



SPIM

Thèse de Doctorat



école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Développement de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs

 SKANDARANI NADIA

SPIM

Thèse de Doctorat



école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Spécialité : Sciences pour l'ingénieur

Développement de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs

SKANDARANI NADIA

Soutenue le 17 Décembre 2014

Directeurs de thèse :

M. Hatem BOULAHDOUR, Professeur, Université de Franche-Comté

M. Rabah BOUKHERROUB, Directeur de recherche, CNRS

Rapporteurs :

M. Jean-Olivier DURAND, Directeur de recherche, Université de Montpellier II

Mme. Chantal PICHON, Professeur, Université d'Orléans

Examineurs :

Mme. Souad AMMAR, Professeur, Université de Paris Diderot

M. Tijani GHARBI, Professeur, Université de Franche-Comté

Table des matières

Résumé	1
Abréviations	2
Introduction générale.....	6
Chapitre 1. Les nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs	8
A. Introduction bibliographique.....	8
1. Les nanovecteurs de principes actifs.....	8
1.1. Définition	8
1.2. Les liposomes	10
1.3. Les nanoparticules polymériques.....	12
1.4. Les dendrimères	13
1.5. Les nanoparticules inorganiques.....	15
2. Stratégies de ciblage	16
2.1. Ciblage passif.....	16
2.1.1. Effet de rétention et perméabilité accrues	16
2.1.2. Relargage localisé	17
2.2. Ciblage actif.....	17
3. Internalisation cellulaire des nanoparticules	18
4. Toxicité des nanovecteurs de principes actifs.....	20
5. Conclusion	22
B. Objectifs du travail.....	22
C. Les nanocapsules lipidiques	23
1. Formulation des nanocapsules lipidiques.....	24
2. Caractérisations des nanocapsules lipidiques.....	26
2.1. Diffusion dynamique de la lumière	26
2.2. Microscopie électroniques en transmission.....	28

3. Etude de la stabilité des nanocapsules lipidiques	29
3.1. Stabilité au cours du stockage	29
3.2. Stabilité dans les milieux biologiques	30
3.3. Evolution des caractéristiques des nanocapsules lipidiques à différents pH	31
4. Etude de la toxicité des nanocapsules lipidiques <i>in vitro</i>	33
5. Etude de l'internalisation des nanocapsules lipidiques	34
5.1. Marquage fluorescent des nanocapsules lipidiques	34
5.2. Caractérisations des nanocapsules fluorescentes	35
5.3. Internalisation des nanocapsules fluorescentes	37
5.3.1. Microscopie à fluorescence	37
5.3.2. Microscopie électronique en transmission	41
6. Conclusion.....	41
Références bibliographiques	43
Chapitre 2. Les nanocapsules cationiques : vectorisation de plasmide ADN et principe actif	47
A. Introduction bibliographique	47
1. La thérapie génique	47
1.1. Les vecteurs de la transfection	48
1.1.1 L'ADN nu	48
1.1.2 Les vecteurs viraux.....	49
1.1.3 Les vecteurs non viraux.....	50
1.1.3.1 Les polymères cationiques	50
1.1.3.2 Les lipides cationiques	54
1.1.3.3 Les nanoparticules.....	56
1.2. Les obstacles à franchir lors de la transfection	60
1.2.1. Internalisation des complexes	60
1.2.2. Sortie de l'endosome.....	61
1.2.3. Stabilité de l'ADN dans le cytoplasme	62
1.2.4. Entrée dans le noyau	62
2. Conclusion.....	63
B. Objectifs du travail	63
C. Les nanocapsules lipidiques cationiques.....	63
1. Préparation des nanocapsules lipidiques cationiques.....	63

1.1. Encapsulation du paclitaxel.....	66
2. Caractérisations des nanocapsules cationiques	68
2.1. Diffusion dynamique de la lumière	68
2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance	69
2.3. Détermination de la capacité tampon	70
3. Les complexes nanocapsules lipidiques cationiques/ADN	71
3.1. Préparation des complexes nanocapsules cationiques/ADN.....	71
3.2. Caractérisations des complexes nanocapsules cationiques/ADN	72
3.2.1. Diffusion dynamique de la lumière	72
3.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	74
3.2.2.1. Etude de la dégradation de l'ADN par la DNase I	75
3.3. Etude de la cytotoxicité des complexes nanocapsules cationiques/ADN	75
3.4. Etude de la transfection des complexes nanocapsules cationiques/ADN	77
3.5. Etude du relargage du paclitaxel	79
3.5.1. Etude de l'apoptose induite par le paclitaxel	80
3.5.2. Etude de la vectorisation du paclitaxel avec les complexes NCL/ADN	82
4. Conclusion.....	83
Références bibliographiques	84
Chapitre 3. Les nanocapsules lipidiques pour la thérapie photodynamique.....	88
A. Introduction bibliographique.....	88
1. La thérapie photodynamique	88
1.1. Définition et principe	89
1.2. Génération d'oxygène singlet.....	90
1.3. Utilisation des nanoparticules pour la thérapie photodynamique	91
1.3.1. Les nano-formulations à base de porphyrines.....	91
1.3.2. Les nano-formulations à base de chlorines	92
1.3.3. Les nano-formulations à base de phtalocyanines	93
1.3.4. Les nano-formulations à base d'autres types de PS	94
1.4. Localisation intracellulaire des photosensibilisateurs	95
1.4.1. Les lysosomes	97
1.4.2. Les mitochondries	97
1.4.3. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique	97
1.5. Mécanismes de destruction des tumeurs causée par la thérapie photodynamique	98

1.5.1. Effets directs.....	98
1.5.2. Effets indirects.....	100
1.6. Nouvelles stratégies en thérapie photodynamique	101
2. Conclusion.....	102
B. Objectifs du travail.....	102
C. Les nanocapsules lipidiques chargées en photosensibilisateurs	103
1. Préparation des nanocapsules chargées en photosensibilisateurs.....	103
2. Caractérisations des nanocapsules chargées en photosensibilisateurs	107
2.1. Diffusion dynamique de la lumière	107
2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance	108
2.3. Spectroscopie en UV-visible	108
2.4. Spectroscopie en fluorescence	111
3. Génération d'oxygène singulet.....	112
3.1. Rendement quantique de génération d'oxygène singulet.....	113
4. Etude du photo-blanchiment des nanocapsules chargées en photosensibilisateurs ...	115
5. Etudes biologiques <i>in vitro</i>	117
5.1. Photo-toxicité des nanocapsules chargées en photosensibilisateurs	117
5.2. Analyse du cycle cellulaire de l'ADN.....	121
5.3. Localisation intracellulaire des nanocapsules chargées en photosensibilisateurs ..	124
6. Conclusion.....	127
Références bibliographiques	128
Chapitre 4. Ciblage des canaux ioniques TRPM8 avec les nanocapsules lipidiques	131
A. Introduction bibliographique.....	131
1. Les canaux ioniques	131
1.1. La superfamille des canaux TRP.....	132
1.1.1. Le canal TRPM8	134
1.1.2. TRPM8 et le cancer de la prostate	135
1.1.2.1. Les agonistes	136
1.1.2.2. Les antagonistes	138
2. Utilisation des nanoparticules pour le ciblage des canaux ioniques	140
B. Objectifs du travail.....	142
C. Les nanocapsules lipidiques chargées en menthol.....	142
1. Préparation et caractérisation des nanocapsules chargées en menthol.....	143

2. Etudes biologiques <i>in vitro</i>	143
2.1. Microscopie à fluorescence.....	143
2.2. Imagerie calcique.....	146
3. Conclusion.....	150
Références bibliographiques	152
Conclusion générale et Perspectives	154
Partie expérimentale	161
1. Matériels.....	161
2. Techniques expérimentales	161
2.1. Diffusion dynamique de la lumière.....	161
2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance	162
2.3. Spectroscopie en UV-visible.....	162
2.4. Spectroscopie en fluorescence	162
2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	162
2.6. Microscopie confocale à fluorescence	163
2.7. Cytométrie de flux.....	163
2.8. Microscopie calcique.....	164
3. Préparation des nanocapsules lipidiques	166
3.1. Encapsulation de principes actifs	167
3.2. Préparation des nanocapsules lipidiques cationiques.....	168
3.3. Préparation des complexes nanocapsules cationiques/ADN.....	168
4. Purification des nanocapsules lipidiques.....	168
5. Caractérisations des nanocapsules lipidiques.....	169
5.1. Détermination de la taille et la charge de surface des nanocapsules.....	169
5.2. Détermination de la taille et la charge de surface des complexes NCL/ADN	169
5.3. Détermination de la morphologie des nanocapsules lipidiques	169
5.4. Détermination du taux d'encapsulation de principes actifs	169
5.5. Détermination de la capacité tampon	170
5.6. Détermination de la force de liaison des nanocapsules cationiques avec l'ADN	170
5.7. Etude de la protection de l'ADN de la DNase I.....	171
5.8. Etude du photo-blanchiment des nanocapsules chargées en PS	171
6. Etudes biologiques <i>in vitro</i>	171

6.1. Culture cellulaire	171
6.2. Test de prolifération cellulaire MTT	172
6.2.1. Cytotoxicité des nanocapsules	172
6.2.2. Cytotoxicité des complexes NCL/ADN	173
6.2.3. Etude du relargage du paclitaxel	173
6.2.4. Photo-toxicité des nanocapsules chargées en PS	174
6.3. Observation des nanocapsules par microscopie à fluorescence	174
6.4. Observation des nanocapsules par microscopie électronique en transmission ...	174
6.5. Imagerie calcique	175
6.6. Etude de la transfection	175
6.6.1. Microscopie confocale à fluorescence	175
6.6.2. Cytométrie de flux.....	175
6.7. Etude de l'apoptose induite par le paclitaxel	176
6.8. Etude du cycle cellulaire de l'ADN	176
6.9. Localisation intracellulaire des nanocapsules chargées en PS	176
7. Génération d'oxygène singulet.....	177
Références bibliographiques	178

Annexe

Résumé

Le développement des nanotechnologies dans le domaine médical a suscité un engouement considérable ces dernières années, notamment l'utilisation de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs. En effet, les nanoparticules offrent des perspectives uniques pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs qu'ils soient des gènes (thérapie génique), des anti-cancéreux (chimiothérapie) ou encore des agents photosensibilisateurs (Thérapie photodynamique, TPD). Le défi majeur reste cependant l'acheminement des molécules thérapeutiques jusqu'à leur site d'action, tout en gardant leur intégrité ainsi que leur effet thérapeutique.

L'axe de recherche de cette thèse est l'utilisation des nanocapsules lipidiques comme plateforme multifonctionnelle pour la délivrance de principes actifs. Un des objectifs étant le développement de nanocapsules lipidiques, stables de point de vue physico-chimique, et fonctionnalisées avec du polyéthylèneimine capables de délivrer efficacement un plasmide ADN et un anti-cancéreux (paclitaxel) dans le cadre d'une thérapie combinée. Les applications de ces nanovecteurs pour la transfection de gènes et la vectorisation de chimiothérapeutique *in vitro* ont été réalisées.

Par ailleurs, l'aptitude de nanocapsules lipidiques à vectoriser des agents photosensibilisants pour la thérapie photodynamique a été aussi étudiée *in vitro*, et les résultats ont montré que l'encapsulation de deux molécules PS dans les nanocapsules permet une synergie de l'effet photodynamique tout en gardant les propriétés physico-chimiques de chaque PS intactes.

Enfin, l'encapsulation d'un agoniste au canal ionique TRPM8, le menthol, fait l'objet du dernier chapitre. L'étude par imagerie calcique du relargage de cette molécule lipophile *in vitro* a permis de confirmer le potentiel des NCL comme nanovecteurs de principes actifs.

Mots-clés : Nanocapsules lipidiques (NCL), transacylation, transfection, thérapie photodynamique (TPD), photosensibilisateurs (PS), canal TRPM8, menthol.

Abstract

The development of nanotechnology in the medical field has attracted considerable interest in recent years, including the use of nanoparticles for drug delivery. Indeed, nanoparticles offer unique opportunities for drug delivery such as genes (gene therapy), anti-cancer (chemotherapy) photosensitizers (photodynamic therapy, PDT). The major challenge, however, remains the delivery of therapeutic molecules to their site of action while keeping their integrity and their therapeutic effect.

The research focus of this thesis is the use of lipid nanocapsules as a multifunctional platform for the delivery of drugs. One goal is the development of stable lipid nanocapsules, functionalized with polyethyleneimine and capable of effectively delivering a plasmid DNA and an anti-cancer (paclitaxel) as part of a combination therapy. The applications of these nanocarriers for transfection and delivery of chemotherapeutic were performed *in vitro*.

Moreover, the ability of lipid nanocapsules to encapsulate photosensitizers for photodynamic therapy has been studied *in vitro*, and the results showed that the encapsulation of two molecules of PS in the nanocapsules allows a synergy photodynamic effect while protecting the PS from photo degradation.

Finally, encapsulating an ion channel TRPM8 agonist (menthol) is the subject of the last chapter. The study by calcium imaging of the release of this lipophilic molecule *in vitro* confirmed the potential of lipid nanocapsules as nanocarriers of drugs.

Keywords: Lipid nanocapsules (LNC), transacylation, transfection, photodynamic therapy (PDT), photosensitizers (PS), channel TRPM8, menthol.

Liste des abréviations

A

Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNp	Acide désoxyribonucléique plasmidique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsi	Acide ribonucléique interférent
ATP	Adénosine triphosphate

B

BGTC	Bis(guanidinium)-tren-cholestérol
------	-----------------------------------

D

DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC-chol	3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol
DDL	Diffusion dynamique de la lumière
DiD	4-Chlorobenzenesulfonate de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine
DiI	Perchlorate de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine
DiO	Perchlorate de 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine
DiR	Iodure de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindotricarbocyanine
DMEM	Milieu de culture "Dulbecco's Modified Eagle"
DMRIE	Bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyammonium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase I	Déoxyribonucléase I
DOGS	Dioctadécylamidoglycylspermine
DOPE	Dioleoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-triméthylammoniumpropane

DOTMA	Chlorure de <i>N</i> -(2,3-dioléyloxypropyl)- <i>N,N,N</i> -triméthylammonium
DPBF	1,3-Diphénylisobenzofurane
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	1,2-Distéaroyl-phosphatidyléthanolamine-méthyl- conjugué polyéthylèneglycol-2000
DTPP	5-5- (4- <i>N, N</i> -diacetoxyphenyl) -10,15,20-tétraphénylporphyrine

E

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERO	Espèces réactives d'oxygène

F

FA	Acide folique
FACS	Tri cellulaire activé par fluorescence (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FBS	Sérum fœtal bovin

G

GFP	Protéine fluorescente verte
-----	-----------------------------

H

H1299	Cellules humaines du cancer du poumon
HaCaT	Lignée tumorale humaine de peau
HCl	Acide chlorhydrique
HEC-1A	Lignée tumorale de l'utérus
HEK	Cellules embryonnaires de rein humain
HeLa	Cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Hy	Hypéricine

I

I	Iode
IC ₅₀	Concentration à 50 % d'inhibition
In	Indium
IP	Indice de polydispersité

M

MCF-7	Cellules tumorales mammaires
MDA-MB-231	Cellules humaines du cancer de sein
MET	Microscopie électronique en transmission
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MW	Poids moléculaire

N

NaCl	Chlorure de sodium
NCL	Nanocapsules lipidiques
NLS	Séquences de localisation nucléaire
NP	Nanoparticule

P

PA	Principe actif
PBS	Tampon phosphate salin
PC3	Cellules humaines du cancer de la prostate
PCL	Poly-ε-caprolactone
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PGA	Acide polyglutamique
PLGA	Acide poly (lactique-co-glycolique)
PLL	Poly(L) lysine
PPIX	Protoporphyrine IX

PS Photosensibilisateur

PTX Paclitaxel

R

RB Rose Bengale

RE Rendement d'encapsulation

Re Rhénium

RNO p-Nitrosodiméthylaniline

RPA Rétention et perméabilité accrues

T

m-THPC m-Hydroxyphényltétrachlorine

Tc Technétium

TCPP Tétra(4-carboxyphényl) porphyrine

TMPyP 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine

TMPyP4 Tétra-(*N*-méthyl-4-pyridyl) porphyrine

TPD Thérapie photodynamique

U

UV Ultra-violet

Introduction Générale

La nanomédecine est l'application des nanotechnologies dans le domaine biomédical. Ces nano-systèmes offrent la possibilité de délivrer des substances pharmaceutiques spécifiquement aux sites malades ou de vectoriser des agents de contraste pour le diagnostic et l'imagerie. La plupart des nanoparticules sont de nature organique ou inorganique et se caractérisent par différentes propriétés physiques et chimiques. Elles peuvent être aussi fonctionnalisées avec divers ligands leur permettant de cibler des tissus et les cellules en particulier. La nanomédecine promet ainsi de fournir « le médicament du futur » avec comme approche les nanoparticules multifonctionnelles.

La lutte contre le cancer représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Les techniques de traitement varient selon les types de cancers et le stade d'avancement de la maladie. Parmi ces traitements, la thérapie génique est considérée comme l'une des approches thérapeutiques les plus prometteuses, car elle a le potentiel de traiter les anomalies au niveau de l'acide nucléique en modifiant ou en manipulant les gènes. Cependant, l'application de la thérapie génique pour le traitement des cancers reste limitée actuellement par la faible efficacité de transfection et la toxicité des vecteurs utilisés. Parmi les différents vecteurs de gènes non viraux, les nanoparticules offrent une plateforme idéale pour l'intégration de toutes les caractéristiques souhaitables en un seul système capable de véhiculer un gène sans dégradation en considérant les différentes barrières biologiques.

Une autre modalité de traitement des cancers, récemment développée, est la thérapie photodynamique. Il s'agit d'une technique innovante basée sur la combinaison d'une molécule photosensibilisante (non toxique) et d'une source de lumière. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est la difficulté à accéder à certaines tumeurs profondes et la forte hydrophobicité des agents photosensibilisants utilisés. Une des tendances actuelles en matière de traitement anti-tumoral, est de combiner les thérapies ou encore les agents thérapeutiques afin d'obtenir un effet de synergie dans l'éradication des cancers, de plus en plus virulents.

Le projet présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans une démarche multidisciplinaire, faisant appel à la chimie mais également à la biologie cellulaire. Le but de notre travail est l'élaboration de nanoparticules fonctionnalisées à base de lipides susceptibles de transférer à la fois un gène sous forme d'ADN plasmidique et un anti-cancéreux, deux agents photosensibilisants dans le cadre de co-vectorisation de principes actifs ou encore l'étude du ciblage des canaux ioniques avec un agoniste encapsulé.

Dans le Chapitre 1, nous présenterons une étude bibliographique sur les différents systèmes nanoparticulaires utilisés pour la vectorisation de principes actifs, tout en insistant sur l'application de co-délivrance d'agents thérapeutiques. Nous nous intéresserons ensuite au développement de nanocapsules lipidiques stables comme vecteurs de principes actifs. Puis, nous discuterons les propriétés biologiques *in vitro* de ces nano-objets.

Dans le Chapitre 2, l'introduction bibliographique sera consacrée à la thérapie génique et les différents vecteurs de transfection, plus particulièrement l'intérêt des nanocapsules lipidiques dans la vectorisation de gènes. Puis, l'étude expérimentale portera sur le développement de nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le polyéthylèneimine pour la transfection de plasmide d'ADN et la délivrance de principe actif (paclitaxel) dans le cadre d'une thérapie combinée. Les nanovecteurs cationiques ainsi formulés ont été caractérisés et leur potentiel à co-délivrer un ADN et un agent chimiothérapeutique a été évalué *in vitro*.

Dans le Chapitre 3, nous présenterons la thérapie photodynamique ainsi que les exemples de formulations à base de nanoparticules utilisés *in vitro* et *in vivo*. La localisation intracellulaire des agents photosensibilisants et les mécanismes de mort induite par la thérapie photodynamique seront discutés. Ensuite, nous exposerons les résultats expérimentaux de l'utilisation des nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de molécules photosensibilisantes dans le cadre de la thérapie photodynamique *in vitro*. Cette étude est basée sur une approche intéressante utilisant la combinaison des effets photosensibilisants de deux molécules, vectorisées dans une même nanocapsule, pour améliorer l'activité photodynamique.

Dans le Chapitre 4, la première partie comportera une introduction bibliographique sur les canaux ioniques TRP et leur implication dans certaines pathologies, et en particulier le rôle du canal TRPM8 dans la cancérogenèse prostatique. Nous nous intéresserons ensuite à l'encapsulation de l'agoniste du TRPM8 (le menthol) dans les nanocapsules lipidiques dans le cadre de ciblage des canaux ioniques surexprimés sur les cellules cancéreuses de la prostate.

Chapitre 1 : Les Nanocapsules Lipidiques pour la Vectorisation de principes actifs

A. Introduction bibliographique :

Le développement des nanotechnologies dans le domaine médical a suscité un engouement considérable ces dernières années, notamment l'utilisation de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs. En effet, les nanoparticules offrent des perspectives uniques pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs qu'ils soient des gènes (thérapie génique), des anti-cancéreux (chimiothérapie) ou encore des agents photosensibilisants (thérapie photodynamique, TPD). Le défi majeur reste cependant l'acheminement des molécules thérapeutiques jusqu'à leur site d'action, tout en gardant leur intégrité ainsi que leur effet thérapeutique.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons quelques exemples de nanoparticules utilisées à des fins thérapeutiques en s'intéressant en particulier aux nanomatériaux organiques. Les stratégies de ciblage avec les nano-vecteurs de principes actifs seront ensuite développées. Enfin, la dernière partie de cette revue bibliographique sera consacrée aux interactions de nanoparticules avec les cellules d'un point de vue mécanisme d'internalisation et cytotoxicité.

1. Les nano-vecteurs de principes actifs :

1.1. Définition :

Selon la définition de NNI (*National Nanotechnology Initiative*), les nanoparticules sont des structures de tailles variant de 1 à 100 nm dans au moins une dimension. Cependant, le préfixe «nano» est couramment utilisé pour les particules de plusieurs centaines de nanomètres [1]. Il existe aujourd'hui différents types de nano-vecteurs utilisés en nanomédecine qui diffèrent selon leur composition, leur forme ou leur structure (**Figure 1.1**).

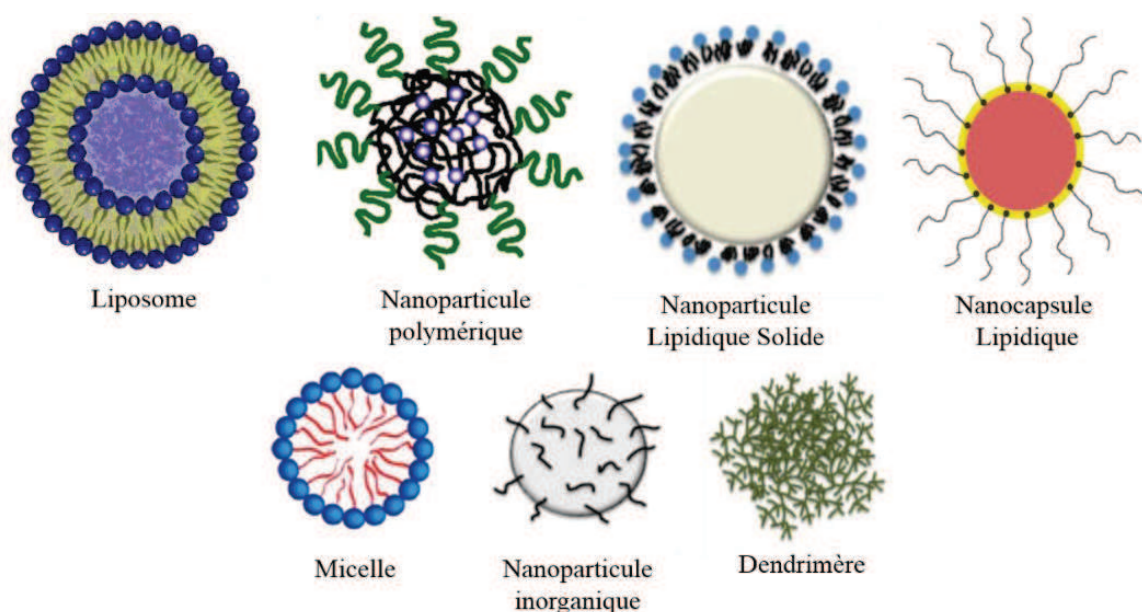


Figure 1.1 - Les différents types de nanoparticules utilisées pour la vectorisation de principes actifs (d'après [2]).

Les nano-vecteurs ayant des propriétés physico-chimiques et biologiques optimisées sont internalisés par les cellules plus facilement que les grosses molécules, leur permettant ainsi d'être des plateformes idéales de vectorisation de principes actifs. L'agent thérapeutique peut être adsorbé ou lié de façon covalente à la nanoparticule ou peut être aussi encapsulé.

Une fois que les nano-vecteurs atteignent les tissus malades, les principes actifs sont libérés. Une libération contrôlée peut se faire par des changements de l'environnement physiologique tels que la température, le pH...

Cependant, les nanoparticules doivent être biocompatibles (capables de s'intégrer à un système biologique sans induire de réponse immunitaire ou d'effets négatifs) et non toxiques. Les effets indésirables des nano-systèmes dépendent fortement de leur taille, de leur forme, de la concentration, de la composition chimique de leur surface, de la voie d'administration, ainsi que du temps de circulation dans le sang [1].

Un des développements les plus récents dans le domaine de vectorisation de principes actifs, est l'idée de co-délivrance de molécules thérapeutiques dans le but d'avoir un effet de synergie d'efficacité de traitement.

Les avantages d'une combinaison de thérapie sont multiples et généralement spécifiques à l'application envisagée, dont la majorité vise le traitement du cancer. La synergie dans le contexte de la co-délivrance se traduit par l'amélioration de l'effet thérapeutique désiré comparé à celui obtenu avec un seul principe actif, ou avec l'effet de deux médicaments administrés en combinaison, mais séparément [3].

Plusieurs systèmes de co-délivrance de principes actifs ont été développés en utilisant un certain nombre de vecteurs précédemment investigués pour la vectorisation d'un thérapeutique seul, tels que les liposomes, les dendrimères, les nanoparticules polymériques... Et les formulations portent généralement sur la co-vectorisation de principe actif / principe actif, principe actif / ARNsi ou principe actif / plasmide ADN.

1.2. Les liposomes :

Les liposomes ont été introduits en 1965 et représentent l'une des premières plateformes utilisée en nanomédecine [4]. Actuellement, il existe plus de 11 formulations approuvées en clinique, et encore plus en développement préclinique.

Les liposomes sont des nanoparticules sphériques composées d'un cœur aqueux entouré d'une couche de phospholipides. Ils contiennent une ou plusieurs bicouches membranaires constituées de lipides naturels ou synthétiques [4].

Selon la conception, la taille des liposomes peut varier de 10 nm à quelques microns. En plus de leur biocompatibilité, les liposomes présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des agents hydrophiles grâce à leur cœur aqueux et des principes actifs hydrophobes dans la bicouche lipidique (**Figure 1.2**). Ils permettent ainsi d'augmenter la solubilité de principes actifs et d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques. Il existe beaucoup d'exemples de formulations de liposomes avec différents agents tels que les anti-cancéreux [5], neurotransmetteurs [6], antibiotiques [7], anti-inflammatoires [8]...

Les liposomes sont des candidats idéals pour la co-vectorisation de molécules thérapeutiques car ils ont la capacité d'encapsuler des molécules lipophiles et hydrophiles, et sont les seuls nano-vecteurs actuellement en essais cliniques pour la thérapie combinée.

Une formulation de liposomes appelée LipoVito [9] a permis l'encapsulation simultanée de la vincristine et le topotécan, deux agents utilisés en chimiothérapie. Les résultats de l'étude ont

montré que les deux molécules n'interagissent pas dans les liposomes en ayant toutefois une efficacité thérapeutique importante [9, 10].

La co-délivrance d'un gène avec un principe actif a aussi été appliquée en utilisant les liposomes. Des liposomes cationiques ont prouvé leur efficacité pour la vectorisation de gènes (ADN / ARNsi) avec des principes actifs. En effet, la charge positive de ces nano-vecteurs permet la formation de complexes stables avec l'ADN / ARNsi. *Saad et al.* [11] ont ainsi co-délivré la doxorubicine et les ARN interférents MRP1 et Bcl2 pour traiter les cellules de cancer multi-résistantes. De plus, une étude de formulation de liposomes anioniques contenant un adénovirus et une carmustine s'est avérée efficace pour la réduction de l'immunogénécité des vecteurs adénovirus [12].

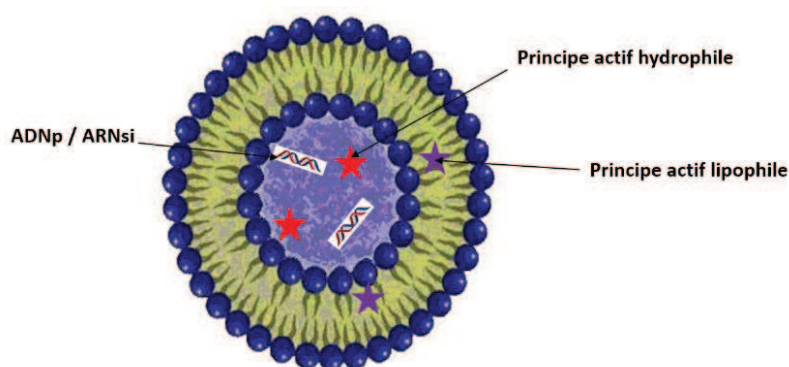


Figure 1.2 – Représentation schématique d'un liposome multifonctionnel.

Bien que les liposomes soient les systèmes les plus appropriés pour la délivrance de principes actifs, ces médicaments ont tendance à être assez rapidement libérés *in vivo*. Optimiser les formulations et favoriser le ciblage spécifique sont donc des défis qui doivent être surmontés afin d'augmenter l'efficacité clinique de tels nano-systèmes [3].

1.3. Les nanoparticules polymériques :

Les nanoparticules (NPs) polymériques sont des structures biocompatibles et biodégradables de diamètre compris entre 10 et 100 nm. Elles sont obtenues à partir de polymères synthétiques tels que le poly- ϵ -caprolactone [13], polyacrylamide [14] et polyacrylate [15], ou de polymères naturels tels que l'albumine [16], le chitosane [17] et le dextrane [18] (**Figure 1.3**).

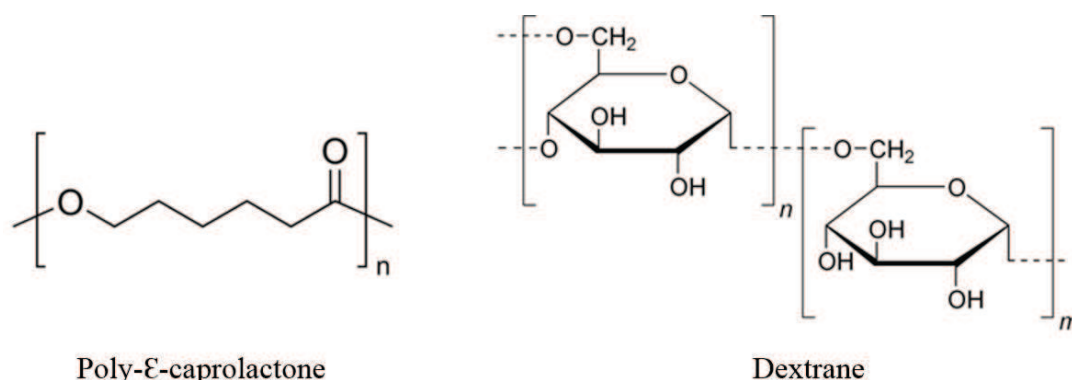


Figure 1.3 - Structures chimiques de polymères utilisés pour la formulation de nanoparticules polymériques.

La majorité de ces nano-vecteurs est formulée selon un processus d'auto-assemblage utilisant un ou plusieurs copolymères. Ces copolymères s'assemblent spontanément en une structure cœur-enveloppe dans un environnement aqueux [4]. Les blocs hydrophobes forment le cœur, afin de minimiser leur exposition à un environnement aqueux, tandis que les blocs hydrophiles constituent la couche externe qui stabilise le cœur [19]. Il en résulte ainsi une structure de nano-objets adaptée pour la vectorisation de principes actifs. Le cœur hydrophobe permet de piéger des agents thérapeutiques et la couche hydrophile fournit une protection stérique aux nanoparticules.

