



HAL
open science

Impact des milieux biologiques sur les nanocapsules lipidiques (LNCs) et évaluation pharmacocinétique

Vincent Lebreton

► **To cite this version:**

Vincent Lebreton. Impact des milieux biologiques sur les nanocapsules lipidiques (LNCs) et évaluation pharmacocinétique. Pharmacologie. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0073 . tel-04647643

HAL Id: tel-04647643

<https://theses.hal.science/tel-04647643v1>

Submitted on 15 Jul 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ÉCOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Sciences Pharmaceutiques

Par

Vincent LEBRETON

Impact des milieux biologiques sur les nanocapsules lipidiques et évaluation pharmacocinétique

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 12 juillet 2023

Unité de recherche : Micro et Nanomédecines Translationelles INSERM 1066/CNRS 6021, Angers, France

Rapporteurs avant soutenance :

Anne DES RIEUX Professeur, Université de Louvain
Yann PELLEQUER Professeur, Université de Franche-Comté

Composition du Jury :

Président : Pascal LE CORRE Professeur, Université de Rennes

Examineurs : Anne DES RIEUX Professeur, Université de Louvain
 Yann PELLEQUER Professeur, Université de Franche-Comté

Directeur de thèse : Frédéric LAGARCE Professeur, Université d'Angers
Co-directeur de thèse : Patrick SAULNIER Professeur, Université d'Angers

Invité

Co-encadrant : Samuel LEGEAY Maître de conférence, Université d'Angers

**L'auteur du présent document
vous
autorise à le partager, reproduire,
distribuer et communiquer selon
les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements,

Au **Professeur Frédéric LAGARCE**, qui m'a accordé sa confiance depuis mon arrivée à Angers et tout au long de cette thèse et ce malgré les circonstances. Merci pour tout, de la conception du sujet à la rédaction de ce manuscrit tu m'as beaucoup apporté, j'espère avoir fourni un travail de qualité et avoir été à la hauteur de ton investissement.

Au **Professeur Patrick SAULNIER**, qui m'a accueilli au sein du laboratoire et qui m'a encadré pour mener à bien ce projet. Merci de m'avoir accordé votre confiance et d'avoir toujours fait preuve d'enthousiasme et de bienveillance à mon égard. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Au **Docteur Samuel LEGEAY**, pour m'avoir accepté au sein de son projet et guidé pour aboutir ce travail. Merci pour ton encadrement, tes précieux conseils tout au long de cette thèse. Merci pour ton aide, ton écoute et ton soutien dans les moments les plus difficiles et pour les sorties course à pied ! Sois assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect, en te souhaitant le meilleur pour ton futur projet.

Aux **Professeurs Anne DES RIEUX** et **Yann PELLEQUER**, pour me faire l'honneur de participer à ce jury et pour avoir accepté de consacrer de votre temps pour évaluer ce travail en qualité de rapporteurs. Soyez assurés de ma profonde considération.

Au **Professeur Pascal LE CORRE**, pour avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Au CHU d'Angers, au SCAHU (animalerie) ainsi qu'à La Ligue contre le cancer pour le financement de ce projet sans lequel ces travaux de recherche n'auraient pu exister.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui m'ont aidé pendant ces années, tout particulièrement,

Le Docteur Norraseth KAEOKHEMLOED, nous avons formé une belle équipe, très complémentaire pour nos projets respectifs, sans toi les manipulations à l'animalerie n'auraient pas eu la même saveur. Félicitations à toi pour ta thèse et MERCI.

Le Docteur Emilie ROGER, pour tes conseils, ton sens de la rigueur. Merci pour ton aide.

A Nolwenn LAUTRAM, pour tes nombreux petits conseils et pour ton aide précieuse et ta bonne humeur permanente.

A Jérôme BEJAUD et Olivier THOMAS, pour leur aide et leur disponibilité tout au long de ce projet.

Aux Docteurs Jean-Christophe GIMEL, Florence FRANCONI et Laurent LEMAIRE, pour m'avoir aidé et accompagné sur une partie du projet même si les résultats ont été infructueux.

Au Docteur Audrey GRIVEAU, pour ton aide et ta disponibilité en toute circonstance.

REMERCIEMENTS

Je veux également remercier Adélie, Nicolas, Pierre L, Abdallah, Florence, Pierre I et tous les autres doctorants qui poursuivent, qui vont terminer et même ceux qui commencent leur thèse et qui sauront se reconnaître. Merci pour ces moments passés ensemble, ces belles rencontres, ces discussions scientifiques ainsi que vos messages de soutien... Bref une belle aventure à vos côtés.

Merci à l'ensemble du Laboratoire MINT pour les échanges que nous avons eu et pour les moments partagés ensemble et votre soutien.

Je ne saurai oublier l'ensemble de l'équipe enseignante du département de Pharmacie ainsi que le Doyen récemment nommé, le Professeur Sébastien FAURE. Merci pour cet accueil sincère et chaleureux. J'adresse mes remerciements tout particulièrement à l'équipe de Galénique, le Professeur Marie-Claire VENIER, le Docteur Brigitte PECH et Florian FOUCHET sans oublier le Docteur Emilie ROGER, pour m'avoir accompagné et fait confiance lors de mes débuts à vos côtés.

A tous mes collègues de la pharmacie, pharmaciens, internes, préparateurs, techniciens, ouvriers, secrétaires, ... qui m'ont soutenu notamment dans les moments difficiles. Je n'ose les citer de peur d'en oublier. A l'exception du Docteur Sandy VRIGNAUD, qui m'a rapidement donné sa confiance à mon arrivée et qui a toujours fait preuve de compréhension pour que je puisse mener à bien ce projet. Je te remercie sincèrement pour ton aide et ton soutien.

J'ajoute Audrey BOURGES, pour ton soutien et ta compréhension, j'ai toujours pu compter sur toi et la qualité de ton travail en toute circonstance, pour cela merci.

Bien sûr, je tiens à remercier ma famille, aussi et surtout ma belle-famille ainsi que mes amis pour leur soutien pendant ces années et ce d'autant plus depuis que notre vie a tragiquement basculée. Mention spéciale pour Justine qui a pris le temps de me relire pour éliminer les dernières coquilles et fautes d'orthographe.

Merci à toi Charlène, mon amour, je n'ai pas assez de mots pour te remercier. Tu as été un soutien sans faille et une aide permanente pendant toutes ces années malgré mes sautes d'humeur notamment en cas de stress !!! La vie a désormais une saveur bien particulière, je te remercie d'avoir encore confiance en elle, tentons de la rendre un peu plus belle pour nous deux et pour Constance que l'on aime déjà plus que tout.

J'aurai un dernier mot de remerciement pour Capucine, ma petite chérie partie beaucoup trop tôt, tu m'as tellement aidé... Tu étais ma bouffée d'oxygène pendant ces années, du haut de tes 2 ans tu éclaboussais la vie, tu étais notre rayon de soleil. La vie fut bien trop courte pour toi et c'est injuste. Ce fut dur mais j'ai souhaité finir ce travail en ta mémoire pour que tu sois fière de ton « Papa d'Amour » comme tu disais !

A tous ceux pour lesquels j'aurai eu la maladresse de ne pas les citer. A tous ceux qui ne se seraient pas reconnus dans ces éloges et à qui je dois beaucoup. A vous tous, un grand merci.

A Charlène et Constance,

A notre étoile, Capucine,

« Tu n'es plus là où tu étais, mais partout là où je suis. »

Victor Hugo

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
INTRODUCTION GENERALE	16
1. Nanomédecines et nanomédicaments : généralités	17
1.1. Définitions	17
1.2. Infrastructures	19
1.3. Classification des nanosystèmes pharmaceutiques	20
1.4. Applications médicales	25
2. Développement des nanomédicaments : intérêts et limites	29
2.1. Intérêts des structures nanométriques	29
2.1.1. Taille des nanovecteurs et surface de contact disponible	29
2.1.2. Solubilisation de substances actives hydrophobes	30
2.1.3. Vectorisation	31
2.1.4. Amélioration du profil pharmacocinétique	32
2.2. Limites des nanosystèmes pharmaceutiques	33
2.2.1. Caractérisation physicochimique	33
2.2.2. Capacité d'encapsulation du principe actif	34
2.2.3. Reproductibilité et maîtrise des procédés de formulation au niveau industriel	34
2.2.4. Stabilité et stockage des nanomédicaments	35
2.2.5. Interactions avec les protéines	35
2.2.6. Passage des barrières biologiques	36
2.2.7. Limites du ciblage	37
2.2.8. Biocompatibilité et nanotoxicité	37
3. Pharmacocinétique des nanomédicaments	39
3.1. Pharmacocinétique des médicaments	39
3.1.1. Définition et concept	39
3.1.2. Méthodes d'analyse	41
3.2. Application aux nanomédicaments	48
BIBLIOGRAPHIE	51
CAHIER DES CHARGES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL	59

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	61
Chapitre 1. Modélisation pharmacocinétique des nanomédicaments : enjeux et spécificités	61
PARTIE EXPERIMENTALE	72
Chapitre 2. Etude de la formation de la couronne de protéines autour des NCLs	73
Chapitre 3. Etude pharmacocinétique des NCLs-FRET : modélisation par approche populationnelle	97
Chapitre 4. Etude de l'élimination rénale des NCLs-FRET	109
DISCUSSION GENERALE	124
1. Méthodes d'étude de l'adsorption protéique autour des NCLs	125
1.1. Modèles d'études	125
1.2. Techniques de séparation après contact avec les milieux biologiques	128
2. Méthodes de caractérisation	131
3. Stabilité des nanoparticules dans les milieux biologiques	135
4. Evaluation de la pharmacocinétique des NCLs	137
4.1. Méthodes de détection quantitative des NCLs dans les milieux biologiques	137
4.2. Méthodes d'étude <i>in vivo</i>	138
5. Biodistribution-Biotransformation-Elimination	140
5.1. Etude de la biodistribution en fonction de la taille	140
5.2. Capture macrophagique et impact de la pégylation	140
5.3. Métabolisme hépatique.....	141
5.4. Elimination rénale.....	143
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	147
BIBLIOGRAPHIE	149

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	<i>Accelerated Blood Clearance</i>
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ASC	Aire Sous la Courbe
ASMC	Aire Sous la Courbe du Moment statistique d'ordre 1 des concentrations en fonction du temps
AUC	<i>Analytical Ultra Centrifugation</i>
A4F	<i>Asymmetric Flow-Field Fractionation</i>
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>
BSA	Albumine de Sérum Bovin
C_0	Concentration initiale
C_{obs}	Concentration observée
Cl	Clairance totale
C_{max}	Concentration maximale plasmatique
C_{pred}	Concentration prédite
Da	Daltons
DCS	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DDS	<i>Drug Delivery System</i>
D_H	Diamètre hydrodynamique
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability Retention</i>
ETPN	Plateforme Technologique Européenne de Nanomédecine
ESF	Fondation Européenne pour la Science
EU-NCL	<i>European Nanomedicine Characterization Laboratory</i>

F	Biodisponibilité
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GOF	<i>Goodness-Of-Fit</i>
ICH	Conférences Internationales d'Harmonisation
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
IV	Intraveineuse
LL	<i>Log-Likelihood</i> ratio
MRT	Temps de Résidence Moyen
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCL	<i>Nanotechnology Characterization Laboratory</i>
NCLs	NanoCapsules Lipidiques
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPDE	<i>Normalized Prediction Distribution Errors</i>
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PBPK	<i>Physiological Based Pharmacokinetic</i>
PEG	PolyÉthylène Glycols
PLA	Acide PolyLactique
PLGA	Acide Poly(Lactique-co-Glycolique)
PD	Pharmacodynamie
PK	Pharmacocinétique
PKpop	Pharmacocinétique de population
k_a	Constante d'absorption
k_e	Constante d'élimination
TONIC	<i>Translation Of Nanotechnology In Cancer</i>
RSE	<i>Relative Standard Error</i>
SAEM	<i>Stochastic Approximation Expectation Maximization</i>
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
SRE	Système Réticulo-Endothélial

SVF	Sérum de Veau Fœtal
TEM	<i>Transmission Electronic Microscopy</i>
T _{max}	Temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale
Vd	Volume de distribution apparent
VPC	<i>Visual Predictive Checks</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nanomédicaments autorisés dans l'Union Européenne.....**27**

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Échelle de comparaison de taille des nanomatériaux.....	16
Figure 2.	Diagramme des différents types de nanosystèmes pharmaceutiques.....	19
Figure 3.	Nanosystèmes pharmaceutiques organiques et inorganiques.....	19
Figure 4.	Liposomes et dérivés.....	20
Figure 5.	Effet de la diminution de la taille d'un cube sur la surface de contact.....	28
Figure 6.	Mécanismes de vectorisation des cellules tumorales par les nanomédicaments.....	31
Figure 7.	Concept de base de l'approche PK-PD (Pharmacocinétique-Pharmacodynamie).....	38
Figure 8.	Représentation simplifiée des étapes de la pharmacocinétique d'un médicament.....	39
Figure 9.	Analyse non compartimentale par méthode des trapèzes permettant d'estimer l'aire sous la courbe (ASC) de t_0 à t_7	41
Figure 10.	Exemples de modèles pharmacocinétiques compartimentaux après administration intraveineuse et équations différentielles associées	43
Figure 11.	Variabilité interindividuelle additive (A) et proportionnelle (B).....	44
Figure 12.	Variabilité résiduelle additive (A) et proportionnelle (B).....	45
Figure 13.	Influence des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules sur leur profil pharmacocinétique.....	49
Figure 14.	Comparaison de la composition de la couronne de protéines après incubation dans le sérum de veau fœtal, sérum humain, plasma humain hépariné, plasma humain citraté, après analyse quantitative par LC-MS.....	125
Figure 15.	Comparaison de la composition de la couronne de protéines par analyse LC-MS Entre deux techniques d'isolation du complexe [nanoparticules-protéines] après centrifugation ou A4F.....	128
Figure 16.	Représentation schématique de l'approche technologique souhaitée par le EU-NCL et le NCI-NCL pour mesurer la taille des nanoparticules en fonction du niveau de complexité du mélange.....	132
Figure 17.	Prérequis nécessaire pour la détection du signal FRET (Förster Resonance Energy Transfer) : superposition entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur avec les deux fluorophores séparés de moins de 10 nm...	133

Figure 18. Méthodologie de traitement des cellules RAW264.7 et des cellules Hepa1-6 dans le modèle Transwell pour l'étude du métabolisme hépatique des nanoparticules de chitosan (CsNps).....	140
Figure 19. Schéma de représentation des mécanismes de dégradation des nanoparticules de chitosan (CsNps) au niveau hépatique chez la souris.....	140
Figure 20. Schéma d'élimination des nanoparticules (NPs) par deux voies principales : hépatique et rénale.....	142
Figure 21. Schéma montrant les 4 principaux facteurs qui peuvent donner aux nanoparticules (NPs) la capacité de contourner la filtration.....	143
Figure 22. Représentation schématique du modèle final développé pour de la quétiapine encapsulée dans des NCLs après injection intraveineuse.....	144

INTRODUCTION GENERALE

A l'heure actuelle, l'un des défis majeurs à relever dans le développement des médicaments, notamment dans le domaine de la cancérologie, est le ciblage sélectif de la molécule thérapeutique vers les cellules pathologiques. Le site d'administration d'un médicament étant très souvent différent du site d'action du principe actif, ce dernier se trouve confronté à des obstacles non négligeables tels que le passage des barrières biologiques, les interactions avec les protéines des milieux biologiques, la dégradation ou encore le métabolisme. Afin d'obtenir des concentrations thérapeutiques efficaces au niveau du site d'action, il faut généralement accepter une perte importante de principe actif vers des sites non pathologiques. Il est aisé de comprendre que cela peut engendrer des effets indésirables plus ou moins importants pouvant conduire à l'arrêt du traitement.

Le recours à la nanomédecine dans le développement des médicaments de demain a soulevé de nombreux espoirs. En effet, cela ouvre des possibilités de ciblage plus sélectif et pourrait donc permettre d'obtenir des thérapeutiques présentant une efficacité supérieure avec une moindre toxicité en comparaison aux thérapies conventionnelles. Ce domaine scientifique reposant sur des concepts novateurs et sur l'utilisation de matériaux innovants a pour objectif, d'une part, de concevoir des structures capables de transporter des principes actifs tout en les protégeant d'une éventuelle dégradation et, d'autre part, de maîtriser leur libération que ce soit en termes de durée ou de localisation.

Ce manuscrit s'ouvre donc sur une introduction générale abordant des généralités sur les nanomédecines, les intérêts et limites de ces formulations ainsi que sur la pharmacocinétique des nanomédicaments. Ce dernier point fait d'ailleurs l'objet d'une revue de la littérature. Ensuite, le travail expérimental s'est établi en trois parties. La première s'intéresse au phénomène d'adsorption des protéines autour des nanomédicaments. La seconde évalue le devenir *in vivo* des nanomédicaments après injection intraveineuse chez le rat. Enfin, la troisième partie permet d'étudier spécifiquement l'élimination rénale de ces nanomédicaments après administration dans le compartiment sanguin chez le rat. Une discussion générale autour des méthodes utilisées lors de ce travail expérimental suivie d'une conclusion viendront clore ce manuscrit.

1. Nanomédecines et nanomédicaments : généralités

1.1. Définitions

Dès le V^{ème} siècle avant Jésus-Christ, les Grecs se sont interrogés sur la matière. Est-elle continue ? Est-elle divisible à l'infini ou en petits fragments jusqu'à des petites particules indivisibles et indestructibles ? Sans en avoir conscience, ces savants ont posé les premières bases des nanosciences [1].

La trace grecque persiste à ce jour avec le préfixe « nano » qui fait référence à quelque chose de très petit, de l'ordre du nanomètre (nm), 1 million de fois plus petit qu'un mètre soit 10^{-9} m. Selon certains auteurs, les structures nanométriques sont définies comme présentant une taille allant de 1 à 100 nm [1,2]; pour d'autres, leur taille peut aller jusqu'à 1000 nm [3,4]. Elles représentent l'espace dimensionnel compris entre les échelles atomiques et moléculaires. (**Figure 1**) [1,5-7].

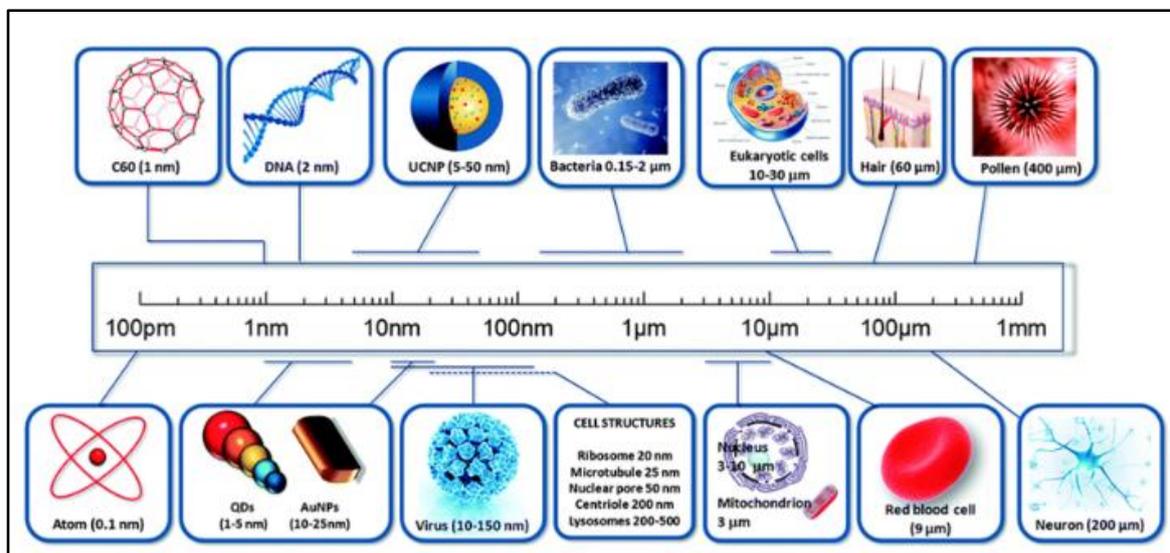


Figure 1. Échelle de comparaison de taille des nanomatériaux.
(Reproduite à partir de Bayda *et al.* [1])

Les nanosciences peuvent se définir simplement comme les sciences s'intéressant aux structures nanométriques.

En 1959, le scientifique américain Richard Feynman, prix Nobel de Physique, est le premier à introduire le concept de « nanotechnologies » au cours d'une conférence donnée lors du congrès annuel de la Société Américaine de Physique [8]. Bien qu'il ne mentionne jamais le terme de « nanotechnologies », il explique que, grâce à la mécanique quantique, il devrait être possible de produire et de contrôler des petites machines et évoque même déjà des applications possibles en médecine [9]. Il est reconnu aujourd'hui comme le fondateur de ce nouveau champ de recherche. Ce n'est qu'en 1974 qu'apparaît la première vraie définition, toujours valable aujourd'hui, du terme « nanotechnologies » donnée par le scientifique japonais Norio Taniguchi : « [...],

nanotechnology mainly consists of the processing of separation, consolidation and deformation of materials by one atom or one molecule » [10]. Les nanotechnologies peuvent également être définies comme l'application pratique des concepts théoriques établis par les nanosciences ; elles représentent l'ensemble des techniques et/ou des outils utilisant des matériaux de taille nanométrique. Pour simplifier, l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) et la Commission Européenne se sont accordées pour désigner les nanoparticules comme des objets avec une ou plusieurs dimensions externes dans la plage de 1 à 100 nm [2,11,12].

Les nanotechnologies ont été intégrées dans de nombreux domaines tels que la mécanique, l'informatique, la biologie, la toxicologie, la cosmétologie et bien sûr la médecine. L'utilisation de nanoparticules en médecine, et plus largement en santé, que ce soit pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques, appartient au champ de recherche de la nanomédecine [1,13,14]. La Fondation Européenne de la Science (ESF) en donne la définition suivante: « *Nanomedicine uses nano-sized tools for the diagnosis, prevention and treatment of disease and to gain increased understanding of the complex underlying patho-physiology of disease. The ultimate goal is to improve quality of life* » [15]. Ainsi, la nanomédecine peut être définie comme la science qui s'intéresse aux nanotechnologies dans le domaine de la santé. Lorsque ces nanotechnologies sont utilisées comme vecteur de substances actives, on parle alors de nanomédicaments.

La recherche relative aux nanotechnologies est très récente et représente probablement le domaine de recherche en santé le plus prometteur du XXI^{ème} siècle. Cela se traduit, notamment dans le domaine de la médecine, par une augmentation exponentielle du nombre de publications scientifiques incluant le terme « *nanomedicine* ». Alors que moins de 30 articles étaient publiés en 2005, 857 en 2010, 3438 en 2014, aujourd'hui plus de 40 000 publications sont recensées dans la base Medline [16–19]. Toutefois, ces chiffres sont à interpréter avec prudence car l'emploi du terme « *nanomedicine* » par la communauté scientifique et surtout médicale fait suite à une publication parue dans un journal médical de grande envergure, le *New England Journal of Medicine*, en 2010 [20].

1.2. Infrastructures

Les nanotechnologies ont pu bénéficier pour leur développement, et depuis maintenant plus de 20 ans, de la mise en place d'infrastructures spécifiques publiques ou privées [4,21]. Afin de mieux appréhender les différentes structures entre les Etats-Unis et l'Union Européenne, il a été choisi de scinder la description des deux organisations.

Tout d'abord, en 2000, devant l'intérêt grandissant pour le potentiel des nanotechnologies, les États-Unis ont créé la *National Nanotechnology Initiative* (NNI), organisation gouvernementale coordonnant la recherche et les ressources financières pour le développement des nanotechnologies [2,22]. Quatre ans plus tard, en 2004, grâce à l'association du *National Cancer Institute* (NCI), du *National Institute of Standards and Technology* (NIST) et de la *Food and Drug Administration* (FDA), le *Nanotechnology Characterization Laboratory* (NCL) est fondé. Il s'agit d'une structure dédiée à la caractérisation et aux études de sécurité précliniques des nanoparticules [23,24]. Enfin, en 2012, à l'initiative du NCI, un consortium est créé pour accélérer le développement et l'utilisation des nanotechnologies dans le diagnostic et le traitement des cancers. Ce partenariat public/privé appelé « *Translation Of Nanotechnology In Cancer* » (TONIC) réunit des experts des secteurs publics et privés provenant du monde universitaire, du gouvernement et de l'industrie [23].

En parallèle, en Europe en 2005, les industriels des nanotechnologies, en collaboration avec la Commission Européenne, fondent la Plateforme Technologique Européenne de Nanomédecine (ETPN) dans le but de développer les applications des nanotechnologies en santé et de faire de l'Europe le leader mondial de la nanomédecine. En 2015, l'ETPN devient une association indépendante et choisit d'implanter son siège en France au sein de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle (ESPCI ParisTech). L'association rassemble aujourd'hui plus de 125 membres de 25 états membres différents couvrant tous les acteurs de la nanomédecine : universités, PME, industrie, agences publiques, Commission Européenne... [23,25]. L'*European Nanomedicine Characterization Laboratory* (EU-NCL) est créé en 2015. A l'instar de sa structure homologue américaine, ce laboratoire a pour vocation d'améliorer la caractérisation des nanoparticules pour diverses applications médicales telles que le cancer, le diabète ou encore les maladies inflammatoires chroniques [23,26].

La mise en place de ces infrastructures spécifiques est inédite et probablement liée aux attentes nombreuses de la recherche pharmaceutique pour développer les nanomédicaments, en particulier dans le domaine de la cancérologie [27].

1.3. Classification des nanosystèmes pharmaceutiques

Les nanomédicaments peuvent être composés d'une grande variété de matériaux et de structures physiques différentes. Il existe de multiples manières de classer les nanosystèmes (ou nanovecteurs) pharmaceutiques, toutes basées sur des critères tels que leur composition chimique, leur forme, leur taille ou encore leur mode de synthèse [28].

Deux classifications sont fréquemment retrouvées dans la littérature. La première distingue les nanodispositifs des nanomatériaux ; ces derniers pouvant être divisés en nanocristaux et nanostructures polymères et non polymères (**Figure 2**) [4,29,30].

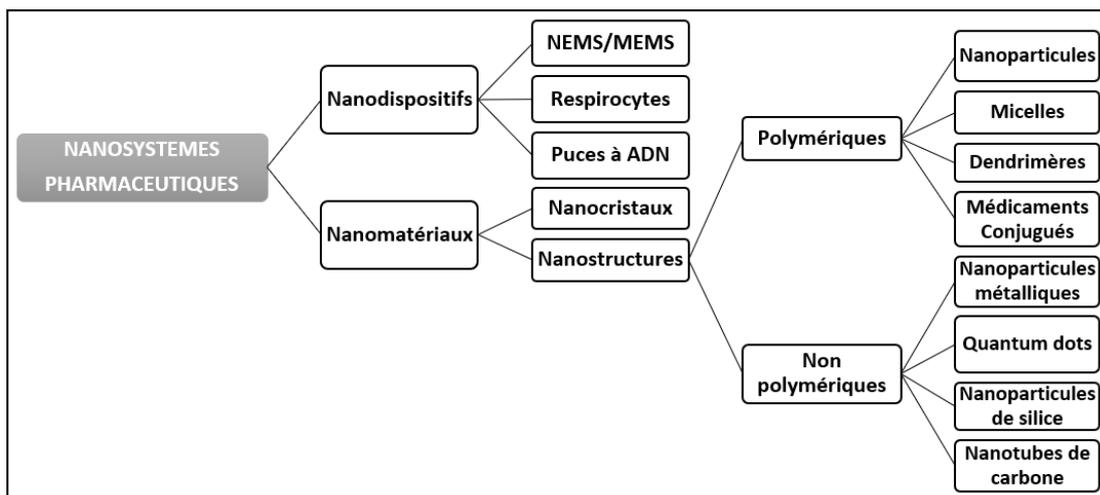


Figure 2. Diagramme des différents types de nanosystèmes pharmaceutiques.

NEMS: Nano-Electro-Mechanical-System; MEMS: Micro-Electro-Mechanical-System

La seconde classification différencie les nanosystèmes en deux catégories : les nanosystèmes organiques et les nanosystèmes inorganiques (**Figure 3**) [2,7,31].

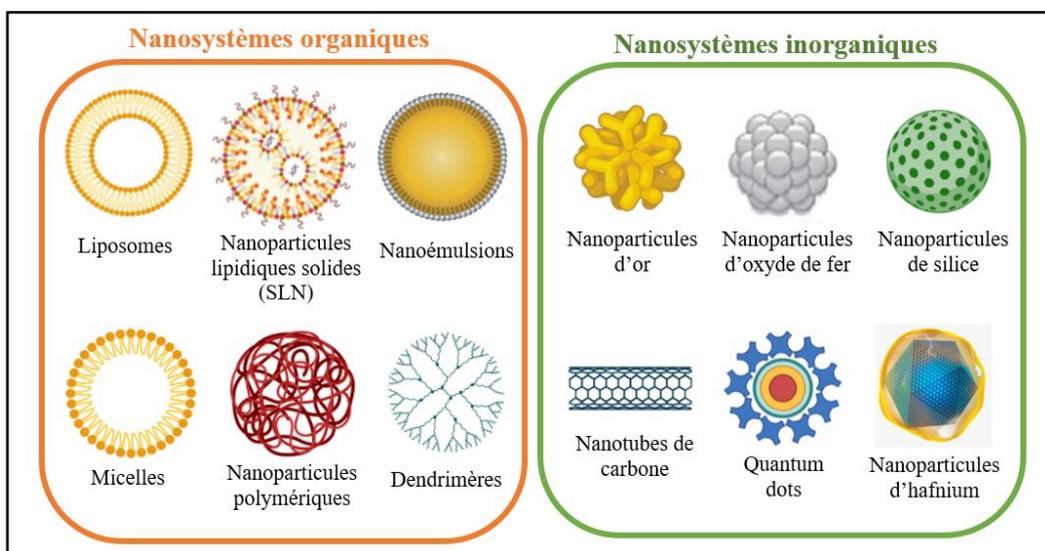


Figure 3. Nanosystèmes pharmaceutiques organiques et inorganiques.

Les nanosystèmes à usage médical disponibles sur le marché sont détaillés ci-après :

Nanocristaux

Les nanocristaux sont des nanoparticules cristallines présentant au moins une dimension inférieure à 100 nm. Ils n'ont pas de matrice et sont donc entièrement composés de la substance active. La dispersion des nanocristaux dans un liquide permet d'obtenir des nanosuspensions, formulations utilisées pour augmenter la solubilité de molécules hydrophobes. Les nanosuspensions présentent un taux de dissolution élevé du principe actif et permettent donc d'améliorer la biodisponibilité. En général, les nanosuspensions doivent être stabilisées en utilisant des tensioactifs ou des stabilisants polymères [2,32,33].

Liposomes

Les liposomes sont des nanovésicules organiques artificielles dont la membrane est constituée d'une (ou plusieurs) bicouche(s) phospholipidique(s) renfermant une cavité aqueuse. La nanomédecine s'intéresse depuis longtemps à ces structures en raison de leurs nombreux avantages : petite taille (50 à 200 nm), biocompatibilité, biodégradation, transport de principes actifs lipophiles (membrane) et/ou hydrophiles (cœur), augmentation possible de la demi-vie plasmatique après pégylation de la bicouche lipidique, c'est-à-dire ajout de chaînes plus ou moins longues de polyéthylène glycols (PEG). Le principal inconvénient des liposomes est leur faible stabilité chimique engendrée par une hydrolyse *in vivo* des phospholipides. Pour pallier cela, de nouvelles nanovésicules plus stables (polymersomes et niosomes) sont actuellement à l'étude (**Figure 4**) [2,4,32].

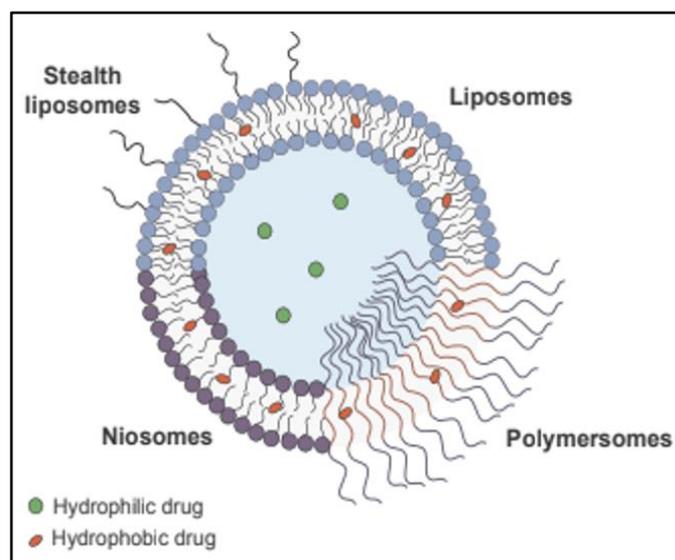


Figure 4. Liposomes et dérivés. (Reproduite à partir de Bisso *et al.* [2])

Stealth liposomes : liposomes rendus furtifs après introduction de lipides pégylés au sein de la membrane phospholipidique ; *Niosomes* : vésicules dont la membrane est une bicouche de tensioactifs non-ioniques ; *Polymersomes* : vésicules dont la membrane est composée d'une bicouche de copolymères autoassemblés

Micelles

Les micelles sont des nanovecteurs supramoléculaires généralement sphériques de taille comprise entre 10 et 200 nm constitués d'un noyau et d'une enveloppe. Elles sont formées par l'auto-assemblage de molécules amphiphiles : tensioactifs de bas poids moléculaire (micelles de tensioactifs) ou copolymères (micelles polymères). Les structures micellaires sont intéressantes pour la vectorisation de principes actifs. En effet, d'une part, usuellement, leur noyau hydrophobe peut transporter un ou plusieurs médicaments, particulièrement les molécules peu solubles dans l'eau. D'autre part, leur enveloppe hydrophile stabilise le cœur de la micelle et protège le médicament en milieu aqueux. Cette enveloppe peut être fonctionnalisée dans le but d'obtenir un ciblage plus précis ayant pour conséquence une augmentation de la spécificité et de l'efficacité avec une diminution de la toxicité. Les nanostructures micellaires présentent une perméabilité et une solubilité élevée. Il est à noter que, généralement, les micelles polymères sont plus stables dans le sang que les micelles de tensioactifs et les liposomes. Cependant, leurs points faibles sont les suivants : maîtrise difficile de la libération du principe actif et cytotoxicité (interaction des molécules membranaires amphiphiles avec les membranes cellulaires) [2,31,32].

Nanoparticules dendrimères

Les nanoparticules dendrimères sont des nanovecteurs globulaires arborescents de petite taille (< 10 nm). Elles sont constituées d'un noyau central auquel se rattachent de nombreuses ramifications parfaitement identiques et hautement fonctionnalisées. Au fur et à mesure de la croissance en génération d'un dendrimère (augmentation exponentielle du nombre de fonctions périphériques), trois compartiments vont apparaître :

- la surface multivalente composée des fonctions périphériques libres ;
- les couches externes situées sous la surface et protégées du milieu extérieur par la surface périphérique ;
- le cœur, point d'attache des ramifications, complètement isolé du milieu extérieur.

Les dendrimères présentent les avantages suivants : structure uniforme, masse moléculaire définie, faible polydispersité et haut potentiel de fonctionnalisation [4,32].

Nanocapsules

De manière générale, les nanocapsules sont des nanovecteurs vésiculaires composés d'un cœur huileux ou aqueux enrobé d'une fine coque rigide pouvant être constituée de polymères naturels ou synthétiques. Leur taille varie de 30 à 200 nm. Les nanocapsules ont la capacité d'intégrer une grande variété de molécules y compris des molécules biologiquement instables telles que des acides nucléiques, des peptides ou des protéines qui vont pouvoir ainsi échapper *in vivo* à leur dégradation hydrolytique et enzymatique. Ce sont des nanosystèmes biodégradables présentant une bonne biocompatibilité et qui en fonction de leur composition, peuvent présenter une capacité de charge élevée [2,34–37]. Il est à noter ici que la partie expérimentale de ce manuscrit porte sur les nanocapsules lipidiques (NCLs), nanocapsules formées d'un cœur huileux composé de triglycérides à chaîne moyenne et d'une coque associant phospholipides et tensioactifs [36].

Nanoémulsions

Une nanoémulsion est constituée de 2 liquides non miscibles, l'un étant dispersé dans l'autre sous forme de nano-gouttelettes (20 à 200 nm de diamètre). Les nanoémulsions utilisées dans le domaine pharmaceutique sont quasi-exclusivement des nanoémulsions huile dans eau (H/E). Elles peuvent être utilisées pour le transport et la libération de principes actifs. Malheureusement, ces structures peuvent être instables et donc sujettes aux phénomènes de type oxydation, crémage, floculation, séparation de phase... Néanmoins, l'utilisation de tensioactifs optimisés pour les stabiliser permet de faciliter leur utilisation en pratique courante [2].

Nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères sont des nanovecteurs solides matriciels pouvant transporter un large éventail de molécules (principes actifs, protéines, acides nucléiques, agents diagnostiques...). Le transport de ces molécules peut se faire soit *via* leur intégration au sein du noyau de la nanoparticule, soit par liaison physique ou chimique à sa surface. Les polymères synthétiques les plus utilisés en formulation de nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs sont des polymères biodégradables (PLA : polylactide ; PGA : polyglycolide ; PLGA : poly(lactide-co-glycolide) ; PACA : poly(cyanoacrylate d'alkyle) ; PAA : poly(acide aminé)) présentant une faible toxicité puisque pouvant être facilement métabolisés et dégradés par l'organisme avant d'être éliminés. L'enthousiasme pour ce type de nanovecteur est lié à leur facilité de synthèse, leur faible coût de production ainsi qu'à la possibilité d'obtenir des structures présentant une grande diversité de composition, d'architecture et de fonctionnalisation. Comparés aux autres, ces nanosystèmes relativement stables présentent la plus longue durée d'action, sans toutefois dépasser 24 heures [2,32,38].

Nanoparticules inorganiques

La grande famille des nanoparticules inorganiques contient une large variété de nanosystèmes (**Figure 3**). Bien que ces nanoparticules présentent des propriétés électroniques intéressantes pour une utilisation en diagnostic ou en thérapeutique, leur développement reste souvent limité aux stades précliniques et ils sont peu retrouvés dans les nanomédicaments autorisés, principalement en raison de leur faible biodégradabilité et de leur mauvaise biocompatibilité. Les nanoparticules inorganiques actuellement disponibles sur le marché sont limitées aux nanoparticules d'oxydes métalliques : nanoparticules d'oxyde de fer et nanoparticules d'oxyde d'hafnium [2,30,31].

Conclusion

En fonction de l'application recherchée, la forme et le choix des matériaux sont déterminants puisqu'ils vont pouvoir conférer des caractéristiques spécifiques aux systèmes nanoparticulaires et donc des capacités d'interactions avec les milieux biologiques plus ou moins importantes influençant leur pharmacocinétique [39–42].

Parmi les nanosystèmes pharmaceutiques qui ont été développés depuis l'essor de la nanomédecine, les systèmes liposomaux, les nanoparticules polymères, et plus récemment les nanocapsules, sont les plus étudiés et semblent être les plus prometteurs.

1.4. Applications médicales

Initialement, le champ d'application de la nanomédecine s'est naturellement tourné vers le diagnostic et le traitement des cancers, pathologies dont l'incidence ne cesse d'augmenter en dépit d'une meilleure connaissance des facteurs de risques et de la mise en place de dépistages précoces. Toutefois, des applications sont également attendues dans d'autres domaines comme les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives ou le développement de nouveaux vaccins par exemple [43,44].

Les nanotechnologies à usage médical sont étudiées, voire pour certaines déjà utilisées en pratique courante, dans quatre types d'applications :

- le diagnostic (nanodiagnostic) ;
- l'administration contrôlée de principes actifs (nanothérapie) ;
- la médecine régénérative ;
- la théranostique (nanothéranostique).

Alors que les nanosystèmes non polymères sont utilisés en diagnostic (*in vitro* ou *in vivo*), les nanostructures polymères sont plutôt mises au service de la galénique pour créer de nouveaux systèmes de libération de molécules actives (« *drug delivery system* » (DDS)) [4].

Les nanomédicaments en cours de développement ou déjà disponibles sur le marché à des fins de diagnostic sont essentiellement des agents de contraste utilisant des nanoparticules d'oxyde de fer ou d'or, des liposomes de gadolinium ou de maghémite (magnétoliposomes), des quantum dots ou encore des nanocapsules de perfluorocarbures. Bien que le profil toxique de ces nouveaux agents de contraste soit encore peu connu, l'accumulation de ceux-ci dans certains tissus ne fait aucun doute. Ainsi, leur développement en tant qu'outils d'imagerie reste très limité [45,46].

Les nanomédicaments à visée thérapeutique sont essentiellement employés dans le traitement des cancers. En voici quelques exemples : le cancer des ovaires (Caelyx® - doxorubicine liposomale pégylée), le cancer du sein (Abraxane® - nanoparticules de paclitaxel liées à de l'albumine humaine) ou encore les leucémies (Vyxeos® - daunorubicine/cytarabine liposomales). D'autres applications sont possibles puisque certains nanovecteurs ont permis d'encapsuler un antifongique (Ambisome® - amphotéricine B liposomale), un anesthésique (Diprivan® - nanoémulsion de propofol), un immunosuppresseur (Sandimmun® - nanoémulsion de ciclosporine) et même du matériel génétique tel qu'un ARN silence (Onpattro® - nanocapsules de patisiran sodique) [14,39]. Les nanomédicaments actuellement autorisés sur le marché européen sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Nanomédicaments autorisés dans l'Union Européenne. [14,47,48]

Type	Spécialité	Laboratoire pharmaceutique	DCI	Autorisation EMA	Forme galénique	Indications
Nanocristaux	Emend®	Merck	Aprépritant	2003	Gélules, poudre pour suspension buvable	Antiémétique
	Lipanthyl®	Laboratoires Fournier	Fénofibrate	2000	Comprimés	Hyperlipidémie
	Ivemend®	Merck	Fosaprépitant dimeglumine	2008*	Solution injectable	Antiémétique
	Zypadhera®	Lilly	Olanzapine pamoate	2008	Poudre et solvant pour suspension injectable	Schizophrénie
	Invega®	Janssen Pharmaceuticals	Palipéridone	2007*	Comprimés	Schizophrénie
	Xeplion®/Trevicta®	Janssen Pharmaceuticals	Palipéridone palmitate	2016	Suspension injectable	Schizophrénie
	Rapamune®	Wyeth Pharmaceuticals	Sirolimus	2010	Comprimés, solution buvable	Immunosuppresseur dans la transplantation rénale
Liposomes	AmBisome®	NeXstar Pharmaceuticals	Amphotéricine B liposomale	1998	Poudre pour dispersion injectable	Aspergillose/candidose systémique, Cryptococcose méningée
	DaunoXome®	Galen LTD	Daunorubicine liposomale	1996*	Dispersion liposomale injectable	Sarcome de Kaposi
	Caelyx®	Baxter	Doxorubicine liposomale pégylée	1996	Dispersion liposomale injectable	Cancer du sein, Cancer de l'ovaire, Sarcome de Kaposi
	Myocet	Teva	Doxorubicine liposomale	2000*	Poudre et solvant pour dispersion injectable	Cancer du sein métastatique
	Vyxeos®	Jazz Pharmaceuticals	Daunorubicine/ Cytarabine liposomales	2018	Poudre pour dispersion injectable	Leucémie aiguë myéloblastique
	Onivyde®	Merrimack Pharmaceuticals	Irinotecan sucrosulfate liposomal pégylé	2016	Dispersion liposomale injectable	Adénocarcinome métastatique du pancréas
	Mepact®	Takeda	Mifarmutide liposomal	2009*	Poudre pour solution injectable	Ostéosarcome non métastatique
	DepoDur®	SkyePharma	Sulfate de morphine liposomal	2006*	Suspension injectable	Analgésie post-opératoire
Visudyne®	QLT Phototherapeutics	Vertéporfine	2000	Poudre pour solution injectable	Néovascularisation choroïdienne dans la DMLA exsudative	
Micelles	Apealea®	Oasmia Pharmaceutical	Paclitaxel micellaire	2018	Poudre pour solution injectable	Cancers de l'ovaire, du péritoine et des trompes de Fallope
Nanocapsules	Abelcet®	Defiante Farma	Amphotéricine B	1997	Suspension injectable	Aspergillose/candidose systémique
	Spikevax®	Moderna	Elasoméran	2020	Dispersion injectable	Prévention de la Covid-19
	Onpattro®	Alnylam	Patisiran sodique	2018	Solution injectable	Amylose héréditaire à transthyréline
	Comirnaty®	Pfizer-BioNTech	Tozinaméran	2020	Dispersion injectable	Prévention de la Covid-19
Nanoémulsions	Neoral®/Sandimmun®	Novartis	Ciclosporine	1995	Capsule molle/ Solution buvable	Prévention du rejet de greffe, Syndrome néphrotique, Psoriasis, Polyarthrite rhumatoïde, Dermatite atopique
	Oncaspar®	Enzon pharmaceuticals	L-asparaginase pégylée	2016	Solution injectable	Leucémie aiguë lymphoblastique, Leucémie myéloïde chronique

* Non commercialisé en France

** Non encore commercialisé à ce jour

Tableau 1 (suite). Nanomédicaments autorisés dans l'Union Européenne. [14,47,48]

Types	Spécialités	Laboratoire pharmaceutique	DCI	Autorisation EMA	Forme galénique	Indications
Nanoémulsions	Diprivan®	Fresenius Kabi	Propofol	2001	Emulsion injectable	Sédatif/hypnotique utilisé comme anesthésique général
Nanoparticules polymères	Cimzia®	UCB Pharma	Certolizumab-pegol	2009	Solution injectable	Polyarthrite rhumatoïde, Maladie de Crohn, Spondylarthrite ankylosante, Rhumatisme psoriasique
	Mircera®	Vifor	Methoxy-PEG-Epoïétine β	2018	Solution injectable	Anémie
	Neulasta®	Amgen	Pegfilgrastim	2002	Solution injectable	Neutropénie post-chimiothérapie anticancéreuse
	Pegasys®	Genentech USA	Peginterferon alfa 2a recombinant	2002	Solution injectable	Hépatite B, Hépatite C
	Somavert®	Pfizer	Pegvisomant	2003	Poudre et solvant pour solution injectable	Acromégalie
Nanoparticules protéiques	Copaxone®	Teva	Copolymère d'acétate de glatiramère	2016	Solution injectable	Sclérose en plaque
	Abraxane®	Celgene	Nab-Paclitaxel	2008	Poudre pour solution injectable	Cancer du sein métastatique, Cancer du poumon, Adénocarcinome métastatique du pancréas
	Zevalin®	Bayer	⁹⁰ Yttrium-Ibritumomab tiuxétan	2004	Dispersion injectable	Lymphome non hodgkinien
Nanocomplexes	Renagel®/ Renvela®	Sanofi-Aventis	Chlorhydrate/ Carbonate de sevelamer	2007	Comprimés/Poudre pour suspension buvable	Hyperphosphorémie de l'insuffisant rénal chronique dialysé
Nanoparticules dendrimères	Vivagel BV®	StarPharma	Astrodimère sodique	2015*	Gel pour application locale	Prophylaxie des maladies sexuellement transmissibles
Nanoparticules inorganiques	Venofer®	Vifor	Complexe d'hydroxyde ferrique - saccharose	1998	Solution injectable	Anémie par carence martiale
	Ferinject®	Vidor	Carboxymaltose ferrique	2010	Solution injectable	Anémie par carence martiale
	Hensify®	Nanobiotix	NBTXR3 - Oxyde d'hafnium	2019**	Suspension injectable	Sarcome des tissus mous localement avancé

* Non commercialisé en France

** Non encore commercialisé à ce jour

La médecine régénérative vise à restaurer les tissus, et donc les fonctions des organes, en utilisant l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire [4,49,50]. Le recours aux nanomédicaments dans ce domaine en est à l'état de concept avec un potentiel important d'applications. En effet, la régénération des tissus, en considérant l'utilisation des nanovecteurs biocompatibles, ne semble pas limitée si la vectorisation permet d'atteindre le tissu cible (cérébral, hépatique, cutané, oculaire ou encore cardiaque). Les nanoparticules polymères microsphériques constituées d'un copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA) sont le véhicule le plus utilisé [46,49,51]. Les nanoformulations les plus avancées concernent l'encapsulation de facteurs de croissance comme par exemple le facteur de croissance neurotrophique issu des cellules gliales (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF)). Du fait de la courte demi-vie du GDNF et de son passage limité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'utilisation de ce nanomédicament représente une réelle source d'espoir dans le traitement de la maladie de Parkinson. D'autres études s'intéressent à l'encapsulation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF)). De tels nanomédicaments permettraient de régénérer le tissu cardiaque détruit à la suite d'un accident cardiaque ischémique [51].

Enfin, il subsiste une dernière application, toujours en phase de développement : la nanothéranostique. Il s'agit dans cette approche d'utiliser des nanomédicaments contenant, dans une même formulation, à la fois un agent d'imagerie et un principe actif afin de combiner la thérapie au diagnostic [52,53]. Les nanomédicaments destinés à des applications théranostiques sont en plein essor avec par exemple l'utilisation récente d'un radionucléide, le lutétium, qui possède des propriétés diagnostiques (imagerie médicale en médecine nucléaire) et thérapeutiques. Ce dernier a été associé d'une part à un analogue de la somatostatine pour le diagnostic et le traitement des tumeurs neuroendocrines (^{177}Lu -DOTATATE) et, d'autre part, à un antigène membranaire spécifique de la prostate pour une utilisation chez les patients atteints de tumeurs métastatiques prostatiques (^{177}Lu -PSMA-617) [45,52].

2. Développement des nanomédicaments : intérêts et limites

Il est évident que les nanomédicaments ont bénéficié d'un développement rapide motivé par la nécessité d'avoir à disposition des outils diagnostiques toujours plus rapides et sensibles et des thérapies plus sûres, plus efficaces et plus personnalisées. Au cours de leur développement, les avantages théoriques des nanomédicaments sont restés longtemps sans ambiguïté : faible toxicité, temps de circulation dans le sang augmenté, clairance diminuée, bonne stabilité dans les milieux biologiques et bonne reproductibilité de formulation. Ainsi, de grands espoirs ont été fondés pour une utilisation en clinique. Toutefois, de nombreuses limites entravent le développement des nanomédicaments [54].

2.1. Intérêts des structures nanométriques

2.1.1. Taille des nanovecteurs et surface de contact disponible

En raison de leur petite taille, les nanoparticules présentent un rapport surface/volume extrêmement élevé. En effet, pour un volume équivalent, plus la matière constituant ce volume est petite et plus la surface de contact avec l'extérieur est grande (**Figure 5**). Ainsi, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques et chimiques radicalement différentes des structures de même composition mais de taille supérieure. Les nanovecteurs possèdent une énergie de surface élevée les rendant hautement réactifs [14].

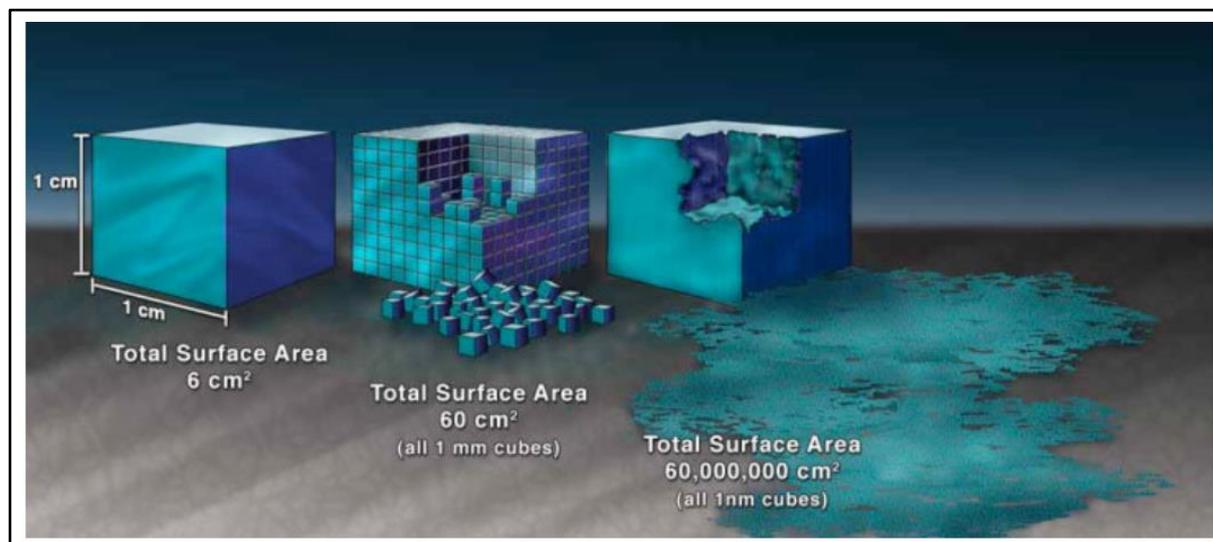


Figure 5. Effet de la diminution de la taille d'un cube sur la surface de contact.
(Reproduite d'après www.nano.gov [22])

Dans le cas des nanocristaux, une surface disponible importante entraîne une augmentation de la vitesse de dissolution et donc une augmentation de la quantité de substance active libre ce qui favorise l'absorption de cette dernière et, par conséquent, améliore sa biodisponibilité [55]. Cela peut être illustré par l'exemple du Lipanthyl® 67 mg en gélule, avec la substance active sous forme micronisée, qui est bioéquivalent au Lipanthyl® 100 mg comprimés avec la substance active qui est sous la forme standard [56].

La surface disponible est l'un des critères d'identification des nanomédicaments et plus largement des nanomatériaux. En effet, dans une recommandation du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux, la Commission Européenne précise que « *Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition [de nanomatériau] dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$* » [11,12].

2.1.2. Solubilisation de substances actives hydrophobes

De nombreux anticancéreux ont montré, du fait de leurs propriétés physicochimiques, des problèmes de solubilité, de stabilité ou encore de faible biodisponibilité [17]. Les nanovecteurs sont des DDS qui permettent d'améliorer la solubilité des principes actifs peu solubles et/ou non stables dans les milieux biologiques puisque leurs formulations associent des excipients hydrophiles et hydrophobes [4].

Le meilleur exemple est peut-être celui du paclitaxel, molécule lipophile donc peu soluble en milieu aqueux. En effet, la formulation de médicaments conventionnels à base de cet anticancéreux et pour une administration par voie intraveineuse nécessite le recours à des excipients toxiques tels que l'huile de ricin polyoxyéthylénée (Cremaphor EL®) ou l'éthanol. Le développement puis la mise sur le marché en 2008 de l'Abraxane®, nanomédicament utilisant de l'albumine humaine pour améliorer la solubilisation du paclitaxel, a permis d'ôter ces excipients toxiques améliorant ainsi la tolérance du médicament et permettant d'administrer des doses plus importantes [23,57].

Citons également l'exemple de l'AmBisome®, une formulation liposomale d'amphotéricine B mise sur le marché en 1998. L'amphotéricine B est un antifongique lipophile pour lequel il existe une formulation conventionnelle injectable sous forme de suspension d'amphotéricine B désoxycholate (Fungizone®). Malheureusement, la toxicité de ce médicament, en particulier au niveau rénal, limite la dose pouvant être administrée. Les avantages de l'AmBisome® par rapport à la Fungizone® sont les suivants : amélioration des propriétés pharmacocinétiques, meilleure stabilité, diminution de l'accumulation dans les tissus sains et réduction des effets indésirables [32,58].

2.1.3. Vectorisation

C'est notamment par un meilleur ciblage (ou vectorisation) des sites pathologiques que les nanomédicaments présentent un bénéfice thérapeutique important, particulièrement en

cancérologie. Ce ciblage peut être passif, c'est-à-dire engendré par des mécanismes physiologiques ou physiopathologiques, ou actif après fonctionnalisation des nanovecteurs.

a) Ciblage passif

Le ciblage passif des cellules pathologiques par les nanomédicaments repose principalement sur la théorie de l'effet EPR « *Enhanced Permeability Retention* ». Ce phénomène a été décrit dans les années 80 pour les macromolécules et correspond à une augmentation de la perméabilité vasculaire liée à l'existence de fenestrations du tissu endothélial dans certaines situations pathologiques telles que l'inflammation ou la croissance de tumeurs solides [59–62].

Dans le cas de l'inflammation, un remodelage vasculaire, lié à l'activation du système immunitaire, est opéré pour permettre une pénétration des leucocytes dans le tissu. L'augmentation de la perméabilité vasculaire en résultant peut permettre la rétention de nanoparticules au sein des tissus enflammés ou infectés [63].

