mosc.)* **23**, 4255–4261 (1984).
105. Berthet, N. *et al.* High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1598–1611 (2013).
106. Khorev, O., Stokmaier, D., Schwardt, O., Cutting, B. & Ernst, B. Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 5216–5231 (2008).
107. Liu, G. *et al.* Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives. *RSC Adv.* **7**, 18252–18259 (2017).
108. Monestier, M. Glycoconjugués ciblés vers le foie : reconnaissance par des lectines pour la vectorisation de chélateurs de cuivre. (2015).
109. Monestier, M. *et al.* ASGPR-Mediated Uptake of Multivalent Glycoconjugates for Drug Delivery in Hepatocytes. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **17**, 590–594 (2016).
110. Pujol, A. M. *et al.* A sulfur tripod glycoconjugate that releases a high-affinity copper chelator in hepatocytes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **51**, 7445–7448 (2012).
111. Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng. Sci.* **23**, 22–36 (1960).
112. *Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux.*
113. Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K. & von Goetz, N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2242–2250 (2012).
114. Jang, E. *et al.* White-Light-Emitting Diodes with Quantum Dot Color Converters for Display Backlights. *Adv. Mater.* **22**, 3076–3080 (2010).
115. Hosseinzadeh, S., Baharifar, H. & Amani, A. Efficacy of a Model Nano-TiO₂ Sunscreen Preparation as a Function of Ingredients Concentration and Ultrasonication Treatment. *Pharm. Sci.* **23**, 129–135 (2017).
116. Lehmphul, K. Use of nanomaterials in coatings. (2014).
117. Merkle, H. P. & Speiser, P. Preparation and in vitro evaluation of cellulose acetate phthalate coacervate microcapsules. *J. Pharm. Sci.* **62**, 1444–1448 (1973).
118. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **33**, 2373–2387 (2016).

119. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **65**, 271–284 (2000).
120. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **9**, e1449 (2017).
121. Yuan, H., Fales, A. M. & Vo-Dinh, T. TAT Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced Intracellular Delivery and Efficient NIR Photothermal Therapy Using Ultralow Irradiance. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11358–11361 (2012).
122. Ekimov, A. I. & onushcheko, A. Quantum Size Effect in Three-Dimensional Microscopic Semiconductor Crystals. *JETP Lett.* **34**, 345–348 (1981).
123. High-Tech Synthesis of Colloidal Quantum Dots Begins in Dubna. Available at: <https://en.rusnano.com/press-centre/news/88604>.
124. Gao, X. *et al.* In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 63–72 (2005).
125. Rocha, T. L., Mestre, N. C., Sabóia-Morais, S. M. T. & Bebianno, M. J. Environmental behaviour and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: A review. *Environ. Int.* **98**, 1–17 (2017).
126. Tarantini, A. *et al.* Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation. *NanoImpact* **14**, 100168 (2019).
127. Couvreur, P. *et al.* Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 331–332 (1979).
128. Hariharan, S. *et al.* Design of Estradiol Loaded PLGA Nanoparticulate Formulations: A Potential Oral Delivery System for Hormone Therapy. *Pharm. Res.* **23**, 184–195 (2006).
129. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).
130. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327 (1971).
131. ten Tije, A. J., Verweij, J., Loos, W. J. & Sparreboom, A. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 665–685 (2003).
132. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Controlled Release* **132**, 171–183 (2008).
133. Desai, N. *et al.* Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 1317–1324 (2006).

134. Han, S., Ganbold, T., Bao, Q., Yoshida, T. & Baigude, H. Sugar Functionalized Synergistic Dendrimers for Biocompatible Delivery of Nucleic Acid Therapeutics. *Polymers* **10**, (2018).
135. Rupp, R., Rosenthal, S. L. & Stanberry, L. R. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 561–566 (2007).
136. Hegde, N., Velingkar, V. & Prabhakar, B. An Update on Design and Pharmacology of Dendritic Poly(l-lysine). *Int. J. Pept. Res. Ther.* (2018).
137. Price, C. F. *et al.* SPL7013 Gel (VivaGel®) Retains Potent HIV-1 and HSV-2 Inhibitory Activity following Vaginal Administration in Humans. *PLoS ONE* **6**, (2011).
138. Delmas, T. *et al.* Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 471–481 (2011).
139. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
140. Amoozgar, Z. & Yeo, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 219–233 (2012).
141. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–IN27 (1965).
142. Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C. & Greige-Gerges, H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food Chem. Toxicol.* **113**, 40–48 (2018).
143. Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release* **160**, 117–134 (2012).
144. Oh, Y.-K. & Park, T. G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 850–862 (2009).
145. Beaulac, C., Sachtelli, S. & Lagace, J. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 35–41 (1998).
146. Schmidt, J. *et al.* Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **126**, 1895–1904 (2003).
147. Franz-Montan, M., de Paula, E., Groppo, F. C., Ranali, J. & Volpato, M. C. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **50**, 454–458 (2012).
148. Rongen, H. A. H., Bult, A. & van Bennekom, W. P. Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Methods* **204**, 105–133 (1997).
149. Swain, S. M., Whaley, F. S. & Ewer, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer* **97**, 2869–2879 (2003).