Une étude intéressante a montré le potentiel des NPs polymériques dans la co-délivrance de principes actifs [20]. En effet, la co-encapsulation de la doxorubicine avec l'ARN interférent

ARNsi BCL-2 dans des NPs à base de copolymères poly- ϵ -caprolactone (PCL), polyéthylèneimine (PEI), acide polyglutamique (PGA) et de polyéthylène glycol (PEG) [21] a entraîné un effet synergique sur l'apoptose des cellules de gliomes C6 *in vitro* et *in vivo* (Figure 1.4).

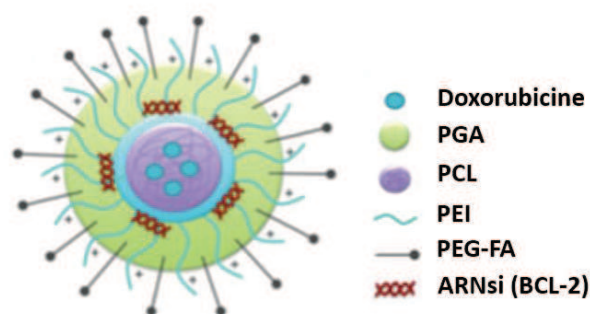


Figure 1.4 - Représentation schématique de NPs polymériques utilisées pour la co-délivrance de principes actifs [22].

Les nanoparticules polymériques représentent ainsi une plateforme intéressante sur laquelle des modifications peuvent être réalisées pour augmenter leur flexibilité. Cependant, une des préoccupations est la difficulté à retirer complètement le solvant organique résiduel au cours de la formulation [3].

1.4. Les dendrimères :

Les dendrimères sont définis comme étant des macromolécules branchées [23] formées à partir de monomères (ou dendrons) qui s'associent sous une forme arborescente à partir d'un cœur [24]. Ils sont généralement obtenus à partir d'éléments synthétiques ou naturels tels que les acides aminés, les sucres et les nucléotides.

Ces nanoparticules peuvent être facilement modifiées et conjuguées à des fins thérapeutiques. Les dendrimères peuvent être chargés en principe actif grâce aux cavités présentes dans leur cœur par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes ou par greffage chimique. La cytotoxicité de ces nano-vecteurs dépend de la nature chimique du cœur et de leur surface.

Comparés aux formulations liposomales actuellement disponibles, les dendrimères ont l'avantage d'être plus stables. En effet, le contrôle de leurs structures ainsi que la possibilité

de vectoriser une grande quantité de molécules, sont des atouts majeurs pour la co-délivrance de principes actifs.

Les dendrimères sont particulièrement utiles car ils permettent d'encapsuler des molécules lipophiles dans leurs noyaux hydrophobes, tandis que leurs groupes de surface polyvalents permettent la fixation de plusieurs molécules [25, 26] (**Figure 1.5**). En outre, ils peuvent être complexés avec des acides nucléiques pour la thérapie génique. Par exemple, la doxorubicine a été utilisée pour intercaler le plasmide pORF-TRAIL ; ce complexe fixé sur un dendrimère permet d'améliorer l'efficacité de transfection grâce à la petite taille de ces vecteurs [25].

Les dendrimères ont la capacité d'encapsuler simultanément une molécule hydrophile et lipophile. En effet, *Clementi et al.* [27] ont réussi à vectoriser deux principes actifs : le paclitaxel et l'alendronate dans un même dendrimère fonctionnalisé avec des molécules PEG.

Bien qu'ils offrent une plateforme intéressante pour la thérapie combinée, les dendrimères doivent encore surmonter quelques défis pour passer au niveau clinique, tels que le temps de demi-vie dans la circulation sanguine, la biodégradabilité...

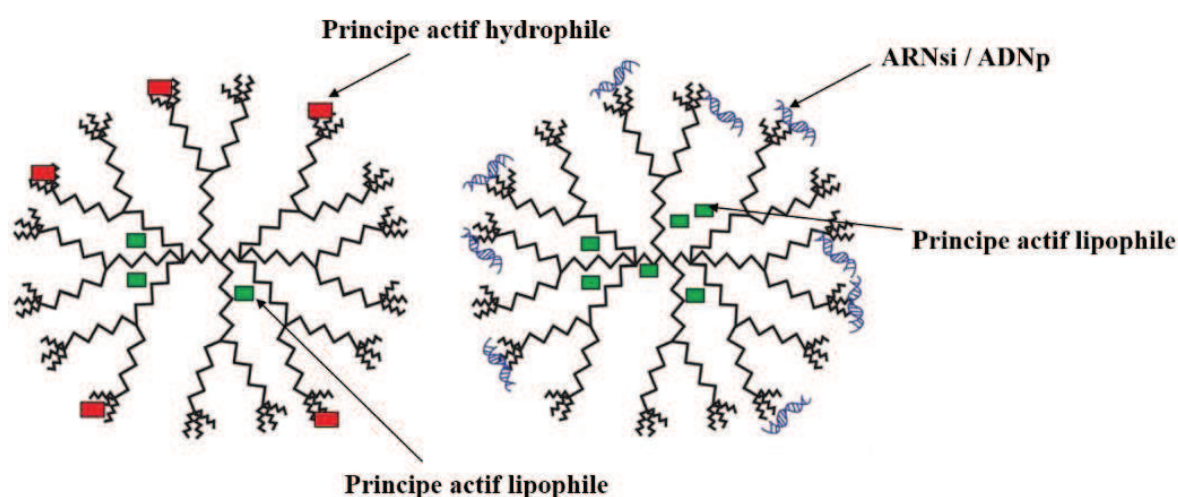


Figure 1.5 - Représentation schématique de dendrimères utilisés pour la co-délivrance de principes actifs (d'après [3]).

1.5. Les nanoparticules inorganiques :

Les nanoparticules inorganiques sont composées d'éléments inorganiques tels que la silice ou les métaux ou oxydes de métaux (fer, zinc...). Elles varient en fonction de leur taille, leur surface et leur porosité. Selon leur propriété de surface, ces nano-vecteurs peuvent être utilisés comme réservoir pour délivrer des principes actifs, ou comme agent de contraste dans l'imagerie et le diagnostic [28].

Des exemples de nanoparticules inorganiques pour la délivrance de principes actifs sont indiqués ci-après (**Tableau 1.1**).

Principe actif	Activité thérapeutique	Nanovecteur	Référence
Carboplatine	Agent anti-cancéreux	NPs de silice mésoporeuse	[29]
Doxorubicine	Agent anti-cancéreux	NPs de silice mésoporeuse	[30]
Amoxicilline	Antibiotique	NPs de silice mésoporeuse	[31]
Ciprofloxacine	Antibiotique	NPs superparamagnétiques	[32]
Paclitaxel	Agent anti-cancéreux	NPs magnétiques	[33]

Tableau 1.1 – Exemples de nanoparticules inorganiques utilisées pour la vectorisation de principes actifs.

Comparées aux nano-systèmes organiques traditionnels, les nanoparticules inorganiques biocompatibles présentent des atouts de point de vue composition et structure pour la construction de nano-vecteurs de co-délivrance de principes actifs. Par exemple, les NPs de silice mésoporeuse présentent une structure nanoporeuse capable d'encapsuler des médicaments. Les NPs magnétiques possèdent quant à elles des propriétés physico-chimiques intrinsèques permettant notamment le transfert d'énergie irradiée en chaleur dans le cadre de thérapie par hyperthermie [34].

Ces nanoparticules multifonctionnelles se sont avérées être les agents de contraste les plus efficaces pour l'imagerie et le diagnostic [35]. Cependant, plusieurs défis doivent être encore surmontés avant de passer au stade clinique pour la délivrance de principes actifs avec des

nano-vecteurs inorganiques. L'utilisation de métaux lourds ou d'éléments toxiques ainsi que la non élimination de certains composés et ce jusqu'à deux mois après injection restent un handicap majeur.

2. Stratégies de ciblage :

L'un des principaux avantages qu'offrent les nanotechnologies est la délivrance de médicaments ciblée vers le site de la maladie. Ceci peut se faire soit par un ciblage passif de principes actifs au site d'action ou par ciblage actif (**Figure 1.6**).

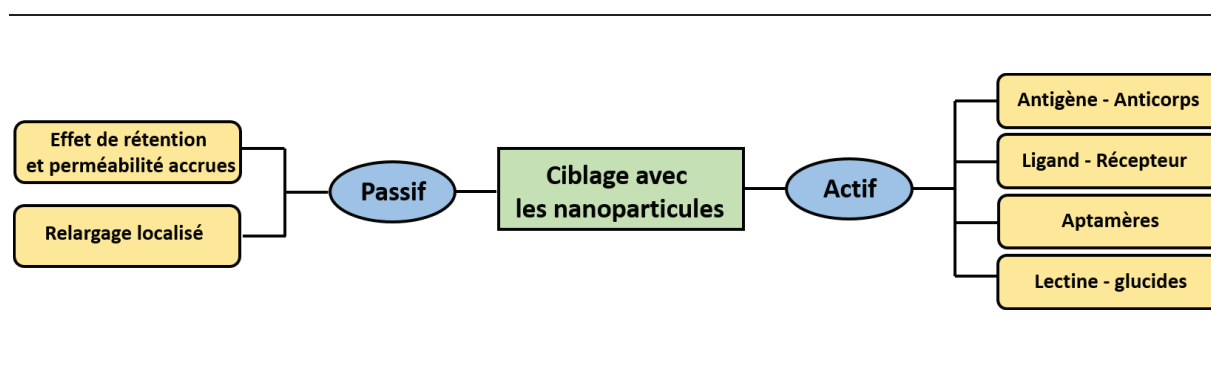


Figure 1.6 – Stratégies de ciblage avec les nano-vecteurs de principes actifs (d'après [36]).

2.1. Le ciblage passif :

2.1.1. Effet de rétention et perméabilité accrues (RPA) :

Le ciblage passif exploite les différences anatomiques entre les tissus sains et les tissus malades pour délivrer le principe actif à son site d'action. En effet, la physiologie des tissus malades peut être modifiée à travers l'effet de rétention et perméabilité accrues (RPA). Cela se produit car la vascularisation de la tumeur n'est pas étanche et laisse passer les nanoparticules circulantes qui peuvent s'accumuler plus rapidement dans les tissus tumoraux [36].

L'effet RPA a été fortement exploité pour vectoriser diverses molécules thérapeutiques à leur site d'action et de nombreuses études utilisent ce mécanisme de ciblage passif. Un des premiers exemples de formulation est le Doxil, un liposome PEGylé stable encapsulant la doxorubicine. Le Doxil a montré une bonne rétention de la molécule thérapeutique dans la

formulation liposomale et un temps de circulation 6 fois plus important que la doxorubicine libre [37]. Il a été approuvé pour le traitement du cancer des ovaires et du cancer de sein métastatique. De tels systèmes se sont avérés efficaces dans la réduction de la taille des tumeurs grâce au mécanisme de rétention et perméabilité accrues [38].

Un essai *in vivo* réalisé avec des nano-systèmes formulés par *Akao et al.* [39] a mis en évidence une activité anti-tumorale importante sur des souris portant des tumeurs solides en raison de l'effet RPA, qui permet une accumulation des nanoparticules dans les cellules tumorales. Le défi majeur est la stabilité des principes actifs dans les nano-vecteurs permettant d'assurer un effet thérapeutique efficace.

2.1.2. Le relargage localisé :

L'autre approche est le relargage direct intra-tumoral de l'agent thérapeutique en utilisant les nanoparticules comme vecteurs, notamment pour le traitement des cancers localisés comme le cancer de la prostate ou encore le cancer de la tête et du cou [36].

Sahoo et al. [40] ont montré que des nanoparticules biodégradables chargées en paclitaxel étaient plus efficaces que la molécule libre pour l'inhibition de la prolifération de cellules tumorales. En effet, sur la lignée cellulaire du cancer de la prostate, l'IC₅₀ (concentration en principe actif nécessaire pour avoir 50 % d'inhibition de prolifération cellulaire) obtenu avec les NPs était 5 fois plus faible que celle avec la molécule libre en solution. Le même résultat a été observé chez les souris ayant reçu une dose par injection intra tumorale dont les tumeurs ont régressé de façon significative après introduction de nanoparticules contenant le paclitaxel. Une seconde étude a montré que cette efficacité de traitement est due à une meilleure internalisation cellulaire des nanoparticules et une rétention intracellulaire soutenue de la molécule encapsulée [41].

Ainsi, les nanoparticules peuvent non seulement agir comme des nano-vecteurs efficaces pour la protection des principes actifs des conditions physiologiques, mais aussi permettre une libération spécifique et contrôlée des molécules thérapeutiques à leurs sites d'action.

2.2. Le ciblage actif :

Le ciblage actif nécessite la conjugaison de ligands spécifiques aux récepteurs qui peuvent cibler les sites d'action [36]. Le succès du ciblage de molécules thérapeutiques dépend du

ligand qui doit être abondant et avoir une grande affinité et spécificité aux récepteurs des cellules ciblées.

Il peut être réalisé soit par reconnaissance moléculaire des cellules malades *via* formation d'un complexe ligand – récepteur, soit par des interactions antigène – anticorps ou encore par ciblage en utilisant des aptamères.

La taille nanométrique des nano-vecteurs ainsi que la possibilité de coupler différents ligands à leurs surfaces offrent d'excellentes opportunités pour passer les barrières physiologiques et permettre à l'agent thérapeutique de s'accumuler préférentiellement dans les tissus ciblés.

Par exemple, des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des PEG et différentes quantités de transferrine à leurs surfaces ont été testées pour leur potentiel de ciblage actif. Les résultats ont montré que les nanoparticules ainsi modifiées peuvent délivrer plus efficacement le principe actif dans les cellules cancéreuses des tumeurs solides que les nanoparticules non modifiées [42]. D'autres études ont aussi exploité la stratégie de ciblage actif pour délivrer l'agent thérapeutique spécifiquement à leurs sites d'action [43, 44].

3. Internalisation cellulaire des nanoparticules :

La stratégie thérapeutique utilisant les nanoparticules comme plateforme pour la vectorisation de principes actifs est basée sur la libération précise de cet agent dans un organe, tissu ou cellules spécifiques. Les nanoparticules doivent surmonter un certain nombre de barrières pour atteindre leurs sites d'action. En particulier, une translocation efficace des nano-vecteurs à travers la membrane plasmique est une condition préalable.

Ainsi la compréhension des voies biologiques impliquées dans l'absorption cellulaire des nutriments et solutés peut faciliter le développement de nano-systèmes capables de cibler spécifiquement les organes malades et d'obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques.

Les études réalisées sur les mécanismes par lesquels les nanoparticules entraînent dans les cellules ont montré que l'endocytose était le processus d'internalisation le plus prédominant, notamment à cause de la taille de ces nano-objets (> 10 nm) [45]. Ce processus implique la formation de nouvelles membranes de vésicules intracellulaires fermées à partir de la membrane plasmique avec une internalisation de lipides, protéines et de liquide extracellulaire (**Figure 1.7**). Le trafic endocytosique est un mécanisme cellulaire très dynamique et

hautement régulé. En effet, il a été démontré que les cellules pouvaient internaliser jusqu'à 5 fois leur volume en une heure [46].

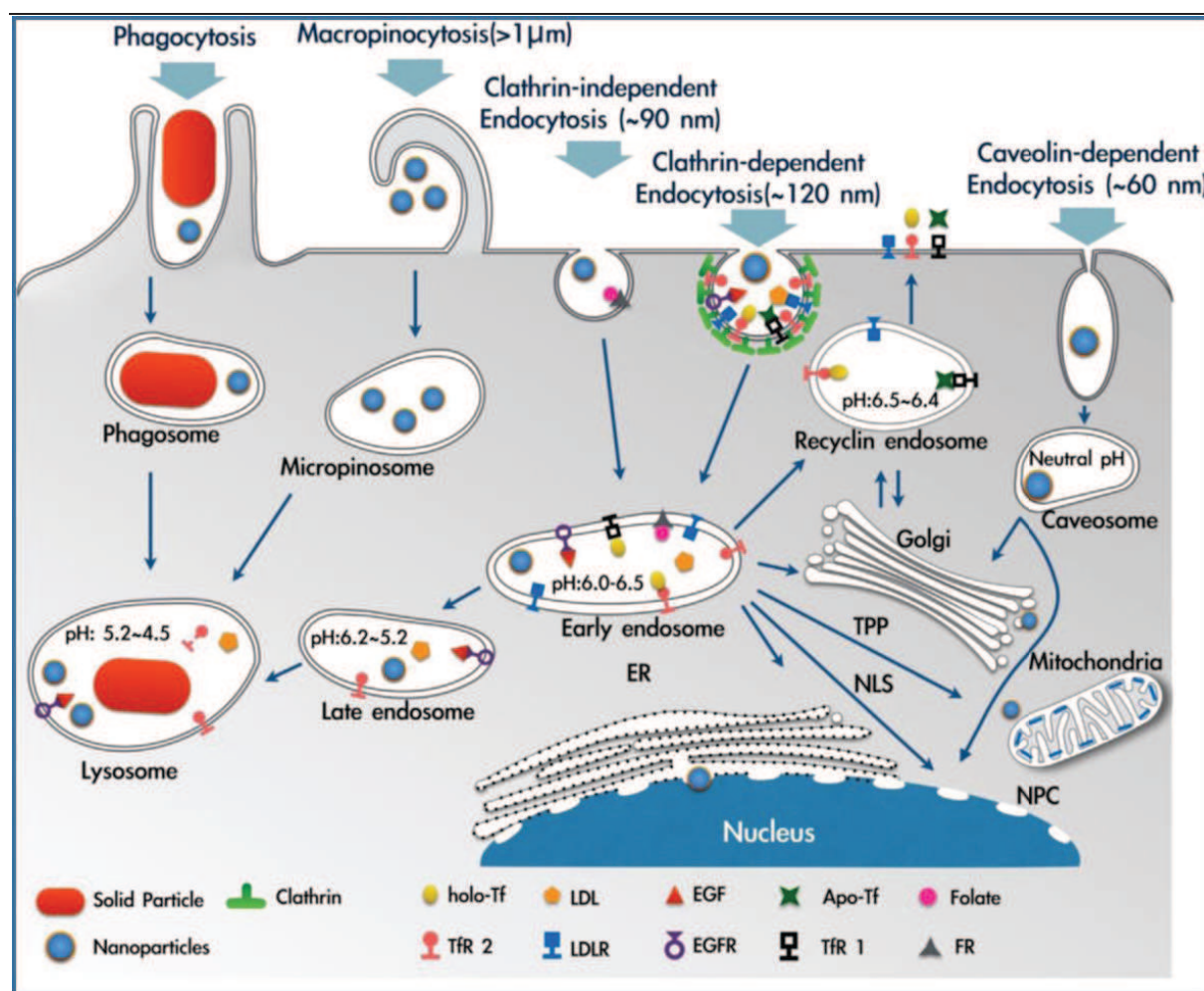


Figure 1.7 – Les voies d’internalisation cellulaire de NPs (ER : réticulum endoplasmique, NLS : signal de localisation nucléaire, NPC : pore nucléaire, TPP : cation triphénylphosphonium) [45].

Les deux principales voies d’endocytose utilisées par les cellules sont la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose est principalement utilisée par les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages [47]. Une des caractéristiques de cette forme unique d’endocytose est la grande taille des vésicules endocytées (> 250 nm), appelées phagosomes [48]. L’internalisation cellulaire de nanoparticules par l’intermédiaire de phagocytose

implique des forces d'attraction (forces de Van der Waals, interactions ioniques, interactions hydrophobes / hydrophiles) entre les cellules et la surface des nanoparticules.

La pinocytose est présente chez tous les types de cellules et peut être subdivisée en endocytose clathrine-dépendante, endocytose cavéole-dépendante, endocytose clathrine / cavéole indépendantes et la macropinocytose [45].

La voie d'endocytose par la clathrine est le processus le plus étudié pour le trafic de matériels dans les cellules eucaryotes. C'est une voie complexe qui implique la signalisation intercellulaire, le recyclage de la membrane et l'absorption des éléments nutritifs [49]. La route d'internalisation des nanoparticules dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques incluant la taille, la forme et la charge de surface mais aussi de la lignée cellulaire. Il semblerait ainsi que l'endocytose clathrine-dépendante est la voie d'entrée des nanoparticules de taille ~ 100 nm [45].

La compréhension des mécanismes d'internalisation cellulaire des nano-systèmes développés pour la vectorisation de principes actifs est une étape primordiale pour le passage en phase clinique. Les nanoparticules pénètrent dans les cellules par l'intermédiaire d'une combinaison de voies d'internalisation différentes. En fonction de leurs tailles, formes et leurs charges de surface, une route d'internalisation peut être préférée à d'autres. Le fait que la voie d'internalisation peut déterminer le sort et la localisation intracellulaire des nanoparticules encourage l'élaboration de stratégies fiables pour contrôler ou au moins influencer l'absorption cellulaire des nano-objets dans l'espoir d'améliorer l'effet thérapeutique [45].

4. Toxicité des nano-vecteurs de principes actifs :

Les nano-vecteurs de principes actifs sont développés pour leur unique propriété d'augmenter la biodisponibilité des molécules thérapeutiques tout en réduisant leurs effets indésirables dans le corps. Plusieurs découvertes récentes ont rapporté des toxicités inattendues liées à ces nano-vecteurs poussant la recherche vers un nouveau domaine appelé nano-toxicologie [50, 51].

La nano-toxicologie est une branche importante de la nanotechnologie. Il s'agit de l'étude des interactions entre les nanostructures et les systèmes biologiques afin de comprendre la relation entre les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux (taille, forme, charge de surface...) et les réponses biologiques toxiques.

La taille des nano-systèmes est comparable aux composants cellulaires et protéines. Par conséquent, les nanoparticules peuvent franchir les barrières mécaniques naturelles du corps humain par différentes voies et peuvent induire des effets néfastes sur la santé.

Bien que les relations de cause à effet ne soient pas encore définies, un certain nombre d'études ont rapporté les effets potentiellement nocifs des nanoparticules *in vitro* et *in vivo* sur des modèles expérimentaux. Il a été démontré que les propriétés physico-chimiques influent fortement sur la toxicité des nano-objets comme la taille, la composition, la charge, l'agrégation... [52].

La taille est un des facteurs importants qui peuvent influencer sur la toxicité des nanoparticules. C'est un paramètre qui dépend du milieu de dispersion tels que l'eau ultrapure, et les milieux de culture avec et sans sérum. Les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm possèdent des propriétés mécaniques, électriques et chimiques essentielles pour la vectorisation de principes actifs. Cependant, leur petite taille peut être à l'origine des effets indésirables, tels que le passage à travers la barrière hémato-encéphalique et le déclenchement des réactions immunitaires [53].

L'autre paramètre à prendre en considération dans l'évaluation de la toxicité des nanovecteurs est la charge de surface, généralement indiquée par le potentiel zêta. Le potentiel zêta reflète le potentiel électrique des nanoparticules et est influencé par la composition de la particule et du milieu de dispersion. Par exemple, il a été démontré que les nanoparticules cationiques peuvent causer une hémolyse et coagulation du sang alors que les nanoparticules anioniques étaient moins toxiques [28].

Par ailleurs, les nano-vecteurs possèdent une grande surface spécifique en raison de leur petite taille. Cette surface joue un rôle important dans la toxicité associée aux nano-systèmes puisqu'elle va réagir directement avec les systèmes biologiques. La stabilité de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules dans un environnement biologique est un facteur essentiel dans la régulation des conséquences toxicologiques associées aux nanostructures. Le greffage par exemple de chaînes PEG à la surface des nanoparticules permet de stabiliser et de protéger les nano-systèmes de l'opsonisation augmentant ainsi leur temps de circulation sanguine.

5. Conclusion :

Comme nous l'avons vu tout au long de cette étude bibliographique, les nanoparticules ont le potentiel de révolutionner la thérapie, l'imagerie et le diagnostic de diverses maladies, grâce aux nombreux avantages qui les caractérisent. Cependant, certains aspects doivent être pris en compte, tels que la toxicité et le devenir de ces nano-vecteurs dans l'organisme.

En outre, le mécanisme d'endocytose et les voies de dégradation sont encore mal connus. Ainsi, les possibilités illimitées des stratégies de traitement demeurent une des perspectives les plus excitantes des nano-vecteurs de principes actifs.

B. Objectifs du travail :

L'utilisation des nanoparticules comme plateforme pour la délivrance de principes actifs pour la thérapie, le diagnostic ou l'imagerie médicale prend une place importante dans le domaine de la nanotechnologie. Les chercheurs ne cessent d'innover dans la conception de nano-vecteurs de plus en plus diversifiés allant de l'inorganique à l'organique. La stratégie commune vise à développer des nano-systèmes de principes actifs non toxiques et capables de cibler spécifiquement les tissus malades.

La recherche dans ce domaine s'est d'abord intéressée aux liposomes. Biocompatibles, ils présentent également d'autres avantages leur permettant d'être la première plateforme utilisée en clinique. Les problèmes liés à la stabilité des liposomes en milieu biologique constituent malgré tout un frein. Dans ce contexte, des chercheurs ont développé d'autres nano-systèmes à base de lipides capable de vectoriser efficacement des principes actifs, comme les nanocapsules lipidiques.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous présenterons les nanocapsules lipidiques, leur procédé de formulation ainsi que leur stabilité dans différentes conditions physiologiques. Ensuite, une partie sera consacrée aux tests biologiques *in vitro* dans le but de démontrer le potentiel de ces nano-objets comme nano-vecteurs de principes actifs.

C. Les nanocapsules lipidiques :

Les nanocapsules lipidiques sont des nanoparticules lipidiques, composées d'un cœur huileux liquide entouré d'une couche constituée de tensioactifs hydrophiles et de tensioactifs lipophiles (**Figure 1.8**). Le cœur huileux (Labrafac Lipophile WL1349) est composé d'un mélange de triglycérides d'acides gras de chaînes moyennes (caprylique et caprique). Le tensioactif lipophile (Phospholipon 90G) est la lécithine (phosphatidylcholine). Enfin, le tensioactif hydrophile (Solutol HS 15) est le 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol (HS-PEG). Il s'agit un mélange de PEG 660 libres (30%) et de PEG 660 hydroxystéarates (70%).

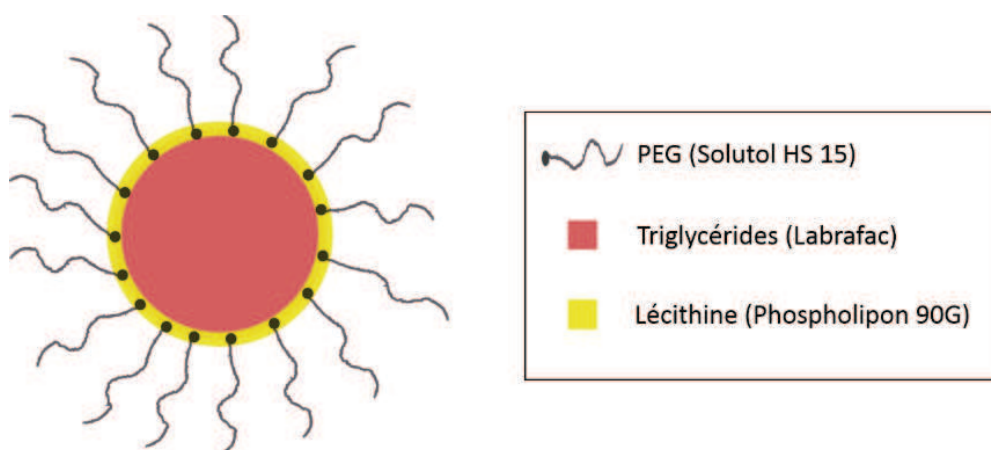


Figure 1.8 - Représentation schématique des nanocapsules lipidiques.

Ces nanovecteurs ont été introduits par *Heurtault et al.* [54, 55] pour leur potentiel dans la délivrance de principes actifs. Ils sont dotés de plusieurs avantages (**Figure 1.9**). En plus d'avoir des constituants biocompatibles et approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*), les nanocapsules lipidiques se caractérisent surtout par une stabilité physique supérieure à 18 mois grâce notamment à la couche externe formée de PEG, qui leur confère des propriétés de furtivité. Le processus de formulation de ces nano-objets est très facile et simple à mettre en œuvre ne nécessitant pas de solvant organique.

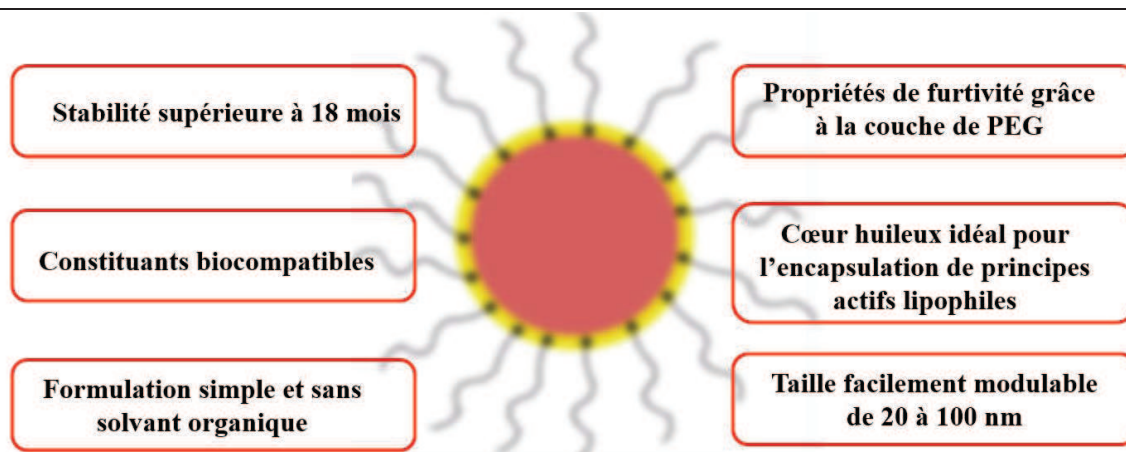


Figure 1.9 - Avantages des nanocapsules lipidiques.

1. Formulation de nanocapsules lipidiques (NCL) :

La formulation de ces nanocapsules s'effectue selon un procédé d'inversion de phase (huile/eau). Les différents composés sont d'abord mélangés en respectant les proportions indiquées dans le **Tableau 1.2**. Puis, le mélange est soumis à trois cycles de température (de 90°C à 70°C), au cours desquels la zone d'inversion de phase est observée autour de 78°C.

Au-dessus de la zone de transition (environ 90°C), on observe une émulsion eau dans l'huile qui se caractérise par une couleur blanche (trouble). En dessous de la zone de transition (environ 70°C), on observe une émulsion huile dans l'eau.

Après les trois cycles de température, une étape de trempe avec de l'eau froide (0°C) est nécessaire afin de stabiliser les nanocapsules et le mélange est maintenu sous agitation magnétique jusqu'au refroidissement complet (**Figure 1.10**).

	NCL 25 nm	NCL 50 nm	NCL 100 nm
Labrafac (%)	20,0	33,3	40,0
Solutol (%)	32,4	19,1	12,4
Phospholipon 90G (%)	3,0	3,0	3,0
NaCl (%)	1,7	1,7	1,7
Eau distillée (%)	42,9	42,9	42,9

Tableau 1.2 – Composition des constituants pour la formulation de NCL de différentes tailles pour une masse totale de 1,26 g.

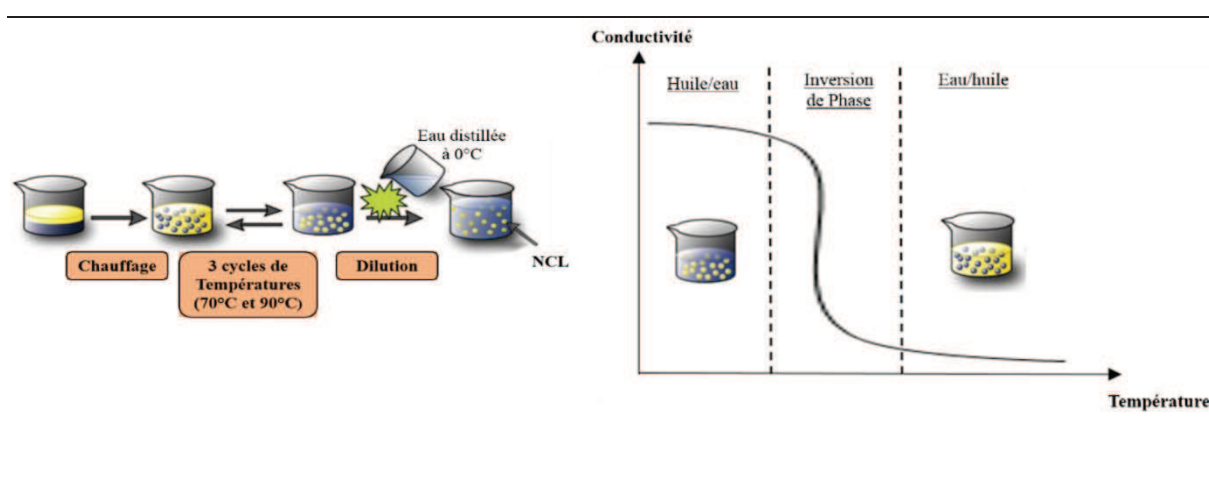


Figure 1.10 - Formulation de NCL (d'après [55, 56]).