Dans le cas des tumeurs solides, le développement tumoral entraîne la formation de nombreux vaisseaux sanguins (néovascularisation) afin d'apporter oxygène et éléments nutritifs nécessaires à la croissance tumorale. Ce réseau vasculaire anormal présentant un épithélium fenestré et un drainage lymphatique faible permet l'extravasation et l'accumulation massive des nanomédicaments dans le tissu tumoral en comparaison aux autres tissus (**Figure 6**) [62,64,65]. Toutefois, le taux d'accumulation dans la tumeur dépend de plusieurs paramètres que sont la taille du nanovecteur, le temps de circulation plasmatique du nanomédicament, le degré de vascularisation de la tumeur et la taille des fenestrations endothéliales [63]. Il sera abordé dans une prochaine partie toutes les limites liées à cette théorie conceptuelle du ciblage passif (2.2.7 Limites du ciblage).

b) Ciblage actif

Le ciblage actif des cellules pathologiques par les nanomédicaments résulte de la fonctionnalisation de la surface externe des nanovecteurs. L'ajout de ligands tels que des peptides, des protéines ou encore des anticorps va leur conférer le pouvoir d'interagir avec des récepteurs présents à la surface des cellules cibles (**Figure 6**) [65]. Ceci est d'autant plus intéressant que, bien souvent, les cellules pathologiques surexpriment certains récepteurs ou antigènes de surface ; ainsi il en résulte un ciblage très spécifique [66,67]. Cependant, la fonctionnalisation des nanovecteurs facilite leur reconnaissance, leur phagocytose après opsonisation et donc leur dégradation par les macrophages du Système Réticulo-Endothélial (SRE). Par conséquent, il est essentiel d'adapter le nombre de ligands à la surface des nanovecteurs afin de conserver un ciblage actif efficace tout en limitant l'activation du SRE [68]. La pégylation est un moyen de rendre les nanoparticules furtives pour le SRE. Elle permet de créer une couronne hydrophile qui limite l'accès des cellules spécialisées telles que les macrophages [69,70]. Bien que de nombreux nanomédicaments utilisant un ciblage actif soient en phase d'essai clinique plus ou moins avancée, à ce jour aucun n'est encore autorisé sur le marché [65,66,71,72].

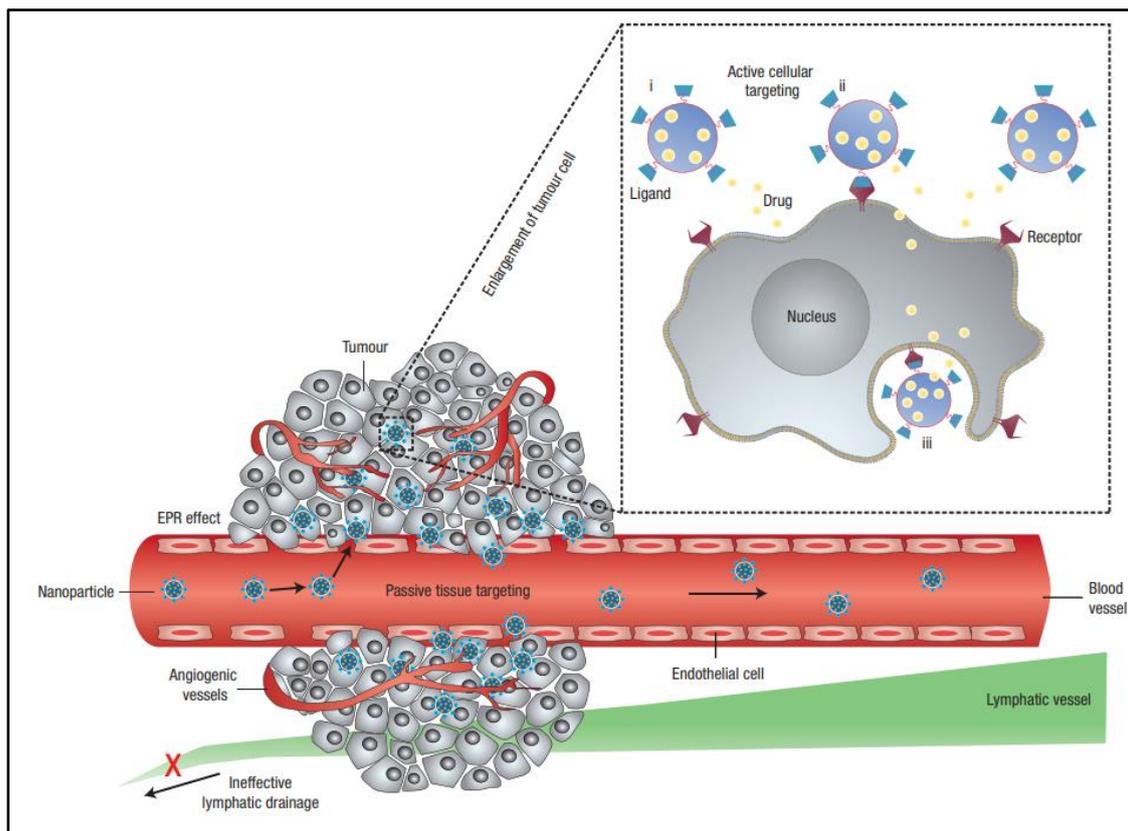


Figure 6. Mécanismes de vectorisation des cellules tumorales par les nanomédicaments.
(Reproduite à partir de Peer *et al.* [65])

Vectorisation passive via l'effet EPR ; Vectorisation active par fonctionnalisation des nanoparticules : (i) relargage du principe actif à proximité des cellules cibles ; (ii) liaison à la membrane cellulaire des cellules cibles et action en tant que réservoir extracellulaire à libération prolongée ; (iii) internalisation dans la cellule cible par endocytose

2.1.4. Amélioration du profil pharmacocinétique

La force des nanovecteurs comme DDS réside dans leur capacité à pouvoir modifier la pharmacocinétique des molécules actives transportées. Les deux avantages majeurs sont la protection du principe actif des dégradations enzymatiques, chimiques ou immunitaires (SRE) et la diminution de l'élimination rénale. Ainsi, les nanovecteurs permettent de diminuer la quantité de principe actif administrée dans l'organisme par diminution de la dose par prise et/ou par diminution de la fréquence d'administration [4,73]. De plus, ces nouveaux DDS facilitent le franchissement des principes actifs à travers les membranes cellulaires pour atteindre les cellules et donc augmenter l'efficacité thérapeutique [4].

Ces modifications substantielles du profil pharmacocinétique apportées permettent bien souvent d'augmenter la tolérance des médicaments transportés. L'amélioration du profil pharmacocinétique passe par une diminution des concentrations toxiques (diminution de la C_{max}) associée à des concentrations à l'équilibre efficaces pendant toute la durée du traitement (Aire Sous la Courbe (ASC) stable) grâce à une libération contrôlée de l'actif [74]. Ceci permet une

exposition prolongée des cellules cibles à des concentrations thérapeutiques efficaces de principe actif. Ainsi, dans le domaine de la cancérologie, en parvenant à mieux cibler les tumeurs sans trop exposer l'individu, les nanomédicaments améliorent la marge thérapeutique des anticancéreux [23].

Le premier nanomédicament disponible sur le marché a été le Doxil® (FDA - 1995). Il s'agit de liposomes pégylés encapsulant de la doxorubicine, anticancéreux de la famille des anthracyclines. Bien que cette nanoformulation n'ait pas permis d'améliorer le bénéfice clinique du cancer du sein (survie globale et survie sans progression tumorale), elle conduit à l'amélioration de la biodisponibilité accompagnée d'une augmentation du temps de circulation et d'une diminution de la toxicité cardiaque. En revanche, la fréquence d'apparition de la toxicité cutanée a aussi augmenté (érythrodysesthésie palmo-plantaire ou syndrome main-pied), cela étant probablement lié à l'allongement du temps de circulation entraînant une biodistribution non spécifique vers des tissus sains [32,74,75].

2.2. Limites des nanosystèmes pharmaceutiques

Compte tenu du faible nombre de nanomédicaments commercialisés à ce jour après plus de 30 ans de recherche, on peut affirmer aujourd'hui que la réussite concernant le développement des nanotechnologies dans le domaine médical n'est pas au rendez-vous [76]. Reste à comprendre les causes de cet échec. L'enthousiasme était-il exagéré ? Les doutes sur l'innocuité ont-ils gagné une partie de la communauté scientifique [77,78] ? Bien que les nanoformulations aient permis des avancées majeures avec le développement et la mise sur le marché de nouveaux médicaments, en particulier en cancérologie, des limites persistent [79].

2.2.1. Caractérisation physicochimique

La caractérisation physicochimique des nanovecteurs apparaît comme un défi technique majeur tant pour les scientifiques que pour les autorités réglementaires et nécessite des investissements importants. Cette étape est indispensable pour comprendre le comportement des nanovecteurs dans l'organisme mais aussi pour améliorer l'évaluation de la sécurité des nanomédicaments. Le recours à des méthodes fiables et précises est nécessaire pour détecter et quantifier les nanomédicaments avant et après leur administration.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur les méthodes à employer ni sur le nombre de paramètres à évaluer. Outre la taille, la forme et la charge électrostatique, il semblerait judicieux de déterminer au minimum les caractéristiques suivantes : degré d'agrégation, structure cristalline, surface spécifique, porosité, composition chimique, solubilité dans l'eau, vitesse de dissolution et, le cas échéant, qualité des molécules fixées en surface et densité des ligands accrochés [14]. Tous ces paramètres sont parfois difficilement évaluables. Cependant, ils sont essentiels puisqu'ils peuvent modifier les propriétés physicochimiques intrinsèques des

nanovecteurs et donc leur pharmacocinétique, leur pharmacodynamie et leurs interactions avec leur cible [54,57].

Idéalement, la caractérisation physicochimique des nanovecteurs devrait être effectuée au cours de toutes les étapes de développement d'un nanomédicament, des premiers essais *in vitro* aux évaluations *in vivo*. Il apparaît indispensable d'établir un consensus international à ce sujet pour gagner en précision et en standardisation [14,80,81].

2.2.2. Capacité d'encapsulation du principe actif

L'efficacité d'encapsulation d'un principe actif est l'un des paramètres importants lors du développement des nanomédicaments. La quantité de principe actif transportable dans les nanovecteurs est extrêmement limitée en comparaison aux médicaments conventionnels. Par exemple, les micelles polymères peuvent encapsuler seulement 10 % de leur masse totale (masse de principe actif/masse de l'ensemble des nanovecteurs). De plus, la perte de principe actif non encapsulé lors de la phase de formulation n'est pas négligeable. Afin de limiter ces pertes, il est possible d'utiliser des polymères ayant une affinité spécifique pour la molécule encapsulée [82,83].

2.2.3. Reproductibilité et maîtrise des procédés de formulation au niveau industriel

L'obtention de nanovecteurs homogènes sur le plan physique et chimique est l'un des challenges importants de l'industrie pharmaceutique. Aucune méthode d'obtention des nanomédicaments n'est parfaite. Sont en cause des procédés de formulation souvent complexes avec de nombreuses étapes (homogénéisation, sonication, centrifugation, évaporation des solvants, purification, lyophilisation, stérilisation...). Si cela est généralement simple, relativement facile à maîtriser et peu coûteux en laboratoire de recherche, il est souvent moins aisé de produire ces nanomédicaments à l'échelle industrielle. Cela entraîne des problèmes de reproductibilité inter-lots et représente une des limites majeures du développement des nanomédicaments. En effet, toute variation de formulation liée au procédé de fabrication est susceptible d'entraîner des modifications des propriétés physicochimiques (taille, charge de surface, taux d'encapsulation et capacité de libération du principe actif...) à l'origine de modifications d'efficacité de ces nanomédicaments [32,84–86]. A noter qu'à cause de problèmes récurrents de production, la FDA a retiré en 2017 l'AMM du Dépocyte® [87].

2.2.4. Stabilité et stockage des nanomédicaments

Comme tout médicament, les nanomédicaments doivent rester stables de leur production jusqu'à leur administration [84]. Ceci doit impérativement être pris en compte car l'efficacité et/ou l'innocuité du nanomédicament après administration peuvent être affectées. Le principe actif lui-même peut aussi être à l'origine de la dégradation du nanovecteur.

Les problèmes de stabilité à long terme en solution aqueuse semblent essentiellement concerner les nanoparticules organiques. Une étape de purification est essentielle pour éliminer au maximum les résidus post-formulation (principe actif libre, excipients, solvants...) car ils peuvent déclencher ou catalyser des réactions de dégradation. S'ajoute à cela le recours à des procédés tels que la lyophilisation ou la congélation permettant de maintenir l'intégrité physicochimique des nanovecteurs. L'inconvénient de ces deux techniques est l'utilisation d'agents cryoprotecteurs, comme le tréhalose, qui peuvent à leur tour modifier les propriétés physicochimiques du nanovecteur [88–91]. A noter que les conséquences des modifications physicochimiques des nanovecteurs au cours du temps sont, par exemple, le relargage massif de principe actif ou l'apparition de phénomènes d'agrégaions lors de l'administration.

D'autres procédés de conservation peuvent être employés comme la stérilisation qui permet de fournir un médicament exempt de microorganismes. Ceci est nécessaire et obligatoire lors de l'usage de certaines voies d'administrations comme la voie parentérale. En plus d'utiliser du matériel et des matières premières stériles pour diminuer biocharge initiale, il est possible d'utiliser des méthodes de stérilisation dites terminales. Les méthodes qui semblent les plus utilisées sont, la filtration stérilisante qui est adaptée si les nanovecteurs ne mesurent pas plus de 200 nm ou encore l'autoclavage si les nanovecteurs peuvent résister à des conditions de températures et de pressions importantes (120°C pendant 20 min). Ajouté à cela l'irradiation aux rayons Gamma ou encore la stérilisation basse température par gaz plasma (45°C pendant 50 min) si cela ne modifie pas de façon substantielles les caractéristiques initiales du nanovecteur [92].

Il convient d'être particulièrement attentifs lors de ces étapes car les procédés de conservation eux-mêmes peuvent entraîner des modifications du nanovecteur. Il est donc nécessaire de rechercher les modifications physicochimiques liées aux procédés de conservation afin d'évaluer leurs éventuelles conséquences et de mettre en œuvre, si nécessaire, des ajustements (type de cryoprotecteur, vitesse de congélation...) [90,91].

2.2.5. Interactions avec les protéines

Comme évoqué précédemment, les nanovecteurs possèdent une surface de contact disponible importante leur conférant une énergie de surface élevée. Il en résulte une adsorption rapide de certaines molécules (protéines, lipides) à leur surface après contact avec les milieux biologiques. L'interaction la plus importante et la plus décrite est celle avec les protéines plasmatiques aboutissant à la formation d'une couronne de protéines à la surface des nanoparticules (en anglais : « *protein-nanoparticles corona formation* ») [93,94].

Deux conséquences majeures découlent de la présence de cette couronne protéique. D'une part, elle augmente l'élimination des nanoparticules par le SRE en favorisant l'opsonisation par les facteurs du complément [4]. D'autre part, elle modifie les propriétés physicochimiques initiales des nanovecteurs qui vont à leur tour influencer la composition et la taille de la couronne [95,96].

Au total, la formation d'une couronne de protéines autour des nanoparticules peut altérer leur ciblage, leur pharmacocinétique. Si le nanomédicament atteint sa cible malgré tout, les cellules cibles vont interagir avec cet ensemble couronne/nanovecteur qui est parfois très éloigné du nanovecteur initialement formulé [96–98]. Il apparaît donc nécessaire d'approfondir les expérimentations *in vitro* et *in vivo* pour permettre une meilleure prévision des effets biologiques des nanomédicaments [98,99]. Les conditions expérimentales sont de ce fait déterminantes pour étudier et comprendre ces interactions. La température, la composition ou encore le pH du milieu sont autant de facteurs de variabilité qui doivent être pris en compte [98,101].

2.2.6. Passage des barrières biologiques

Tout principe actif doit être capable de franchir les barrières biologiques de l'organisme afin de pouvoir atteindre son site d'action. La perte récente d'enthousiasme sur le potentiel des nanomédicaments est probablement associée à la compréhension de certains mécanismes relatifs au passage de ces barrières [21,102]. Quel que soit le type de médicament, ces barrières représentent un obstacle majeur à la biodistribution des molécules actives. Il est évident que sans leur présence, la conception de DDS serait beaucoup plus simple. Rappelons que le rôle de ces structures biologiques est de protéger les tissus des molécules exogènes ; il est ainsi plutôt logique que leur franchissement ne soit pas aisé.

Il existe deux types de barrières : les barrières épithéliales et les barrières endothéliales. Les barrières épithéliales sont représentées par les muqueuses (ex : cornée, muqueuse nasale, muqueuse gastro-intestinale, muqueuse pulmonaire) et l'épiderme. Les barrières endothéliales, dont fait partie la BHE, sont des barrières vasculaires.

Depuis quelques années, plusieurs approches ont été proposées pour améliorer le passage des molécules actives à travers ces barrières, dont certaines très prometteuses [102–105]. Néanmoins, le passage de certaines molécules, notamment au travers de la BHE, n'est pas sans poser des problèmes de toxicité neurologique [102]. Une connaissance fine de la biodistribution et du passage des barrières biologiques est essentielle pour bien apprécier le profil toxicologique des nanomédicaments [106].

Jusqu'à présent, il n'y a pas eu d'études prédictives permettant d'évaluer le passage des barrières biologiques par les nanomédicaments. En effet, les modèles employés, comme tous les modèles, présentent souvent des biais et des limites qui ne permettent pas de reproduire les conditions retrouvées *in vivo*. Il apparaît nécessaire de distinguer les différences histologiques entre les barrières biologiques chez l'animal et chez l'Homme pour mieux déterminer la sécurité d'utilisation des nanomédicaments [107].

2.2.7. Limites du ciblage

Les résultats obtenus lors des études *in vivo* chez l'animal ou chez l'Homme ne confirment que rarement les résultats des études *in vitro*. Ceci est probablement lié à la formation de la couronne de protéines autour des nanoparticules (2.2.5 Interactions avec les protéines). En effet, les mécanismes de transport, d'internalisation et de ciblage des nanovecteurs sont complexes et encore mal connus et finalement peu pris en compte lors des études *in vitro* [87].

Le ciblage passif lié à l'effet EPR (2.1.3. Vectorisation ; a) Ciblage passif), phénomène à la base du développement des nanomédicaments dans le cancer, est de plus en plus remis en question et pour cause : il est probable que le développement tumoral chez l'Homme, plus lent que celui obtenu sur des modèles animaux, n'offre que peu d'altérations vasculaires à proximité du tissu tumoral [23,39]. Récemment, plusieurs études ont démontré que la fraction de la dose initiale (DI) de principe actif qui entrait dans la cellule par voie passive était d'environ 3% DI/gramme de tumeur [108–111]. Par conséquent, l'entrée et l'accumulation des nanovecteurs dans la tumeur sont associées à d'autres mécanismes qui doivent être élucidés afin d'optimiser leur formulation et donc permettre une exposition maximale aux principes actifs [23,109].

L'une des principales limites de l'effet EPR semble être associée au microenvironnement tumoral, et plus précisément à la pression intra-tumorale qui fait désormais l'objet de toutes les attentions [32,39,112]. A cela s'ajoutent les caractéristiques tumorales propres telles que le profil génétique ou la mise en place de mécanisme de résistance. Tous ces éléments, peu ou pas pris en compte lors des expérimentations *in vitro*, sont probablement à l'origine des résultats *in vivo* décevants [32,113]. Une réflexion autour des modèles *in vitro* et précliniques chez l'animal devient urgente. A l'avenir, ils devront être plus fidèles et plus pertinents afin que les résultats issus de ces expérimentations soient prédictifs de ce qu'il va pouvoir se passer chez l'Homme [23,84].

2.2.8. Biocompatibilité et nanotoxicité

Le volet sécurité est essentiel dans le développement des médicaments mais il reste encore aujourd'hui trop souvent délaissé lors des phases de preuve de concept des nanomédicaments. En raison de leur toxicité potentielle et méconnue, un climat de méfiance s'est instauré autour des nanomédicaments [84,114].

L'évaluation de la biocompatibilité passe par la compréhension des interactions entre les nanovecteurs et les organismes vivants afin de bien comprendre les dangers éventuels liés à cette exposition. Rappelons qu'une substance est dite biocompatible si elle n'entraîne aucune réaction immunitaire de l'organisme. L'une des principales causes du déclenchement de la réponse immunitaire est l'adsorption des protéines autour des nanoparticules. Comme évoqué précédemment (2.2.5. Interactions avec les protéines), cela est directement lié aux caractéristiques physicochimiques du nanovecteur. La cartographie des protéines adsorbées est donc cruciale pour établir la biocompatibilité des nanomédicaments. L'évaluation du profil pharmacocinétique des nanomédicaments, et notamment de la distribution dans l'organisme,

contribue aussi à l'étude de la biocompatibilité. En effet, selon leur taille et leur composition, les nanovecteurs vont préférentiellement se distribuer dans le foie, la rate, les reins ou encore le cœur, les poumons et le cerveau. Certains nanovecteurs peuvent s'y accumuler pendant plusieurs jours voire plusieurs années [42,114–116].

Ces tests de biocompatibilité doivent être effectués lors des études *in vitro* et *in vivo* pour démontrer la sécurité d'utilisation de ces nouveaux DDS. A ce jour, il n'existe pas de ligne directrice spécifique et harmonisée pour mener ces études de façon appropriée. En effet, les protocoles actuels sont destinés à évaluer les produits chimiques conventionnels sans tenir compte de l'échelle nanométrique. Cependant, la Commission Européenne a été à l'initiative d'un groupe de travail (projet NanoTEST) pour évaluer spécifiquement la sécurité des nanomédicaments. Ce groupe de travail est à l'origine d'un certain nombre de travaux scientifiques [117]. Brièvement les travaux se sont focalisés, d'abord, sur la caractérisation physicochimique nécessaire pour déterminer la toxicité des nanovecteurs après mise en contact avec un milieu de culture cellulaire. Ensuite, les résultats issus de ces travaux concernent la standardisation de la méthodologie d'étude de la toxicologie *in vitro* des nanomédecines. Ainsi, ont été déterminés le nombre de répétitions, les modèles cellulaires à utiliser ou encore la quantité de nanoparticules à utiliser par type cellulaire étudié. Enfin, d'autres aspects ont été déterminés comme les méthodologies d'études de toxicité génétique, cellulaire (hépatique, intestinale, nerveuse...), immunologique et même fœtale [117].

L'évaluation de la toxicité des nanomédicaments souffre des mêmes limites que l'évaluation de leur efficacité (méthodologies de caractérisation, suivi de la biodistribution *in vivo*...). Idéalement, les études toxicologiques devront être capables de déterminer, non seulement la toxicité du nanomédicament, mais aussi la toxicité du nanovecteur seul. Malheureusement, à ce jour, les modèles standardisés permettant d'évaluer correctement la sécurité des nanomédicaments sont rares [32,80,84,114].

A l'heure actuelle, la question de savoir si les nanomédicaments présentent des risques et quelles sont les investigations nécessaires à mener pour démontrer leur sécurité reste une question ouverte. Afin de répondre à toutes ces interrogations, un nouveau champ de recherche est né : la nanotoxicologie. Elle a pour objectif d'étudier les effets des interactions entre les nanomatériaux et les systèmes biologiques [14]. La nanotoxicologie est devenue une partie intégrante du domaine de recherche qu'est la nanomédecine.

3. Pharmacocinétique des nanomédicaments

3.1. Pharmacocinétique des médicaments

3.1.1. Définition et concept

La pharmacocinétique (PK) s'intéresse au devenir du médicament après son administration grâce à l'analyse mathématique des concentrations du principe actif dans les principaux tissus. Elle représente une étape incontournable dans le processus de développement des médicaments. Les études PK s'effectuent lors des phases d'essais précliniques et cliniques et sont la clé d'un passage réussi entre les 2 phases. L'objectif final est d'optimiser les protocoles thérapeutiques (posologie, rythme d'administration) afin d'obtenir la meilleure efficacité possible tout en minimisant la toxicité. Une étude PK est systématiquement associée à une étude pharmacodynamique (PD) ainsi qu'à l'étude de la combinaison des deux (PK-PD) (**Figure 7**). Alors que la PK étudie l'effet de l'organisme sur le médicament, la PD s'intéresse à l'effet de la molécule active sur l'organisme [118-120].

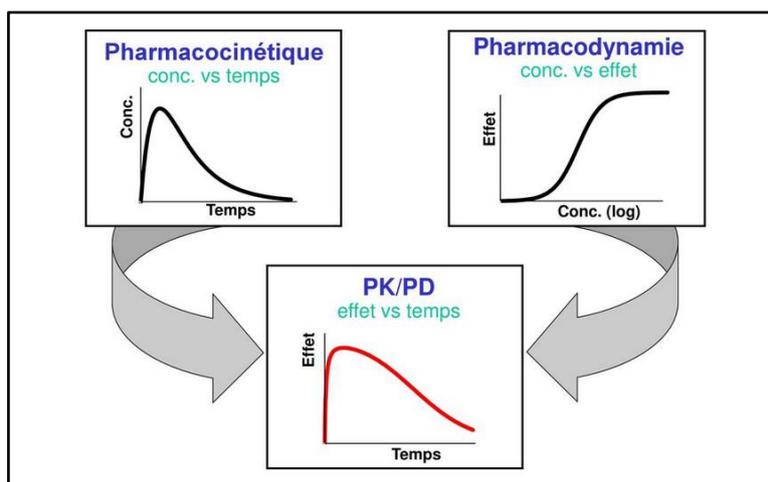


Figure 7. Concept de base de l'approche PK-PD (Pharmacocinétique-Pharmacodynamie).
(Adaptée de Muller *et al.* [118])

La PK d'un médicament se divise en 4 phases : absorption, distribution, métabolisation et élimination (ADME). La **Figure 8** est une représentation simplifiée car les 4 phases peuvent être concomitantes. Ainsi, cette figure représente les moments où elles sont prépondérantes.

Absorption

Cette première phase n'est effective que lorsque le médicament est administré par voie extravasculaire. A l'exception de la voie intraveineuse pour laquelle le médicament est directement introduit dans le compartiment sanguin, toutes les autres voies d'administration (voie orale mais aussi voie sous-cutanée, intramusculaire...) nécessitent le passage d'une ou plusieurs

barrières biologiques par le médicament pour atteindre ce compartiment. La qualité de l'absorption, qui dépend des caractéristiques physicochimiques du médicament administré, est évaluée par la biodisponibilité (F). Elle correspond à la fraction de la dose administrée qui atteint le compartiment sanguin en comparaison à la voie intraveineuse qui fait office de référence (F=100%) ; F est donc compris entre 0 et 100% [121,122].

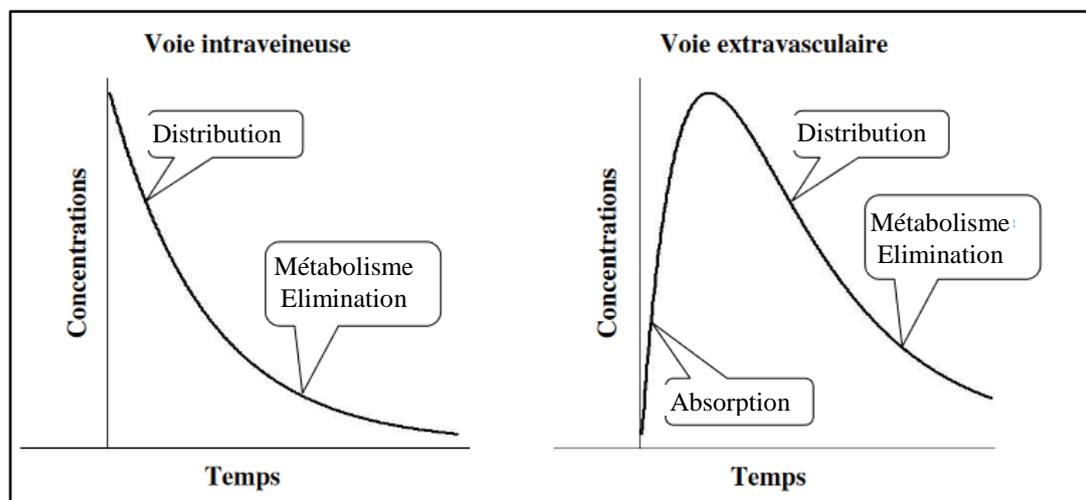


Figure 8. Représentation simplifiée des étapes de la pharmacocinétique d'un médicament (ADME : Administration, Distribution, Métabolisation, Elimination).

Distribution

La phase de distribution est une étape qui se déroule à mesure que le médicament ayant atteint la circulation sanguine générale se distribue dans les différents tissus. Elle fait intervenir des mécanismes de transport passifs ou actifs pour traverser l'endothélium vasculaire. Les propriétés intrinsèques de la molécule et la nature du tissu cible influencent la vitesse de distribution. Si une molécule lipophile de faible poids moléculaire se distribuera très rapidement dans un grand volume, une molécule hydrophile de haut poids moléculaire aura tendance à s'accumuler dans le compartiment sanguin. Les capacités de distribution d'un médicament sont évaluées par le calcul du volume de distribution apparent (Vd) qui représente l'espace de dilution dans lequel il va se répartir. La liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires peut modifier le processus de distribution et seule la forme libre du médicament est susceptible de traverser les membranes biologiques [121,122].

Métabolisme

Le métabolisme (ou biotransformation) de molécules exogènes telles que les médicaments est majoritairement hépatique. L'objectif est de rendre les molécules plus hydrosolubles et ainsi de faciliter leur élimination par voie rénale mais aussi par voie hépatique. Le métabolisme peut se diviser en deux phases : une phase de fonctionnalisation (réactions enzymatiques) puis une phase de conjugaison (réactions chimiques). Les enzymes impliquées dans les réactions de réduction,

d'oxydation ou d'hydrolyse appartiennent au groupe des cytochromes P450 (Cyp450) comprenant plusieurs iso-enzymes pouvant être le siège de nombreuses interactions médicamenteuses. Ces étapes de transformation peuvent aboutir à des composés actifs ou inactifs sur le plan pharmacologique. [123,124]

Elimination

L'élimination est la quatrième et dernière phase de « vie » d'un médicament dans l'organisme. Elle fait suite à la métabolisation et y est même combinée puisque le but de la première étape est de faciliter la seconde. La molécule active peut être éliminée sous forme inchangée ou sous forme de métabolites soit par voie rénale (urine), soit par voie hépatique (bile). Lors de ce processus d'élimination, il est important de prendre en compte le cycle entéro-hépatique puisque, lorsque le médicament est éliminé *via* les sels biliaires, il se retrouve dans le tube digestif et peut de nouveau atteindre la circulation sanguine après absorption. Comme pour les autres phases, l'élimination dépend grandement des propriétés physicochimiques du principe actif. En général, les molécules polaires et hydrophiles sont éliminées sous forme inchangée dans les urines alors que les molécules lipophiles sont métabolisées par le foie avant d'être éliminées dans les urines ou les fèces [122,125,126].

3.1.2. Méthodes d'analyse

Les deux approches les plus utilisées pour caractériser mathématiquement la PK d'un médicament sont l'analyse non compartimentale et l'analyse compartimentale. Si pour la première, seule une approche individuelle est possible, pour la seconde, il est possible d'utiliser une approche individuelle ou une approche populationnelle [119,122].

a) Analyse non compartimentale

L'analyse non compartimentale ne nécessite pas d'hypothèses mathématiques pour décrire le devenir du médicament. Cette approche permet d'obtenir directement à partir des points expérimentaux la concentration maximale (C_{max}), ainsi que le temps nécessaire pour atteindre C_{max} (T_{max}). Il est aussi possible d'estimer l'exposition de l'organisme au principe actif par la méthode des trapèzes pour déterminer l'ASC en fonction du temps. Il existe deux méthodes pour estimer la surface des trapèzes, la méthode linéaire ou la méthode log-linéaire. Quelle que soit la méthode utilisée, l'ASC totale s'obtient en faisant la somme des surfaces de chaque trapèze intermédiaire (**Figure 9**). De la même manière on peut aussi déterminer l'aire sous la courbe du moment statistique d'ordre 1 des concentrations en fonction du temps (ASMC). A partir de ces paramètres estimés (ASC et ASMC) et des paramètres initiaux connus (dose et concentration initiale C_0), il est possible d'en déduire la clairance totale (Cl) et le temps de résidence moyen (MRT) de la molécule dans l'organisme [120].

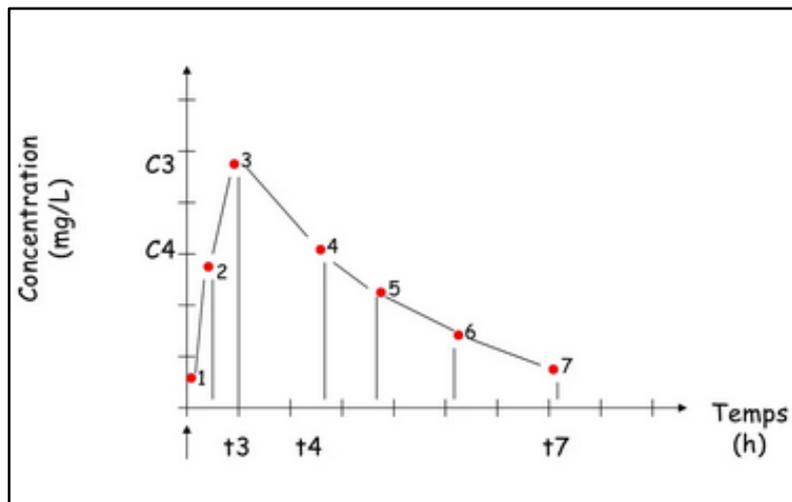


Figure 9. Analyse non compartimentale par méthode des trapèzes permettant d'estimer l'aire sous la courbe (ASC) de t_0 à t_7 .

La clairance correspond à la capacité d'épuration d'un volume de fluide en un temps donné pour une substance donnée par un organe ou un organisme (mL/min) :

$$Cl = \frac{Dose}{ASC}$$

Le temps de résidence moyen (MRT) permet de mesurer le temps passé par une molécule dans l'organisme :

$$MRT = \frac{ASMC}{ASC}$$

Aussi on peut déduire le volume de distribution à l'état d'équilibre de la molécule dans l'organisme (V_{eq}) :

$$V_{eq} = Cl \times MRT$$

b) Analyse compartimentale

L'outil de modélisation mathématique le plus couramment utilisé en PK est l'analyse compartimentale. Un compartiment peut se définir comme un espace réel (reflétant une réalité anatomique) ou virtuel dans lequel le médicament est supposé se distribuer de façon homogène. Un modèle PK peut être constitué d'un ou plusieurs compartiments (un compartiment central et un ou plusieurs périphériques) organisés pour pouvoir décrire au mieux les concentrations observées. Il est d'usage de considérer le compartiment sanguin comme le compartiment central. Le modèle mathématique final doit permettre de décrire les transferts entre compartiments. Ces transferts peuvent être réversibles ou irréversibles (élimination vers l'extérieur) (**Figure 10**) [120].

Dans la plupart des situations, les transferts inter-compartmentaux obéissent à des cinétiques d'ordre 1. De tels modèles PK sont dit linéaires. Cela signifie que la vitesse de transfert (dQ/dt) est proportionnelle à la quantité de substance active (Q) :

$$\frac{dQ}{dt} = -k \times Q$$

Avec :

k : constante de vitesse de dissolution ; Q : quantité de principe actif présente à l'instant t

Ainsi, après intégration exponentielle : $Q = Q_0 \times e^{-kt}$

soit à volume constant : $C = C_0 e^{-kt}$

Avec :

Q_0 : quantité initiale de principe actif ; C_0 : concentration initiale de principe actif

Les constantes k représentent les échanges entre les compartiments. Certaines ont une signification physiologique comme la constante d'absorption (k_a) ou la constante d'élimination (k_e).

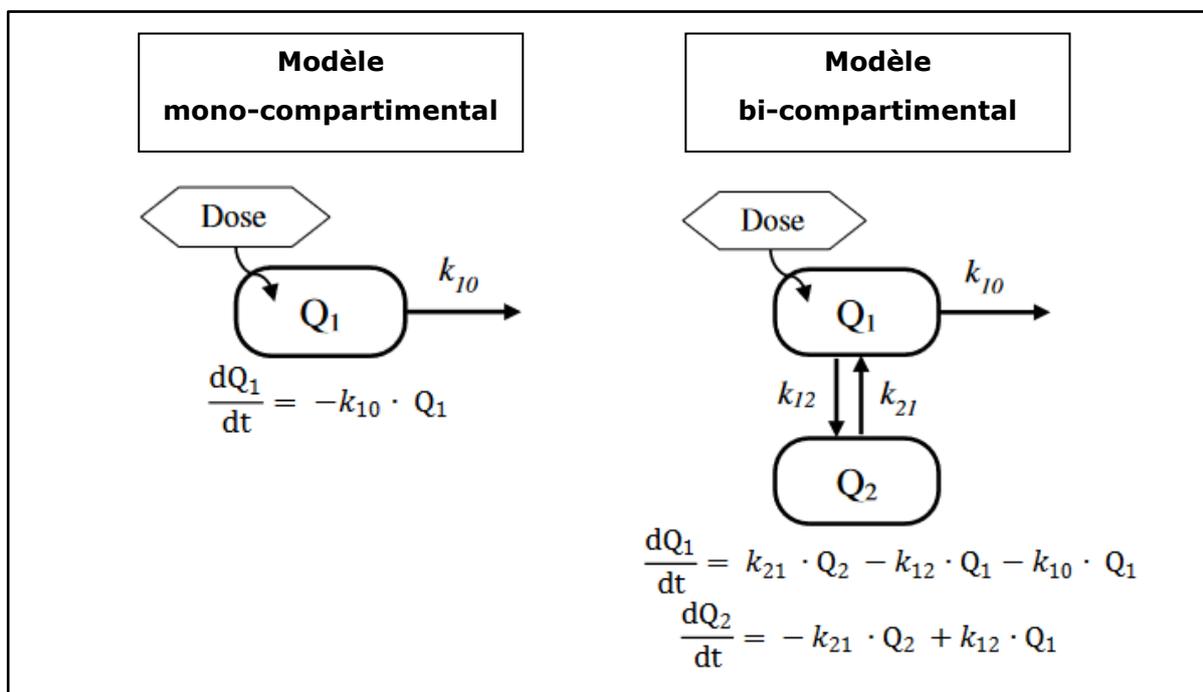


Figure 10. Exemples de modèles pharmacocinétiques compartimentaux après administration intraveineuse et équations différentielles associées.

Q_1 : Quantité de médicament dans le compartiment 1 (compartiment central) ; Q_2 : Quantité de médicament dans le compartiment 2 (compartiment périphérique) ; k_{12} et k_{21} : constantes de transferts entre les compartiments 1 et 2 (dans le sens 1 vers 2 et 2 vers 1 respectivement) ; k_{10} : constante d'élimination du compartiment 1 vers l'extérieur

Il arrive que le passage d'un compartiment à un autre ne respecte pas une cinétique d'ordre 1. Il s'agit souvent d'une cinétique d'ordre 0 où la vitesse de transfert (dQ/dt) est constante et indépendante de la quantité de substance active (Q) dans le compartiment de départ :

$$\frac{dQ}{dt} = \pm k$$

Ceci peut se produire lorsque la molécule emprunte des voies de transport ou d'élimination saturables. Il s'agit alors de modèles PK dits non linéaires.

Il existe d'autres types de cinétiques de transfert inter-compartimental dont celle de Michaëlis-Menten pour décrire une cinétique saturable dont la vitesse dépend de la concentration en substance active mais aussi de paramètres constants spécifiques du mécanisme de transport utilisé.

c) Approche individuelle

Lors d'une étude PK « classique », il est nécessaire d'avoir, pour chaque individu, un grand nombre de mesures quantitatives de la molécule testée pour pouvoir décrire correctement l'évolution des concentrations en fonction du temps et ainsi déterminer les paramètres PK individuels. C'est en faisant la moyenne des valeurs individuelles que les paramètres moyens de la population sont obtenus.

d) Approche populationnelle

L'analyse PK de population (PKpop) s'appuie sur l'intégralité des données de l'ensemble des individus (« population ») pour déterminer les paramètres PK de la population. Ce type d'approche permet de diminuer le nombre de prélèvements par individu. Alors qu'il faut compter une dizaine de prélèvements pour obtenir des données fiables en PK « classique », seuls trois à quatre prélèvements sont nécessaires en PKpop (sous réserve qu'ils décrivent l'ensemble de la cinétique). La particularité de cette approche réside dans le fait que chaque paramètre est considéré comme une variable aléatoire. Un modèle PKpop est décrit par la combinaison d'un modèle structural et d'un modèle d'erreur regroupant des effets fixes (effets fixés par l'expérimentateur ; ex. : la dose) et des effets aléatoires (effets observés ; ex. : la concentration à un instant t) ; il s'agit donc de modèles à effets mixtes [127,128].

Modèle structural

Le modèle structural décrit l'évolution de la concentration en fonction du temps chez un individu sans tenir compte des erreurs de mesure. Il s'agit de prédire le nombre de compartiments en fonction des profils PK observés [127].

Modèle d'erreur

Une différence entre les concentrations observées (C_{obs}) et les concentrations prédites par le modèle structural (C_{pred}) pour un individu donné est systématiquement observée. Cela peut s'expliquer par les erreurs analytiques de mesure et/ou par l'imprécision de prédiction du modèle. Cette erreur résiduelle (ε) comprend la variabilité interindividuelle, la variabilité résiduelle et la variabilité inter-occasion. Elle est supposée suivre une distribution normale de moyenne nulle. [129]

$$C_{obs} = C_{pred} + \varepsilon$$

– Variabilité interindividuelle

La variabilité interindividuelle représente l'écart moyen entre la valeur moyenne du paramètre PK de population et la valeur réelle de l'individu. Elle permet d'évaluer la dispersion des données individuelles et peut être modélisée de plusieurs façons : modèle additif, proportionnel ou mixte (**Figure 11**). Si une dispersion importante des données est observée, il convient d'en expliquer les sources à l'aide de covariables. Cette variabilité est supposée suivre une loi normale de moyenne nulle et de variance ω^2 .

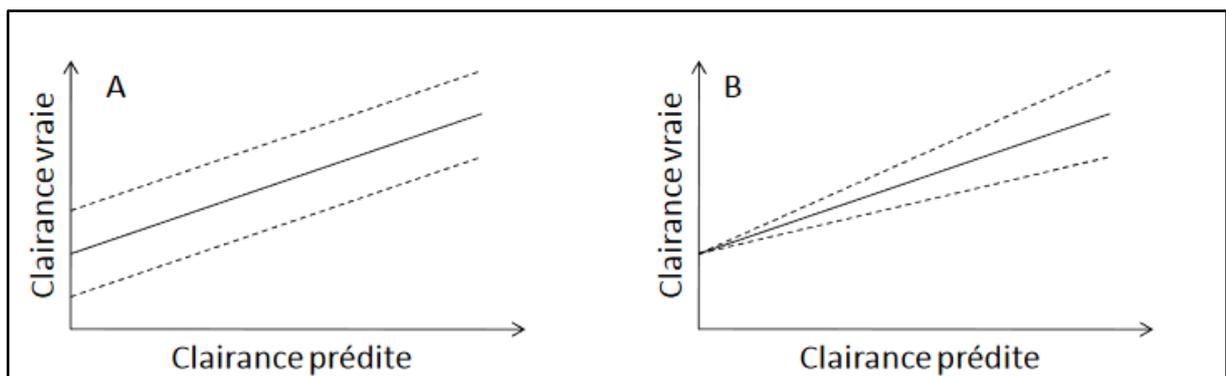


Figure 11. Variabilité interindividuelle additive (A) et proportionnelle (B).

– Variabilité résiduelle

Après évaluation de la variabilité interindividuelle, l'écart restant entre les concentrations observées et les concentrations prédites correspond à la variabilité résiduelle et permet d'apprécier l'ajustement du modèle. En effet, si elle est très importante, cela signifie que soit le modèle présente des défauts d'ajustement entre les données observées et prédites, soit il existe une forte variabilité inter-occasion (si le schéma d'administration a exposé plusieurs fois un même individu au principe actif étudié). Tout comme pour la variabilité interindividuelle, il existe trois façons de modéliser la variabilité résiduelle : modélisation additive, modélisation proportionnelle ou mixte (**Figure 12**). Cette variabilité est également supposée suivre une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2 .

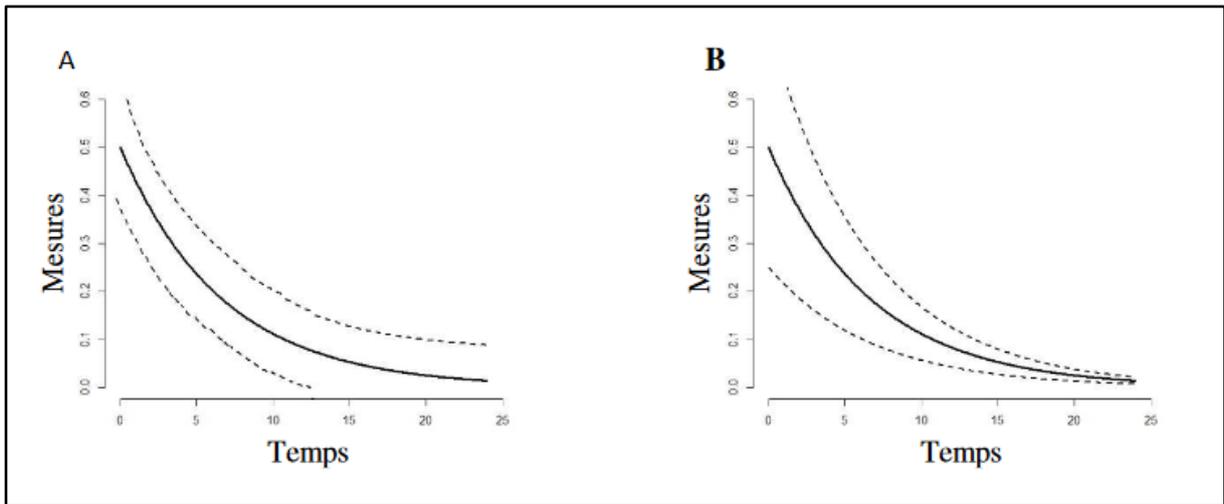


Figure 12. Variabilité résiduelle additive (A) et proportionnelle (B).

– Variabilité inter-occasion

Cette troisième composante du modèle d'erreur n'est estimable que lorsque plusieurs profils PK sont observés pour un même patient, c'est-à-dire lorsqu'un même individu a été exposé plusieurs fois au principe actif étudié.

Modélisation et estimation des paramètres

L'objectif final de la modélisation est de sélectionner un modèle décrivant le plus fidèlement possible les données observées tout en conservant une certaine simplicité afin de garder une cohérence avec les mécanismes physiologiques (principe de parcimonie).

La première étape de modélisation consiste à sélectionner un modèle structural au regard des données expérimentales obtenues. Il s'agit de tester plusieurs modèles compartimentaux et différentes cinétiques d'absorption (le cas échéant) et d'élimination (ordre 1, ordre 0 ou Michaëlis-Menten). Le choix du modèle structural final s'effectue à l'aide de l'analyse de certains critères synonymes de bon ajustement. Le plus utilisé est le rapport de vraisemblance ou *log-likelihood ratio* (LL) exprimé comme suit :

$$-2LL = -2 \times \log(L)$$

Avec :

L : fonction de vraisemblance

Les logiciels de modélisation PK utilisent des algorithmes permettant d'estimer les valeurs optimales des paramètres pour minimiser la valeur du LL et donc pour maximiser l'ajustement entre les données prédites et les données observées (vraisemblance). Le logiciel Monolix® (logiciel utilisé dans la partie expérimentale de ce travail) utilise pour cela la méthode SAEM

(*Stochastic Approximation Expectation Maximization*). Très brièvement, cette méthode combine une étape de simulation des paramètres individuels (étape d'espérance de vraisemblance (E)) suivie d'une étape d'approximation stochastique pour l'estimation du maximum de vraisemblance (étape de maximisation (M)) [130,131]. D'autres critères, tels que le Critère d'Information d'Akaike (*Akaike Information Criterion* (AIC)) et le Critère d'Information Bayésien (*Bayesian Information Criterion* (BIC)), sont également utilisés pour sélectionner le meilleur modèle. Le modèle présentant le plus faible AIC et/ou BIC est retenu.[131,132]

$$AIC = -2\ln(L) + 2k \quad \text{et} \quad BIC = -2\ln(L) + k \times \ln(N)$$

Avec :

k : nombre de paramètres à estimer dans le modèle ; *N* : nombre d'observations

La seconde étape de modélisation consiste à rechercher les covariables qui pourraient influencer significativement un ou plusieurs paramètres du modèle. La sélection des covariables à intégrer dans le modèle s'effectue également à l'aide des critères décrits précédemment (LL, AIC et BIC).

La troisième étape consiste à valider le modèle final sélectionné (combinaison du modèle structural et du modèle d'erreur). Il existe deux méthodes de validation : la validation externe et la validation interne. La première consiste à vérifier la productivité du modèle final en utilisant un échantillon de données n'ayant pas servi lors de la construction du modèle. S'il s'agit de la méthode la plus robuste, c'est la moins utilisée car elle nécessite beaucoup de données expérimentales. La seconde méthode est basée sur l'étude graphique du modèle. Plusieurs représentations graphiques peuvent être analysées :

- le GOF (*Goodness-Of-Fit*) : représentation des données prédites en fonction des données observées permettant de détecter les biais du modèle structural et du modèle d'erreur [134];
- VPC (*Visual Predictive Checks*) : comparaison entre les données observées et des données simulées par l'algorithme à partir du modèle final [135] ;
- NPDE (*Normalized Prediction Distribution Errors*) : il représente les résidus (modèle d'erreur) et il permet d'apprécier la performance prédictive du modèle [136,137].

Enfin, l'évaluation du modèle passe par l'analyse de l'incertitude calculée pour chaque paramètre ; c'est le reflet de la qualité de l'estimation. A titre d'exemple, le logiciel Monolix® donne, pour chaque paramètre estimé, l'erreur standard de cette estimation (*Standard Error* (SE)) très souvent exprimée en valeur relative (*Relative Standard Error* (RSE)). De façon usuelle, il est admis qu'une valeur de RSE supérieure à 30% sur l'estimation des effets fixes et/ou supérieure à 50% sur les effets aléatoires témoigne de la mauvaise adéquation du modèle. Cela peut résulter d'un manque de données et/ou du choix d'un modèle sur-paramétré. Par ailleurs, le manque de données expérimentales peut conduire à un phénomène dit de régression vers la moyenne (*shrinkage*). Dans ce cas, le modèle final présentera une distribution des valeurs individuelles prédites imprécise qui tendra automatiquement vers la moyenne des quelques valeurs

expérimentales de départ. Retenons qu'un fort *shrinkage* (> 20-30 %) des paramètres individuels peut conduire à des conclusions erronées [134,138].

Au total, si les données expérimentales sont suffisantes et de qualité, il est possible, grâce aux logiciels actuels de PK, de modéliser des données complexes comme peuvent l'être celles issues des études sur les nanomédicaments.

3.2. Application aux nanomédicaments

L'importance des études PK dans le développement des nanomédicaments n'est plus à démontrer. En effet, les caractéristiques spécifiques des nanomédicaments entraînent des mécanismes complexes d'absorption, de transport, de distribution, de métabolisation et d'élimination [13,31,111,139,140]. Comme il a été décrit précédemment, les nanomédicaments sont très divers et très hétérogènes tant dans la forme, que dans la structure, que dans la composition. Or, comme décrit dans la **Figure 13**, les caractéristiques physicochimiques des nanovecteurs impactent leur PK [42]. Par conséquent, les méthodologies d'études pharmacocinétiques doivent être harmonisées pour faciliter les études comparatives des nanomédicaments entre eux mais aussi avec les médicaments sous formes pharmaceutiques conventionnelles [111]. Aussi, cette hétérogénéité complexifie la méthodologie, ce qui nécessite des adaptations au cas par cas pour bien appréhender les propriétés de ces nanomédicaments. Ainsi, les résultats obtenus sont toujours spécifiques du type de nanomédicament étudié et ne semblent pas extrapolables. L'utilisation directe des méthodes classiques, adaptées à l'étude pharmacocinétique des petites molécules, n'est pas possible sans adaptation spécifique pour l'étude des nanomédecines. D'après la récente méta-analyse de Kumar *et al.*, chaque type de nanomédicament possède son propre profil pharmacocinétique [111]. Sans nul doute, l'amélioration du passage de la phase préclinique à la phase clinique passera par des évaluations PK robustes et de qualité [87,111]. Cette amélioration de la translation en phase clinique se fera par l'intermédiaire du développement de modèles pharmacocinétiques intégrant des données physiologiques (PBPK : *Physiological Based Pharmacokinetic*). Les modèles PBPK permettent d'extrapoler des données obtenues lors des phases précliniques *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Ainsi, il devient plus aisé d'appréhender le potentiel des nanomédicaments chez l'Homme tant d'un point de vue efficacité que toxicité. Tout ceci doit s'appuyer sur des modèles *in vitro* et *in vivo* appropriés et les plus fidèles possibles ainsi que sur des outils de détection fiables du nanomédicament afin de quantifier correctement sa distribution tissulaire [111,141,142]. Il est important de préciser que l'évaluation PK d'un principe actif encapsulé dans un nanovecteur doit être différenciée de celle de la molécule active seule. En effet, seule cette fraction libérée est considérée comme active [42,143,144].

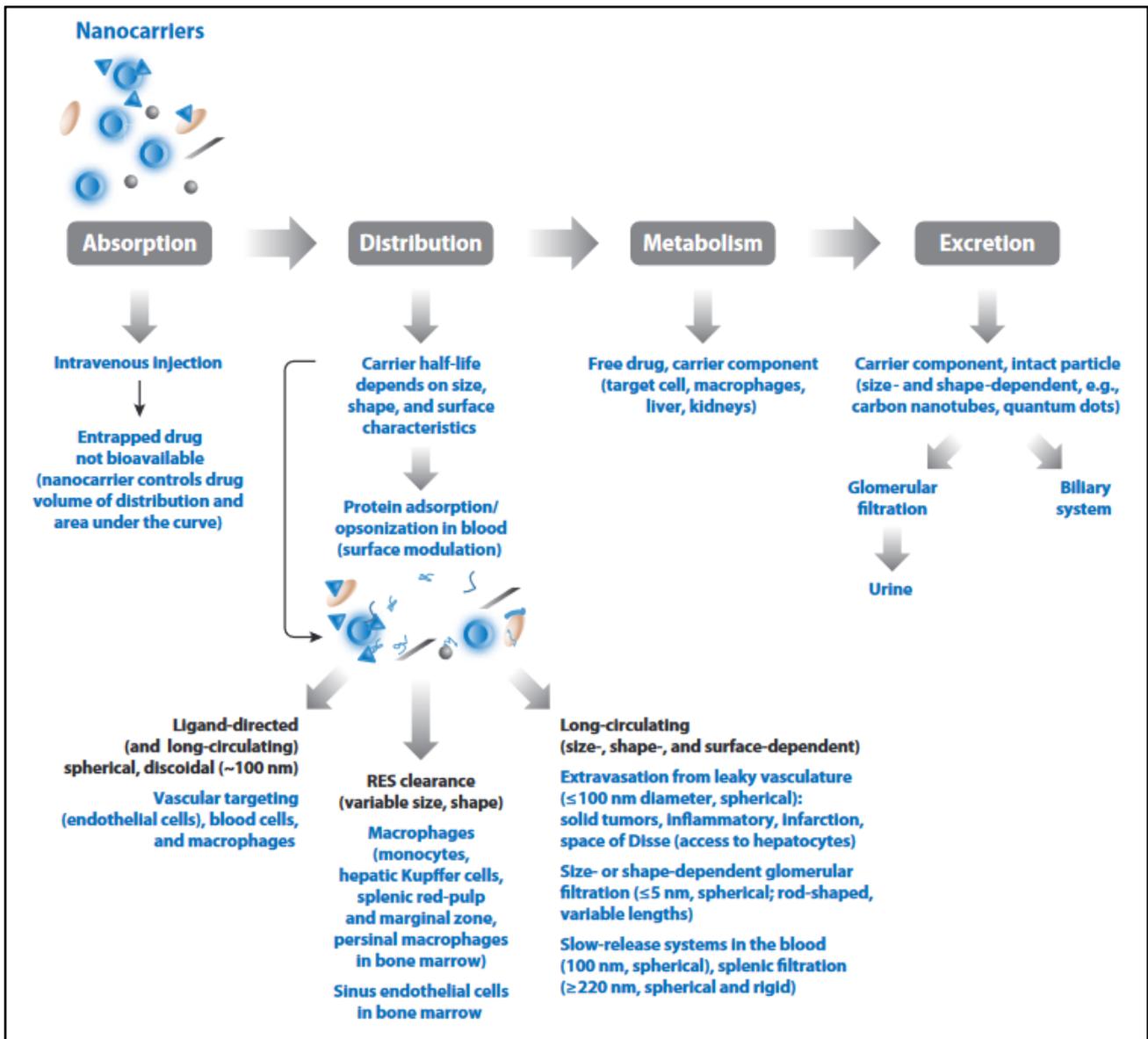


Figure 13. Influence des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules sur leur profil pharmacocinétique ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination). (Reproduite à partir de Moghimi *et al.* [42])

RES: Reticulo-Endothelial System

A cela s'ajoute la difficulté de compréhension des interactions des nanomédicaments avec les milieux biologiques après administration dans un organisme vivant. En effet, de cette opsonisation résulte des complexes nanomédicaments-protéines qui se distribuent dans l'organisme en fonction du milieu biologique d'administration et des caractéristiques physico-chimiques du nanovecteur. Ce phénomène simple et immédiat est très complexe à traduire mathématiquement d'un point de vue de la biodistribution. A ce jour aucun modèle PK ou PBPK n'inclut cet élément pourtant essentiel à l'extrapolation inter-espèces [2,111,145].