150. O'Brien, M. E. R. *et al.* Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **15**, 440–449 (2004).
151. Symon, Z. *et al.* Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes. *Cancer* **86**, 72–78 (1999).
152. Muller, R. H., Schwarz, C., Mehnert, W. & Lucks, J. S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. *Proc. Control. Release Soc.* 480–481 (1993).
153. Gasco, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. (1993).
154. Hosseini, S. M. *et al.* Doxycycline-encapsulated solid lipid nanoparticles as promising tool against *Brucella melitensis* enclosed in macrophage: a pharmacodynamics study on J774A.1 cell line. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **8**, 62 (2019).
155. Wong, H. L., Bendayan, R., Rauth, A. M., Li, Y. & Wu, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 491–504 (2007).
156. Andrezzi, E. *et al.* Size-Stable Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Gd-DOTA for Magnetic Resonance Imaging. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1455–1467 (2013).
157. Helgason, T. *et al.* Impact of surfactant properties on oxidative stability of beta-carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8033–8040 (2009).
158. Zur Mühlen, A., Schwarz, C. & Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 149–155 (1998).
159. Bayón-Cordero, L., Alkorta, I. & Arana, L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. *Nanomater. Basel Switz.* **9**, (2019).
160. Mehnert, W. & Mäder, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 165–196 (2001).
161. Waghmare & Jadhav, S. L. Solid Lipid Nanoparticles : a promising drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **3**, 100–107 (2012).
162. Mukherjee, S., Ray, S. & Thakur, R. S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.* **71**, 349–358 (2009).
163. Fundarò, A. *et al.* Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol. Res.* **42**, 337–343 (2000).
164. Zara, G. P. *et al.* Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Idarubicin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles After Duodenal Administration to Rats. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1324–1333 (2002).
165. Yang, S. C. & Zhu, J. B. Preparation and Characterization of Camptothecin Solid Lipid Nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 265–274 (2002).

166. Kang, K. W. *et al.* Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 210–213 (2010).
167. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E. & Benoit, J.-P. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm. Res.* **19**, 875–880 (2002).
168. Benoit, J.-P. *et al.* Lipid nanocapsules, preparation method and use as medicine. (2004).
169. Hirsjärvi, S. *et al.* Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 375–387 (2013).
170. Abdel-Mottaleb, M. M. A., Neumann, D. & Lamprecht, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *Int. J. Pharm.* **390**, 208–213 (2010).
171. Lollo, G. *et al.* Development of multifunctional lipid nanocapsules for the co-delivery of paclitaxel and CpG-ODN in the treatment of glioblastoma. *Int. J. Pharm.* **495**, 972–980 (2015).
172. Saliou, B. *et al.* Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **50**, 172–180 (2013).
173. Zhegalova, N. G., Dergunov, S. A., Wang, S. T., Pinkhassik, E. & Berezin, M. Y. Design of fluorescent nanocapsules as ratiometric nanothermometers. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **20**, 10292–10297 (2014).
174. Morille, M., Passirani, C., Letrou-Bonneval, E., Benoit, J. & Pitard, B. Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. *Int. J. Pharm.* **379**, 293–300 (2009).
175. Müller, R. H., Radtke, M. & Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, S131–S155 (2002).
176. Gilbert, E. *et al.* Percutaneous absorption of benzophenone-3 loaded lipid nanoparticles and polymeric nanocapsules: A comparative study. *Int. J. Pharm.* **504**, 48–58 (2016).
177. Kaur, S., Nautyal, U., Singh, R., Singh, S. & Devi, A. Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. *Asian Pac. J. Health Sci.* **2**, 76–93 (2015).
178. Delmas, T. *et al.* How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir* **27**, 1683–1692 (2011).
179. Müller, R. H., Radtke, M. & Wissing, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* **242**, 121–128 (2002).
180. Sharma, A. & Baldi, A. Nanostructured Lipid Carriers: A Review. *J. Dev. Drugs* **7**, 1000191 (2018).
181. Puglia, C. *et al.* Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *Int. J. Pharm.* **357**, 295–304 (2008).
182. Texier, I. *et al.* Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **14**, 054005 (2009).