Les caractéristiques physico-chimiques de nanocapsules lipidiques présentent de nombreux avantages pour la vectorisation de divers principes actifs et leur relargage *in vitro* et *in vivo*. D'une part, le cœur hydrophobe est un atout intéressant pour l'encapsulation de molécules thérapeutiques sachant que la majorité de ces médicaments est peu soluble dans l'eau. D'autre part, les chaînes PEG en surface confèrent à ces nano-objets des propriétés de furtivité leur permettant d'échapper à l'élimination rapide de la circulation sanguine et augmentent ainsi leur temps de demi-vie *in vivo* [57].

Le premier essai d'encapsulation de principes actifs a été décrit par *Lamprecht et al.* [58]. Il s'agit du médicament anti-arythmique l'amiodarone dont le taux d'encapsulation dans les NCL est très élevé (~94 %). Les résultats ont aussi montré que le relargage *in vitro* était

prolongé, permettant la délivrance du principe actif à son site d'action sans perte initiale de quantité.

Par la suite, de nombreux principes actifs lipophiles ainsi que des médicaments amphiphiles ont été encapsulés dans les NCL tels que l'ibuprofène [59], l'indinavir [60], et surtout des agents anticancéreux hydrophobes : le paclitaxel [61], l'étoposide [62]...

En plus d'une plateforme thérapeutique, les nanocapsules lipidiques peuvent être utilisées pour l'imagerie et la radiothérapie. Elles ont été chargées avec différents radionucléides dans leur cœur huileux ou à leur surface tels que ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{125}I ou ^{111}In [63-65] et avec divers fluorophores [66] pour l'imagerie par fluorescence.

2. Caractérisations des nanocapsules lipidiques :

2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) :

Les nanocapsules lipidiques sont caractérisées de manière générale en termes de taille (diamètre hydrodynamique moyen) et de charge de surface (potentiel zêta). La technique utilisée est la diffusion dynamique de la lumière (DDL). C'est une méthode d'analyse spectroscopique non invasive et facile à utiliser. Le principe de la méthode est la diffusion de la lumière (laser) par les particules de l'échantillon, soumises à des mouvements thermiques aléatoires. Des corrélations mathématiques permettent de déduire la taille des nanoparticules dans un liquide donné.

Le potentiel zêta représente la charge de surface des nanoparticules dispersées dans une solution. Il traduit la mobilité électrophorétique d'une suspension chargée dans un champ électrique.

Des études ont permis d'optimiser les proportions des composants (Labrafac, Solutol, Phospholipon, NaCl et eau) afin de formuler des nanocapsules de diamètres moyens différents (25, 50 et 100 nm) (**Figure 1.11**) [55, 67]. Il existe en effet un domaine de faisabilité dans lequel les proportions du Solutol et de Labrafac ont une grande influence sur la distribution de la taille des nanocapsules. Le diamètre moyen des NCL diminue lorsque la quantité du Solutol augmente (et la quantité du Labrafac diminue), et inversement. Ce phénomène résulte des propriétés stabilisantes des chaînes PEG à l'interface triglycérides / eau [68]. Le Solutol confère une stabilité au système huile dans eau favorisant la formation de particules de petites

tailles. Cette propriété est due au caractère amphiphile de ce tensioactif conféré d'une part par les chaînes PEG hydrophiles et d'une autre part par les chaînes stéarates hydrophobes [67].

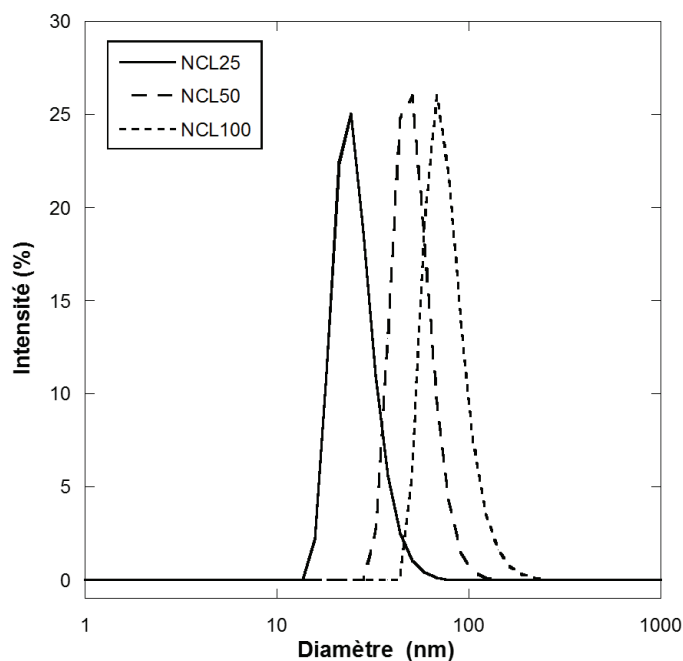


Figure 1.11 - Distribution de la taille de trois formulations de NCL.

Les nanocapsules ainsi formées présentent un diamètre moyen entre 20 et 100 nm, et sont monodisperses avec un indice de polydispersité inférieur à 0,2.

Le deuxième paramètre analysé par le mode électrophorétique de diffusion dynamique de la lumière (DDL) est le potentiel zêta, qui représente le potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement à la surface des nanocapsules lipidiques. Il s'agit d'un indicateur important et utile pour prévoir la stabilité des NCL. En général, les nanocapsules ont une charge de surface légèrement négative en raison de la présence de molécules de phospholipides et des chaînes PEG à leurs surfaces [69, 70].

La méthode de formulation des nanocapsules lipidiques ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques représentent des atouts importants leur conférant les caractéristiques d'un système idéal pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes.

Pour la suite des études, nous nous sommes intéressés à une taille en particulier de nanocapsules, les NCL de diamètre moyen 25 nm. D'une part, la petite taille permet une pénétration facile et rapide dans l'organisme. D'une autre part, les nanocapsules de diamètre moyen de 25 nm se caractérisent par une surface spécifique importante offrant une large possibilité de fonctionnalisation [71].

2.2. Microscopie électronique en transmission (MET) :

Après formulation des nanocapsules lipidiques (diamètre moyen de 25 nm), l'échantillon a été observé en microscopie électronique en transmission après coloration négative à l'acétate d'uranyle. C'est une technique d'analyse à haute résolution qui permet de donner des informations sur la morphologie et la taille des nanostructures observées. La **Figure 1.12** montre que les NCL sont de forme sphérique. Leurs tailles moyennes correspondent à celles mesurées par diffusion dynamique de la lumière (autour de 25 nm). Il est important de noter la présence d'agrégats de nanocapsules dus à la procédure de préparation de l'échantillon. En effet, la cryo-MET est plus adaptée pour l'observation de nanoparticules de type nanocapsules lipidiques car elle préserve mieux la structure de l'échantillon lors de sa préparation. *Béduneau et al.* [57] ont réussi à imager en cryo-MET des nanocapsules de diamètre moyen 25 nm.

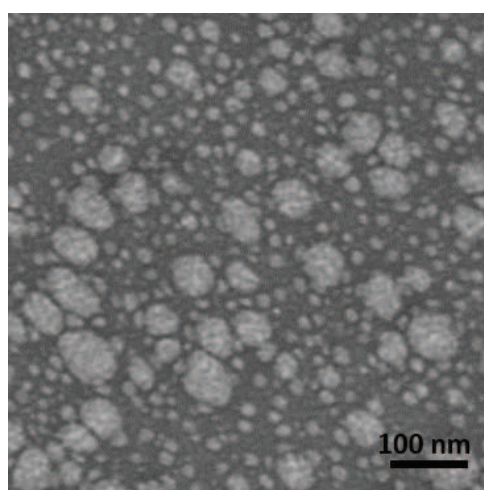


Figure 1.12 – Image en MET de nanocapsules lipidiques de diamètre moyen 25 nm.

3. Etude de la stabilité des nanocapsules lipidiques :

La stabilité colloïdale à long terme des nanocapsules lipidiques est une donnée importante pour des applications biomédicales. La stabilité physico-chimique de ces NCL a été étudiée par la mesure de la taille et la charge de surface en fonction de plusieurs paramètres notamment le temps du stockage, les milieux biologiques et le pH.

3.1. Stabilité au cours du stockage :

Un lot de nanocapsules lipidiques de diamètre moyen de 25 nm (NCL25) a été formulé et stocké à 4 °C. La stabilité de ces nanocapsules au cours de dix semaines a été étudiée grâce au suivi du diamètre moyen et de charge de surface par diffusion dynamique de la lumière (DDL).

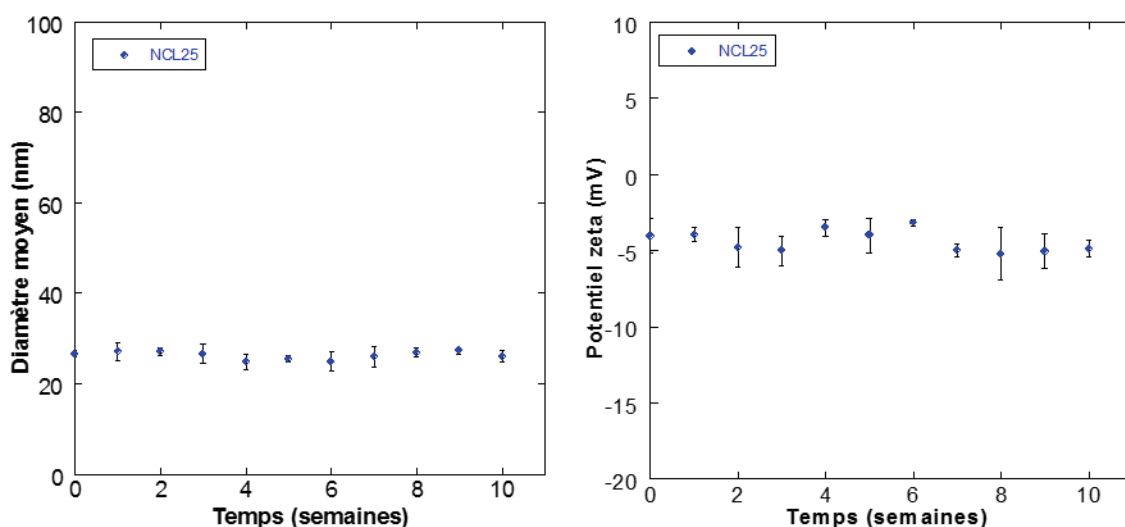


Figure 1.13 - Evolution de la taille et du potentiel zêta des NCL25 au cours du temps.

L'évolution du diamètre moyen et du potentiel zêta des NCL au cours du temps est représentée dans la **Figure 1.13**. Les résultats montrent que les nanocapsules lipidiques sont stables en termes de taille et charge de surface après dix semaines de stockage à 4°C. Le

diamètre moyen des NCL est de $26,1 \pm 1,3$ nm après 10 semaines et n'est donc pas modifié au cours de la conservation puisqu'il était initialement autour de $26,7 \pm 0,5$ nm. De même, le potentiel zêta des nanocapsules reste globalement inchangé au cours du temps, il varie de $-4,0 \pm 1,1$ mV à $-4,9 \pm 0,5$ mV après 10 semaines.

Par ailleurs, il a été démontré que les NCL restaient stables dans le temps de point de vue physico-chimique. L'échantillon conservé à 4°C était parfaitement stable pendant au moins 18 mois et à 37°C pendant un mois et demi [55]. Cette caractéristique serait due notamment à la rigidité de la surface de ces nano-objets conférée par la structure des tensioactifs constituant la couche externe.

3.2. Stabilité dans des milieux biologiques :

L'étude du comportement des nanocapsules lipidiques dans des milieux biologiques a été réalisée par mesure de la taille des NCL dans différents milieux (eau ultrapure, PBS, DMEM sans sérum, DMEM avec sérum) à température ambiante (25°C) et à 37°C, après une incubation d'une heure.

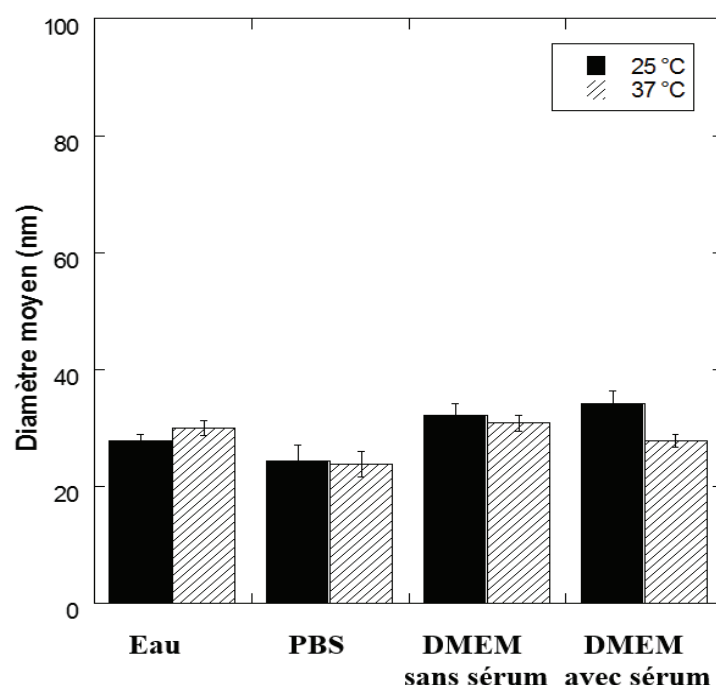


Figure 1.14 – Diamètre moyen des NCL25 dans des milieux biologiques à température ambiante (25°C) et à 37°C.

Dans un premier temps, nous avons étudié la stabilité des NCL dans un milieu tamponné, le tampon phosphate salin (PBS pour « *phosphate buffered saline* ») à un pH qui correspond à celui des milieux de culture (7,4). La mesure de la taille par DDL montre que les NCL gardent une stabilité physique après incubation dans un milieu riche en sels. Une légère diminution (< 5 nm) du diamètre moyen des nanocapsules dans le PBS est constatée pour les deux conditions de températures testées (par exemple à 25°C, la taille varie de $27,8 \pm 1,0$ nm (dans l'eau ultrapure) à $24,4 \pm 2,6$ nm (dans le PBS)) (**Figure 1.14**). Cette différence est due à la conformation que peut avoir les chaînes PEG dans un solvant à forte concentration en sel. En effet, le polyéthylène glycol peut se contracter en présence de solutions riches en sels [72] et par conséquent induire une diminution de la taille des nanoparticules.

Nous avons étudié le comportement des nanocapsules lipidiques dans le milieu de culture DMEM supplémenté ou non avec du sérum bovin fœtal (FBS pour « *fetal bovine serum* »). Ce milieu complexe est couramment utilisé dans les expériences *in vitro* avec les cellules. Les mesures en DDL ont montré que les nanocapsules lipidiques conservaient leur stabilité colloïdale dans le DMEM. En effet, le diamètre moyen des NCL reste inchangé par rapport aux mesures initiales dans l'eau.

Ainsi, dans le but de mimer les conditions expérimentales de culture cellulaire (milieu complexe, température de 37°C), nous avons montré que les NCL étaient parfaitement stables de point de vue physique pendant une heure, notamment grâce à la présence de la couche externe rigide formée par les chaînes PEG.

3.3. Evolution des caractéristiques physico-chimiques des NCL à différents pH :

La stabilité physico-chimique à différents pH est un paramètre important à prendre en considération lorsqu'on doit développer des nano-vecteurs de principes actifs. Le temps de circulation sanguine dépend fortement du comportement des nanoparticules dans des conditions physiologiques spécifiques notamment, des pH différents.

L'effet du pH sur les caractéristiques physiques des nanocapsules a été évalué en mesurant la taille et le potentiel zêta d'un lot de NCL (25 nm) incubé pendant 30 minutes à différents pH. La gamme du pH testé se situe entre 3 et 10.

Les mesures du diamètre moyen des nanocapsules à chaque pH sont montrées dans la **Figure 1.15**. Le pH n'induit pas de changement de la taille de ces NCL ; elles restent parfaitement

stables quel que soit le pH du milieu. Ceci peut être dû à l'effet de la charge négative du groupe phosphate des PEG qui permet la stabilité stérique par répulsion électrostatique entre les nanocapsules. Une telle stabilité les rend appropriées pour des applications biomédicales *in vitro* et *in vivo*.

L'expérience suivante consistait à déterminer le potentiel zêta des NCL à différents pH. Les valeurs dépendent du potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement, qui est finalement régi par la composition de la surface des nanocapsules et par les conditions de salinité et de pH dans lesquelles elles sont dispersées [73]. Dans notre cas, les résultats du potentiel zêta sont en accord avec la nature chimique de la couche externe de nos nanocapsules, essentiellement formée par des chaînes de polyéthylène glycol (**Figure 1.15**). En effet, les valeurs affichent une large négativité pour tous les pH testés, avec une tendance de plus en plus accentuée vers les pH basiques. De tels résultats ont déjà été observés avec des nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec différents types de polyéthylène glycol [73].

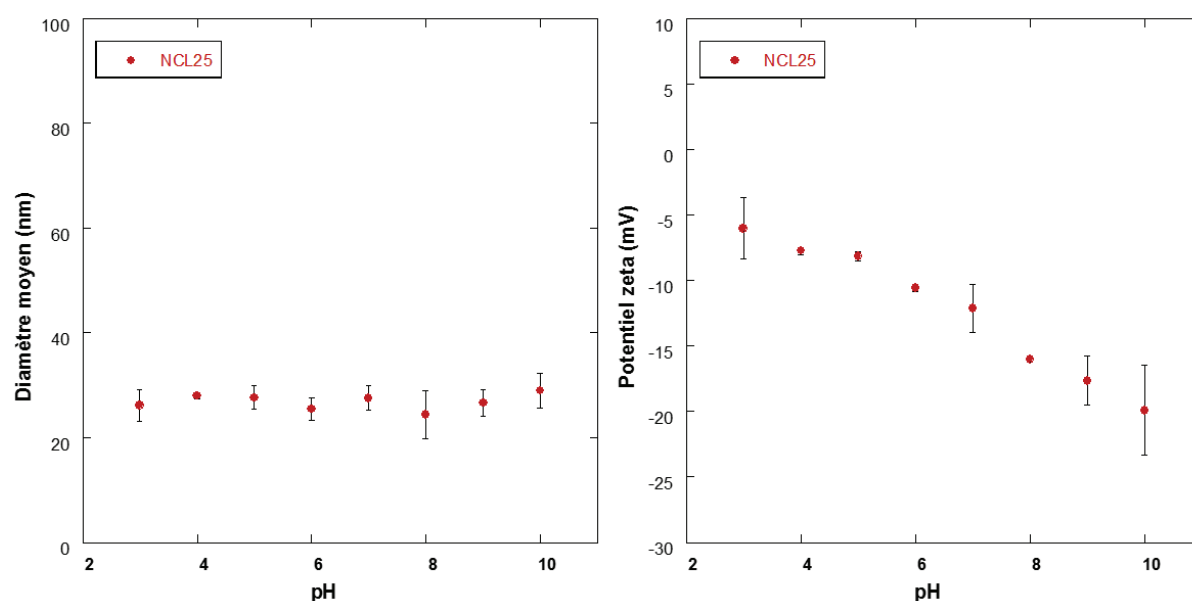


Figure 1.15 - Evolution de la taille et du potentiel zêta des NCL25 en fonction du pH.

4. Etude de la toxicité des nanocapsules lipidiques *in vitro* :

La biocompatibilité des nanoparticules est un paramètre clé dans l'application biologique. Il est évident que la cytotoxicité des NCL dépend essentiellement de la concentration ainsi que de la nature chimique de leur surface. L'étude de la toxicité des nanocapsules lipidiques *in vitro* a été évaluée avec le test colorimétrique MTT sur deux lignées cellulaires HEK et HeLa à différentes concentrations et différents temps d'incubation. Ce test permet d'évaluer l'activité enzymatique des cellules vivantes en produisant un composé coloré (formazan). L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 1.16**.

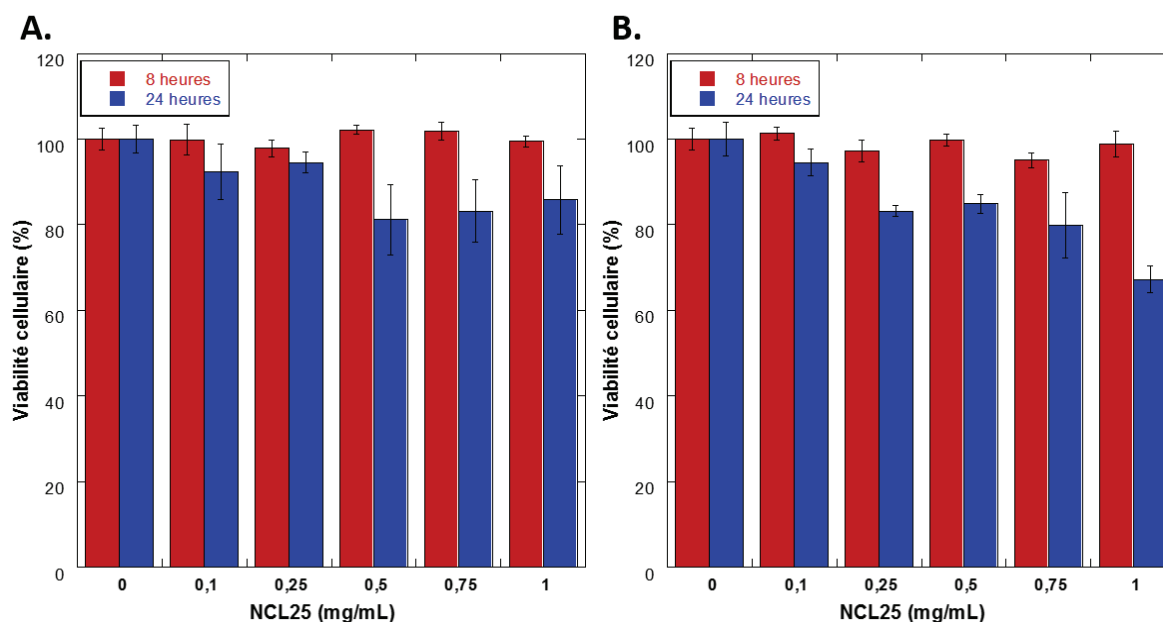


Figure 1.16 – Cytotoxicité des NCL25 *in vitro* sur des cellules HeLa (A) et HEK (B).

Les cellules ont été incubées avec les NCL pendant 8 et 24 heures, à des concentrations de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mg/mL. La viabilité cellulaire (%) est calculée par rapport au contrôle contenant des cellules non traitées avec des nanocapsules :

$$Viabilité(\%) = \frac{[Abs]_{NCL}}{[Abs]_{Contrôle}} \times 100\%$$

D'après les résultats du test de cytotoxicité, la viabilité cellulaire diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration en NCL et la durée d'incubation (**Figure 1.16**). Il est à noter toutefois que les cellules embryonnaires HEK se caractérisent par une faible adhérence, d'où un effet toxique plus important comparé aux cellules HeLa. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'après 8 heures d'incubation les nanocapsules lipidiques ne sont pas toxiques pour toutes les concentrations testées sur les deux lignées cellulaires. Pour le temps d'incubation de 24 heures, les NCL ne sont pas toxiques jusqu'à une concentration de 0,25 mg/mL et la viabilité cellulaire est réduite jusqu'à 70 % lorsque la concentration des nanocapsules est supérieure à 0,75 mg/mL.

L'étude de cytotoxicité montre ainsi une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire. Par conséquent, les nanocapsules ont très peu d'effet cytotoxique *in vitro* pour des concentrations allant jusqu'à 0,5 mg/mL. En plus de la biocompatibilité des composants, la non toxicité des NCL est probablement due au fait que la couche externe est essentiellement composée de chaînes PEG [74]. En effet, il a été démontré que la fonctionnalisation des nanoparticules avec du polyéthylène glycol améliorait leur cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* [75]. Cependant, l'effet toxique des tensioactifs est principalement dû à leur structure amphiphile. Les deux parties hydrophile et lipophile peuvent interagir avec les groupements polaires et les chaînes lipophiles de la bicouche de lipides cellulaires respectivement, provoquant la rupture de la membrane plasmique [76].

5. Etude de l'internalisation des nanocapsules lipidiques :

5.1. Marquage fluorescent des nanocapsules lipidiques :

Afin de les visualiser *in vitro* par fluorescence, les nanocapsules ont été formulées en présence d'un composé lipophile fluorescent : le DiI (**Figure 1.17**). Le DiI est une carbocyanine qui absorbe les radiations vertes – jaunes (longueur d'onde d'excitation maximale, 549 nm) et émet une fluorescence orangée (longueur d'onde d'émission maximale, 565 nm).

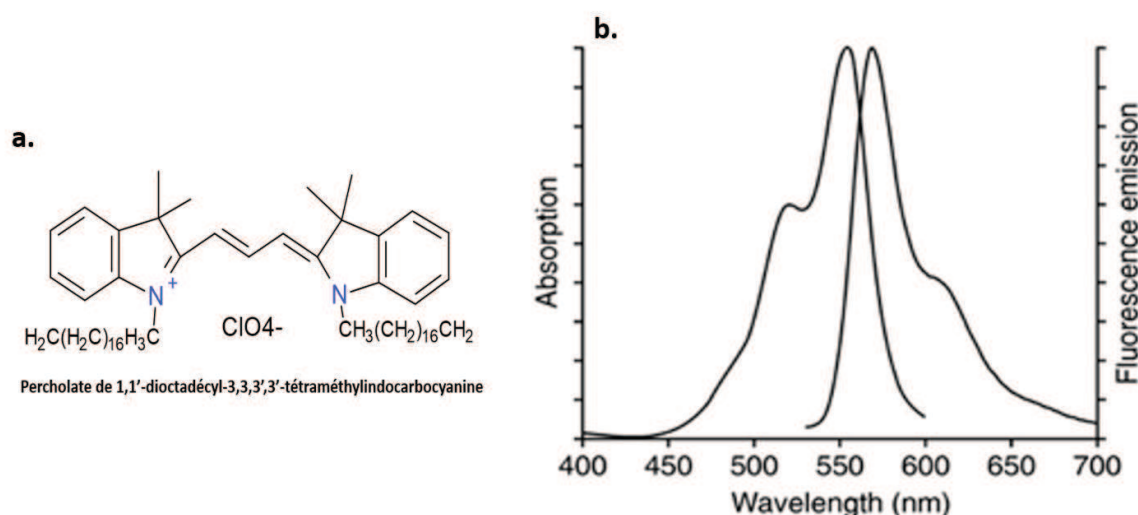


Figure 1.17 – Structure chimique (a) et spectres d’absorption et d’émission du DiI (b).

Au cours des dernières années, les carbocyanines (DiI, DiO, DiD, DiR) ont vu leurs applications se multiplier pour l’imagerie *in vitro* et *in vivo* grâce à leurs propriétés intéressantes avec des longueurs d’ondes d’excitation et d’émission dans le proche infrarouge [66]. Les NCL sont des nanovecteurs appropriés pour l’encapsulation de marqueurs lipophiles. Ceci a été confirmé par l’encapsulation du DiI avec un taux d’encapsulation autour de 99 %.

Bastiat et al. [66] ont étudié la stabilité de marqueurs fluorescents dans les NCL ; les résultats ont montré que les carbocyanines lipophiles sont localisés dans la couche du tensioactif autour du cœur huileux. Grâce à leur structure amphiphile, ces colorants participent probablement au processus de formulation des nanocapsules et leur libération indiquerait la destruction des NCL.

5.2. Caractérisations des nanocapsules fluorescentes :

Les NCL25 vides ou marquées au DiI à 0,2 % sont préparées et caractérisées. La concentration en nanocapsules correspond à la masse sèche. Les caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules vides et fluorescentes sont consignées dans le **Tableau 1.3**.

Formulation	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)	Taux d'encapsulation (%)	[NCL] en (mg/mL)	[DiI] en (μM)
NCL25 vides	26,8 ± 0,2	0,11 ± 0,01	- 4,8 ± 1,8	-	65,8 ± 0,5	-
NCL25-DiI	25,1 ± 1,9	0,08 ± 0,02	0,1 ± 0,3	99 ± 0,8	66,0 ± 1,2	64 ± 1,1

Tableau 1.3 – Caractéristiques physico-chimiques des NCL25 vides et marquées au DiI.

L'incorporation du DiI dans les nanocapsules lipidiques n'a pas d'influence sur le diamètre moyen de ces nanostructures. La nature chimique lipophile de ce marqueur favorise sa solubilisation dans la phase huileuse lors de la formulation des NCL. Les nanocapsules marquées gardent une monodispersité importante ($IP < 0,2$). Par ailleurs, le potentiel zêta des NCL marquées au DiI augmente légèrement comparé à celui des NCL vides ($-4,8 \pm 1,8$ mV pour les NCL25 vides et $+0,1 \pm 0,3$ mV pour les NCL25-DiI). Ce résultat confirme une localisation de la carbocyanine chargée positivement à l'interface huile – tensioactifs à l'intérieur des nanocapsules.

Nous avons également caractérisés les deux lots de NCL25 vides et marquées au DiI par spectroscopie UV-visible (**Figure 1.18**). Les formulations correspondant aux nanocapsules ont été mesurées dans l'eau ultrapure, alors que le colorant DiI a été solubilisé dans le solvant DMSO avant la mesure de l'absorbance.

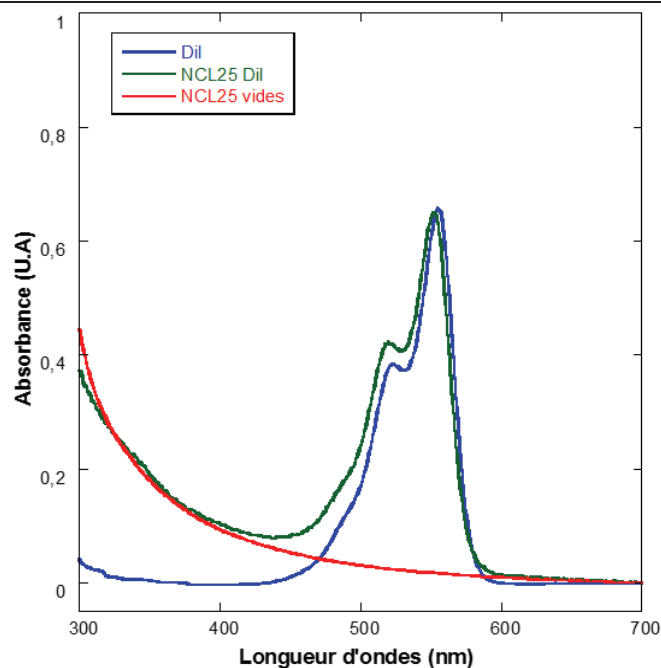


Figure 1.18 – Spectres d’absorbance UV-Vis de NCL25 vides à 4,1 mg/mL, NCL25-DiI à 4,1 mg/mL en NCL et 4 μ M en DiI et DiI à 4 μ M.

La superposition des spectres d’absorbance des NCL25 contenant le DiI et du DiI libre en solution nous a permis de confirmer que les nanocapsules pouvaient être une bonne alternative pour la solubilisation de colorants lipophiles ou peu solubles dans les solvants aqueux. En effet, le DiI présente le même profil d’absorbance en UV-Vis (deux bandes d’absorption à 520 et 550 nm), qu’il soit encapsulé ou libre en solution. Il est à noter que les nanocapsules lipidiques absorbent légèrement dans l’ultraviolet ($\lambda < 400$ nm).

5.3. Internalisation cellulaire des NCL fluorescentes :

5.3.1. Microscopie à fluorescence :

Afin de comprendre le mécanisme par lequel les nanocapsules lipidiques sont internalisées dans les cellules, nous avons incubées les cellules avec des NCL25 marquées au DiI à deux températures différentes : 4°C et 37°C pendant 4 heures.