Ainsi, ce présent travail de thèse est le fruit de cette réflexion autour des méthodologies d'étude et des interactions des nanomédicaments avec les milieux biologiques. Ceci pour mieux

comprendre et appréhender la biodistribution des nanovecteurs en fonction de leurs caractéristiques. Les spécificités de comportement PK des nanomédicaments font l'objet d'une revue dédiée présentée dans la Partie Bibliographique de ce manuscrit. Les réflexions autour de la pharmacocinétique et des interactions avec les milieux biologiques des nanocapsules lipidiques font l'objet de la partie expérimentale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio, The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- [2] S. Bisso, J.C. Leroux, Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability, *Int. J. Pharm.* 578 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119098>.
- [3] M. Ochubiojo, I. Chinwude, E. Ibanga, S. Ifianyi, Nanotechnology in Drug Delivery, in: *Recent Adv. Nov. Drug Carr. Syst., InTech*, (2012). <https://doi.org/10.5772/51384>.
- [4] A.P. Nikalje, Nanotechnology and its Applications in Medicine, *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 5 (2015). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>.
- [5] S. Kumar, R. Nyodu, V.K. Maurya, S.K. Saxena, Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (2020) 23–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3.
- [6] K.K. Jain, Nanomedicine: Application of nanobiotechnology in medical practice, *Med. Princ. Pract.* 17 (2008) 89–101. <https://doi.org/10.1159/000112961>.
- [7] T.A. Seidu, D.O. Asante, R. Alolga, W. Bo, Nanoparticulate Drug Delivery Systems (2022) 10.3390/pharmaceutics14051113.
- [8] R.P. Feynman, There's plenty of room at the bottom, *J. Microelectromechanical Syst.* 1 (1992) 60–66. <https://doi.org/10.1109/84.128057>.
- [9] R.P. Feynman, *There's Plenty of Room at the Bottom* (1960).
- [10] N. Taniguchi, On the basic concept of nano-technology, in: *Int. Conf. Prod. Eng., Tokyo*, (1974).
- [11] Commission européenne, Recommandation de la Commission Européenne relative à la définition des nanomatériaux, 2011/696/UE. (2011).
- [12] E.A.J. Bleeker, W.H. de Jong, R.E. Geertsma, M. Groenewold, E.H.W. Heugens, M. Koers-Jacquemijns, D. van de Meent, J.R. Popma, A.G. Rietveld, S.W.P. Wijnhoven, F.R. Cassee, A.G. Oomen, Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65 (2013) 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.007>.
- [13] A. Ahmad, I. Ahmad, A. Khan, M. Abdullah, C. Yern Chee, F. Verpoort, Introduction to nanomedicine an overview, *Nanomedicine Manuf. Appl.*, (2021) 1–20. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820773-4.00001-9>.
- [14] S. Soares, J. Sousa, A. Pais, C. Vitorino, Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues, *Front. Chem.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>.
- [15] European Science Foundation Policy Briefing 2.
- [16] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, 2006. <http://scientific.thomson.com/products/sci/>.
- [17] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *J. Control. Release.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>.
- [18] K. MG, K. V, H. F, History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 06 (2015). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000336>.
- [19] D. Astruc, Introduction to nanomedicine, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21010004>.

- [20] B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, *Nanomedicine*, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2434–2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273>.
- [21] R. Juliano, *Nanomedicine: Is the wave cresting?*, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 171–172. <https://doi.org/10.1038/nrd3958>.
- [22] www.nano.gov, National Nanotechnology Initiative.
- [23] J.I. Hare, T. Lammers, M.B. Ashford, S. Puri, G. Storm, S.T. Barry, *Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 108 (2017) 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.025>.
- [24] www.cancer.gov/nano/research/ncl, Nanotechnology Characterization Laboratory - NCI.
- [25] www.etp-nanomedicine.eu, ETPN | Nanomedicine European Technology Platform.
- [26] www.euncl.eu, European Nanomedicine Characterization Laboratory.
- [27] A.T. Florence, *Nanotechnologies for site specific drug delivery: Changing the narrative*, *Int. J. Pharm.* 551 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.023>.
- [28] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y.S. Chan, A. Dufresne, M.K. Danquah, *Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations*, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- [29] M. Mir, S. Ishtiaq, S. Rabia, M. Khatoon, A. Zeb, G.M. Khan, A. ur Rehman, F. ud Din, *Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery*, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2249-8>.
- [30] S. Bhatia, *Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications*, in: *Nat. Polym. Drug Deliv. Syst.*, Springer International Publishing, (2016) 33–93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3_2.
- [31] I. Ahmed Hamed Khalil, I. A. Arida, M. Ahmed, *Introductory Chapter: Overview on Nanomedicine Market*, *Curr. Futur. Asp. Nanomedicine*, IntechOpen. (2020). <https://doi.org/10.5772/intechopen.91890>.
- [32] F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Roointan, M. Karimi, M.R. Hamblin, *Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities*, *Nanomedicine.* 14 (2019) 93–126. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>.
- [33] J. -Uwe, A.H. Junghanns, R.H. Müller, *Nanocrystal technology, Drug delivery and clinical applications.* (2008) 295-309.
- [34] N. Matougui, L. Boge, A.C. Groo, A. Umerska, L. Ringstad, H. Bysell, P. Saulnier, *Lipid-based nanoformulations for peptide delivery*, *Int. J. Pharm.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.019>.
- [35] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, *A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers*, *Pharm Res.* 19 (2002) 875-80. doi: 10.1023.
- [36] C.R.A. Mouzouvi, A. Umerska, A.K. Bigot, P. Saulnier, *Surface active properties of lipid nanocapsules*, *PLoS One.* (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179211>.
- [37] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.P. Benoît, J.E. Proust, *Interfacial stability of lipid nanocapsules*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 30 (2003) 225–235. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00096-1).
- [38] J. Nicolas, P. Couvreur, *Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux*, *Medicine/Sciences.* 33 (2017) 11–17. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301003>.

- [39] R. Foulkes, E. Man, J. Thind, S. Yeung, A. Joy, C. Hoskins, The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: Current and future perspectives, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 4653–4664. <https://doi.org/10.1039/d0bm00558d>.
- [40] J.E. Riviere, Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots, 1 (2008) 26–34. <https://doi.org/10.1002/wnan.024>.
- [41] Q.-H. Zhao, L.-Y. Qiu, An Overview of the Pharmacokinetics of Polymer-Based Nanoassemblies and Nanoparticles, *Curr. Drug Metab.* 14 (2013) 832–839. <https://doi.org/10.2174/138920021131400104>.
- [42] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, T.L. Andresen, Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: An integrated analysis and perspective, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 481–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>.
- [43] L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal, Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25 (2016) 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>.
- [44] K. Park, The drug delivery field at the inflection point: Time to fight its way out of the egg, *J. Control. Release.* 267 (2017) 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.030>.
- [45] N. Tsapis, Agents de contraste pour l'imagerie médicale, *Medecine/Sciences.* 33 (2017) 18–24. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301004>.
- [46] F. Zor, F.N. Selek, G. Orlando, D.F. Williams, Biocompatibility in regenerative nanomedicine, *Nanomedicine.* 14 (2019) 2763–2775. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0140>.
- [47] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, Liposomal formulations in clinical use: An updated review, *Pharmaceutics.* 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- [48] A.A. Halwani, Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010106>.
- [49] K. Chaudhury, V. Kumar, J. Kandasamy, S. RoyChoudhury, Regenerative nanomedicine: Current perspectives and future directions, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 4153–4167. <https://doi.org/10.2147/ijn.s45332>.
- [50] C. Kiparissides, O. Kammona, 6 Nanotechnology Advances in Diagnostics, Drug Delivery, and Regenerative Medicine. (2015) 311–339.
- [51] E. Garbayo, S. Pascual-Gil, C. Rodríguez-Nogales, L. Saludas, A. Estella-Hermoso de Mendoza, M.J. Blanco-Prieto, Nanomedicine and drug delivery systems in cancer and regenerative medicine, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 12 (2020). <https://doi.org/10.1002/wnan.1637>.
- [52] T. Langbein, W.A. Weber, M. Eiber, Future of theranostics: An outlook on precision oncology in nuclear medicine, *J. Nucl. Med.* 60 (2019) 13S–19S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.220566>.
- [53] T. Lammers, S. Aime, W.E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, Theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 1029–1038. <https://doi.org/10.1021/ar200019c>.
- [54] R. Duncan, R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the microscope, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 2101–2141. <https://doi.org/10.1021/mp200394t>.
- [55] E.M. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge, Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds, *Toxicol. Pathol.* 36 (2008) 43–48. <https://doi.org/10.1177/0192623307310946>.
- [56] J.P. Guichard, R. Levy-prades Sauron, A comparison of the bioavailability of standard or micronized formulations of Fenofibrate, *Curr. Ther, Reserarch* 54 (1993)

- [57] S. Tinkle, S.E. Mcneil, S. Mühlebach, R. Bawa, G. Borchard, Y.C. Barenholz, L. Tamarkin, N. Desai, Nanomedicines: Addressing the scientific and regulatory gap, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1313 (2014) 35–56. <https://doi.org/10.1111/nyas.12403>.
- [58] P. Chavanet, Amphotericine B dkoxycholate (Fungizone®) : vieux médicament, nouvelles versions, *Rev Med Interne.* 18 (1997) 153-165.
- [59] F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release.* 148 (2016) 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- [60] K. Greish, Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting, *Methods Mol. Biol.* 624 (2010) 25–37. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_3.
- [61] L.E. Gerlowski, R.K. Jain, Microvascular Permeability of Normal and Neoplastic Tissues, *Microvascular Research* 31 (1996) 288-305.
- [62] H Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release.* 65 (2000) 271-284.
- [63] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science* (80-.). 303 (2004) 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
- [64] A.M.E. Abdalla, L. Xiao, M.W. Ullah, M. Yu, C. Ouyang, G. Yang, Current challenges of cancer anti-angiogenic therapy and the promise of nanotherapeutics, *Theranostics.* 8 (2018) 533–549. <https://doi.org/10.7150/thno.21674>.
- [65] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
- [66] U.K. Marelli, F. Rechenmacher, T.R. Ali Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, Tumor targeting via integrin ligands, *Front. Oncol.* 3 (2013). <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00222>.
- [67] S. Quader, K. Kataoka, Nanomaterial-Enabled Cancer Therapy, *Mol. Ther.* 25 (2017) 1501–1513. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2017.04.026>.
- [68] H. Tang, X. Chen, M. Rui, W. Sun, J. Chen, J. Peng, Y. Xu, Effects of surface displayed targeting ligand GE11 on liposome distribution and extravasation in tumor, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 3242–3250. <https://doi.org/10.1021/mp5001718>.
- [69] B. Pelaz, P. Del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernández, J.M. De La Fuente, G.U. Nienhaus, W.J. Parak, Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake, *ACS Nano.* 9 (2015) 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- [70] F.F. Davis, The origin of peganology, 2002. www.elsevier.com/locate/drugdelivCommentary.
- [71] G. Caracciolo, Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 543-557. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.003>.
- [72] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.* 63 (2012) 185–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>.
- [73] H. Wang, J. Yu, X. Lu, X. He, Nanoparticle systems reduce systemic toxicity in cancer treatment, *Nanomedicine.* 11 (2016) 103–106. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.166>.
- [74] Y. Barenholz, Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release.* 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [75] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Review of Animal and Human Studies, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 419-436.

- [76] F. Lagarce, Nanomedicines: Are we lost in translation?, *Eur. J. Nanomedicine*. (2015). <https://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0017>.
- [77] V. Khare, A.K. Saxena, P.N. Gupta, Toxicology Considerations in Nanomedicine, *Nanotechnol. Appl. Tissue Eng.*, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00015-7>.
- [78] R. Fanciullino, J. Ciccolini, G. Milano, Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: A focus on nano-albumin-bound drugs, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 88 (2013) 504–513. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2013.06.010>.
- [79] V. Agrahari, P. Hiremath, Challenges associated and approaches for successful translation of nanomedicines into commercial products, *Nanomedicine*. 12 (2017) 819–823. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0039>.
- [80] A. Gabizon, M. Bradbury, U. Prabhakar, W. Zamboni, S. Libutti, P. Grodzinski, Cancer nanomedicines: Closing the translational gap, *Lancet*. 384 (2014) 2175–2176. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61457-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61457-4).
- [81] J.B. Coty, C. Vauthier, Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success, *J. Control. Release*. 275 (2018) 254–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.013>.
- [82] Y.W. Cho, J. Lee, S.C. Lee, K.M. Huh, K. Park, Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles, *J. Control. Release*. 97 (2004) 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.03.013>.
- [83] Q. Li, W. Yao, X. Yu, B. Zhang, J. Dong, Y. Jin, Drug-loaded pH-responsive polymeric micelles: Simulations and experiments of micelle formation, drug loading and drug release, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158 (2017) 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.063>.
- [84] S. Hua, M.B.C. de Matos, J.M. Metselaar, G. Storm, Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: Pathways for translational development and commercialization, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00790>.
- [85] V. Agrahari, V. Agrahari, Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities, *Drug Discov. Today*. 23 (2018) 974–991. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.047>.
- [86] R. Paliwal, R.J. Babu, S. Palakurthi, Nanomedicine Scale-up Technologies: Feasibilities and Challenges, *Ageing Int.* 15 (2014) 1527–1534. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0177-9>.
- [87] H. He, L. Liu, E.E. Morin, M. Liu, A. Schwendeman, Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines - Lessons Learned from Successes and Failures, *Acc. Chem. Res.* 52 (2019) 2673–2683. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00228>.
- [88] P. Zhao, X. Hou, J. Yan, S. Du, Y. Xue, W. Li, G. Xiang, Y. Dong, Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.001>.
- [89] J.C. Kasper, G. Winter, W. Friess, Recent advances and further challenges in lyophilization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>.
- [90] Y. Aso, S. Yoshioka, Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes, *Chem. Phar. Bull.* 53 (2005) 301–304.
- [91] B. Stark, G. Pabst, R. Prassl, Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.010>.

- [92] Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine*. 2014 Oct;10(7):1391-9. doi: 10.1016/j.nano.2014.03.017.
- [93] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.
- [94] R. García-álvarez, M. Vallet-Regí, Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance, *Nanomaterials*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11040888>.
- [95] S.J. Park, Protein–nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 5783–5802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254808>.
- [96] Q. Xiao, M. Zoulikha, M. Qiu, C. Teng, C. Lin, X. Li, M.A. Sallam, Q. Xu, W. He, The effects of protein corona on in vivo fate of nanocarriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 186 (2022) 114356. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114356>.
- [97] R. Pearson, H.-J. Hsu, J. Bugno, S. Hong, Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery, *MRS Bull.* (2014) 227–237.
- [98] S. Palchetti, D. Pozzi, A.L. Capriotti, G. La Barbera, R.Z. Chiozzi, L. Digiacomio, G. Peruzzi, G. Caracciolo, A. Laganà, Influence of dynamic flow environment on nanoparticle-protein corona: From protein patterns to uptake in cancer cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 153 (2017) 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.037>.
- [99] M. Hadjidemetriou, S. McAdam, G. Garner, C. Thackeray, D. Knight, D. Smith, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, J. Rogan, A. Clamp, K. Kostarelos, The Human In Vivo Biomolecule Corona onto PEGylated Liposomes: A Proof-of-Concept Clinical Study, *Adv. Mater.* 31 (2019). <https://doi.org/10.1002/adma.201803335>.
- [100] N. Singh, C. Marets, J. Boudon, N. Millot, L. Saviot, L. Maurizi, In vivoprotein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior?, *Nanoscale Adv.* 3 (2021) 1209–1229. <https://doi.org/10.1039/d0na00863j>.
- [101] G. Caracciolo, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.011>.
- [102] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- [103] S.M. Kim, P.H. Faix, J.E. Schnitzer, Overcoming key biological barriers to cancer drug delivery and efficacy, *J. Control. Release.* 267 (2017) 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.016>.
- [104] S.J. Hwang, H. Park, K. Park, Gastric retentive drug-delivery systems., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 15 (1998) 243–84.
- [105] M.B. Bally, P. Harvie, F.M.P. Wong, S. Kong, E.K. Wasan, D.L. Reimer, Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (1999) 291-315.
- [106] P. Henrich-Noack, D. Nikitovic, M. Neagu, A.O. Docea, A.B. Engin, S. Gelperina, M. Shtilman, P. Mitsias, G. Tzanakakis, I. Gozes, A. Tsatsakis, The blood–brain barrier and beyond: Nano-based neuropharmacology and the role of extracellular matrix, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17 (2019) 359–379. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.01.016>.
- [107] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release.* 342 (2022) 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.

- [108] Q. Dai, S. Wilhelm, D. Ding, A.M. Syed, S. Sindhvani, Y. Zhang, Y.Y. Chen, P. Macmillan, W.C.W. Chan, Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors, *ACS Nano*. 12 (2018) 8423–8435. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03900>.
- [109] S. Sindhvani, A.M. Syed, J. Ngai, B.R. Kingston, L. Maiorino, J. Rothschild, P. MacMillan, Y. Zhang, N.U. Rajesh, T. Hoang, J.L.Y. Wu, S. Wilhelm, A. Zilman, S. Gadde, A. Sulaiman, B. Ouyang, Z. Lin, L. Wang, M. Egeblad, W.C.W. Chan, The entry of nanoparticles into solid tumours, *Nat. Mater.* 19 (2020) 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- [110] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016). <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [111] M. Kumar, P. Kulkarni, S. Liu, N. Chemuturi, D.K. Shah, Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 194 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114708>.
- [112] S. Taurin, H. Nehoff, K. Greish, Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link?, *J. Control. Release*, 164 (2012) 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.013>.
- [113] K. Park, Facing the truth about nanotechnology in drug delivery, *ACS Nano*. 7 (2013) 7442–7747. <https://doi.org/10.1021/nn404501g>.
- [114] A.R. Petrinca, A. Pietroiusti, G. Argentin, R. Cicchetti, D. Donia, R. Gabrieli, I. Vignoli, A. Magrini, M. Divizia, [The birth of nanobiotechnologies: new nanomaterials, potential uses, toxic effects and implications for public health]., *Ig. Sanita Pubbl.* 65 (2005) 169–88.
- [115] N. Singh, B. Manshian, G.J.S. Jenkins, S.M. Griffiths, P.M. Williams, T.G.G. Maffei, C.J. Wright, S.H. Doak, NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*. 30 (2009) 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>.
- [116] W.H. De Jong, P.J. Borm, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *Int. Jour. Nanomed.* 3 (2008) 133–149.
- [117] L. Juillerat-Jeanneret, M. Dusinska, L.M. Fjellsbo, A.R. Collins, R.D. Handy, M. Riediker, Biological impact assessment of nanomaterial used in nanomedicine. Introduction to the NanoTEST project, *Nanotoxicology*. 9 (2015) 5–12. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.826743>.
- [118] M. Müller, U. Müller-Zellenberg, G. Hochhaus, H. Derendorf, Current concepts in pharmacokinetics and their implications for clinical medicine, *Wien Klin Wochenschr.* 113 (2001) 566–572.
- [119] M. Hashida, Role of pharmacokinetic consideration for the development of drug delivery systems: A historical overview, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 157 (2020) 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.015>.
- [120] R.M. Ward, S.E. Kern, Principles of Pharmacokinetics, in: *Fetal Neonatal Physiol.*, Elsevier, (2017) 201–207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00019-6>.
- [121] D.R. Mould, R.N. Upton, Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development - Part 2: Introduction to pharmacokinetic modeling methods, *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2 (2013). <https://doi.org/10.1038/psp.2013.14>.
- [122] A.J. Lucas, J.L. Sproston, P. Barton, R.J. Riley, Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 14 (2019) 1313–1327. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1660642>.
- [123] M. Zhao, J. Ma, M. Li, Y. Zhang, B. Jiang, X. Zhao, C. Huai, L. Shen, N. Zhang, L. He, S. Qin, Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>.

- [124] O.A. Almazroo, M.K. Miah, R. Venkataramanan, Drug Metabolism in the Liver, *Clin. Liver Dis.* 21 (2017) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>.
- [125] J.Y.L. Chiang, Bile acid metabolism and signaling, *Compr. Physiol.* 3 (2013) 1191–1212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>.
- [126] M.S. Roberts, B.M. Magnusson, F.J. Burczynski, M. Weiss, Enterohepatic Circulation Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications, *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 751-790.
- [127] L. Yuh, S. Beal, M. Davidian, F. Harrison, A. Hester, K. Kowalski, E. Vonesh, R. Wolfinger, Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Methodology and Applications: A Bibliography, *Biometrics.* 50 (1994) 566-575.
- [128] L.B. Sheiner, "The Population Approach to Pharmacokinetic Data Analysis: Rationale and Standard Data Analysis Methods", *Drug Metab. Rev.* 15(1984) 153-171.
- [129] S Urien, La pharmacocinétique de population, aspects fondamentaux Fundamentals of population pharmacokinetics, *La Lettre du Pharmacologue* 17 (2003) 97-102.
- [130] B. Delyon, M. Lavielle, E. Moulines, Convergence of stochastic approximation version of the EM algorithm, *The Ann. of Statistics* 27 (1999) 94-128.
- [131] P.L.S. Chan, P. Jacqmin, M. Lavielle, L. McFadyen, B. Weatherley, The use of the SAEM algorithm in MONOLIX software for estimation of population pharmacokinetic-pharmacodynamic-viral dynamics parameters of maraviroc in asymptomatic HIV subjects, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 38 (2011) 41–61. <https://doi.org/10.1007/s10928-010-9175-z>.
- [132] E. Olofsen, A. Dahan, Using Akaike's information theoretic criterion in population analysis: a simulation study, *F1000Research.* 2 (2013) 71. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-71.v1>.
- [133] D. Brocks, D. Hamdy, Bayesian estimation of pharmacokinetic parameters: An important component to include in the teaching of clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring, *Res. Pharm. Sci.* 15 (2020) 503–514. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.301335>.
- [134] Joel S. Owen, Jill Fiedler-Kelly, *Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Model.* , 2014.
- [135] M. Bergstrand, A.C. Hooker, J.E. Wallin, M.O. Karlsson, Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models, *AAPS J.* 13 (2011) 143–151. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9255-z>.
- [136] E. Comets, K. Brendel, F. Mentré, Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models: The npde add-on package for R, *Comput. Methods Programs Biomed.* 90 (2008) 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2007.12.002>.
- [137] K. Brendel, C. Dartois, E. Comets, A. Lemenuel-Diot, C. Laveille, B. Tranchand, P. Girard, C.M. Laffont, F. Mentré, Are Population Pharmacokinetic and/ or Pharmacodynamic Models Adequately Evaluated?, *Clin Pharmacokinet.* 46 (2007) 221-234.
- [138] R.M. Savic, M.O. Karlsson, Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: Problems and solutions, *AAPS J.* 11 (2009) 558–569. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9133-0>.
- [139] H. Wu, J.R. Infante, V.L. Keedy, S.F. Jones, E. Chan, J.C. Bendell, W. Lee, B.A. Zamboni, S. Ikeda, H. Kodaira, M.L. Rothenberg, H.A. Burris, W.C. Zamboni, Population pharmacokinetics of PEGylated liposomal CPT-11 (IHL-305) in patients with advanced solid tumors, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (2013) 2073–2081. <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1580-y>.

- [140] K. Raza, P. Kumar, N. Kumar, R. Malik, Pharmacokinetics and biodistribution of the nanoparticles, *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids.* (2017) 165-186. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00009-2>.
- [141] H. Mukai, K. Hatanaka, N. Yagi, S. Warashina, M. Zouda, M. Takahashi, K. Narushima, H. Yabuuchi, J. Iwano, T. Kuboyama, J. Enokizono, Y. Wada, Y. Watanabe, Pharmacokinetic evaluation of liposomal nanoparticle-encapsulated nucleic acid drug: A combined study of dynamic PET imaging and LC/MS/MS analysis, *J. Control. Release.* 294 (2019) 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.006>.
- [142] M.S. Valic, M. Halim, P. Schimmer, G. Zheng, Guidelines for the experimental design of pharmacokinetic studies with nanomaterials in preclinical animal models, *J. Control. Release.* 323 (2020) 83-101. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.002>.
- [143] W.C. Zamboni, Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 8230-8234. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1895>.
- [144] K. Park, PK/PD model for liposomal chemophototherapy, *J. Control. Release.* 297 (2019) 102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.022>.
- [145] D. Pozzi, G. Caracciolo, L. Digiaco, V. Colapicchioni, S. Palchetti, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, R. Zenezini Chiozzi, A. Puglisi, A. Laganà, The biomolecular corona of nanoparticles in circulating biological media, *Nanoscale.* 7 (2015) 13958-13966. <https://doi.org/10.1039/c5nr03701h>.

CAHIER DES CHARGES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Le laboratoire MINT (Micro et Nanomédecines translationnelles) de l'Université d'Angers est à l'initiative d'un type de nanosystème pharmaceutique : les nanocapsules lipidiques (NCLs). Elles sont obtenues *via* un procédé original d'inversion de phase et un brevet a été déposé au début des années 2000 pour protéger cette innovation [35]. La suite de ce manuscrit s'intéresse uniquement à ce type de nanoformulation.

Mieux connaître le devenir des NCLs dans l'organisme, et par conséquent, optimiser les nanoformulations afin d'obtenir le meilleur profil pharmacocinétique possible, semble être la clé pour un passage de la phase préclinique vers la clinique.

L'objectif général de ce travail de thèse a été de mettre en place des outils et techniques pour comprendre le devenir des NCLs après administration par voie intraveineuse.

Le travail expérimental s'est décomposé en trois phases. La première, dédiée à l'évaluation du phénomène d'adsorption des protéines sur les NCLs, semblait indispensable puisque cela a été très peu étudié auparavant au sein du laboratoire. Ainsi, le devenir immédiat des NCLs après administration intraveineuse a été étudié après mise en contact *in vitro* des NCLs avec le milieu sanguin. L'objectif de cette première phase expérimentale était donc d'évaluer l'impact des transformations physico-chimiques *in vitro* liées à la formation d'une couronne de protéines autour des NCLs.

En parallèle, une seconde phase expérimentale avait pour objectif de mettre au point une méthode d'extraction et de quantification des NCLs dans le sang, sous forme intacte, pour la réalisation d'une étude de pharmacocinétique *in vivo* chez le rat après administration intraveineuse. En effet, les données pharmacocinétiques sur les NCLs, comme le volume de distribution ou le temps de circulation, restent à ce jour encore méconnues.

Enfin, au vu des résultats obtenus à l'issue de la seconde phase expérimentale, l'élimination rénale des NCLs (sous leur forme intacte) après administration intraveineuse *in vivo* chez le rat a été étudiée spécifiquement, et ce dans le but de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses.

Ce travail a été financé par La Ligue contre le cancer (Maine-et-Loire et Loiret). Une bourse de 23 480 euros a été attribuée à ce projet en 2019 pour permettre la réalisation des expérimentations au sein du laboratoire MINT.

La suite du présent manuscrit se décompose en trois grandes parties. La première partie est une revue de la littérature consacrée à la compréhension des spécificités de modélisation pharmacocinétique des nanovecteurs organiques. Il s'agit d'un état des lieux sur les problématiques et les points de vigilance nécessaires en vue d'améliorer la transposition des phases de développement précliniques vers une utilisation en pratique courante. La seconde partie expose les travaux expérimentaux et se divise en trois chapitres :

- Etude de la formation de la couronne de protéines après mise en contact des NCLs avec des protéines ;
- Etude pharmacocinétique de NCLs-FRET après administration intraveineuse chez le rat avec modélisation par approche populationnelle ;
- Etude de l'élimination rénale des NCLs-FRET après administration intraveineuse chez le rat.

La troisième partie est consacrée à une discussion générale portant sur les différentes méthodologies abordées sur l'ensemble de ce travail avant de conclure et de présenter les perspectives sur lesquelles ouvrent ces travaux.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Modélisation pharmacocinétique des nanomédicaments : enjeux et spécificités

Avant-propos

Comme tout médicament, les nanomédicaments doivent bénéficier, au cours de leur développement, d'une attention toute particulière quant à leur pharmacocinétique pour espérer arriver sur le marché. Les chercheurs et industriels doivent faire face à de nombreux obstacles au cours des différentes phases de développement d'un nanomédicament : caractérisation physico-chimique, détection et quantification dans l'organisme après administration, modifications des propriétés physicochimiques après administration... Tous ces éléments sont autant de spécificités à appréhender pour espérer mener des travaux d'évaluation pharmacocinétique de qualité.

Cette revue est le fruit d'un travail de recherche bibliographique. Elle fait la synthèse des spécificités de modélisation liées à ces formes galéniques originales que sont les nanovecteurs. Y sont exposées également quelques pistes de réflexion ainsi que des propositions à propos notamment de la biotransformation des nanoparticules et de la pharmacocinétique théorique de la molécule active, sous forme encapsulée et sous forme libre.

Publié dans Drug Discovery Today. 2021 Oct; 26 (10):2259-2268.



Specificity of pharmacokinetic modeling of nanomedicines

KEYNOTE (GREEN)

Vincent Lebreton^{a,b}, Samuel Legeay^a, Patrick Saulnier^{a,b}, Frederic Lagarce^{a,b,c}

^aUniversity of Angers, MINT Inserm 1066 CNRS 6021, Angers, France

^bCHU Angers, 4 Rue Larrey, 49033 Angers, France

Nanomedicines have been developed for more than four decades to optimize the pharmacokinetics (PK) of drugs, especially absorption, distribution, and stability *in vivo*. Unfortunately, only a few drug products have reached the market. One reason among others is the lack of proper PK modeling and evaluation, which impedes the optimization of these promising drug delivery systems. In this review, we discuss the specificity of nanomedicines and propose key parameters to take into account for future accurate PK evaluation of nanomedicine. We believe that this could help these innovative drug products to reach to market and change the fate of many diseases.

Keywords: Nanomedicine; Pharmacokinetics; Drug evaluation; Modeling

Introduction

The concept of nanomedicines was coined during the 1960s, and some medical applications have successfully made it to the clinic, especially in the domain of cancer therapy and, recently, with two nanoparticle (NP)-based vaccines to combat Coronavirus 2019 (COVID-19).^{1–4} However, for some key opinion leaders in this field, the pathway to the market is narrow for these special drug delivery systems.⁵ This issue is linked to the difficulty in characterizing nanosized drug delivery systems.⁶ Their clinical translation would be faster if the products were better characterized and if their behavior *in vivo* was more described.⁷

This is worth pursuing because nanotechnologies have significant potential in medicine beyond their application for vaccines. The concept of nanodrug delivery systems was proposed initially to improve the efficacy and safety of already commercialized anti-cancer or anti-infectious drugs. The objective was to enhance the performance of those nano-encapsulated drugs (i.e., absorption, body residence time, and selective distribution) and to limit their toxicity.⁸ The field has since received significant funding and is projected to continue to grow rapidly.⁹



Vincent Lebreton studied pharmacy at the University of Angers, France, and was then a hospital pharmacist at the University of Toulouse, earning a MSc in pharmacokinetics from the University of Paris XI, France. He is currently a hospital pharmacist and a PhD at the University

of Angers. His main research interest is the pharmacokinetic evaluation of anticancer drug nanoparticles to understand and improve their profiles.



Samuel Legeay received his PharmD in 2014 and his PhD in 2016 from the University of Angers, France. After a stint at the Vascular Biology Center (Augusta, GA, USA), he joined the MINT laboratory (UMR INSERM U1066 CNRS 6021, Angers, France) in 2017 as an assistant professor, where he focuses his research on the pharmacokinetics of nanomedicines and vascular targeting.

* Corresponding author at: University of Angers, MINT Inserm 1066 CNRS 6021, Angers, France. Lagarce, F. (Frederic.lagarce@univ-angers.fr)



Frederic Lagorce

received his PhD in 2004, and has been a full professor of pharmaceutical technology and biopharmaceutics since 2012 at the University of Angers, France. Being also a hospital pharmacist, his research is translational (from bench to bedside) and

mainly focuses on cancer therapy, especially bioavailability enhancement by exploiting interactions between the drug products (mainly nanosystems) and living tissues. In hospital he is in charge of the pharmaceutical technology and quality control unit. Finding new answers to medical needs using innovative drug formulations is what drives his work.

Nanomedicines have been developed for more than four decades to optimize the pharmacokinetics (PK) of drugs, especially absorption, distribution, and stability *in vivo*. Unfortunately, only a few drug products have reached the market. One reason among others is the lack of proper PK modeling and evaluation, which impedes the optimization of these promising drug delivery systems. In this review, we discuss the specificity of nanomedicines and propose key parameters to take into account for future accurate PK evaluation of nanomedicine. We believe that this could help these innovative drug products to reach to market and change the fate of many diseases.

Unfortunately, the few therapeutics nanoformulations that have already reached the market have not dramatically changed the outcome of their target disease, as seen, for example, with liposomal doxorubicin, which displays a new toxicological profile compared with free doxorubicin (used for palmo-plantar erythrodysesthesia)^{10,11} and for Nab[®] paclitaxel (increases sensory neuropathy), which has not changed the prognosis of patients with breast cancer.^{11,12} The enhanced permeation and retention (EPR) effect observed in rodents, which was for decades used to explain the potential of NPs to accumulate in tumors, is now widely recognized as being minimal in humans.¹³ These examples show that the biodistribution of nanomedicines remains to be precisely determined. Moreover, the interactions of nanomedicines with biological media needs to be described in more details, in particular because of the high surface area:mass ratio of these nanosized drug delivery systems. Indeed, one major interaction raised to explain the fate of NPs *in vivo* is protein corona formation at the surface of the NP, the diffusion of the modified NP being impeded by its sterically hindered surface.

We think that the major problem impeding the access of nanomedicine to patients is that previous pharmacokinetic (PK) and biodistribution studies, including PK modeling, did not take into account the specificity of those drug delivery systems. In regular PK analysis, biodistribution is described by four phases: absorption (except for the intravenous route), distribution, metabolism, and elimination (ADME). These are associated with different PK parameters, such as volume of distribution, half-life, mean retention time (MRT), area under the curve (AUC), and clearance. Those parameters are calculated based on the concentration of the drug molecule in the blood (mainly) versus time. PK modeling can be done by either a noncompartmental approach or by compartmental modeling. In this review, we shed light on what makes nanomedicines so different and how those specificities should be considered in models that are used to gain their approval by national and international health agencies.

Nanomedicines can globally be classified into two groups: organic and inorganic. Organic NPs include nanocapsules, dendrimers, polymeric micelles, and liposomes, whereas inorganic ones include NPs without any carbon atoms and generally comprise a variety of materials, such as noble metals (golden, silver etc.), alkaline earth metals (calcium, magnesium, etc.), semiconductors (cadmium and titan) or magnetic compounds (iron, nickel, cobalt, etc.).¹⁵

In this review, we focus on organic lipidic or polymeric NPs because the issues and models associated with these differ from those of inorganic particles, especially in terms of their diffusion and stability, which are central to understand the fate of these particles in the body.

Absorption

Besides parenteral routes, all routes of administration (skin delivery, pulmonary delivery, and oral delivery) involve absorption to reach the blood circulation for systemic action.¹⁶ We focus here on oral delivery because the challenges for PK evaluation are the highest for this route, as explained below.

The oral route is the route of choice for many drugs because it is considered convenient and safe. However, some drugs are not properly absorbed by the oral route because they are not soluble and display low permeability across the intestinal barrier. Some drugs are also destroyed by the biochemical stress induced by digestive liquids. Nanomedicines have been proposed to protect the drug and enhance its permeability. This would allow the oral delivery of peptides, such as insulin, or other important drugs, such as anticancer drugs.¹⁷

After oral administration, the bioavailability of the drug is mainly impacted by the absorption process. In fact, the stability of the drug after contact with biological media, its solubility, and its permeability are key parameters to monitor. The encapsulation of the drug molecules in NPs can help to control these parameters and many examples can be found showing oral bioavailability enhancement after encapsulation in nanocarriers;^{18–21} however, specific issues can also appear, as we discuss herein.

Gastrointestinal stability of NPs in relation to their PK profile

Gastric or intestinal fluids are a well-known stress for free molecules because of the pH of the media and the presence of enzymes, such as lipases or peptidases. If encapsulation is

proposed to protect active drugs, NPs should remain intact after contact with gastric or intestinal fluid with minimal encapsulated drug leakage. To evaluate the gastrointestinal stability of lipid nanocapsules (LNC), Roger *et al.* studied the size of LNCs after 3 h of contact with a simulated gastric (FaSSiF-V2) and intestinal media (FeSSiF-V2). The LNC size was not modified after 3 h in the gastric medium but was quickly destroyed in the intestinal medium because of pancreatic lipase.²² In addition, Singh *et al.* studied the stability of poly (ethylene glycol) (PEG)-ylated liposomes versus conventional liposomes after 2 h of exposure to the gastrointestinal environment. They compared the release of the drug from these two formulations, finding that if the drug remained in PEGylated liposomes after 2 h, it was then completely released, compared with the conventional liposomes XXXXX.²³ For polymeric NPs, Tobio *et al.* demonstrated that a PEG coating of poly (lactic acid) (PLA) NPs increased protection against digestive fluids. Indeed, after 4 h of incubation in simulated gastric media, PEG-PLA NPs were less degraded than PLA NPs (only 3% PEG-PLA NPs were converted in lactate against 9% of PLA NPs).²⁴

From these examples, it is easy to understand that, to describe the PK profile of nanomedicines after oral administration, the stability of the nanocarrier along all the gastrointestinal tract should be checked and included in the PK model.

Mucus permeation of NPs as a crucial barrier to absorption

After its contact with gastric and intestinal fluid, the nanocarrier has to diffuse through mucus to be absorbed or at least to release its cargo in the mucus in the vicinity of drug-absorption sites. After the stability issue, diffusion within mucus is an important barrier for nanocarrier absorption; the barrier properties of mucus have been fully reviewed elsewhere.^{25–27}

Using the Transwell® system, Groo *et al.* studied the impact of LNC surface modifications on their diffusion capability through the intestinal mucus layer. The authors concluded that LNCs with positive or neutral charge diffuse better through the mucus compared with negative LNCs.²⁸ However, mucus diffusion might be a limiting step for drug absorption in the case of nanomedicines, explaining why many authors have proposed specific models²⁶ and NP surface modifications to aid mucus crossing.²⁹ Regular cell models, such as Caco-2 cells, which are widely used to assess the intestinal permeability of small molecules, are not relevant in the case of nanomedicines if they do not display a mucus barrier. This is why specific *in vitro* models, including mucus-secreting cells in co-culture with Caco-2, have been proposed.^{30–32} For example, to increase the correlation between *in vitro–in vivo* results, Pereira *et al.* seeded Caco-2 and HT29-MTX Matrigel®, which contains myofibroblasts (CCD18-Co cells).³³ The authors demonstrated that this new 3D *in vitro* model was robust and could be used to predict drug and NP permeability.³³

NP mechanisms of diffusion in mucus are a complex and ill-defined phenomenon. Physicochemical interactions, such as hydrophobic, electrostatic, and hydrogen interactions, limit NP diffusion and can be controlled by the composition of the NP surface properties.²⁶ In addition, because both the size and charge of nanomedicines impact their ability to diffuse through

mucus and there is interplay between those two features, they have to be analyzed concomitantly.^{34,35}

Contrary to what is used for free small molecules, mucus diffusion is a key parameter that must be considered in the design of absorption models for nanomedicines. Thus, as proposed for stability, relevant models of PK used for nanomedicines should take into account their diffusion into mucus. In the case of small molecules, *in vitro–in vivo* correlation does not consider mucus diffusion; that is, the more the drug is released *in vitro*, the more of it will be absorbed (if the transport process is not saturable). This correlation is more complicated if the NPs are stuck in the mucus. Similarly, current PK models do not differ even if the drug remains in the NP during the absorption process.

Crossing intestinal barriers: The specificity of nanomedicines and consequences for PK study

Crossing the intestinal barrier requires specific pathways in the case of nanomedicines. As long as the drug remains encapsulated, it cannot cross the enterocytes by passive diffusion, whereas this is the main absorption process for small uncharged molecules. Thus, the absorption will be different if the drug is released before enterocyte crossing or if it is the NP carrying the drug that is absorbed. These differences have to be taken into account in relevant specific PK models. Indeed, NPs can only be absorbed by active endocytosis using clathrin pits or caveolae or by micropinocytosis.³² These processes are saturable and slower than passive diffusion. These particular steps for NP absorption should be included in relevant PK models of NP. Absorption mechanisms can be studied using regular cellular models.¹⁸ For example, one important question to address is the equilibrium of the endocytosis mechanisms in the case of NPs. For some NPs, a relay between the different endocytosis has been observed if one of them is saturated or blocked, allowing rapid uptake of the NPs in the cell, whereas, for others, it might not be the same if their uptake is mediated by only one endocytosis process.

The integrity of NPs while crossing the intestinal barriers should also be studied. For example, Roger *et al.* conducted an *in vitro* study of LNCs to demonstrate their stability during enterocyte crossing. By following NPs with Förster resonance energy transfer (FRET) labeling, the authors observed the FRET signal in the basolateral side of the Caco-2 cell monolayer after 2 h, allowing them to demonstrate both LNC integrity and intestinal absorption.³⁶ This information is essential because the PK after absorption will follow the PK profile of the free drug if the carrier is destroyed during the absorption process, whereas it will mostly follow the PK profile observed after intravenous injection of the nanocarrier if this carrier remains intact after reaching the portal vein at the end of the absorption process. One can also suggest that the PK of the drug can also be a complex mix between the PK of the free and encapsulated drug.

Other *in vitro* models have been developed to mimic accurately the cell diversity of the intestinal barrier. Gulberg *et al.* developed a co-culture with Caco-2 cells and the B cell lymphoma Raji cell line to mimic enterocytes and M cells, respectively.³⁷ This model was improved by des Rieux *et al.*, and enabled the authors to suggest micropinocytosis as a main mechanism of absorption for their 200-nm carboxylated polystyrene NP.³⁰ Belouqui *et al.* summarized different cell culture models used

for transport studies of NP. The authors stated that almost all NPs cross the intestinal barriers via endocytosis except for lipophilic NPs, which are mainly transported by transcellular pathways.³²

The cellular models for studying intestinal absorption have been improved to better describe their uptake mechanisms by the cells. Knowledge of those mechanisms is needed to optimize the NP formulation to enhance their oral bioavailability. In parallel, the integrity of NPs can be monitored (especially using FRET) during the crossing of cells. This second feature appears to be more crucial to include in the PK model to predict more accurately the bioavailability of the drug. If the NP is not stable while crossing the intestinal cell barrier, the fate of the encapsulated drug can be critically modified, which is not the case if the uptake pathway changes or is not fully described. The latter was shown by Roger *et al.*, who displayed alternative uptake mechanisms because the main entrance pathway was blocked by inhibitors. Indeed, the authors demonstrated a modification of transport pathways after cholesterol depletion or inhibition of clathrin-mediated endocytosis.²¹

PK model relevancy for absorption

From what has already been discussed, we can affirm that integrity of the NP and its overall stability is an important parameter to monitor to obtain a relevant PK model. In regular PK models, the AUC after oral administration is accurate evidence of the rate of absorption, which can be calculated by Weibull modeling (Weibull's law is a three-parameter probability law that is widely used to model the lifetime of products because of its flexibility). In the case of nanomedicines, it is not relevant to only quantify the concentration of the drug through time because it does not consider the stability of the NP. For example, this was demonstrated by Groo *et al.*, whereby the most effective paclitaxel nanoformulation in an *in vivo* subcutaneous tumor model after oral delivery was not that with the highest AUC. Importantly, the tumor was resistant to free paclitaxel but not to encapsulated paclitaxel. Thus, the formulation that was not stable during absorption gave the highest AUC, whereas free paclitaxel was not effective enough against the tumor. Paclitaxel encapsulated in stable LNCs was less absorbed but more effective. This is one example that demonstrates that relationship between AUC and drug effect is not obvious in the case of nanomedicines.³⁸

Distribution

The main goal of drug nanoencapsulation is to modify the distribution of the drug to enhance its activity and/or to reduce its toxicity. Thus, this step of the PK process should be clearly assessed. Once again, regular PK models fail to describe with good accuracy the dynamics of NP distribution, which depends on the interaction of particles with body fluids and tissues throughout the distribution process. Physicochemical parameters of the NPs change after contact with body fluids and are responsible for the fate of the nanocarrier *in vivo*. To describe and predict those interactions, it is mandatory to characterize the NPs fully before administration and during their journey in the bloodstream.

Characterization of NPs before administration

To follow the distribution dynamics and to establish relevant models, it is important to characterize the formulation before administration. Not only size, shape, and charge should be assessed, but the homogeneity of the formulation should also be well defined. If more than one type of nanostructure exists (e.g., nanocapsules mixed with micelles) in the same formulation mixture, this will have impact on the overall distribution. Regular PK models used to describe distribution only consider the active ingredient as a free drug. Some nanomedicine PK models have been published but with the hypothesis that only one type of NP was administered.^{23,39} However, it is now well known that other species, such as micelles, can also be present in the formulation in addition to NPs. This is also the case for liposomal formulations, which can contain different types of liposome or liposome remnants.⁴⁰ This complexity of the NP population after formulation has to be well characterized or purified to be included for specific PK modeling of NPs.

To explain the complexity of NP characterization, we can look at an apparently simple parameter, namely size determination. It is well known that size impacts distribution.^{41,42} Thus, accurately determining the size is mandatory. However, different techniques adapted and validated in the nanosize range, such as dynamic light scattering (DLS), NP tracking analysis (NTA), or field-flow fractionation (FFF), coupled to multiple sizing detectors or even electron microscopy (EM), will not give the same results, especially for particles that are not solid, such as liposomes or lipid nanocapsules. If the technique is different, the measured parameter is also different as, thus, is the final result. In fact, the difficulty is in choosing the best adapted method of analysis. In addition, size measurement is always performed *in vitro* in standardized conditions and might not be the same after contact with organic fluids, as blood. The same reasoning can be applied for zeta potential reflecting the surface charge of the particles.

Therefore, determining the true size of a particle is difficult and impedes accurate modeling of distribution. A 10% error on the radius of the particle will lead to a 21% error on the surface and, for some techniques, this difference is much higher.⁴³

Characterization of NPs after administration

If NP characterization is not easy before administration while NPs are in their native form, it becomes even more difficult in the blood compartment after contact with plasma proteins, which form a corona at the surfaces of the NPs and potentially changes their diffusion properties.^{44,45} The profile of coating protein depends on the physicochemical properties of NPs. This physicochemical specificity leads to a 'biological identity', which has been well described by Dawson and Linse *et al.*, and more recently by Caracciolo *et al.*^{14,46} This relatively modern concept is misunderstood, and mastering it is probably one of the keys to nanomedicine clinical success.⁴⁷ Increasing knowledge of this phenomenon is essential to obtain information relating to the surface-associated proteins of NPs. Given that the environment of the protein changes between different body compartments, NP coatings change as they move through the body. Indeed, corona proteins comprise a 'hard corona' based on strong NP/protein links, and 'soft corona' resulting from weak binding,

which allows dynamic protein exchanges at the surface of NPs.^{48,49} Finally, protein corona formation can lead to opsonization, which can enhance uptake by specialized cells of the reticuloendothelial system (RES), leading to increased NP elimination. Therefore, by changing the size, shape properties, and surface charge of NPs, a protein coating will influence their biodistribution. To avoid or minimize corona protein and, thus, increase the plasma half-life during biodistribution, it is possible to design stealth NPs with a PEG coating.^{50,51} These NPs can be considered second-generation NPs, for which steric stabilization with PEG is one of the promising approaches used to improve their PK profile, increase circulation time and/or stability, and reduce clearance of plasma nanocarrier by the RES.⁵²

Other important information for establishing accurate PK models is the equilibrium dynamic between the encapsulated drug, free drug, and the free NP. Regular PK models only describe the evolution of drug concentrations in compartments such as blood, brain, or other specific tissues. For NPs, their performance is linked to the distribution process of the drug within the carrier (specific targeting or drug protection) and the kinetics of release from the carrier to obtain drug action. Thus, monitoring the drug alone presents some limitations for NP PK modeling. Thus, it is important to use methods that enable the determination of not only the encapsulated and released drugs, but also the emptied NP. Combined with the PK process, this information is required to establish an accurate PK model with a high prediction capability of both the efficacy and toxicity of nanomedicines.

Singh *et al.* performed an *in vivo* PK study on liposomes loaded with exemestane (Fig. 1), in which they measured drug concentration without evaluating the integrity of liposomes,²³ while Menzel *et al.* investigated exenatide loaded in a self-emulsifying drug delivered system.³⁹ Most of the published studies rely on the monitoring of drug blood concentration over time, which is relevant for non-encapsulated drugs but is not accurate for nanomedicines. Considering the equilibrium between the free and the encapsulated drug during PK modeling will be required to remove barriers to the clinical translatability of nanomedicine treatments.

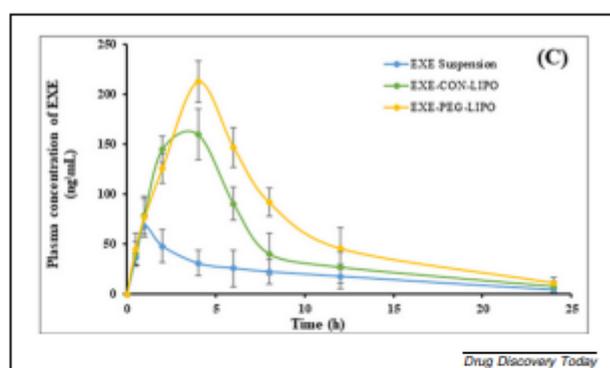


FIGURE 1 Plasma concentration of exemestane (EXE) with time for three different formulations: suspension, conventional liposomes (EXE-CON-LIPO), and poly (ethylene glycol) (PEG)-ylated liposomes (EXE-PEG-LIPO). Reproduced, with permission, from ²³.

Many studies use labeling of the drug or the nanocarrier (e.g., with a dye) to follow their distribution. In this case, the stability of the dye and of its association with the nanocarrier has to be checked. Many issues have been reported, such as instability of fluorescent labeling, structure modification of the carrier after labeling, or deterioration of NP stability.^{53,54} Moreover, labeling can change the fate of the nanomedicines if it changes their surface properties, as discussed earlier. Guo *et al.* discussed each method of labeling and their associated flaws for example, some elements of whole blood (hemoglobin) can interfere with fluorescence. According to these authors, radiotracers are considered as a suitable choice to keep the molecular structure of the nanocarriers but, unfortunately, are not the most appropriate form of control of NP structure integrity.⁵⁴

Volume of distribution

The volume of distribution (Vd) is a theoretical volume at which the drug should distribute at a homogenous concentration calculated from the initial blood concentration immediately after intravenous injection. This parameter is calculated for every regular drug product. For nanomedicines, encapsulated and free drugs are present at the same time from the initial time point (T0) in the blood circulation because, in many cases, there is an equilibrium between free and encapsulated drug even in the containers. Given this duality, the regular determination of Vd from the blood at T0 is neither accurate nor informative. If one calculates the Vd from the total drug (encapsulated plus free drug) the interpretation will be complex because the entities do not display the same diffusion patterns. This inability to determine an accurate Vd has consequences for modeling because, in standard models, Vd is used to calculate other parameters, such as drug total clearance. This example shows again that regular modeling is not relevant for PK determination of nanomedicines.

Biodistribution studies

A major way to evaluate the distribution of nanomedicines in the body while assessing their stability is to use FRET, as already described for absorption studies. Laine *et al.* used FRET to evaluate the behavior of different lipid NPs [i.e., LNCs, pegylated LNCs, and lipid nanoemulsions (LNEs)]. Results showed different release kinetic profiles, with PEGylated LNCs and LNEs had an extended blood-circulation time associated with good structure stability over several hours after intravenous injection.⁵⁵ Gravier *et al.* used macroscopic and microscopic imaging to analyze the FRET signal to determine the stability of LNE and LNC in a biological environment. Results showed that LNCs remained more stable compared with LNEs in the presence of serum or cancer cells.⁵⁶ These studies, based only on imaging, give insight into the fate of nanocarriers *in vivo* but are not quantitative and, thus, do not enable determination of a PK profile. Quantifying both the free drug and the nanocarrier in parallel would be a good strategy to this end.

Various studies have described the surface modification of NPs to optimize the biodistribution of the encapsulated drug in, for example, active targeting on solid tumors. Some surface probes, such as RGD peptides⁵⁷ or specific antibodies, have been proposed for this use.^{11,58} In recent years, the ability of blood pro-

teins to form a corona around NPs has also been taken into account to develop efficient active targeting.^{59,60} Before trying to optimize the biodistribution, one should be able to characterize accurately the distribution of nanomedicines and to differentiate encapsulated drug from free drug in every tissue. This would help to solve the issue of active targeting. In fact, the percentage of administrated drug that is considered to reach its target after encapsulation in specialized drug delivery systems is low (0.3–3% according to some studies).^{61,62} Although targeting has been one of the potential key features highlighted for nanomedicines, it is now obvious that this goal has not yet been achieved in humans. This is also because animal models used (mainly rodents) do not display the same physiological characteristics as humans and, thus, are nonrelevant models.

Conclusions on PK model relevancy for distribution step

To characterize and model the distribution, it is important to determine the dynamics of corona formation over the particles. Regular PK parameters are not directly usable, such as, for example, Vd, as discussed earlier. Moreover, modeling should include the equilibrium between free and encapsulated drug. One way of doing this would be to add a supplemental compartment related to the encapsulated drug in the PK model. Thus, the minimum number of compartments in a nanomedicine PK model would be two (i.e., free drug in the blood and encapsulated drug in the blood) (Fig. 2).

Degradation–elimination

The degradation–elimination phase is the last phase of the PK process for drugs and NPs. One of the key advantages of NPs is their prolonged circulation time. This has been seen as being particularly relevant for cancer therapy, and is why it is vital to characterize this phase with the aim of optimizing it. This phase contains both metabolization and excretion processes.

Phases of NP elimination and hepatic affinity

For the active drug, the PK phase of metabolism is represented by chemical reactions mainly found in the liver. Usually, these reactions are divided into three phases. First, an activation phase using enzymes of cytochrome P450, which include oxidation, reduction, or hydrolysis reactions. Then, a conjugation phase is

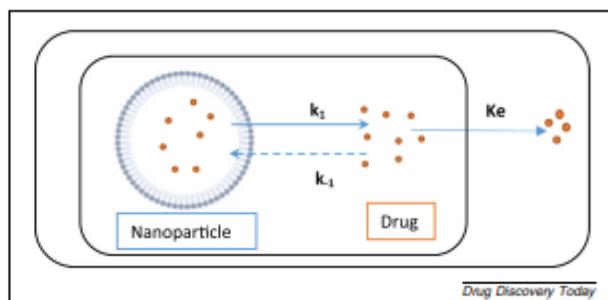


FIGURE 2

Drug release and exchange between nanoparticles and its elimination from the central compartment. k_1 and k_{-1} are the exchange constants of active drug between the NP central compartment. K_e represents the elimination constant from the compartment.

necessary because metabolites obtained after the first phase are clearly unstable. During this second phase, the addition of a hydrophilic group allows the best drug solubilization, thus facilitating its elimination. The final phase is a transport phase to eliminate xenobiotics (Fig. 3).⁶³ All these phases refer to the active drug and not to its carrier.