183. Gravier, J. J. *et al.* Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **16**, 096013 (2011).
184. Jacquart, A. *et al.* LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **18**, 101311 (2013).
185. Mérian, J. *et al.* Comparative biodistribution in mice of cyanine dyes loaded in lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 1–10 (2015).
186. Mérian, J. *et al.* Synthetic Lipid Nanoparticles Targeting Steroid Organs. *J. Nucl. Med.* **54**, 1996–2003 (2013).
187. Bayon, E. Nouveau système de délivrance d'antigènes à base de nanoparticules lipidiques (Lipidots) pour formulation vaccinale. (2018).
188. Goutayer, M. *et al.* Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 137–147 (2010).
189. Szebeni, J., Garcia, R., Eskelson, C. D. & Chvapil, M. The organ distribution of liposome-encapsulated and free cobalt in rats. Liposomes decrease the cardiac uptake of the metal. *Life Sci.* **45**, 729–736 (1989).
190. Kumar, R. *et al.* In vivo Biodistribution and Clearance Studies using Multimodal ORMOSIL Nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 699–708 (2010).
191. De Jong, W. H. *et al.* Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **29**, 1912–1919 (2008).
192. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in (eds. Feingold, K. R. *et al.*) (MDText.com, Inc., 2000).
193. Zheng, G., Chen, J., Li, H. & Glickson, J. D. Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17757–17762 (2005).
194. Müller, R. H., Maaßen, S., Weyhers, H., Specht, F. & Lucks, J. S. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **138**, 85–94 (1996).
195. Mérian, J. Développement et caractérisation in vivo de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire. (2012).
196. Sayag, D. *et al.* Phase-0/phase-I study of dye-loaded lipid nanoparticles for near-infrared fluorescence imaging in healthy dogs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **100**, 85–93 (2016).
197. Bayon, E. *et al.* Overcoming immunogenicity issues of HIV p24 antigen by the use of innovative nanostructured lipid carriers as delivery systems: evidences in mice and non-human primates. *Npj Vaccines* **3**, 46 (2018).
198. Kulkarni, V. *et al.* HIV-1 conserved elements p24CE DNA vaccine induces humoral immune responses with broad epitope recognition in macaques. *PLoS One* **9**, e111085 (2014).

199. Ataman-Onal, Y. *et al.* Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **112**, 175–185 (2006).
200. Zupančič, E. *et al.* Rational design of nanoparticles towards targeting antigen-presenting cells and improved T cell priming. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **258**, 182–195 (2017).
201. Choi, J. *et al.* Targeting tumors with cyclic RGD-conjugated lipid nanoparticles loaded with an IR780 NIR dye: In vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* **532**, 677–685 (2017).
202. Ashwell, G. & Harford, J. Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 531–554 (1982).
203. Spiess, M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 10009–10018 (1990).
204. Rensen, P. C. *et al.* Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 37577–37584 (2001).
205. Maitani, Y., Kawano, K., Yamada, K., Nagai, T. & Takayama, K. Efficiency of liposomes surface-modified with soybean-derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells. *J. Controlled Release* **75**, 381–389 (2001).
206. Deschuyteneer, M., Prieels, J. P. & Mosselmans, R. Galactose-specific adsorptive endocytosis: an ultrastructural qualitative and quantitative study in cultured rat hepatocytes. *Biol. Cell* **50**, 17–29 (1984).
207. Tian, C. *et al.* N-acetyl-L-cysteine functionalized nanostructured lipid carrier for improving oral bioavailability of curcumin: preparation, in vitro and in vivo evaluations. *Drug Deliv.* **24**, 1605–1616 (2017).
208. Shi, M., Wosnick, J. H., Ho, K., Keating, A. & Shoichet, M. S. Immuno-Polymeric Nanoparticles by Diels–Alder Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 6126–6131 (2007).
209. Cui, Y., Dong, H., Cai, X., Wang, D. & Li, Y. Mesoporous Silica Nanoparticles Capped with Disulfide-Linked PEG Gatekeepers for Glutathione-Mediated Controlled Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 3177–3183 (2012).
210. Prasuhn, D. E. *et al.* Combining Chemoselective Ligation with Polyhistidine-Driven Self-Assembly for the Modular Display of Biomolecules on Quantum Dots. *ACS Nano* **4**, 267–278 (2010).
211. Fischler, M. *et al.* Chain-like assembly of gold nanoparticles on artificial DNA templates via ‘click chemistry’. *Chem. Commun.* **0**, 169–171 (2007).
212. Wu, J. & Guo, Z. Improving the Antigenicity of sTn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines. *Bioconjug. Chem.* **17**, 1537–1544 (2006).
213. Westerlind, U. *et al.* Ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted gene delivery, part 1: Synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine. *Glycoconj. J.* **21**, 227–241 (2004).

214. Koeller, K. M., Smith, M. E. B. & Wong, C.-H. Tyrosine Sulfation on a PSGL-1 Glycopeptide Influences the Reactivity of Glycosyltransferases Responsible for Synthesis of the Attached O-Glycan. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 742–743 (2000).
215. Crich, D. & Yang, F. Synthesis of Neoglycoconjugates by the Desulfurative Rearrangement of Allylic Disulfides. *J. Org. Chem.* **73**, 7017–7027 (2008).
216. Góngora-Benítez, M., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chem. Rev.* **114**, 901–926 (2014).
217. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
218. Mainard, M. & Jacob, D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* 40–44 (2016).
219. Hattori, Y., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **69**, 369–377 (2000).
220. Kawakami, S., Munakata, C., Fumoto, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* **90**, 105–113 (2001).
221. Wang, T. *et al.* Biodegradable Self-Assembled Nanoparticles of Galactose-Containing Amphiphilic Triblock Copolymers for Targeted Delivery of Paclitaxel to HepG2 Cells. *Macromol. Biosci.* **16**, 774–783 (2016).
222. Jeong, Y.-I. *et al.* Cellular recognition of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) and poly(ethylene glycol) diblock copolymer endcapped with galactose moiety. *Int. J. Pharm.* **296**, 151–161 (2005).
223. ATEM - Les détecteurs - A diffusion de lumière - Université Lille 1. Available at: <http://atechimie.univ-lille1.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/Detecteurs/A-diffusion-lumiere/>.
224. de Villiers, A., Górecki, T., Lynen, F., Szucs, R. & Sandra, P. Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation. *J. Chromatogr. A* **1161**, 183–191 (2007).
225. Varache, M., Ciancone, M. & Couffin, A.-C. Development and validation of a novel UPLC-ELSD method for the assessment of lipid composition of nanomedicine formulation. *Int. J. Pharm.* **566**, 11–23 (2019).
226. Kawakami, S., Munakata, C., Fumoto, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* **90**, 105–113 (2001).
227. Managit, C., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Effect of galactose density on asialoglycoprotein receptor-mediated uptake of galactosylated liposomes. *J. Pharm. Sci.* **94**, 2266–2275 (2005).