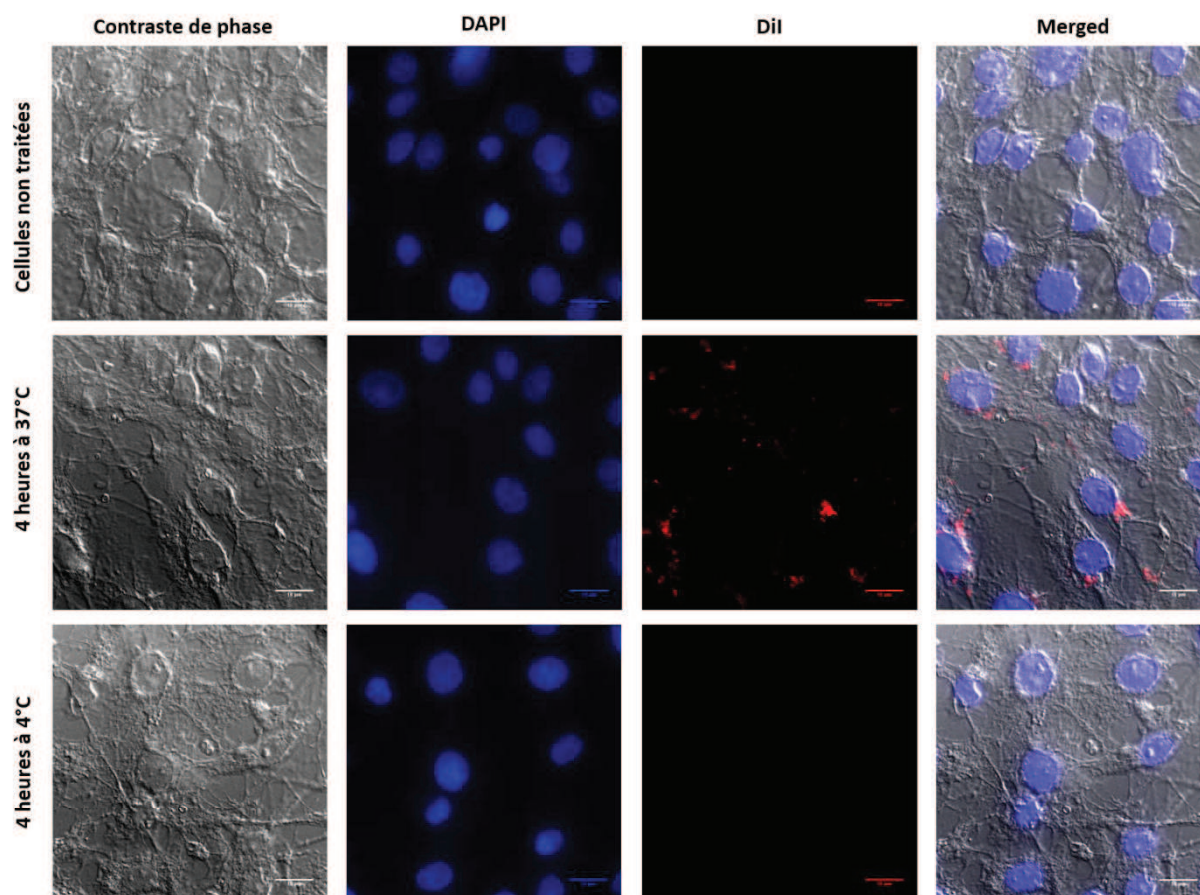


Figure 1.19 – Microscopie à fluorescence des cellules HeLa après 4 heures d’incubation avec NCL25-DiI à 250 µg/mL : DAPI (marquage du noyau en bleu), DiI (fluorescence des NCL en rouge), Merged (fusion des trois images).

Il a été établi auparavant que les faibles températures inhibaient les processus d’internalisation dépendant de l’énergie, notamment l’endocytose [66]. L’incubation des cellules avec les nanocapsules fluorescentes à 4°C permet de bloquer leur endocytose. Les images observées après fixation montrent qu’il y a absence de fluorescence du DiI dans les cellules (**Figure 1.19**). Cependant, lorsque les cellules sont incubées à 37 °C en présence des NCL25-DiI, on observe une fluorescence intracellulaire sous forme de spots autour des noyaux cellulaires. Cette fluorescence est due à l’internalisation des nanocapsules. Ainsi, ces résultats confirment ceux déjà obtenus dans d’autres études [56, 66] i.e. que les nanocapsules lipidiques entrent dans les cellules *in vitro* par endocytose.

Nous avons fait varier par la suite le temps d'incubation des cellules avec les nanocapsules de 30 minutes à 4 heures afin de suivre la cinétique d'internalisation des NCL fluorescentes.

Les images d'observation microscopique montrent que l'endocytose des nanocapsules est très rapide. La **Figure 1.20 (b)** affiche la présence de « points rouges » correspondant aux NCL25-DiI dans le cytoplasme de presque toutes les cellules. Les études réalisées sur d'autres lignées cellulaires ont montré que les nanocapsules lipidiques pénétraient dans les cellules après un temps d'exposition très court (2 minutes) et se retrouvaient dans les endosomes primaires [56].

D'autre part, on remarque que l'intensité de fluorescence ainsi que le nombre des nanocapsules diminuent au cours du temps d'exposition (**Figure 1.20**). Cette observation suggère une dégradation des NCL ou encore leur exocytose (mécanisme inverse de l'endocytose : sortie de la cellule vers le milieu extracellulaire). Cependant, la possibilité de la destruction des nanocapsules est moins probable car elle serait accompagnée de la diffusion du colorant DiI.

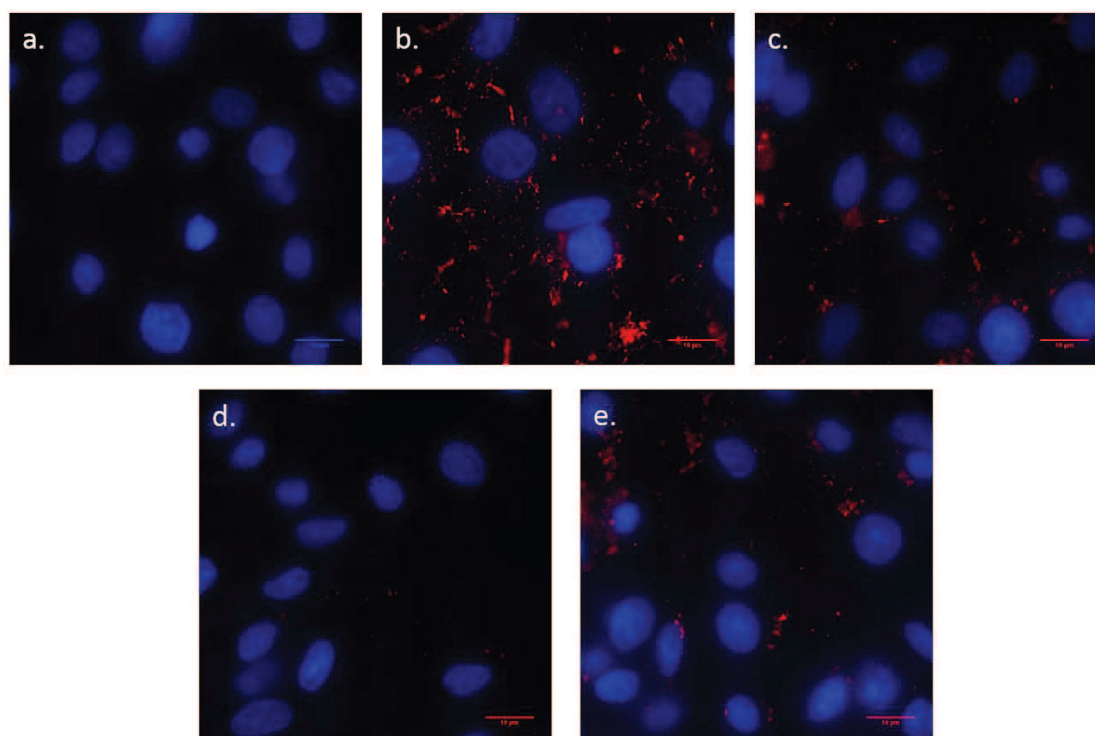


Figure 1.20 – Microscopie à fluorescence de cellules HeLa (noyau en bleu et NCL25-DiI en rouge), a : Cellules non traitées ; b : NCL25-DiI après 30 minutes d’incubation ; c : NCL25-DiI après 1 heure d’incubation ; d : NCL25-DiI après 2 heures d’incubation ; e : NCL25-DiI après 4 heures d’incubation.

En combinant ainsi les résultats obtenus dans cette étude avec ceux rapportés dans la littérature, trois principaux points des caractéristiques biologiques des nanocapsules lipidiques peuvent être mis en évidence.

Tout d’abord, l’internalisation des NCL dans les cellules est un mécanisme actif, rapide et saturable, médié principalement par les voies clathrine / cavéole indépendantes et cholestérol dépendant, indicatif de l’endocytose. Deuxièmement, l’accumulation des NCL dans les cellules dure assez longtemps pour permettre de prolonger la biodisponibilité intracellulaire du principe actif. Enfin, les nanocapsules ont été faiblement retrouvées dans les lysosomes et sont donc capables d’échapper à la dégradation lysosomale [56]. Il est nécessaire cependant de noter la différence observée dans le comportement des nanocapsules vis-à-vis des cellules entre les lots de tailles différentes (25, 50 et 100 nm).

5.3.2. Microscopie électronique en transmission (MET) :

Les nanocapsules lipidiques ont été incubées avec des cellules HEK à une concentration de 1 mg/mL pendant 30 minutes. Après fixation, les échantillons ont été observés au MET.

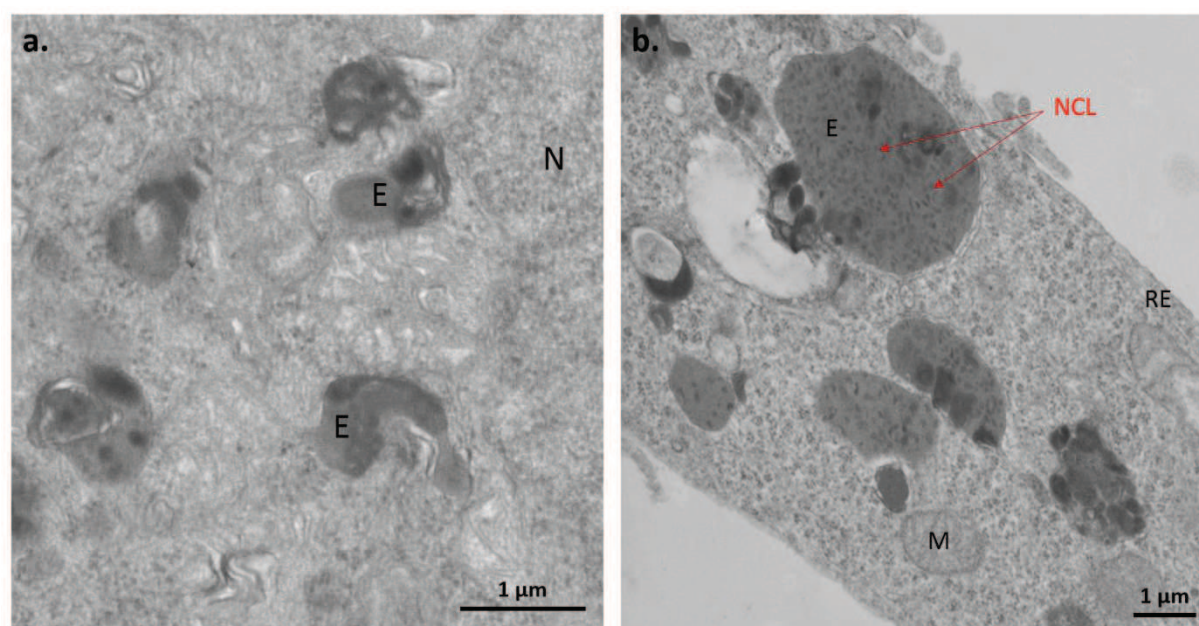


Figure 1.21 – Microscopie électronique en transmission des cellules HEK, 30 minutes d’incubation ; **a** : cellules non traitées (contrôle négatif) ; **b** : NCL25 vides à 1 mg/mL (N : noyau, E : endosome, RE : réticulum endoplasmique, M : mitochondrie).

L’internalisation des nanocapsules par endocytose a été confirmée par MET. En effet, au bout de 30 minutes d’incubation à 37°C, l’observation des compartiments cellulaires montre que les NCL se retrouvent dans les endosomes (**Figure 1.21**). Sur l’image (**b**) de la figure, les flèches en rouge montrent les NCL dans un endosome tardif.

6. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons montré le potentiel des nanocapsules lipidiques à vectoriser des principes actifs et des sondes fluorescentes peu solubles dans l’eau. L’encapsulation de ces

molécules permet de les solubiliser en milieu aqueux tout en gardant leurs caractéristiques physico-chimiques (fluorescence, absorption..) intacts.

La biocompatibilité des nanocapsules lipidiques ainsi que leur internalisation a été démontrée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires. Par ailleurs, l'étude de la stabilité physique de ces nano-objets a montré qu'elles étaient parfaitement stables aux différentes conditions physiologiques (pH, température, milieu de culture, tampon) pour un temps d'incubation donné (1 heure).

Ainsi, au vue de leurs caractéristiques physico-chimiques très prometteuses, les nanocapsules lipidiques représentent une plateforme biomédicale idéale pour la délivrance de principes actifs mais aussi peuvent s'inscrire parfaitement dans la stratégie de la combinaison de thérapie ou encore le ciblage actif de tissus malades.

Références bibliographiques :

1. Wilczewska, A.Z., et al., *Nanoparticles as drug delivery systems*. Pharmacol Rep, 2012. **64**: p. 1020 - 1037.
2. Faraji, A.H., et al., *Nanoparticles in cellular drug delivery*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(8): p. 2950-62.
3. Godsey, M.E., et al., *Materials innovation for co-delivery of diverse therapeutic cargos*. RSC Adv, 2013. **3**(47): p. 24794-24811.
4. Wang, A.Z., et al., *Nanoparticle delivery of cancer drugs*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 185-98.
5. Shaikh, I.M., et al., *Liposome co-encapsulation of synergistic combination of irinotecan and doxorubicin for the treatment of intraperitoneally grown ovarian tumor xenograft*. J Control Release, 2013. **172**(3): p. 852-861.
6. Afergan, E., et al., *Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes*. J Control Release, 2008. **132**(2): p. 84-90.
7. Wong, J.P., et al., *Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular Francisella tularensis infection*. J Control Release, 2003. **92**(3): p. 265-273.
8. Simoes, S., et al., *Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides*. Gene Ther, 1999. **6**(11): p. 1798-807.
9. Zucker, D., et al., *Optimization of vincristine-topotecan combination--paving the way for improved chemotherapy regimens by nanoliposomes*. J Control Release, 2010. **146**(3): p. 326-33.
10. Zucker, D., et al., *Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 281-9.
11. Saad, M., et al., *Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer*. Nanomedicine (Lond), 2008. **3**(6): p. 761-76.
12. Zhong, Z., et al., *Co-delivery of adenovirus and carmustine by anionic liposomes with synergistic anti-tumor effects*. Pharm Res, 2012. **29**(1): p. 145-57.
13. Bilensoy, E., et al., *Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors*. Int J Pharm, 2009. **371**(1-2): p. 170-6.
14. Bai, J., et al., *One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite*. Mat Chem Phys, 2007. **106**(2-3): p. 412-415.
15. Zhang, Z.Y., et al., *High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(6): p. 805-14.
16. Martínez, A., et al., *Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems*. Carbo Poly, 2011. **83**(3): p. 1311-1321.
17. Saraogi, G.K., et al., *Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis*. Int J Pharm, 2010. **385**(1-2): p. 143-9.
18. Thambi, T., et al., *Bioreducible Carboxymethyl Dextran Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery*. Adv Healthc Mater, 2014. DOI: 10.1002/adhm.201300691.
19. Park, I.K., et al., *Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: in vitro transfection*. Arch Pharm Res, 2004. **27**(12): p. 1284-9.
20. Cheng, D., et al., *Multifunctional nanocarrier mediated co-delivery of doxorubicin and siRNA for synergistic enhancement of glioma apoptosis in rat*. Biomaterials, 2012. **33**(4): p. 1170-9.

21. Cao, N., et al., *The synergistic effect of hierarchical assemblies of siRNA and chemotherapeutic drugs co-delivered into hepatic cancer cells*. Biomaterials, 2011. **32**(8): p. 2222-32.
22. Creixell, M., et al., *Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance*. Nano Today, 2012. **7**(4): p. 367-379.
23. Radler, J.O., et al., *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science, 1997. **275**(5301): p. 810-4.
24. Godbey, W.T., et al., *Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency*. Gene Ther, 1999. **6**(8): p. 1380-8.
25. Han, L., et al., *Plasmid pORF-hTRAIL and doxorubicin co-delivery targeting to tumor using peptide-conjugated polyamidoamine dendrimer*. Biomaterials, 2011. **32**(4): p. 1242-52.
26. Acton, A.L., et al., *Janus PEG-based dendrimers for use in combination therapy: controlled multi-drug loading and sequential release*. Biomacromol, 2013. **14**(2): p. 564-74.
27. Clementi, C., et al., *Dendritic poly(ethylene glycol) bearing paclitaxel and alendronate for targeting bone neoplasms*. Mol Pharm, 2011. **8**(4): p. 1063-72.
28. Gupta, A.K., et al., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
29. Feldherr, C.M., et al., *Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells*. J Cell Biol, 1991. **115**(4): p. 933-9.
30. He, Q., et al., *A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug delivery system for overcoming multi-drug resistance*. Biomaterials, 2011. **32**(30): p. 7711-20.
31. Li, Z., et al., *Organically modified MCM-type material preparation and its usage in controlled amoxicillin delivery*. J Colloid Interface Sci, 2010. **342**(2): p. 607-13.
32. Bajpai, A.K., et al., *Magnetically mediated release of ciprofloxacin from polyvinyl alcohol based superparamagnetic nanocomposites*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(2): p. 357-69.
33. Hua, M.Y., et al., *Magnetic-nanoparticle-modified paclitaxel for targeted therapy for prostate cancer*. Biomaterials, 2010. **31**(28): p. 7355-63.
34. Kumar, C.S., et al., *Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(9): p. 789-808.
35. Chen, Y., et al., *Inorganic Nanoparticle-Based Drug Codelivery Nanosystems To Overcome the Multidrug Resistance of Cancer Cells*. Mol Pharm, 2014. **11**(8): p. 2495-2510.
36. Parveen, S., et al., *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*. Nanomedicine, 2012. **8**(2): p. 147-66.
37. Gullotti, E., et al., *Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery*. Mol Pharm, 2009. **6**(4): p. 1041-51.
38. Maeda, H., et al., *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 409-19.
39. Akao, T., et al., *A poly(gamma-glutamic acid)-amphiphile complex as a novel nanovehicle for drug delivery system*. J Drug Target, 2010. **18**(7): p. 550-6.
40. Sahoo, S.K., et al., *Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer*. Int J Cancer, 2004. **112**(2): p. 335-40.
41. Sahoo, S.K., et al., *Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention*. Mol Pharm, 2005. **2**(5): p. 373-83.

42. Choi, C.H., et al., *Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010. **107**(3): p. 1235-40.
43. Tong, R., et al., *The formulation of aptamer-coated paclitaxel-poly(lactide) nanoconjugates and their targeting to cancer cells*. Biomaterials, 2010. **31**(11): p. 3043-53.
44. Kocbek, P., et al., *Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody*. J Control Release, 2007. **120**(1-2): p. 18-26.
45. Yameen, B., et al., *Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting*. J Control Release, 2014. **190**: p. 485-499.
46. Steinman, R.M., et al., *Endocytosis and the recycling of plasma membrane*. J Cell Biol, 1983. **96**(1): p. 1-27.
47. Aderem, A., et al., *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
48. Rabinovitch, M., *Professional and non-professional phagocytes: an introduction*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(3): p. 85-7.
49. Kirchhausen, T., *Clathrin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 699-727.
50. De Jong, W.H., et al., *Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards*. Int J Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 133 - 149.
51. Oberdorster, G., *Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology*. J Intern Med, 2010. **267**(1): p. 89-105.
52. Sharma, A., et al., *Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(1): p. 47-69.
53. Dhawan, A., et al., *Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges*. Anal Bioanal Chem, 2010. **398**(2): p. 589-605.
54. Heurtault, B., et al., *Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament*. 2001. Patent WO 2001064328 A1.
55. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 875-80.
56. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7542-54.
57. Beduneau, A., et al., *Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties*. Pharm Res, 2006. **23**(9): p. 2190-9.
58. Lamprecht, A., et al., *New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone*. J Control Release, 2002. **84**: p. 59 - 68.
59. Lamprecht, A., et al., *Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment*. Int J Pharm, 2004. **278**(2): p. 407-14.
60. Pereira de Oliveira, M., et al., *Tissue distribution of indinavir administered as solid lipid nanocapsule formulation in mdr1a (+/+) and mdr1a (-/-) CF-1 mice*. Pharm Res, 2005. **22**(11): p. 1898-1905.
61. Lacoëuille, F., et al., *In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel*. Int J Pharm, 2007. **344**(1-2): p. 143-9.
62. Lamprecht, A., et al., *Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition*. J Control Release, 2006. **112**(2): p. 208-13.
63. Ballot, S., et al., *^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2006. **33**(5): p. 602-7.
64. Jestin, E., et al., *Radiolabeling and targeting of lipidic nanocapsules for applications in radioimmunotherapy*. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **51**(1): p. 51-60.

65. Allard, E., et al., *188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(10): p. 1838-46.
66. Bastiat, G., et al., *A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging*. J Control Release, 2013. **170**(3): p. 334-42.
67. Heurtault, B., et al., *The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution*. Eur J Pharm Sci, 2003. **18**(1): p. 55-61.
68. Heurtault, B., et al., *Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 167-70.
69. Vonarbourg, A., et al., *Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface*. Electrophoresis, 2005. **26**(11): p. 2066-75.
70. Heurtault, B., et al., *Physico-chemical stability of colloidal lipid particles*. Biomaterials, 2003. **24**(23): p. 4283-4300.
71. Barras, A., et al., *Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules*. Int J Pharm, 2009. **379**(2): p. 270-7.
72. Heeb, R., et al., *Influence of salt on the aqueous lubrication properties of end-grafted, ethylene glycol-based self-assembled monolayers*. ACS Appl Mater Interfaces, 2009. **1**(5): p. 1105-12.
73. Sanchez-Moreno, P., et al., *Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(2): p. 2405-24.
74. Coon, J.S., et al., *Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 897 - 902.
75. Nikam, D.S., et al., *Colloidal stability of polyethylene glycol functionalized Co_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanoparticles: effect of pH, sample and salt concentration for hyperthermia application*. RSC Adv, 2014. **4**: p. 12662-12671.
76. Maupas, C., et al., *Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells*. Int J Pharm, 2011. **411**(1-2): p. 136-41.

Chapitre 2 : Les Nanocapsules Cationiques : Vectorisation de plasmide ADN et principe actif

A. Introduction bibliographique :

Le développement des technologies de génomique ainsi qu'une meilleure compréhension des gènes impliqués dans la croissance du cancer ont permis d'envisager le traitement de ce genre de pathologies complexes en utilisant la thérapie génique. Cependant, l'application de la thérapie génique reste limitée actuellement par la faible efficacité de transfection et la toxicité des vecteurs utilisés.

Parmi les différents vecteurs de gènes, on distingue deux systèmes de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Bien qu'ils soient efficaces, les vecteurs viraux représentent un risque additionnel compte tenu de leur forte immunogénicité et cytotoxicité potentielle. En plus du coût éventuellement élevé de leur préparation. Les vecteurs non viraux représentent ainsi une alternative intéressante pour la vectorisation efficace et sans risque de principes actifs et gènes. Le principal défi consiste alors à préparer un système non toxique, efficace et à bas coût.

L'étude bibliographique de ce chapitre sera consacrée à la présentation de la thérapie génique et plus précisément la transfection de gènes, les vecteurs utilisés en s'intéressant surtout aux vecteurs non viraux. Enfin, les différents obstacles intracellulaires que rencontrent ces vecteurs *in vitro* seront discutés.

1. La thérapie génique :

La thérapie génique consiste à traiter une anomalie génétique (mutation, altération) à l'origine d'une maladie en utilisant le gène comme principe actif. Elle est à ce jour utilisée pour diverses applications thérapeutiques et plus particulièrement dans le traitement de cancers. Il existe deux principales voies de thérapie génique : *in vivo* (administrer le matériel génétique directement dans l'organisme) et *ex vivo* (modifier génétiquement les cellules cibles prélevées chez le patient et les ré-administrer dans son organisme) (**Figure 2.1**).

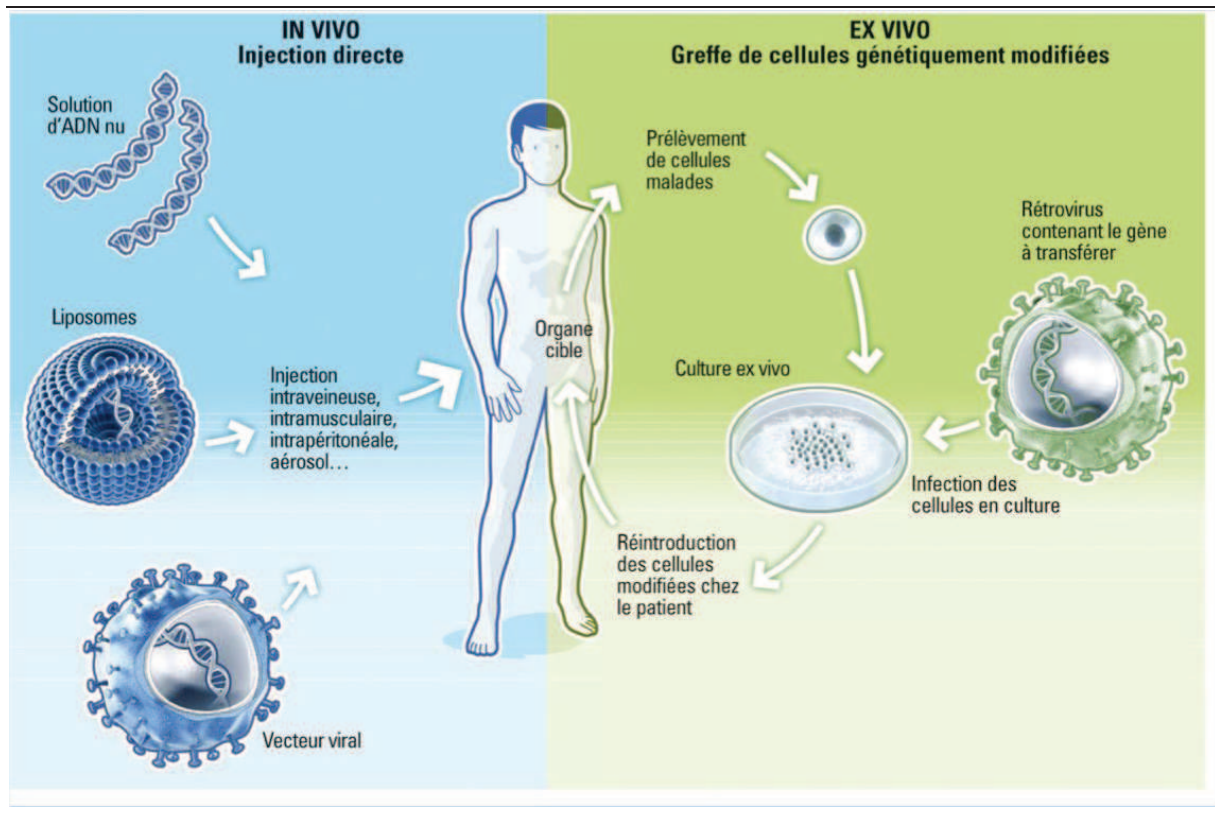


Figure 2.1 : Les deux voies de la thérapie génique [1].

1. 1. Les vecteurs de la transfection :

1. 1. 1. L'ADN nu :

La première approche consiste en l'utilisation d'ADN nu sous forme plasmidique. C'est un vecteur composé d'un ADN circulaire portant un gène qui code pour une protéine d'intérêt. L'ADN nu présente l'avantage d'être facile à produire, peu coûteux et surtout de n'avoir aucune limite pour la taille du gène thérapeutique à insérer. L'injection directe au niveau de la tumeur a montré un niveau d'expression du gène important permettant d'utiliser cette approche dans divers protocoles expérimentaux [2]. Cependant, cette stratégie souffre de plusieurs inconvénients notamment la limitation à une application aux organes accessibles par injection directe et la dégradation de l'ADN nu par les enzymes présentes dans le sérum lors de la délivrance systémique [2]. Ainsi, dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection, des vecteurs viraux et non viraux ont été développés.

1. 1. 2. Les vecteurs viraux :

La deuxième approche consiste en l'utilisation de virus modifiés comme vecteurs de gènes. En effet, ce sont des vecteurs naturels dotés d'une grande capacité à transférer leur matériel génétique dans une cellule. Le principe est donc de les modifier génétiquement afin de les utiliser comme vecteurs pour la thérapie génique. Les plus utilisés sont les rétrovirus, les adénovirus et les virus adénovirus-associés (**Figure 2.2**).

Bien qu'ils soient très efficaces dans la transfection de gènes, les vecteurs viraux présentent de nombreux inconvénients principalement la sécurité, le risque d'induire une réponse immunitaire (immunogénicité), la limitation en taille de gènes à insérer et le coût de production assez onéreux.

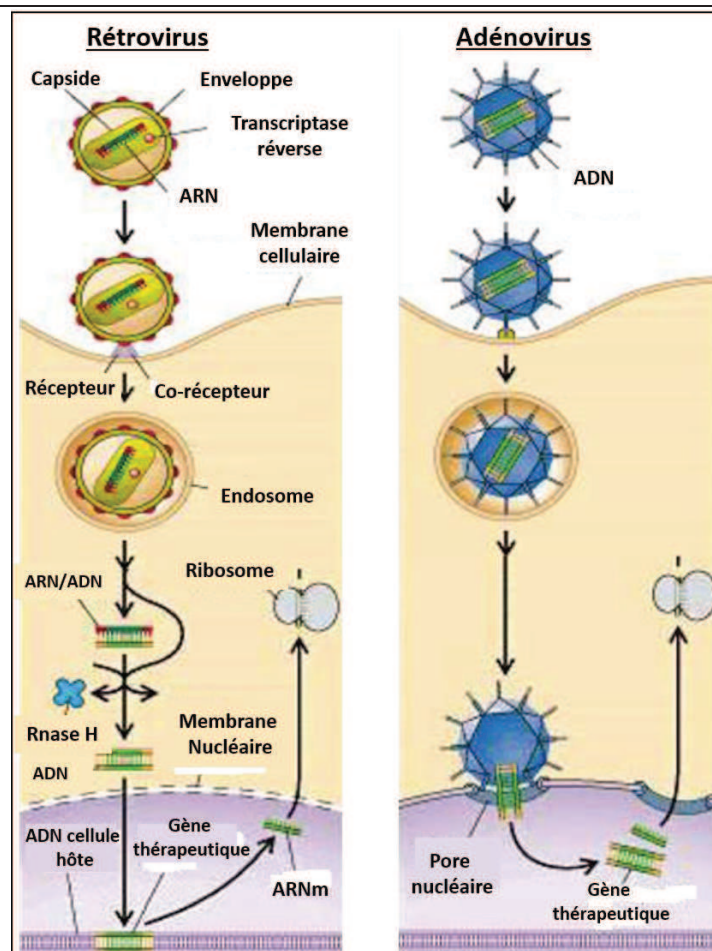


Figure 2.2 : Mécanismes de transfection par les vecteurs viraux (rétrovirus et adénovirus).

transfecter [2] (**Figure 2.4**). Paradoxalement, ces mêmes charges cationiques, représentent une forte toxicité pour les cellules et limitent l'utilisation de ces polymères *in vivo* [5]. La densité importante en groupements amines primaires, secondaires et tertiaires ayant un pouvoir de protonation confère au PEI une capacité tampon très importante à différents pH. Cette propriété appelée « éponge à protons » est probablement l'un des facteurs les plus importants dans l'efficacité de transfection de ces polymères [3].