In the case of nanomedicines, PK parameters associated with normal metabolism and followed by drug elimination are not directly applicable. For the nanocarrier, it could be possible to define a Phase IV of degradation (Fig. 3). Indeed, even if NPs are not metabolized using classical hepatic pathways, there is a specific process for NP degradation mainly linked to liver–NP interactions, as described by Zhang *et al.* After NP administration, proteins that are present in different biological media cover NPs to form a protein corona. This is called opsonization and can be considered as the first step in elimination, during which the NP is tagged by proteins to allow its recognition by specific cells. Indeed, NPs covered with this protein corona generate different cell interactions in the blood, such as complement activation, or in different tissues, for example in the liver, with cellular uptake by the resident macrophages, Kupffer cells. The second step of NP elimination is the result of these interactions, which lead to NP degradation NP by the immune system. Thus, the liver has an essential role in the elimination of NPs, especially in the Kupffer cells by micropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, or caveolin-mediated endocytosis.^{64–66} Internalization is largely associated with surface charge, shape, or size and, thus, also with the composition of protein corona because it impacts all three characteristics. For example, PEG reduces cellular uptake by decreasing the formation of the protein corona. By contrast, NP size can affect endocytosis mechanisms. Indeed, endocytosis is caveolin mediated for 20–100-nm NPs, whereas it is clathrin mediated for 100–350-nm NPs, and uses micropinocytosis for larger NPs.^{65–68}

NP–liver interactions: ABC phenomena

NP–liver interactions are a major step in elimination; unfortunately, this step was generally only studied *in vitro* or in healthy animals, as detailed by La-Beck *et al.*⁶⁹ Using the right models in this case can be particularly relevant. For example, cancers are often associated with profound and heterogeneous immune dysfunction, which can lead to modification of circulating proteins, changing the nature of the corona covering the NPs and modifying their PK profiles.⁶⁸ Phagocytosis of NPs is more associated with specific recognizable proteins present on their surface rather than by the quantity of binding proteins. Indeed, Nguyen *et al.* showed that uptake of NPs in mixtures of different protein concentrations by phagocytes was identical.⁶⁰

These interactions with the mononuclear phagocyte system (MPS) lead to NP clearance from blood and sequestration in organs of the MPS: liver, spleen, and lymph nodes, and is one of the most important barriers to the therapeutic efficiency of NPs.⁷⁰ PEG is added to the NP surface to reduce uptake by MPS, but this can induce the production of anti-PEG antibodies and activation of complement proteins. This immunogenicity mechanism, which leads to an accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, is well established in preclinical studies but is unclear in clinical situations.^{68,71–73} The lack of relevant

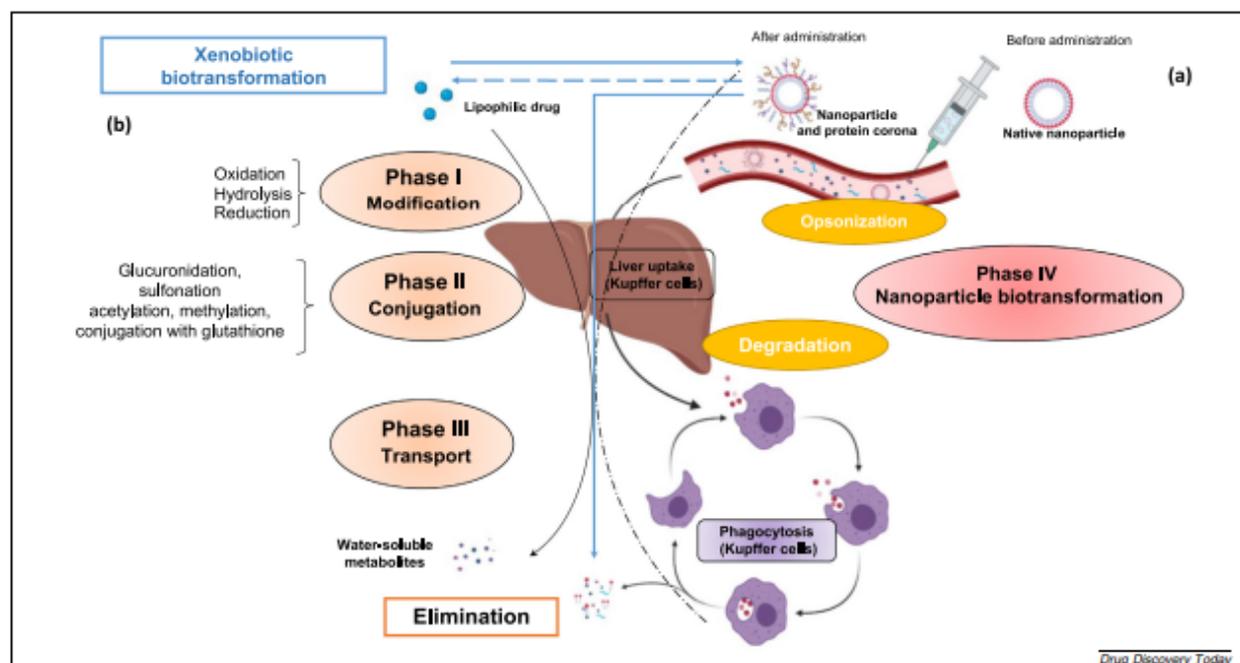


FIGURE 3

Parallel elimination of organic nanoparticles (a) and its encapsulated drug after release (b). Blue arrow represents drug release into the environment from the carrier; dashed blue arrow indicates drug exchange between the environment and the carrier. Blue circles indicate lipophilic drug molecules.

PK studies, including repetition of NP injections, could explain this situation. Thus, it will be interesting to study this ABC phenomenon more precisely, especially PK modification of nanomedicines after multiple injections. The ABC phenomenon is complex and depends on multiple factors: time interval effect (more pronounced from 4 to 7 days), third dose effect (decrease of effect after two injections), PEG-surface density, PEG chain-length effect, NP size and charge effect (increased for larger and positively charged NPs), administration effect (more important for slow infusion in contrast to bolus), or also animal species effect (maximum ABC is observed after 7 days for rats and 10 days for mice, but is unobserved for the rabbit).⁷¹

Renal excretion

As discussed for the distribution phase, another way to improve the PK profile during the elimination phase involves adding PEG to the NP surface to reduce renal clearance.⁷⁴

NP renal elimination is also associated with protein-corona formation because it has a major role in increasing particle diameter (hydrodynamic diameter), which becomes considerably larger compared with its *in vitro* measurement. Consequences for blood clearance are important because NP diameter is associated with cut-off glomerular filtration linked to the elimination from blood of the encapsulated drug; thus, this can affect its half-life in blood.⁷⁵

Glomerular tissue comprises three layers: fenestrated endothelium, glomerular basement membrane (GBM), and podocytes, with pores between 4 and 5 nm. Filtration cut-off is ~65 kDa (albumin molecular weight), which corresponds to 6–8 nm.

NPs < 6 nm are subject to free glomerular filtration, whereas NPs > 8 nm are not filtered. Moreover, renal elimination is also influenced by NP charge because the GBM is negatively charged; thus, positively charged NPs are more easily filtered than negatively charged NPs, which are repulsed. In addition, because fenestrated endothelium is covered by a negatively charged glycocalyx layer that is 200–300-nm thick, it allows negative NPs to have a longer circulation time.^{54,75,76} In a recent review, Peng *et al.* discussed the challenge of renal-clearable nanocarriers. This is an interesting topic because renal-clearable nanomedicines have many advantages, such as minimizing MPS uptake and avoiding long-term accumulation in vital organs, which could induce hepatic or spleen toxicity.⁷⁰

Calculating PK parameters for the elimination phase for nanomedicines

In regular PK analysis, the elimination phase is described by different PK parameters: half-life, MRT, and clearance. These parameters are calculated (mainly) from the concentration of the free drug in the blood versus time. This can be done by non-compartmental analysis (NCA) or after using compartmental modeling. In each case, the calculation should be related to the drug concentration. When it comes to nanomedicines, the problem is more complex because the drug can be present in blood as free or encapsulated drug (i.e., not bioavailable at the site of action). This situation should be taken into account in studies involving the PK analysis of nanomedicines. Indeed, the result obtained is not the same if both the free drug and the encapsu-

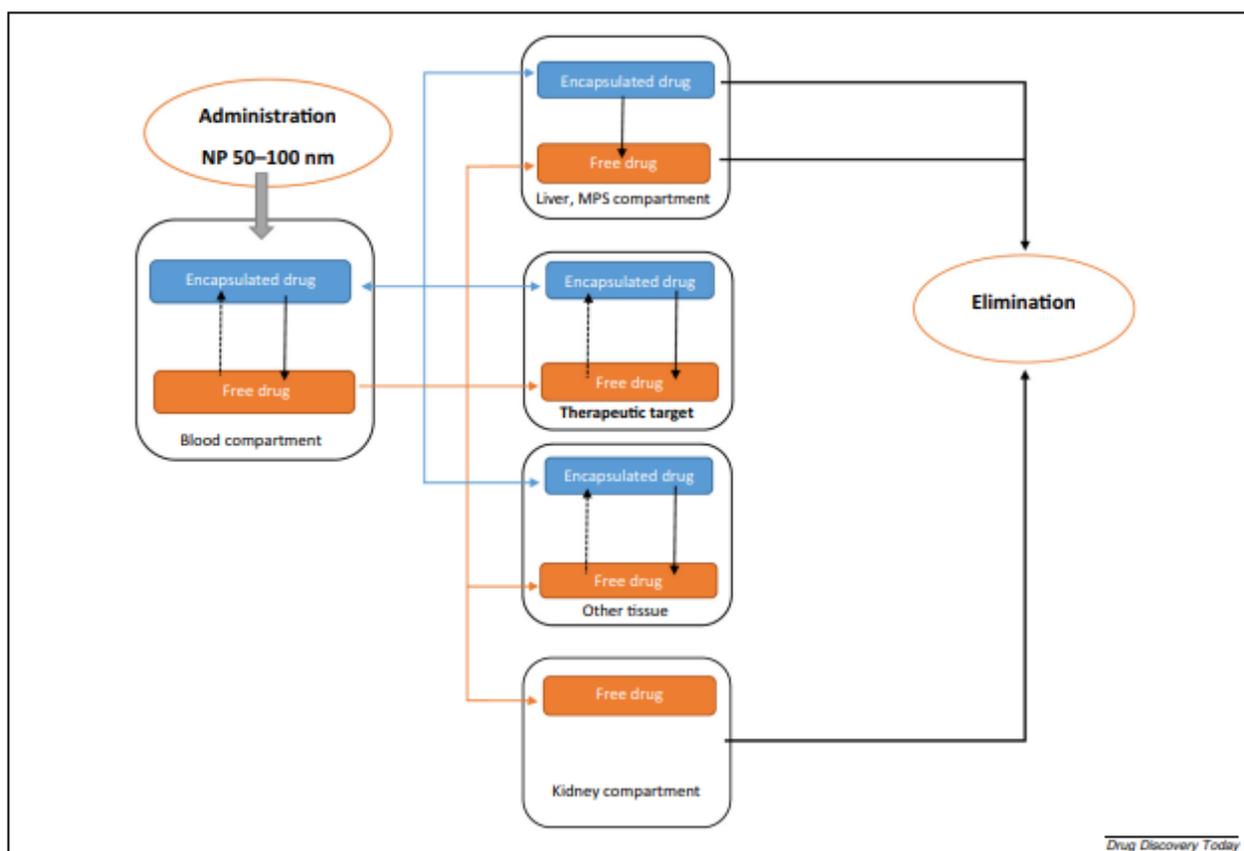


FIGURE 4

Proposed theoretical compartment pharmacokinetics (PK) model adapted to the specific features of nanomedicines. Blue arrows indicate encapsulated drug biodistribution; orange arrows indicate free drug biodistribution; black arrows indicate drug release from the nanoparticle; dashed black arrows indicate hypothetical return of drug back its carrier. Abbreviation: MPS, mononuclear phagocyte system.

lated drug are separated after blood sampling before analysis. Given that the fraction of drug that can be eliminated by the kidney is only the free drug, the calculated renal clearance should only refer to the free drug (with exception of renal-clearable nanomedicines < 8 nm as discussed earlier). For terminal half-life determination, the issue is the same and interpreting a half-life that includes free and encapsulated drug can be difficult, especially if the parameter is compared with a standard injectable or oral formulation without any encapsulation (i.e., sequestration of the drug from its elimination process). Thus, the MRT might be more relevant because it allows a more accurate comparison between different formulations of the same drug after NCA. MRT is a global value of the mean amount of time a molecule will stay in the studied tissue or media; however, it is only calculated from the blood AUC and its shape is described by area under the first moment curve (AUMC). Total clearance calculations for nanomedicine should also only be calculated as the ratio of dose and AUC using NCA, again keeping in mind that, in the case of nanomedicines, the result will be different if free drug is considered or if the total of free and encapsulated drug is considered. If modeling is involved to determine those elimi-

nation parameters, the carrier with its encapsulated drug should be considered as a supplementary compartment, as discussed earlier. In the model, the stability of the carrier should also be considered because it impacts the release of the free drug and, thus, its elimination. In fact, the released drug can follow the elimination process, which might not be the same for the encapsulated drug still protected from major elimination processes (metabolization, kidney filtration etc.).

Concluding remarks and perspectives

Classical PK parameters are not fully adapted and, thus, classical PK modeling is not sufficient to describe the PK of nanomedicines. Indeed, the PK of NPs is a suite of complex phenomena that combine free drug, encapsulated drug, and empty NPs. Classical PK models describe only the fate of the free drug. It is now necessary to create new PK models taking into account the dynamic equilibrium of free and encapsulated drug, the stability of the nanocarrier in the organism, its interactions with specific organs, such as the liver, spleen, and kidney, and any *in vivo* modifications of the carrier.

Recently, Colino *et al.* proposed an interesting PK model of NPs, which includes a specific compartment for macrophage uptake and release.⁶⁶ Two recent reviews by Byun *et al.* and Yuan *et al.* provide details about PK behavior that can be used to design PBPK models.^{77,78} Finally, Guo *et al.* suggested ways to improve PK modeling using two methods of approaching data: compartmental and noncompartmental analysis. The second method is more robust especially when the distribution is unknown.⁵⁴

As these authors explain, it appears essential to take into account all sequestration compartments in mathematical models

to better describe blood-circulation time and elimination of nanomedicines. Fig. 4 summarizes a proposed approach to describe the compartment to consider in modeling, which is the first step to future relevant PK models for nanomedicines.

Acknowledgment

This work was funded by the French League Against Cancer ('La Ligue contre le cancer') Maine et Loire Comity.

References

- 1 S. Tran, P.J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai, Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery, *Clin Transl Med* 6 (2017) 44–65.
- 2 L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, et al., Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine, *N Engl J Med* 384 (2020) 403–416.
- 3 J. Machhi, F. Shahjini, S. Das, M. Patel, M.M. Abdelmoaty, J.D. Cohen, et al., Nanocarrier vaccines for SARS-CoV-2, *Adv Drug Deliv Rev* 171 (2021) 215–239.
- 4 Anon., Nanomedicine and the COVID-19 vaccines, *Nat Nanotechnol* 15 (2020) 963.
- 5 K. Park, Drug delivery of the future: chasing the invisible gorilla, *J Control Release* 240 (2016) 2–8.
- 6 A.T. Florence, Nanotechnologies for site specific drug delivery: changing the narrative, *Int J Pharm* 551 (2018) 1–7.
- 7 H. Malhaire, F. Lagarce, Is the translational approach becoming a reality in nanomedicine?, *Eur J Nanomed* 7 (2015) 79–83.
- 8 T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science* 303 (2004) 1818–1822.
- 9 F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Rooftan, M. Karimi, M.R. Hamblin, Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities, *Nanomedicine* 14 (2019) 93–126.
- 10 A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies, *Clin Pharmacokinet* 42 (2003) 419–436.
- 11 R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat Rev Clin Oncol* 7 (2010) 653–664.
- 12 W.J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, et al., Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, *J Clin Oncol* 23 (2005) 7794–7803.
- 13 F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *J Control Release* 244 (2016) 108–121.
- 14 G. Caracciolo, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Biological identity of nanoparticles *in vivo*: clinical implications of the protein corona, *Trends Biotechnol* 35 (2017) 257–264.
- 15 M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G.V. Lowry, J.-P. Jolivet, M.R. Wiesner, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat Nanotechnol* 4 (2009) 634–641.
- 16 G. P. Kalarikkal N, Thomas S. Challenges in nonparenteral nanomedicine therapy. In: Kesharwani P, Taurin S, Greish K, editors. *Theory and applications of nonparenteral nanomedicines*. Amsterdam; Elsevier Inc; 2021. p. 27–54.
- 17 H. Malhaire, J.C. Gimel, E. Roger, J.P. Benoit, F. Lagarce, How to design the surface of peptide-loaded nanoparticles for efficient oral bioavailability?, *Adv Drug Deliv Rev* 106 (2016) 320–336.
- 18 E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J.P. Benoit, Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery, *Nanomedicine* 5 (2010) 287–306.
- 19 A. Ramadan, F. Lagarce, A. Tessier-Marteau, O. Thomas, P. Legras, L. Macchi, et al., Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and *in vivo* pharmacokinetic study, *Int J Nanomedicine* 6 (2011) 2941–2951.
- 20 J. Vanshosaz, S. Taymouri, A. Jahani-Najafabadi, A. Alizadeh, Efavirenz oral delivery via lipid nanocapsules: formulation, optimisation, and ex-vivo gut permeation study, *IET Nanobiotechnol* 12 (2018) 795–806.
- 21 E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J. Benoit, Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal, *J Control Release* 140 (2009) 174–181.
- 22 E. Roger, F. Lagarce, J.P. Benoit, The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules, *Int J Pharm* 379 (2009) 260–265.
- 23 A. Singh, Y.R. Neupane, S. Shafi, B. Mangla, K. Kohli, PEGylated liposomes as an emerging therapeutic platform for oral nanomedicine in cancer therapy: *in vitro* and *in vivo* assessment, *J Mol Liq* 303 (2020) 9.
- 24 M. Tobío, A. Sánchez, A. Vila, I. Soriano, C. Evora, J.L. Vila-Jato, et al., The role of PEG on the stability in digestive fluids and *in vivo* fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration, *Colloids Surf B Biointerfaces* 18 (2000) 315–323.
- 25 R.A. Cone, Barrier properties of mucus, *Adv Drug Deliv Rev* 61 (2009) 75–85.
- 26 A.C. Groo, F. Lagarce, Mucus models to evaluate nanomedicines for diffusion, *Drug Discov Today* 19 (2014) 1097–1108.
- 27 L. Sardelli, D.P. Pacheco, A. Zicarelli, M. Tunesi, O. Caspani, et al., Towards biotinspired: *in vitro* models of intestinal mucus, *RSC Adv* 9 (2019) 15887–15899.
- 28 A.C. Groo, K. Mircheva, J. Bejaud, I. Panalotou, P. Saulnier, T. Ivanova, et al., Development of 2D and 3D mucus models and their interactions with mucus-penetrating paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm Res* 31 (2014) 1753–1765.
- 29 S. Dünnhaupt, O. Kammona, C. Waldner, C. Kiparissides, A. Bernkop-Schnürch, Nano-carrier systems: strategies to overcome the mucus gel barrier, *Eur J Pharm Biopharm* 96 (2015) 447–453.
- 30 A. des Rieux, V. Fievez, I. Théate, J. Mast, V. Pr at, Y.J. Schneider, An improved *in vitro* model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells, *Eur J Pharm Sci* 30 (2007) 380–391.
- 31 Y. Xu, N. Shrestha, V. Pr at, A. Belouqui, Overcoming the intestinal barrier: a look into targeting approaches for improved oral drug delivery systems, *J Control Release* 322 (2020) 486–508.
- 32 A. Belouqui, A. Des Rieux, V. Pr at, Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier, *Adv Drug Deliv Rev* 106 (2016) 242–255.
- 33 C. Pereira, F. Ara jo, C.C. Barrias, P.L. Granja, B. Sarmento, Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D *in vitro* cellularized intestinal model for permeability studies, *Biomaterials* 56 (2015) 36–45.
- 34 C. He, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs, *Biomaterials* 33 (2012) 8569–8578.
- 35 D.A. Norris, P.J. Sinko, Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of -polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin, *J Appl Polym Sci* 63 (1997) 1481–1492.
- 36 E. Roger, J.C. Gimel, C. Bensley, A.S. Klymchenko, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model, *J Control Release* 253 (2017) 11–18.
- 37 E. Gullberg, M. Leonard, J. Karlsson, A.M. Hopkins, D. Brayden, A.W. Baird, et al., Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model, *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2000) 808–813.
- 38 A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarce, *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomedicine* 10 (2015) 589–601.
- 39 C. Menzel, T. Holzhausen, F. Laffleur, S. Zaichik, M. Abdulkarim, M. Gumbleton, et al., *In vivo* evaluation of an oral self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for enoxatide, *J Control Release* 277 (2018) 165–172.
- 40 H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, W. Wu, Adapting liposomes for oral drug delivery, *Acta Pharm Sin B* 9 (2019) 36–48.

- 41 K. Partikel, R. Korte, N.C. Stein, D. Mulac, F.C. Herrmann, H.U. Humpf, et al., Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm* 141 (2019) 70–80.
- 42 W. Fan, Z. Yu, H. Peng, H. He, Y. Lu, J. Qi, et al., Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions, *Int J Pharm* 586 (2020) 119551.
- 43 F. Caputo, J. Clogston, L. Calzolari, M. Rösslein, A. Prima-Mello, Measuring particle size distribution of nanoparticle-enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity, *J Control Release* 299 (2019) 31–43.
- 44 A.L. Capriotti, C. Cavaliere, S. Pavesana, Liposome protein corona characterization as a new approach in nanomedicine, *Anal Bioanal Chem* 411 (2019) 4313–4326.
- 45 P.C. Ke, S. Lin, W.J. Parak, T.P. Davis, F. Caruso, A decade of the protein corona, *ACS Nano* 11 (2017) 11773–11776.
- 46 T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, et al., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 2050–2055.
- 47 P. Jain, R.S. Pawar, R.S. Pandey, J. Madan, S. Pawar, P.K. Lakshmi, et al., In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is protein corona the missing link?, *Biotechnol Adv* 35 (2017) 889–904.
- 48 K. Kristensen, T.B. Engel, A. Stensballe, J.B. Simonsen, T.L. Andresen, The hard protein corona of stealth liposomes is sparse, *J Control Release* 307 (2019) 1–15.
- 49 O. Vilanova, J.J. Mittag, P.M. Kelly, S. Milani, K.A. Dawson, J.O. Rädler, et al., Understanding the kinetics of protein-nanoparticle corona formation, *ACS Nano* 10 (2016) 10842–10850.
- 50 S. Palchetti, D. Pozzi, A.L. Capriotti, G. Barbera, R.Z. Chiozzi, L. Digiacomo, et al., Influence of dynamic flow environment on nanoparticle-protein corona: from protein patterns to uptake in cancer cells, *Colloids Surf B Biointerfaces* 153 (2017) 263–271.
- 51 O.K. Karl, J. Ndika, P. Parkkila, A. Louna, T. Lajunen, A. Puustinen, et al., In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow, *Nanoscale* 12 (2020) 1728–1741.
- 52 G. Fang, Q. Zhang, Y. Pang, H.E. Thu, Z. Hussain, Nanomedicines for improved targetability to inflamed synovium for treatment of rheumatoid arthritis: Multifunctionalization as an emerging strategy to optimize therapeutic efficacy, *J Control Release* 303 (2019) 181–208.
- 53 G. Bastiat, C.O. Pritz, C. Roeder, F. Fouchet, E. Lignières, A. Jesacher, et al., A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging, *J Control Release* 170 (2013) 334–342.
- 54 Guo H, MacKay JA. A pharmacokinetics primer for preclinical nanomedicine research. In Lorraine L, Rinaldi C, editors. *Nanoparticles for biomedical applications*. Amsterdam: Elsevier Inc; 2020. p. 109–28.
- 55 A.L. Lainé, J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, et al., Conventional versus stealth lipid nanoparticles: formulation and *in vivo* fate prediction through FRET monitoring, *J. Control Release* 188 (2014) 1–8.
- 56 J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J.P. Benoit, et al., FRET imaging approaches for *in vitro* and *in vivo* characterization of synthetic lipid nanoparticles, *Mol Pharm* 11 (2014) 3133–3144.
- 57 M. Goutayer, S. Dufort, V. Jossierand, A. Royère, E. Heinrich, F. Vinet, et al., Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by *in vivo* fluorescence imaging, *Eur J Pharm Biopharm* 75 (2010) 137–147.
- 58 M. Hadjdemetriou, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, R.F. Collins, K. Dawson, K. Kostarelos, *In vivo* biomolecule corona around blood-circulating, clinically used and antibody-targeted lipid bilayer nanoscale vesicles, *ACS Nano* 9 (2015) 8142–8156.
- 59 C.K. Elechalawar, M.N. Hossen, L. McNally, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, Analysing the nanoparticle-protein corona for potential molecular target identification, *J. Control Release* 322 (2020) 122–136.
- 60 V.H. Nguyen, B.J. Lee, Protein corona: a new approach for nanomedicine design, *Int J Nanomed* 12 (2017) 3137–3151.
- 61 Q. Dai, S. Wilhelm, D. Ding, A.M. Syed, S. Sindhvani, Y. Zhang, et al., Quantifying the ligand-coated nanoparticle delivery to cancer cells in solid tumors, *ACS Nano* 12 (2018) 8423–8435.
- 62 S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Otha, J. Audet, H.J. Dvorak, et al., Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat Rev Mater* 1 (2016) 16014.
- 63 C. Xu, C.Y.-T. Li, A.-N.T. Kong, Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics, *Arch Pharm Res* 28 (2005) 249–268.
- 64 Y.-N. Zhang, W. Poon, A.J. Tavares, I.D. McGilvray, W.C.W. Chan, Nanoparticle-liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination, *J. Control Release* 240 (2016) 332–348.
- 65 K. Xiao, Y. Li, J. Luo, J.S. Lee, W. Xiao, A.M. Gonik, et al., The effect of surface charge on *in vivo* biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles, *Biomaterials* 32 (2011) 3435–3446.
- 66 C.I. Collino, J.M. Lanao, C. Gutierrez-Millan, Targeting of hepatic macrophages by therapeutic nanoparticles, *Front Immunol* 11 (2020) 218.
- 67 C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W.C. Chan, Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J Am Chem Soc* 134 (2012) 2139–2147.
- 68 N.M. La-Beck, L.M. Wood, X. Liu, Harnessing liposome interactions with the immune system for the next breakthrough in cancer drug delivery, *Front Pharmacol* 10 (2019) 220.
- 69 N.M. La-Beck, A.A. Gabizon, Nanoparticle interactions with the immune system: clinical implications for liposome-based cancer chemotherapy, *Front Immunol* 8 (2017) 6–11.
- 70 C. Peng, Y. Huang, J. Zheng, Renal clearable nanocarriers: overcoming the physiological barriers for precise drug delivery and clearance, *J. Control Release* 322 (2020) 64–80.
- 71 T. Shimizu, A.S. Abu Lila, T. Ishida, Y. Hashimoto, H. Kiyada, Relationship between the concentration of anti-polyethylene glycol (PEG) immunoglobulin M (IgM) and the intensity of the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon against PEGylated liposomes in mice, *Biol Pharm Bull* 38 (2015) 417–424.
- 72 J.K. Armstrong, G. Hempel, S. Kolling, L.S. Chan, T. Fisher, H.J. Meiselman, et al., Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients, *Cancer* 110 (2007) 103–111.
- 73 Z. Zhang, Y. Chu, C. Li, W. Tang, J. Qian, X. Wei, et al., Anti-PEG scFv corona ameliorates accelerated blood clearance phenomenon of PEGylated nanomedicines, *J. Control Release* 330 (2020) 493–501.
- 74 F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm* 5 (2008) 505–515.
- 75 M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats, *Nanomedicine* 3 (2008) 703–717.
- 76 N. Bertrand, J.C. Leroux, The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective, *J Control Release* 161 (2012) 152–163.
- 77 J.H. Byun, D.G. Han, H.J. Cho, I.S. Yoon, I.H. Jung, Recent advances in physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic models for anticancer nanomedicines, *Arch Pharm Res* 43 (2020) 80–99.
- 78 D. Yuan, H. He, Y. Wu, J. Fan, Y. Cao, Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, *J Pharm Sci* 108 (2019) 58–72.

PARTIE EXPERIMENTALE

Cette première partie bibliographique a permis de mettre en lumière les nombreuses particularités PK liées aux nanomédicaments. Ce sont autant de difficultés dans le développement pharmaceutique de ces formulations galéniques. L'objectif initial de ce travail expérimental était de développer des d'outils d'évaluation de la PK des NCLs. En effet, ces nanovecteurs développés au sein du laboratoire MINT n'avaient jusqu'alors jamais été évalués d'un point de vue pharmacocinétique.

La revue de la littérature réalisée en amont du travail expérimental nous a obligés, dans un premier temps, à nous focaliser sur le devenir et l'état des NCLs après contact avec les fluides biologiques. En effet, les données issues des recherches bibliographiques ont entraîné un questionnement à propos de la formation de la couronne de protéines autour de ces nanovecteurs après administration.

Ceci fait l'objet du premier chapitre de la partie expérimentale qui permet d'apporter quelques éléments de réponse sur le comportement *in vitro* des NCLs pour prédire leur devenir *in vivo*. Le second chapitre de la partie expérimentale traite quant à lui du devenir de différents types de NCLs après injection intraveineuse chez le rat. La mise au point d'un système d'extraction et de détection quantitatif des NCLs a été nécessaire pour permettre la modélisation pharmacocinétique. Enfin, au vu des données obtenues et de l'objectif initial, un dernier chapitre a été consacré à l'étude de l'élimination rénale de ces NCLs après injection intraveineuse chez le rat. Ceci a permis de mieux comprendre la biodistribution et l'élimination des NCLs et ainsi de compléter l'évaluation *in vivo*.

Chapitre 2. Etude de la formation de la couronne de protéines autour des NCLs

Avant-propos

Après administration dans le compartiment sanguin, les NCLs se retrouvent en contact avec les protéines plasmatiques. Comme décrit dans les années 1980 par Leo Vroman, les protéines ont la capacité de s'adsorber à la surface des matériaux. Les NCLs n'échappent pas à ce phénomène qui se traduit par la formation d'une couronne de protéines autour de ces nanoparticules et qui a été décrit pour la première fois dans les années 2000.

Il est clairement établi que cette couronne est très dépendante des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules. De ce fait, plusieurs types de NCLs ont été mises en contact avec du plasma afin d'évaluer les différentes modifications physiques entraînées par cette adsorption protéique (taille et potentiel zêta).

Ce travail s'achève par l'utilisation de la méthode Ohshima, du nom de son inventeur, utilisée dans l'étude des caractéristiques électrocinétiques et électrostatiques de certaines nanoparticules pour tenter de prédire l'affinité des protéines plasmatiques pour celles-ci.

Soumis dans European Journal of Pharmaceutical Sciences (Under review status 23/06/2023)

Protein corona formation on Lipidic Nanocapsules: influence of the interfacial PEG repartition

Vincent Lebreton^{1, 2, *}, Samuel Legeay¹, Anastasiia Vasylaki¹, Frédéric Lagarce^{1,2}, Patrick Saulnier^{1,2}.

¹ MINT, INSERM U1066, CNRS 6021, UNIV Angers, SFR-ICAT 4208, Angers, France.

² CHU Angers, 49033 Angers, France

* Corresponding author: Vincent Lebreton

Abstract

The parameters currently used for the characterisation of nanoparticles, such as size and zeta potential, are not able to reflect the performance of a nanocarrier in the biological environment. Therefore, more thorough *in vitro* characterisation is required to predict their behaviour *in vivo*, where the nanoparticles acquire a new biological identity due to interactions with biomolecules. In the present study, we performed *in vitro* characterisation in biological fluids for lipid nanocapsules (LNCs) with varying means sizes (50 nm and 100 nm), different electrical surface charges and different Poly Ethylene Glycol (PEG) compositions. Then, different methods were applied to show the impact of the protein corona formation on the LNCs. Even if all formulations attached the plasmatic proteins, a higher thickness of corona and highest protein bound was observed for certain LNC50 formulations. A better knowledge of proteins adsorption phenomenon over NPs in the plasmatic media is a corner stone for the clinical translation. In fact, after short blood circulation time, it is not the initially designed nanoparticle but the complex nanoparticle bearing its protein corona which circulates to reach the target.

Keywords: Corona formation, Lipid NanoCapsules, plasmatic media, electrokinetic, physicochemical properties

1. Introduction

Organic or inorganic nanoparticles (NPs) have been used since last decades to improve drug delivery [1,2]. However, if some successful medical applications exist in the domain of cancer therapy or more recently in infectious diseases with SARS-COV-2 vaccines [3,4], there is a need for a better knowledge about NP interactions with the biological fluids [5]. A basic understanding of the link between physicochemical properties of NPs and the impact on the adsorption of protein seem decisive to improve the design and development of well-characterised NPs for the future [6,7]. After contact with the biological fluids, NPs are immediately surrounded by proteins to finally change their synthetic identity to a new biological one [8,9]. Although the interactions between NPs and proteins have been described since the 70s, Tyrell et al found for the first time albumin, alpha- and beta-globulin interaction with liposomes and studied the effect on this interaction on their uptake by cells [10]. The intensive study of the consequences of this aggregation phenomenon has started around 2007, when Dawson et al. described protein coating and gave it the name of "protein corona" [5,11,12]. Nowadays, it was widely recognised that NPs and biomolecules establish different interactions, where several factors are known to affect the protein corona composition, which includes morphological and chemical NP characteristics [8,13–15]. The protein corona is complex and variable because biological fluids such as plasma contain as many as 3700 proteins [5,11,16] and it has been estimated approximately that 50 to 150 proteins can interact with NPs [17,18]. In a general pattern, corona is constituted by a "hard-corona" based on strong NP/proteins links and a "soft corona" resulting from weak binding, allowing dynamic protein exchanges at the NP surface [19–21]. Adding to that, some components of the protein corona called opsonins enhance uptake by the specialised cells of the reticuloendothelial system (RES) leading to an increased and faster elimination [22–24]. Understanding this phenomenon is an important milestone of the NP development because the entire impact of the protein corona on the fate of NPs and thus on drug delivery patterns remains partially unknown. Indeed, if there are a lot of data concerning inorganic NPs, studies on soft particles remain poor concerning protein corona especially on Lipid Nanocapsules (LNCs) like those developed by our team since 2000 [25]. These nanocapsules have been used to encapsulate many molecules in their lipid core [26–29]. Among the huge number of organic NPs, the main advantage of LNCs lies in their formulation. Just by playing with the composition (water/oil ratio, surfactant concentrations), their formulation allows a good control of their physico-chemical characteristics mainly the surface characteristics [30–33]. This is why it is particularly relevant to study the influence of the size, the surface charge and the interfacial properties on protein coating in the case of LNCs to obtain optimised formulations. On previous studies which were conducted by our team, Groo et al, have demonstrated post-inserting PEG to LNCs permit to increase blood circulation time of paclitaxel b [34]. Nevertheless, recently we published a study about LNCs with pre-mixing PEG which highlight in one side an increase time of blood circulation of LNCs 85 nm, but the other side a frankly decrease blood time residence of LNCs 50 nm [35]. The aim of the present work was to demonstrate how protein corona can

modify the synthetic identity of LNCs for different protein corona by using different pegylated surfactants at the first steps of the LNC formulation. In this paper, we suggest to analyse the effects of LNCs (different sizes and different interfacial molecular conformation) on the protein corona formation by using the soft particles analysis described by Ohshima. This electrokinetic method is able to quantify the electrical charge density in the accessible ionic layer inside the LNCs shell [36,37].

2. Materials and methods

2.1 Materials

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), octadecylamine (stearylamine), Bovine Serum Albumin (BSA), sodium chloride and potassium chloride were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Kolliphor® HS-15 (PEG 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate mixture) was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). Lipoid® S75-3 (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine mixture) were purchased from Lipoid GmbH (Steinhausen, Switzerland). Captex® 8000 (glyceryl tricaprilate) was kindly provided by Abitec Corporation (Columbus, OH, USA). DSPE-mPEG-2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)) was purchased Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q® Advantage A10 System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Fetal Bovine serum (FBS) was purchased from Biowest (Nuaille, France).

Fresh rat plasma was obtained directly after intracardiac blood puncture on Sprague Dawley male rat (Janvier labs, Saint-Genis-Laval, France) on EDTA K2 tube (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, USA)

2.2 Formulation of Lipid NanoCapsules (LNCs)

LNCs were formulated using a phase inversion process that has been established previously [25]. For the different formulations, the compounds were precisely weighed as mentioned in supplementary Table S1. For positively and negatively charged LNCs, 1.4 mg of stearylamine (SA) or 7.0 mg of DSPE-mPEG-2000 (PEG) were added, respectively in the starting premix with all other compounds. Briefly, the mixture was carried out under magnetic stirring at 200 rpm agitation speed at room temperature to obtain an oil/water emulsion. Then, four cycles of heated and cooled phases from 60 to 90° C have been performed to detect the inverted phase close to 70°C. On the last run, at this inversion phase, LNCs were formed after quenching with 625 mg of cold water and stirred for 30 min. LNC suspensions were filtered through a 0.22 µm filter before use. Finally, six formulations of LNCs were obtained with two means of size: 50 nm (LNC-50) and 100 nm (LNC-100), surface modifications: DSPE-mPEG-2000 (PEG) (LNC-50-PEG; LNC-100-PEG) and stearylamine (SA) (LNC-50-SA; LNC-100-SA).

2.3. Size and zeta potential : measurements before and after incubation

All nanoparticles were characterised in terms of size, and zeta potential (ZP) using a Malvern Zetasizer Nano ZS setup (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK). Size was determined by dynamic light scattering method with a 173° backscattering detection measurement angle, after 3 measurements, each constituting at least 10 runs. Each measurement was performed in triplicate (n=1). A 1:100 dilution of nanoparticle suspension in ultrapure water was achieved in order to assure a convenient scattering intensity on the detector. On similar conditions of dilution, ZP was also estimated by 3 measurements with automatic selection of the number of runs (from 10 to 100) through determination of the electrophoretic mobility in a folded capillary cell and after applying the Smoluchowski equation. After incubation in FBS or rat plasma, the average hydrodynamic diameter and polydispersity index of LNCs were measured using the same method as the initial measurement but without the dilution before analysis to avoid modifications of the protein corona around LNCs. In the same conditions, ZP has been determined after 3 measurements of each sample without dilution. To permit a suitable comparison between ZP, the conductivity of each sample has been measured. ZS setup (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK). Size was determined by dynamic light scattering method with a 173° backscattering detection measurement angle, after 3 measurements, each constituting at least 10 runs. Each measurement was performed in triplicate at 25°C. A 1:100 dilution of nanoparticle suspension in ultrapure water was achieved in order to assure a convenient scattering intensity on the detector. On similar conditions of dilution, ZP was also estimated by 3 measurements with automatic selection of the number of runs (from 10 to 100) through determination of the electrophoretic mobility in a folded capillary cell and after applying the Smoluchowski equation.

2.4 Incubation with proteins to study the protein corona formation

2.4.1 Fetal Bovine Serum (FBS)

For the first step, in order to study the evolution of ZP and size after protein contact, it has been decided to perform the experimentation with LNC 50 nm. LNCs 50 nm was incubated with different proportions (v:v) of FBS medium equivalent to 0 to 16 g/L of BSA with fixed final dilution of stock LNCs suspension (1:100) (supplementary on Table S2). To keep similar conductivity, PBS dilution medium was considered as the best choice. All mix combinations were performed on Ultra High Recovery Microcentrifuge Tubes (STARLAB International GmbH, Hamburg, Germany) to minimise protein binding to the plastic surface. The LNCs were incubated for 1h at 37°C on lab oven (Mettler, Schwabach, Germany).

2.4.2 Rat plasma

In order to assess the protein-corona formation, the second step consisted in the incubation of the six different LNC formulations with fresh rat plasma for 1 h at 37° C in the previously described conditions. For plasma preparation, EDTA was chosen as an appropriate anticoagulant since it does not alter the protein corona composition [36,37]. In order to make accurate comparisons between the six formulations, the ratio of nanoparticles surface area to the volume of plasma was established thanks to *in vivo* relevant LNCs plasma-particle concentrations. To explain briefly, after intravenous injections of each LNC suspensions, the initial concentrations (C_{init}) were close to 5.0×10^{13} part/mL. As the surface area of LNC 50 nm (A_{LNC50}) has been considered as the reference, the surface area (Eq. 2) of the formulation was calculated and the result for one particle (7850 nm²) was considered as the target. Then, to estimate the surface area of the formulation in blood compartment after injection, A_{LNC50} has been multiplied by the C_{init} to obtain the required standardised surface area, 3.925×10^{17} nm²/ml for each experimentation.

The volume of LNC suspension added to plasma was calculated for each formulation according to the following formula:

$$V_{LNC} = \frac{3.925 \times 10^{17}}{A_{LNC} \times C_{LNC}} \quad (1)$$

where A_{LNC} is the surface area of a LNC (in nm²), and C_{LNC} is concentration of LNC (in particles/ml). Since LNC have a spherical shape, A_{LNC} was calculated as follows:

$$A_{LNC} = 4\pi r^2 \quad (2)$$

After incubation, nanoparticle size and ZP were measured using Zetasizer Nano and compared to the initial parameters of the formulation.

2.5. Isolation of LNCs-Corona and free proteins with size exclusion chromatography

In order to separate LNCs bearing protein corona from free proteins present in plasma, size exclusion chromatography (SEC) was performed using Waters 600 HPLC system (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) equipped with protein KW-803 column (Shodex, New York, NY, USA) [38]. Detection was performed using a UV ($\lambda = 280$ nm) and a refractive index detector. PBS was used as a mobile phase at a flow rate of 0.75 mL/min, sample injection volume constituted 100 μ L. Chromatographic profiles were obtained for rat plasma, LNCs formulations, and mixtures of LNC with plasma incubated during 1 h at 37° C (n=1).

2.6. Protein quantification of corona with Micro bicinchoninic acid (micro-BCA) assay

The micro-BCA assay was used to quantify the amount of protein absorbed onto the LNC surface after incubation in plasma. The assay was performed using Thermo Scientific™ Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 150 µL of protein-containing samples were mixed with 150 µL of working reagent in a microplate well, incubated at 37° C for 2 h, and the absorbance was measured at 562 nm on SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Additionally, a set of protein standards with varying mass concentration of bovine serum albumin between 0 and 200 µg/mL was tested in order to build a standard curve, from which the protein concentration in the samples was estimated. The obtained protein concentration was corrected for dilution factor introduced during SEC and the quantity of coeluted plasma proteins was subtracted. In order to make comparisons between different formulations, the quantity of absorbed protein was expressed as the density of protein on the LNC surface in µg/nm².

2.7. Semi qualitative analysis: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

After separation step from SEC of interesting harvested fractions and after protein quantification step with micro-BCA, the aliquots have been diluted to reach a maximum of 20 µg of proteins per samples in maximum volume of 40 µL. These samples were treated with Laemmli buffer (previously mixed with 2-mercaptoethanol) (BioRad, Hercules, California, USA), heated at 100°C for 5 min. Then, each aliquot was electrophoresed in separated lane to 4-20% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel, a mini-protean® TGX™ precast gel (BioRad, Hercules, California, USA). First lane was attributed to the molecular weights 10-190 kDa, Precision Plus Protein™ standard (BioRad, Hercules, California, USA), the electrophoresis cell has been filled with Tris-Glycine-SDS buffer (BioRad, Hercules, California, USA), and electrophoresis conditions have been fixed to 100 V for 90 min. After that, the gels were washed with water and stained with Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad, Hercules, California, USA) during 30 min and destained in water acetic acid solution. Finally, the gels were read with gel imager apparatus (Axygen, San Fransisco, California, USA).

2.8. Electrokinetic measurements

In order to determine the pseudo-charge density (ZN) and the accessibility layer to ions or proteins (1/λ), the electrophoretic mobility of LNCs according to Ohshima, who has well described the soft-particle theory [34]. Thus, it has been decided to perform electrophoretic mobility measurement with NanoZS of our different LNCs formulations (LNC-50, LNC-50-PEG, LNC-100, LNC-100-PEG for different KCl concentrations. The four formulations were diluted into potassium chloride solution with variable concentrations ranging from 0 to 0.15 mol/L. The

average and standard deviation values have been estimated from 3 measurements of each sample (n=1). Experimental values were fitted by using the following equation:

$$\mu = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \frac{(\psi_0 / \kappa_m) + (1/\lambda) \psi_{DON}}{(1/\kappa_m) + (1/\lambda)} + \frac{\rho_{fix}}{\eta} \left(\frac{1}{\lambda}\right)^2 \quad (3)$$

where ψ_0 is the surface potential and ψ_{DON} is the Donnan potential in the polyelectrolyte layer (Figure 1).

Both parameters (ψ_0 and ψ_{DON}) are calculated according to Equations (4) and (5).

$$\psi_0 = \psi_{DON} + \frac{2n\kappa T}{\rho_{fix}} \left\{ 1 - \left[\left(\frac{\rho_{fix}}{2zn e} \right)^2 + 1 \right]^{1/2} \right\} \quad (4)$$

$$\psi_{DON} = \frac{\kappa T}{ze} \ln \left\{ \frac{\rho_{fix}}{2zn} + \left[\left(\frac{\rho_{fix}}{2zne} \right)^2 + 1 \right]^{1/2} \right\} \quad (5)$$

κ_m is given the following Equation (6)

$$\kappa_m = \kappa \sqrt{1 + \left(\frac{\rho_{fix}}{2zne} \right)^2} \quad (6)$$

with, the Debye length is calculated using

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 e^2 n_i}{\varepsilon_r \varepsilon_0 \kappa T}} \quad (7)$$

Where the physical constants were defined as ε_0 : electric permittivity of free space; ε_r : electric permittivity of water; T: temperature; z_i : charge number of ion species i ; z : charge number of electrolytes (supposed to be symmetrical); e : elemental charge; κ : Boltzmann's constant; n : bulk electrolyte molar concentration; n_i : bulk ion i molar concentration; N : charge unit molar concentration in the LNC shell. ρ_{fix} : pseudo-charge density in the accessible layer; λ^{-1} : depth of the accessible layer.

On Figure 1, the particle with a core radius is surrounded by a PEG layer and $1/\lambda$ represents the depth accessible to ions (K^+ , Cl^-) Figure 1A is adapted from Ohshima [35]. Figure 1B presents the Donnan potential (ψ_{DON}) in the polyelectrolyte layer and the potential (ψ_0) at the surface.

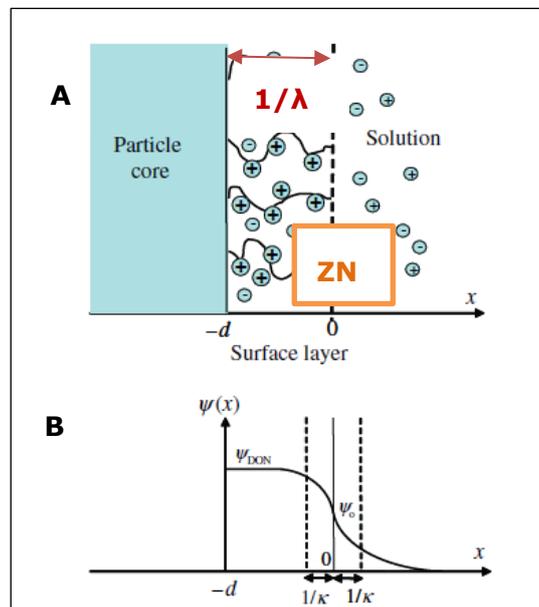


Figure 1. A) Schematic representation of ion distribution (upper) with $1/\lambda$ (nm) the thickness of ion-penetrable layer and ZN (C/m^3) the pseudo-electrical charge of this accessible layer. B) Representation of the potential distribution $\psi(x)$ (lower) across an ion-penetrable surface charge layer. (Adapted from Ohshima [34])

2.9 Statistical analysis

All data is presented as mean \pm standard deviation, based on the data from experiments performed in triplicates unless stated otherwise. Statistical significance was determined by means of a t-test between control and experiment values, or analysis of variance with Tukey post hoc test, using GraphPad Prism 9.3.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Multiple comparisons for more than two groups were performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test to determine the significance of difference among all paired combinations. p-values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results and discussion

1. Zeta potential and size of LNCs after FBS contact

This work started with a study on classical LNC 50 to understand and check if the methods were available to detect the presence of protein on the different NPs. LNC 50 have been formulated with ZP around -4.3 ± 0.2 mV. Because after 1h of incubation, the size and ZP were stable (data not shown), all the measurements have been performed after 1h of incubation with proteins. After incubation in different FBS solutions (concentrations reported as equivalent BSA concentration), ZP starts to decrease and then increases significantly when the concentration of BSA reaches 4 g/L (Figure 2). This phenomenon could be attributed to the saturation of the NPs surface with strong negative charged proteins binding ("hard corona") and then the formation of the "soft corona" with proteins less negatively or neutrally charged. A control group without LNCs, containing just FBS, allowed to ensure that the measurement was related to the complex LNC-protein ZP evolution and not to the protein alone.

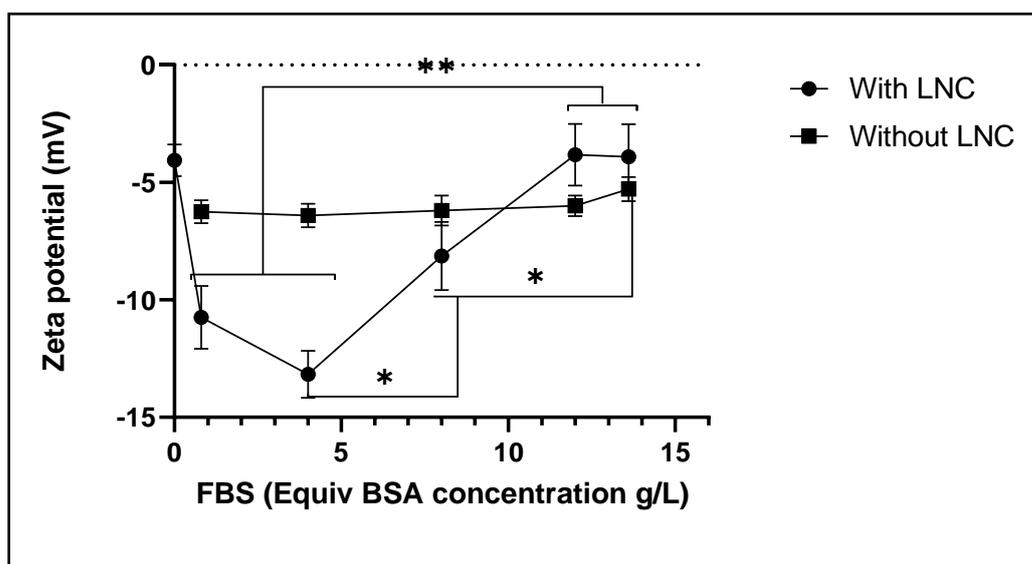


Figure 2. Zeta potential (mV) evolution of LNC 50 nm after incubation on the solution of Fetal Bovine Serum (FBS) expressed in equivalent bovine serum albumin concentration (g/L). Paired *t-test* ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$

Adding to that, as it is shown in Figure 3, size distribution profile of LNCs with FBS in aqueous solution presented two peaks where the first can be attributed to albumin (the main protein of FBS). Indeed, in regards with the special size measurement of pure BSA solution shown on supplementary data (Figure S3), a hydrodynamic diameter around 5 nm (PDI <0.3) was measured. In our case, it was previously demonstrated that albumin and NPs can be significantly distinguished in the size measurement [39,40]. Even if there is an important difference of hydrodynamic sizes between albumin (5 nm) and LNC (50 nm), these two elements seem well separated even if the intensity of the scattered light is proportional to the sixth power of the particle diameter making this technique very sensitive to the presence of large particles [41].

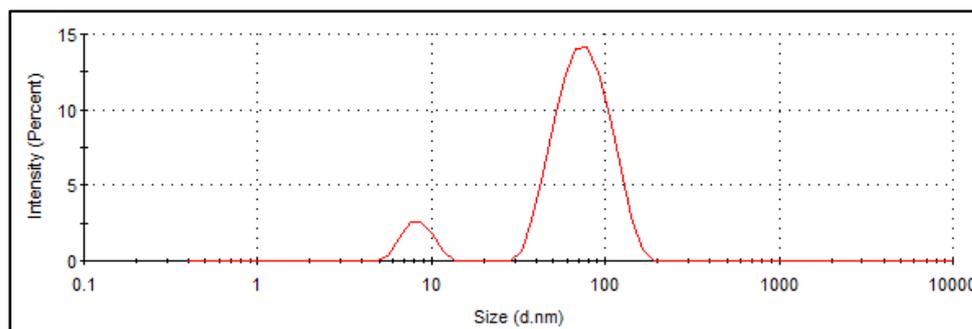


Figure 3. Distribution of size (nm) LNC 50 nm after with Fetal Bovin Serum (FBS). (*NanoZetaSizer; Malvern Panalytical*)

In order to obtain more accurate results on corona formation and to evaluate the effect of surface modification of LNC on the protein corona formation, the FBS has been replaced by plasma and six different formulations were tested [36,40].

2. Modifications of the protein corona formation following the surface of LNCs after plasma contact

2.1 Physical characteristics modifications

Whole plasma was chosen as the most adequate medium for protein corona experiments because media like serum do not include coagulation proteins that may constitute a part of protein corona [36]. In Figure 4A, it was observed that the increase in size after contact with rat plasma proteins is similar among 50 nm and 100 nm formulations, with the exception of LNC 50 nm PEG (negatively charged) that displays a larger increase in size. As for the change in ZP (Figure 4B), regardless of initial surface charge, all the formulations reach a similar value around -5 mV. Similar results have been recently described by Hierro-Oliva et al. where three different titanium inorganic NPs had similar ZP after protein adsorption [42]. It can be noted that the thickness of protein corona on LNC 50 nm PEG is considerably higher than in other formulations. Using the analysis of variance (ANOVA) method, it was found that particle surface charge has a significant influence on protein corona thickness ($p < 0.05$), while Tukey post hoc test has shown that the difference lies between 50 nm SA and 50 nm PEG formulations. This result concerning

LNC-50-PEG seems different than the usual previous results obtained with pegylated NPs where the PEG post-insertion reduced the protein adsorption [43–45]. Moreover, in previous cited studies such as Pelaz *et al.*, the additional PEG layer is more homogeneous because it is located in the external part of the NP interface after post-insertion final step. In our case, the DSPE-mPEG 2000 is mixed at the starting of the formulation with Kolliphor® HS-15 (hydroxystearate of PEG 600). One can suppose an interfacial demixion of both molecules during the formulation leading to inhomogeneous zones at the LNC surface. Thus the conformation of PEG chains at the surface of NPs is modified and different compared to the most case with usual graft pegylation technique [46–48]. Otherwise, this phenomenon would partly explain the increased clearance that has been observed after intravenous injection on rats [49].

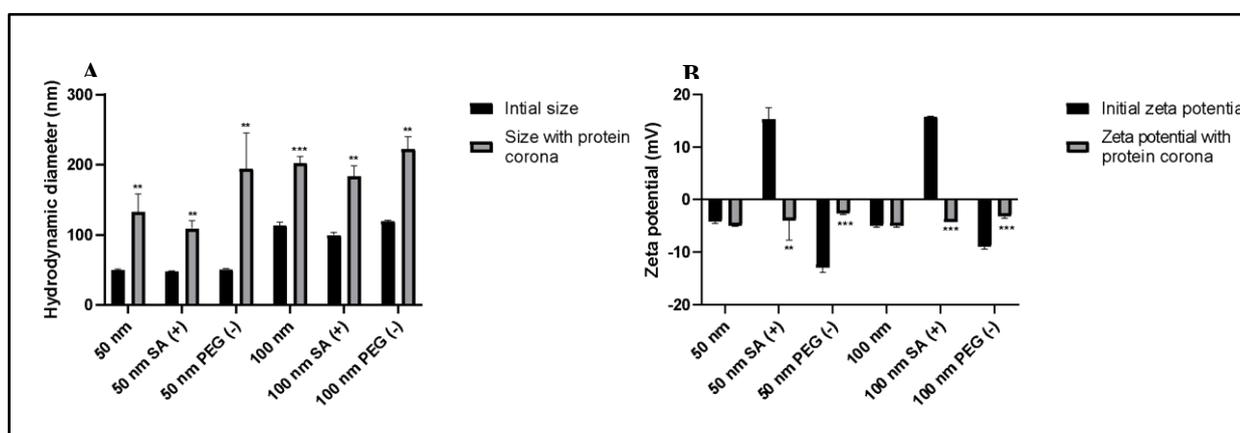


Figure 4. **A)** Hydrodynamic diameter (nm) for six different LNCs formulations after 1 h incubation in rat plasma. **B)** Zeta potential (mV) of six different LNCs formulations after 1 h incubation in rat plasma. Paired *t*-test ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to initial measurement.

2.2 Separation of LNC with protein corona from free plasma proteins

Then, the separation of LNC with protein corona from plasma was performed using size exclusion SEC, in order to separate LNC from free proteins and to perform a protein analysis. Firstly, chromatographic profiles for rat plasma and blank LNC formulations were obtained and used as controls. The retention times for these compounds were established. Then, the mixtures of LNC with plasma incubated for 1 h at 37° C were separated (Figure 5). Fraction of interest, F1 corresponds to the peak that has the same retention time as blank LNC with possible LNC covered by protein corona.

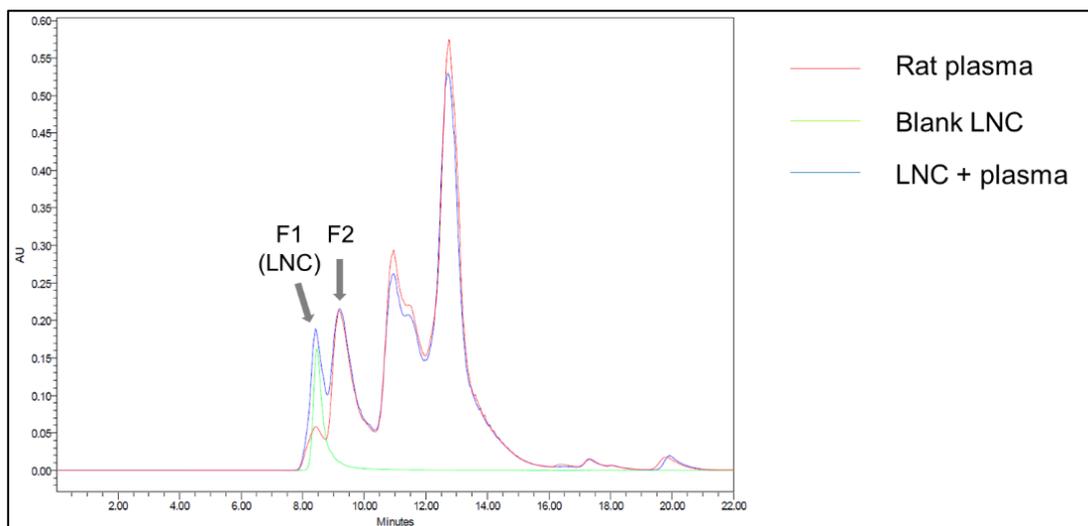


Figure 5. Overlaid chromatograms for rat plasma, blank LNC (50 nm), and LNC-plasma mixture incubated for 1 h at 37° C. Arrows indicate fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2), which were used for further experiments.

2.3 Quantification and semi-qualitative approach of protein corona surrounding LNCs

After separation, the protein amount bound to each LNC formulation was quantified using a micro BCA protein assay. Since interference of lipids with BCA assay was reported in the literature [53], blank LNC formulations without incubation in plasma were also included in the assay. No contribution was detected from these samples. The Figure 6A demonstrates that the quantity of protein bound to LNC, expressed as the density of protein on the LNC surface in $\mu\text{g}/\text{nm}^2$ is similar for all formulations except LNC 50 nm PEG, which has significantly higher (approximately 3-fold) quantity of protein per unit of the surface area of nanoparticles.