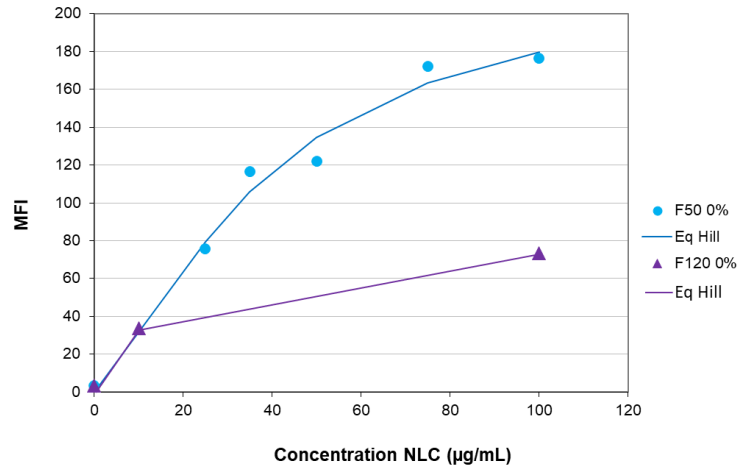
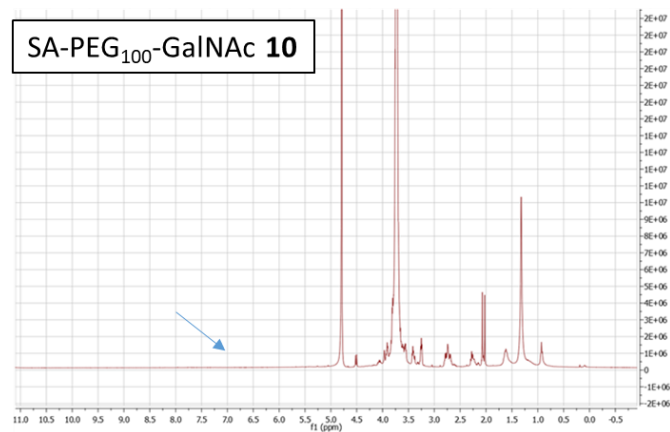
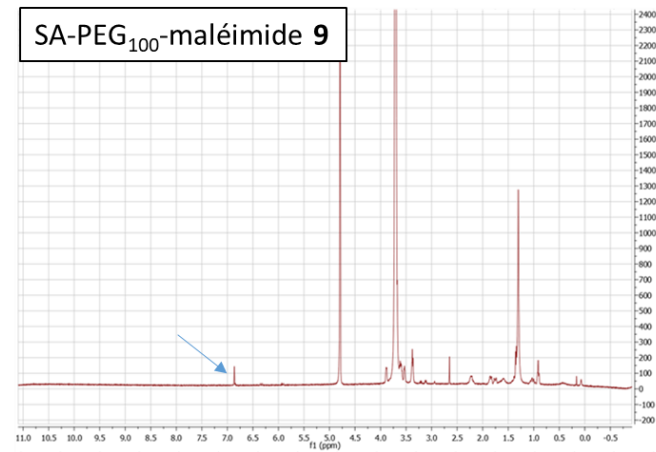
228. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**, 615 (1979).
229. Fotakis, G. & Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**, 171–177 (2006).
230. Schwartz, A. L., Fridovich, S. E., Knowles, B. B. & Lodish, H. F. Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J. Biol. Chem.* **256**, 8878–8881 (1981).
231. Crommelin, D. J. A. & Florence, A. T. Towards more effective advanced drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **454**, 496–511 (2013).
232. Ballet, F. Hepatic circulation: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **47**, 281–328 (1990).
233. Thapa, B., Kumar, P., Zeng, H. & Narain, R. Asialoglycoprotein Receptor-Mediated Gene Delivery to Hepatocytes Using Galactosylated Polymers. *Biomacromolecules* **16**, 3008–3020 (2015).
234. Navarro, F. P. *et al.* Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **130**, 161–169 (2014).
235. Barcroft, J. & Hill, A. V. The nature of oxyhaemoglobin, with a note on its molecular weight. *J. Physiol.* **39**, 411–428 (1910).
236. Maalej, M. *et al.* Human Macrophage Galactose-Type Lectin (MGL) Recognizes the Outer Core of Escherichia coli Lipooligosaccharide. *ChemBioChem* **20**, 1778–1782 (2019).
237. Geijtenbeek, T. B. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575–585 (2000).
238. Valladeau, J. *et al.* Immature Human Dendritic Cells Express Asialoglycoprotein Receptor Isoforms for Efficient Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Immunol.* **167**, 5767–5774 (2001).
239. Suzuki, N., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T. & Irimura, T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J. Immunol.* **156**, 128–135 (1996).
240. Mitchell, D. A., Fadden, A. J. & Drickamer, K. A Novel Mechanism of Carbohydrate Recognition by the C-type Lectins DC-SIGN and DC-SIGNR subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* **276**, 28939–28945 (2001).
241. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–597 (2000).
242. Xiao, Y. *et al.* Synthesis of novel tetravalent galactosylated DTPA-DSPE and study on hepatocyte-targeting efficiency in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 3033–3050 (2013).
243. Foroozandeh, P. & Aziz, A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **13**, (2018).