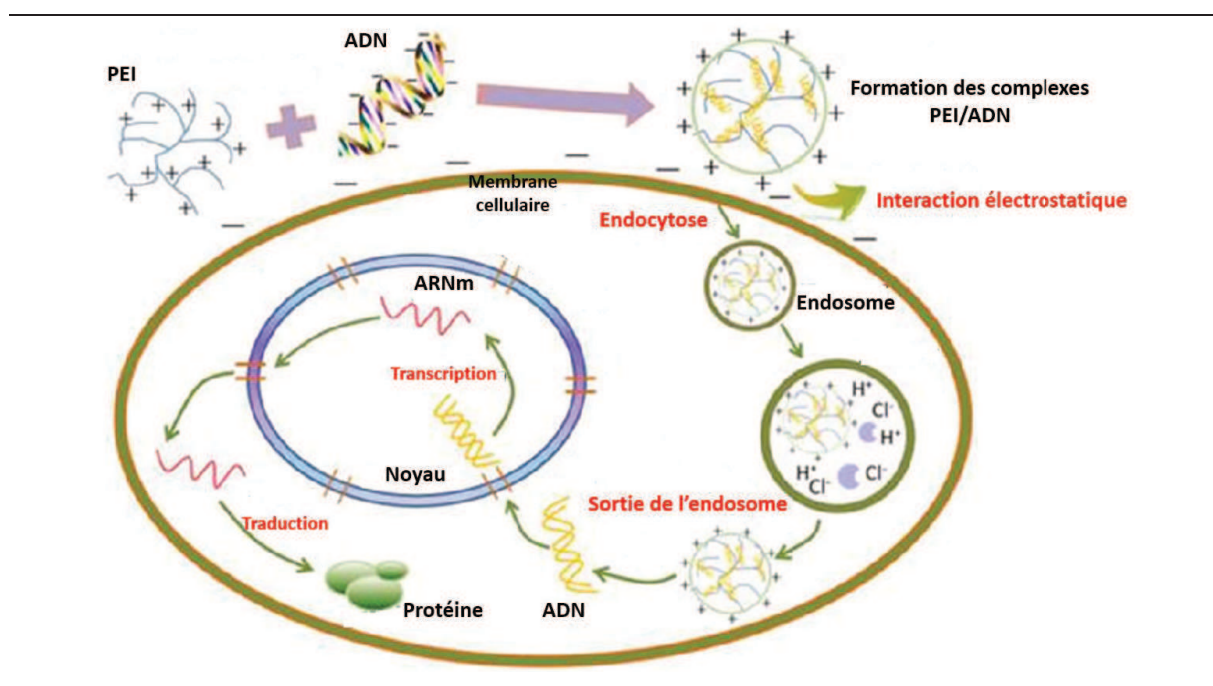


Figure 2.4 – Représentation schématique de la transfection avec le polymère PEI (d'après [6]).

❖ La poly (L-lysine) (PLL) :

La PLL est l'un des premiers polymères cationiques utilisés dans la délivrance de gènes [7]. Il a une structure de polypeptide biodégradable, ce qui le rend adéquat pour l'application *in vivo* (**Figure 2.5**). Cependant, la PLL présente une cytotoxicité assez élevée.

Les polyplexes formés entre la PLL et l'ADN sont internalisés par les cellules aussi efficacement que pour le PEI, mais les taux de transfection restent très bas comparés à ceux du PEI [4]. Une raison qui pourrait expliquer cette différence est le manque de groupements amines avec un pKa entre 5 et 7 permettant la libération endosomale [8].

Ainsi, l'utilisation de peptides fusogéniques [9] ou d'agents endosomolytiques [10] pourrait permettre l'amélioration du niveau de transfection. Aussi, le greffage d'histidine ou autres structures contenant l'imidazole à la PLL a permis d'avoir une efficacité d'expression de gène rapporteur plus importante comparé à la PLL non modifiée [11, 12].

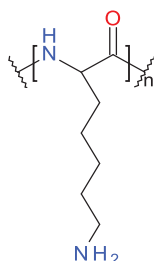


Figure 2.5 - Structure chimique de la Poly (L-lysine).

❖ Les dendrimères :

Les dendrimères sont des polymères sphériques et branchés. Ils sont obtenus grâce un processus arborescent autour d'un cœur central à partir duquel des monomères vont se ramifier de façon symétrique et ordonné (**Figure 2.6**).

Les dendrimères portent des amines primaires à leur surface et des amines tertiaires à l'intérieur. Les amines primaires permettent de se lier à l'ADN et le condenser en nanoparticules qui seront internalisées par les cellules, tandis que les groupements amines tertiaires vont agir comme une « éponge à protons » dans les endosomes et favoriser la libération des complexes dans le cytoplasme [2].

La taille et le diamètre des dendrimères ont une importance dans l'efficacité de transfection. En effet, les dendrimères de génération (10) ont un potentiel de transfert de gènes plus efficace comparés aux dendrimères de génération (5) [13]. Les dendrimères constitués de polymères poly(amidoamine) sont les plus utilisés pour la délivrance d'acides nucléiques sous le nom commercial de Polyfect® ou Superfect® [4].

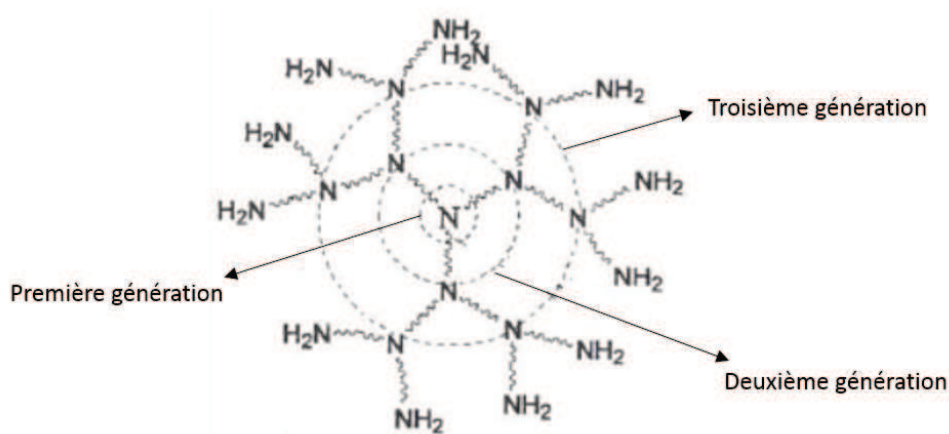


Figure 2.6 - Structure générale d'un dendrimère (d'après [4]).

❖ *Le chitosan :*

Le chitosan est un polysaccharide linéaire biodégradable et biocompatible. Il est composé de sous unités *N*-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liée par une liaison β (1-4) (**Figure 2.7**), produit par désacétylation de la chitine (le composant de l'exosquelette des crustacés et des insectes) [2]. Il peut se complexer avec l'ADN pour former des petites particules stables de taille (20 – 500 nm) et le protègent contre la dégradation enzymatique [14]. Plusieurs études se sont donc penchées sur le potentiel du chitosan comme vecteur de gènes, notamment l'utilisation de chitosan galactosylé [15], chitosan-*graft*-poly(vinylpyrrolidone) galactosylé [16]...

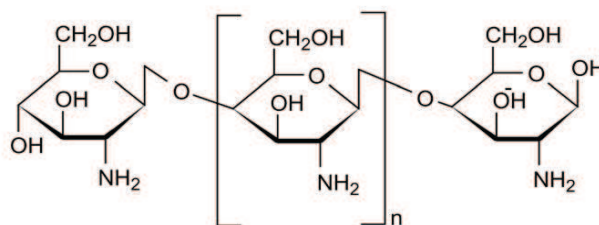


Figure 2.7 – Structure chimique du chitosan.

1. 1. 3. 2. Les lipides cationiques :

La deuxième famille de vecteurs non viraux comprend les lipides cationiques.

Depuis la première application en thérapie génique en 1987, plusieurs lipides cationiques ont été synthétisés et utilisés comme vecteurs de gènes. Ce sont des composés amphiphiles faciles à produire et peuvent être adaptés pour diverses applications [2]. Ils sont constitués de tête polaire cationique liée *via* un espaceur à une ou plusieurs chaînes hydrophobes (**Figure 2.8**).

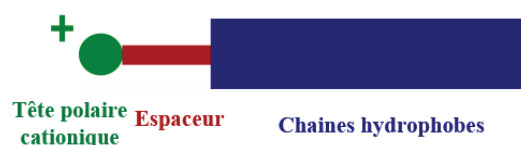


Figure 2.8 - Structure générale des lipides cationiques.

La tête chargée positivement permet de se lier aux groupements phosphates des acides nucléiques, tandis que la partie hydrophobe faciliterait l'endocytose ou la fusion avec les membranes cellulaires [4]. Bien qu'ils soient tous des molécules amphiphiles cationiques, les lipides cationiques peuvent être classés en plusieurs sous-groupes en fonction des caractéristiques de leur structure de base [2] (**Figure 2.9**):

- 1) Les lipides aliphatiques monovalents caractérisés par une seule fonction amine au niveau de la tête tels que le DOTMA, le DOTAP et le DMRIE.
- 2) Les lipides aliphatiques multivalents dont la tête contient plusieurs fonctions amines tel que DOGS.
- 3) Les dérivés cationiques du cholestérol tels que le DC-Chol et le BGTC.

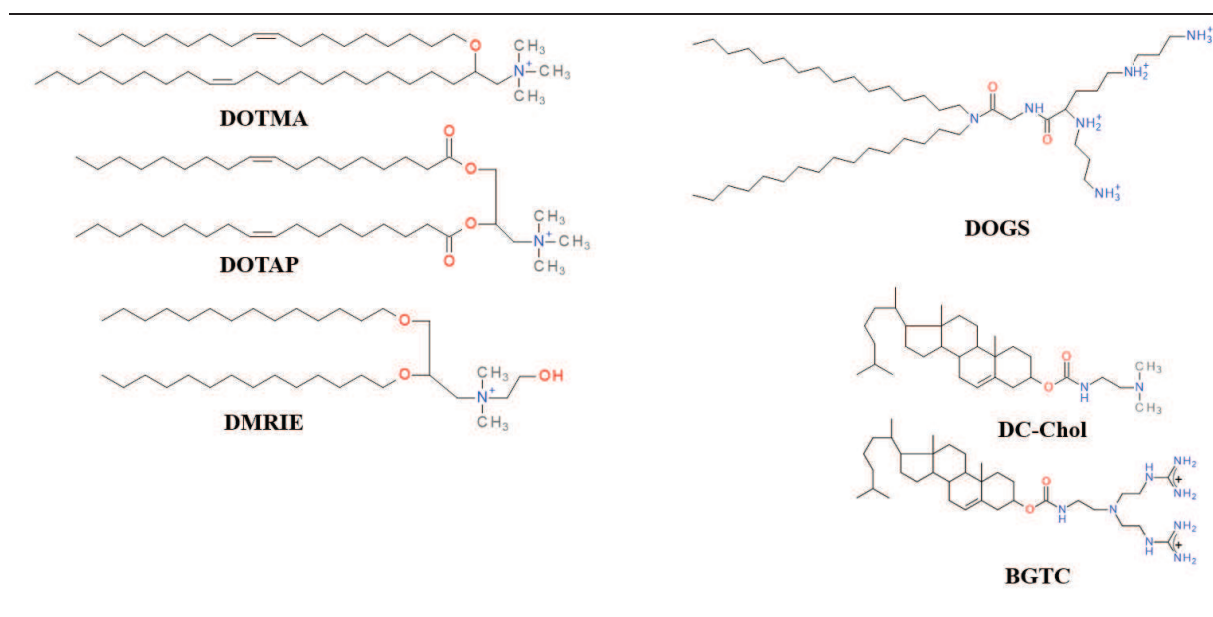


Figure 2.9 – Structures chimiques de lipides cationiques.

Le mécanisme de complexation de l'ADN est similaire à celui avec les polymères cationiques. En effet, les lipides cationiques vont se lier aux acides nucléiques pour former des complexes appelés « lipoplexes » *via* des interactions électrostatiques. En général, la formation de lipoplexes se fait selon deux structures de phase : lamellaire et hexagonale [4] (**Figure 2.10**).

La forme lamellaire est une structure globulaire et condensée, comprenant des monocouches d'ADN intercalées dans les bicouches lipidiques [17], tandis que la structure de phase hexagonale inversée est constituée d'ADN recouvert de monocouches de lipides cationiques sous forme de maille bidimensionnelle [18].

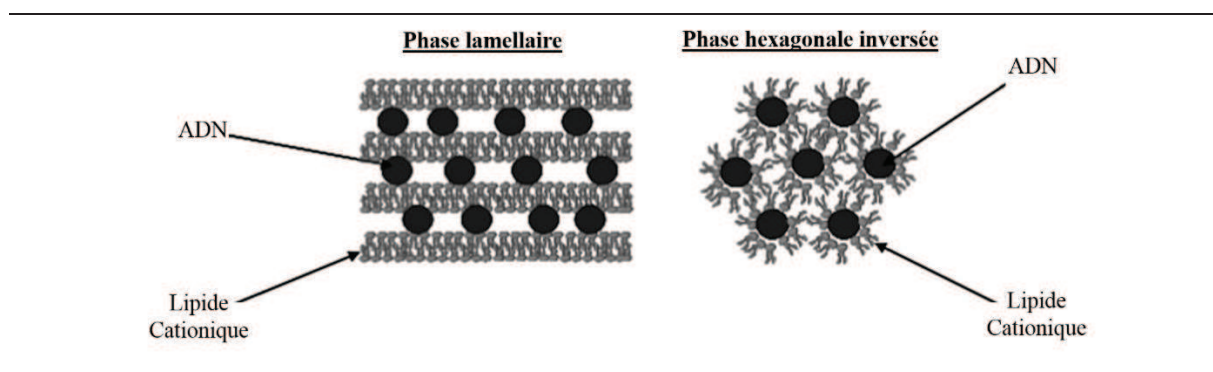


Figure 2.10 - Représentation schématique des structures de lipoplexes [2].

Il est toutefois important de mentionner que les lipides cationiques sont souvent utilisés avec un lipide dit « *Helper* » lors des tests de transfection tels que le DOPE. En effet, ces lipides semblent avoir un rôle important dans l'efficacité de transfection en favorisant la conversion de la phase lamellaire en hexagonale, connue pour être plus optimale au transfert de gènes [19, 20].

1. 1. 3. 3. Les nanoparticules :

Parmi les vecteurs non viraux, les nanoparticules offrent une plateforme idéale pour l'incorporation de toutes les caractéristiques souhaitables en un seul vecteur de gènes. Plusieurs applications dans la délivrance de gènes utilisant les nano-vecteurs de principes actifs déjà connus tels que les liposomes, les NPs lipidiques, les NPs polymériques ou encore les NPs inorganiques sont rapportées dans la littérature.

Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans le développement de nano-systèmes efficaces pour la délivrance de gènes, leur efficacité de transfection est loin d'être satisfaisante.

❖ *Les nanocapsules lipidiques (NCL) :*

Les vecteurs cationiques tels que les lipides et les polymères sont efficaces dans la transfection de gènes *in vitro*. Cependant, leur efficacité *in vivo* reste très limitée par leur instabilité en milieu biologique ainsi que leur toxicité éventuelle due aux charges positives libres [21].

Le choix donc d'utiliser les nanocapsules lipidiques, développées par *Heurtault et al.* [22], comme vecteurs apparaît comme une alternative pour la transfection (**Figure 2.11**).

La formulation des NCL est basée sur le principe d'inversion de phase par la variation de température (trois cycles de température). Les diamètres moyens des nanoparticules résultantes varient entre 20 et 100 nm, en fonction de la proportion de chaque constituant [23]. Les chaînes de polyéthylène glycol (PEG) greffées à leurs surfaces leur confèrent des propriétés de furtivité. En effet, les NCL se caractérisent par un temps de circulation dans le sang relativement important [24].

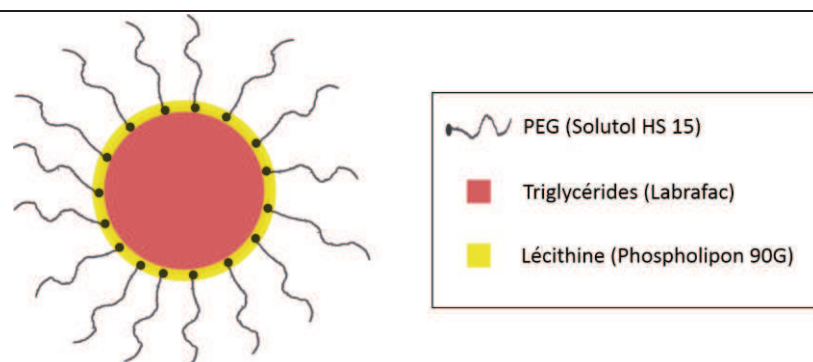


Figure 2.11 : Représentation schématique de nanocapsules lipidiques.

Dans une étude précédente [21], un premier essai d'encapsulation de plasmide ADN dans des nanocapsules lipidiques a été démontré. L'ADN étant une molécule hydrophile, il a fallu le mélanger avec des lipides cationiques DOTAP/DOPE pour former des lipoplexes et encapsuler ces complexes formés dans le cœur huileux des NCL. Les nanocapsules lipidiques chargées en ADN ont été caractérisées et les résultats ont montré que ces NCL sont stables (diamètre des NCL/ADN est de ~ 100 nm) et que la majorité des lipoplexes ont été encapsulés à l'intérieur des nanocapsules lipidiques.

D'autre part, l'électrophorèse sur gel ainsi que la microscopie électronique (cryoMET) ont permis de vérifier que l'ADN était bien encapsulé dans les NCL et qu'il n'était pas dégradé par le processus de formulation. Enfin, l'étude *in vitro* a confirmé la capacité de ces nano-vecteurs à être internalisés par les cellules et à les transfecter efficacement.

Dans le but d'augmenter le temps de circulation des NCL/ADN *in vivo* [25], la surface de ces nano-vecteurs a été modifiée par greffage de deux polymères amphiphiles : le copolymère F108 et le dérivé PEG lipidique DSPE-mPEG₂₀₀₀. La méthode de fonctionnalisation par post-insertion a permis l'obtention de NCL stables avec des diamètres moyens autour de 130 nm. L'ADN encapsulé ne semble pas subir de dégradation lors de la formulation des NCL modifiées avec les polymères et les nanoparticules ainsi obtenues sont plus biocompatibles que les lipoplexes seuls qui affichent une cytotoxicité assez importante.

La modification de la surface des nanocapsules lipidiques chargées en ADN avec des polymères PEG a permis d'améliorer d'une part la biodistribution de ces nano-vecteurs en augmentant le temps de leur circulation dans le sang *in vivo* ainsi que leur accumulation dans les tumeurs, comparées aux NCL/ADN non fonctionnalisés. D'autre part, l'augmentation de l'efficacité de transfection *in vitro* avec le copolymère F108 sur deux lignées cellulaires (H1299 et HeLa) [26] et *in vivo* avec les NCL/ADN modifiées avec le DSPE-mPEG₂₀₀₀ [27, 28].

Par ailleurs, les nanocapsules lipidiques ont été utilisées comme vecteur de gènes dans une approche de ciblage des tumeurs. En effet, *Morille et al.* [26] ont démontré que le greffage de polymères F108 modifiés avec des molécules de galactose permet d'augmenter spécifiquement la transfection des cellules primaires hépatiques qui possèdent les récepteurs de galactose.

Plus récemment, l'étude de la capacité des NCL à cibler des tumeurs de mélanome sur un modèle de souris a montré que les NCL modifiées avec le polymère DSPE-mPEG₂₀₀₀ peuvent transfecter spécifiquement la tumeur greffée *in vivo* et cette expression de gènes co-localise avec les NCL dans les cellules tumorales [29].

Les différentes modifications de surface des nanocapsules lipidiques utilisées pour la transfection d'ADN sont consignées dans la **Figure 2.12**.

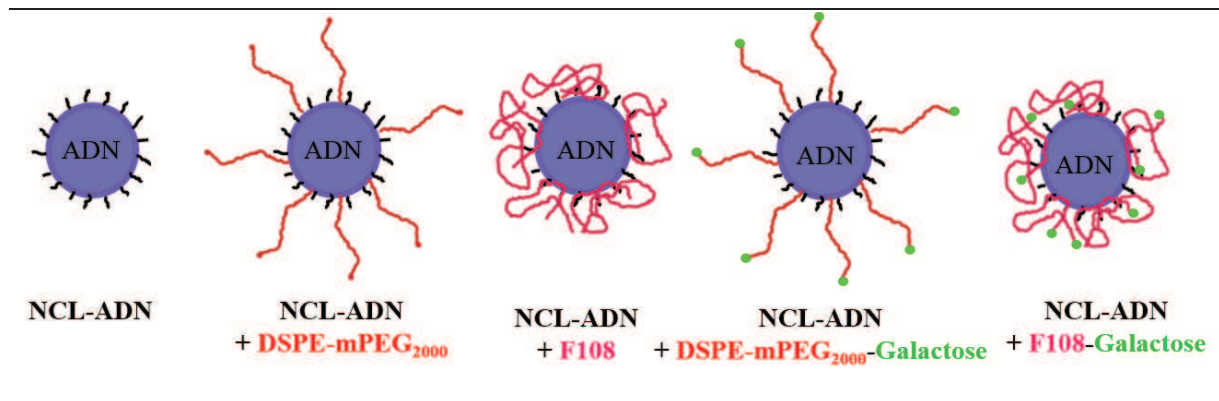


Figure 2.12 - Les différentes NCL utilisées pour la transfection d'ADN.

Une nouvelle approche en thérapie génique consiste à transfecter des ARNsi thérapeutiques dans le but de traiter les cancers. Cette technique est basée sur une nouvelle stratégie introduite en 1998 [30] appelée l'interférence par ARN. Cela se traduit par l'utilisation des petits ARN interférents (ARNsi) pour réduire l'expression de l'ARN messager cible et bloquer l'expression des gènes responsables des tumeurs.

Plusieurs chercheurs se sont donc intéressés à développer des nano-vecteurs capables de transfecter efficacement des ARNsi *in vitro* et *in vivo*.

Dans ce contexte, les nanocapsules lipidiques ont été évaluées pour leur potentiel à vectoriser des ARNsi. Deux stratégies ont été étudiées : l'encapsulation de l'ARNsi dans les NCL *via* des lipoplexes [31, 32] et la formation de complexes *via* l'interaction électrostatique entre les NCL cationiques et les ARNsi [33, 34]. Les résultats ont mis en évidence que les nanocapsules lipidiques étaient capables de transfecter les ARNsi *in vitro* qu'ils soient encapsulés [32] ou adsorbés à leurs surfaces fonctionnalisées avec du chitosan [34] (**Figure 2.13**).

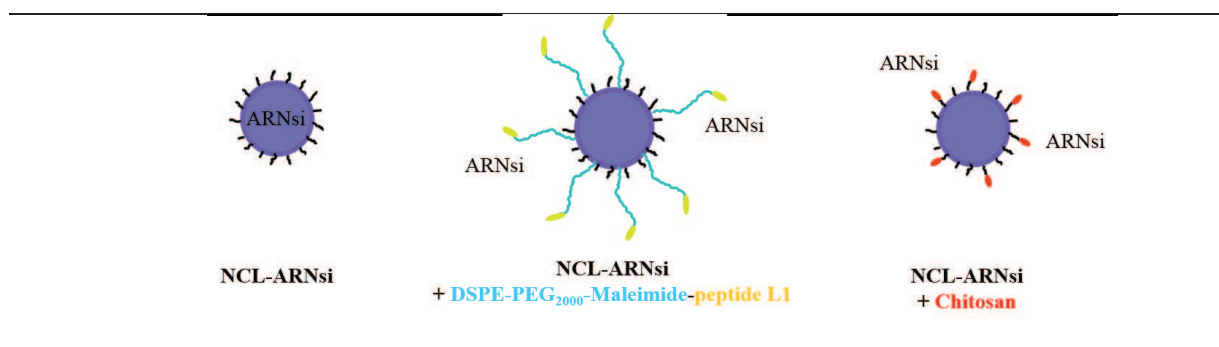


Figure 2.13 - Les différentes NCL utilisées pour la transfection d'ARNsi.

1. 2. Les obstacles à franchir lors de la transfection :

L'efficacité de transfection *in vitro* par les vecteurs non viraux dépend généralement de différents facteurs tels que la préparation des complexes (concentration du vecteur et de l'ADN, forces ioniques des solutions, ratio de charges..), les cellules (lignée cellulaire, confluence, cycle cellulaire...) et autres facteurs (le milieu, le temps d'incubation..).

Une fois internalisés par les cellules, les acides nucléiques doivent traverser plusieurs obstacles intracellulaires avant d'atteindre leurs cibles et entraîner l'effet thérapeutique (**Figure 2.14**). Une formulation optimale doit donc prendre en considération tous ces facteurs et leur influence sur les propriétés du complexe, son internalisation, la cytotoxicité et l'efficacité de transfection [4].

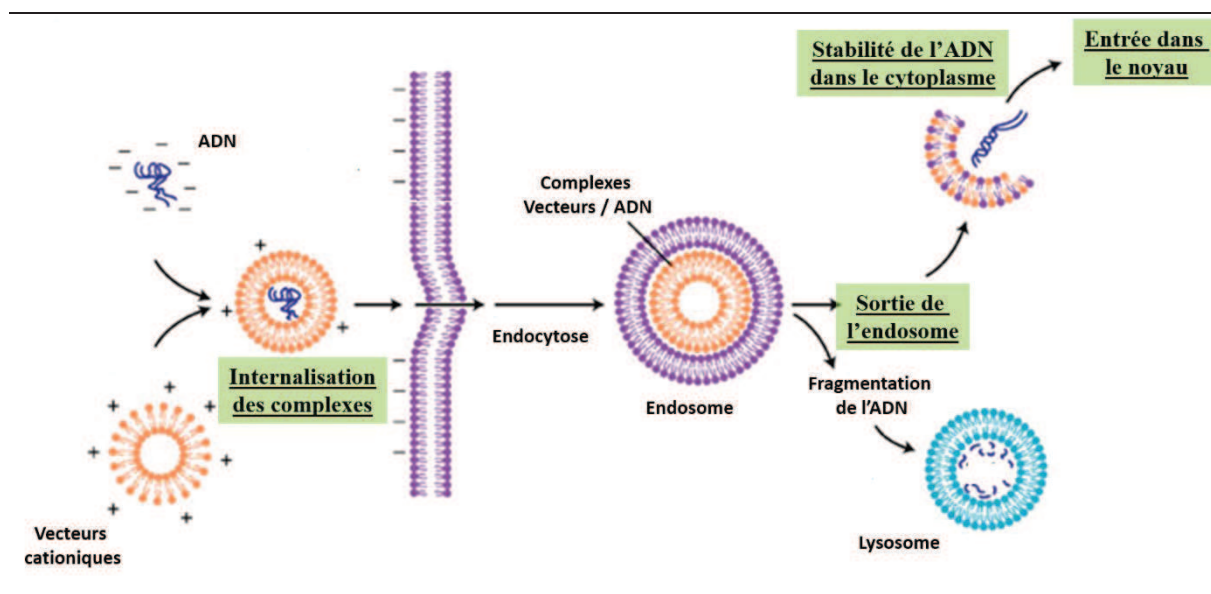


Figure 2.14 – Les étapes de transfection par les vecteurs non viraux (d'après [35]).

1. 2. 1. Internalisation des complexes :

Le premier obstacle à surmonter est la membrane cellulaire. Cette membrane est constituée de bicouches lipidiques intégrant des protéines responsables du trafic entre le milieu extra et intracellulaire. La surface des membranes cellulaires est chargée négativement et c'est principalement dû à la présence de glycoprotéines et glycérophosphates [36].

Plusieurs stratégies ont été proposées dans le but de favoriser l'internalisation des vecteurs de gènes :

- 1) Cationisation des complexes : en se basant sur le fait qu'il pourrait y avoir une interaction électrostatique avec la membrane des cellules chargée négativement, la cationisation des complexes semble être une approche intéressante pour faciliter l'internalisation des vecteurs dans les cellules. Cependant, une forte densité en charges positives peut induire une cytotoxicité et donc l'équilibre entre les charges positives et leur toxicité doit être pris en considération.
- 2) Ciblage : le couplage des complexes avec des peptides ou molécules ciblant les récepteurs d'endocytose tels que la transferrine qui va se lier au récepteur de transferrine [37] mais aussi des anticorps spécifiques à certaines cellules.
- 3) Utilisation de protéines de transduction (PTD) : ce sont des protéines capables de translocer la membrane cytoplasmique sans le passage par le mécanisme d'endocytose [4].

1. 2. 2. Sortie de l'endosome :

La deuxième étape à franchir après l'internalisation est la sortie des compartiments endocytosiques vers le cytoplasme. Quel que soit le mécanisme d'entrée dans la cellule (phagocytose, endocytose..), les complexes vont suivre le chemin endolysosomal (de l'endosome précoce au lysosome). Et afin d'être efficaces, ils doivent échapper à ces compartiments (ou au moins les acides nucléiques qu'ils transportent) car l'environnement acide ainsi que les nucléases présentes dans les lysosomes vont finir par dégrader l'ensemble des complexes. La libération de l'endosome semble de ce fait jouer un rôle clé dans la délivrance de matériel génétique [4].

Deux mécanismes sont proposés :

- 1) Effet « éponge à protons » : les polymères tels que le PEI ayant un potentiel de transfection important se caractérisent par la propriété de tamponner dans l'intervalle de pH des lysosomes (5 – 7). Cette capacité tampon est due à la présence de groupements amines secondaires et tertiaires non protonés. Ainsi, l'effet « éponge à protons » a été proposé comme étant une explication du mécanisme du relargage de tel complexe dans le cytoplasme [3]. Suivant cette hypothèse, la capacité tampon entraînerait un flux de protons et d'ions chlorure durant l'acidification endolysosomale, augmentant la pression osmotique dans la vésicule. Par conséquent,

la diffusion passive de l'eau dans ces vésicules permettra la destruction et la sortie des complexes de la vésicule endosomale [4].

- 2) Déstabilisation de la membrane : la déstabilisation de la membrane de l'endosome est le mécanisme qui traduirait le processus avec lequel les lipoplexes parviennent à échapper aux compartiments endolysosomaux. En effet, l'interaction électrostatique entre les charges cationiques des lipides et les phospholipides anioniques des compartiments intracellulaires [38] pourrait causer la déstabilisation de la courbure des vésicules et finalement entraîner le relargage du contenu de l'endosome dans le cytoplasme [39, 40].

1. 2. 3. Stabilité de l'ADN dans le cytoplasme :

Pour avoir une expression du gène, le plasmide d'ADN doit être transporté jusqu'au noyau. Cependant, la présence de nucléases dans le cytoplasme réduit fortement la demi-vie de ces acides nucléiques. L'ADN nu par exemple a une demi-vie courte d'environ 50 – 90 minutes [41]. C'est pourquoi l'endroit dans le cytoplasme où l'ADN est relargué par les vecteurs est très important dans l'efficacité de l'entrée dans le noyau.

La complexation de l'ADN avec les vecteurs cationiques se fait par condensation des acides nucléiques. Cette condensation permet de réduire la taille et par conséquent la mobilité de l'ADN dans le cytoplasme favorisant son entrée dans le noyau [42, 43]. Il a aussi été démontré que les vecteurs jouent un rôle important dans la protection de l'ADN de la dégradation enzymatique dans le cytoplasme [44]. En effet, en le condensant en complexes, les vecteurs cationiques vont former une couche autour de l'ADN qui limite le contact de ce dernier avec les nucléases type DNase I présentes dans le cytoplasme.

1. 2. 4. Entrée dans le noyau :

La dernière barrière à franchir pour avoir une transfection efficace est le noyau. Plus précisément l'enveloppe nucléaire, qui est constituée d'une double membrane intégrant des complexes de pores nucléaires [45]. L'entrée dans le noyau peut se faire durant la mitose car la membrane nucléaire se désassemble [46], mais aussi au moment de l'interphase, *via* les pores nucléaires. Cependant, seules les petites molécules (~ 10 nm) ou les ions peuvent diffuser passivement à travers les pores. Les molécules plus larges tels que le plasmide d'ADN et l'ARN doivent être reconnues par les récepteurs nucléaires pour translocer à l'intérieur du noyau. Cette reconnaissance peut se faire avec des séquences de localisation

nucléaire (NLS). Ce sont des séquences d'acides aminés qui permettent le transport actif des ADN ou protéines dans le noyau [47, 48].

2. Conclusion :

Le succès de la thérapie génique dépend principalement des systèmes de vectorisation du matériel génétique. Le futur verra une combinaison des techniques du génie génétique et des progrès en nanotechnologies.

Incontestablement, les vecteurs viraux recombinants restent toujours les vecteurs de gènes les plus efficaces comparés aux vecteurs non viraux. Bien que des améliorations considérables aient été réalisées au cours des dernières années, les exigences des normes pour l'utilisation des nanoparticules en clinique ne sont pas atteintes en termes d'efficacité et de spécificité, en particulier pour les injections systémiques.