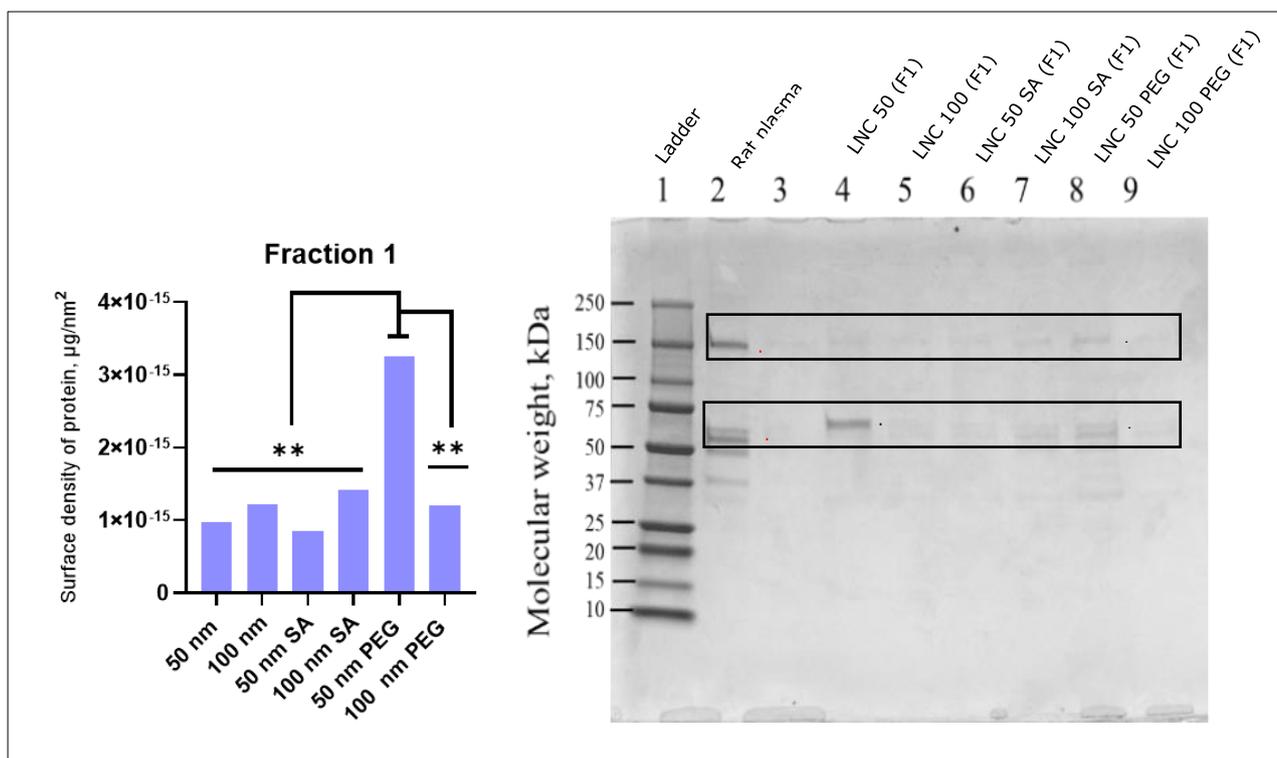


Figure 6. **A)** Protein quantity bound to different LNC formulations per unit of surface area (BCA assay). Data is expressed as mean \pm standard deviation (measurement performed in duplicate). $**p \leq 0.01$. **B)** SDS-PAGE gel of LNC exposed to the protein of rat plasma, with framed sections representing the main intense bands (150 kDa, and 65 kDa) with black stars the higher bands level of intensity of the rat plasma exposed LNCs and red stars the higher bands level intensity of the rat plasma.

Thus, after the quantification step, we evaluated if the composition of the protein corona formed on LNCs after exposition to rat plasma was also linked to their physicochemical properties. Indeed, following removal of the unbound and loosely bound proteins, the protein constituents of the protein corona were qualitatively analysed by SDS-PAGE performed under reducing conditions (Figure 6B). The protein profiles were fairly similar, but the intensities of the bands differed. The remaining bands represent the plasma proteins that bound to the LNCs during the incubation with rat plasma. The image of gel on Figure 6B shows the results of the fraction 1 given after the SEC step. Two main bands probably correspond to albumin (65 kDa) and one other glycoprotein like a coagulation factor (150 kDa) [13]. The most intense plasma protein bands (identified by black stars) correspond to the corona protein around LNC-50-PEG that seems in total accordance with the previous results of the protein quantification. These higher intensity bands (60 and 150 kDa) were also found on the rat plasma proteins profile. These results evidence that the main proteins present in the rat plasma have a high affinity for LNCs especially for LNC 50-PEG.

These results confirmed the NP evolution during plasmatic incubation. The LNC 50 nm with PEG addition has shown their higher diameter increasing due to protein adsorbed and thus a larger quantity of protein on their surface. As previously discussed, understanding PEG conformation on the NPs surface can explain these results because that did not correspond to an usual

pegylation process [47,48]. Adding to that, we can also focus on the PEG surface density because the quantity of added PEG was equal between LNC 50 and 100 nm (Supplementary Table S1). That leads to a higher PEG density for the LNC 50 as compared to the LNC 100 which can decrease the roughness and increase the protein corona formation [50]. Walkey *et al.*, have demonstrated on one hand that increasing PEG density may further reduce serum protein adsorption on gold NPs. On the other hand, when the PEG density was fixed, the decrease of NP size leads to an increase of the total protein adsorption [44]. Even if we have modified simultaneously size and surface density of PEG, it seems clear that the protein quantity adsorbed is a consequence of the NPs surface curvature with steric interactions between neighbouring PEGs. Finally, this confirms that adsorption of proteins is probably stronger when PEG chains have more freedom on lower curvature surface. These findings also confirm that increasing PEG density on smaller NP will enhance the protein adsorption. As it has been previously described, PEG mushroom-like conformations could be less efficient than PEG brush-like ones for protein adsorption. To complete these results, the last step of this study consists in the application of the soft particle theory of Ohshima [34,51].

3. Electrokinetics analysis of LNCs, a link between corona protein and soft particles

To understand the previous results on the corona protein formation, an electrokinetic study has been performed using the Ohshima method [34]. The goal of this study was to characterise the available thickness at the NP interface where proteins can interact with the interfacial compounds (mainly of PEG hydroxystearate mixture) and thus to assess the influence of the interfacial molecular conformation.

The Table 1 shows estimated values of pseudo-charge density (ZN) and the accessibility layer to ions or proteins ($1/\lambda$), with specific calculation models based on Ohshima method. After calculation, this method allows to find a concordance between theoretical and experimental values by determining the best ZN and $1/\lambda$ values. The different values were presented in the Table 1 as a function of LNCs type. It has been decided to exclude NPs with electropositive charge related to stearylamine present in LNC-50-SA and LNC-100- SA formulations because the probe Cl^- is not well validated to use for Ohshima's method.

Table 1. Estimated parameters, with Ohshima's method, pseudo-charge density ZN (C/m³) and the accessibility layer 1/λ (nm), for different LNCs.

	ZN (C/m ³)	1/λ (nm)
LNC-50	-4958	0.8
LNC-100	-664.9	3.3
LNC-50-PEG	-17.3	98.9
LNC-100-PEG	-32.6	55.7

The usual LNC 50 and 100 nm without specific coatings have displayed a negative pseudo-charge density and a very low ion penetration accessibility layer. For LNCs with PEG addition, the results presented and Table 1 show little negative pseudo-charge density and high ion penetration accessibility layer. The decrease of pseudo-charge density of LNCs with PEG is linked to the addition of PEG, which lead to a steric hindrance layer in contrast to classical LNC formulations. Proteins, with mainly negative charges, seem more in interaction with LNC-50-PEG with lower apparent negatively pseudo-charge compared to LNC-50. The similar phenomenon is observed for LNC-100-PEG *versus* LNC-100. Adding to that, the ion penetration layer which is higher for LNC-50-PEG than other LNCs confirmed our previous obtained results (protein quantification) with higher adsorbed protein surface density (Figure 6A) and an increased hydrodynamic diameter (Figure 4A).

If we focus on the LNC50-PEG ion penetration accessible layer and proteins adsorption, the high attractiveness could be due to a brush-like conformation facilitating the protein penetration in contrast to a mushroom-like conformation for LNC-100-PEG. This difference of PEG surface conformation can be linked to PEG surface density and surface curvature difference between 50 nm to 100 nm. Like it was previously described, the protein adsorption seems to be the result of curvature-dependent differences in PEG-PEG steric interactions [44]. Even if PEG addition is not similar to usual PEG grafting [47,48], this finding seems to be slightly in contrast to main works on this topic in which an increase in the PEG density decreases, and not enhance, the protein adsorption [45,52,53]. Nowadays, the stealthiness of NPs is a concept which is not totally controlled. Some works explored deeper the procedure for NPs coating, to understand influence of polymers conformation and surface density to achieve the optimal stealth effect [54,55]. PEG density seems to play a major role in the long-circulating NP characteristics [53,56,57]. Interestingly, we recently showed an increased blood clearance of those LNCs 50 nm PEG compared to the five other LNCs after intravenous administration in rat [49]. This observation was assigned to an increased instability of the LNCs 50 nm PEG in blood as compared to the

other ones [49]. Thus, the new data from the present study reveal that the difference in the protein corona formation, specifically on the LNC 50 nm PEG, is associated with their increased blood instability and increased blood clearance observed *in vivo*. It is now well accepted that surface changes in corona formation of organic nanoparticles strongly correlated to biological and pharmacological changes like cell uptake and internalization [58], in depth pharmacokinetics studies are now needed to decipher the link between the PEG density, the corona formation, the stability in blood and the blood clearance.

Conclusion

In summary, with this study it has been shown that the protein-nanoparticle corona formation can be studied by different methods. Whether it is with zeta potential and size or protein quantification and even Ohshima method, all the obtained results confirm the protein adsorption on LNCs. Another important result is linked to the PEG addition during the formulation showing that it does not necessarily lead to stealth nanoparticles. It seems obvious to distinguish pre-formulation and post-insertion PEG addition. Our method of PEG addition in the starting mixture modified the accessible penetration layer for proteins. Even if many studies tried to find the best PEG density and conformation to guarantee a good stealthiness, it is now sure that proteins always manage to penetrate and adsorb on NPs surface. The current challenge is to improve characterization methods to assess the consequence of PEG density and length chain on protein corona formation. Moreover, our study confirms that a basic understanding of physicochemical properties of NP which impact the adsorption of protein is decisive for designing and developing nanomedicines. Knowing that, NPs characteristics in the blood circulation (and trying to reach its targets) can be very different to their initial formulation because of protein corona formation. In the future, well understanding of the *in vivo* fate of NPs after intravenous administration with protein adsorption phenomenon is the first step to improve clinical translation.

Funding

This work was supported by Ligue contre le cancer Maine et Loire et Loiret Comitee (JPB/FP - 441/12.2019 NANOPK PROJECT). Anastasiia Vasylaki was funded by NANOMED EMJMD supported by the European Union and the Erasmus+ Program by the European Union in the Framework Agreement Number 2016–2057/001- 001 EMJMD, No. 574439-EPP-1-FR-EPPKA1-JMD-MOB.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] S. Tran, P.-J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai, Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery, *Clin. Transl. Med.* (2017). <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>.
- [2] K. Park, A. Otte, H. Park, Perspective on drug delivery in 2050, *J. Control. Release.* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.025>.
- [3] Nanomedicine and the COVID-19 vaccines, *Nat. Nanotechnol.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00820-0>.
- [4] J. Machhi, F. Shahjin, S. Das, M. Patel, M.M. Abdelmoaty, J.D. Cohen, P.A. Singh, A. Baldi, N. Bajwa, R. Kumar, L.K. Vora, T.A. Patel, M.D. Oleynikov, D. Soni, P. Yeapuri, I. Mukadam, R. Chakraborty, C.G. Saksena, J. Herskovitz, M. Hasan, D. Oupicky, S. Das, R.F. Donnelly, K.S. Hettie, L. Chang, H.E. Gendelman, B.D. Kevadiya, Nanocarrier Vaccines for SARS-CoV-2, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.002>.
- [5] I. Lynch, K.A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions, 2008.
- [6] S. Sharifi, G. Caracciolo, M. Mahmoudi, Biomolecular Corona Affects Controlled Release of Drug Payloads from Nanocarriers, *Trends Pharmacol. Sci.* 41 (2020) 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.011>.
- [7] N. Bertrand, P. Grenier, M. Mahmoudi, E.M. Lima, E.A. Appel, F. Dormont, J.M. Lim, R. Karnik, R. Langer, O.C. Farokhzad, Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics, *Nat. Commun.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00600-w>.
- [8] G. Caracciolo, Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 543–557. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.003>.
- [9] V. Pareek, A. Bhargava, V. Bhanot, R. Gupta, N. Jain, J. Panwar, Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18 (2018) 6653–6670. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15766>.
- [10] D.A. Tyrrell, V.J. Richardson, B.E. Ryman, The effect of serum protein fractions on liposome-cell interactions in cultured cells and the perfused rat liver, 1977.
- [11] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.
- [12] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K.A. Dawson, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>.
- [13] S. Palchetti, V. Colapicchioni, L. Digiaco, G. Caracciolo, D. Pozzi, A.L. Capriotti, G. La Barbera, A. Laganà, The protein corona of circulating PEGylated liposomes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.11.012>.
- [14] S.J. Park, Protein-nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 15 (2020) 5783–5802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254808>.
- [15] P.C. Ke, S. Lin, W.J. Parak, T.P. Davis, F. Caruso, A Decade of the Protein Corona, *ACS Nano.* 11 (2017) 11773–11776. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>.

- [16] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K.A. Dawson, The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century, *Adv. Colloid Interface Sci.* 134–135 (2007) 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.021>.
- [17] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S.K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R.H. Stauber, Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis, *ACS Nano.* 5 (2011) 7155–7167. <https://doi.org/10.1021/nn201950e>.
- [18] L. Treuel, D. Docter, M. Maskos, R.H. Stauber, Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 857–873. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.88>.
- [19] K. Kristensen, T.B. Engel, A. Stensballe, J.B. Simonsen, T.L. Andresen, The hard protein corona of stealth liposomes is sparse, *J. Control. Release.* 307 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.042>.
- [20] O. Vilanova, J.J. Mittag, P.M. Kelly, S. Milani, K.A. Dawson, J.O. Rädler, G. Franzese, Understanding the Kinetics of Protein-Nanoparticle Corona Formation, *ACS Nano.* 10 (2016) 10842–10850. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04858>.
- [21] O.K. Kari, J. Ndika, P. Parkkila, A. Louna, T. Lajunen, A. Puustinen, T. Viitala, H. Alenius, A. Urtti, In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow, *Nanoscale.* 12 (2020) 1728–1741. <https://doi.org/10.1039/c9nr08186k>.
- [22] G. Fang, Q. Zhang, Y. Pang, H.E. Thu, Z. Hussain, Nanomedicines for improved targetability to inflamed synovium for treatment of rheumatoid arthritis: Multi-functionalization as an emerging strategy to optimize therapeutic efficacy, *J. Control. Release.* 303 (2019) 181–208. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.027>.
- [23] H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari, Nanoparticle uptake: The phagocyte problem, *Nano Today.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>.
- [24] A. MCGoron, M. Fujita, F. Jadidi-Niaragh, N.M. La-Beck, L.M. Wood, X. Liu, Harnessing Liposome Interactions With the Immune System for the Next Breakthrough in Cancer Drug Delivery, (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00220>.
- [25] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers, 2002.
- [26] S. Peltier, J.M. Oger, F. Lagarce, W. Couet, J.P. Benoît, Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0022-2>.
- [27] E. Roger, F. Lagarce, J.P. Benoit, Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.021>.
- [28] M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J.P. Benoît, C. Passirani, Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.044>.
- [29] B. Saliou, O. Thomas, N. Lautram, A. Clavreul, J. Hureauux, T. Urban, J.P. Benoit, F. Lagarce, Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide, *Eur. J. Pharm. Sci.* 50 (2013) 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.06.013>.
- [30] C.R.A. Mouzouvi, A. Umerska, A.K. Bigot, P. Saulnier, Surface active properties of lipid nanocapsules, *PLoS One.* (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179211>.

- [31] T. Perrier, P. Saulnier, J.P. Benoît, Methods for the functionalisation of nanoparticles: New insights and perspectives, *Chem. - A Eur. J.* (2010). <https://doi.org/10.1002/chem.201000808>.
- [32] S. Hirsjärvi, S. Dufort, J. Gravier, I. Texier, Q. Yan, J. Bibette, L. Sancey, V. Josserand, C. Passirani, J.P. Benoît, J.L. Coll, 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 Nanotechnology, Biol. Med.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.08.005>.
- [33] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.026>.
- [34] K. Park, To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question, *J. Control. Release.* 142 (2010) 147–148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.025>.
- [35] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials.* 27 (2006) 4356–4373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.
- [36] M.P. Vincent, S. Bobbala, N.B. Karabin, M. Frey, Y. Liu, J.O. Navidzadeh, T. Stack, E.A. Scott, Surface chemistry-mediated modulation of adsorbed albumin folding state specifies nanocarrier clearance by distinct macrophage subsets, *Nat. Commun.* 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20886-7>.
- [37] H. Ohshima, Theory of electrostatics and electrokinetics of soft particles, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 10 (2009). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/10/6/063001>.
- [38] Hiroyuki Ohshima, *Theory of Colloid and Interfacial Electric Phenomena*, 1st ed., Academic Press, 2006.
- [39] G. Berrecoso, J. Crecente-Campo, M.J. Alonso, Unveiling the pitfalls of the protein corona of polymeric drug nanocarriers, *Drug Deliv. Transl. Res.* 10 (2020) 730–750. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00745-0>.
- [40] M. Lundqvist, C. Augustsson, M. Lilja, K. Lundkvist, B. Dahlbäck, S. Linse, T. Cedervall, The nanoparticle protein corona formed in human blood or human blood fractions, *PLoS One.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175871>.
- [41] C. Gazaille, M. Sicot, M. Akiki, N. Lautram, A. Dupont, P. Saulnier, J. Eyer, G. Bastiat, Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03034-8/Published>.
- [42] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- [43] M.N. Gupta, I. Roy, How Corona Formation Impacts Nanomaterials as Drug Carriers, *Mol. Pharm.* 17 (2020) 725–737. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01111>.
- [44] J Demeester, W Jiskoot, D Crommelin, *Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals*, AAPS, Arlington, 2005.
- [45] M. Hierro-Oliva, A.M. Gallardo-Moreno, M.L. González-Martín, Surface characterisation of human serum albumin layers on activated ti6al4v, *Materials (Basel).* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14237416>.
- [46] B. Pelaz, P. Del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernández, J.M. De La Fuente, G.U. Nienhaus, W.J. Parak, Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake, *ACS Nano.* 9 (2015) 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b01326>.
- [47] C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W.C.W. Chan, Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>.

- [48] Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Muller RH, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEGchain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surfaces B.* (2000) 301–313.
- [49] A. Cieślak, N. Wauthoz, A. Nieto Orellana, N. Lautram, J. Béjaud, J. Hureauux, M. Lafleur, J.P. Benoit, C.J. Salomon, G. Bastiat, Stealth nanocarriers based sterosomes using PEG post-insertion process, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.008>.
- [50] T.M. Allen, P. Sapra, E. Moase, USE OF THE POST-INSERTION METHOD FOR THE FORMATION OF LIGAND-COUPLED LIPOSOMES, n.d.
- [51] R. Mare, D. Paolino, C. Celia, R. Molinaro, M. Fresta, D. Cosco, Post-insertion parameters of PEG-derivatives in phosphocholine-liposomes, *Int. J. Pharm.* 552 (2018) 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.028>.
- [52] R. Bilardo, F. Traldi, A. Vdovchenko, M. Resmini, Influence of surface chemistry and morphology of nanoparticles on protein corona formation, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 14 (2022). <https://doi.org/10.1002/wnan.1788>.
- [53] H. Ohshima, Dynamic electrophoretic mobility of a soft particle, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 142–152. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7264>.
- [54] K. Partikel, R. Korte, N.C. Stein, D. Mulac, F.C. Herrmann, H.U. Humpf, K. Langer, Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 141 (2019) 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.006>.
- [55] R. Rampado, S. Crotti, P. Caliceti, S. Pucciarelli, M. Agostini, Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of "Stealthy" Nanomaterials, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00166>.
- [56] J.B. Coty, E. Eleamen Oliveira, C. Vauthier, Tuning complement activation and pathway through controlled molecular architecture of dextran chains in nanoparticle corona, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 769–778. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.048>.
- [57] D. Li, F. Wang, H. Di, X. Liu, P. Zhang, W. Zhou, D. Liu, Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Shells for Nanoparticles: Enhanced stealth effect and colloidal stability, *Langmuir.* 35 (2019) 8799–8805. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01325>.
- [58] H. Zhou, Z. Fan, P.Y. Li, J. Deng, D.C. Arhontoulis, C.Y. Li, W.B. Bowne, H. Cheng, Dense and Dynamic Polyethylene Glycol Shells Cloak Nanoparticles from Uptake by Liver Endothelial Cells for Long Blood Circulation, *ACS Nano.* 12 (2018) 10130–10141. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b04947>.
- [59] V. Lebreton, N. Kaeokhamloed, A. Vasylaki, G. Hilairet, A. Mellinger, J. Béjaud, P. Saulnier, F. Lagarce, F. Gattacceca, S. Legeay, E. Roger, Pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules using new quantitative FRET technique, *J. Control. Release.* 351 (2022) 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.057>.
- [60] P. Sánchez-Moreno, P. Buzón, H. Boulaiz, J.M. Peula-García, J.L. Ortega-Vinuesa, I. Luque, A. Salvati, J.A. Marchal, Balancing the effect of corona on therapeutic efficacy and macrophage uptake of lipid nanocapsules, *Biomaterials.* 61 (2015) 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.049>.

Supplementary information

Supplementary S1: LNC formulations

The composition of LNCs, appears in the following Table S1.

Table S1. Compositions of different LNCs formulations

Compositions	Quantity (mg)					
	LNC-50	LNC-50-PEG	LNC-50-SA	LNC-100	LNC-100-PEG	LNC-100-SA
Captex® 8000	125	125	125	193.8	193.8	193.8
Kolliphor® HS-15	131.3	131.3	131.3	106.3	106.3	106.3
Purified water	243.8	243.8	243.8	200	200	200
DSPE-mPEG-2000	-	7.0	-	-	7.0	-
Stearylamine	-	-	1.4	-	-	1.4
Lipoid® S75-3	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4
NaCl	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
Purified water (2°C)	625	625	625	625	625	625

LNC-50: LNC 50 nm; LNC-50-PEG; LNC 50 nm with DSPE-mPEG; LNC-50-SA; LNC 50 nm with stéarylamine. LNC-100; LNC 100 nm; LNC-100-PEG; LNC 100 nm with DSPE-mPEG; LNC-100-SA; LNC 100 nm with stéarylamine

Supplementary S2: Sample preparation LNC and Fetal Bovine Serum

The condition of incubation of protein contain on the Fetal Bovine Serum with each type of LNC were the result of the volume/volume mixed approach as it has been shown on the Table S2. To facilitate understanding the BSA quantity of each sample has been calculate to express the result of BSA equivalent (g/L) which was more comprehensive than v/v percentage of FBS.

Table S2. Preparation of LNC 50/FBS sample

FBS % (v:v)	BSA equivalent (g/L)	FBS (mL)	LNC 50 stock suspension (1:10) (mL)	PBS (mL)
0%	0	0	0.5	4.5
5%	0.8	0.25	0.5	4.25
10%	1.60	0.5	0.5	4
25%	4.00	1.25	0.5	3.25
50%	8.00	2.5	0.5	2
75%	12.00	3.75	0.5	0.75
85%	13.60	4.25	0.5	0.25
100%	16	5	0	0

Supplementary S3: Hydrodynamic diameter of proteins on FBS and albumin

To check and compare the profile of hydrodynamic diameter of FBS and albumin, it was decided to perform on the one side the measurement of stock solution of FBS (which contain 16 g/L of albumin) and on the other side the measurement of fresh prepared solution of albumin at 16 g/L. The results are summarized in Figure S3.

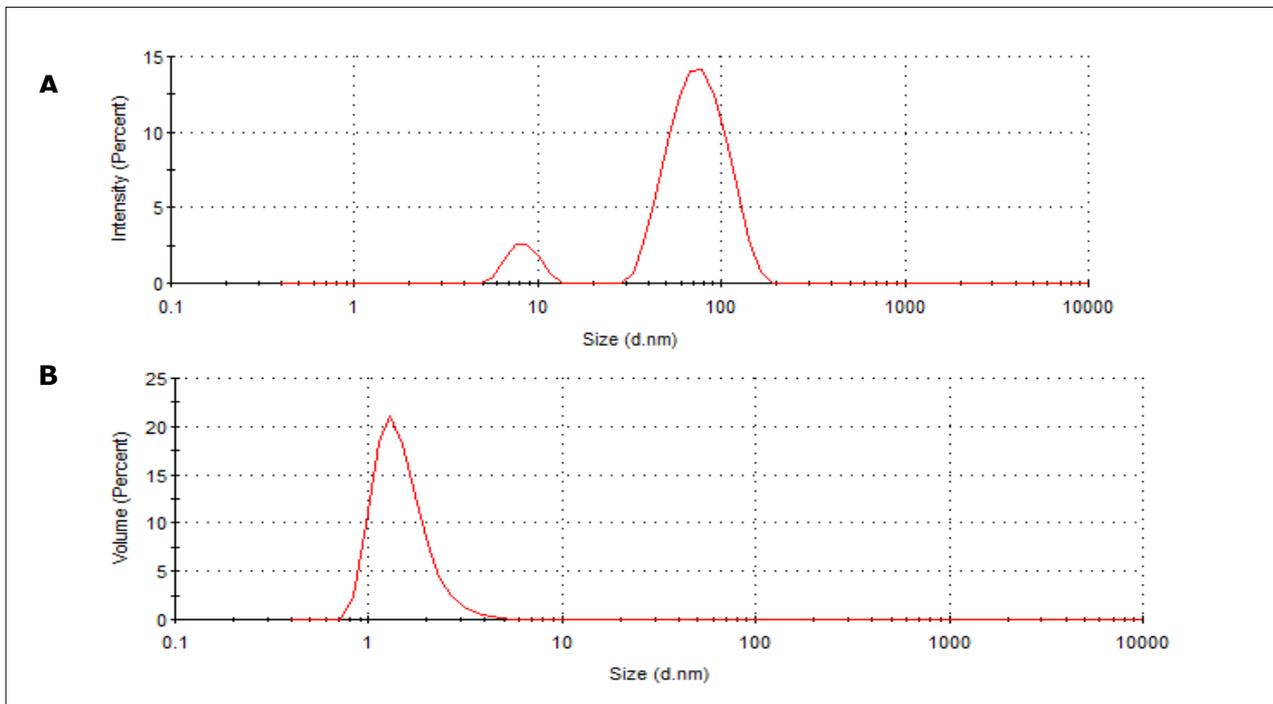


Figure S3. A) Distribution of size (nm) LNC 50 nm after with Fetal Bovin (FBS). B) Size distribution (nm) of Bovine Serum Albumin (BSA) in solution (35 g/L) (*NanoZetaSizer; Malvern Panalytical*)

Chapitre 3. Etude pharmacocinétique des NCLs-FRET : modélisation par approche populationnelle

Avant-propos

Après ce premier chapitre expérimental dédié aux modifications des NCLs après mise en contact avec les protéines plasmatiques, ce projet de thèse s'est poursuivi par l'étude PK des NCLs. Pour cela, il était indispensable de pouvoir mesurer quantitativement les NCLs dans le sang. La méthode FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) a été choisie pour évaluer simultanément l'intégrité et la quantité de NCLs présentes après une étape d'extraction. Plusieurs types de NCLs ont été étudiées. Cette étude, effectuée chez le rat, est l'une des premières qui a abouti à la modélisation PK des NCLs par approche populationnelle. Elle permet ainsi de mieux appréhender les variabilités intra et interindividuelles et donc d'aboutir à des résultats originaux et informatifs sur le devenir des NCLs après injection intraveineuse.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec un autre doctorant du laboratoire MINT (Norraseth Kaokhamloed) encadré par le Dr Emile Roger (MCU-HDR) et le Dr Samuel Legeay (MCU). Celui-ci avait pour but de déterminer la biodisponibilité par voie orale des NCLs-FRET.

Publié dans Journal of controlled Released. 2022 Nov; 351:681-691.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel

Pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules using new quantitative FRET technique

Vincent Lebreton^{a,b,1}, Norraseth Kaeokhamloed^{a,1}, Anastasiia Vasylaki^a, Grégory Hilairet^c, Adélie Mellinger^a, Jérôme Béjaud^a, Patrick Saulnier^{a,b}, Frédéric Lagarce^{a,b}, Florence Gattacceca^d, Samuel Legeay^a, Emilie Roger^{a,*}

^a MINT, INSERM U1066, CNRS 6021, UNIV Angers, SFR-ICAT 4208, Angers, France

^b CHU Angers, 49033 Angers, France

^c UNIV Angers, SFR ICAT4208, Angers, France

^d Computational Pharmacology and Clinical Oncology (COMPO) Unit, Iria Sophia Antipolis-Méditerranée, Cancer Research Center of Marseille, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille University UM105, 13385 Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

FRET
Lipid nanocapsules
Pharmacokinetics
Population pharmacokinetics
Drug delivery

ABSTRACT

The present study investigated the pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules (LNCs) after intravenous administration in rats. Six different Förster resonance energy transfer LNCs (FRET-LNCs) have been studied with 2 sizes (50 and 85 nm) and 3 coating types (none, DSPE-mPEG 2000 or stearylamine). A FRET-LNCs blood extraction method was developed to retain an accurate FRET signal. Intact FRET-LNCs were specifically quantified through combination of FRET signal and Nano Tracker Analysis. Pharmacokinetic data were first described by non-compartmental analysis, then used to develop a population pharmacokinetic model.

The pharmacokinetic elimination of FRET-LNCs was non-linear and dependent on size and surface modification, while the distribution was dependent on size. The LNCs 85 nm volume of distribution was lower than LNCs 50 nm. As expected, LNCs 85 nm with PEG coating displayed a lower clearance than other formulations. Surprisingly, this study highlighted a faster elimination of LNCs 50 nm with PEG compared to other formulations which could be explained by instability in blood. This first pharmacokinetic model of intact LNCs allowed a thorough understanding of the influence of size and coating on pharmacokinetic properties and paves the way for future mechanistic modeling approaches to predict the fate of LNCs *in vivo*.

1. Introduction

Drug encapsulation into nanocarriers is currently one of the most promising technologies to improve drug delivery. Lipid nanocapsules (LNCs) are organic nanocarriers, consisting of a triglyceride core and surfactant shell, and have already been well characterized [1–3]. It is firstly developed by our group [1,4], allows the delivery of several drugs via intravenous (IV) or oral administration routes (paclitaxel [2,5], fondaparinux [6], albendazole [7], praziquantel [8], etc.). However, the limited understanding of the pharmacokinetics (PKs) of this nanocarrier itself is a major issue that can lead to poor translation to the clinical level's application. The limited knowledge about PK of organic

nanocarrier itself is probably one reason, notably due to the lack of technique to specifically quantify the intact organic nanoparticles concentration in the blood. Most of PK organic nanoparticles studies were performed on drugs without evaluating integrity of the nanocarrier. For example, Singh et al., Carreño et al., and Menzel et al. describe the pharmacokinetics of drug encapsulated into NPs (exemestane, quetiapine and exenatide, respectively) which is relevant for total drug but not for encapsulated drug [9–11]. In some other works, the radiolabeling technique was utilized to evaluate the PK parameters of NPs. Unfortunately, with this method, which follows the radioelement, the signal indistinctly quantifies intact and degraded LNCs, not taking into account their structural integrity which might have been compromised after

Abbreviations: FRET, Förster resonance energy transfer; LNCs, Lipid nanocapsules; PKs, pharmacokinetics; NTA, Nanoparticle Tracking Analysis system; IV, intravenous; PR, proximity ratio; PEG, polyethylene glycol.

* Corresponding author.

E-mail address: emilie.roger@univ-angers.fr (E. Roger).

¹ Both authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.057>

Received 17 June 2022; Received in revised form 7 September 2022; Accepted 27 September 2022

Available online 7 October 2022

0168-3659/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

interaction with biological media [12]. In this context, Förster resonance energy transfer (FRET) method presents a great potential to describe the *in vivo* fate of LNCs [13].

FRET is the interaction between one fluorescent dye (called FRET donor) which transfers its energy to the second dye (FRET acceptor) by the energy resonance (distance inferior at 10 nm). The FRET donor and acceptor dyes can be coloaded in the nanocarriers, and the short-distance FRET phenomenon will occur only if the nanocarrier is intact [13]. Roger et al. have previously developed a combination of FRET method with the Nanoparticle Tracking Analysis system (NTA) to measure particle concentration, which allows to quantify the concentration of intact LNCs. This technique combination was used *in vitro* to measure intact LNCs particle concentration after intestinal epithelium barrier crossing [4,14]. Therefore, this method seems well suited for quantifying the intact LNCs particles in biological media. Nevertheless, to use this technique, another challenge of quantifying intact LNCs in biological fluids and tissues is to develop an extraction method from the blood that conserves particles integrity [13,15].

Moreover, it has been known that the PEGylation can provide a stealth effect to increase the circulation time of nanoparticles because of lower opsonization phenomenon and so, lower elimination after macrophage uptake [16–18]. In contrast, PEGylation can increase elimination of nanoparticles after PEG antibodies synthesis as a result of the first injection, it is called accelerated blood clearance (ABC) phenomenon and this phenomenon has never been studied for LNCs [16–18]. Because this topic seems interesting and widely studied, and the only way to study this phenomenon is the repeated injection.

The aim of this study was to investigate the PK analysis of intact LNCs after IV administration in rats and reinjection after 7 days using the FRET method of quantitation. In this context, different FRET-LNCs formulations, already developed in our lab, have been studied. Firstly, an extraction method in blood by ultracentrifugation has been developed to achieve an efficient FRET signal. PK data were first described using non-compartmental analysis (NCA). A population compartmental (PopPK) model was then developed to provide a deeper understanding of PK properties of LNCs and their variability depending on size and coating. Finally, particles stability was assessed in rat blood to explain some *in vivo* results.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dil (1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate), DID (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-dicarbocyanine perchlorate), and Histopaque®-1083 were purchased from ThermoFisher (Villebon-sur-Yvette, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q® Advantage A10 System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Captex® 8000 (glyceryl tricaprilate) was kindly provided by Abitec Corporation (Columbus, OH, USA). Lipoid® S75-3 (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine mixture) were purchased from Lipoid GmbH (Steinhausen, Switzerland). Kolliphor® HS-15 (PEG 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate mixture) was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). DSPE-mPEG-2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)) was purchased Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from PAA Laboratories (Toronto, ON, Canada). Polycarbonate centrifuge tube size 7 × 20 mm (reference 343,775) was purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France). Heparin sodium 5000 UI/mL was purchased from Panpharma (Luitré, France).

2.2. Formulation of LNCs coloaded with Dil- and Did-TPB (FRET-LNCs)

Dil- and Did-tetraphenylborate (TPB) were synthesized using the method described previously [14,19]. Six formulations of LNCs

coloaded with Dil-TPB and Did-TPB (called FRET-LNCs) with different sizes: 50 nm (LNC-50) and 85 nm (LNC-85), surface modifications: DSPE-mPEG-2000 (PEG) (LNC-50-PEG;LNC-85-PEG) and stearylamine (SA) (LNC-50-SA; LNC-85-SA) were prepared using the phase inversion method (composition shown Table 1) [4].

2.3. FRET-LNCs characterization

The mean size (nm), particle concentration (particle/mL), and particle size distribution were measured with the NTA technique using a NanoSight NS300 (Malvern Instrument, Worcestershire, UK) with a low volume flow cell and a 450 nm laser. FRET-LNCs suspensions were diluted in ultrapure water by the factor from 5×10^5 to 1×10^6 and then slowly injected into the sample chamber using a 1 mL syringe pump with the rate of 3–4 μ L per second. The video sequences of the nanoparticles were captured over 60 s (5 replicates) and then analyzed by NTA analytical software version 3.2.

NTA provides the particle distribution width parameters, which are calculated following the equation: $\text{Span} = (D90 - D10)/D50$ where D10, D50, and D90 represent the diameter (nm) at the 10th, 50th (median), and 90th percentiles of the distribution histogram, respectively.

The zeta potential of the FRET-LNCs was determined by laser doppler electrophoresis using Zetasizer® Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments SA, Worcestershire, the UK) diluted by factor 1×10^2 .

The fluorescence emission spectra of FRET-LNCs were recorded on a FluoroMax® 4 spectrophotometer (Horiba Jobin Yvon Inc., Piscataway, NJ, USA) at room temperature with the 548 nm excitation and 0.5 s integration time. FRET-LNCs suspension was diluted by factor 3×10^3 . The emission spectra were collected from 530 to 720 nm, with an increment of 1 nm. They were corrected for the lamp source fluctuations and the wavelength-dependent response of the detector. The maximum intensity of the FRET donor and acceptor were recorded at 569 ± 5 nm and 675 ± 5 nm, respectively.

The integrity of nanoparticles was determined by the FRET proximity ratio (PR) calculated by the following equation: $PR = A/(A + D)$, where A and D are the maximum fluorescence intensity of the aforementioned FRET acceptor and donor signals, respectively.

2.4. Animal studies

Male Sprague-Dawley rats ($n = 28$) aged 11 ± 2 weeks and weighing 480 ± 73 g were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All rats received a standard laboratory diet and water ad

Table 1
Compositions of different FRET-LNCs formulations.

Compositions	Quantity (% w/w)					
	LNC-50	LNC-50-PEG	LNC-50-SA	LNC-85	LNC-85-PEG	LNC-85-SA
Captex® 8000 (2% w/w Dil-TPB)	5.5	5.5	5.5	8.5	8.5	8.5
Captex® 8000 (2% w/w Did-TPB)	5.5	5.5	5.5	8.5	8.5	8.5
Kolliphor® HS-15	11.5	11.5	11.5	9.3	9.3	9.3
Purified water	21.3	21.3	21.3	17.5	17.5	17.5
DSPE-mPEG-2000	–	0.6	–	–	0.6	–
Stearylamine	–	–	0.1	–	–	0.1
Lipoid® S75-3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
NaCl	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Purified water (2° C)	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7

LNC-50: LNC with an expected size of 50 nm; LNC-50-PEG: LNC with DSPE-mPEG and expected size of 50 nm; LNC-50-SA: LNC with stearylamine and expected size of 50 nm; LNC-85: LNC with an expected size of 85 nm; LNC-85-PEG: LNC with DSPE-mPEG and expected size of 85 nm; LNC-85-SA: LNC with stearylamine and expected size of 85 nm.

libitum. The experimental protocol on animals was carried out to the EU Directive 2010/63/EU and was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiment of the Pays de la Loire, France (APAFIS #2020092411444021).

2.5. IV administration of FRET-LNCs

2.5.1. First injection

Six FRET-LNCs formulations were intravenously injected into Sprague-Dawley rats via dorsal penile vein with the dose of 2×10^{14} particles/100 g rat. Ten samples of 150 μL of blood were collected in tail vein at 5, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 600 and 1440 min post-dosing. No $>1500 \mu\text{L}$ were collected over the 24-h study period ($< 5\%$ total blood volume). Samples were analyzed as described previously.

2.5.2. Repeated injection

After 7 days, the same dose of the same type of FRET-LNCs was injected into the same rat. Blood was collected and analyzed with the same method as mentioned above.

2.6. Quantification FRET-LNCs in plasma

2.6.1. FRET-LNCs extraction from blood

A 100 μL blood sample was taken and immediately mixed with 100 μL of Histopaque®-1083 in the polycarbonate centrifuge tube kept in ice. Then, the samples were centrifuged using Optima MAX-UP Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Villepinte, France) and the fixed-angle rotor TLA-100 (Beckman Coulter, Villepinte, France) with a relative centrifugal force of $4 \times 10^5 \text{ G}$ at 25°C for 2 h. Finally, 75 μL of the supernatant was immediately collected and mixed with 225 μL of ultrapure water. FRET donor and acceptor spectra of the samples were measured, and the PR was calculated. Then, the particle concentrations were calculated from the equation derived from the quantitative calibration curve.

2.6.2. Particle integrity analysis

Sample's mean PR at any time point was calculated. The time duration that FRET-LNCs having full integrity was coined as the *full-integrity phase*. A time point was included in the *full-integrity phase* if the mean PR at a time point was ≥ 0.80 and was statistically equivalent to the mean PR of the pooled reference formulations ($n = 38$) using the equivalence test (see supplementary S1). Only the FRET acceptor intensity in the *full-integrity phase* was quantified as the *in vivo* plasma particle concentration by the calibration curve, otherwise, the data was reported as below the limit of quantification (BLOQ). Algorithm for FRET-LNCs particle concentration quantification procedure is detailed in supplementary Scheme S1.

2.6.3. Quantitative calibration curve

For the standard solutions, seven dilutions of FRET-LNCs were prepared with the dilution factors ranging from 1×10^3 to 5×10^4 and then spiked into blood or PBS. The initial particle concentration of the formulation had been measured in the characterization step by NTA (section 2.3). Maximum FRET acceptor emission intensities of the spiked standard were measured ($675 \pm 5 \text{ nm}$) and plotted as a function of particle concentration with the curve fitted by a double logarithmic regression function in the linear form: $F_A = 10^k \times C^m$ where F_A is FRET acceptor maximum emission intensity ($675 \pm 5 \text{ nm}$) of a sample; k is the intercept; C is FRET-LNCs particle concentration of a sample; m is the slope of the fitting curve. The linearity of the fitting curve was estimated by the coefficient of determination (R^2) with the acceptance of $R^2 \geq 0.980$. Due to the interference from background fluorescent noise at low concentration, the standard concentration with PR < 0.80 was excluded from the calibration curve.

2.6.4. Lower limit of quantification (LLOQ)

The LLOQ of each FRET-LNCs formulation was defined as the mean of the lowest *in vivo* particle concentration in the *full-integrity phase*.

2.7. Pharmacokinetics analysis and modeling

NCA and PopPK analyses were performed on blood concentrations of intact FRET-LNCs concentrations vs time data using PKanalix and Monolix softwares, respectively (MonolixSuite 2021R1, Lixoft, Antony, France). Actual sampling times and doses were used in the analysis. Default software settings were used unless otherwise stated.

For NCA, BLOQ was considered as missing values. The linear trapezoidal linear integral method was used to compute the area under the curve from time zero to the time of the last measured concentration (AUC_{last}). All available observations were included for calculation of the slope of the terminal log-linear phase λ_z and the corresponding half-life (HL), which was performed with a uniform weighting. Kinetic profiles with fewer than 5 observations were excluded from the analysis. Rats having received two administrations were analyzed independently for each administration. Area under the curve from time zero to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$), mean residence time (MRT), plasma clearance (CL) and volume of distribution (V_D) were determined from the observed concentrations.

For PopPK, BLOQ concentrations were interval-censored, between 0 and the LLOQ for each type of FRET-LNCs. PK parameters from rats having received two administrations were estimated from the two obtained PK profiles, each administration being considered as an occasion. PK parameters were assumed to follow a log-normal distribution. Structural models with 1 or 2 compartments and linear or non-linear elimination were tested. Combined, constant and proportional residual error models were tested on the best structural model. LNCs were categorized by type of surface modification (classical, PEGylated or coated with SA), size (50 or 85 nm), or the combination of both (type of LNC). Impact of the categorical covariates coating, size and type on PK parameters was assessed by the stepwise covariate modeling procedure, using exponential relationships. Inter-occasion variability was also assessed. Among alternate models, the model displaying the lowest corrected Bayesian Information Criterion (cBIC) was retained. Model evaluation was performed based on the relative standard error (RSE) of the estimates, which was considered acceptable under 30% for fixed effects and under 50% for random effects. Graphical evaluation of models included goodness of fit (GOF) plots (observations versus predictions and distribution of weighted residuals) and visual predictive checks (VPC). For the final model, stability was additionally assessed by evaluating the sensitivity of fixed effect parameters to changes of their initial values.

2.8. In vitro stability of FRET-LNCs in rat blood

Rat blood was obtained by cardiac puncture and kept in a lithium heparin tube (Vacutainer®, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). FRET-LNCs were added to 1 mL of the blood to obtain a final concentration of 28.5 Teraparticles/mL (Teraparticles or $\text{Tp} = 10^{12}$ particles). The mixture was incubated at 37°C with stirring. 100 μL of blood was collected at 5, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 and 600 min. FRET-LNCs particle concentration was quantified with the same method in section 2.6. A control group in PBS was analyzed with the same experimental condition. The concentration results were normalized with the results from the first time point (5 min) and reported as: $\%C_N = (C_t/C_5) \times 100\%$ where $\%C_N$ is the percentage normalized particle concentration, C_t is the particle concentration at each time point, and C_5 is the initial particle concentration at the time 5 min. To ensure the integrity of the extracted FRET-LNCs, the FRET signal has been monitored for each sample. The mean PR of the sample from each time point ($n = 3$) has been statistically compared.

2.9. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the software Prism GraphPad (version 9.3.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The statistical significance was assessed for a *p*-value under 0.05.

2.9.1. Formulation and characterization

The statistical analyses were conducted by two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons) to investigate the effect of size and surface modification.

2.9.2. Noncompartmental pharmacokinetics

The difference of NCA of the 1st injection (day-0) between each formulation was analyzed by two-way ANOVA with size and surface modification factors. The difference of NCA of the 2nd injection (day-7) was statistically compared to the 1st injection (day-0) by paired *t*-test.

2.9.3. In vitro particle stability

Particle integrity equivalence test was assessed by two one-sided tests (TOST) as the method mentioned earlier. The particle concentration as %C_N from each time point was statistically compared to the initial %C_N at 5 min (time factor) and between blood vs PBS (media factor) by repeated-measures two-way ANOVA.

3. Results and discussions

3.1. FRET-LNCs formulations and characterization

To follow the behavior of intact LNCs [1], the FRET method has been chosen. FRET relies on the interaction between two encapsulated dyes which is more precisely for monitoring intact LNCs than the single encapsulated dye system. Indeed, the fluorescence signal of the single dye system can originate from the dye already released outside the LNCs, while the FRET signal can only be detected from the two dyes in close proximity inside the intact LNCs. Moreover, to avoid any modification of the nanocarrier's physicochemical properties and dyes dissociations, dyes have been encapsulated and not conjugated to one of the LNCs components. Six FRET-LNCs formulations with different sizes (50 and 85 nm) and surface modifications (none, DSPE-mPEG-2000 or stearylamine) were prepared following the compositions described in our previous work [4]. Two sizes were formulated in the range of 47.5–52.7 nm and 78.6–84.8 nm with a span in the range of 0.40–0.67, suggesting a narrow and uniform size distribution (Table 2). Because NTA determines the Brownian motion by video image analysis, particles in the samples are visualized, and a photo of particles can be extracted (Supplementary Fig. S2). The zeta potential varied by both size and surface modification. The proximity ratio (PR) of all the formulations were in a range from 0.86 to 0.93, as obtained in our previous work for optimal FRET signal, and demonstrating their full integrity [20]. Finally, the particle concentration, except for LNC-50-PEG, ranged from 2.5×10^2 to 3.8×10^2 Tp/mL. Surprisingly, LNC-50-PEG had a particle concentration of 10.1×10^2 Tp/mL, which is significantly (*p* < 0.05) higher than all the others as already obtained in our previous work (Table 2) [4]. This difference in particles concentration was considered in the following *in vitro* and *in vivo* experiments.

3.2. FRET-LNCs extraction and quantification method

For the noncompartmental pharmacokinetic and the population pharmacokinetic analyses, quantitative information (and not qualitative or semi-quantitative information) regarding the plasma particle concentration is required. For the PK studies, a new extraction method was developed for quantifying intact FRET-LNCs in biological media. Blood itself has the autofluorescent emission spectrum at 548 nm which overlaps the FRET spectrum of FRET-LNCs [21,22]. Various methods of extraction are available e.g., solid-phase extraction (SPE), liquid–liquid

Table 2
FRET-LNCs Characterization (mean ± SD).

Formulations	Particle Size (nm)	Span	Zeta Potential (mV)	FRET Proximity Ratio (PR)	Particle Concentration (10 ² Tp/mL)
LNC-50 (a) (n = 5)	49.3 ± 4.8 ^d	0.51 ± 0.20	4.2 ± 2.1 ^{bc,d}	0.90 ± 0.02	3.2 ± 0.8 ^b
LNC-50-PEG (b) (n = 5)	47.5 ± 2.3 ^e	0.40 ± 0.04 ^e	-7.1 ± 2.8 ^{bc}	0.87 ± 0.04	10.1 ± 1.1 ^{ac}
LNC-50-SA (c) (n = 7)	52.7 ± 4.9 ^f	0.56 ± 0.09	18.0 ± 1.0 ^{cd}	0.86 ± 0.03 ^f	3.8 ± 0.5
LNC-85 (d) (n = 5)	84.8 ± 3.1 ^a	0.61 ± 0.04	16.9 ± 1.1 ^{bc,d}	0.90 ± 0.03	2.5 ± 0.8
LNC-85-PEG (e) (n = 3)	78.6 ± 2.1 ^b	0.67 ± 0.09 ^b	-1.3 ± 1.8 ^{cd}	0.93 ± 0.01	3.3 ± 0.5 ^b
LNC-85-SA (f) (n = 3)	83.1 ± 5.4 ^c	0.62 ± 0.03	30.0 ± 1.1 ^{cd}	0.93 ± 0.01 ^c	2.8 ± 0.8

T_p = 10¹² particles (Teraparticle). Statistical significance was conducted by two-way ANOVA (Tukey) and expressed as a comparison: (a) vs LNC-50, (b) vs LNC-50-PEG, (c) vs LNC-50-SA, (d) vs LNC-85, (e) vs LNC-85-PEG, (f) vs LNC-85-SA; if the level of significance with *p* < 0.05.

extraction (LLE), protein precipitation (PP) [15]. Preliminary unpublished work demonstrated that these methods were not appropriate to our study because they use organic solvents that destroy LNCs. The dissociated FRET-LNCs do not give FRET signal because the dyes will dissipate out, causing their distance to widen beyond the FRET distance. In order to avoid using organic solvents and to get rid of solid blood components from the sample, the sucrose density gradient centrifugation technique was employed using Histopaque®-1083, which is the polysucrose solution with the density 1.083 g/mL [23]. FRET-LNCs have a lower density than Histopaque®-1083 and the aqueous phase of blood. So that, after the centrifugation, LNCs will be at the top of the supernatant. At last, the FRET spectrum of FRET-LNCs was measured by the fluorimeter.

In a previous work [14], no apparent variation was observed between the particle concentration of LNCs calculated by the fluorescence calibration curve at the FRET acceptor wavelength and the one determined by the NTA. However, the plasma extract could still contain natural lipid or protein particles. As a result, a microscopic analysis (TEM, SEM) or a direct NTA measurement would overmeasure the presence of the particles because these methods did not distinguish natural lipid or protein particles from LNCs. Meanwhile, the *in vivo* experiment with a routine analytical method testing numerous samples must be developed. Accordingly, the particle concentration in blood was determined by using the fluorimeter. To ensure that only the FRET acceptor intensity of fully intact FRET-LNCs was quantified as particle concentration, FRET-LNCs particle integrity at any time point was determined by PR with equivalence test. Only FRET acceptor intensity during the *full-integrity phase* was quantifiable by the calibration curve. To quantify the FRET-LNCs particle concentration in the extract, a calibration curve was constructed between the FRET acceptor intensities at 675 ± 5 nm and FRET-LNCs particle concentration. The different standard concentrations were spiked in blood and, after the extraction, FRET acceptor intensities were measured and plotted as a function of the known FRET-LNCs particle concentrations. The linearity of every calibration curve was >0.980. A new calibration curve was constructed for every freshly prepared batch of FRET-LNCs to reduce the variability caused by the varying particle concentration of each formulation. Matrix effect was observed (see supplementary S4). In accordance with the ICH and USFDA guidelines, to analyze *in vivo* sample, the calibration curve was prepared in the same biological matrix as of the sample, which is

blood (or PBS in the *in vitro* experiment) [24,25].

The LLOQ of the *in vivo* plasma particle concentration was determined by both plasma particle concentration and particle integrity (the PR). The LLOQ of each formulation is shown in Table 3.

Moreover, to detect free dyes released from FRET-LNCs, the extraction by ultracentrifugation was performed on DiI-TPB/blood and DiD-TPB/blood mixtures. Nevertheless, this extraction method could not efficiently extract the free DiI-TPB and DiD-TPB dyes from blood, as only around 0.0002% of the free dyes were retrieved. The dyes were observed to adsorb to the glass vial, plastic tube, and plastic pipette tips. Thus, only the FRET signals from the dyes inside FRET-LNCs could be determined by this extraction method.

3.3. Particle concentration-time profile and NCA

Forty-three PK profiles were obtained in 28 rats, 15 rats being dosed twice (Fig. 1). Of note, 2 out of 3 rats suddenly died after reinjection of LNC-85-SA. As a consequence, reinjection of LNC-85-SA was discontinued for ethical reasons, in agreement with the protocol, and reinjection data were obtained in 1 animal only. An interaction with erythrocyte or platelet and toxicity of stearylamine was already demonstrated with liposomes by Nishly et al., which would explain the death of these 2 rats [26].

In order to carry out the quantitative particle analysis in rat plasma, the FRET spectra was measured with $\lambda_{ex} = 548$ nm. Firstly, the PR was checked qualitatively for the overall integrity of FRET-LNCs. Then, the concentration of intact nanoparticles was estimated with the equation obtained from every freshly prepared batch of FRET-LNCs. The following experiments take into account 430 samples collected, 55 values were missing, while 80 values were BLOQ. As an example of the obtained spectra, the emission spectra of LNC-50 in rat plasma (FRET donor and FRET acceptor) were given in Supplementary S3, as well as a photo of particles extracted from video images obtained by NTA.

The PKs of the intact FRET-LNCs has never been elucidated due to the lack of technique to directly quantify their particle concentration in biological media. The BLOQ values were considered as missing. Nine PK profiles with fewer than 5 observations (2 to 4) were considered too poor for NCA and excluded. Finally, the 34 analyzed PK profiles contained 6 to 9 observations, and a total of 268 observations. The FRET LNCs were considered intact, and the concentration has been calculated with the appropriate standard curve. The PR was monitored and plotted as a function of time (see supplementary Fig. S5). After concentration analysis, PK data showed that, while the decreased V_D for bigger LNCs was observed for all coatings without a significant difference (18.6 vs 24.8, 15.4 vs 16.8, 16.4 vs 22.1 mL for LNCs 85 nm vs 50 nm classical, PEG and SA respectively), the decreased CL for bigger LNCs was only observed for PEG LNCs (3.0 mL/min). Interestingly, LNC-50-PEG displayed a significantly higher CL than 50 nm classical and SA LNCs (12.1 vs 5.5 and 6.3 10^{-3} mL/min respectively), while LNC-85-PEG displayed a significantly lower CL than 85 nm classical and SA LNCs (3.0 10^{-3} mL/min vs 5.6 and 5.8 10^{-3} mL/min respectively). Accordingly, HL and MRT were significantly shorter for LNC-50-PEG and higher for LNC-85-PEG than for other LNC types (Table 4). LNCs 85-PEG displayed significantly higher $AUC_{0-\infty}$ (27,672 vs 9432 Tp.min/mL) and significantly lower CL (3.0 vs 12.1 10^{-3} mL/min) when compared to LNC-50-PEG (Table 4). Groo et al. have performed a study with paclitaxel-loaded LNCs-50 with and without PEG length of 2000 to compare their PK profiles. After IV

administration in rats, circulation time of PEGylated paclitaxel-loaded LNCs is longer than classical paclitaxel-loaded LNCs. Indeed, the MRT of paclitaxel after IV administration was 80 min and 54 min for paclitaxel-loaded PEG LNCs and paclitaxel-loaded LNCs, respectively [27]. Similarly, in another study using qualitative fluorescence detection technique, Morille et al., concluded to a longer time circulation of PEG₂₀₀₀ LNCs 50 nm than LNCs 50 nm without PEG₂₀₀₀ after measuring the fluorescence signal of encapsulated DiD [28]. All these studies seem to demonstrate the longer circulation time of PEG LNCs. However, it is important to not forget that, in these studies, the total paclitaxel or dye (free and encapsulated) was quantified or followed and not only the encapsulated one.

To conclude, by employing the quantitative FRET technique detection of LNCs, these results highlight a size-dependent clearance of PEGylated LNCs in blood, which is associated with modifications of their PK profiles. This study allows describing for the first-time quantitative results about *in vivo* fate of LNCs.