244. Digiacomo, L. *et al.* An apolipoprotein-enriched biomolecular corona switches the cellular uptake mechanism and trafficking pathway of lipid nanoparticles. *Nanoscale* **9**, 17254–17262 (2017).
245. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2780–2799 (2012).
246. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **27**, 4356–4373 (2006).
247. Tanaka, J. *et al.* Specific and Differential Binding of N-Acetylgalactosamine Glycopolymers to the Human Macrophage Galactose Lectin and Asialoglycoprotein Receptor. *Biomacromolecules* **18**, 1624–1633 (2017).
248. Oh, H. R. *et al.* Galactosylated Liposomes for Targeted Co-Delivery of Doxorubicin/Vimentin siRNA to Hepatocellular Carcinoma. *Nanomaterials* **6**, (2016).
249. Xu, Z. *et al.* The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* **30**, 226–232 (2009).
250. Jain, A. *et al.* Galactose engineered solid lipid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **134**, 47–58 (2015).
251. Zhu, X. *et al.* SPIO-loaded nanostructured lipid carriers as liver-targeted molecular T2-weighted MRI contrast agent. *Quant. Imaging Med. Surg.* **8**, 770–780 (2018).
252. Huang, K.-W. *et al.* Galactose Derivative-Modified Nanoparticles for Efficient siRNA Delivery to Hepatocellular Carcinoma. *Biomacromolecules* **19**, 2330–2339 (2018).
253. Simons, K. & Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 597–603 (2002).
254. Li, Y. *et al.* Lipid rafts-mediated endocytosis and physiology-based cell membrane traffic models of doxorubicin liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 1801–1811 (2016).
255. Imai, T. Human Carboxylesterase Isozymes: Catalytic Properties and Rational Drug Design. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**, 173–185 (2006).
256. Sharma, A. *et al.* Molecular theranostic based on esterase-mediated drug activation for hepatocellular carcinoma. *Dyes Pigments* **163**, 628–633 (2019).
257. Meade, B. R. *et al.* Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1256–1261 (2014).
258. Wei, J., Kang, H. W. & Cohen, D. E. Thioesterase superfamily member 2 (Them2)/acyl-CoA thioesterase 13 (Acot13): a homotetrameric hotdog fold thioesterase with selectivity for long-chain fatty acyl-CoAs. *Biochem. J.* **421**, 311–322 (2009).
259. Han, S. & Cohen, D. E. Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation. *J. Lipid Res.* **53**, 2620–2631 (2012).
260. Franklin, M. P., Sathyanarayan, A. & Mashek, D. G. Acyl-CoA Thioesterase 1 (ACOT1) Regulates PPAR α to Couple Fatty Acid Flux With Oxidative Capacity During Fasting. *Diabetes* **66**, 2112–2123 (2017).

261. Zhou, J., Hao, N., Zoyza, T. D., Yan, M. & Ramström, O. Lectin-gated, mesoporous, photofunctionalized glyconanoparticles for glutathione-responsive drug delivery. *Chem. Commun.* **51**, 9833–9836 (2015).
262. Latorre, A., Couleaud, P., Aires, A., Cortajarena, A. L. & Somoza, Á. Multifunctionalization of magnetic nanoparticles for controlled drug release: a general approach. *Eur. J. Med. Chem.* **82**, 355–362 (2014).
263. Vernall, A. J., Ballet, S. & Abell, A. D. Cross-metathesis and ring-closing metathesis reactions of amino acid-based substrates. *Tetrahedron* **64**, 3980–3997 (2008).
264. De Matteis, L. *et al.* New active formulations against M. tuberculosis: Bedaquiline encapsulation in lipid nanoparticles and chitosan nanocapsules. *Chem. Eng. J.* **340**, 181–191 (2018).
265. Xie, Y. *et al.* Determination of non-liposomal and liposomal doxorubicin in plasma by LC–MS/MS coupled with an effective solid phase extraction: In comparison with ultrafiltration technique and application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* **1072**, 149–160 (2018).
266. Guillot, A. *et al.* Solid Phase Extraction as an Innovative Separation Method for Measuring Free and Entrapped Drug in Lipid Nanoparticles. *Pharm. Res.* **32**, 3999–4009 (2015).
267. Westesen, K., Bunjes, H. & Koch, M. H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Controlled Release* **48**, 223–236 (1997).
268. Slater, T. F., Sawyer, B. & Sträuli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 383–393 (1963).
269. Shao, Z. *et al.* Targeted lung cancer therapy: preparation and optimization of transferrin-decorated nanostructured lipid carriers as novel nanomedicine for co-delivery of anticancer drugs and DNA. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1223–1233 (2015).