B. Objectifs du travail:

Les nanocapsules lipidiques font partie des vecteurs non viraux. Ces systèmes présentent plusieurs avantages leur permettant d'être des vecteurs potentiels pour la transfection de gènes thérapeutiques.

Cette partie du chapitre porte sur l'étude de nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le polyéthylèneimine pour la transfection de gènes et la délivrance de principe actif (anti-cancéreux). Les NCL cationiques ainsi formulées sont caractérisées en termes de taille, charge de surface et quantité de PEI greffée à leurs surfaces. Elles sont ensuite utilisées pour la condensation de plasmide ADN. Les complexes formés avec l'ADN sont étudiés afin d'évaluer la force de liaison entre les deux composés, leur cytotoxicité et leur efficacité de transfection *in vitro*. Enfin, le potentiel de ces nano-systèmes à délivrer un agent chimiothérapeutique (paclitaxel) est évalué *in vitro*.

C. Les nanocapsules lipidiques cationiques :

1. Préparation des NCL cationiques :

Les nanocapsules lipidiques de taille 25 nm (NCL25) ont été formulées selon le procédé d'inversion de phases [22] en mélangeant les constituants à des proportions données (**Figure**

2.15). Le choix du diamètre moyen (25 nm) se justifie notamment par l'application de ces nanosystèmes dans la délivrance de plasmide d'ADN. En effet, la vectorisation de gènes par les nanoparticules se fait généralement par complexation du matériel génétique (plasmide ADN) en formant des particules de taille plus importante. Ainsi, la taille initiale des nanovecteurs doit être petite afin de former des complexes dont le diamètre favorisera leur internalisation cellulaire (< 100 nm).

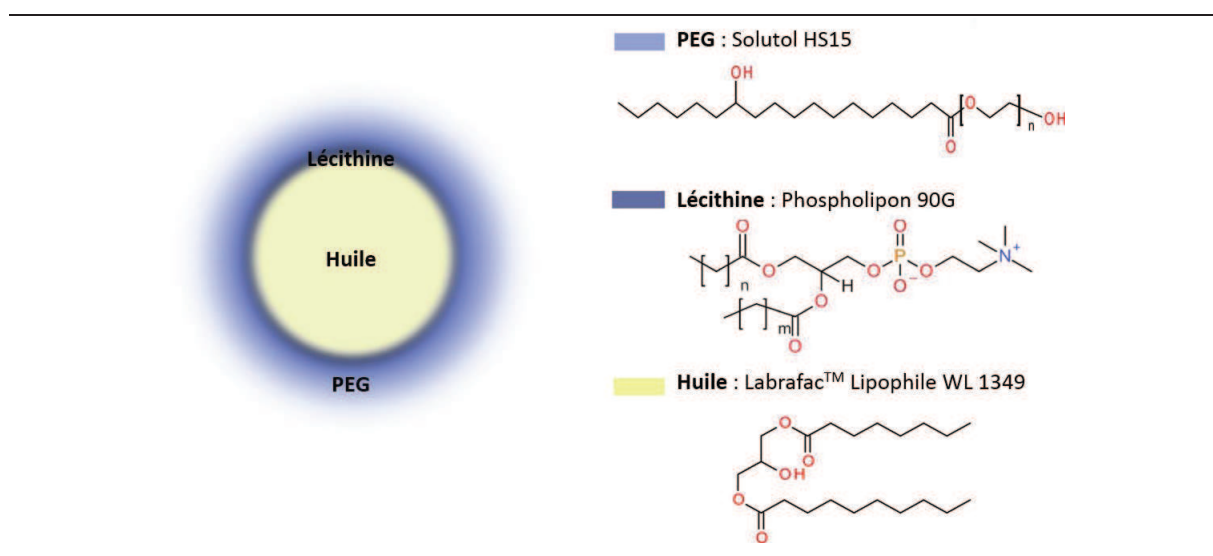


Figure 2.15 : Représentation schématique d'une nanocapsule lipidique.

La deuxième étape consiste à modifier la surface de ces nanocapsules en greffant un polymère cationique : le polyéthylèneimine (PEI, 1,8 kDa) (**Figure 2.16**).

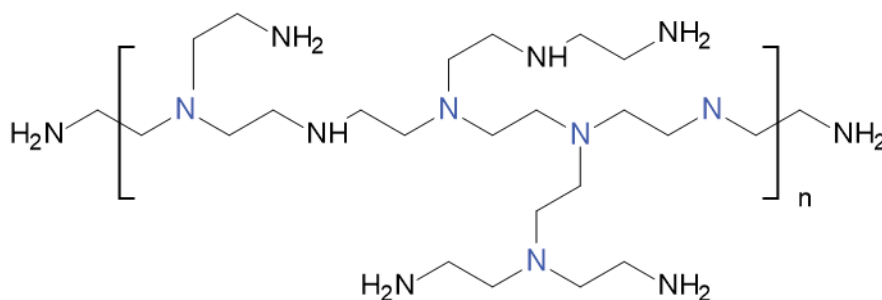


Figure 2.16 – Structure chimique du PEI branché.

La fonctionnalisation des NCL avec le PEI a été réalisée par une méthode de transacylation, en mélangeant le polymère avec la suspension de NCL à pH basique (pH ~ 10,6) (**Figure 2.17**) [49].

La réaction de transacylation consiste en un échange de groupements acyles entre le polyéthylène glycol (PEG) des nanocapsules et le PEI dans un milieu alcalin. Elle présente l'avantage d'être facile et simple à mettre en œuvre.

Une forte concentration de PEI à la surface des nanocapsules peut altérer les propriétés intéressantes des groupements PEG telles que le potentiel de furtivité (longue durée de circulation dans le sang) et l'effet EPR « *Enhanced Permeability and Retention effect* ».

D'autre part, *Petersen et al.* [50] ont démontré que le degré de PEGylation de copolymères PEI-graft-PEG modulait la condensation de l'ADN et pouvait affecter donc l'efficacité de transfection.

Par ailleurs, l'incorporation par transacylation de chitosan à la surface des nanocapsules lipidiques a permis la formation de nanoparticules de petites tailles capables de complexer efficacement l'ARN interférent ARNsi anti-EGFR [34]. La réaction de transacylation a été réalisée en utilisant de faibles quantités de chitosan évitant ainsi les problèmes de solubilité avec ce polymère.

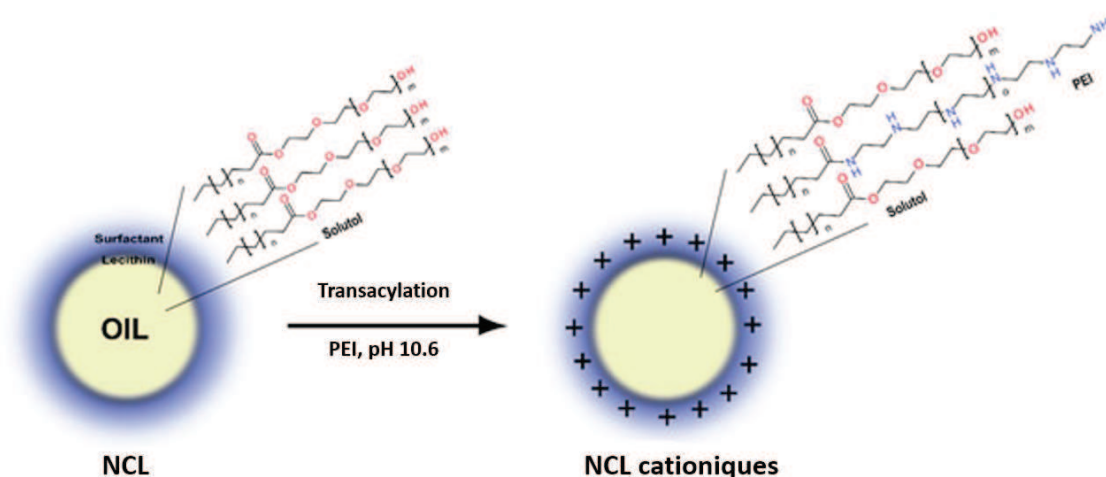


Figure 2.17 – Représentation schématique de la réaction de transacylation des NCL avec le PEI [51].

Notre choix s'est porté sur le PEI branché de faible poids moléculaire (1,8 kDa) car le poids moléculaire du polymère cationique est un facteur déterminant sur l'efficacité de transfection et la cytotoxicité [52, 53]. En effet, les polymères PEI branchés et à haut poids moléculaires permettent d'avoir un taux de transfection élevé, mais aussi présentent une forte cytotoxicité due à la forte charge cationique. En revanche, les PEI de faible poids moléculaires sont moins toxiques mais ont une faible efficacité de transfection *in vitro*.

Pour obtenir ainsi une efficacité de transfection et une bonne biocompatibilité, la stratégie commune des recherches s'est dirigée vers la modification du PEI avec différents groupements hydrophobes tels que le cholestérol [54], le myristate [55], l'iodure de dodécyle [56], l'iodure d'hexadécyle [56], l'acide palmitique[57], l'acide oléique..[58].

Nous avons donc envisagé d'appliquer cette approche en insérant le PEI de faible poids moléculaire directement à la chaîne alkyle du Solutol HS 15 (**Figure 2.17**). Le PEI permettra de modifier la charge de surface des NCL favorisant la condensation de l'ADN.

1.1. Encapsulation du paclitaxel :

L'utilisation d'un seul agent chimiothérapeutique a montré certaines limites dans le traitement de cancers, telles que le développement par les tumeurs de résistance aux médicaments et une toxicité élevée due aux fortes concentrations de principes actifs utilisés. La combinaison de

deux ou plusieurs médicaments est un des moyens possibles pour surmonter ces limitations. D'autre part, l'association de la chimiothérapie et la thérapie génique offre une modalité prometteuse pour améliorer l'effet anti-tumoral par une activation simultanée de plusieurs voies de signalisation dans les cellules cancéreuses [59].

Le paclitaxel (PTX) fait partie des agents anticancéreux les plus utilisés en cancérologie humaine (**Figure 2.18**). Cependant, il est très lipophile et présente une faible solubilité en phase aqueuse, ce qui complique son utilisation en clinique. Afin de contourner ce problème, nous avons donc utilisé les nanocapsules lipidiques comme vecteurs de paclitaxel *in vitro*.

Le paclitaxel a été encapsulé dans les NCL25 selon le même protocole décrit ci-dessus, en le solubilisant dans la phase huileuse (Labrafac et Phospholipon 90G) [60].

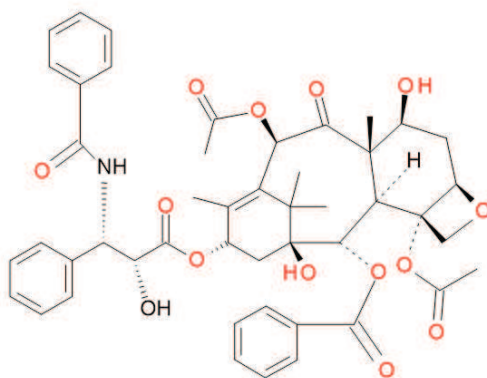


Figure 2.18 – Structure chimique du paclitaxel.

Les nanocapsules chargées de paclitaxel ont été aussi fonctionnalisées avec le PEI dans les mêmes conditions qu'avec les NCL vides dans le but de délivrer un ADN et un principe actif simultanément. Il s'agit ici d'une preuve de concept visant à démontrer le potentiel des nanocapsules lipidiques comme nano-vecteurs de plusieurs principes actifs en utilisant d'une part leur cœur huileux comme réservoir d'agents chimiothérapeutiques et d'autre part, leur surface externe pour fixer du matériel génétique dans le cadre d'une combinaison de thérapies contre le cancer.

2. Caractérisations des NCL cationiques :

2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) :

Le greffage du PEI à la surface des nanocapsules a été vérifié par mesure du potentiel zêta des NCL fonctionnalisées. En effet, la charge de surface des NCL cationiques (nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le PEI, NCL25-T) est passée de +0,8 mV à +18,7 mV, comparées aux nanocapsules lipidiques non modifiées (NCL25). Cette caractéristique est due à la nature chimique du PEI qui est un polymère chargé positivement. Le diamètre des nanocapsules fonctionnalisées est peu influencé par la présence du PEI à la surface probablement en raison de la faible taille de ce polymère (1,8 kDa).

Les propriétés physico-chimiques des NCL chargées en PTX (NCL25-PTX) ont été aussi étudiées par DDL. La présence du PTX n'a eu aucun effet sur le diamètre moyen et l'indice de polydispersité des nanocapsules. De même, le potentiel zêta ne change pas suite à l'encapsulation du paclitaxel comparé aux NCL vides (NCL25) (**Tableau 2.1**).

	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)	PTX
NCL25	27,3 ± 0,6	0,18 ± 0,03	+0,8 ± 0,4	-
NCL25-T	26,2 ± 3,9	0,19 ± 0,05	+18,7 ± 1,6	-
NCL25-PTX	25,0 ± 0,9	0,13 ± 0,01	-1,9 ± 0,8	+
NCL25-PTX-T	25,6 ± 0,7	0,19 ± 0,01	+16,6 ± 0,4	+

Tableau 2.1 - Caractérisation des NCL avant et après fonctionnalisation avec le PEI et encapsulation du PTX.

L'insertion du polymère PEI à la surface des nanocapsules chargées n'a pas d'incidence sur leurs tailles. En effet, les nanocapsules chargées en PTX et fonctionnalisées avec le PEI (NCL25-PTX-T) ont un diamètre moyen de 25,6 nm avec un indice de polydispersité inférieur à 0,2 (**Tableau 2.1**). Cependant, le potentiel zêta de ces nanoparticules a augmenté de -1,9 à +16,6 mV, confirmant ainsi l'incorporation du PEI à la surface des nanocapsules.

2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

Le taux d'encapsulation du paclitaxel dans les nanocapsules a été déterminé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les NCL chargées en PTX fonctionnalisées ou non avec le PEI ont été analysées par HPLC. Cette étude montre que le paclitaxel s'encapsule efficacement dans les NCL avec un taux d'encapsulation très élevé (~ 100 %), favorisée par sa faible solubilité dans les solvants aqueux (**Tableau 2.2**). Il est toutefois important de noter que, lors de la fonctionnalisation avec le PEI, il y a une fuite importante de PTX (environ 67 %) des nanocapsules. Ceci est dû aux conditions basiques requises par la réaction de transacylation.

Formulation	Taux d'encapsulation du PTX (%)	Quantité de PEI par NCL (%)
NCL25	-	-
NCL25-T	-	13 ± 1
NCL25-PTX	100 ± 1	-
NCL25-PTX-T	33 ± 0,8	13 ± 2

Tableau 2.2 - Taux d'encapsulation du paclitaxel et pourcentage de PEI des NCL.

L'analyse quantitative effectuée par HPLC sur les NCL fonctionnalisées a permis de déterminer la quantité de PEI incorporée à la surface des NCL (**Tableau 2.2**).

Nous avons utilisé la même quantité de PEI pour les formulations de nanocapsules cationiques dans le but de garder les propriétés intéressantes des chaînes PEG de la couche externe des nanocapsules (furtivité et stabilité physique des nanocapsules).

D'autre part, *Messaoudi et al.* [34] ont montré que la fonctionnalisation par transacylation de chitosan à la surface de nanocapsules lipidiques est une réaction limitée par la quantité de polymères pouvant s'incorporer dans les chaînes PEG de la couche externe. En effet, il semblerait que le rendement de transacylation (pourcentage de chitosan restant à la surface

des NCL après purification) diminue fortement (de 20,1 % à 6,5 %) en augmentant la concentration en polymère cationique (de 0,6 mg/mL à 2,4 mg/mL). Ceci est peut-être dû au fait qu'on atteint un plateau correspondant à la saturation de la surface des nanocapsules.

2.3. Détermination de la capacité tampon des NCL :

Les molécules qui entrent dans les cellules par endocytose connaîtront un changement de l'environnement, de pH neutre vers un pH plus acide (~ 5), et la dégradation par les lysosomes est l'un des principaux obstacles à surpasser pour une délivrance de gènes efficace dans les cellules [61]. La propriété « éponge à protons » du PEI est censée entraîner un effet tampon à l'intérieur des endosomes et est responsable de la libération des complexes ADN dans le cytoplasme de la cellule [62].

L'évaluation donc de la capacité tampon des NCL25 cationiques a été réalisée par titration du pH, en mesurant le changement du pH des suspensions, initialement à pH basique, au cours de l'addition de quantités croissantes de HCl (**Figure 2.19**).

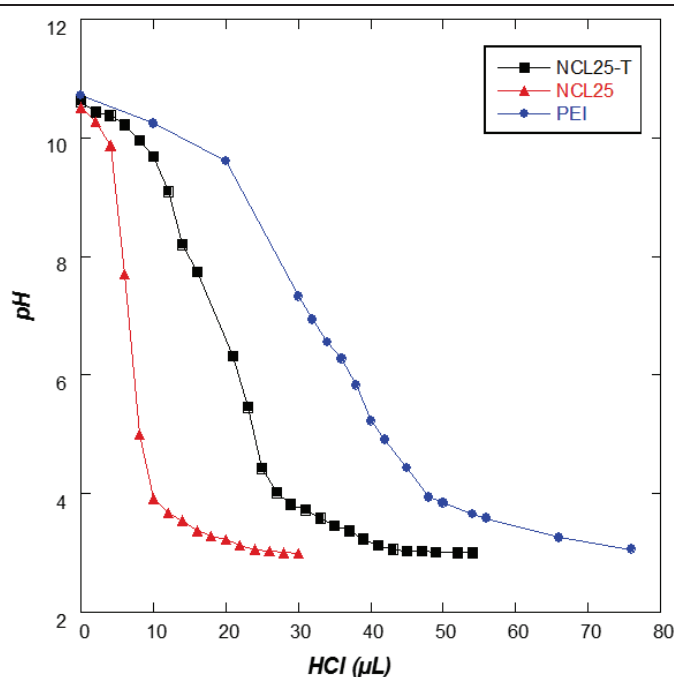


Figure 2.19 - Courbes de titration de suspensions aqueuses de NCL25-T (200 $\mu\text{g/mL}$, noir), NCL25 (200 $\mu\text{g/mL}$, rouge) et PEI (27 $\mu\text{g/mL}$, bleu).

Le PEI possède une capacité tampon très importante dans l'intervalle de pH allant de 3 à 10 [63]. En effet, ces polymères subissent une faible variation du pH lors de l'addition de faibles quantités de HCl au cours de la titration. Contrairement aux NCL25 vides dont le pH change rapidement suite à l'ajout de petites quantités d'acide chlorhydrique, les NCL25 fonctionnalisées gardent une capacité tampon, puisque le pH de la solution varie plus lentement (**Figure 2.19**). Cette propriété d'absorption de protons permettra la déstabilisation de la membrane de l'endosome et de ce fait la libération des complexes NCL/ADN dans le cytoplasme.

Après la caractérisation physico-chimique des nanocapsules fonctionnalisées (NCL25-T), nous avons étudié le potentiel de ces nanocapsules à interagir avec un plasmide d'ADN et leur capacité à former des complexes avec les acides nucléiques qui est une étape primordiale dans la transfection de gènes.

3. Les complexes NCL cationiques / ADN :

3.1. Préparation des complexes NCL cationiques / ADN :

La formation de complexes entre les NCL fonctionnalisées et l'ADN est due à l'interaction électrostatique entre les nanocapsules cationiques et le plasmide d'ADN chargé négativement (**Figure 2.20**). De ce fait, l'incubation des NCL fonctionnalisées avec le plasmide d'ADN en solution aqueuse à température ambiante a permis la formation de complexes. Néanmoins, le ratio massique entre les nanocapsules et le plasmide joue un rôle important sur les propriétés physico-chimiques des complexes formés.

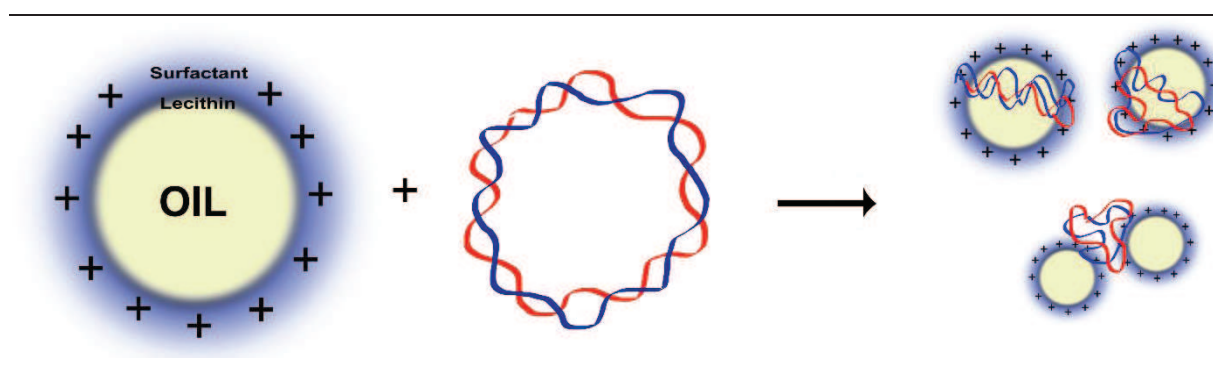


Figure 2.20 - : Représentation schématique de la formation de complexes NCL cationiques / ADN [51].

Pour obtenir les différents ratios massiques de ces complexes, nous avons fixé la quantité d'ADN (1 μ g) et fait varier la quantité de nanocapsules pour chaque ratio.

3.2. Caractérisations des complexes NCL cationiques / ADN :

3.2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) :

Les complexes formés avec les NCL fonctionnalisées et le plasmide ADN ont été analysés par DDL. La taille ainsi que le potentiel zêta de ces complexes à différents ratios massiques ont été mesurés, les résultats sont montrés dans la **Figure 2.21**.

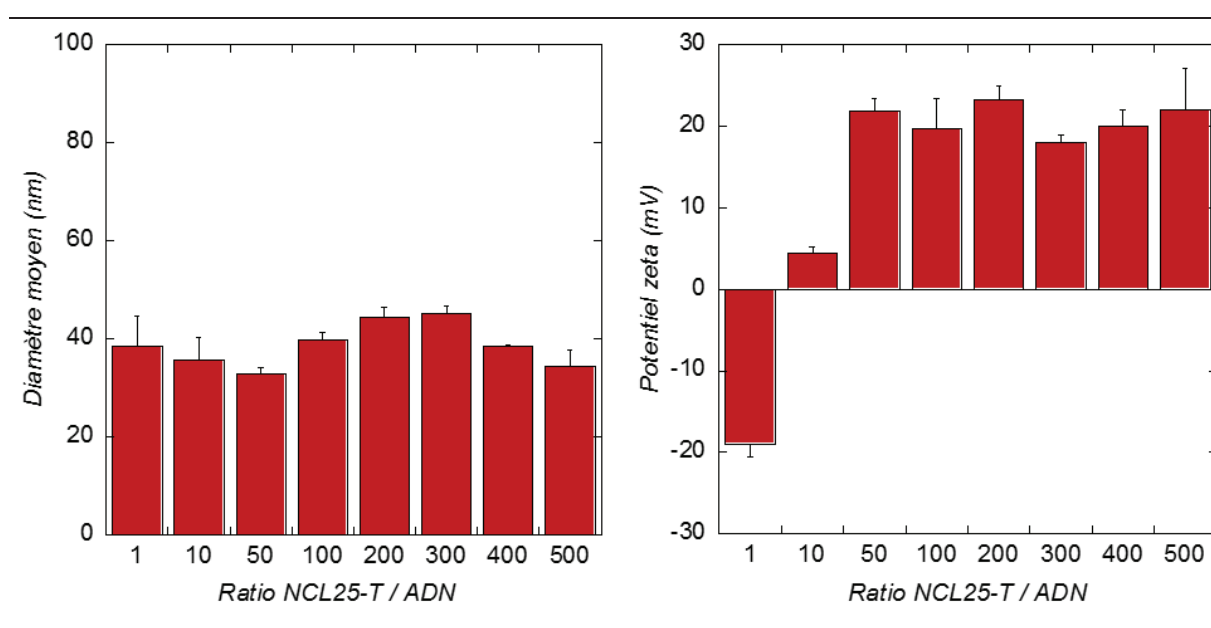


Figure 2.21 - Caractérisation par DDL des complexes NCL25-T/ADN à différents ratios.

Les nanocapsules cationiques sont capables de condenser l'ADN pour former des complexes *via* des interactions électrostatiques dont la taille et la charge de surface dépendent du ratio massique entre NCL25-T et l'ADN. Le diamètre moyen de ces complexes est d'environ 40 à 50 nm pour un ratio allant de 1 à 500 (**Figure 2.21**). La condensation de l'ADN avec les NCL fonctionnalisées a un effet neutralisant sur la charge de surface des nano-vecteurs. En effet, au ratio 1/1, le potentiel zêta devient négatif (-19 mV). Cependant, aux ratios NCL25-T/ADN égales ou supérieurs à 50/1, les complexes ont une taille moyenne autour de 40 nm et affichent une charge de surface nettement positive (+20 mV). Le ratio optimal semble être à

partir de 50/1. Il est à noter toutefois que les NCL vides (non fonctionnalisées) ne permettent pas la condensation de l'ADN ou l'ARN, montrant la nécessité de fonctionnaliser leurs surfaces [33].

L'incubation du plasmide d'ADN avec des quantités croissantes de PEI (1,8 kDa, libre en solution) pendant 30 minutes à température ambiante a permis la formation de complexes PEI/ADN de grande taille. Pour un ratio massique de 500/1 de PEI/ADN, les complexes affichent une taille moyenne de 500 nm et ce diamètre moyen dépasse les 800 nm pour les ratios massiques de 50/1 et 10/1 (**Figure 2.22**). Le potentiel zêta varie en fonction du ratio PEI/ADN (à partir du ratio 200/1 la charge de surface devient nettement positive avec +20 mV).

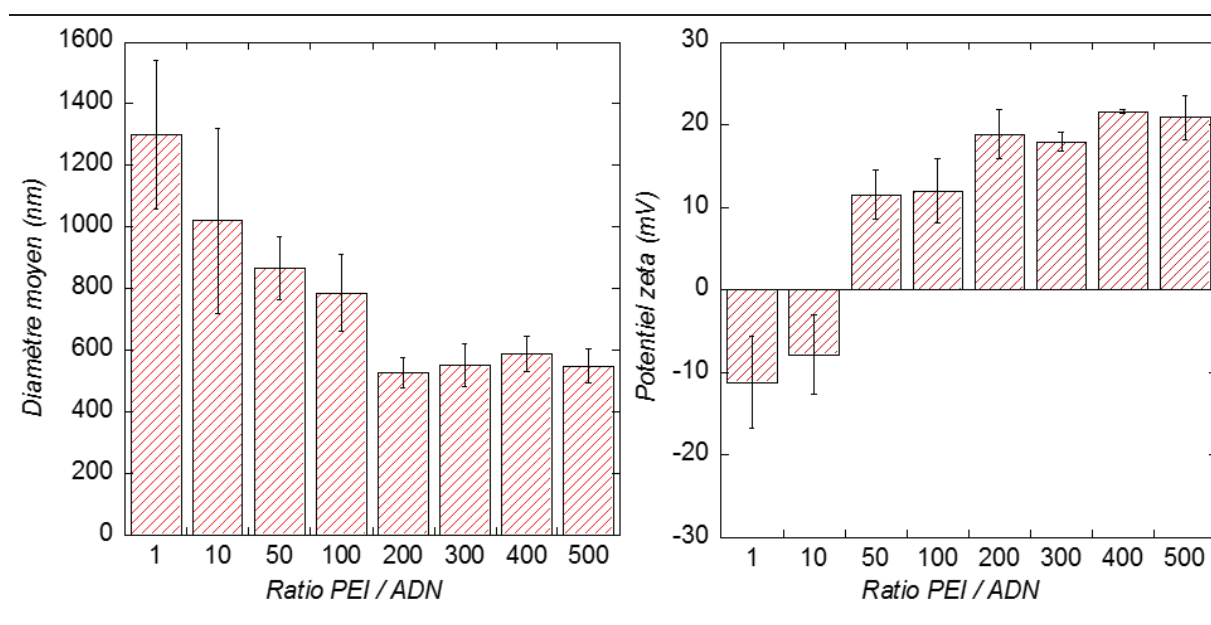


Figure 2.22 : Diamètres moyens et potentiels zêta des complexes PEI/ADN à différents ratios.

La taille des complexes PEI/ADN est comparable à celle rapportée par *Chen et al.* [64] pour des complexes formés entre le PEI (1,8 kDa) et un plasmide d'ADN (800 nm de diamètre moyen). Les auteurs ont attribué la taille élevée observée à la faible densité de charges positives ainsi que la force d'interaction avec l'ADN du polymère PEI de faible poids moléculaire.

Ces résultats mettent en évidence la capacité des nanocapsules cationiques NCL25-T à condenser l'ADN en particules chargées positivement et de taille nanométrique pour tous les ratios massiques de complexes testés, ce qui peut être favorable à une internalisation cellulaire efficace.

3.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose :

Nous avons déjà montré que les NCL25 modifiées avec le PEI pouvaient former des complexes nanométriques avec l'ADN *via* des interactions électrostatiques. La force de l'interaction entre les NCL fonctionnalisées et l'ADN a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les mêmes ratios NCL25-T / ADN analysés par DDL ont été testés (**Figure 2.23**). Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Les bandes observées sur le gel correspondent aux fragments d'ADN. La migration (déplacement de la bande de haut en bas) montre que l'ADN n'est pas retenu par les nanocapsules. Dans le cas contraire, une forte interaction entre les NCL cationiques et l'ADN empêche son déplacement sur le gel.

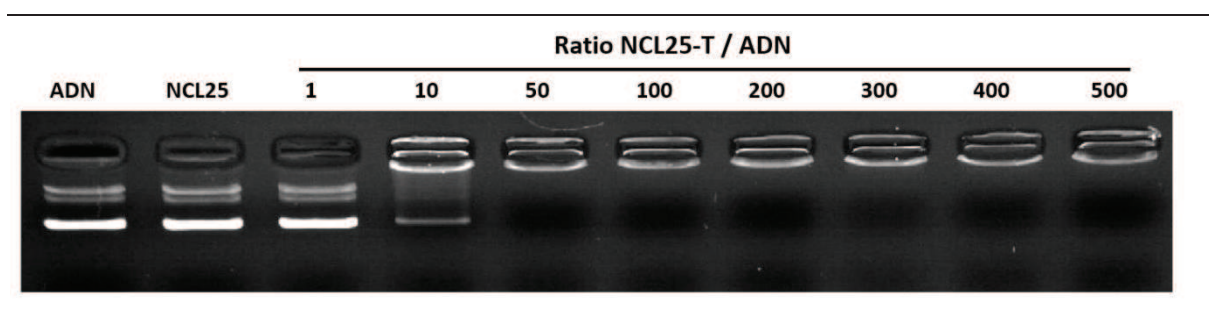


Figure 2.23 - Electrophorèse sur gel des complexes NCL25-T / ADN.

Les résultats de la migration sur gel montrent qu'à partir du ratio massique de 50/1, l'ADN est complètement condensé par les NCL fonctionnalisées. En effet, pour ces conditions, il n'y a pas de bande correspondant à l'ADN, comparé à l'ADN libre (1^{ère} ligne) (**Figure 2.23**). L'ADN complexé avec les NCL25-T reste dans les puits du gel car la force des interactions électrostatiques dans les complexes à ces ratios est plus importante que celle de la migration électrophorétique. Ceci confirme l'importance du ratio massique entre les NCL et l'ADN dans

la formation de complexes stables, puisqu'aux ratios inférieurs à 50/1, l'ADN n'est pas retenu dans le puits (ligne 3) ou partiellement (ligne 4).

La force de l'interaction entre les NCL25-T et l'ADN est un paramètre primordial dans la réussite de la transfection sachant que l'environnement cellulaire est très complexe et hostile aux corps étrangers (pH, salinité, riche en enzymes et ions).

3.2.2.1. Etude de la dégradation de l'ADN par la DNase I

La protection de l'ADN contre la dégradation par les nucléases (telles que DNase I) *in vitro* est un facteur essentiel pour augmenter l'efficacité de transfection. Dans cette étude, la stabilité des complexes NCL25-T / ADN contre la dégradation enzymatique a été évaluée par incubation des complexes avec la DNase I pendant 30 minutes. Les résultats de migration sur gel d'agarose suggèrent que dans les complexes NCL25-T / ADN (ratios supérieurs 50/1), les nanocapsules cationiques parviennent à protéger l'ADN contre la dégradation enzymatique. Il est à noter que pour un ratio massique inférieur à 50/1, tout l'ADN est dégradé par l'enzyme et il n'y a pas de bande caractéristique de l'ADN sur le gel d'agarose (**Figure 2.24**).