To study the effect of the ABC phenomenon and its pharmacokinetics consequences, the FRET-LNCs formulations with the same dose were reinjected to the same rat ($n = 3$) after 7 days. The PR-time profile had the same pattern as in the first injection (see supplementary Fig. S5). The particle concentration-time profile of the reinjection was shown in Fig. 1B and compared with each first injection datum in Fig. 1A. These results demonstrated that the 1-week reinjection plasma particle concentration-time profile was similar to the first injection for the 6 formulations. Moreover, NCA was performed on the reinjection data (shown in Table 4) and no significant difference (paired t-test) was obtained compared to the parameters from the initial injection. Thus, NCA results showed that PK parameters were similar after the first and the second administration for all formulations. Note that all formulations contain small PEG chains (PEG₆₆₀) because Kolliphor® HS-15, which acts as a surfactant, is composed of a mixture of free PEG₆₆₀ and the PEG₆₆₀ with mono- and the di-esters of 12-hydroxystearic acid. Nevertheless, as demonstrated by Basile et al. with similar formulations, LNCs with only Kolliphor® HS-15 had low *in vitro* activation of complement proteins in the *in vitro* study [29]. With our *in vivo* study, we can hypothesize that no immune reaction against PEG would occur in rats after a 7-day reinjection. In comparison, Ichihara et al., have previously demonstrated that after administration of PEGylated liposomes (DSPE-PEG₂₀₀₀) with mean size around 100 nm, in mice and rats, anti-PEG IgM production appeared after 3 days with a peak at 5 days [30]. Even if the interval between the two injections was very important to observe this phenomenon, these authors confirmed that the maximum level of anti-PEG is around 5 to 7 days [31]. Other parameters are known to influence the ABC phenomenon like size of nanoparticles, density and dose of PEG [31]. For the dose, it is possible that, with our LNCs formulations, induction of the ABC phenomenon was abrogated because the amount of PEG was higher than 0.5 μ mol/kg, as suggested by Hashimoto et al. [32]. Indeed, by calculation, the total amount of injected PEG₆₆₀ and PEG₂₀₀₀ (for LNC-50-PGE, and LNC-85-PEG) were between 90 and 1900 μ mol/kg and 5–25 μ mol/kg, respectively. In addition, Li et al. have performed a study about animal species effect on ABC phenomenon with PEGylated liposomes. They observed that the antibodies PEG production could be inhibited by cytotoxic drug loaded in liposomes. Then, in dogs, the ABC phenomenon was more pronounced than in rats or mice [33]. Therefore, it is possible to suppose that the production of antibodies after the first injection of PEGylated nanoparticles does not modify the PK profile, especially the clearance. In the previous cited studies, they were only interested in increasing plasma antibody levels and not in the potential PK parameter modifications.

Conclusively, all the results pointed out that 1-week reinjection did not significantly change any pharmacokinetics in the 6 tested FRET-LNCs formulations. Therefore, for the popPK, the results from the first injection and the reinjection could be combined to increase the sample size for popPK and thus to improve the accuracy of the model.

Table 3
LLOQ for each formulation.

	LNC-50	LNC-50-PEG	LNC-50-SA	LNC-85	LNC-85-PEG	LNC-85-SA
LLOQ (Tp/mL) (m + sd)	16.7±6.3	15.6±6.8	13.1±2.7	7.6±2.3	16.6±2.3	6.0±2.4

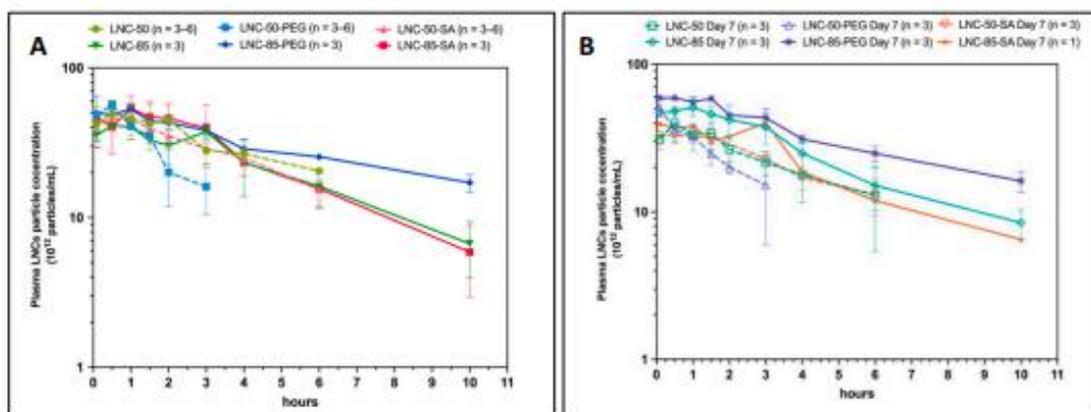


Fig. 1. Plasma particle concentration-time profile of 50-nm & 85-nm FRET-LNCs following the IV bolus. (A) with day-0 injection. (B) with day-7 injection. Data is reported as the arithmetic mean and standard deviation (whisker). Particle concentration is in the unit of 10^{12} particles/mL (Teraparticles).

Table 4

NCA of the pharmacokinetic parameters (mean and 95 %CI) of six different FRET-LNCs by IV bolus injection route in the rat model (D0) and after a second injection separate by one week (D7).

PK parameters (NCA)	1st injection (D0)/2nd injection (D7)	LNCs 50 nm			LNCs 85 nm		
		LNC-50 (a) (n = 3)/(n = 3)	LNC-50-PEG (b) (n = 3)/(n = 3)	LNC-50-SA (c) (n = 3)/(n = 3)	LNC-85 (d) (n = 3)/(n = 3)	LNC-85-PEG (e) (n = 3)/(n = 3)	LNC-85-SA (f) (n = 3)/(n = 1)
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($T_p \cdot \text{min/mL}$)	D0	22016 ^b [18,172, 25,860]	9432 ^{ab} [4524, 14,340]	17,733 [10,282, 25,184]	15984 ^e [8767, 23,200]	27672 ^{bd} [21,890, 33,454]	17,091 [9369, 24,813]
	D7	14,376 [0, 30,261]	7906 [0, 16,814]	13,569 [4125, 23,012]	18,318 [9688, 26,948]	26,858 [18,578, 35,138]	14,217 [15,198, 21,400]
$AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ ($T_p \cdot \text{min/mL}$)	D0	12768 ^b [7622, 17,914]	6871 ^{ab} [6034, 7708]	11,441 [9182, 13,699]	13505 ^e [9664, 17,346]	18744 ^{bd} [17,982, 19,506]	15,198 [8996, 21,400]
	D7	8623 [4220, 13,027]	5010 [3493, 6528]	7968 [4357, 11,580]	15,563 [9565, 21,560]	19,927 [16,419, 23,425]	12,201 [12,201, 12,201]
Half-life (min)	D0	312 ^b [25, 599]	102 ^{ab} [5, 199]	252 [53, 451]	240 [86, 394]	358 ^b [243, 474]	202 [41, 362]
	D7	257 [0, 610]	111 [0, 239]	268 [21, 514]	221 [129, 313]	294 [212, 375]	215 [215, 215]
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (min)	D0	441 ^b [28, 854]	143 ^{ab} [3, 283]	353 [84, 623]	323 [128, 519]	522 ^b [347, 697]	272 [72, 471]
	D7	365 [0, 871]	164 [0, 378]	369 [51, 686]	312 [196, 428]	429 [308, 551]	300.0 [300.0, 300.0]
$Cl_{0 \rightarrow \infty}$ (10^{-3} mL/min)	D0	5.5 ^b [4.5, 6.2]	12.1 ^{ab} [5.5, 18.7]	6.3 [3.1, 9.4]	5.6 [2.8, 8.3]	3.0 ^b [2.2, 3.8]	5.8 [3.6, 7.9]
	D7	7.4 [0, 16.8]	14.0 [1.4, 26.6]	7.3 [2.4, 12.3]	5.5 [2.5, 8.5]	3.3 [1.9, 4.7]	7.1 [7.1, 7.1]
V_D (mL)	D0	24.8 [0.7, 48.8]	16.8 [9.6, 23.9]	22.1 [11.8, 32.3]	18.6 [14.8, 22.5]	15.4 [11.7, 19.2]	16.4 [5.1, 27.7]
	D7	22.5 [18.4, 26.5]	20.1 [18.8, 21.4]	26.6 [16.4, 36.8]	17.2 [12.4, 21.9]	13.9 [11.6, 16.1]	22.2 [22.2, 22.2]

$T_p = 10^{12}$ particles (Teraparticle). Statistical analysis was conducted by two-way ANOVA and is expressed if the level of significance $\leq p 0.05$ as: (a) vs LNC-50, (b) vs LNC-50-PEG, (c) vs LNC-50-SA, (d) vs LNC-85, (e) vs LNC-85-PEG, (f) vs LNC-85-SA. A statistical analysis was conducted by paired t-test to compare the first injection and second injection.

3.4. Population pharmacokinetics analysis (popPK) of intact FRET-LNCs

All 375 measured concentrations from 43 kinetics and 28 rats were included in the analysis. BLOQ concentrations were interval-censored, between 0 and the LLOQ for each subtype of LNC (Table 3). The data were best described by a 1 compartment model with a Michaelis-Menten elimination and a proportional residual error. A strong correlation between V_m (maximum elimination rate) and K_m (Michaelis-Menten constant) was observed, suggesting an over-parameterization of the model, which was corrected by fixing K_m . After a parameter sensitivity analysis between 25 and 35 T_p/mL , the value of 27 T_p/mL , resulting in the lowest BICc, was retained for K_m . Importantly, other estimated parameters were stable for the various tested values of K_m . Base model parameters were estimated with a good precision, with relative standard

errors (RSE) below 20% (Table 5). Inter-occasion variability did not improve the model.

Effect of size, coating and type of LNCs on V_D and V_m were assessed. Inclusion of the type of LNC as a covariate on V_m resulted in the highest decrease of the BICc value (Table 6). Addition of a second covariate on this new reference model with type of LNC on V_m allowed to include effect of size on V_D as the most significant covariate. Addition of any other covariate did not further reduce the BICc value. Since the estimated value of the effect of LNC-SA-50 on V_m was low (-0.08) and poorly estimated (RSE = 107%), it was fixed to zero, resulting in a lower BICc value. In the final model, reference V_m value consequently corresponded to the value of V_m for LNC-50 and LNC-50-SA. Other types of LNCs significantly influenced V_m when compared to the reference value (Table 6). The type of LNCs explained 35% of the variability of V_m ,

Table 5

Population PK model parameters: one compartment model with non-linear elimination and proportional error model. Typical value (TV) was obtained from reference value (RV = 21.49 mL for V_D , 3.89 Tp/min for V_m) and β using the formula: $\log TV = \log RV + \beta$.

Parameters	BASE MODEL		FINAL MODEL		Typical value
	Estimate	RSE (%)	Estimate	RSE (%)	
Fixed Effects					
V_D (mL)	20.29	3.30	21.49	3.68	21.49
β_{85, V_D}	NA	NA	-0.16	36.00	18.31
V_m (Tp/min)	3.93	8.89	3.89	4.19	3.89
β_{LNC-85, V_m}	NA	NA	-0.30	25.60	2.88
β_{LNC-50, PEG, V_m}	NA	NA	0.75	9.21	8.24
β_{LNC-85, PEG, V_m}	NA	NA	-0.74	12.10	1.86
$\beta_{LNC-85-SA, V_m}$	NA	NA	-0.20	41.00	3.18
K_m (Tp/mL)	27.00	NA	27.00	NA	27.00
Standard Deviation of the Random Effects					
ω_{V_D}	0.15	19.80	0.13	17.50	NA
ω_{V_m}	0.46	18.00	0.11	13.70	NA
Error Model Parameters					
b	0.20	4.73	0.20	4.68	NA

RSE: relative standard error. V_D : volume of distribution. V_m : maximum elimination rate. K_m : Michaelis-Menten constant. Tp: terapeutics (10^{17} particles). $\beta_{A,B}$: effect of covariate A on parameter B. ω_{V_D} : unexplained inter-individual variability (standard deviation) of parameter B. b: proportional residual error (standard deviation).

Table 6

Population PK model: impact of covariates on BICc and random effect parameters.

	BICc	ω_{V_D}	ω_{V_m}	b
Base	2094.45	0.15	0.46	0.20
Size on V	2090.98	0.13	0.46	0.20
LNC type on V_m (6 types)	2041.43	0.15	0.11	0.20
LNC type on V_m (5 types)	2039.11	0.15	0.11	0.20
Final	2035.86	0.13	0.11	0.20

while size of LNCs explained only 2% of the variability of V_D .

All the parameters of the final model were estimated with a good precision, with RSE below 20% (Table 5). Shrinkage of V_D and V_m distribution were below 20% (Table 6). The residual error of 20% was acceptable. The final model was stable, as assessed by estimating parameters starting from 5 random combinations of initial estimates for V_D and V_m , varying between 11.89 and 32.33 mL and 1.21 and 3.30 Tp/min respectively (supplementary Fig. S6).

Diagnostic plots showed that the final model was able to accurately predict observations, all over the observed concentrations range and all along the kinetics (Fig. 2). Indeed, observations versus population and individual predictions splines were close to the identity line (Fig. 2A), while individual weighted residuals (IWRES) versus time and individual predictions showed that percentiles were close to the theoretical percentiles from the normal centered reduced law (Fig. 2B). Corrected visual predictive checks confirmed that the final model accurately captured the mean PK profile and its associated variability (Fig. 2C).

The PopPK analysis confirmed the results obtained with the NCA. Parameter values were similar, and the same impact of size and coating properties of LNCs was identified. V_D was 21.49 mL for pooled 50 nm LNCs and 18.31 mL for pooled 85 nm LNCs from PopPK (Table 5), these values are comparable to the mean values obtained from NCA (22.2 mL and 17.2 mL respectively, from Table 4). Comparison of elimination parameters is less straightforward, since a constant CL is estimated using NCA, while a non-linear CL dependent on plasma concentration could be characterized with PopPK modeling. However, the value of CL at a plasma concentration (C_p) of 35 Tp/mL which is roughly half the

maximum C_p measured in the current study, was of 6.3×10^{-3} mL/min for LNC-50 and LNC-50-SA (with V_m and K_m from Table 6), as calculated from the following equation:

$$CL = \frac{V_m}{K_m + C_p}$$

This value is similar to the values of 5.5 and 6.3×10^{-3} mL/min obtained from NCA for both types of LNCs, LNC-50 and LNC-50-SA respectively (Table 4). On the same principle, CL from PopPK when C_p is 35 Tp/mL was 4.6, 13.3, 3.0 and 5.1×10^{-3} mL/min respectively for LNC-85, LNC-50-PEG, LNC-85-PEG and LNC-85-SA, in line with CL calculated from NCA, of 5.6, 12.1, 3.0 and 5.8×10^{-3} mL/min respectively (Table 4).

No inter-occasion variability was observed when the LNCs were administered twice. The absence of PK parameters modification in our study might be explained by a limited production of antibodies, or a lack of effect of antibody production on the clearance of the LNC.

Altogether, PK analysis showed that, independently from the coating features, LNCs with smaller size (50 nm versus 85 nm) displayed a slightly larger V_D (+14% from PopPK, +23% from NCA respectively). A wider distribution of smaller particles has been described [34,35] and ascribed to a vascular permeability and a capability to circulate in capillaries of blood circulation system.

The effect of LNC characteristics on CL was more complex. For all coating types, elimination was decreased for LNC-85 compared to their LNC-50 nm counterparts, with V_m reduced by 26% and 18% for LNC-85 and LNC-85-SA respectively, and by 77% for LNC-85 and LNC-50 with PEG coating (Table 5). A faster elimination of smaller particles has been previously described [35,36] and ascribed to a more easily destabilized nanostructure by hepatobiliary excretion because of liver fenestration size. Interestingly, PopPK allowed to evidence a significantly decreased V_m for LNC-85 versus LNC-50, which could not be captured by NCA. This might be due to the less complete information usable in NCA, with only 34 PK profiles and 268 observations compared to 43 PK profiles and 375 observations for PopPK, and the lowest concentrations and higher clearance profiles being excluded from the analysis for methodological reasons.

Consistently, for LNCs 85 nm, PEGylation reduced CL by 46% and 48% compared to classical and LNCs with SA respectively as shown by NCA (Table 4). PEGylation also reduced V_m by 35% and 42% compared to classical and LNCs with SA respectively as shown by PopPK (Table 5). However, surprisingly, LNC-50-PEG was faster eliminated than LNC-50 and LNC-50-SA, with CL and V_m approximately doubled. PEGylation appears to have a counterproductive effect on LNC-50: another elimination route might be activated. Interestingly, a recent review from Adhikari et al. [37] reported that several authors had observed that nanoparticles theoretically too large to be filtrated by the kidney were found intact in the urine after administration in mice. Among various possible mechanisms, cell-membrane wrapping has been shown to be possible for 30 to 60 nm diameter spherical nanoparticles [38]. Moreover, caveolae-mediated endocytosis, which is more likely for 60 nm diameter nanoparticles than clathrin-mediated endocytosis [39], might also be involved. We could then hypothesize that only LNC-50-PEG, which are both small enough and certainly less opsonized, could be eliminated by this renal route, explaining their surprisingly faster elimination. However, the precise identification of the clearance routes for LNCs needs to be further studied. In addition to providing a deeper understanding of PK variability depending on LNCs characteristics, PopPK analysis of intact LNCs concentrations allowed to characterize a non-linear elimination of LNCs. Few studies have reported non-linear elimination of nanomedicines so far. Non-linearity was identified based on administration of various doses and it was observed that the clearance was dose-dependent [40,41]. Further studies will be needed to explore the mechanisms involved in the distribution and clearance of these LNCs in the body [42]. In the future, the FRET method should be valuable to compare the PK of intact nanocarrier to the PK of

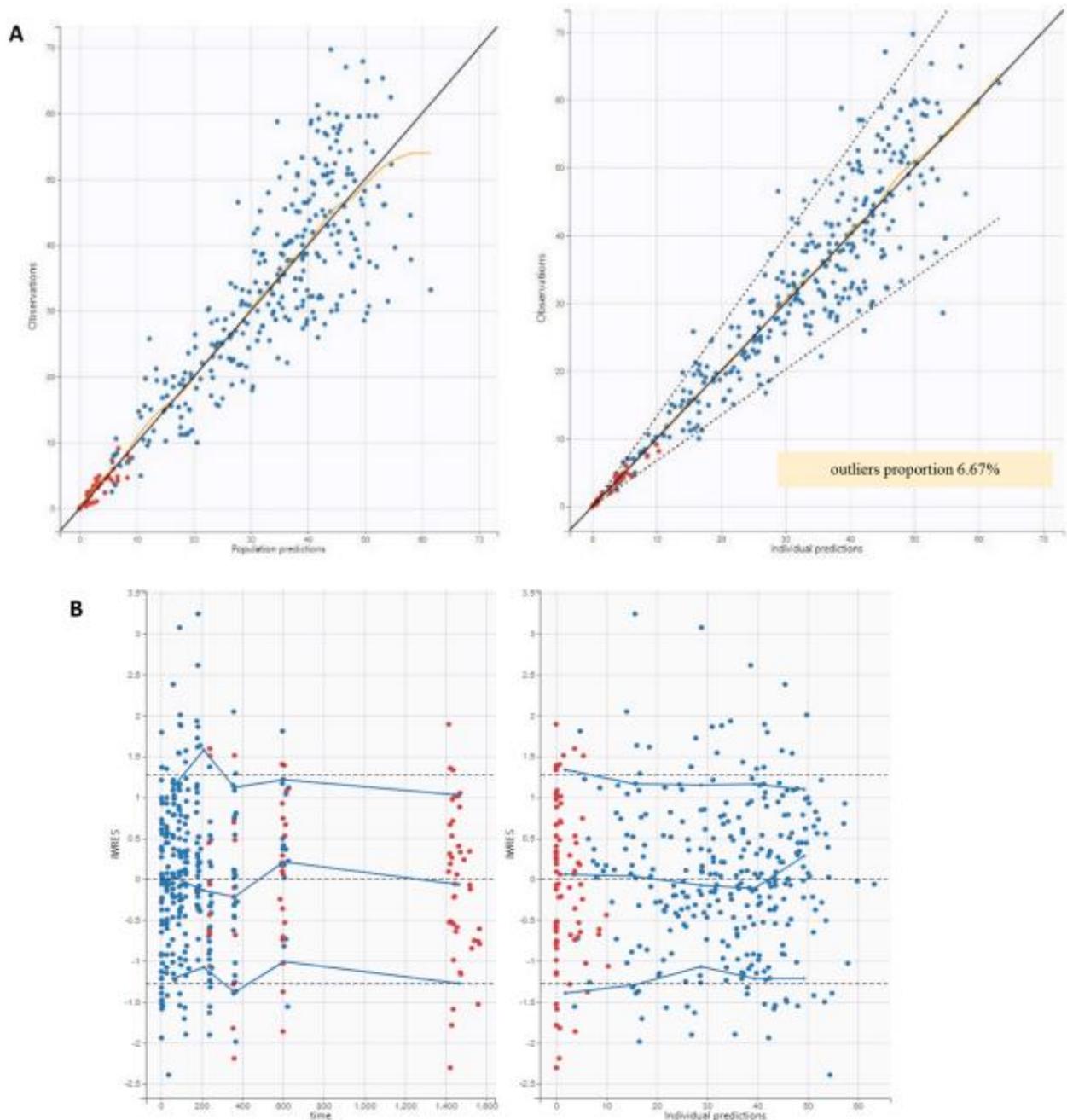


Fig. 2. Diagnostic plots of the final model with covariates. Blue and red dots respectively represent uncensored and censored observations. Concentrations expressed in T_p /mL, time in hours. A) Observations vs population predictions (left) and vs individual predictions (right). Black solid line: identity line. Dotted line: 90% prediction interval. Orange line: spline. B) Individual weighted residuals vs time (left) and vs individual predictions (right). Solid lines: empirical mean and percentiles. Dotted lines: predicted mean, 10th and 90th percentiles. Shaded areas: 90% prediction intervals of empirical mean (red) and 10th and 90th percentiles (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

encapsulated and free drug, providing lacking information on the release kinetics. Such data will be able to feed more advanced predictive PBPK models for nanomedicines [43,44].

The combination of an innovative FRET-based quantification

method specific of intact LNCs and of advanced PK modeling allowed to characterize for the first time a non-linear elimination of intact LNCs, and to evidence that PEGylation unexpectedly increased clearance of LNCs 50 nm, while decreasing the clearance of LNCs 85 nm.

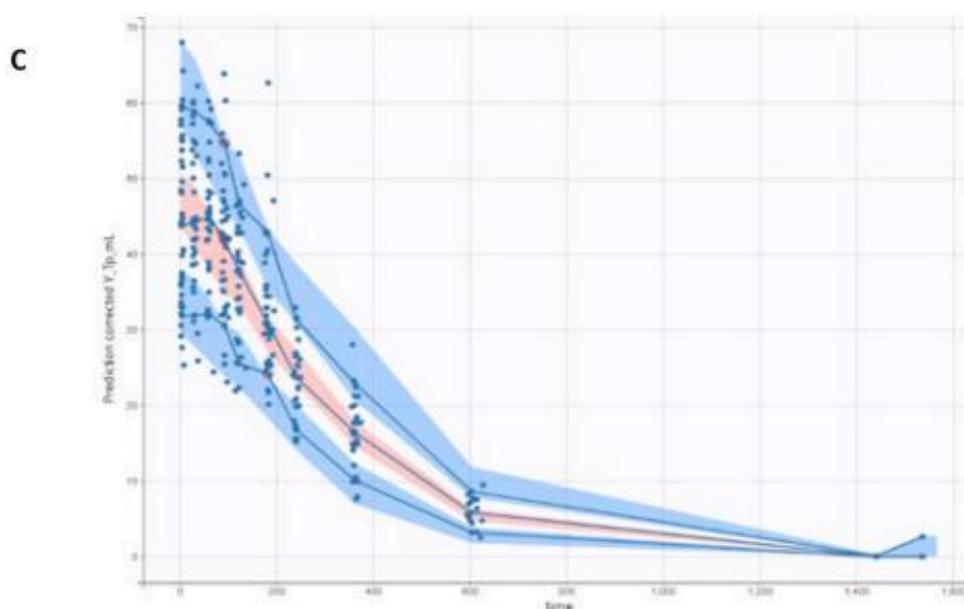


Fig. 2. (continued).

3.5. FRET-LNCs *in vitro* stability in blood

In regards of number studies among literature [18,41,46], the results of our *in vivo* fate nanoparticle after administration to rats were not as expected for LNC-50-PEG. To deeper understand this phenomenon, the *in vitro* stability of FRET-LNCs in the blood of rat was performed. A final concentration of 28.5 Tp/mL has been chosen in accordance with *in vivo* results. This particle concentration was equivalent to the peak time zero concentration of the *in vivo* study when it is considered that a rat has a theoretical total blood volume of 7.0 mL/100 g rat [47]. Fig. 3B shows a stable PR for all formulations for 10 h. Nevertheless, a significant decrease of normalized particle concentration was observed after 3 h of incubation in blood for LNC-50-PEG when no significant decline after 10 h was observed for all other formulations. (Fig. 3A). This result was correlated to the *in vivo* experiment showing a decrease in the blood concentration of LNC-50-PEG formulation after 4 h. This phenomenon was not observed in PBS, meaning that a degradation process only occurs in the blood for this type of LNCs. Consequently, the observed *in vivo* results could be, at least, partly explained by a faster degradation of LNC-50-PEG particles in blood. However, future in depth studies will be needed to confirm whether this phenomenon is the only one which can explain the faster clearance of the LNC-50-PEG.

In comparison to the literature, this result could be explained by the detection technique. The frequently used technique for quantifying the integrity of nanocarriers in the biological medium is the semi-quantitative FRET techniques [48–50]. In these studies, the PR has been interpreted like a percentage of degradation and converted to a quantity of intact nanoparticles. Thus, this method seems not adapted to measure the concentration of intact nanoparticles, but only to approximately evaluate the value of FRET ratio (DiI/DiD). This would probably explain the differences of the results from the present study using a quantitative method and the results described in the literature.

This instability of LNC-50-PEG during *in vivo* and *in vitro* experiments was surprising because the PEGylated LNCs had been reported to be more stable in human plasma (*in vitro*) than conventional LNCs due to the so-called stealth effect [20]. The PEGylation concept, which was born with Professor Davis in 1970s, gives the main advantages to enhance the residence time in the bloodstream [51]. This prolonged

circulation time has been associated with both a reduced uptake and a reduced immune response, and can induce an enhanced therapeutic efficacy [52]. However, the particles stability should be considered as another particle characteristic. The physicochemical instability can probably be explained by the PEG surface density on the LNCs. Adding PEG on the LNC-50 which already contains PEG could induce this chemical frailty [53]. Recently, Professor Kinam Park gave some issues about PEGylated nanomedicines because if many studies confirmed the advantages of circulation time, this mechanism always seems totally unknown [54]. However, adding PEG could also enhance the instability of nanostructures. As it is exposed by Battler et al., a high surface density of PEG coating induces an entropic penalty of confining and stretching PEG chains which can be compensated by electrostatic binding gain. It has been shown that this equilibrium may occur in high ionic strength solutions [55]. Consequently, plasma, which is a high salt medium, would increase the instability of PEGylated LNCs. In addition, bio-distribution and accumulation in certain organs could also be another factor contributing to the blood elimination of LNCs [34]. Future experiments should investigate these hypotheses to elaborate on the true cause behind the decreased particle stability of LNC-50-PEG in blood.

4. Conclusion

To conclude, a new quantitative FRET method was developed to describe for the first time the specific pharmacokinetic properties of intact LNCs after IV injection in rats. As shown both by NCA and PopPK results, 85 nm LNCs were less intensively distributed than their 50 nm counterparts. As expected, PEGylation reduced elimination of 85 nm LNCs, compared to other types of coating. Surprisingly, PEGylation had an opposite effect on 50 nm LNCs, with an increased elimination compared to all other LNCs. This effect can be explained by a decreased *in vitro* stability of LNC-50-PEG in blood compared to the other formulations. Finally, population analysis of the PK profiles showed that PK of intact LNCs was non-linear, which has been seldom reported so far. The present *in vitro* and *in vivo* study of six different types of LNCs with various coatings and sizes, combining an innovative FRET-based quantification method of intact LNCs with an advanced population modeling approach, allowed a major breakthrough in the understanding of the PK

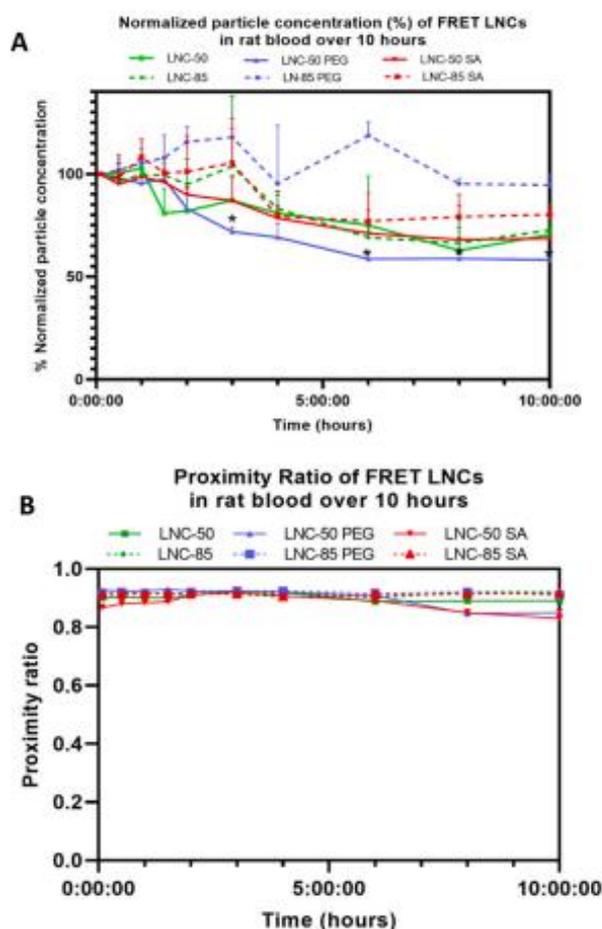


Fig. 3. Stability of FRET-LNCs in rat blood over 10 h. (A) The graph represents % normalized particle concentration (% C_0) (B) The graph represents the proximity ratio. The experiment was conducted in triplicate and reported as the arithmetic mean and 95% CI (whisker) with the significance level indicated as * $p \leq 0.05$ compared to the initial % C_0 at 5 min.

behavior of LNCs. This work will be helpful to predict the fate of various types of LNCs *in vivo* and will consequently facilitate their clinical translation. The specificity of the FRET-based quantification technique for intact nanoparticles is the corner stone of an accurate understanding of the PK of nanoparticles and will create new opportunities in the field of nanomedicines.

Funding

This work was supported by Ligue Contre le Cancer, Maine et Loire et Lolret Committee (JBP/FP -441/12.2019 and JBP/FP-223/12.2020). Anastasiia Vasylyki was funded by NANOMED EMJMD supported by the European Union and the Erasmus+ Program by the European Union in the Framework Agreement Number 2016–2057/001–001 EMJMD, No. 574439-EPP-1-FR-EPPKA1-JMD-MOB.

CRedit authorship contribution statement

Vincent Lebreton: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Norraseth Kaeokhamloed:** Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Anastasiia Vasylyki:** Investigation. **Grégory Hilaret:** Investigation. **Adélie Mellinger:** Investigation.

Jérôme Béjaud: Investigation. **Patrick Saulnier:** Supervision, Funding acquisition. **Frédéric Lagarce:** Supervision, Funding acquisition. **Florence Gattacceca:** Formal analysis, Validation, Writing – review & editing. **Samuel Legeay:** Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing – review & editing. **Emilie Roger:** Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.057>.

References

- [1] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid Nanocarriers, *Pharm. Res.* 19 (2002) 875–880, <https://doi.org/10.1023/A:1016121319668>.
- [2] E. Roger, F. Lagarce, E. Garçon, J.P. Benoit, Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis, *J. Control. Release* 140 (2009) 174–181, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.010>.
- [3] D. Urimi, M. Hellsing, N. Mahmoudi, C. Söderberg, R. Widenbring, L. Gedda, K. Edwards, T. Loftsson, N. Schipper, Structural characterization study of a lipid Nanocapsule formulation intended for drug delivery applications using small-angle scattering techniques, *Mol. Pharm.* 19 (2022) 1068–1077, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00648>.
- [4] N. Kaeokhamloed, E. Roger, J. Béjaud, N. Lauram, F. Manero, R. Perrot, C. Abbara, M. Briet, S. Legeay, New in vitro coculture model for evaluating intestinal absorption of different lipid nanocapsules, *Pharmaceutics* 13 (2021), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050595>.
- [5] S. Peltier, J.M. Oger, F. Lagarce, W. Couet, J.P. Benoit, Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1243–1250, <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0022-2>.
- [6] A. Ramadan, F. Lagarce, A. Tessier-Martreau, O. Thomas, P. Legras, I. Macchi, P. Saulnier, J.P. Benoit, Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and in vivo pharmacokinetic study, *Int. J. Nanomedicine* (2011), <https://doi.org/10.2147/IJN.S25791>.
- [7] P.E. Pensel, G. Ullio Gamboa, J. Fabbri, L. Ceballos, S. Sanchez Bruni, L.I. Alvarez, D. Allemanni, J.P. Benoit, S.D. Palma, M.C. Elisondo, Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice, *Acta Trop.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.016>.
- [8] R.O. Amara, A.A. Ramadan, R.M. El-Moslemany, M.M. Eissa, M.Z. El-Azouzi, L. K. El-Khoedagui, Praziquantel–lipid nanocapsules: an oral nanotherapeutic with potential *Schistosoma mansoni* tegumental targeting, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 4493–4505, <https://doi.org/10.2147/IJN.S167285>.
- [9] A. Singh, Y.R. Neupane, S. Shañ, B. Mangla, K. Kohli, PEGylated liposomes as an emerging therapeutic platform for oral nanomedicine in cancer therapy: in vitro and in vivo assessment, *J. Mol. Liq.* 303 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112649>.
- [10] C. Menzel, T. Holzseisen, F. Laffleur, S. Zaichik, M. Abdulkarim, M. Gumbleton, A. Bernkop-Schnürch, In vivo evaluation of an oral self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for exenatide, *J. Control. Release* 277 (2018) 165–172, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.018>.
- [11] F. Carreño, V.E. Helfer, K.J. Staudt, L.B. Olivo, K. Paese, F.S. Meyer, A. P. Herrmann, S.S. Guterres, S.M.K. Rates, I. Trocôniz, T.D. Costa, Semi-mechanistic pharmacokinetic modeling of lipid core nanocapsules: understanding quetiapine plasma and brain disposition in a neurodevelopmental animal model of schizophrenia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 375 (2020) 49–58, <https://doi.org/10.1124/JPET.120.000109>.
- [12] H. Guo, J.A. MacKay, A pharmacokinetics primer for preclinical nanomedicine research, in: *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier, 2020, pp. 109–128, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816662-8.00008-4>.
- [13] G. Yang, Y. Liu, J. Teng, C.-X. Zhao, FRET Ratiometric Nanoprobes for nanoparticle monitoring, *Biosensors* 11 (2021) 505, <https://doi.org/10.3390/bios11120505>.
- [14] E. Roger, J.C. Gimel, C. Bensley, A.S. Klymchenko, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model, *J. Control. Release* 253 (2017) 11–18, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.005>.

- [15] S. Bonnet, R. Elfatairi, F. Franconi, E. Roger, S. Legeay, Organic nanoparticle tracking during pharmacokinetic studies, *Nanomedicine*. 16 (2021), <https://doi.org/10.2217/nmm-2021-0155>, 2539–2536.
- [16] K. Partikel, R. Korte, N.C. Stein, D. Mulac, F.C. Herrmann, H.U. Humpf, K. Langer, Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 141 (2019) 70–80, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.006>.
- [17] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L.M. Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- [18] A. Vonaour, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials*. 27 (2006) 4356–4373, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.
- [19] V.N. Killin, H. Anton, N. Anton, E. Steed, J. Vermot, T.F. Vandamme, Y. Mely, A. S. Klymchenko, Counterion-enhanced cyanine dye loading into lipid nano-droplets for single-particle tracking in zebrafish, *Biomaterials*. 35 (2014) 4950–4957, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.053>.
- [20] A.L. Lainé, J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, M. Wilber, I. Texier, J.L. Coll, J.P. Benoit, C. Passirani, Conventional versus stealth lipid nanoparticles: formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring, *J. Control. Release* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.042>.
- [21] M. Toprak, Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with Butein in liposomes, *Spectrochimica Acta - part a: molecular and biomolecular, Spectroscopy*. 154 (2016) 108–113, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.10.023>.
- [22] S. Seyedi, P. Parvin, A. Jafarholi, A. Abbasi, M. Mehdinejad, A. Khorrami, M. Mehrabi, A. Moafi, Fluorescence emission quenching of RbB fluorophores in attendance of various blood type RBCs based on Stern-Volmer formalism, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 248 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119237>.
- [23] L. Vergori, E. Lauret, R. Soletti, M.C. Martinez, R. Andriantsitohaina, Low concentration of ethanol favors progenitor cell differentiation and neovascularization in high-fat diet-fed mice model, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 78 (2016) 43–51, <https://doi.org/10.1016/j.ijbc.2016.07.004>.
- [24] U.S. Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, U.S. Food and Drug Administration, 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (accessed September 6, 2022).
- [25] EMA, ICH M10 on bioanalytical method validation, European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation>, 2019 (accessed September 6, 2022).
- [26] T. Nishiya, R.T.T. Lam, F. Eng, M. Zerey, S. Lau, Mechanistic study on toxicity of positively charged liposomes containing Stearylamine to blood, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* 23 (1995) 505–512, <https://doi.org/10.3109/10731199509117966>.
- [27] A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarde, In vivo evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomedicine*. 10 (2015) 589–601, <https://doi.org/10.2217/nmm.14.124>.
- [28] M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials*. (2010), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.044>.
- [29] L. Basile, C. Passirani, N.-T. Huyh, J. Béjaud, J.-P. Benoit, G. Puglisi, R. Pignatello, Serum-stable, long-circulating paclitaxel-loaded colloidal carriers decorated with a new amphiphilic PEG derivative, *Int. J. Pharm.* 426 (2012) 231–238, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.038>.
- [30] M. Ichihara, T. Shimizu, A. Imoto, Y. Hashiguchi, Y. Uehara, T. Ishida, H. Kiwada, Anti-PEG IgM response against PEGylated liposomes in mice and rats, *Pharmaceutics*. 3 (2011) 1–11, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010001>.
- [31] T. Ishida, H. Kiwada, Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 56–62, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.005>.
- [32] Y. Hashimoto, T. Shimizu, A.S.A. Lila, T. Ishida, H. Kiwada, Relationship between the concentration of anti-polyethylene glycol (PEG) immunoglobulin M (IgM) and the intensity of the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon against PEGylated liposomes in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 38 (2015) 417–424, <https://doi.org/10.1248/bpb.14-00653>.
- [33] C. Li, J. Cao, Y. Wang, X. Zhao, C. Deng, N. Wei, J. Yang, J. Cui, Accelerated blood clearance of pegylated liposomal topotecan: influence of polyethylene glycol grafting density and animal species, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3864–3876, <https://doi.org/10.1002/jps.23254>.
- [34] S. Hirsjärvi, L. Sancey, S. Dufort, C. Belloche, C. Vanpouille-Box, E. Garçon, J.-L. Coll, F. Hindré, J.-P. Benoit, Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 594–600, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.057>.
- [35] H. Lee, H. Fonge, B. Hoang, R.M. Reilly, C. Allen, The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1195–1208, <https://doi.org/10.1021/mp100038h>.
- [36] S. Hirsjärvi, S. Dufort, J. Gravier, I. Texier, Q. Yan, J. Bibette, L. Sancey, V. Josseland, C. Passirani, J.P. Benoit, J.L. Coll, 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* (2013), <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.08.005>.
- [37] C.F. Adhikari, S.H. Cheung, Y.H. Lin, S.H. Wu, Atypical renal clearance of nanoparticles larger than the kidney filtration threshold, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms222011182>.
- [38] N. Hoshiyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine*. 11 (2016) 673–692, <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>.
- [39] R.M. Pearson, H.J. Hsu, J. Bugno, S. Hong, Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery, *MRS Bull.* 39 (2014) 227–237, <https://doi.org/10.1557/mrs.2014.9>.
- [40] A. Gabizon, D. Tzemach, L. Mak, M. Bronstein, A.T. Horowitz, Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of Pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models, *J. Drug Target.* 10 (2002) 539–548, <https://doi.org/10.1080/1061186021000072447>.
- [41] H. Wu, J.R. Infante, V.L. Keedy, S.F. Jones, E. Chan, J.C. Bendell, W. Lee, B. A. Zamboni, S. Ikeda, H. Kodaira, M.L. Rothenberg, H.A. Burris, W.C. Zamboni, Population pharmacokinetics of Pegylated liposomal CPT-11 (IHL-305) in patients with advanced solid tumors, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (2013) 2073–2081, <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1580-y>.
- [42] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanizadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipid nanocarrier systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [43] D. Yuan, H. He, Y. Wu, J. Fan, Y. Cao, Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 108 (2019) 58–72, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.037>.
- [44] J.H. Byun, D.G. Han, H.J. Cho, I.S. Yoon, I.H. Jung, Recent advances in physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic models for anticancer nanomedicines, *Arch. Pharm. Res.* 43 (2020) 80–99, <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01209-2>.
- [45] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of Pegylated liposomal doxorubicin, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 419–436, <https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002>.
- [46] R.J. Probst, J.M. Lim, D.N. Bird, G.L. Pole, A.K. Sato, J.R. Claybaugh, Gender differences in the blood volume of conscious Sprague-Dawley rats, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 45 (2006) 49–52.
- [47] J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J.P. Benoit, J.L. Coll, I. Texier, FRET imaging approaches for in vitro and in vivo characterization of synthetic lipid nanoparticles, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 3133–3144, <https://doi.org/10.1021/mp500329z>.
- [48] R. Bouchaala, L. Mercier, B. Andreiuk, Y. Mely, T. Vandamme, N. Anton, J. G. Goetz, A.S. Klymchenko, Integrity of lipid nanocarriers in bloodstream and tumor quantified by near-infrared ratiometric FRET imaging in living mice, *J. Control. Release* 236 (2016) 57–67, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.027>.
- [49] F. Cayre, S. Mura, B. Andreiuk, D. Sobot, S. Gouazon, D. Desmaële, A. S. Klymchenko, P. Couvreur, In vivo FRET imaging to predict the risk associated with hepatic accumulation of squalene-based prodrug nanoparticles, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018), <https://doi.org/10.1002/adhm.201700830>.
- [50] F.F. Davis, The origin of pegnology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 457–458, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00021-2).
- [51] K. Park, Impact of anti-PEG antibodies on PEGylated nanoparticles fate in vivo, *J. Control. Release* 287 (2018) 257, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.014>.
- [52] L.A.S. Bahari, H. Hamishehkar, The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A comparative literature review, *Adv. Pharm. Bull.* 6 (2016) 143–151, <https://doi.org/10.1517/apb.2016.021>.
- [53] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: from 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- [54] T.M. Blättler, S. Pasche, M. Textor, H.J. Griesser, High salt stability and protein resistance of poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) copolymers covalently immobilized via aldehyde plasma polymer interlayers on inorganic and polymeric substrates, *Langmuir*. 22 (2006) 5760–5769, <https://doi.org/10.1021/la0602766>.

Chapitre 4. Etude de l'élimination rénale des NCLs-FRET

Avant-propos

A la suite de l'étude pharmacocinétique des NCLs- FRET, les résultats obtenus ont conduit ce travail de thèse à faire l'étude spécifique de l'élimination rénale chez le rat après injection intraveineuse. La même méthodologie quantitative FRET a été utilisée. En effet, afin de bien comprendre la pharmacocinétique de ces NCLs, il semblait indispensable de compléter ce travail par l'étude de l'élimination urinaire de ces nanovecteurs.

Elimination study of intact LNCs after rat intravenous administration

Vincent Lebreton^{1,2,*}, Samuel Legeay¹, Clara Rapenne¹, Patrick Saulnier^{1,2}, Frédéric Lagarce^{1,2}.

¹ MINT, INSERM U1066, CNRS 6021, UNIV Angers, SFR-ICAT 4208, Angers, France.

² CHU Angers, 49033 Angers, France

* Corresponding author: Vincent Lebreton

Abstract

The current challenge on the development of nanomedicines is to better understand their pharmacokinetic profiles. Some of our previous pharmacokinetic studies of intact lipid nanocapsules (LNCs) permit to characterize size dependent distribution and coating dependent elimination. Surprisingly, a faster elimination of LNCs 50 nm with PEG as compared to other formulations has been observed. This present study investigated the elimination of four different *Förster resonance energy transfer* LNCs (FRET-LNCs) of two sizes (50 and 85 nm) and of 2 coating types (none, DSPE-mPEG 2000). To understand specifically elimination phase, FRET-LNCs in urine of rats were collected (between 60 to 1440 min) at different time points after intravenous administration. Quantitative analysis using FRET and NTA was performed to measure intact FRET-LNCs in urine. Finally, this study confirmed that the elimination of FRET LNC is probably due to liver tissue interaction and not to renal elimination.

Keywords: Pharmacokinetics, Lipid nanocapsules; Renal elimination; FRET; drug delivery

1. Introduction

Nanomedicine is one of the most promising inventions of the 20st century [1]. These nanomedicines are nowadays widely developed as new drug delivery system (DDS) in cancer therapy for the diagnosis, or for the targeted delivery of therapeutics. Nanoformulations permit to overcome poor solubility or low bioavailability of active pharmaceutical ingredients (API) [2,3]. The development of these new DDS is rapidly growing with an increasing trend of NP-based therapies being approved by governmental authorities. However, the *in vivo* experimentation in

animal models and the first phase of clinical trials [4–6], are rarely confirmed because of biological, technological and clinical limitations to achieve consistent clinical impact [7]. Indeed, after intravenous administration, the first interactions start with serum proteins circulating in blood which become attached onto the surface of the NPs to form a protein corona. This results in a transformation from a physico-chemical identity to a biological identity of NPs [8,9]. After this first step, interactions continue with organs and can be categorized such as NP-liver, NP-kidney or NP-tumor interactions in case of cancer [10–13]. These interactions, particularly with liver and kidney, are responsible for nanoparticle clearance from the body. Efficiency of NPs seems to be linked to their clearance rate from the body and most of the published data reported a rapid liver elimination after injection in the bloodstream [14,15]. As largely described by numerous publications, the liver represents one of the major barriers for drug delivery of NPs [14]. Indeed, it has been recently published that NPs were metabolized using specific hepatic pathways [16], because liver-NP interactions were a consequence of the opsonization phenomenon [8,9]. The protein corona that covers NPs allows a recognition by the mononuclear phagocyte system (MPS) that leads to a cellular uptake [9,10]. However, if the majority of NPs pharmacokinetic studies have demonstrated liver elimination of NPs [16], the kidneys are the second major organs responsible for their clearance by blood filtration. Compared to the liver elimination pathway, the renal excretion permits to quickly reduce the potential toxicity of some NPs such as inorganic NPs composed by heavy and noble metals or quantum dots [17–19] especially if their size is below 10 nm [20].

Actually, the pore size limit of the glomerular filtration membrane (GFM) in kidneys leads to a size threshold for NPs renal clearance [13,15]. Despite this threshold, there is growing evidence that NPs larger than filtration cut-off GFM architecture are excreted in urine [21]. This mainly concerns the inorganic NPs as described on two recent reviews by Adhipandito *et al.* and Naumenko *et al.* [21,22]. These data seem to indicate that NPs can avoid the degradation and cross throughout the GFM. In this regards, one of our recent *in vivo* experimentation has found a faster clearance of one type NPs, the Lipid Nano Capsules (LNC) 50 nm with PolyEthylenGlycol (PEG) coating (LNC-50-PEG) compared to other LNCs after IV injection on rats [23].

In line with these data, the aim of this study was to investigate the elimination pathway of intact LNCs after IV administration in rats using fluorescence resonance and energy transfer (FRET) method of quantification already developed in our lab for previous PK studies [23–25]. In this context, the *in vivo* fate of four different LNC formulations containing specific dyes for FRET, has been studied. Those formulations will be called FRET-LNCs along this paper. Firstly, a stability study in rat urine has been performed after adaptation of our blood extraction and quantification method to achieve an efficient FRET signal [23]. Then, elimination of intact LNCs was studied to better understand the pharmacokinetic properties of LNCs depending on their size and coating.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lipoid®S75-3 (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine mixture) was purchased from Lipoid GmbH (Steinhausen, Switzerland). Kolliphor®HS-15 (PEG 660 and polyethylene glycol 660hydroxystearate mixture) and DSPE-mPEG(2000)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000](ammonium salt)) were respectively purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany) and Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Captex® 8000 (glyceryl tricaprilate) was a gift from Abitec Corporation (Columbus, OH, USA). DiI (1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) and DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-dicarbocyanine perchlorate) and Histopaque-1083 were purchased from Thermofisher (Villebon-sur-Yvette, France). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from PAA Laboratories (Toronto, ON, Canada) and sodium chloride was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q® Advantage A10 System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Polycarbonate centrifuge tube size 7 × 20 mm (reference 343775) was purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France). Heparin sodium 5000 UI/mL was purchased from Panpharma (Luitré, France).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation and characterization of LNCs co-loaded with DiI- and DiD-TPB (FRET-LNCs)

Firstly, the fluorophore probes (DiI and DiD-tetraphenylborate (TPB)) were synthesized using the method previously described [26,27]. Four formulations of FRET-LNCs, which are LNCs with two co-loaded fluorophores DiI-TPB and DiD-TPB with different sizes: 50 nm (LNC-50) and 85 nm (LNC-85) and surface modifications DSPE-mPEG-2000 (PEG) (LNC-50-PEG; LNC-85-PEG). Then, FRET-LNCs were prepared according to the original phase inversion process described by Heurtault et al.[28]. Briefly, premixed Captex®8000 with DiI and DiD, and Lipoid®S75-3 were mixed and heated at 85°C. Kolliphor®HS-15, NaCl and water were then added and homogenized under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 70 and 90°C were then carried out and followed by an irreversible shock induced by dilution with 2°C purified water added to the mixture at 78°C. Slow magnetic stirring was then applied to the suspension of LNCs for 5 min at room temperature. Formulations are shown on **Table 1**.

Table 1. Composition of FRET-LNCs

Compositions	LNC-50	LNC-50-PEG	LNC-85	LNC-85-PEG
Captex® 8000 (2%w/w DiI-TPB)	5.5	5.5	8.5	8.5
Captex® 8000 (2%w/w DiD-TPB)	5.5	5.5	8.5	8.5
Lipoid® S75-3	0.7	0.7	0.7	0.7
Kolliphor® HS-15	11.5	11.5	9.3	9.3
Purified water	21.3	21.3	17.5	17.5
DSPE-mPEG-2000	-	0.6	-	0.6
NaCl	0.8	0.8	0.8	0.8
Purified water (2° C)	54.7	54.7	54.7	54.7

LNC-50: LNC with a target size of 50 nm; LNC-50-PEG: LNC with DSPE-mPEG and a target size of 50 nm; LNC-85: LNC with a target size of 85 nm; LNC-85-PEG: LNC with DSPE-mPEG and a target size of 85 nm;

Then, FRET-LNCs were characterized for size, zeta potential (ZP) proximity ratio (PR) and concentration determination. First, the mean size (nm) and particle concentration (particle/mL) measurement were performed with nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NanoSight® NS300 (Malvern Instrument, Worcestershire, UK). After dilution in ultrapure water (5×10^5 to 1×10^6 factor), FRET-LNCs were injected into the sample chamber using a 1 mL syringe pump with a flow rate of 3-4 μ L per second. The final measure was given after video sequences capture over 60 seconds (5 replicates) and analyzed by NTA analytical software version 3.2. Then, ZP of the FRET-LNCs was determined by laser Doppler electrophoresis using Zetasizer® Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments SA, Worcestershire, the UK) diluted by factor 1×10^2 . Finally, the PR of each formulation was determined using fluorescence analysis, it permitted to demonstrate integrity of NPs. With the FluoroMax® 4 spectrophotometer (Horiba Jobin Yvon Inc., Piscataway, NJ, USA), the fluorescence emission spectra of FRET-LNCs were recorded. The FRET-LNCs nanoformulations were diluted by a factor 3×10^3 . The emission spectra were collected after excitation (548 nm) from 530 to 720 nm, with an incrementation of 1 nm. The data were recorded for the maximum intensity of FRET donor and acceptor at 569 ± 5 nm and 675 ± 5 nm, respectively. To calculate the PR the following equation has been applied $PR = A/(A+D)$, where A and D are the maximum fluorescence intensity of the aforementioned FRET acceptor and donor signals, respectively.

2.2.2. Quantification FRET-LNCs in urine

Extraction from rat urine

As previously published by our team, the intact FRET-LNCs were firstly extracted from the biological media with the same sucrose density gradient centrifugation technique [23]. For this *in vivo* experimentation, 100 μL of urine sample were collected and immediately mixed with 100 μL of Histopaque®-1083 in the polycarbonate centrifuge tube and kept in ice. Then, the tube was put in Optima MAX-UP Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Villepinte, France) with the fixed-angle rotor TLA-100 (Beckmann Coulter, Villepinte, France) during 2 hours with a relative centrifugal force of $4 \times 10^5 \text{ G}$ at 25°C . Finally, a fixed volume of supernatant (75 μL) was collected and mixed with ultrapure water (225 μL). The FRET signal of each sample was measured and the PR was calculated. Finally, using the equation derived from the calibration curve the particle concentration was calculated.

Particle Integrity Analysis

For each kind of FRET-LNCs at each time point, the mean PR was calculated. In a previous study, the PR where the FRET-LNCs displayed full integrity has been statistically determined using equivalent test [23]. If the mean PR at a time point was ≥ 0.80 , the FRET-LNCs were considered intact [23]. In this case, they can be quantified as urine particle concentration by the calibration curve.

Quantitative Calibration Curve

For the standard solutions, seven dilutions of FRET-LNCs were prepared with the dilution factors ranging from 1×10^3 to 5×10^4 and then spiked into urine or PBS. The initial particle concentration of the formulation had been measured in the characterization step by NTA. Maximum FRET acceptor emission intensities of the spiked standard were measured ($675 \pm 5 \text{ nm}$) and plotted as a function of particle concentration. The linearity of the fitting curve was estimated by the coefficient of determination (R^2) with acceptance criteria of $R^2 \geq 0.980$. Due to the interference from background fluorescent noise at low concentration, the standard concentration with $\text{PR} < 0.80$ was excluded from the calibration curve.

All calibration curves were prepared in urine (or PBS for the *in vitro* experiment). It has been decided to use the same biological matrix to exclude matrix effect in accordance with the ICH and FDA guidelines [29,30].

2.2.3. *In vitro* stability study of FRET-LNCs

FRET-LNCs were diluted at a fixed final concentration of 28.5 Teraparticles/mL (Teraparticles or $\text{Tp} = 10^{12}$ particles) in fresh rat urine which was obtained after putting naïve rat in metabolic cage (Techniplast S.p.A, Buguggiate, Italia). The mixture was incubated at 37°C with gentle stirring. Samples of 100 μL were collected at times 5,30,60,90,120, 180, 240, 360, 1440 min

and added to 100 µL of Histopaque®-1083 in centrifuge polycarbonate tubes (Beckman-coulter, Brea, California, USA). Then, samples have been centrifuged for 2 hours at 400 000 g at 25°C. At the end, 75 µL of the supernatant were immediately collected and mixed with 225 µL of ultrapure water. Particle concentration of intact FRET-LNCs was quantified as explained below (2.2.5). A control group in PBS was performed with the same experimental conditions.

The concentrations were normalized with the first time point and reported as following calculation $\%C_N = (C_t/C_5) \times 100\%$ where $\%C_N$ is the percentage normalized particle concentration, C_t is the particle concentration at each time point, and C_5 is the initial particle concentration at the time 5 minutes. The integrity of extracted LNCs has been monitored for each sample. Finally, the mean PR of the sample from each time point ($n = 3$) has been statistically compared.

2.2.4. Animal studies

Sprague-Dawley male rats ($n = 16$) were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). The rats were aged 9 ± 0.5 weeks, weighted 467 ± 57 g and received a standard laboratory diet and water *ad libitum*. Protocol on animals was designed according to the EU Directive 2010/63/EU and was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiment of the Pays de la Loire, France (APAFIS #2020092411444021). All rats were housed with controlled room temperature (22°C) and dark-light cycle (12h). The rat urine was collected at times 60, 120, 240, 360, 480, 600 and 1440 min using metabolic cage (Techniplast S.p.A, Buguggiate, Italia). The urine samples were kept in ice prior to FRET analysis. Urine volume was measured for time point collection.

2.2.5. IV administration of FRET-LNCs

Four FRET-LNCs formulations were injected intravenously way *via* dorsal penile vein with a fixed dose of 2×10^{14} particles/100 g rat. Four samples of 150 µL of blood were collected in tail vein at 5, 30, 120 and 1440 min after administration. Thirty minutes after IV injection of FRET-LNCs and just after the 30 min blood time collection point, rats have been put on metabolic cage for urine collection from 60 to 1440 min. Particle concentration of intact FRET-LNCs was quantified in blood and urine sampling as explained previously.

2.3. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the software Prism GraphPad (version 9.3.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The statistical significance was assessed for a p -value under 0.05.

In vitro Particle Stability

The particle concentration as %C_N from each time point was statistically compared to the initial %C_N at 5 minutes (time factor) and between blood vs PBS (media factor) by repeated-measures using two-way ANOVA.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of LNCs formulations

Four formulations were prepared following our previous study [31]. The FRET method has been chosen to follow biodistribution of intact LNCs [28]. As shown on **Table 2**, the obtained formulations were close to the hydrodynamic diameter target size. Zeta potential of PEG formulations was found negative in contrast to non-modified LNCs. For all formulations, the PR was close to 0.9 demonstrating the full integrity of FRET-LNCs [32].