Annexes

Annexe 1 : Choix de F50 plutôt que de F120

Annexe 2 : Disparition des protons caractéristiques du maléimide suivi par RMN ¹H

Annexe 3 : Détail des calculs permettant de déterminer le pourcentage molaire en Myrj™ S40 et SA-PEG₁₀₀-GalNAc

Répartition des différents composés du Myrj™ S100 :

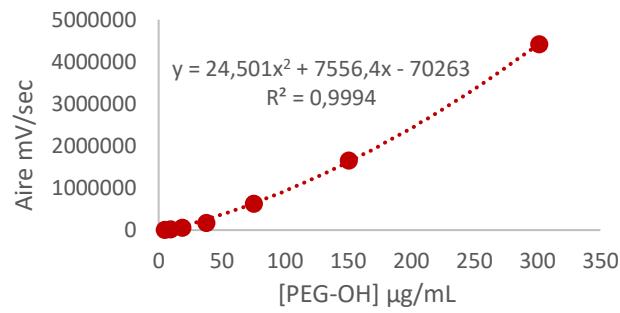
	Masse molaire	% dans le Myrj™ S40
PEG-OH	1778	30,1
PEG-C16	2016	34,6
PEG-C18	2044	35,3
SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc	5346	

Détermination du pourcentage molaire de chaque surfactant PEGylé dans les différentes formulations :

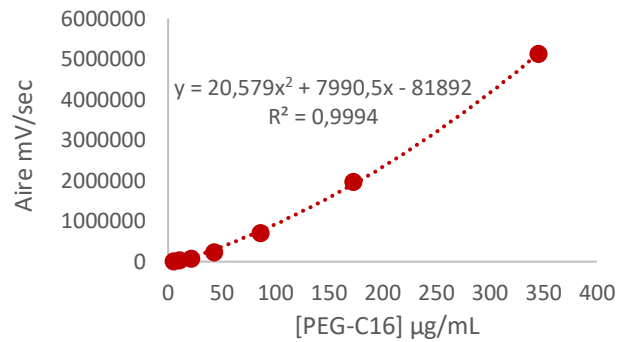
	A	B	C	D
Myrj (mg)	345,0	327,0	298,3	241,1
PEG-OH (mg)	103,8	98,4	89,8	72,6
PEG-C16 (mg)	119,3	113,1	103,2	83,4
PEG-C18 (mg)	121,7	115,4	105,3	85,1
SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc (mg)	0,0	18,7	46,7	105,4
Total	344,9	345,6	344,9	346,4
PEG-OH (mmol)	58,4	55,4	50,5	40,8
PEG-C16 (mmol)	59,2	56,1	51,2	41,4
PEG-C18 (mmol)	59,6	56,4	51,5	41,6
SA-PEG ₁₀₀ -GalNAc (mmol)	0,0	3,5	8,7	19,7
total mmol	177,1	171,4	161,9	143,5
PEG-OH (% mol)	33,0	32,3	31,2	28,4
PEG-C16 (% mol)	33,4	32,7	31,6	28,8
PEG-C18 (% mol)	33,6	32,9	31,8	29,0
SA-PEG₁₀₀-GalNAc (%mol)	0,0	2,0	5,4	13,7

Annexe 4 : Courbes de calibration des PEG-OH et PEG-C16 présents dans le Myrj™ S40