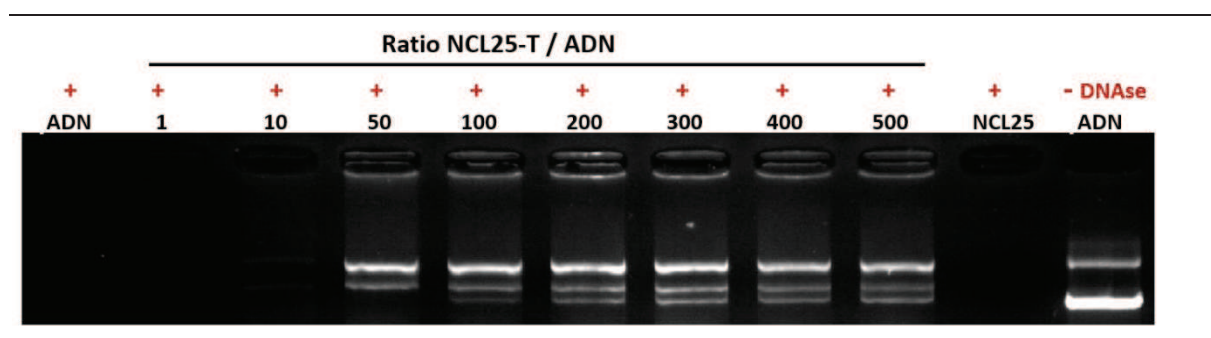


Figure 2.24 - Etude de la dégradation enzymatique de l'ADN des complexes NCL25-T / ADN.

3.3. Etude de la cytotoxicité des complexes NCL cationiques / ADN :

La cytotoxicité des nano-vecteurs a une importance capitale pour les applications de vectorisation de principes actifs et peut affecter l'efficacité de transfection. Des études ont montré que le PEI de haut poids moléculaire présentait une cytotoxicité élevée en raison de la forte densité de charges positives et la déstabilisation des membranes cellulaires [65],

contrairement au PEI de faible poids moléculaire qui est peu toxique pour les cellules [53]. Il est donc primordial d'étudier la toxicité des nanocapsules fonctionnalisées avec le PEI.

Dans cette étude, la cytotoxicité des complexes NCL25-T / ADN a été évaluée *in vitro* sur les cellules HEK. Les cellules ont été incubées pendant 6 heures en présence des complexes à différents ratios. L'estimation de la viabilité cellulaire a été réalisée avec le test colorimétrique MTT dont le principe est la transformation du composé MTT en formazan (couleur pourpre) sous l'action enzymatique des cellules vivantes.

Les résultats de la **Figure 2.25** montrent que pour tous les ratios massiques (50/1 à 500/1), les complexes formés avec les NCL fonctionnalisées et l'ADN affichent une viabilité cellulaire proche de 100 % prouvant la non-toxicité de ces nano-vecteurs *in vitro* dans les conditions expérimentales.

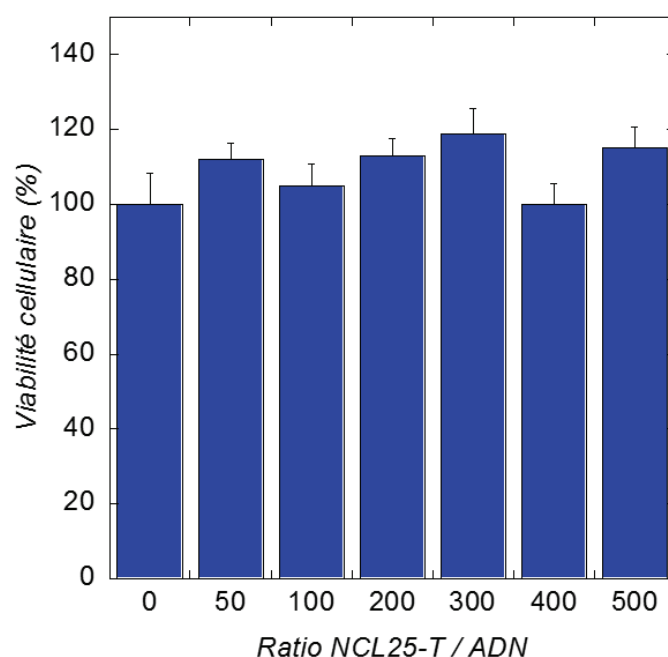


Figure 2.25 – Viabilité cellulaire des complexes NCL25-T / ADN sur des cellules HEK.

La cytotoxicité des complexes formés entre le PEI et le plasmide d'ADN (PEI / ADN) a été étudiée aussi en utilisant le test de prolifération MTT. Les résultats de viabilité cellulaire sont représentés dans la **Figure 2.26**.

Les complexes PEI/ADN affichent une toxicité cellulaire *in vitro* croissante en fonction de la quantité de PEI présente dans les complexes. La viabilité cellulaire atteint 70 % pour un ratio massique de 300/1.

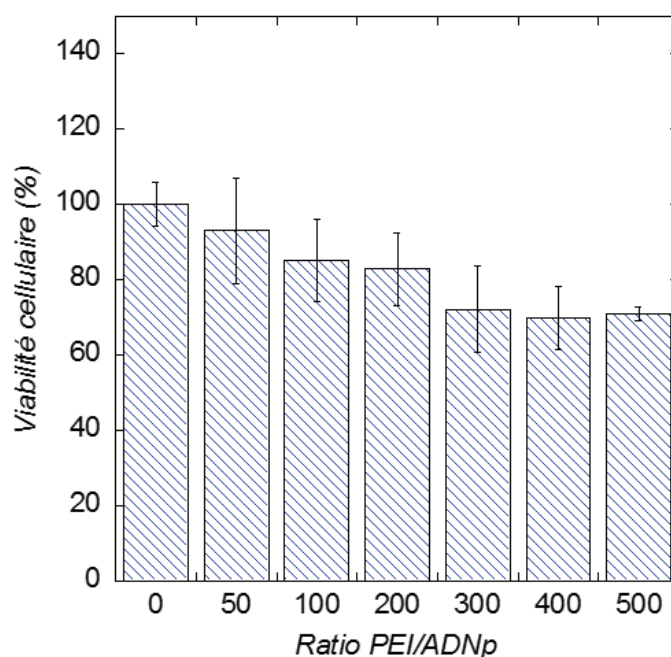


Figure 2.26 : Viabilité cellulaire des complexes PEI / ADN sur les cellules HEK.

3.4. Etude de la transfection des complexes NCL cationiques / ADN :

L'étude de transfection avec les complexes nanocapsules cationiques / ADN a été réalisée en utilisant le gène rapporteur de la protéine fluorescente GFP. Les complexes ont été incubés avec les cellules HEK et leur potentiel de transfection a été évalué par microscopie confocale et cytométrie de flux (FACS) en comparant l'efficacité avec le PEI libre (**Figure 2.27**).

Bien que pour un ratio massique de 50/1 les complexes NCL25-T/ADN affichent des propriétés physico-chimiques intéressantes, le taux de transfection n'était pas si élevé (faible efficacité de transfection).

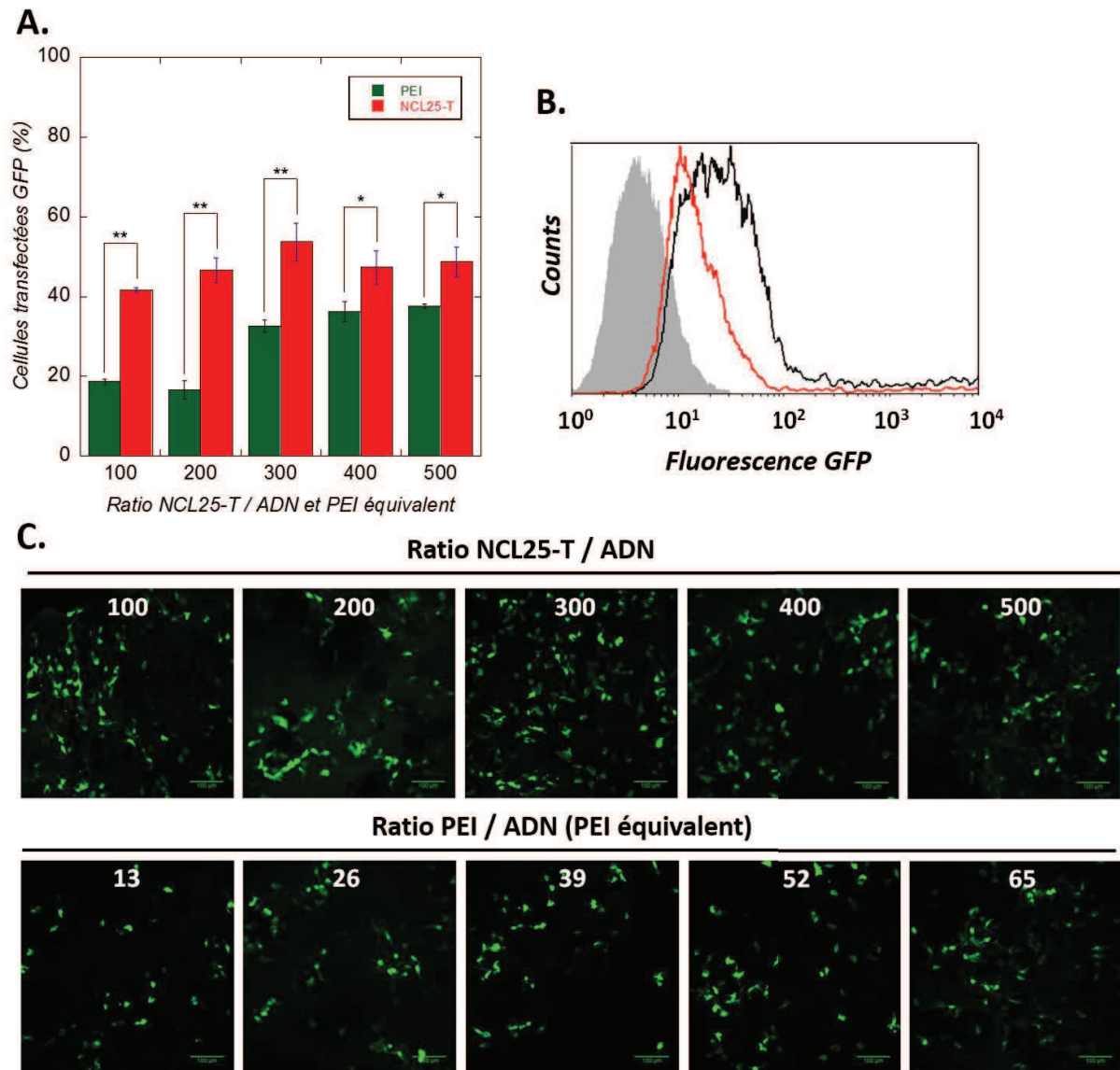


Figure 2.27 – Les cellules HEK transfectées avec le plasmide GFP. **(A)** Taux de transfection des cellules avec les complexes NCL25-T / ADN et PEI / ADN à différents ratios déterminé par cytométrie de flux. **(B)** Analyse FACS des cellules HEK non traitées (gris) et des cellules transfectées avec PEI / ADN (26,2 $\mu\text{g/mL}$, rouge) et NCL25-T / ADN (200 $\mu\text{g/mL}$, noir). **(C)** Microscopie confocale des cellules HEK exprimant la GFP. L'échelle représente 100 μm . La barre d'erreur correspond à l'écart type ($n = 3$) ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Comme le montre la **Figure 2.27 (A)**, les nanocapsules fonctionnalisées avec le PEI affichent une efficacité de transfection 1,3 à 2,8 fois plus importante que celle avec le PEI libre. En

effet, les complexes NCL25-T / ADN au ratio optimal de 200/1 ont un taux de transfection 2,8 fois plus élevé que les complexes formés avec le PEI à la même concentration avec l'ADN. L'efficacité de transfection des nanocapsules cationiques *in vitro* est probablement due à l'internalisation importante des complexes avec l'ADN ainsi que leur libération de l'endosome. En effet, il a été déjà démontré que les NCL sont rapidement accumulées dans les cellules et qu'elles avaient la capacité de s'échapper du compartiment endolysosomal [66]. D'autre part, les NCL25-T ont montré une capacité tampon partielle favorisant la libération des endosomes *via* l'effet « éponge à protons ».

L'analyse FACS des cellules HEK transfectées avec le ratio optimal des complexes NCL25-T / ADN montre clairement le shift de la fluorescence par rapport aux cellules non traitées (**Figure 2.27 (B)**). Par ailleurs, les images obtenues par microscopie confocale viennent confirmer visuellement l'expression de la protéine fluorescente suite à la transfection des cellules (**Figure 2.27 (C)**).

Ainsi, pour une concentration en PEI libre de 65 µg/mL, le taux de transfection avec ces complexes restent moins élevé qu'avec les nanocapsules lipidiques (38 % contre 54 %). Il est important de noter que les tests de transfection sur les cellules HEK dans un milieu de culture complet (DMEM, 10% FBS) ont affiché un faible taux de transfection (< 3%) avec les complexes nanocapsules cationiques et le PEI libre.

Les résultats montrent l'effet synergique des NCL fonctionnalisées avec le PEI comme vecteurs de délivrance de gènes possédant à la fois une forte biocompatibilité et une meilleure efficacité de transfection.

3.5. Etude du relargage du paclitaxel :

Une des caractéristiques intéressantes des nano-vecteurs est leur capacité à délivrer simultanément deux ou plusieurs principes actifs. Le potentiel des nanocapsules cationiques pour la co-délivrance d'ADN plasmidique et de principe actif hydrophobe a été évalué par l'encapsulation du paclitaxel dans le cœur huileux des NCL. Les nanocapsules chargées en PTX ont été ensuite modifiées avec du PEI de la même manière que celle utilisée pour les NCL25-T.

Afin de valider l'efficacité de tels nano-objets à vectoriser des principes actifs sans altérer leur effet thérapeutique, nous avons étudié le relargage *in vitro* du paclitaxel en s'intéressant en particulier au mécanisme d'apoptose induit par cet anti-cancéreux hydrophobe.

3.5.1. Etude de l'apoptose induite par le paclitaxel :

La technique de coloration au DAPI permet d'évaluer si l'encapsulation du PTX dans les nanocapsules affecte l'apoptose induite par le paclitaxel. En effet, les noyaux des cellules HEK non traitées montrent une fluorescence homogène sans aucun signe de segmentation ou de fragmentation. Cependant, l'incubation des cellules avec des NCL25-PTX-T et PTX libre (1 µg/mL de PTX) pendant 4 h à 37°C entraîne une fragmentation des noyaux cellulaires en plusieurs petits segments, indiquant la rupture de la chromatine suivie de la condensation de l'ADN (**Figure 2.28**). Ces caractéristiques morphologiques sont propres au mécanisme de mort cellulaire correspondant à l'apoptose.

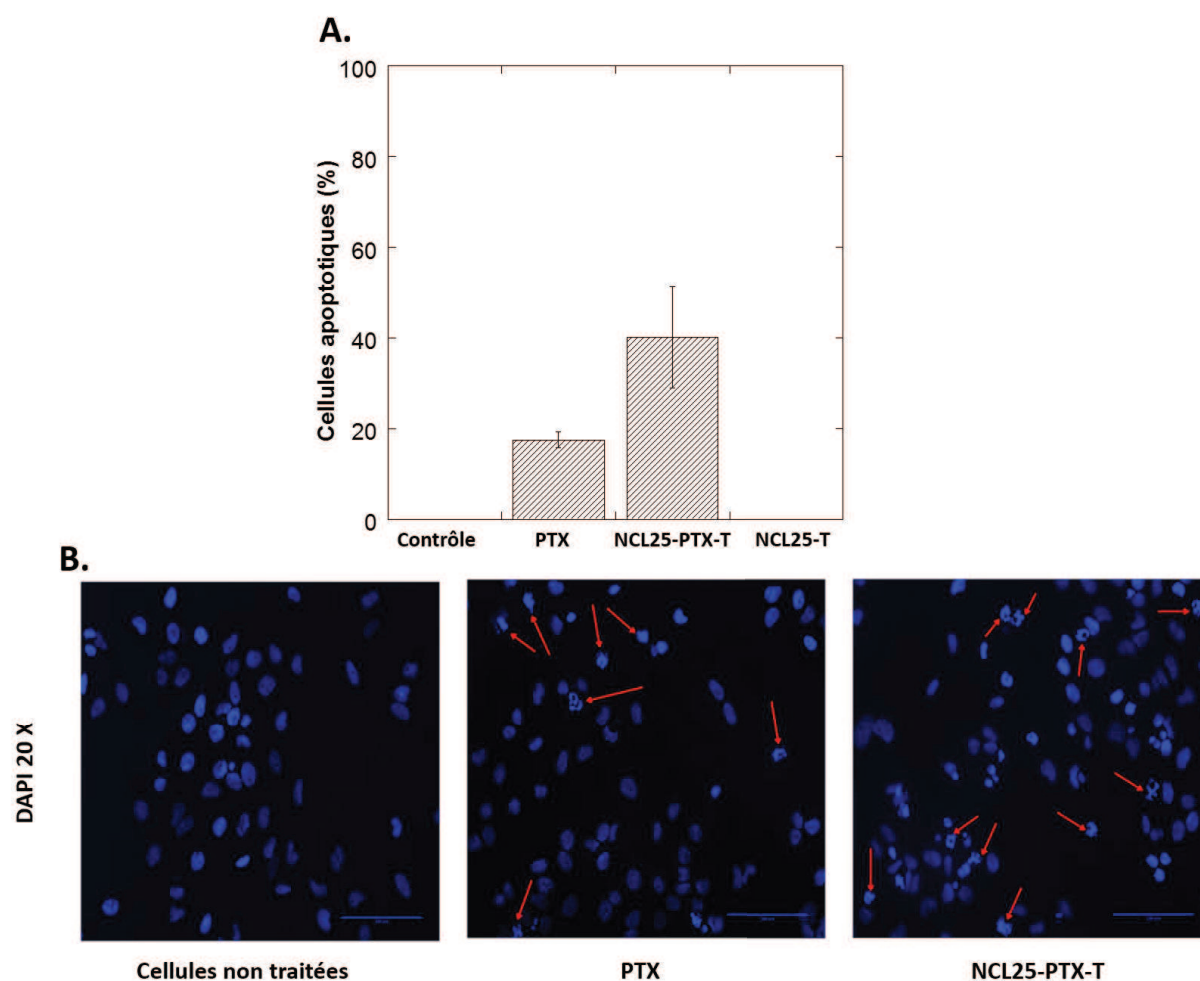


Figure 2.28 – Marquage au DAPI des cellules HEK après 4 h d’incubation avec le milieu cellulaire (cellules non traitées), PTX (1 $\mu\text{g/mL}$), NCL25-T (concentration en NCL 500 $\mu\text{g/mL}$) et NCL25-PTX-T (concentration en NCL 500 $\mu\text{g/mL}$, PTX 1 $\mu\text{g/mL}$). **(A)** Pourcentage de cellules apoptotiques. **(B)** Microscopie à fluorescence des cellules non traitées, PTX et NCL25-PTX-T, les flèches en rouge montrent les noyaux fragmentés.

Les flèches en rouge dans la **Figure 2.28** montrent que les noyaux de certaines cellules commencent à se fragmenter en petits morceaux suite au relargage du paclitaxel. Le pourcentage de cellules apoptotiques induit par les nanocapsules cationiques chargées en PTX est plus important que pour le paclitaxel libre en solution. L’encapsulation donc du paclitaxel dans les nanocapsules lipidiques n’altère pas le mécanisme d’action de l’anti-cancéreux *in vitro*. D’autre part, la fonctionnalisation des nanocapsules avec le PEI confère une charge de surface positive aux nanocapsules chargées en PTX permettant ainsi leur internalisation dans

les cellules plus rapidement en raison de l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement.

3.5.2. Etude de la vectorisation du paclitaxel avec les complexes NCL cationiques / ADN :

L'activité cytotoxique *in vitro* du PTX libre, NCL25-T / ADN et NCL25-PTX-T / ADN a été évaluée par le test MTT sur les cellules HEK. Les concentrations en PTX varient de 0,22 à 1,1 µg/mL et correspondent aux concentrations du principe actif encapsulé dans les NCL après fonctionnalisation avec le PEI (concentrations en NCL de 100 µg/mL à 500 µg/mL). Après 24 h d'incubation, les résultats de viabilité cellulaire montrent que $32,2 \pm 3,5$ % des cellules traitées avec la dose la plus élevée de PTX survivent, et $35,4 \pm 6,7$ % pour les NCL25-PTX-T à la même concentration en principe actif. Les nanocapsules non chargées en PTX (NCL25-T) sont non toxiques pour les cellules (**Figure 2.29**).

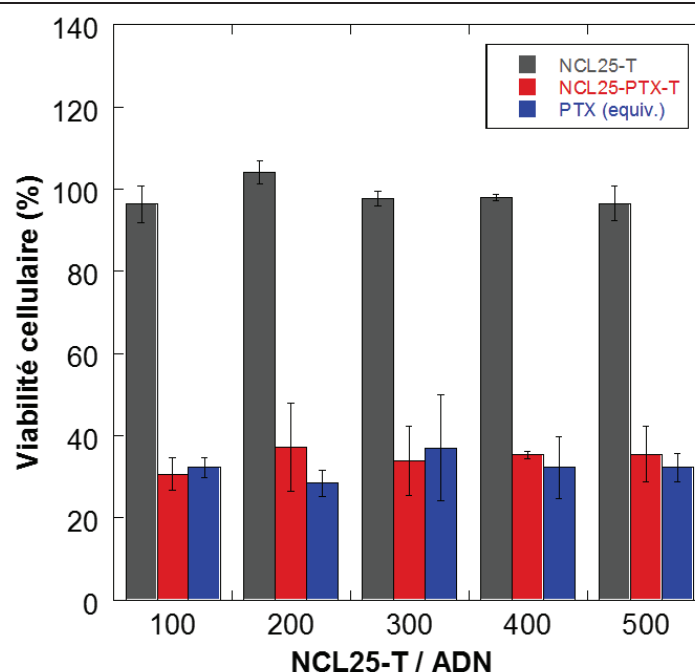


Figure 2.29 – Viabilité cellulaire du PTX libre, NCL25-T / ADN et NCL25-PTX-T / ADN sur des cellules HEK déterminée par le test MTT.

Les résultats obtenus par le test MTT montrent clairement que le paclitaxel encapsulé dans les nanocapsules modifiées par PEI et complexées avec l'ADN peut induire un effet toxique sur les cellules comparable à celui du paclitaxel libre en solution à la même concentration. Cette propriété est d'une importance primordiale pour la conception de nano-vecteurs pour la co-délivrance d'ADN et de principes actifs.

4. Conclusion :

Divers polymères et vecteurs non viraux ont vu le jour dans le but d'améliorer l'efficacité de transfection *in vitro*. Dans ce chapitre, nous avons démontré l'effet synergique des nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le polyéthylèneimine de faible poids moléculaire pour vectoriser l'ADN plasmidique. Les molécules de PEI ont été incorporées à la surface des nanocapsules par une simple réaction de transacylation permettant la formation de nanocapsules cationiques stables en milieux aqueux. La formation de complexes entre les nanocapsules cationiques et le plasmide d'ADN stables et de taille nanométrique (< 50 nm) a été vérifiée. Les nanocapsules cationiques ont permis la protection de l'ADN condensé de la dégradation enzymatique.

Le taux de transfection obtenu avec les complexes formés entre les nanocapsules et l'ADN était 2,8 fois plus important qu'avec le PEI libre ainsi qu'une faible toxicité *in vitro*.

Par ailleurs, la structure particulière des NCL (cœur huileux) offre la possibilité d'encapsuler des médicaments hydrophobes. En effet, cette propriété a été utilisée pour la co-vectorisation de paclitaxel et d'ADN plasmidique. Nous avons donc démontré que les nanocapsules fonctionnalisées avec le PEI et chargées en paclitaxel étaient capables de délivrer simultanément un ADN et un principe actif *in vitro*.

Cependant, d'autres études doivent être menées pour l'optimisation de la stabilité et de l'efficacité de transfection des complexes nanocapsules cationiques / ADN dans les milieux de culture supplémentés en sérum.

Références bibliographiques :

1. Cassini, K., et al., *Eugénisme et thérapie génique*. Lycée Marcelin Berthelot. 1^{ère} année scientifique, TPE, 2012.
2. Morille, M., et al., *Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer*. Biomaterials, 2008. **29**(24-25): p. 3477-96.
3. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
4. Eliyahu, H., et al., *Polymers for DNA delivery*. Molecules, 2005. **10**(1): p. 34-64.
5. Fischer, D., et al., *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*. Pharm Res, 1999. **16**(8): p. 1273-9.
6. Jin, L., et al., *Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers*. Theranostics, 2014. **4**(3): p. 240-55.
7. Wu, G.Y., et al., *Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro*. Biochemistry, 1988. **27**(3): p. 887-92.
8. Merdan, T., et al., *Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments*. Pharm Res, 2002. **19**(2): p. 140-6.
9. Wagner, E., et al., *Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(17): p. 7934-8.
10. Pouton, C.W., et al., *Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids*. J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 289-99.
11. Fajac, I., et al., *Histidylated polylysine as a synthetic vector for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway surface and airway gland serous cells*. J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 368-78.
12. Benns, J.M., et al., *pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(5): p. 637-45.
13. Kukowska-Latallo, J.F., et al., *Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(10): p. 4897-902.
14. Koping-Hoggard, M., et al., *Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo*. Gene Ther, 2001. **8**(14): p. 1108-21.
15. Erbacher, P., et al., *Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability*. Pharm Res, 1998. **15**(9): p. 1332-9.
16. Park, I.K., et al., *Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: in vitro transfection*. Arch Pharm Res, 2004. **27**(12): p. 1284-9.
17. Radler, J.O., et al., *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science, 1997. **275**(5301): p. 810-4.
18. Koltover, I., et al., *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science, 1998. **281**(5373): p. 78-81.

19. Zhdanov, R.I., et al., *Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy*. Bioelectrochemistry, 2002. **58**(1): p. 53-64.
20. Oberle, V., et al., *Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism*. Biophys J, 2000. **79**(3): p. 1447-54.
21. Vonarbourg, A., et al., *The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2009. **30**(18): p. 3197-204.
22. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 875-80.
23. Heurtault, B., et al., *The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution*. Eur J Pharm Sci, 2003. **18**(1): p. 55-61.
24. Cahouet, A., et al., *Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using scintigraphy and gamma counting*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 367-71.
25. Morille, M., et al., *Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting*. Biomaterials, 2010. **31**(2): p. 321-9.
26. Morille, M., et al., *Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting*. Int J Pharm, 2009. **379**(2): p. 293-300.
27. Morille, M., et al., *Tumor transfection after systemic injection of DNA lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2011. **32**(9): p. 2327-33.
28. David, S., et al., *Treatment efficacy of DNA lipid nanocapsules and DNA multimodular systems after systemic administration in a human glioma model*. J Gene Med, 2012. **14**(12): p. 769-75.
29. David, S., et al., *In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model*. Int J Pharm, 2012. **423**(1): p. 108-15.
30. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
31. David, S., et al., *siRNA LNCs--a novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. **81**(2): p. 448-52.
32. Resnier, P., et al., *EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro*. Int J Pharm, 2013. **454**(2): p. 748-55.
33. Weyland, M., et al., *Lipid nanocapsule functionalization by lipopeptides derived from human papillomavirus type-16 capsid for nucleic acid delivery into cancer cells*. Int J Pharm, 2013. **454**(2): p. 756-64.
34. Messaoudi, K., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1479-90.
35. Parker, A.L., et al., *Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine*. Expert Rev Mol Med, 2003. **5**(22): p. 1-15.
36. Singh, A.K., et al., *Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1120**(3): p. 337-42.
37. Simoes, S., et al., *Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides*. Gene Ther, 1999. **6**(11): p. 1798-807.
38. Xu, Y., et al., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*. Biochemistry, 1996. **35**(18): p. 5616-23.
39. Hafez, I.M., et al., *On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids*. Gene Ther, 2001. **8**(15): p. 1188-96.
40. Zhang, Z.Y., *High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model*. Bioconj Chem, 2000. **11**(6): p. 805-14.
41. Lechardeur, D., et al., *Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer*. Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 482-97.

42. Godbey, W.T., et al., *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**(9): p. 5177-81.
43. Godbey, W.T., et al., *Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency*. Gene Ther, 1999. **6**(8): p. 1380-8.
44. Hill, I.R., et al., *Determination of protection from serum nuclease activity by DNA-polyelectrolyte complexes using an electrophoretic method*. Anal Biochem, 2001. **291**(1): p. 62-8.
45. Vasu, S.K. et al., *Nuclear pores and nuclear assembly*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 363-75.
46. Brunner, S., et al., *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus*. Gene Ther, 2000. **7**(5): p. 401-7.
47. Feldherr, C.M., et al., *Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells*. J Cell Biol, 1991. **115**(4): p. 933-9.
48. Cokol, M., et al., *Finding nuclear localization signals*. EMBO Rep, 2000. **1**(5): p. 411-5.
49. Benoit, J.P., et al., *Method for preparing functionalized lipid capsules*. 2010. Patent WO 2010113111 A1.
50. Petersen, H., et al., *Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system*. Bioconjug Chem, 2002. **13**(4): p. 845-54.
51. Skandrani, N., et al., *Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging*. Nanoscale, 2014. **6**(13): p. 7379-90.
52. Godbey, W.T., et al., *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery*. J Control Release, 1999. **60**(2-3): p. 149-60.
53. Sawant, R.R., et al., *Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery*. Biomaterials, 2012. **33**(15): p. 3942-51.
54. Bajaj, A., et al., *Synthesis and gene transfection efficacies of PEI-cholesterol-based lipopolymers*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(8): p. 1640-51.
55. Kim, S.C., et al., *Hydrophobic Modification of Polyethyleneimine for Gene Transfectants*. Bull. Korean Chem. Soc. , 2001. **22**: p. 1069 - 1075.
56. Thomas, M., et al., *Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**(23): p. 14640-5.
57. Brownlie, A., et al., *PEI-based vesicle-polymer hybrid gene delivery system with improved biocompatibility*. Int J Pharm, 2004. **274**(1-2): p. 41-52.
58. Alshamsan, A., et al., *Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine*. Mol Pharm, 2009. **6**(1): p. 121-33.
59. Yu, B., et al., *Enhanced antitumor efficacy of folate modified amphiphilic nanoparticles through co-delivery of chemotherapeutic drugs and genes*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6369-78.
60. Lacoëuille, F., et al., *In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel*. Int J Pharm, 2007. **344**(1-2): p. 143-9.
61. Maxfield, F.R., et al., *Endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(2): p. 121-32.
62. Pack, D.W., et al., *Design and development of polymers for gene delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(7): p. 581-93.
63. Godbey, W.T., et al., *Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery*. J Biomed Mater Res, 2000. **51**(3): p. 321-8.

64. Chen, X., et al., *Crosslinked self-assemblies of lipoid acid-substituted low molecular weight (1800 Da) polyethylenimine as reductive-sensitive non-viral gene vectors*. Nanotechnology, 2012. **23**(41): p. 415602.
65. Moghimi, S.M., et al., *A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy*. Mol Ther, 2005. **11**(6): p. 990-5.
66. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7542-54.

Chapitre 3 : Les Nanocapsules Lipidiques pour la Thérapie Photodynamique

A. Introduction bibliographique :

La thérapie photodynamique (TPD) est une technique de traitement très innovante de plusieurs maladies, notamment le cancer. Elle repose sur le principe d'exciter sélectivement par la lumière une substance photosensibilisante, préalablement administrée. Elle présente l'avantage d'être non invasive et n'induit pas d'effets secondaires à long terme.

Cependant, le problème majeur rencontré dans l'application de TPD étant l'hydrophobicité de la plupart des agents photosensibilisants. En effet, l'injection de ces molécules dans l'organisme nécessite la préparation de formulations particulières. Le développement des nano-vecteurs pourrait ainsi remédier aux obstacles liés à la solubilisation des photosensibilisateurs et surtout permettre un ciblage actif des sites d'intérêt.

Dans ce troisième chapitre, nous exposerons les principes de la thérapie photodynamique et la génération d'oxygène singulet. Quelques exemples de formulations à base de nanoparticules utilisées dans le cadre de TPD seront présentés. Enfin, les mécanismes de mort cellulaire induite par l'action des agents photosensibilisants seront discutés dans la dernière partie de la revue bibliographique.