Finally, the particle concentration ranged around 3×10^2 Tp/mL, except for LNC-50-PEG. Indeed, LNC-50-PEG had higher particle concentration (10.1×10^2 Tp/mL), than all the other formulations. For the following *in vitro* stability study and *in vivo* experiment, this difference has been taken into account.

Table 2. FRET-LNCs formulations characteristics

Formulations	Particle Size (nm)	Zeta Potential (mV)	FRET Proximity Ratio (PR)	Particle Concentration (10^2 Tp/mL)
LNC-50	49.3	4.2	0.90	3.2
LNC-50-PEG	47.5	-7.1	0.89	10.1
LNC-85	84.8	16.9	0.90	2.5
LNC-85-PEG	78.6	-1.3	0.89	3.3

$T_p = 10^{12}$ particles (Teraparticle).

3.2 In vitro stability study of LNCs in urine of rats

To make sure that FRET-LNCs were stable in urine during *in vivo* elimination study in the bladder and in backer with metabolic cage collection, it has been decided to perform an *in vitro* stability study for 24 hours. The final particle concentration in urine has been adjusted to 28.5 Tp/mL supposing that all LNCs were eliminated by kidney filtration. This particle concentration was equivalent to the peak time zero concentration of the *in vivo* study when it is considered that a rat has a theoretical total blood volume of 7.0 mL/100 g rat [33].

Results are shown on **Figure 1**. All formulations were stable during 24 hours in urine at 25°C, no statistical difference has been observed between normalized particle concentration and initial particle concentration. The normalized particle concentration was not statistically different to particle concentration PBS media. In contrast to our previous *in vitro* experiment in blood, the LNC-50 PEG remains stable in urine while that was not the case in blood. Indeed, as it has been recently described, all formulations were stable in blood during 10 hours of incubation excepted for LNC-50-PEG, for which a significant decrease of particle concentration has been observed after 3 hours [23].

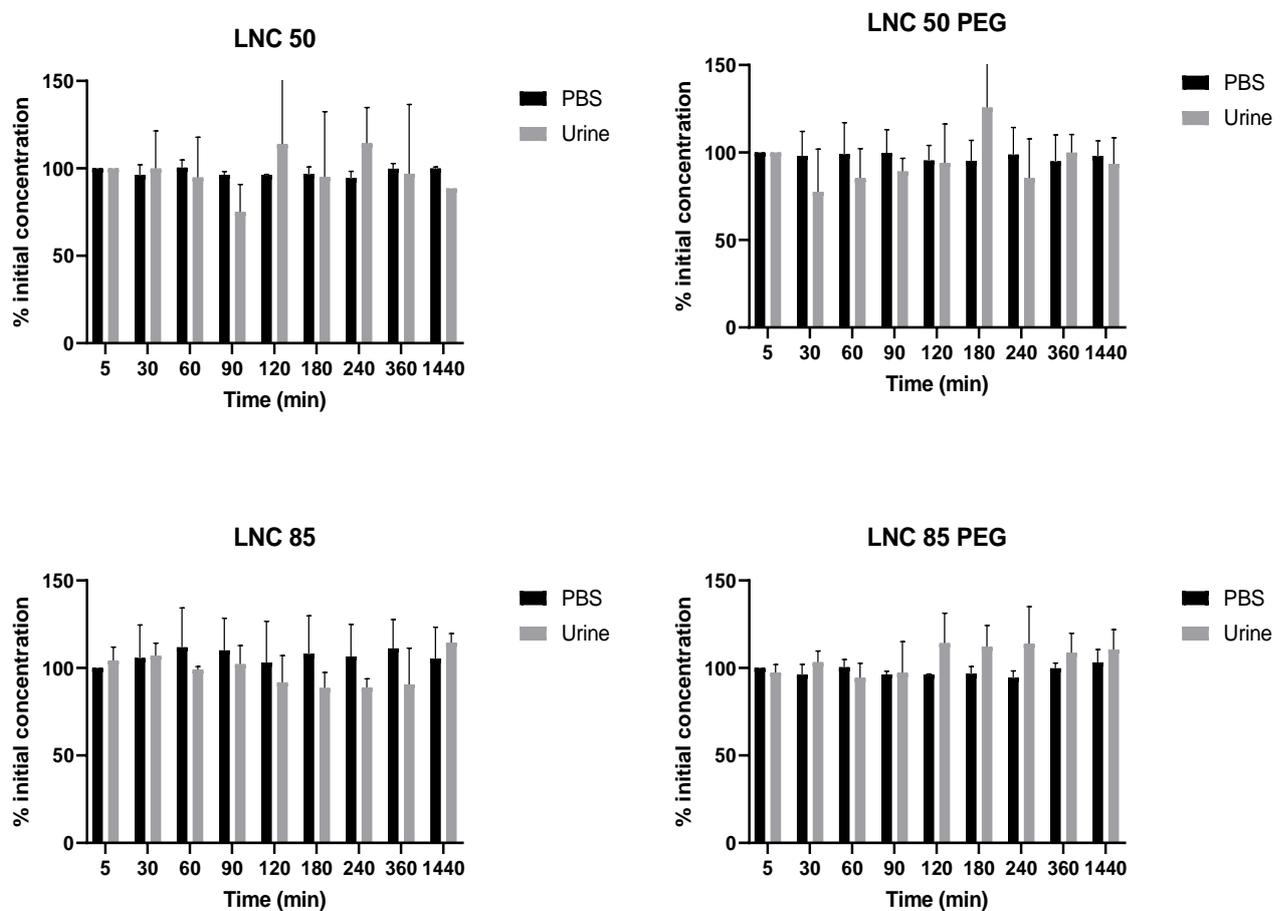


Figure 1. Stability of FRET-LNCs in rat urine over 24 hours. The diagram represents % normalized particle concentration ($\%C_N$) in urine and PBS for each FRET-LNCs subtype. The experiment was conducted in triplicate and reported as the arithmetic mean and standard deviation (whisker).

3.3 Blood concentrations and renal elimination of LNCs

After the preliminary *in vitro* study to ensure that FRET-LNCs were stable in urine, an *in vivo* experiment of renal elimination was performed. After intravenous administration of a weight adjusted dose (20 Tp/100 g of rat), the particle concentration of FRET-LNCs was quantified if PR was higher than 0.80[23].

Results of blood sampling were presented on **Figure 2**. The particle concentration vs time profiles were close to what we found in a previous study [23]. Like this first previous work, the faster elimination of blood LNC-50-PEG and the longer blood circulation time of LNC-85-PEG were also observed. Because it was decided to study renal elimination, the blood sampling has been limited. In consequence, the pharmacokinetic comparison should be limited to the observational curves and particles concentrations.

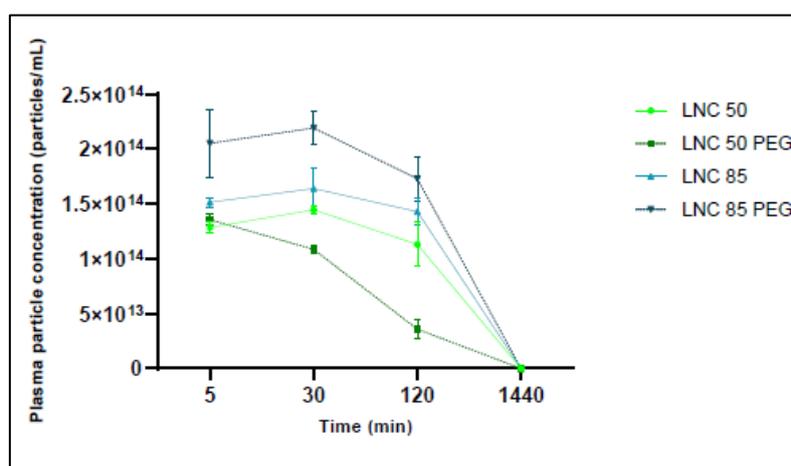


Figure 2. Plasma particle concentration vs. time profile of 50-nm and 85-nm FRET-LNCs following IV bolus. Data is reported as the arithmetic mean and standard deviation (whisker).

In contrast to renal elimination, particle concentrations in rat urine on sampling 30 to 1440 min after intravenous administration were null for each tested formulation. It has not been possible to fully quantify intact FRET-LNCs because each calculated PR were under the limit of 0.67. These results mean that FRET-LNCs were not intact and thus no quantifiable by our calibration curves, which were performed with standard PR > 0.67. Our hypothesis of faster blood elimination of intact LNC-PEG-50 nm is thus not explained by renal excretion. These results showed that FRET-LNCs would certainly respect the classical way of liver elimination. Although renal nanomedicine elimination is less studied than liver elimination, threshold of renal filtration is thought to be around 10 nm, supposing that larger NPs cannot be cleared by the glomerulus membrane [17,22]. Nevertheless, it has been demonstrated that NPs could reach urine with bypass of glomerulus membrane and cross the proximal convoluted tubules by transcytosis mechanism

[21,34]. This was however not observed with our FRET-LNCs, confirming that neither renal filtration nor secretion occurred with LNCs. As it has been reported by Adhipandito *et al.*, the molecular mechanisms of renal elimination are unknown for larger NPs. Also, as it has been reported by Du *et al.* that NPs with hydrodynamic diameter > 6 nm passed through endothelium and stayed blocked and accumulated in the mesangium where they were degraded into small fragments, resulting in a renal clearance [13]. Moreover, these large NPs can also be endocytosed by endothelial cells of the peritubular capillaries, and accumulate in this compartment to finally be released in urine [13,17]. Regarding these data, even if LNCs were not eliminated under intact formulation in urine, we cannot exclude that these formulations might be degraded in kidneys.

To explain the faster blood elimination of LNC-50-PEG, in contrast to others LNCs formulations, liver elimination pathway should be explored. As it has been described in most previous work, NPs after administration usually accumulate in the liver tissue [10,14]. Even if the transport mechanism is not totally understood, the affinity for this organ seems directly linked to physico-chemical characteristics (size, shape, surface functionalization) [14,20]. The liver endothelium had fenestration pore size between 50 to 100 nm which allows clearance of NPs within this size range or lower [35]. In addition, almost all NPs are not directly metabolized by liver tissue but eliminated by the MPS also known as the reticuloendothelial system (RES) [36]. Indeed, NPs on the blood compartment immediately cause an opsonization phenomenon by circulating proteins. These were recognized by specific cells of MPS, representing by the Kupffer cells in the liver to eliminate NPs and would explain, in part, the faster blood elimination of LNC-50-PEG [10,16].

Additionally, it has been described that the surface functionalization such as PEG addition can modify the blood clearance [37,38]. The properties of NPs surface modify the corona protein formation and thus the elimination of NPs [39,40]. It is clear that NPs bio-interactions and therefore their biodistribution are affected by their protein corona [41]. In addition, the corona protein formation may be different for LNC-50-PEG formulations than for others. Pegylation and surface curvature are known to modify the protein adsorption on NPs surface [39,42]. As we previously observed in another study, it may be possible that LNC-50-PEG induce a specific corona protein which increases opsonization (unpublished data). That could be responsible for uptake and sequestration of NPs by the MPS.

This uptake rate is strongly dependent on NPs properties and particularly in surface functionalization [14]. Moreover, Wei *et al.* reported that PEGs or its impurities can induce an unstable formulation *in vivo* notably because of enzymatic degradation [43]. In addition to the likely difference on the protein corona formation, this impurities-induced degradation would also be responsible for the increased blood clearance of LNC-50-PEG compared to others tested formulations.

4. Conclusion

In summary, no FRET-LNCs formulations were cleared as native structure in urine. The faster blood elimination of LNC 50 nm with PEG addition has not been explained by a renal excretion. Renal elimination mechanisms need to be thoroughly investigated for all new nanomedicine formulations to better characterize their fate *in vivo*. Indeed, fundamental understanding of the physiological challenges of nanomedicines, and notably on their elimination pathways, will advance more effective delivery strategies. That will constitute a milestone to the future pharmacokinetic studies of LNCs in the goal of future success in nanomedicines translation into the clinic.

Funding

This work was supported by Ligue contre le cancer Maine et Loire et Loiret Comitee (JPB/FP - 441/12.2019 NANOPK PROJECT).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- [2] F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Roointan, M. Karimi, M.R. Hamblin, Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities, *Nanomedicine.* 14 (2019) 93–126. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>.
- [3] F.L.O. Da Silva, M.B.D.F. Marques, K.C. Kato, G. Carneiro, Nanonization techniques to overcome poor water-solubility with drugs, *Expert Opin. Drug Discov.* 15 (2020) 853–864. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1750591>.
- [4] A.P. Nikalje, *Nanotechnology and its Applications in Medicine*, Med. Chem. (Los. Angeles). 5 (2015). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>.
- [5] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release.* 342 (2022) 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- [6] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic: An update, *Bioeng. Transl. Med.* 4 (2019). <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>.
- [7] S. Hua, M.B.C. de Matos, J.M. Metselaar, G. Storm, Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: Pathways for translational development and commercialization, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00790>.
- [8] G. Caracciolo, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.011>.
- [9] S.J. Park, Protein–nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 15 (2020) 5783–5802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254808>.
- [10] Y.-N. Zhang, W. Poon, A.J. Tavares, I.D. McGilvray, W.C.W. Chan, Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination, *J. Control. Release.* 240 (2016) 332–348. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.01.020>.
- [11] Y. Huai, M.N. Hossen, S. Wilhelm, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, Nanoparticle Interactions with the Tumor Microenvironment, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 2247–2263. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00448>.
- [12] Y. Huang, J. Wang, K. Jiang, E.J. Chung, Improving kidney targeting: The influence of nanoparticle physicochemical properties on kidney interactions, *J. Control. Release.* 334 (2021) 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.04.016>.
- [13] B. Du, M. Yu, J. Zheng, Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys, *Nat. Rev. Mater.* 3 (2018) 358–374. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0038-3>.
- [14] L. Baboci, S. Capolla, F. Di Cintio, F. Colombo, P. Mauro, M. Dal Bo, M. Argenziano, R. Cavalli, G. Toffoli, P. Macor, The Dual Role of the Liver in Nanomedicine as an Actor in the Elimination of Nanostructures or a Therapeutic Target, *J. Oncol.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/4638192>.
- [15] W. Poon, Y.N. Zhang, B. Ouyang, B.R. Kingston, J.L.Y. Wu, S. Wilhelm, W.C.W. Chan, Elimination Pathways of Nanoparticles, *ACS Nano.* 13 (2019) 5785–5798. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.9b01383>.
- [16] V. Lebreton, S. Legeay, P. Saulnier, F. Lagarce, Specificity of pharmacokinetic modeling of nanomedicines, *Drug Discov. Today.* 26 (2021) 2259–2268. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.04.017>.

- [17] C. Peng, Y. Huang, J. Zheng, Renal clearable nanocarriers: Overcoming the physiological barriers for precise drug delivery and clearance, *J. Control. Release.* 322 (2020) 64–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.020>.
- [18] H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B. Itty Ipe, M.G. Bawendi, J. V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1165–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>.
- [19] M. Yu, J. Zheng, Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles, *ACS Nano.* 9 (2015) 6655–6674. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01320>.
- [20] M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats, *Nanomedicine.* 3 (2008) 703–717. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>.
- [21] V. Naumenko, A. Nikitin, K. Kapitanova, P. Melnikov, S. Vodopyanov, A. Garanina, M. Valikhov, A. Ilyasov, D. Vishnevskiy, A. Markov, S. Golyshev, D. Zhukov, I. Alieva, M. Abakumov, V. Chekhonin, A. Majouga, Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney, *J. Control. Release.* 307 (2019) 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.026>.
- [22] C.F. Adhipandito, S.H. Cheung, Y.H. Lin, S.H. Wu, Atypical renal clearance of nanoparticles larger than the kidney filtration threshold, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222011182>.
- [23] V. Lebreton, N. Kaeokhamloed, A. Vasylaki, G. Hilairret, A. Mellinger, J. Béjaud, P. Saulnier, F. Lagarce, F. Gattacceca, S. Legeay, E. Roger, Pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules using new quantitative FRET technique, *J. Control. Release.* 351 (2022) 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.057>.
- [24] E. Roger, J.C. Gimel, C. Bensley, A.S. Klymchenko, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model, *J. Control. Release.* 253 (2017) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.005>.
- [25] A.C. Groo, P. Saulnier, J.C. Gimel, J. Gravier, C. Ailhas, J.P. Benoit, F. Lagarce, Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery, *Int. J. Nanomedicine.* (2013). <https://doi.org/10.2147/IJN.S51837>.
- [26] H. Wu, J.R. Infante, V.L. Keedy, S.F. Jones, E. Chan, J.C. Bendell, W. Lee, B.A. Zamboni, S. Ikeda, H. Kodaira, M.L. Rothenberg, H.A. Burris, W.C. Zamboni, Population pharmacokinetics of PEGylated liposomal CPT-11 (IHL-305) in patients with advanced solid tumors, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (2013) 2073–2081. <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1580-y>.
- [27] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials.* 27 (2006) 4356–4373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.
- [28] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers, 2002.
- [29] US Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations, US Food and Drug Administration 2018. [http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances\(accessed spetember 6,2022\)](http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances(accessed%20spetember%206,2022))
- [30] International Conference on Harmonization, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 1994.
- [31] N. Kaeokhamloed, E. Roger, J. Béjaud, N. Lautram, F. Manero, R. Perrot, C. Abbara, M. Briet, S. Legeay, New in vitro coculture model for evaluating intestinal absorption of different lipid nanocapsules, *Pharmaceutics.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050595>.

- [32] A.L. Lainé, J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, M. Wiber, I. Texier, J.L. Coll, J.P. Benoit, C. Passirani, Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring, *J. Control. Release.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.042>.
- [33] R.J. Probst, J.M. Lim, D.N. Bird, G.L. Pole, A.K. Sato, J.R. Claybaugh, Gender Differences in the Blood Volume of Conscious Sprague-Dawley Rats NIH Public Access, n.d.
- [34] R.M. Williams, J. Shah, H.S. Tian, X. Chen, F. Geissmann, E.A. Jaimes, D.A. Heller, Selective Nanoparticle Targeting of the Renal Tubules, *Hypertension.* 71 (2018) 87–94. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09843>.
- [35] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles., *Mol. Pharm.* 5 (2008) 505–15. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>.
- [36] H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari, Nanoparticle uptake: The phagocyte problem, *Nano Today.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>.
- [37] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [38] A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang, Y. Barenholz, Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes 1, 1994.
- [39] B. Pelaz, P. Del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernández, J.M. De La Fuente, G.U. Nienhaus, W.J. Parak, Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake, *ACS Nano.* 9 (2015) 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- [40] R. Rampado, S. Crotti, P. Caliceti, S. Pucciarelli, M. Agostini, Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of “Stealthy” Nanomaterials, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00166>.
- [41] A. Zhang, K. Meng, Y. Liu, Y. Pan, W. Qu, D. Chen, S. Xie, Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers in vivo and their influences, *Adv. Colloid Interface Sci.* 284 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102261>.
- [42] C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W.C.W. Chan, Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>.
- [43] Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubiella, C. Wischke, A.T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag, Protein interactions with polymer coatings and biomaterials, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 8004–8031. <https://doi.org/10.1002/anie.201400546>.

DISCUSSION GENERALE

Bien que mises au point dans les années 2000, les NCLs formulées au laboratoire MINT sont encore en pleine phase de développement et ce toujours en quête d'un passage de la phase préclinique à la phase clinique. Pour atteindre cet objectif, il apparaît inéluctable de mieux appréhender le devenir de ces NCLs dans l'organisme après administration. Cependant, il reste encore de nombreuses zones d'ombre et la mise en place d'outils et de techniques pour bien comprendre la biodistribution des NCLs semble donc nécessaire. C'est autour de cette réflexion que ce travail de thèse a été mené. Le sujet étant complexe, il a été nécessaire de faire des choix et de découper ce travail en trois phases pour tenter de répondre méthodiquement aux interrogations de cette vaste remise en question. Pour l'ensemble de ce travail, l'administration par voie intraveineuse a été préférée afin de s'affranchir de toute étape supplémentaire d'absorption ou de résorption pour atteindre la circulation sanguine générale. De plus, après absorption, les NCLs passent par la circulation sanguine, ce qui impose une caractérisation prioritaire des interactions liées à la mise en contact avec ce fluide biologique complexe.

Ainsi, il a semblé naturel de s'interroger dans un premier temps sur le devenir immédiat des NCLs après administration intraveineuse. Comme l'ont montré les résultats du **Chapitre 2**, il semble que les premiers instants dans le compartiment sanguin soient cruciaux puisqu'il en résulte une opsonisation qui entraîne la reconnaissance et donc l'élimination des nanovecteurs par le SRE. Cette première phase du travail expérimental a bien mis en évidence les capacités d'adsorption des protéines plasmatiques sur les NCLs. De plus, il a bien été confirmé que la structure chimique d'un nanovecteur et donc l'interface proposée aux protéines plasmatiques influençait la formation de la couronne de protéines.

Ensuite, la seconde phase de ce travail a permis d'évaluer la PK de ces nanovecteurs après administration par voie intraveineuse chez le rat en se focalisant sur les NCLs intactes à l'aide de la technique FRET. Les résultats du **Chapitre 3** ont été très informatifs puisqu'ils ont permis de dégager des indications marquantes comme la distribution dépendante de la taille ou encore la clairance des NCLs influencée par le type de décoration de surface. En effet, plus la taille augmente et plus la distribution diminue. Par ailleurs, si l'ajout de PEG en surface a bien permis de diminuer la clairance des NCLs de 85 nm, elle a en revanche significativement augmenté celle des NCLs de 50 nm.

Enfin, la troisième et dernière phase de ce travail fait suite aux résultats obtenus lors de la seconde phase, notamment pour les NCLs 50 nm recouvertes de molécules de PEG. Le but de cette dernière expérimentation, constituant le **Chapitre 4**, était de répondre à l'éventuelle existence d'une élimination urinaire des NCLs-FRET sous forme intacte. La réponse apparaît comme clairement négative. Par voie de conséquence, nous pouvons supposer à partir de l'ensemble de ces résultats que les NCLs, comme la plupart des nanovecteurs, subissent une

forte dégradation par capture macrophagique hépatique (cellules de Kupffer) après avoir été opsonisées par les facteurs du complément dès leur entrée dans le compartiment sanguin.

Lors de cette discussion, nous allons aborder les différents aspects méthodologiques mis en œuvre dans ce travail pour étudier l'impact des milieux biologiques et la pharmacocinétique des NCLs. Comme évoqué par le Professeur Florence, les choix méthodologiques effectués lors des études des nanoformulations semblent être la clé de l'évolution positive, et donc du maintien de l'espoir fondé autour des nanomédicaments [1].

1. Méthodes d'étude de l'adsorption protéique autour des NCLs

1.1. Modèles d'études

Les interactions nanoparticules-protéines sont largement étudiées *in vitro*, mais ces conditions ne reproduisent pas exactement les conditions d'exposition dans les organismes vivants. Il est difficile de reproduire les conditions d'un point de vue dynamique, mais également d'un point de vue qualitatif et quantitatif par rapport aux fluides biologiques.

Statique versus dynamique

En l'absence de matériel adéquat pour modéliser des conditions dynamiques, le modèle choisi lors de notre étude est un modèle statique avec agitation. Bien que ce ne soient pas des conditions optimales, les NCLs ont été mises en contact avec des protéines dans un récipient clos à 37°C avec une simple agitation par barreau aimanté. L'agitation apparaît comme indispensable lors de l'étude de la formation de la couronne de protéines. En effet, comme l'ont montré plusieurs études, des conditions statiques d'incubation semblent être à l'origine de biais importants dans la formation qualitative et quantitative de la couronne de protéines [2,3]. Cet élément est d'autant plus important que le sang, en tant que liquide newtonien, présente des différences de contraintes de cisaillement selon sa vitesse de circulation et sa composition quantitative (globules et protéines) [4]. Le flux sanguin capillaire est d'environ 0,085 cm/s et le flux artériel est compris entre 10 cm/s et 60 cm/s, ce qui entraîne des variations de viscosité [2,3]. Ces modifications rhéologiques influencent le coefficient de diffusion des protéines et donc les potentielles interactions avec les nanoparticules. La loi de Stokes-Einstein relie la viscosité (μ) au coefficient de diffusion (D) selon l'équation suivante :

$$D = \frac{kt}{6\pi r\mu}$$

Ces contraintes de cisaillement imposées aux nanoparticules peuvent ainsi moduler les capacités d'adsorption des protéines [5,6]. Ceci explique probablement la composition quantitative et

qualitative de la couronne de protéines continuellement modifiée au gré des interactions liées aux modifications du flux sanguin dans l'organisme. Sous l'effet de la vitesse du flux sanguin, il semblerait, d'une part, que les interactions entre les protéines et les nanoparticules soient plus importantes, et, d'autre part, que les contraintes de cisaillement soient à l'origine de la séparation des protéines faiblement liées permettant ainsi la fixation de protéines de plus haute affinité. Au vu des différentes études menées à ce sujet, il apparaît que la formation de la couronne est plus lente dans des conditions dynamiques mais quantitativement plus importante et ce, quel que soit le type de nanoparticules (organiques ou inorganiques) [2,3,7]. Lors de la mise en contact avec le milieu sanguin, si la composition qualitative et quantitative de la couronne semble être en mouvance perpétuelle, les conséquences physiques sur les nanoparticules sont, elles, rapidement définies, à savoir l'augmentation de la taille et la diminution du potentiel zêta [2].

Des études récentes ont souligné l'importance de mener des études *in vitro* dans lesquelles la nature dynamique du flux sanguin doit être prise en compte pour comprendre la corrélation entre la nanoparticule, le milieu biologique et la formation de la couronne de protéines [2]. Les conditions dynamiques sont souvent obtenues par des systèmes de pompes péristaltiques équipées de tuyaux de gros diamètre peu représentatifs d'un organisme vivant [8]. Une nouvelle approche *in vitro* mieux adaptée pour mimer les diamètres des capillaires sanguins semble être la microfluidique. Cette technologie s'intéressant au comportement des fluides dans des micro-canaux intégrés dans des puces permet de maîtriser le débit appliqué, l'orientation du flux et les dimensions des canaux. De récentes études ont montré les bénéfices de l'utilisation de la microfluidique pour étudier l'adsorption de protéines sur des nanoparticules dans des conditions dynamiques. La modélisation des contraintes de cisaillement imposées aux nanoparticules liées et aux diamètres des capillaires et artérioles semble plus juste avec l'élaboration de puces adaptées [8,9]. Par ailleurs, un autre paramètre physique influence la formation de la couronne. Il s'agit de la température d'incubation : plus la température augmente, plus la formation de la couronne est importante. A noter que la température est un des paramètres entrant dans le calcul du coefficient de diffusion (D). Il est donc logique que la mobilité des protéines soit dépendante de cette dernière. De ce fait, une température d'étude fixée et stable à 37°C apparaît comme indispensable pour mimer les conditions *in vivo* [10].

Milieus biologiques d'étude

L'étude de la formation de la couronne de protéines ne peut se faire que dans un milieu biologique soigneusement sélectionné pour être le plus proche possible des conditions *in vivo*. Si notre étude a débuté par une phase de mise au point dans du sérum de veau fœtal (SVF), la suite a été réalisée avec du plasma de rat pour se rapprocher au maximum des conditions d'études *in vivo* menées chez le rat, animal choisi pour l'étude pharmacocinétique des NCLs [11]. La composition protéique du plasma est spécifique à chaque espèce animale, ce qui limite les

extrapolations. Comme l'ont montré Muller *et al.*, la quantité d'immunoglobulines diffère selon l'origine du plasma. Si elles représentent environ 13 % de la quantité totale des protéines chez l'Homme et 7 % chez le lapin, ce n'est que 1 % de la quantité totale des protéines chez la souris [12]. Ainsi, si l'objectif final est d'étudier l'impact de la couronne de protéines sur les nanoparticules après administration intraveineuse chez l'Homme, il est impératif de choisir le plasma humain comme milieu d'étude biologique. L'utilisation du sérum doit être évitée en raison de l'absence des protéines de la coagulation [11,13]. La différence inter-espèces et l'absence de protéines de la coagulation conduisent à proscrire l'utilisation du SVF et c'est la raison qui nous a amené à faire évoluer notre méthodologie d'étude.

Par ailleurs, l'utilisation de plasma impose l'usage d'un anticoagulant qui devra être choisi avec soin car il peut interférer avec l'adsorption protéique autour des nanoparticules [11,14]. Nous avons privilégié l'EDTA car l'héparine a des effets négatifs sur la constitution qualitative de la couronne de protéines puisque le mécanisme d'action de l'héparine est basé sur le retrait de plusieurs protéines plasmatiques comme le fibrinogène, l'antithrombine III, des apolipoprotéines ou encore certaines protéines du complément (C3 et C4b) [13,15].

Les différences de composition de la couronne de protéines liées aux milieux d'incubation sont exposées dans la **Figure 14**.

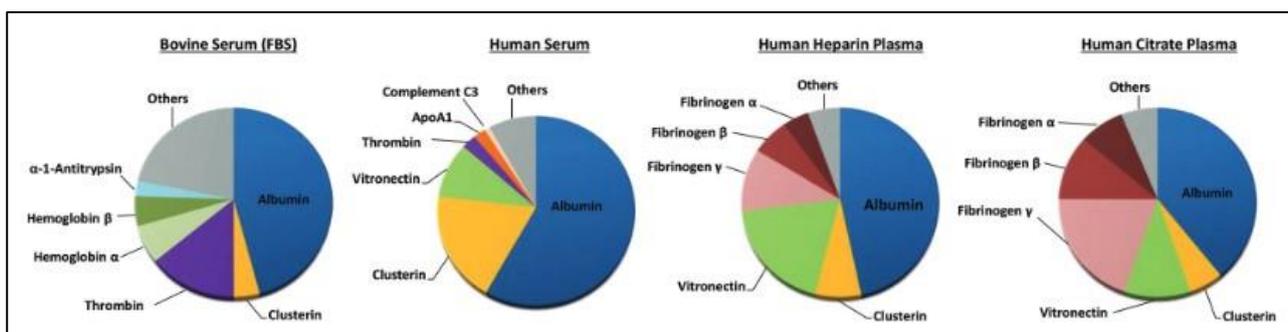


Figure 14. Comparaison de la composition de la couronne de protéines après incubation dans le sérum de veau fœtal, sérum humain, plasma humain hépariné, plasma humain citraté, après analyse quantitative par LC-MS. (Reproduite à partir de Schöttler *et al.* [13])

Usuellement, comme nous avons pu le faire, la quantité de protéines mises en contact avec les nanoparticules est ajustée par rapport à la surface disponible tout en s'assurant d'être dans une situation de large excès afin de mimer les conditions retrouvées *in vivo* post-administration intraveineuse. Cela présente l'avantage de pouvoir comparer plusieurs types de nanovecteurs [16,17]. La durée d'incubation d'une heure dans le milieu biologique, quel que soit le type de nanoparticules, semble faire consensus pour les études s'intéressant à ce phénomène d'adsorption protéique [14,18]. De plus, à la lumière de l'évaluation PK effectuée sur les NCLs (**Chapitre 3**) et du T_{max} observé (30 à 90 min), ce temps d'incubation d'une heure est pertinent [19].

1.2. Techniques de séparation après contact avec les milieux biologiques

Si les modèles *in vitro* sont aisément ajustables pour obtenir des conditions d'exposition relativement proches de la réalité, l'étape de séparation du complexe [nanoparticule-couronne de protéines] des protéines libres du milieu d'incubation est certainement l'une des étapes les plus délicates [11,20]. L'enjeu majeur réside dans la conservation de la couronne de protéines formée dans le milieu biologique sans occasionner de dénaturation de celle-ci. Ceci est d'autant plus difficile qu'il est désormais clairement établi qu'il existe deux couches de couronne. En effet, cette couronne est composée de protéines liées de façon covalentes, formant la « *hard corona* », et de protéines qui s'accrochent par des liaisons faibles, de façon temporaire et en mouvement quasi perpétuel, à l'origine de la « *soft corona* » [21,22]. La technique idéale doit permettre d'isoler le complexe [nanoparticules-protéines] des protéines libres, sans décrocher les protéines de la couronne et sans accrocher de nouvelles protéines libres. Il convient également d'utiliser une méthode adaptée au type de nanoparticules étudié (taille, densité...).

Size-Exclusion Chromatography (SEC)

Au vu des caractéristiques de nos NCLs et du matériel disponible au laboratoire, le choix de la technique de séparation s'est orienté vers la chromatographie d'exclusion stérique (en anglais *Size-Exclusion Chromatography : SEC*). Pour notre étude, nous avons utilisé une colonne Séphadex® (gel d'agarose hydraté). Au vu des données de la littérature, cette méthode semble plus adaptée pour les nanoparticules organiques que la centrifugation ou l'ultracentrifugation. En revanche, les contraintes physiques imposées par cette méthode (interactions avec la colonne, diamètre des pores, débit de la phase mobile) peuvent impacter la couronne de protéines et ceci à tel point que seule la « *hard corona* » apparaît identifiable à la suite de la séparation. Cette méthode présente toutefois l'avantage de ne pas dénaturer la conformation des protéines [20,23].

Centrifugation

Si la centrifugation n'a pas été choisie alors qu'elle semble plus simple à mettre en place, c'est parce qu'il n'apparaissait pas opportun d'utiliser cette méthode au vu de la faible densité des NCLs. En effet, la séparation des protéines libres situées dans le surnageant paraît compromise car les NCLs ont tendance à crêmer à l'issue de la centrifugation. Par ailleurs, les paramètres ajustables de cette méthode (temps, vitesse, nombre de centrifugations ou encore lavage) influencent les résultats avec des risques de désorption des protéines si les conditions de séparation sont trop strictes, ou de surestimation des protéines liées en cas de mauvaise séparation. De plus, même si cela reste à confirmer, plusieurs études montrent que la centrifugation entraîne le décrochage des protéines de la « *soft corona* » [24,25]. Cette méthode

est donc particulièrement intéressante pour les nanoparticules de haute densité puisque la centrifugation va entraîner une migration du complexe [nanoparticules-protéines] vers le culot du tube alors que les protéines libres vont migrer dans le surnageant en raison de leur plus faible densité. L'ajout d'un gradient de sucrose permet d'améliorer les performances de cette technique en assurant une séparation plus fine et en évitant les phénomènes de contact des protéines libres avec les nanoparticules lors de la centrifugation [24].

Asymmetric-flow field fractionation (A4F)

Si nous avions disposé du matériel nécessaire, il aurait été intéressant d'utiliser pour notre étude la technique du fractionnement en fonction de la taille par couplage flux/force (en anglais *asymmetric-flow field-flow fractionation: A4F*). Cette autre méthode chromatographique plus récente semble offrir de nombreux avantages. Elle permet de séparer des molécules de taille comprise entre 1 nm et quelques dizaines de μm , ce qui correspond à des masses moléculaires comprises entre 10^3 et 10^9 Daltons (Da) [26]. L'absence de phase stationnaire, par opposition à la SEC, permet une séparation plus douce et rend possible la conservation de la totalité de la couronne de protéines formée autour des nanoparticules. Cette technique semblerait aussi capable de séparer les protéines libres tout en conservant la « *hard corona* » et la « *soft corona* » selon Ashby *et al.* [27]. En effet, la vitesse élevée du processus de séparation permet, contrairement à des techniques comme la SEC, d'éliminer rapidement toutes les protéines libres qui pourraient s'adsorber, tout en conservant les protéines appartenant à la « *soft corona* ». Seule une analyse qualitative des protéines permet d'émettre cette hypothèse en citant l'exemple de l'albumine qui appartient préférentiellement à la « *soft corona* », alors que les lipoprotéines appartiennent à la « *hard corona* » (**Figure 15**). L'A4F permet également de conserver quantitativement plus de protéines de faible affinité (comme l'albumine) par rapport à la centrifugation où les protéines qui restent liées ont majoritairement une forte affinité (lipoprotéines) avec la nanoparticule. Bien que l'A4F présente de nombreux avantages, elle nécessite de s'assurer d'un prérequis essentiel : l'existence d'une différence initiale significative de taille entre le complexe [nanoparticules-protéines], les protéines libres et le nanovecteur seul. Pour obtenir des résultats satisfaisants, il est important d'optimiser la méthode dans le but notamment d'éviter les interactions entre la membrane d'ultrafiltration et les protéines [25]. Ajouté à cela, et comme c'est le cas avec la majorité des techniques, la dilution nécessaire à l'analyse de l'échantillon peut être à l'origine d'une déstabilisation du complexe [nanoparticules-protéines]. Par ailleurs, les capacités résolutes de cette technique restent à ce jour un challenge puisqu'il semble difficile de séparer les protéines libres des nanovecteurs seuls, notamment lorsque ces deux éléments sont de petite taille (quelques dizaines de nanomètres) [25].

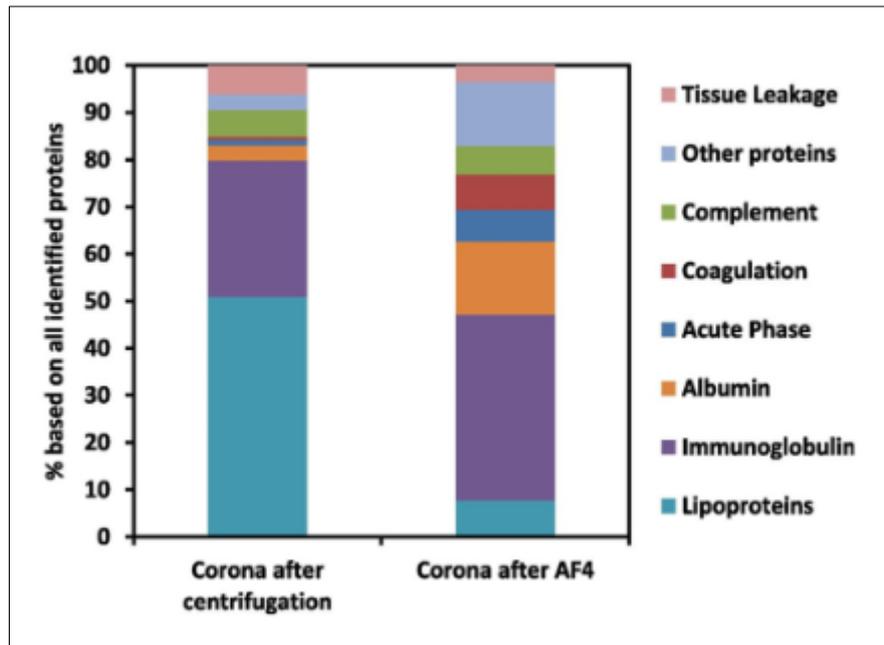


Figure 15. Comparaison de la composition de la couronne de protéines par analyse LC-MS entre deux techniques d'isolation du complexe [nanoparticules-protéines] après centrifugation ou A4F. (Reproduite à partir de Weber *et al.* [24])

Au total, aucune méthode ne permet d'explorer finement la couronne de protéines qui se forme autour des nanoparticules après contact avec un milieu biologique. Au vu des capacités séparatives de la SEC, cette technique paraît tout à fait adaptée et a été choisie pour ses qualités résolutive des éléments de faible poids moléculaire. Toutefois, nous n'avons pas trouvé les paramètres optimaux de séparation lors de ces travaux [24,25]. L'avantage des méthodes chromatographiques comme la SEC réside dans le délai de l'analyse post-incubation et le temps d'analyse lui-même, qui sont, respectivement, court et rapide. Enfin, le couplage à des techniques de détection multiples (UV, dRI, FLD, MALS, ICP-MS) permet de caractériser les différents éléments du mélange (nanovecteurs, protéines et même substance active encapsulée).

2. Méthodes de caractérisation

La caractérisation des nanovecteurs est de loin le plus grand défi à relever lors de ces prochaines années, que ce soit directement après la formulation mais aussi et surtout après la mise en contact avec les milieux biologiques. L'absence de standardisation des protocoles au sein de la communauté scientifique associée à l'absence de directives des instances réglementaires sont probablement les principales causes des résultats souvent décevants obtenus lors des passages des phases précliniques à cliniques des candidats nanomédicaments [28,29].

DLS et mobilité électrophorétique

Les deux caractéristiques systématiquement évaluées lors des études, comme ce fut le cas tout au long de ce travail avec les NCLs, sont la taille et la charge. Pour ce faire, nous avons utilisé la DLS (en anglais *Dynamic Light Scattering*) et la mobilité électrophorétique, méthodes qui sont largement utilisées (près de 50 % des études) en raison de leur facilité d'accès puisque l'équipement est relativement accessible tant d'un point de vue technique que financier [30]. Ces deux techniques nécessitent une importante dilution avant la mesure afin d'estimer correctement les coefficients de diffusion. Cet élément peu gênant pour la caractérisation post-formulation le devient après mise en contact avec les protéines. Comme cela a déjà été évoqué, la couronne de protéines est dans un état d'équilibre permanent qui est déstabilisé lors de modifications du milieu extérieur. C'est pour cette raison que nous avons souhaité nous affranchir de cette dilution après avoir vérifié que nos conditions de mesure permettaient de différencier les protéines seules du complexe [nanoparticules-protéines]. En effet, l'estimation du diamètre hydrodynamique des éléments par mesure du coefficient de diffusion est susceptible d'être perturbée dans des mélanges complexes dit polydispersés [31]. Nos résultats indiquent qu'il est possible d'obtenir des mesures distinctes entre les différents éléments du mélange sans avoir recours à une préparation spécifique de l'échantillon. Cela reste cependant à interpréter avec prudence car la mesure du coefficient de diffusion des petites particules en DLS peut être perturbée voire inexistante en présence de grosses particules. Pour rappel, la DLS permet le calcul de la taille après mesure du coefficient de diffusion (D_z) des particules selon l'équation suivante :

$$D_z = \frac{kT}{6\pi} \times \left(\frac{1}{Rh}\right)_z$$

k : Constante de Boltzmann
 T : Température

Avec

$$Rh = \left(\frac{3}{4\pi} \times \frac{V}{N}\right)^{\frac{1}{3}}$$

V : Volume molaire

De ce fait, le D_z est très sensible aux grosses particules même si elles sont en petites quantités dans le mélange [31].

De même, pour le potentiel zêta, la complexité du mélange perturbe la mobilité des différents éléments. Il est donc difficile d'interpréter le potentiel zêta post-incubation puisque la discrimination de la charge des protéines (majoritairement négative) de la charge des complexes [nanoparticules-protéines] est délicate. C'est pour cette raison qu'il semble opportun, soit de confirmer les résultats obtenus par DLS avec d'autres techniques de mesure directe comme la microscopie à transmission électronique (en anglais *Transmission Electronic Microscopy : TEM*), la microscopie à force atomique (en anglais *Atomic Force Microscopy : AFM*) ou l'analyse de suivi individuel des nanoparticules (en anglais *Nanoparticle Tracking Analysis : NTA*) [2,17,31], soit d'utiliser des méthodes pré-analytiques séparatives comme l'A4F [29].

Comme suggéré par le NCI-NCL et l'EUNCL, les techniques de caractérisation conseillées en premières intention sont la TEM, le NTA et l'A4F. D'autres techniques peuvent être employées pour compléter les études de taille et de morphologie comme la diffusion de rayons X aux petits angles (en anglais, *Small Angle X-ray Scattering : SAXS*), l'ultracentrifugation analytique (en anglais *Analytical Ultra Centrifugation : AUC*), la calorimétrie différentielle à balayage (en anglais *Differential Scanning Calorimetry : DSC*), l'AFM ou encore la détection d'impulsions résistives accordables (en anglais *Tunable Resistive Pulse Sensing : TRPS*) [29,30]. Ainsi, la suite des propos est une justification des choix effectués dans ce travail qui sont le fruit d'un compromis entre la technique optimale et la disponibilité du matériel.

Transmission Electronic Microscopy (TEM)

Les méthodes par comptage direct, comme la TEM, sont très utiles pour caractériser les systèmes colloïdaux que sont les nanoparticules, qu'elles soient organiques ou inorganiques. La grande capacité de comptage ($n > 500$) permet d'obtenir une estimation de taille relativement précise. En revanche, la mesure est effectuée sur un plan en deux dimensions et ce n'est qu'à la suite d'une étape de modélisation tridimensionnelle que le diamètre des nanoparticules est estimé [32]. Bien que cette technique soit très résolutive (0,1-2 nm), le principal inconvénient réside dans la préparation de l'échantillon. Ceci est d'autant plus gênant pour étudier la formation de la couronne de protéines puisque la TEM impose un séchage et une coloration avec fixation de l'échantillon entraînant *de facto* une déformation des nanoparticules et des protéines adsorbées. L'utilisation de la cryo-TEM, autrement dit la TEM sous atmosphère cryogénique, peut diminuer l'effet de la déformation mais seulement si l'eau présente dans l'échantillon n'est pas sous forme cristalline (état vitreux). En revanche, cette étape de congélation est peu compatible avec les molécules biologiques comme les protéines. Cela modifie la conformation des protéines et de ce fait l'organisation de la couronne de protéines autour des NCLs. A noter qu'avec la cryo-TEM, l'échantillon devient très sensible au passage du faisceau électronique à l'origine d'une désorganisation des structures étudiées [33]. Ainsi, la caractérisation de ces systèmes par les TEM ou cryo-TEM est complexe à mettre en œuvre et parfois peu représentative si la technique est mal maîtrisée.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La technique NTA, au-delà de pouvoir mesurer la taille des nanoparticules, présente l'avantage de pouvoir mesurer la concentration particulaire d'une suspension. Bien que nous ayons le matériel disponible au laboratoire, l'importante dilution obligatoire pour obtenir un signal exploitable nous a naturellement détourné de cette technique pour la caractérisation des nanoparticules avec la couronne de protéines.

Analytical Ultra Centrifugation (AUC), Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Les méthodes de centrifugation comme l'AUC et la DSC permettent d'obtenir la caractérisation des nanoparticules en fonction de leur taille et de leur densité. Ces méthodes présentent la possibilité d'étudier des systèmes polydispersés contrairement à la DLS. En revanche, au vu des vitesses de centrifugation possibles (100 000 g), l'étude des NCLs paraît difficile à cause de leur faible densité. En effet, ces techniques ne permettent pas la mesure de particules trop denses de petite taille (nanoparticules métalliques) et de nanoparticules trop peu denses de taille supérieure à 20 nm (nanoparticules polymères, liposomes, NCLs...). De plus, utilisées seules, ces méthodes, semblent peu adaptées à la caractérisation post-incubation dans un milieu biologique car la différence de densité entre le nanovecteur seul ou avec la couronne de protéines est généralement faible [30].

Asymmetric-flow field-flow fractionation (A4F)

L'A4F permet de caractériser les différentes espèces d'un mélange avec une bonne résolution, à la différence de la DLS seule. Le couplage de cette méthode séparative à des techniques spécifiques de détermination de la taille comme la DLS ou la MALS (de l'anglais *Multi-Angle Light Scattering*) permet de proposer une technique de caractérisation relativement robuste et puissante. Cela rend possible la caractérisation post-incubation dans un milieu biologique [25,29]. Comme toute méthode, elle présente des inconvénients. Au-delà du prix de l'appareillage et du niveau de compétence requis pour son utilisation, c'est probablement l'utilisation de tensioactifs qui apparaît comme limitante. En effet, cela peut être à l'origine d'une surestimation de la taille des objets analysés et/ou de la formation de micelles *in situ*. [25]

Au final, il n'existe pas de méthode idéale pour la caractérisation des nanoparticules. Notre choix s'est porté sur la DLS et la mobilité électrophorétique. La disponibilité du matériel ainsi que la facilité de mise en place ont orienté ce choix. Comme pour les autres méthodes, les conditions analytiques, en l'occurrence la dilution, sont souvent délétères aux nanoparticules et/ou à la couronne de protéines. Pour cette raison, nous avons tenté de nous en affranchir au risque de biaiser la mesure.

Pour caractériser au mieux les nanoparticules, qu'elles soient seules ou accompagnées de leur couronne de protéines, l'EUNCL et le NCI-NCL ont proposé une approche regroupant plusieurs techniques. C'est une approche en trois étapes, de la plus simple à la plus complexe. (**Figure 16**) [30].

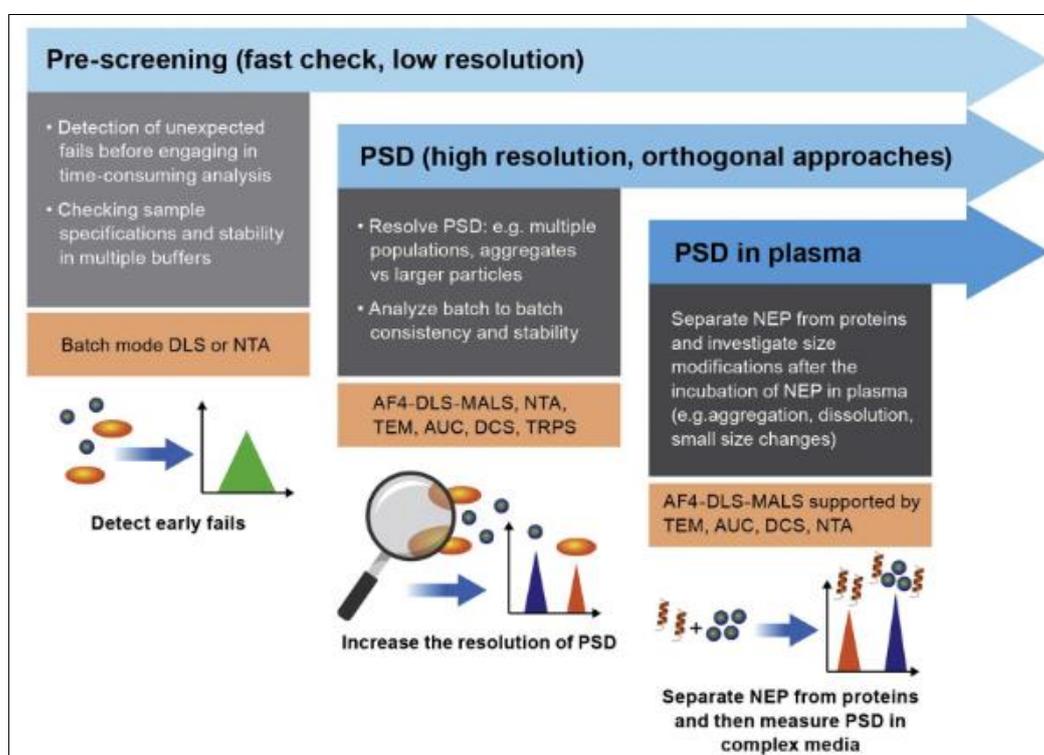


Figure 16. Représentation schématique de l'approche technologique souhaitée par le EU-NCL et le NCI-NCL pour mesurer la taille des nanoparticules (distribution de la taille particulière, en anglais *Particle Size Distribution : PSD*) en fonction du niveau de complexité du mélange. (Reproduite à partir de Caputo *et al.* [30])

3. Stabilité des nanoparticules dans les milieux biologiques

A la suite de l'exploration de l'influence immédiate des milieux biologiques sur les nanoparticules, une autre problématique survient : la stabilité dans les milieux biologiques. Les études de stabilité dans les milieux biologiques sont indispensables pour comprendre le devenir des nanoparticules après leur administration. C'est pour cette raison que ce travail de thèse d'évaluation PK des NCLs a fait l'objet de deux études de stabilité : l'une dans le sang pour évaluer la stabilité des NCLs dans le liquide biologique de transport après administration intraveineuse, et l'autre dans les urines afin d'évaluer l'effet de ce milieu lors de la phase d'élimination des NCLs. Pour chacune d'entre elles, nous avons utilisé le système FRET pour nous intéresser uniquement à la stabilité des nanoparticules sous forme intacte. Ces études de stabilité permettent d'évaluer le caractère biodégradable immédiat des nanoparticules sans l'intervention du foie, de la rate et des reins, organes principalement responsables de la dégradation des nanoparticules [34,35]. Ajouté à cela, l'étude de stabilité dans le sang permet d'évaluer le risque de libération immédiate de la substance active liée à la dégradation du nanovecteur [36].

La meilleure méthode pour évaluer cette stabilité, et donc l'intégrité du nanovecteur dans un milieu biologique, semble être celle que nous avons utilisée lors de nos études, à savoir la méthode FRET. Puisque le signal FRET ne persiste que si les 2 fluorophores (donneur et accepteur) sont séparés par une distance inférieure à 10 nm, il est possible de conclure à l'intégrité des nanoparticules en cas d'obtention de celui-ci (**Figure 17**) [37].

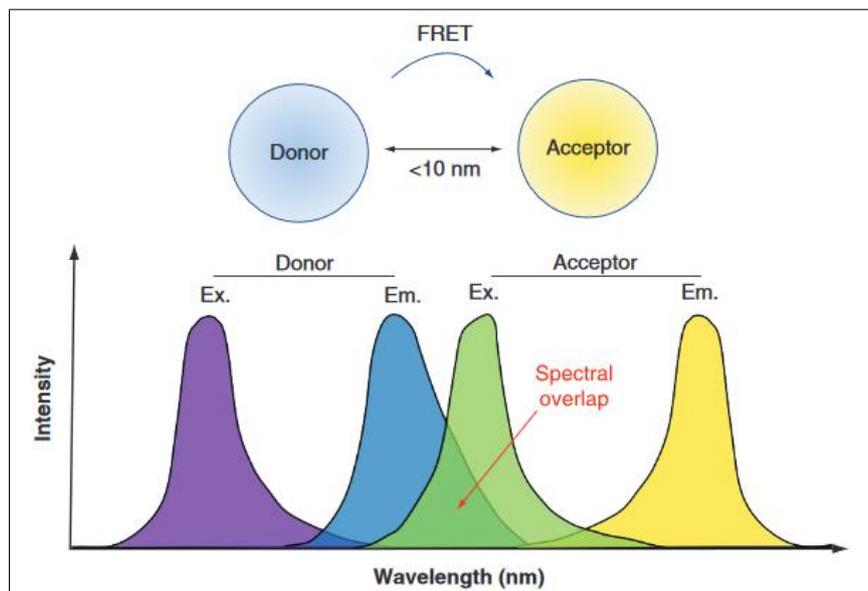


Figure 17. Pré-requis nécessaire pour la détection du signal FRET (Förster Resonance Energy Transfert) : superposition entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur avec les deux fluorophores séparés de moins de 10 nm. (Reproduite à partir de Bonnet *et al.*[37])

Ex : Excitation ; Em : Emission ; FRET : Förster Resonance Energy Transfert

Les autres méthodes de marquage (TEP, TEMP, IRM, fluorescence...) ne renseignent pas sur l'intégrité structurale des nanoparticules [37,38]. La littérature présente à ce jour peu de données de stabilité *ex vivo* dans les liquides biologiques animaux ou humains. La majorité de ces études sont plutôt à classer dans les études *in vitro* car elles font appel à des milieux biologiques simplifiés comme le SVF, le plasma de souris ou encore des globules rouges de souris, et non du sang total de rat comme nous avons pu le faire. Bouchaala *et al.*, et Gravier *et al.*, par exemple, ont réalisé des études de stabilité de NCLs respectivement dans du SVF et dans de l'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 24 heures [39,40]. Chen *et al.* ont eux évalué l'intégrité de micelles durant 2 heures dans des globules rouges et de l'albumine alors que Zhang *et al.* ont étudié la stabilité de micelles polymères dans du plasma de souris pendant 72 heures [41,42]. Toutes ces études utilisant le système FRET aboutissent à des conclusions identiques qui sont que les nanoparticules organiques sont stables ou très peu dégradées lors d'une incubation dans ces milieux biologiques. Ces études, bien qu'éloignées d'un milieu biologique comme le sang total, ont tout de même été menées à 37°C afin de mimer les conditions *in vivo*. En revanche, à ce jour, il semblerait qu'aucune étude d'évaluation de l'intégrité de nanoparticules organiques n'ait été menée dans les urines ce qui renforce l'originalité de ce travail de thèse.

4. Evaluation de la pharmacocinétique des NCLs

L'une des principales difficultés en pharmacocinétique est souvent liée à la quantification de la molécule d'intérêt en différenciant la forme active des autres formes (forme liée, métabolites...). L'encapsulation dans un nanovecteur ajoute une difficulté supplémentaire car, en plus de repérer l'actif sous sa forme libre, il faut repérer l'actif sous sa forme encapsulée afin d'évaluer la biodistribution des nanoparticules avant la libération du principe actif. Par conséquent, pour une évaluation PK, en plus de mettre au point un dosage spécifique de la substance active et de ses métabolites, il faut mettre au point une méthode de détection quantitative du nanovecteur.

4.1. Méthodes de détection quantitative des NCLs dans les milieux biologiques

Ce travail a permis d'évaluer la PK des NCLs seules, c'est-à-dire sans encapsulation d'une substance active. C'est avec la méthode FRET, expliquée précédemment, que le nanovecteur a pu être suivi afin d'évaluer la biodistribution des NCLs sous leur forme intacte uniquement. Cette méthode qualitative permettant de suivre l'intégrité des nanoparticules a déjà été utilisée au sein du laboratoire MINT dès 2014 par Gravier *et al.* ou encore Bouchaala *et al.* en 2016. Cependant, ces travaux se sont limités à une approche semi-quantitative par calcul d'un ratio de signal FRET (%) après déduction du bruit de fond [39,40]. C'est pour améliorer l'évaluation PK que nous avons développé une approche quantitative associant la concentration particulaire, à l'aide du NTA, à la méthode FRET pour déterminer l'intégrité des particules. Ainsi, les échantillons dont le signal FRET présente un indice de proximité supérieur à 0.73 (*Proximity Ratio : PR*) sont synonymes de nanoparticules intactes. De ce fait, nous avons pu évaluer la concentration de nanoparticules intactes dans les échantillons sanguins en fonction de l'intensité du signal FRET après avoir élaboré une gamme d'étalonnage dans le milieu biologique d'étude.