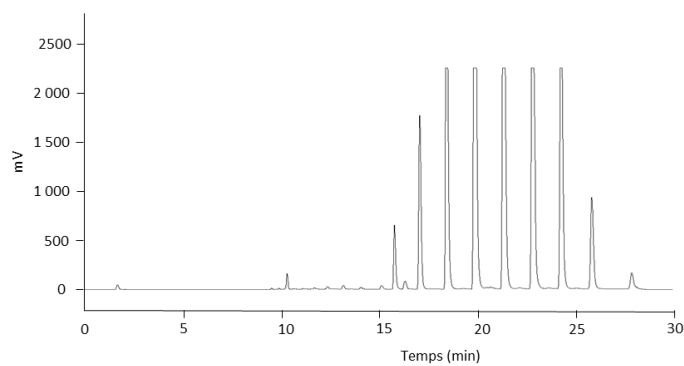
PEG-OH



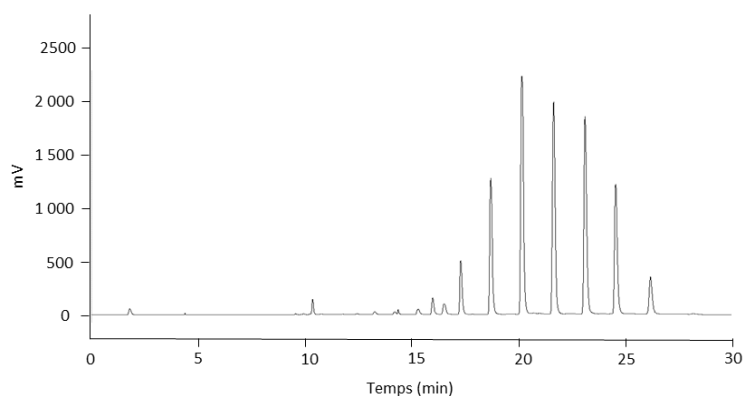
PEG-C16

**Annexe 5 : Chromatogrammes des précipités obtenus pour les formulations B et C**

Chromatogramme obtenu pour le précipité de la formulation B



Chromatogramme obtenu pour le précipité de la formulation C



Annexe 6 : Détail des calculs d'incorporation molaire et de pourcentage de fonctionnalisation expérimental :

EXP Pic area					
	PEG-OH	209640	197549	26023	83428
	PEG-C16	2025400	2413922	1147209	1570128
	PEG-C18	1993916	2732216	2113177	1921453
	Myrj™ S40	4228956	5343687	3286409	3575009
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0	96180	378972	1133502
EXP concentrations injectées					
en µg/mL	PEG-OH	33,42	32,04	12,26	19,15
	PEG-C16	180,15	203,26	117,98	149,32
	PEG-C18	176,61	217,55	184,00	172,04
	Myrj™ S40	390,18	452,85	314,23	340,51
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0,00	65,10	153,10	311,82
EXP concentrations échantillon (V=5mL)					
en mg/mL	PEG-OH	1,78	1,71	0,65	1,02
	PEG-C16	9,61	10,84	6,29	7,96
	PEG-C18	9,42	11,60	9,81	9,18
	Myrj™ S40	20,81	24,15	16,76	18,16
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0,00	3,47	8,17	16,63
EXP nb mol échantillon (V=5mL)					
en µmol	PEG-OH	5,01	4,80	1,84	2,87
	PEG-C16	27,02	30,49	17,69	22,40
	PEG-C18	26,49	32,63	27,60	25,80
	Myrj™ S40	58,52	67,92	47,13	51,07
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0,00	3,25	7,64	15,55
THEO nb de mole échantillon (V=5mL)					

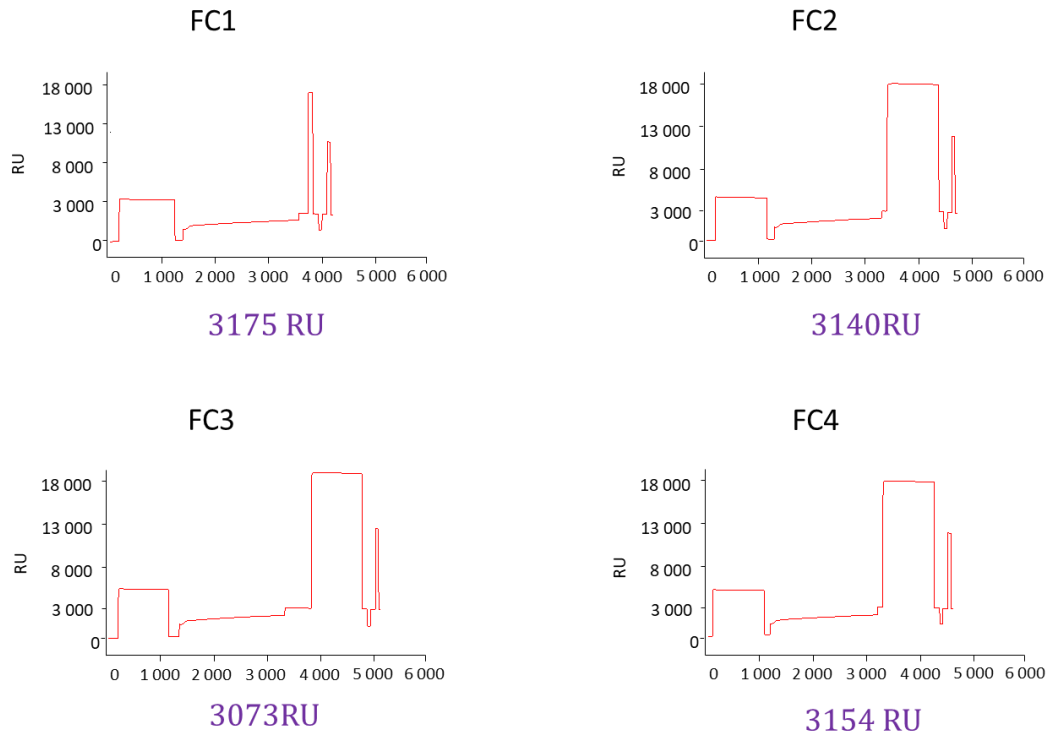
en μ mol	PEG-OH	60,73	57,65	52,51	42,44
	PEG-C16	59,18	56,18	51,17	41,36
	PEG-C18	59,56	56,54	51,49	41,62
	Myrj™ S40	179,47	170,36	155,17	125,42
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0,00	3,64	8,74	19,72
	total	179,47	174,00	163,91	145,13
% incorporation (molaire)					
	PEG-OH	8,25	8,34	3,50	6,77
	PEG-C16	45,66	54,28	34,58	54,15
	PEG-C18	44,48	57,73	53,59	61,99
	Myrj™ S40	32,61	39,88	30,37	40,72
	SA-PEG₁₀₀-GalNAc	0,00	89,52	87,42	78,89
	% EXP MOL				
	% PEG-GalNAc	0,0	4,6	13,9	23,3
	% Myrj™ S40	100	95,4	86,1	76,7