Cette approche innovante présente de réels espoirs dans l'étude de la PK des nanoparticules [43,44]. C'est l'une des seules méthodes, mises à part quelques études utilisant l'IRM avec l'encapsulation de deux agents de contraste, permettant de fournir des données aussi spécifiques sur l'intégrité de nanovecteurs [45,46]. L'un des principaux inconvénients de cette méthode est la présence d'interférences avec la matrice. En effet, si certains composés des milieux biologiques ou organes étudiés présentent des groupements émettant un signal proche du donneur ou de l'accepteur, le signal FRET sera alors biaisé. Ce phénomène d'autofluorescence peut être évité en choisissant une paire FRET avec des sondes dont le spectre d'émission se situe dans le proche infra-rouge (650-900 nm)[47]. D'ailleurs, au décours de notre étude de l'élimination rénale des NCLs-FRET, nous avons pu constater un important bruit de fond probablement lié à l'autofluorescence de la bilirubine. Tout au long de ce travail, nous avons utilisé une paire FRET associant deux sondes fluorescentes de la famille des dialkylcarbocyanines (Di) avec pour donneur le DiI (1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetraméthyl-indocarbocyanine

perchlorate) et pour accepteur le DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) ayant des longueurs d'onde d'émission respectivement de 569 ± 5 nm et 675 ± 5 nm. La bilirubine, issue de la dégradation du noyau hémique des globules rouges et naturellement plus présente dans les urines que dans le sang, possède un maximum d'émission fluorescente d'environ 550 nm [48]. Par voie de conséquence, une interférence non négligeable avec le spectre du donneur peut biaiser le signal FRET et peut entraîner une excitation fortuite de l'accepteur alors même que les NCLs ne sont plus intactes. Au vu de nos résultats, nous pouvons dire que la bilirubine est responsable du fort bruit de fond sans toutefois biaiser le signal FRET dans les urines car ce dernier s'est avéré inexistant. Afin d'améliorer le protocole d'étude de l'élimination rénale, deux pistes semblent se dégager : (i) changer de paire de sondes FRET pour éviter ces interférences ou bien (ii) optimiser l'extraction de la matrice urinaire afin de mieux séparer les NCLs de la bilirubine contenue dans la matrice biologique. La seconde solution apparaît plus accessible dans un premier temps car elle ne nécessite pas de revalider l'ensemble des résultats obtenus dans le sang.

Si le FRET présente quelques inconvénients, notamment pour la quantification du signal permettant d'obtenir des données de concentrations pour les études de biodistribution, les autres méthodes de marquage, comme le radio-marquage ou la fluorescence, ne sont pas des témoins de l'intégrité du nanovecteur. En effet, même si la nanoparticule se retrouve dégradée dans l'organisme, le marqueur, qu'il soit radiologique ou fluorescent, continuera d'offrir un signal détectable, à la différence du signal FRET. Cette méthode FRET a également été utilisée pour l'étude de PK *in vivo* des NCLs chez le rat.

4.2. Méthodes d'étude *in vivo*

Pour être informatives, les études PK doivent faire preuve d'un certain nombre de prérequis comme le choix du modèle animal, de la voie d'administration, du site et du nombre de prélèvements. L'aspect méthodologique de l'évaluation PK est d'autant plus important pour les nanomédicaments qui souffrent à ce jour d'un manque de reproductibilité, probablement à l'origine des difficultés du passage de la préclinique chez l'animal à la clinique chez l'Homme. Ainsi, le design des études précliniques apparaît comme un élément incontournable dans le développement des nanomédicaments.

Modèle animal

Pour mener nos études d'évaluation PK, nous avons choisi de travailler sur le rat mâle de type Sprague-Dawley afin de disposer d'un volume sanguin suffisant pour pouvoir effectuer les prélèvements nécessaires à la réalisation de cinétiques sur 24 heures. Ces cinétiques, dites complètes, comptent 10 prélèvements au maximum soit un volume maximal de 1 mL et représentant moins de 4 % du volume sanguin de l'animal. Ceci est donc tout à fait acceptable. C'est pour cette raison que la souris n'avait pas été retenue. En effet, le même nombre de prélèvements aurait représenté près de 70 % du volume sanguin [49]. Par ailleurs, l'utilisation de rats mâles permet d'éviter toute variabilité interindividuelle liée aux cycles hormonaux des rats femelles [50–53].

Voies d'administration

La voie intraveineuse a été choisie pour administrer les NCLs au niveau de la veine péniennne. Les prélèvements ont été effectués au niveau des veines caudales afin d'éviter tous biais liés à la proximité des deux sites (administration et prélèvements). Comme évoqué en préambule, la voie orale n'a pas été étudiée pour ce travail bien que ce soit une voie particulièrement intéressante pour améliorer l'adhésion des patients à leur prise en charge médicamenteuse et faciliter l'observance aux traitements. Les connaissances actuelles sont limitées et doivent être approfondies. Si la biodisponibilité d'un principe actif peut être améliorée par l'encapsulation [54], le passage du vecteur lui-même semble limité. En effet, d'après de récentes études *in vitro* émanant du laboratoire, le passage du nanovecteur sous sa forme intègre est estimé à moins de 0,5 % de la quantité initiale sachant que le passage par les milieux gastriques induit une libération immédiate dans le tube digestif du principe actif (environ 10 % de la quantité encapsulée) [55–57].

Schéma thérapeutique

Afin de mimer un protocole thérapeutique usuellement utilisé lors d'une chimiothérapie anticancéreuse, il semblait indispensable de répéter les injections de NCLs. Il a donc été décidé d'évaluer l'effet de l'administration répétée des NCLs chez un même rat à une semaine d'intervalle. Cela semblait d'autant plus intéressant que l'élimination accélérée lors de la réinjection de nanoparticules est bien décrite et connue sous le nom de phénomène ABC, pour *Accelerated Blood Clearance* [58,59]. Les détails de ce mécanisme ont été évoqués dans le **Chapitre 1** [60] et les résultats de notre étude sont présentés dans le **Chapitre 3** [19].

5. Biodistribution-Biotransformation-Elimination

5.1. Etude de la biodistribution en fonction de la taille

Une étude de distribution des nanoparticules doit, dans un premier temps, passer par une étude pharmacocinétique simple avec évaluation du volume de distribution (Vd). C'est ce que nous avons fait dans le **Chapitre 3**. Ainsi, et comme cela est déjà mentionné dans la littérature, nous avons confirmé que la taille des nanoparticules influence leur capacité de distribution. En effet, plus le diamètre des nanoparticules diminue, plus la distribution dans l'organisme augmente [19,61,62]. Dans un second temps, il aurait été intéressant de compléter notre étude par l'exploration de la biodistribution des nanoparticules pour savoir quels étaient les tissus de destination des NCLs FRET étudiées.

La distribution tissulaire ne peut être évaluée correctement que si la méthode de détection est sensible et spécifique. En effet, il est indispensable de pouvoir distinguer la nanoparticule intacte de la nanoparticule désintégrée. Cette distinction permet d'évaluer le lieu éventuel de stockage des nanoparticules intactes et/ou de relargage de l'actif lors de la désintégration de celles-ci [60,63]. Il est évident que la technique FRET que nous avons employée semble tout à fait adaptée, l'émission du signal correspondant à la présence de nanoparticules intactes.

5.2. Capture macrophagique et impact de la pégylation

L'administration de nanoparticules dans le compartiment sanguin entraîne immédiatement la migration de protéines autour de celles-ci aboutissant à la formation d'une couronne de protéines [22,64,65]. Cette étape d'opsonisation permet ensuite au système réticulo-endothélial (SRE), aussi connu sous le nom de système mononucléé phagocytaire (SMP), de prendre en charge les nanoparticules pour les éliminer [66,67]. De ce fait, cette étape quasi immédiate de phagocytose après capture macrophagique des nanoparticules par le SMP doit être maîtrisée afin de formuler des nanoparticules permettant d'échapper à ce mécanisme pour espérer atteindre la cible thérapeutique souhaitée [68–70]. Cela passe par des essais *in vitro* comme nous avons pu le faire dans le **Chapitre 2**. A noter que l'ajout de molécules de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des nanoparticules est un élément dit de furtivité permettant d'échapper à cette séquestration par le SMP [71,72]. Wakley *et al.* ont démontré l'impact de l'ajout de PEG sur la capture macrophagique de nanoparticules d'or après mise en contact avec une lignée cellulaire macrophagique murine. Les résultats sont clairs : plus la densité de PEG augmente à la surface de la nanoparticule et plus la capture macrophagique diminue significativement en raison de la diminution de la quantité de protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule [69]. Toutefois, les mécanismes de capture macrophagique des nanoparticules restent à élucider comme l'ont suggéré Walkley *et al.* Les résultats de leur étude semblent laisser penser qu'il existe un autre mécanisme de capture indépendant de la quantité de protéines adsorbées, notamment pour les

nanoparticules de taille supérieure à 50 nm fortement pégylées (densité de PEG > 0,64 PEG/nm²) [69]. De même, Saha *et al.* ont réalisé des expériences similaires en comparant la capture macrophagique de différentes nanoparticules d'or exposées à des quantités variables de protéines. Il en résulte une composition qualitative et quantitative de la couronne de protéines qui diffère en fonction du type de nanoparticules, ceci ayant déjà été démontré à plusieurs reprises [10,64,66]. Ce travail est complété par l'identification précise des protéines en les reliant à leur degré d'implication dans le phénomène de capture macrophagique (ex : lipoprotéines, protéines du complément) [70].

D'un point de vue méthodologique, ces études doivent faire figure de guide pour comprendre et contrôler la conception de la surface des nanoparticules et ainsi minimiser la capture macrophagique. En effet, ce type de tests *in vitro* doit être effectué pour permettre un screening préalable à toute étude *in vivo* afin d'évaluer le niveau de capture macrophagique des nanoparticules.

5.3. Métabolisme hépatique

A la suite de cette capture macrophagique, et si le principe actif encapsulé est métabolisé par le foie, les nanoparticules subissent une forte dégradation plutôt qu'une métabolisation. C'est le SRE, principalement hépatique et représenté par les cellules de Kupffer, qui prend en charge la dégradation des nanoparticules. Ce mécanisme spécifique de dégradation, défini comme une quatrième voie de biotransformation, est présenté et détaillé dans le **Chapitre 1** [60].

Les mécanismes d'études approfondies et spécifiques de cette voie de dégradation hépatique sont encore peu explorés. Jiang *et al.* ont mené une des rares études sur le sujet en étudiant le passage des macrophages (RAW264.7) aux cellules hépatiques (Hepa1-6) à l'aide d'un test de migration cellulaire de type Transwell® (**Figure 18**) [73].

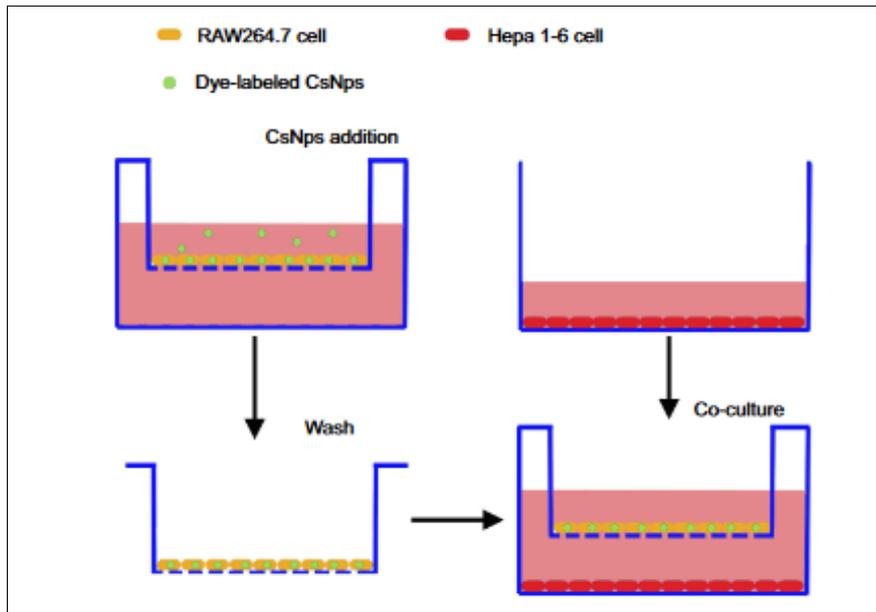


Figure 18. Méthodologie de traitement des cellules RAW264.7 et des cellules Hepa1-6 dans le modèle Transwell® pour l'étude du métabolisme hépatique des nanoparticules de chitosan (CsNps). (Reproduite à partir de Jiang *et al.*[71])

Jiang *et al.* en ont déduit, en plus de la phagocytose liée aux cellules de Kupffer, une prise en charge directe par les hépatocytes. Au-delà de la dégradation, cela peut présenter un réel avantage en cas de thérapie ciblée de pathologies hépatiques (**Figure 19**) [73,74].

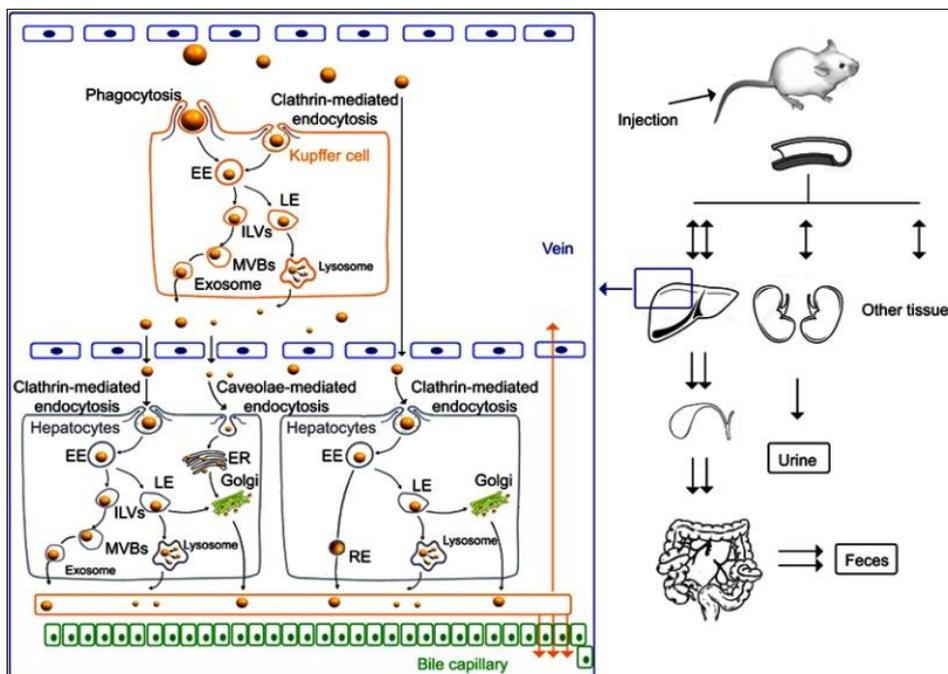


Figure 19. Schéma de représentation des mécanismes de dégradations des nanoparticules de chitosan (CsNps) au niveau hépatique chez la souris. (Reproduite à partir de Jiang *et al.*[73])

Abréviations : EE, endosomes précoces ; LE, endosomes tardifs ; RE, endosomes de recyclage ; ILV, vésicules intraluminales ; MVB, corps multivésiculaires ; ER, réticulum endoplasmique.

Cette étude est intéressante et ce d'autant plus qu'elle comporte une phase d'exploration *in vivo* avec l'injection de ces mêmes nanoparticules associées à un fluorophore pour confirmer leurs voies d'élimination. La voie principale est l'élimination par les fèces après excrétion biliaire (**Figure 19**) [73]. Il apparaît clairement que la taille des nanoparticules influence la prise en charge par le tissu hépatique. Si elles sont inférieures aux fenestrations des sinus hépatiques, l'entrée dans les hépatocytes est directe [75]. De même, Park *et al.*, qui se sont intéressés aux nanoparticules polymères de type PLGA de diamètre plus important, ont conclu à une distribution majoritaire dans les cellules de Kupffer [76].

Bien que ces travaux de thèse ne concernaient pas l'étude du métabolisme hépatique des nanoparticules, il semble évident, à la lumière de nos résultats, que cette étape soit aussi complexe que cruciale pour comprendre le devenir des nanoparticules après administration. Cette étape de dégradation, de prise en charge par le tissu hépatique composé de plusieurs types cellulaires (parenchymateuse (hépatocytes) et non parenchymateuse (cellules de Kupffer)), est difficile à appréhender car les méthodes d'étude de ces mécanismes de prise en charge (phagocytose, pinocytose, cavéoline, clathrine,...), bien que déjà mises en œuvre au sein du laboratoire pour étudier la prise en charge des NCLs par les entérocytes, sont complexes [55]. De plus, chaque type de nanoparticules, en fonction de ses caractéristiques physicochimiques (taille, charge, surface, ...), entraîne une prise en charge spécifique par les cellules du foie.

5.4. Élimination rénale

A priori, comme cela vient d'être évoqué, la voie d'élimination principale voire quasi exclusive des nanoparticules est hépatique exceptée pour les nanoparticules dont la taille n'excède pas 8 nm de diamètre qui se retrouvent directement filtrées par le glomérule [19,77]. Toutefois, de nouveaux mécanismes ont été élucidés laissant penser que des nanoparticules d'une taille supérieure à 100 nm peuvent être éliminées par sécrétion au niveau du tubule rénal [78]. Cette ultime étape pharmacocinétique est indissociable du succès des nanomédecines en thérapeutique. En effet, d'une part l'élimination des nanoparticules permet d'éviter toute toxicité liée à une accumulation et, d'autre part, une élimination trop rapide et importante est à l'origine d'une efficacité moindre [77].

Des travaux ont été menés à ce sujet lors de cette thèse. Ils sont présentés dans le **Chapitre 4** et confirment l'absence d'élimination rénale de NCLs FRET sous forme intacte dans les urines que ce soit par un mécanisme de filtration glomérulaire ou de sécrétion tubulaire.

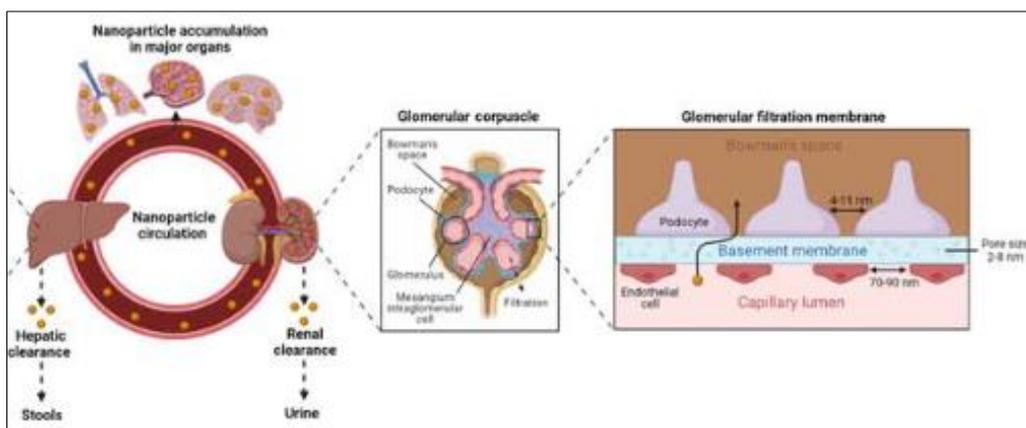


Figure 20. Schéma d'élimination des nanoparticules (NPs) par deux voies principales : hépatique et rénale. (Adaptée à partir de Zhu et al. [77])

Structure glomérulaire à 3 feuillets qui débute par l'endothélium vasculaire fenestré (70-80 nm), puis la membrane basale glomérulaire (pores de 2-8 nm) et enfin l'épithélium fenestré (4-11 nm).

Les méthodologies d'études de l'élimination rénale, de la même manière que pour la phase de dégradation hépatique, passent par des études *in vitro* sur des modèles cellulaires adaptés accompagnées d'études *in vivo* pour évaluer le passage des nanoparticules dans le compartiment urinaire. La stratégie de marquage des nanoparticules est essentielle pour aboutir à des résultats interprétables différenciant les nanoparticules intactes des nanoparticules altérées et du marqueur seul lui-même. C'est pour cette raison que nous avons fait le choix de la méthode FRET pour l'étude *in vivo* de l'élimination rénale (**Chapitre 4**).

Naumenko *et al.* ont réalisé des travaux intéressants sur des nanoparticules inorganiques d'une taille supérieure à 100 nm (nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer). L'évaluation de la biodistribution et la quantification de l'élimination rénale ont été réalisées par l'ajout d'une sonde fluorescente (Cy5) aux nanoparticules. Cette méthode, *a priori* perfectible en raison de l'instabilité du marquage, a fait l'objet d'une évaluation pour tester la stabilité du complexe [nanoparticule-fluorophore]. De plus, Naumenko *et al.* ont utilisé une méthode innovante d'imagerie *in vivo* en temps réel qui a permis de conclure à la séquestration des nanoparticules dans le tissu rénal suivie d'une élimination par sécrétion tubulaire et non par filtration glomérulaire, et ce sous leur forme intacte [78]. Cette étude fait écho à une revue récente d'Adhipandito *et al.* sur la clairance des nanoparticules. Celle-ci suggère des mécanismes de clairance des nanoparticules ayant un diamètre bien supérieur aux pores du glomérule rénal, à savoir 6-8 nm, donc qui s'affranchissent de l'étape de filtration glomérulaire (**Figure 20**) [79].

Les différentes techniques pour évaluer les interactions entre les nanoparticules inorganiques et le tissu rénal ont été présentées par Du *et al.*. Les techniques évoquées sont avant tout des techniques de détection après administration *in vivo* de ces nanoparticules inorganiques uniquement (ICP-MS, IRM, Rayon X, fluorescence,...) [35]. Toutefois, il est possible d'en déduire

que la maîtrise des interactions avec le tissu rénal revient à mieux contrôler leur élimination donc leur efficacité mais aussi et surtout leur toxicité.

Si le nombre de revues sur le sujet augmente, il semblerait qu'à ce jour il n'y ait pas d'études *in vitro* sur des modèles cellulaires que ce soit en deux ou en trois dimensions ou encore en utilisant des organoïdes rénaux. Ces différents modèles d'études présentés par Ebefors *et al.*, qui vont de la culture cellulaire à la construction d'organoïdes (organ-on-a-chip) en passant par de la co-culture en cellule Transwell®, semblent être aptes à l'évaluation de l'élimination rénale des nanoparticules [80]. A noter, une fois encore, que la microfluidique a permis de nettement faire évoluer les modèles afin de mimer le flux de filtration auquel sont soumises les cellules rénales [81]. L'utilisation de ces modèles devrait permettre de fournir de nouvelles données sur l'élimination des nanoparticules afin d'enrichir et faciliter la construction de modèles PBPK.

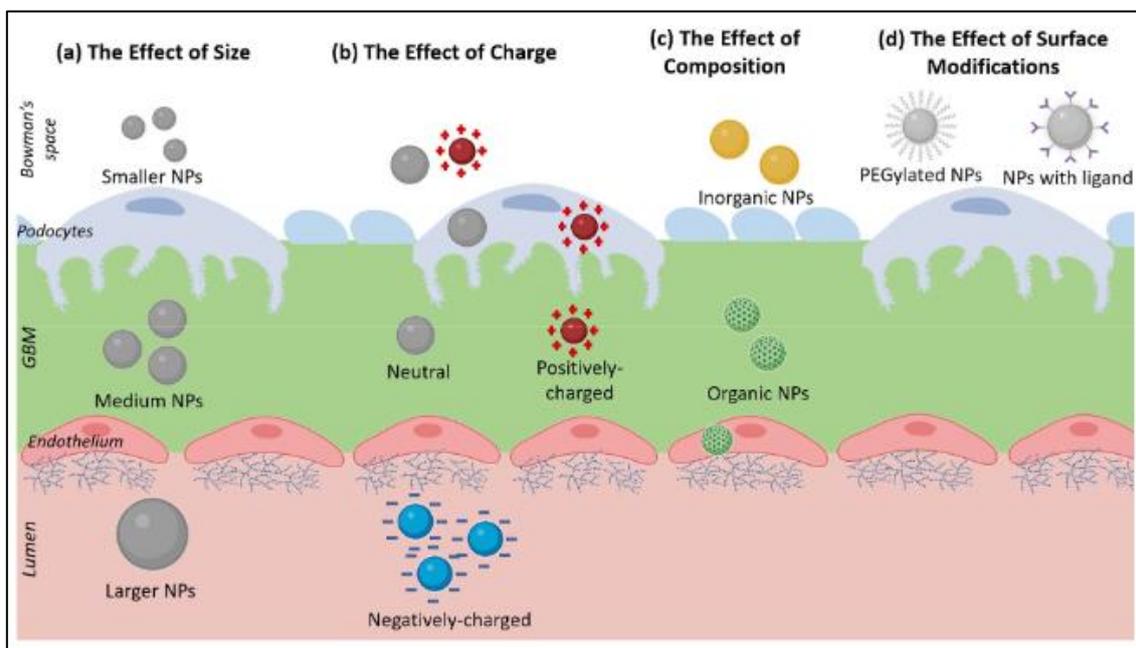


Figure 21. Schéma montrant les 4 principaux facteurs qui peuvent donner aux nanoparticules (NPs) la capacité de contourner la filtration glomérulaire. (Reproduite à partir de Adhipandito *et al.* [79])

(a) la taille ; (b) la charge ; (c) la composition des nanoparticules (organiques et inorganiques) ; (d) la modification de surface (PEGylation ou fonctionnalisation)

Au final, en plus de l'acquisition de connaissances fines sur chaque étape de la pharmacocinétique, l'approche de modélisation doit aussi évoluer. En effet, l'utilisation de modèles classiques semble insuffisante pour décrire la complexité de la pharmacocinétique des principes actifs encapsulés dans des nanomédicaments. Comme nous avons pu le décrire dans le **Chapitre 1**, tous les états et les compartiments de distribution du principe actif doivent être pris en compte [60]. Or, la plupart des modèles pharmacocinétiques ne distingue pas la pharmacocinétique du principe actif libre de celle du principe actif encapsulé dans le nanomédicament [60]. Cette distinction peut être modélisée en pharmacocinétique en utilisant des modèles semi-mécanistiques. Récemment, Carreño *et al.* ont proposé l'un des tous premiers modèles semi-mécanistiques pour la quétiapine encapsulée dans des NCLs. Ces travaux de modélisation sont d'autant plus intéressants que la cible thérapeutique se situe au niveau du cerveau, nécessitant donc le passage de la barrière hémato-encéphalique [82].

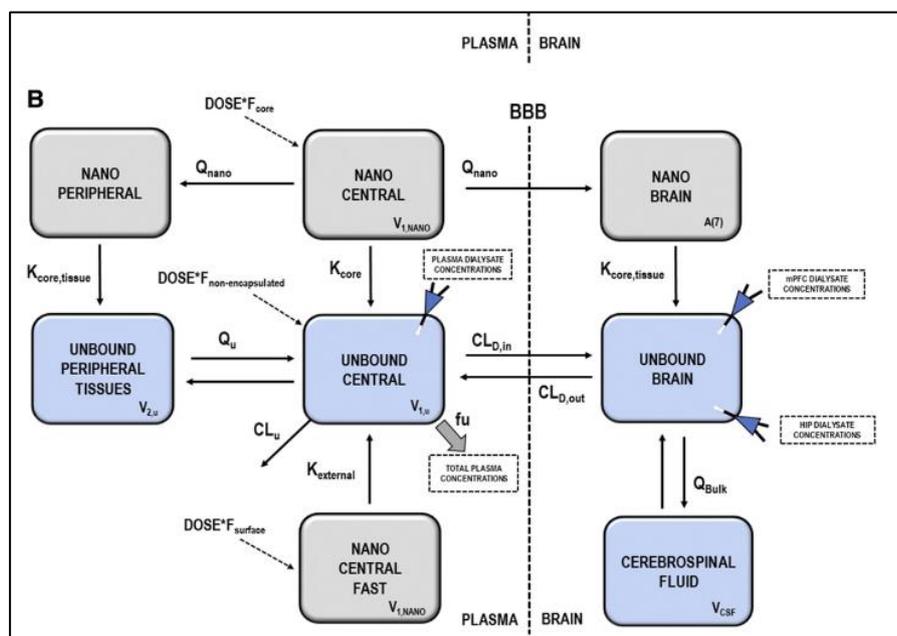


Figure 22. Représentation schématique du modèle final développé pour de la quétiapine encapsulée dans des NCLs après injection intraveineuse. (Reproduite à partir de Carreño *et al.* [82])

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail repose sur la mise au point et sur l'utilisation d'un certain nombre de techniques pour évaluer les nanoparticules *in vitro* et *in vivo*, en particulier les NCLs fabriquées au sein de notre laboratoire. Ces évaluations devaient permettre de mieux comprendre le comportement des NCLs après mise contact avec les milieux biologiques et leur devenir après administration dans un organisme vivant.

Au total six formulations de NCLs ont été étudiées, deux tailles (50 et 85 nm) et trois types de surfaces (PEG, normal et stéarylamine) procurant des charges de surface différentes (négative, neutre et positive respectivement).

L'étude *in vitro* de mise en contact des NCLs avec des protéines plasmatiques a permis de mettre en lumière les conséquences de la formation de la couronne de protéines sur les modifications des caractéristiques physicochimiques initiales. Tous les types de NCLs ont vu leur diamètre hydrodynamique significativement augmenté et leur charge de surface modifiée pour devenir électronégative quelle que soit la charge de départ.

Ce travail s'est poursuivi par une étude *in vivo* effectuée sur des rats de type Sprague-Dawley. Cette étude avait pour but d'évaluer la pharmacocinétique des NCLs sous leur forme intacte uniquement. Pour ce faire, une technique originale a été utilisée : celle-ci combine le dénombrement particulière *via* le NTA à la détection du signal FRET associant une paire de deux fluorophores. Ainsi, les concentrations particulières sanguines de NCLs-FRET intactes ont été mesurées permettant la construction d'un modèle pharmacocinétique (PK). Après une analyse non compartimentale, l'ensemble des données obtenues a été analysé par une approche populationnelle (PKpop) afin de mieux évaluer les covariables influençant la PK des NCLs. Cette analyse PKpop a révélé des résultats intéressants comme le volume de distribution (Vd) qui est dépendant de la taille des NCLs ou encore la clairance (Cl) qui dépend du type de surface des NCLs. En effet, plus la taille des NCLs diminue plus le Vd augmente. De plus, l'ajout de molécules de PEG augmente la clairance des NCLs de 50 nm, alors qu'elle diminue celle des NCLs de 85 nm. Ce dernier résultat est assez surprenant car la pégylation a, en théorie, pour but de diminuer l'opsonisation et donc de diminuer la clairance des NCLs. Si cela se vérifie pour les NCLs de 85 nm, c'est l'effet inverse qui est observé pour les NCLs de 50 nm qui disparaissent très rapidement de la circulation sanguine.

Bien qu'inattendu, ce résultat semble corroborer les résultats obtenus lors de l'étude *in vitro* puisque, pour ces mêmes NCLs 50 nm pégylées, il avait été observé, comparativement aux autres types de NCLs, une augmentation plus importante de leur diamètre hydrodynamique. Cela signifie que la quantité de protéines adsorbées, donc l'opsonisation, était bien supérieure

pour ces NCLs PEG de 50 nm par rapport aux autres. Cela peut s'expliquer par la forte densité de PEG par rapport au rayon de courbure. Il en résulte très probablement une organisation interfaciale des molécules PEG particulière qui pourrait être à l'origine de cette agrégation des protéines circulantes plus importante.

Afin d'explorer spécifiquement l'étape d'élimination et d'écarter toute hypothèse d'élimination rénale rapide par filtration directe, ce travail s'est achevé sur l'étude de l'élimination rénale des NCLs FRET. Cette étude a confirmé l'absence d'élimination rénale des NCLs FRET sous forme intacte. De ce fait, même un mécanisme de sécrétion tubulaire semble être inexistant pour ces NCLs.

L'ensemble de ces travaux a permis d'établir une certaine approche méthodologique pour évaluer le comportement des nanoparticules après mise en contact avec un milieu biologique et après administration intraveineuse chez le rongeur. Ces études très précoces semblent être la clé pour améliorer le passage de la phase préclinique à la phase clinique. Bien que leur utilisation pour les nanomédecines soit encore confidentielle, l'apport des modèles PBPK devrait sans nul doute aussi concourir à cette amélioration [83].

Enfin, à l'issue de ces résultats, il apparaît nécessaire de faire évoluer la manière de concevoir les nanoparticules. En effet, il semble à ce jour nécessaire de construire et designer les nanoparticules avec une approche « Quality-by-Design » [29,84,85]. La maîtrise des interactions avec les milieux biologiques apparaît comme indispensable pour améliorer le ciblage tout en optimisant la pharmacocinétique de celles-ci.

D'ailleurs, quelques travaux commencent à émerger pour créer des nanoparticules capables d'adsorber des protéines bien spécifiques devenant alors elles-mêmes responsables du ciblage thérapeutique recherché. Au final, c'est une étape de post-formulation *in situ* qui n'est qu'un pas de plus vers la médecine personnalisée [86,87].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.T. Florence, Nanotechnologies for site specific drug delivery: Changing the narrative, *Int. J. Pharm.* 551 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.023>.
- [2] S. Palchetti, D. Pozzi, A.L. Capriotti, G. La Barbera, R.Z. Chiozzi, L. Digiaco, G. Peruzzi, G. Caracciolo, A. Laganà, Influence of dynamic flow environment on nanoparticle-protein corona: From protein patterns to uptake in cancer cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 153 (2017) 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.037>.
- [3] D. Pozzi, G. Caracciolo, L. Digiaco, V. Colapicchioni, S. Palchetti, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, R. Zenezini Chiozzi, A. Puglisi, A. Laganà, The biomolecular corona of nanoparticles in circulating biological media, *Nanoscale.* 7 (2015) 13958–13966. <https://doi.org/10.1039/c5nr03701h>.
- [4] G. Dumas, S. Merceron, L. Zafrani, E. Canet, V. Lemiale, A. Kouatchet, E. Azoulay, Hyperviscosity syndrome, *Rev. Med. Interne.* 36 (2015) 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.02.005>.
- [5] A. Saluja, A. V. Badkar, D.L. Zeng, S. Nema, D.S. Kalonia, Ultrasonic storage modulus as a novel parameter for analyzing protein-protein interactions in high protein concentration solutions: Correlation with static and dynamic light scattering measurements, *Biophys. J.* 92 (2007) 234–244. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.095174>.
- [6] C. Curtis, M. McKenna, H. Pontes, D. Toghiani, A. Choe, E. Nance, Predicting: In situ nanoparticle behavior using multiple particle tracking and artificial neural networks, *Nanoscale.* 11 (2019) 22515–22530. <https://doi.org/10.1039/c9nr06327g>.
- [7] N.J. Braun, M.C. DeBrosse, S.M. Hussain, K.K. Comfort, Modification of the protein corona–nanoparticle complex by physiological factors, *Mater. Sci. Eng. C.* 64 (2016) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.059>.
- [8] A.C.G. Weiss, K. Kempe, S. Förster, F. Caruso, Microfluidic Examination of the “hard” Biomolecular Corona Formed on Engineered Particles in Different Biological Milieu, *Biomacromolecules.* 19 (2018) 2580–2594. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00196>.
- [9] L. Digiaco, S. Palchetti, F. Giulimondi, D. Pozzi, R. Zenezini Chiozzi, A.L. Capriotti, A. Laganà, G. Caracciolo, The biomolecular corona of gold nanoparticles in a controlled microfluidic environment, *Lab Chip.* 19 (2019) 2557–2567. <https://doi.org/10.1039/c9lc00341j>.
- [10] M. Mahmoudi, S.E. Lohse, C.J. Murphy, A. Fathizadeh, A. Montazeri, K.S. Suslick, Variation of protein corona composition of gold nanoparticles following plasmonic heating, *Nano Lett.* 14 (2014) 6–12. <https://doi.org/10.1021/nl403419e>.
- [11] M. Mahmoudi, Debugging Nano–Bio Interfaces: Systematic Strategies to Accelerate Clinical Translation of Nanotechnologies, *Trends Biotechnol.* 36 (2018) 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.014>.
- [12] L.K. Müller, J. Simon, C. Rosenauer, V. Mailänder, S. Morsbach, K. Landfester, The Transferability from Animal Models to Humans: Challenges Regarding Aggregation and Protein Corona Formation of Nanoparticles, *Biomacromolecules.* 19 (2018) 374–385. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01472>.
- [13] S. Schöttler, K. Klein, K. Landfester, V. Mailänder, Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake, *Nanoscale.* 8 (2016) 5526–5536. <https://doi.org/10.1039/c5nr08196c>.
- [14] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K.A. Dawson, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>.

- [15] D.J. Sobczynski, O. Eniola-Adefeso, Effect of anticoagulants on the protein corona-induced reduced drug carrier adhesion efficiency in human blood flow, *Acta Biomater.* 48 (2017) 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.023>.
- [16] D. Chen, S. Ganesh, W. Wang, M. Amiji, Plasma protein adsorption and biological identity of systemically administered nanoparticles, *Nanomedicine.* 12 (2017) 2113–2135. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0178>.
- [17] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S.K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R.H. Stauber, Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis, *ACS Nano.* 5 (2011) 7155–7167. <https://doi.org/10.1021/nn201950e>.
- [18] A.L. Capriotti, G. Caracciolo, G. Caruso, C. Cavaliere, D. Pozzi, R. Samperi, A. Laganà, Label-free quantitative analysis for studying the interactions between nanoparticles and plasma proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 635–645. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5691-y>.
- [19] V. Lebreton, N. Kaeokhamloed, A. Vasylaki, G. Hilairret, A. Mellinger, J. Béjaud, P. Saulnier, F. Lagarce, F. Gattacceca, S. Legeay, E. Roger, Pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules using new quantitative FRET technique, *J. Control. Release.* 351 (2022) 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.057>.
- [20] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Nat. Ac. Sci.* 104 (2007) 2050-2055. www.pnas.org/cgi/content/full/.
- [21] R. García-álvarez, M. Vallet-Regí, Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance, *Nanomaterials.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11040888>.
- [22] O. Vilanova, J.J. Mittag, P.M. Kelly, S. Milani, K.A. Dawson, J.O. Rädler, G. Franzese, Understanding the Kinetics of Protein-Nanoparticle Corona Formation, *ACS Nano.* 10 (2016) 10842–10850. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04858>.
- [23] G. Brusotti, E. Calleri, R. Colombo, G. Massolini, F. Rinaldi, C. Temporini, Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review, *Chromatographia.* 81 (2018) 3–23. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3380-5>.
- [24] C. Weber, S. Morsbach, K. Landfester, Possibilities and Limitations of Different Separation Techniques for the Analysis of the Protein Corona, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 58 (2019) 12787–12794. <https://doi.org/10.1002/anie.201902323>.
- [25] I.K. Ventouri, S. Loeber, G.W. Somsen, P.J. Schoenmakers, A. Astefanei, Field-flow fractionation for molecular-interaction studies of labile and complex systems: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 1193 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339396>.
- [26] M. Wagner, S. Holzschuh, A. Traeger, A. Fahr, U.S. Schubert, Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5201–5210. <https://doi.org/10.1021/ac501664t>.
- [27] J. Ashby, S. Schachermeyer, S. Pan, W. Zhong, Dissociation-based screening of nanoparticle-protein interaction via flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7494–7501. <https://doi.org/10.1021/ac401485j>.
- [28] A.A. Halwani, Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010106>.

- [29] S. Đorđević, M.M. Gonzalez, I. Conejos-Sánchez, B. Carreira, S. Pozzi, R.C. Acúrcio, R. Satchi-Fainaro, H.F. Florindo, M.J. Vicent, Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic, *Drug Deliv. Transl. Res.* 12 (2022) 500–525. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01024-2>.
- [30] F. Caputo, J. Clogston, L. Calzolari, M. Rösslein, A. Prina-Mello, Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity, *J. Control. Release.* 299 (2019) 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>.
- [31] K. Fischer, M. Schmidt, Pitfalls and novel applications of particle sizing by dynamic light scattering, *Biomaterials.* 98 (2016) 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.003>.
- [32] S.B. Rice, C. Chan, S.C. Brown, P. Eschbach, L. Han, D.S. Ensor, A.B. Stefaniak, J. Bonevich, A.E. Vladár, A.R.H. Walker, J. Zheng, C. Starnes, A. Stromberg, J. Ye, E.A. Grulke, Particle size distributions by transmission electron microscopy: An interlaboratory comparison case study, *Metrologia.* 50 (2013) 663–678. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/50/6/663>.
- [33] P.L. Stewart, Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 9 (2017). <https://doi.org/10.1002/wnan.1417>.
- [34] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, T.L. Andresen, Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: An integrated analysis and perspective, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 481–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>.
- [35] B. Du, M. Yu, J. Zheng, Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys, *Nat. Rev. Mater.* 3 (2018) 358–374. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0038-3>.
- [36] S. Su, P.M. Kang, Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine, *Nanomaterials.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10040656>.
- [37] S. Bonnet, R. Elfatairi, F. Franconi, E. Roger, S. Legeay, Organic nanoparticle tracking during pharmacokinetic studies, *Nanomedicine.* 16 (2021) 2539–2536. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0155>.
- [38] J. Garcia-Amorós, S. Tang, Y. Zhang, E.R. Thapaliya, F.M. Raymo, Self-Assembling Nanoparticles of Amphiphilic Polymers for In Vitro and In Vivo FRET Imaging, *Top. Curr. Chem.* (2016) 29–60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22942-3_2.
- [39] R. Bouchaala, L. Mercier, B. Andreiuk, Y. Mély, T. Vandamme, N. Anton, J.G. Goetz, A.S. Klymchenko, Integrity of lipid nanocarriers in bloodstream and tumor quantified by near-infrared ratiometric FRET imaging in living mice, *J. Control. Release.* 236 (2016) 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.027>.
- [40] J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J.P. Benoît, J.L. Coll, I. Texier, FRET imaging approaches for in vitro and in vivo characterization of synthetic lipid nanoparticles, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 3133–3144. <https://doi.org/10.1021/mp500329z>.
- [41] H. Chen, S. Kim, W. He, H. Wang, P.S. Low, K. Park, J.X. Cheng, Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo Förster resonance energy transfer imaging, *Langmuir.* 24 (2008) 5213–5217. <https://doi.org/10.1021/la703570m>.
- [42] S. Zhang, H. Gao, G. Bao, Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis, *ACS Nano.* 9 (2015) 8655–8671. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>.
- [43] S. Bonnet, R. Elfatairi, F. Franconi, E. Roger, S. Legeay, Organic nanoparticle tracking during pharmacokinetic studies, *Nanomedicine.* 16 (2021) 2539–2563. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0155>.

- [44] N. Kaeokhamloed, S. Legeay, E. Roger, FRET as the tool for in vivo nanomedicine tracking, *J. Control. Release.* 349 (2022) 156–173. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.06.048>.
- [45] L. Sardelli, D.P. Pacheco, A. Zicarelli, M. Tunesi, O. Caspani, A. Fusari, F. Briatico Vangosa, C. Giordano, P. Petrini, Towards bioinspired: In vitro models of intestinal mucus, *RSC Adv.* 9 (2019) 15887–15899. <https://doi.org/10.1039/c9ra02368b>.
- [46] S. Langereis, J. Keupp, J.L.J. Van Velthoven, I.H.C. De Roos, D. Burdinski, J.A. Pikkemaat, H. Grull, A temperature-sensitive liposomal 1H CEST and 19F contrast agent for MR image-guided drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1380–1381. <https://doi.org/10.1021/ja8087532>.
- [47] G. Yang, Y. Liu, J. Teng, C.-X. Zhao, FRET Ratiometric Nanoprobes for Nanoparticle Monitoring, *Biosensors.* 11 (2021) 505. <https://doi.org/10.3390/bios11120505>.
- [48] R.F. Chen, Fluorescence Stopped-Flow Study of Relaxation Processes in the Binding of Bilirubin to Serum Albumins, *Arch Bioch. and Bioph.* 112 (1974) 106-112.
- [49] M.S. Valic, M. Halim, P. Schimmer, G. Zheng, Guidelines for the experimental design of pharmacokinetic studies with nanomaterials in preclinical animal models, *J. Control. Release.* 323 (2020) 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.002>.
- [50] R.J. Probst, J.M. Lim, D.N. Bird, G.L. Pole, A.K. Sato, J.R. Claybaugh, Gender Differences in the Blood Volume of Conscious Sprague-Dawley Rats, *J Am. Ass. Lab Anim. Sci.* 45 (2006) 49-52
- [51] Abbot A., Return of the rat, *Nature.* 469 (2009) 788–789. <https://doi.org/10.1038/460788a>.
- [52] J. Russell Lindsey, *The Laboratory Rat*, Elsevier, (1979) 1-36. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-10325>.
- [53] Y. Garcia-Sifuentes, D.L. Maney, Reporting and misreporting of sex differences in the biological sciences, *Life* (2021). <https://doi.org/10.7554/eLife>.
- [54] A.C. Groo, M. Bossiere, L. Trichard, P. Legras, J.P. Benoit, F. Lagarce, In vivo evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomedicine.* 10 (2015) 589-601. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.124>.
- [55] E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J. Benoit, Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis, *J. Control. Release.* 140 (2009) 174-181. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.08.010.
- [56] E. Roger, J.C. Gimel, C. Bensley, A.S. Klymchenko, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model, *J. Control. Release.* 253 (2017) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.005>.
- [57] N. Kaeokhamloed, E. Roger, J. Béjaud, N. Lautram, F. Manero, R. Perrot, C. Abbara, M. Briet, S. Legeay, New in vitro coculture model for evaluating intestinal absorption of different lipid nanocapsules, *Pharmaceutics.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050595>.
- [58] T. Ishida, H. Kiwada, Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.005>.
- [59] A.S. Abu Lila, H. Kiwada, T. Ishida, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage, *J. Control. Release.* 172 (2013) 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.026>.
- [60] V. Lebreton, S. Legeay, P. Saulnier, F. Lagarce, Specificity of pharmacokinetic modeling of nanomedicines, *Drug Discov. Today.* 26 (2021) 2259–2268. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.04.017>.

- [61] M. Kumar, P. Kulkarni, S. Liu, N. Chemuturi, D.K. Shah, Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 194 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114708>.
- [62] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine.* 11 (2016) 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>.
- [63] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [64] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K.A. Dawson, The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century, *Adv. Colloid Interface Sci.* 134–135 (2007) 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.021>.
- [65] V.P. Zhdanov, N.J. Cho, Kinetics of the formation of a protein corona around nanoparticles, *Math. Biosci.* 282 (2016) 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2016.09.018>.
- [66] G. Caracciolo, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.011>.
- [67] D.E. Owens, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- [68] P. Sánchez-Moreno, P. Buzón, H. Boulaiz, J.M. Peula-García, J.L. Ortega-Vinuesa, I. Luque, A. Salvati, J.A. Marchal, Balancing the effect of corona on therapeutic efficacy and macrophage uptake of lipid nanocapsules, *Biomaterials.* 61 (2015) 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.049>.
- [69] C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W.C.W. Chan, Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>.
- [70] K. Saha, M. Rahimi, M. Yazdani, S.T. Kim, D.F. Moyano, S. Hou, R. Das, R. Mout, F. Rezaee, M. Mahmoudi, V.M. Rotello, Regulation of Macrophage Recognition through the Interplay of Nanoparticle Surface Functionality and Protein Corona, *ACS Nano.* 10 (2016) 4421–4430. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00053>.
- [71] K. Partikel, R. Korte, N.C. Stein, D. Mulac, F.C. Herrmann, H.U. Humpf, K. Langer, Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 141 (2019) 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.006>.
- [72] Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Muller RH, ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEGchain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surfaces B.* 18 (2000) 301–313.
- [73] L.Q. Jiang, T.Y. Wang, Y. Wang, Z.Y. Wang, Y.T. Bai, Co-disposition of chitosan nanoparticles by multi types of hepatic cells and their subsequent biological elimination: The mechanism and kinetic studies at the cellular and animal levels, *Int. J. Nanomedicine.* 14 (2019) 6035–6060. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208496>.
- [74] H. Wang, C.A. Thorling, X. Liang, K.R. Bridle, J.E. Grice, Y. Zhu, D.H.G. Crawford, Z.P. Xu, X. Liu, M.S. Roberts, Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 939–958. <https://doi.org/10.1039/C4TB01611D>.
- [75] E. Wisse, F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik, B. De Geest, The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer, *Gene Ther.* 15 (2008) 1193–1199. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.60>.

- [76] J.K. Park, T. Utsumi, Y.E. Seo, Y. Deng, A. Satoh, W.M. Saltzman, Y. Iwakiri, Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12 (2016) 1365–1374. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.013>.
- [77] G.H. Zhu, A.B.C. Gray, H.K. Patra, *Nanomedicine: controlling nanoparticle clearance for translational success*, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 709–711. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.05.001>.
- [78] V. Naumenko, A. Nikitin, K. Kapitanova, P. Melnikov, S. Vodopyanov, A. Garanina, M. Valikhov, A. Ilyasov, D. Vishnevskiy, A. Markov, S. Golyshev, D. Zhukov, I. Alieva, M. Abakumov, V. Chekhonin, A. Majouga, Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney, *J. Control. Release.* 307 (2019) 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.026>.
- [79] C.F. Adhipandito, S.H. Cheung, Y.H. Lin, S.H. Wu, Atypical renal clearance of nanoparticles larger than the kidney filtration threshold, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222011182>.
- [80] K. Ebefors, E. Lassén, N. Anandakrishnan, E.U. Azeloglu, I.S. Daehn, Modeling the Glomerular Filtration Barrier and Intercellular Crosstalk, *Front. Physiol.* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.689083>.
- [81] S.N. Bhatia, D.E. Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 760–772. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>.
- [82] F. Carreño, V.E. Helfer, K.J. Staudt, L.B. Olivo, K. Paese, F.S. Meyer, A.P. Herrmann, S.S. Guterres, S.M.K. Rates, I. Trocóniz, T.D. Costa, Semi-mechanistic pharmacokinetic modeling of lipid core nanocapsules: Understanding quetiapine plasma and brain disposition in a neurodevelopmental animal model of schizophrenia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 375 (2020) 49–58. <https://doi.org/10.1124/JPET.120.000109>.
- [83] M. Li, P. Zou, K. Tyner, S. Lee, Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles, *AAPS J.* (2017). <https://doi.org/10.1208/s12248-016-0010-3>.
- [84] S. Soares, J. Sousa, A. Pais, C. Vitorino, *Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues*, *Front. Chem.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>.
- [85] H. He, L. Liu, E.E. Morin, M. Liu, A. Schwendeman, Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines - Lessons Learned from Successes and Failures, *Acc. Chem. Res.* 52 (2019) 2673–2683. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00228>.
- [86] V. Colapicchioni, M. Tilio, L. Digiacomo, V. Gambini, S. Palchetti, C. Marchini, D. Pozzi, S. Occhipinti, A. Amici, G. Caracciolo, Personalized liposome-protein corona in the blood of breast, gastric and pancreatic cancer patients, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 75 (2016) 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.09.002>.
- [87] J. Ren, R. Cai, J. Wang, M. Daniyal, D. Baimanov, Y. Liu, D. Yin, Y. Liu, Q. Miao, Y. Zhao, C. Chen, Precision Nanomedicine Development Based on Specific Opsonization of Human Cancer Patient-Personalized Protein Coronas, *Nano Lett.* 19 (2019) 4692–4701. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01774>.

RÉSUMÉ

L'administration de nanoparticules (NPs) dans le compartiment sanguin entraîne des modifications des caractéristiques physico-chimiques à l'origine de variabilités pharmacocinétiques (PK) des NPs. La maîtrise des interactions NPs-protéines conduisant à la formation de la couronne de protéines apparaît comme essentielle pour comprendre le devenir des NPs après administration et ceci pour améliorer le passage de la préclinique à la clinique, un challenge toujours difficile pour les NPs au regard du nombre de nanomédicaments disponibles sur le marché.

Le présent travail met en avant l'importance de la maîtrise de la caractérisation physico-chimique des nanocapsules lipidiques (NCLs) et ses modifications après mise contact avec le plasma. Pour la première fois, l'effet de la pégylation des NCLs (50 nm) a mis en évidence une importante adsorption des protéines. Après marquage à l'aide de deux fluorophores pour rendre visibles les structures intactes à l'aide de transfert d'énergie par résonance de fluorescence, les NCLs ont été injectées par voie intraveineuse chez le rat pour en évaluer leur PK. L'analyse PK par approche populationnelle a permis d'estimer l'effet d'un certain nombre de covariables. Deux covariables influencent le modèle final, la taille, qui modifie le volume de distribution, et le type de surface, qui modifie la clairance. En effet, les NCLs pégyliées de 50 nm ont rapidement été éliminées. Enfin, l'élimination rénale a fait l'objet d'une étude particulière qui n'a pas révélé d'élimination des NCLs sous leur forme intacte.

Mots-clés : Nanocapsules lipidiques ; couronne de protéines ; FRET ; pharmacocinétique

ABSTRACT

The administration of nanoparticles in the blood compartment causes modifications of the physico-chemical characteristics and thus pharmacokinetic (PK) variabilities. The control of these nanoparticles-protein interactions responsible for the formation of the protein corona appears to be essential for understanding the *in vivo* fate of nanoparticles. This aims to improve transition from preclinical to clinical use, which is always a challenge for nanoparticles given the number of nanomedicines available on the market.

The present PhD work highlights the importance of controlling the physicochemical characterisation of lipid nanocapsules (LNCs) and their modifications after contact with proteins. For the first time, the effect of PEG surface decoration of the NCLs (50 nm) revealed a significant adsorption of proteins. Then, after labelling using fluorophores and performing fluorescence resonance energy transfer (FRET), NCLs-FRET were intravenously injected in rats to evaluate their PK profile. The PK analysis using a population approach allowed to estimate the effect of some covariates. Two covariates influence the final model, size, which modifies the volume of distribution, and surface type, which impacts the clearance of NCLs. Indeed, 50 nm pegylated NCLs were rapidly eliminated. As a result, renal elimination was specifically studied, and the results did not reveal any urine elimination of NCLs in their intact form.

Finally, this methodological approach could be used to evaluate the protein adsorption capacities and PK of nanoparticles.

Keywords : Lipid nanocapsules; protein corona ; FRET ; pharmacokinetic

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Impact des milieux biologiques sur les nanocapsules lipidiques et évaluation pharmacocinétique

Mots clés : Nanocapsules lipidiques ; couronne de protéine ; FRET ; pharmacocinétique

Résumé : L'administration de nanoparticules (NPs) dans le compartiment sanguin entraîne des modifications des caractéristiques physico-chimiques à l'origine de variabilités pharmacocinétiques (PK) des NPs. La maîtrise des interactions NPs-protéines conduisant à la formation de la couronne de protéines apparaît comme essentielle pour comprendre le devenir des NPs après administration et ceci pour améliorer le passage de la préclinique à la clinique, un challenge toujours difficile pour les NPs au regard du nombre de nanomédicaments disponibles sur le marché. Le présent travail met en avant l'importance de la maîtrise de la caractérisation physico-chimique des nanocapsules lipidiques (NCLs) et ses modifications après mise contact avec le plasma. Pour la première fois, l'effet de la pégylation des NCLs (50 nm) a mis en évidence une importante adsorption des protéines.

Après marquage à l'aide de deux fluorophores pour rendre visibles les structures intactes à l'aide de transfert d'énergie par résonance de fluorescence, les NCLs ont été injectées par voie intraveineuse chez le rat pour en évaluer leur PK. L'analyse PK par approche populationnelle a permis d'estimer l'effet d'un certain nombre de covariables. Deux covariables influencent le modèle final : la taille, qui modifie le volume de distribution, et le type de surface, qui modifie la clairance. En effet, les NCLs pégyliées de 50 nm ont rapidement été éliminées. Enfin, l'élimination rénale a fait l'objet d'une étude particulière qui n'a pas révélé d'élimination des NCLs sous leur forme intacte.

Au final, cette approche méthodologique pourra être utilisée pour évaluer les capacités d'adsorption des protéines et la PK des NPs.

Titre : Impact of biological media on lipid nanocapsules and pharmacokinetic evaluation

Keywords : Lipid nanocapsules; protein corona ; FRET ; pharmacokinetic

Abstract : The administration of nanoparticles in the blood compartment causes modifications of the physico-chemical characteristics and thus pharmacokinetic (PK) variabilities. The control of these nanoparticles-protein interactions responsible for the formation of the protein corona appears to be essential for understanding the in vivo fate of nanoparticles. This aims to improve transition from preclinical to clinical use, which is always a challenge for nanoparticles given the number of nanomedicines available on the market. The present PhD work highlights the importance of controlling the physicochemical characterisation of lipid nanocapsules (LNCs) and their modifications after contact with proteins. For the first time, the effect of PEG surface decoration of the NCLs (50 nm) revealed a significant adsorption of proteins.

Then, after labelling using fluorophores and performing fluorescence resonance energy transfer (FRET), NCLs-FRET were intravenously injected in rats to evaluate their PK profile. The PK analysis using a population approach allowed to estimate the effect of some covariates. Two covariates influence the final model, size, which modifies the volume of distribution, and surface type, which impacts the clearance of NCLs. Indeed, 50 nm pegylated NCLs were rapidly eliminated. As a result, renal elimination was specifically studied, and the results did not reveal any urine elimination of NCLs in their intact form. Finally, this methodological approach could be used to evaluate the protein adsorption capacities and pharmacokinetics of nanoparticles..