Annexe 7 : Détail des calculs de densité de surface en molécules composant le Myrj™ S40 :

		A	B	C	D
(g)	masse de formulation	0,49	0,51	0,49	0,51
(nm)	diamètre hydrodynamique	41,8	39,8	52,4	59,8
(cm ³)	volume 1 nano	$3,8 \cdot 10^{-17}$	$3,3 \cdot 10^{-17}$	$7,5 \cdot 10^{-17}$	$1,1 \cdot 10^{-16}$
(g)	masse de 1 nano	$4,0 \cdot 10^{-17}$	$3,5 \cdot 10^{-17}$	$7,9 \cdot 10^{-17}$	$1,2 \cdot 10^{-16}$
	nombre de nanos	$1,2 \cdot 10^{16}$	$1,5 \cdot 10^{16}$	$6,1 \cdot 10^{16}$	$4,3 \cdot 10^{15}$
	nb total de PEG-OH	$3,0 \cdot 10^{24}$	$2,9 \cdot 10^{24}$	$1,1 \cdot 10^{24}$	$1,7 \cdot 10^{24}$
	nb total de PEG-C16	$1,6 \cdot 10^{25}$	$1,8 \cdot 10^{25}$	$1,1 \cdot 10^{25}$	$1,3 \cdot 10^{25}$
	nb total de PEG-C18	$1,6 \cdot 10^{25}$	$2,0 \cdot 10^{25}$	$1,7 \cdot 10^{25}$	$1,6 \cdot 10^{25}$
	nb total de myrjs40	$3,5 \cdot 10^{25}$	$4,1 \cdot 10^{25}$	$2,8 \cdot 10^{25}$	$3,1 \cdot 10^{25}$
	nb de PEG-OH/nano	$2,5 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$
	nb de PEG-C16/nano	$1,3 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$
	nb de PEG-C18/nano	$1,3 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	$3,6 \cdot 10^9$
	nb de myrjs40/nano	$2,9 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	$4,6 \cdot 10^9$	$7,1 \cdot 10^9$
	Surface/PEG-OH	$4,5 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$
	Surface/PEG-C16	$2,4 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
	Surface/PEG-C18	$2,4 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$
	surface / myrjs40	$5,2 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$

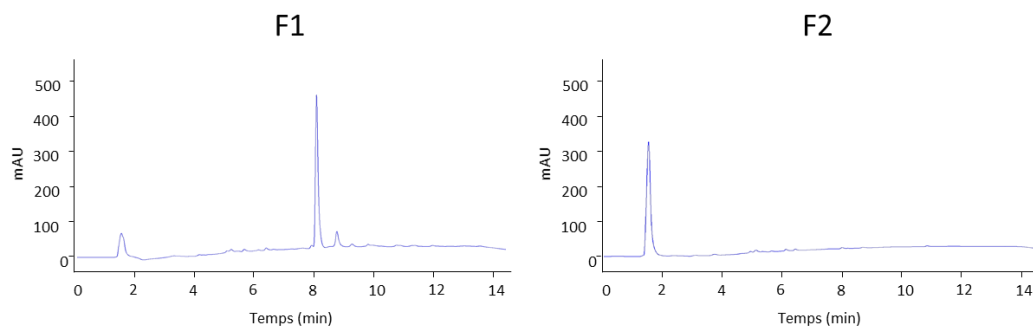
Annexe 8 : Sensorgramme obtenus suite à la fonctionnalisation des voies FC1, FC2, FC3 et FC4 par la StrepTactine :

Fonctionnalisation StrepTactine



Annexe 9 : Evaluation de la fuite des chélateurs lipophiles 2 semaines après stockage :

NLC charges en NTA(Cys(**CO**C₈H₁₇)NH₂)₃ ; NLC-**SCO**



NLC charges en NTA(Cys(**S**C₈H₁₇)NH₂)₃ ; NLC-**SS**

F1