1. La thérapie photodynamique (TPD) :

Depuis la première application de ce mécanisme de mort cellulaire utilisé par *Dougherty et al.* [1], la TPD a connu un engouement croissant de la part des chercheurs pour le traitement du cancer. Un avantage majeur de la thérapie photodynamique comparée aux autres thérapies (chimiothérapie et radiothérapie) est que le PS est non toxique en l'absence de lumière et donc son accumulation dans les tissus non spécifiques ne va pas générer de cytotoxicité. En outre, la lumière d'activation est non-ionisante, ce qui n'a pas d'effet nuisible sur les tissus sains.

En conséquence, la TPD a le potentiel d'être répétée en toute sécurité si nécessaire, sans risque de léser les tissus sains [2].

L'intérêt clinique de l'utilisation de la thérapie photodynamique est prouvée par les quelques formulations de photosensibilisateurs (PS) approuvées par l'agence de santé telles que Photofrin®, Levulan® et Visudyne® aux Etats-Unis, ou encore Foscan®, Photosense® et Metvix® dans d'autres pays [3].

Cependant, la plupart des PS sont très hydrophobes et par conséquent difficiles à administrer par voie intraveineuse. Dans la majorité des essais cliniques actuels, le PS est formulé avec des excipients lipidiques (Cremophor) ou organiques (dextrose, PEG...) qui sont favorables pour l'administration locale, mais peuvent conduire à des allergies, hypersensibilité ou cytotoxicité s'ils sont administrés par voie intraveineuse [3, 4].

L'autre défi en TPD concerne la pénétration des tissus par la lumière. En effet, les tissus facilement accessibles (la peau) peuvent être illuminés par la majorité des longueurs d'ondes. Par contre, les tumeurs des tissus profonds présentent des limites pour la pénétration de la lumière.

Ainsi, les progrès dans les technologies de lasers à fibre optique peuvent fournir de nouvelles voies permettant la pénétration des tissus par la lumière et activer les PS en intra-tumoral, et la nanomédecine peut fournir un moyen efficace de résoudre les problèmes associés à l'administration par voie intraveineuse et la délivrance sélective des PS aux cellules tumorales.

1.1. Définition et principe :

La photothérapie dynamique est une alternative thérapeutique destinée à détruire sélectivement par la lumière des cellules pathologiques ayant accumulées un agent photosensibilisant. Le PS doit générer des espèces réactives après une activation photochimique de l'oxygène. La TPD comporte donc trois paramètres :

- ❖ Une molécule photosensibilisante (PS)
- ❖ Une longueur d'onde spécifique à l'activation du PS
- ❖ L'oxygène

L'activation par la lumière d'un agent photosensibilisant se traduit par un transfert d'énergie en cascades qui produit en fin de compte des espèces oxygénées hautement réactives et cytotoxiques (**Figure 3.1**). En effet, lors de l'absorption de lumière, le PS passe de son état singulet fondamental S_0 à différents états singulets (S_1 , S_2 ...). Le retour à l'état initial S_0 peut se faire par émission d'un photon (fluorescence) ou par transfert d'énergie à un état triplet T_1 (conversion inter système). La durée de vie de cet état triplet, relativement longue, permet au PS d'interagir avec l'oxygène (situé dans son environnement proche) et il en résulte la formation d'espèces radicalaires hautement réactives causant des dommages sur les cellules avoisinantes.

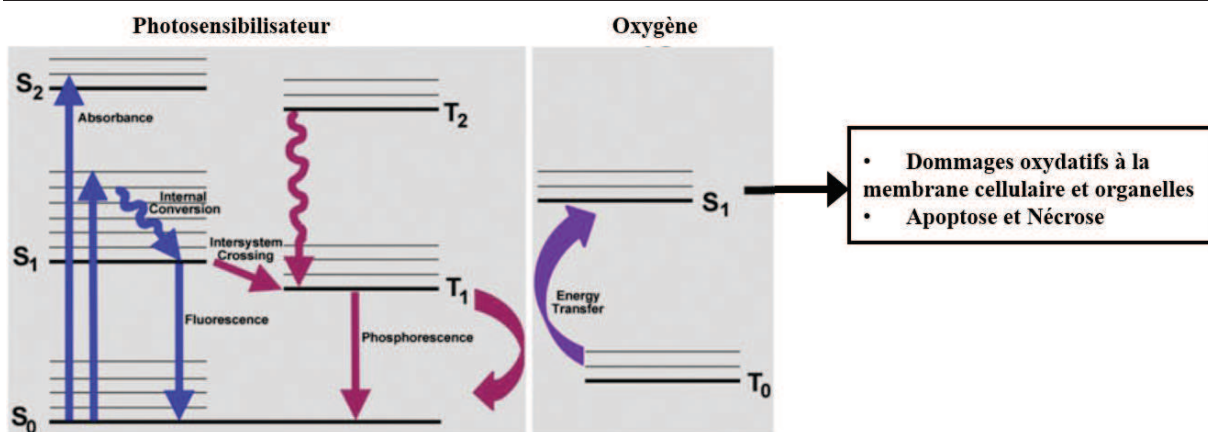


Figure 3.1 - Diagramme de Jablonski représentant les états de transition électroniques et le phénomène de transfert d'énergie entre le PS et l'oxygène dans la TPD [3].

1.2. Génération d'oxygène singulet :

L'oxygène singulet (1O_2) est la forme excitée de l'oxygène, d'énergie plus élevée. Il existe de nombreuses sources connues d'oxygène singulet mais dans le cadre de la thérapie photodynamique, il s'agit du procédé de génération par photosensibilisation.

La génération d'oxygène singulet en TPD est une méthode simple et contrôlable. Elle nécessite la présence d'oxygène, de lumière et d'une molécule photosensibilisante. En effet, le PS va absorber la lumière de l'irradiation et utiliser cette énergie pour exciter l'oxygène et générer ainsi de l'oxygène singulet.

Chaque molécule de PS peut généralement produire $10^3/10^5$ molécules de 1O_2 avant d'être dégradée par photo-blanchiment ou par un autre processus [5]. La capacité de production d'oxygène singulet d'un PS est mesurée par son rendement quantique (Φ_Δ). Le rendement quantique est décrit comme étant le nombre de molécules d'oxygène singulet générées par nombre de photons absorbés par le PS. Il peut être compris entre 0 et 1.

Il existe différentes méthodes pour déterminer le rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_Δ). Elles comprennent les techniques directes (détection directe de la luminescence à 1270 nm) et les méthodes indirectes (détection par dosage indirect avec des molécules piégeant l'oxygène singulet DPBF, RNO...).

1.3. Utilisation des nanoparticules pour la TPD :

L'utilisation des nanoparticules comme vecteurs pour la TPD a été étudiée pour le traitement du cancer. Différents PS et nanovecteurs sont décrits dans la littérature. Cependant, la plupart des PS testés peuvent être classés en trois grandes catégories, à savoir, les porphyrines, les chlorines et les phtalocyanines. En outre, d'autres agents colorants tels que l'hypéricine, le bleu de méthylène et l'indocyanine ont été utilisés comme photosensibilisants.

1.3.1. Les nano-formulations à base de porphyrines :

La première génération des photosensibilisateurs regroupe l'hématoporphyrine et ses dérivés (**Figure 3.2**). Il ne s'agit pas d'un composé unique mais d'un mélange de monomères et d'oligomères, la première formulation est commercialisée sous l'appellation Photofrin®.

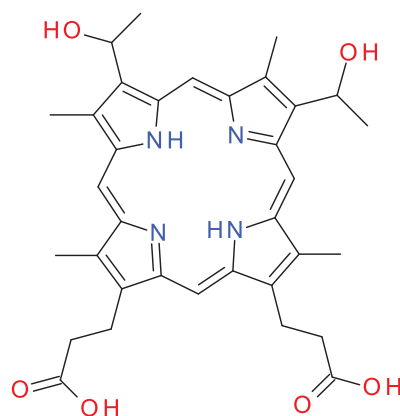


Figure 3.2 - Structure chimique de l'hématoporphyrine.

Bien que la formulation actuelle ne comporte pas de nano-vecteurs, plusieurs études précliniques prometteuses ont été réalisées avec des nano-formulations de PS porphyriniques. Le **Tableau 3.1** regroupe quelques exemples de nano-vecteurs utilisés en TPD *in vitro* et *in vivo*.

Nano-vecteurs	PS	Cellules ciblées	Réf
NPs métalliques	Photofrin	Cancer du poumon A549	[6]
NPs magnétiques	TMPyP4	Cancer du sein MCF-7	[7]
NPs de silice	Protoporphyrine IX	Cancer du côlon HCT116 et HT-29 Cancer du sein MCF7 et MDA-MB-231	[8]
NPs de PLGA	TCPP	Cancer du côlon SW480	[9]

Tableau 3.1 – Exemples de nanoparticules à base de porphyrines utilisées en TPD.

Les dérivés de porphyrine telle que la protoporphyrine IX ont été formulés dans différents systèmes nanoparticulaires comme les NPs magnétiques, les NPs de chitosan, les NPs polymériques...

Hu et al. [9] ont par exemple testé le potentiel de nanoparticules PLGA (acide poly (lactique-co-glycolique) chargées en méso-tétra (carboxyphénol) porphyrine (TCPP) pour le traitement en TPD de xénogreffes de cancer du côlon humain. Les résultats ont montré que la taille des tumeurs des souris traitées avec les nanoparticules régressait significativement par rapport aux contrôles. La majorité de ces formulations ont néanmoins utilisé le mécanisme de rétention et perméabilité accrues (RPA) pour cibler passivement les tumeurs.

Plus récemment, des nanoparticules encapsulant un PS de type porphyrine (TMPyP4) ont été utilisées pour un ciblage actif des tumeurs. En effet, la conjugaison d'un aptamer sur des nanoparticules magnétiques vectorisant le TMPyP4 a permis de cibler les cellules du cancer du sein [7]. D'autres exemples de ciblage actif en TPD avec des nano-vecteurs ont été décrits dans la littérature tels que les NPs de silice fonctionnalisées avec du mannose [10] ou encore les NPs polymériques spécifiques aux récepteurs folates [11].

1.3.2. Les nano-formulations à base de chlorines :

Les chlorines forment une classe importante de PS. Ce sont des molécules ayant un cycle tétrapyrrolique et sont largement utilisées pour leur potentiel en TPD en application anti-tumorale (**Figure 3.3**). Le dérivé de chlore (m-THPC) a reçu en 2002 l'autorisation de mise sur le marché sous le nom commercial Foscan® pour le traitement des cancers de la tête et du cou.

Plusieurs tests d'encapsulation de PS dérivés des chlorines dans différents nano-vecteurs ont été réalisés. Les nano-systèmes offrent la possibilité de solubiliser les agents photosensibilisants et permettent d'autre part le ciblage actif et passif des cellules tumorales.

En effet, des nanoparticules de chitosan ou encore des NPs d'albumine sérique humaine chargées en chlorine e6 (Ce6) ont été testées pour l'étude du cancer du côlon. Les nano-formulations ont permis une inhibition de la croissance significative des xénogreffes de cancer du côlon sur des souris comparées aux traitements avec le PS libre [3].

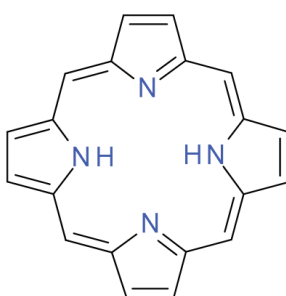


Figure 3.3 - Structure chimique d'une chlorine.

1.3.3. Les nano-formulations à base de phthalocyanines :

Les phthalocyanines font partie des PS qui absorbent fortement aux grandes longueurs d'onde. Ils sont généralement utilisés sous forme de complexes métalliques (**Figure 3.4**). Plusieurs études ont montré le potentiel de telles molécules encapsulées dans des nano-vecteurs en TPD *in vitro* et *in vivo*.

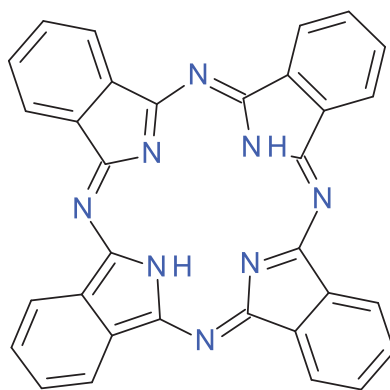


Figure 3.4 – Structure chimique d’une phthalocyanine.

En effet, *Master et al.* [3], travaillant sur la phthalocyanine de zinc (ZnPc), ont développé des nanoparticules de silice mésoporeuse chargées avec cet agent photosensibilisant et ont testé le potentiel TPD de tels systèmes *in vivo*. Ces nano-vecteurs ont permis de prolonger la durée de vie des souris traitées de 16 à 40 jours.

1.3.4. Nano-formulations à base d’autres types de PS :

Outre les grandes classes de PS décrits ci-dessus, plusieurs autres molécules de PS ont été également étudiées dans des formulations de nanoparticules. Parmi ces molécules, il y a l’hypéricine ou encore le bleu de méthylène (**Figure 3.5**).

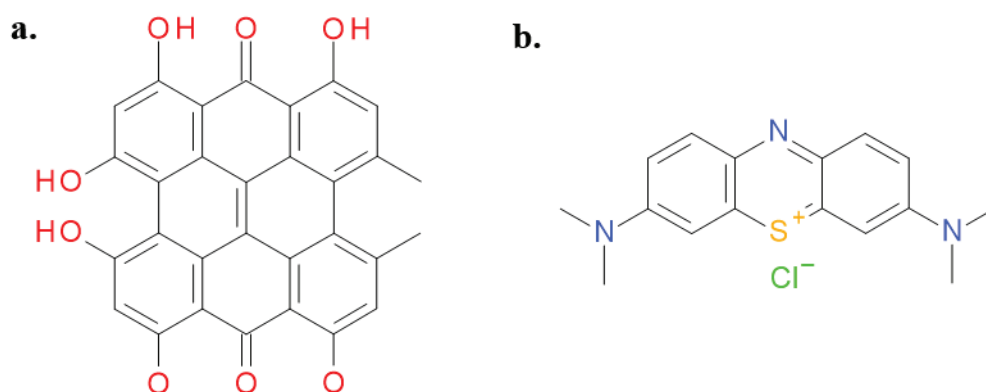


Figure 3.5 – Structures chimiques de l’hypéricine (a) et du bleu de méthylène (b).

Une étude réalisée au sein de notre équipe a montré le potentiel de l'hypéricine pour la photothérapie dynamique *in vitro* via l'utilisation de nanocapsules lipidiques comme vecteurs [12] (**Figure 3.6**). En effet, cette molécule photosensibilisante est très hydrophobe et de ce fait son utilisation en milieu biologique nécessite une étape de solubilisation dans un solvant organique ou un mélange de tensioactifs. La méthode de formulation des NCL sans solvant a permis d'encapsuler l'hypéricine avec un taux très élevée permettant de remédier aux problèmes d'agrégation dans les milieux aqueux.

D'autre part, les NCL chargées en hypéricine ont été testées pour leur potentiel à générer l'oxygène singulet et les résultats des calculs du rendement quantique donnent des valeurs entre 0,29 et 0,44. Cela confirme que les NCL sont une alternative pour la solubilisation de l'hypéricine. Enfin, les tests de TPD *in vitro* sur deux lignées cellulaires (HEK et HeLa) ont permis d'atteindre ~ 50 % de mort cellulaire pour une concentration en PS de 0,5 μM dans les NCL.

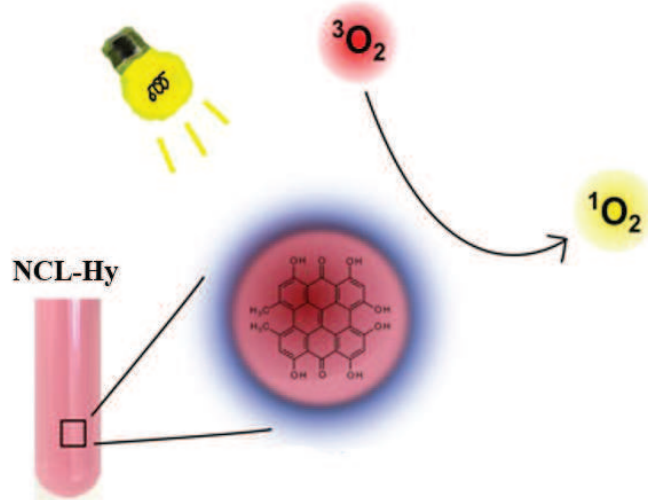


Figure 3.6 – Encapsulation de l'hypéricine dans les nanocapsules lipidiques [12].

1.4. Localisation intracellulaire des PS :

L'internalisation des PS dans les cellules tumorales est une étape primordiale pour une thérapie photodynamique efficace. En effet, les dérivés réactifs de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène, ERO) ont une demi-vie courte limitant leur activité à leurs sites de localisation dans la cellule.

L'effet TPD ainsi que les dommages causés par les PS dans les cellules vont dépendre fortement de la localisation subcellulaire de ces agents (**Figure 3.7**).

La microscopie confocale et l'utilisation de marqueurs cellulaires fluorescents ont permis de faciliter l'étude de la localisation intracellulaire des molécules photosensibilisantes qui dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques.

La charge ionique, le degré d'hydrophobicité ainsi que l'asymétrie de la molécule jouent un rôle important dans l'internalisation des PS par les cellules. En effet, les PS hydrophobes chargés pas trop négativement (moins de deux charges négatives) peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, tandis que les molécules moins hydrophobes et chargées négativement sont internalisées par les cellules par endocytose [13].

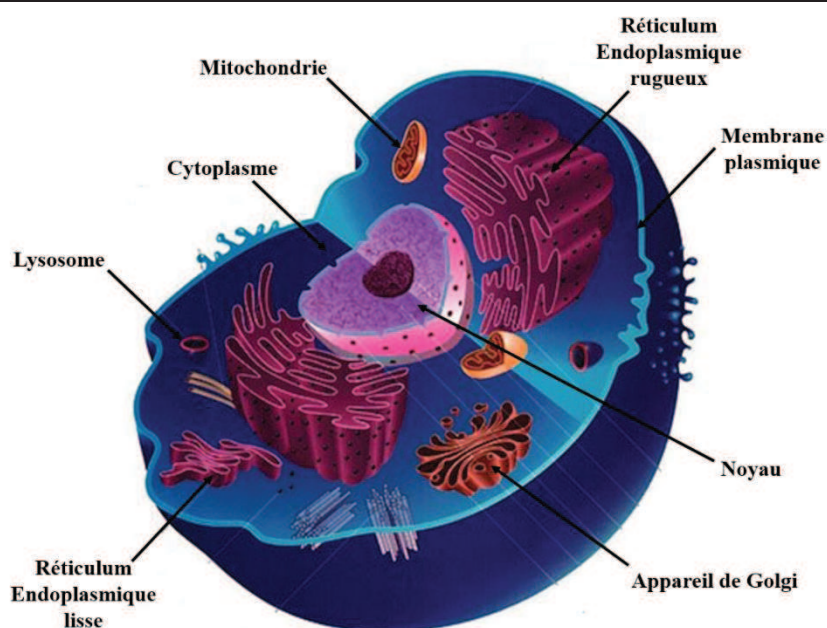


Figure 3.7 – Représentation schématique des différents compartiments cellulaires d'une cellule eucaryote.

1.4.1. Les lysosomes :

En 1993, les lysosomes ont été considérés comme étant les compartiments cibles des PS [14]. Cependant, des études récentes ont montré que, bien que les PS soient localisés dans les lysosomes, l'efficacité relative de la TPD est nettement plus faible que celle observée avec les PS localisés dans les mitochondries et les autres organelles [15, 16].

La localisation intracellulaire initiale des PS dans les lysosomes peut se redistribuer suite à l'action photodynamique et l'absorption de la lumière. Ce comportement a été attribué à la perméabilisation photodynamique de la membrane lysosomale permettant à de petites molécules telles que les PS à passer dans le cytoplasme [13].

1.4.2. Les mitochondries :

Les mitochondries sont des compartiments cibles pour plusieurs PS utilisés en TPD. Ceci est dû probablement au fait que la plupart des molécules PS entraînent l'apoptose par déstabilisation des mitochondries suite à l'irradiation [17].

Les PS hydrophobes chargés positivement peuvent se localiser dans les mitochondries à cause de l'influence du potentiel de la membrane mitochondriale et la bicouche lipidique de la membrane [18]. Il est aussi connu que les mitochondries des cellules cancéreuses accumulent préférentiellement les composés cationiques comparées aux cellules normales [13].

1.4.3. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique :

Des études réalisées par microscopie confocale et spectrométrie à fluorescence ont montré que certains PS pouvaient se localiser dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. En effet, *Teiten et al.* [19] ont étudié la localisation du Foscan dans des cellules du cancer du sein. Les tests de co-localisation avec les marqueurs fluorescents de chaque organelle a permis de conclure que le Foscan présente une faible localisation dans les lysosomes et les mitochondries. Cependant, l'analyse du profil de fluorescence a montré que le PS co-localisait parfaitement avec le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

1.5. Mécanismes de destruction des tumeurs causée par la TPD :

Plusieurs études ont élucidé les mécanismes de mort cellulaire et certaines de ces voies peuvent être initiées suite au traitement TPD. La destruction des cellules cancéreuses par l'effet TPD se fait de deux manières (**Figure 3.8**) :

- ❖ Effet direct entraînant la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie.
- ❖ Effet indirect en provoquant des dommages vasculaires et immunitaires.

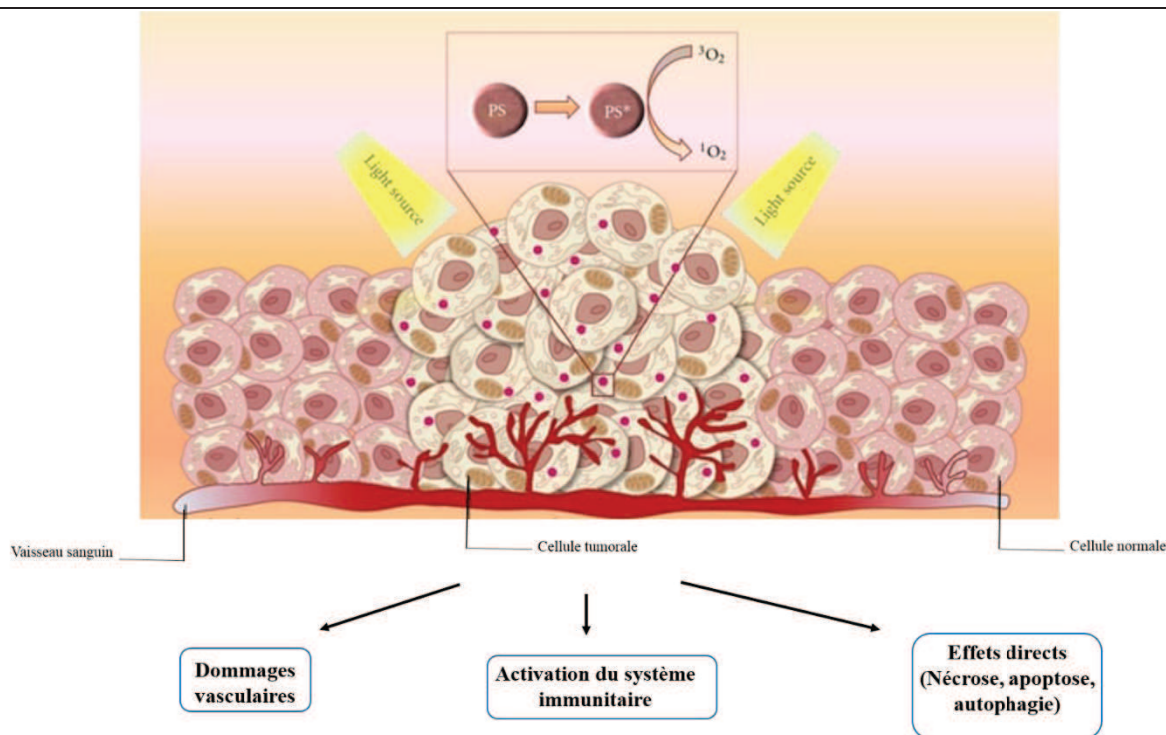


Figure 3.8 – Effets cellulaires induits par TPD [20].

1.5.1. Effets directs :

L'irradiation d'un PS internalisé par les cellules va entraîner la mort cellulaire. Les mécanismes induits vont dépendre de différents paramètres tels que la concentration, les propriétés physicochimiques et la localisation intracellulaire du PS, la concentration en oxygène, la longueur d'onde de la lumière, ... La TPD peut donc entraîner les trois formes de mort cellulaire, à savoir l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (**Figure 3.9**).

❖ *La nécrose :*

La nécrose est une forme violente et rapide de la dégénérescence affectant les populations cellulaires. Elle se caractérise par le gonflement du cytoplasme, la destruction des organelles et la rupture de la membrane plasmique entraînant la libération du contenu cellulaire et une réaction inflammatoire. Il s'agit d'une mort « accidentelle » non programmée, causée par des facteurs physiques ou chimiques [21]. En TPD, la nécrose est principalement induite par la dose de la lumière ainsi que celle du PS [22]. La localisation du PS au niveau de la membrane plasmique peut aussi induire une mort nécrotique probablement due à la destruction de l'intégrité de la membrane et l'épuisement rapide de l'ATP intracellulaire [23].

❖ *L'apoptose :*

L'autre mécanisme de mort cellulaire est appelé apoptose. Il s'agit d'une mort génétiquement programmée permettant le renouvellement cellulaire. Elle se caractérise par le rétrécissement des cellules, un bourgeonnement de la membrane plasmique suivie par la fragmentation de la cellule en multiples vésicules (corps apoptotiques) qui seront éliminés par le système immunitaire (phagocytose) [21]. L'apoptose nécessite l'activation de transcription de gènes spécifiques, notamment l'activation des endonucléases, et l'activation de la voie des caspases [21]. Elle peut être déclenchée soit par l'activation des récepteurs de mort ou soit par la libération du cytochrome C mitochondrial. Le processus de l'apoptose est étroitement contrôlé par diverses protéines. Il est bien connu que la résistance des cellules tumorales à l'apoptose pourrait être une caractéristique essentielle du développement du cancer. Ainsi, la modulation des éléments de la signalisation de l'apoptose lors de la TPD pourrait influencer directement la mort des cellules cancéreuses [24].

❖ *L'autophagie :*

L'autophagie est un mécanisme cellulaire catabolique qui permet à la cellule de maintenir un équilibre entre la synthèse, la dégradation, et le recyclage des composants cellulaires [25]. Il s'agit de la dégradation lysosomale des organites cellulaires et protéines stimulée par divers stress notamment le stress oxydatif [26]. Selon le type des ERO (espèces réactives de l'oxygène) et le degré de dommage oxydatif, la TPD peut stimuler l'autophagie [27] qui agit soit de manière cytoprotectrice ou au contraire induit la mort cellulaire autophagique.

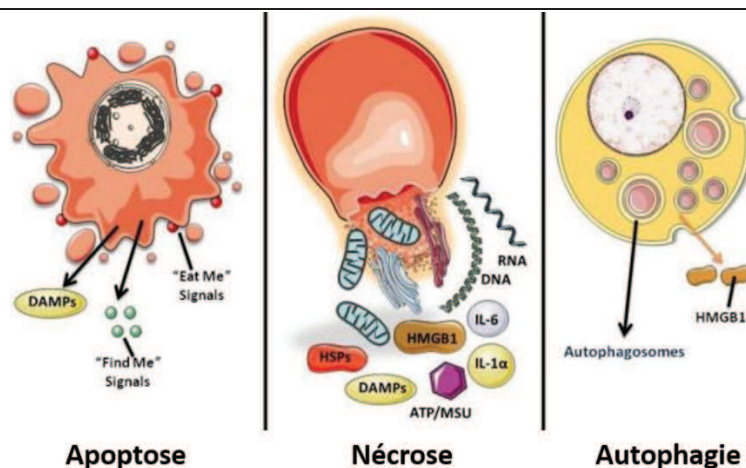


Figure 3.9 – Mécanismes directs de mort cellulaire [26].

1.5.2. Effets indirects :

❖ Effets vasculaires induits par TPD :

Le premier effet indirect induit par la TPD *in vivo* est de nature vasculaire. En effet, des lésions vasculaires surviennent juste après la fin du traitement TPD et contribuent à la mort des cellules tumorales par asphyxie [28]. Les mécanismes impliqués diffèrent fortement en fonction du type de PS. Le Photofrin conduit, par exemple, à la constriction des vaisseaux, l'adhérence des leucocytes et la thrombose, tous ces effets semblent être liés à l'activation plaquettaire et la libération de thromboxane [29].

❖ Effets inflammatoires et immunitaires induits par TPD :

La PDT provoque souvent une réaction inflammatoire aiguë sous forme d'un œdème localisé au site d'action. Cette réaction est une conséquence du stress oxydatif induit. En effet, la réponse inflammatoire est un processus de protection contre les dommages induits par cette thérapie. Sa tâche principale est de contenir la perturbation de l'homéostasie, d'assurer la destruction des cellules endommagées et de favoriser la cicatrisation locale avec restauration de la fonction du tissu normal.

Par ailleurs, la TPD induit une réponse immunitaire anti-tumorale à long terme. Elle active à la fois l'immunité humorale et l'immunité anti-tumorale à médiation cellulaire [26].

Canti et al. [30] ont été les premiers à démontrer l'induction de l'immunité anti-tumorale par la TPD. En effet, les cellules isolées de ganglions lymphatiques de souris ayant des tumeurs traitées par TPD étaient capables de conférer une résistance à la tumeur chez une souris immunodéficiente. La TPD permet donc le développement d'une réponse immunologique à mémoire.

1.6. Nouvelles stratégies en TPD :

La TPD peut être utilisée en combinaison avec les différents traitements actuels contre le cancer y compris la chimiothérapie [31], la chirurgie [32], la thérapie génique [33], et l'immunothérapie [34] sans compromettre leurs effets thérapeutiques.

Un autre moyen d'améliorer l'efficacité de la TPD consiste à favoriser la délivrance du PS et le ciblage des sites d'action en le conjuguant à des molécules ciblant les tumeurs, en utilisant les nanoparticules comme vecteurs ou plus récemment, en co-délivrant deux différents PS. Cette nouvelle stratégie consiste à utiliser une combinaison de deux agents photosensibilisants dans le but d'avoir une synergie de l'effet thérapeutique.

Acedo et al. [35] ont étudié les effets de photosensibilisation médiés par l'administration simultanée de deux différents PS : la phtalocyanine ZnPc et la porphyrine TMPyP, *in vitro* sur différentes lignées cellulaires et *in vivo* chez des souris portant une tumeur (**Figure 3.10**).

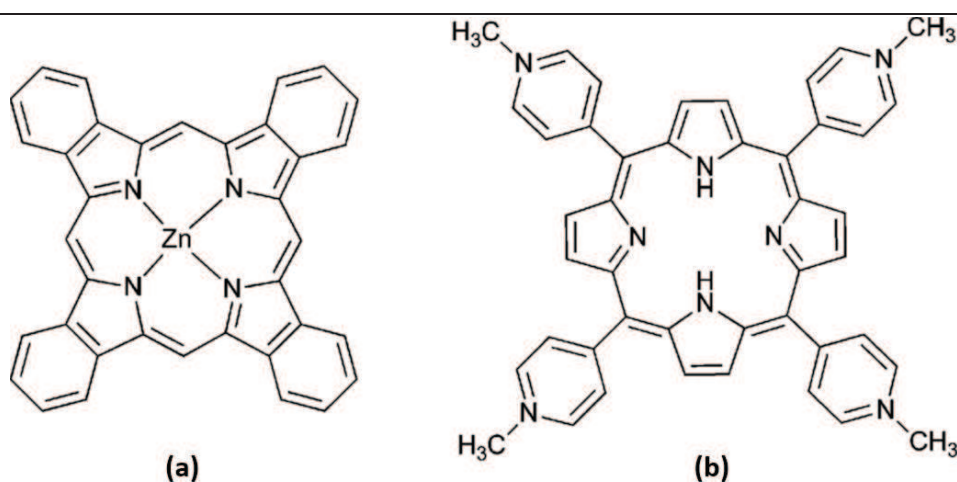


Figure 3.10 : Structures chimiques de la phtalocyanine ZnPc (a) et de la porphyrine TMPyP (b).

Les résultats des tests sur les cellules humaines MCF-7 et HaCaT étaient similaires à ceux obtenus précédemment avec les cellules HeLa [36]. Un effet synergique a été observé (cytotoxicité > 94%) après une incubation d'une heure en présence des deux PS sur les trois lignées cellulaires. Les mécanismes de mort impliqués semblent être l'apoptose et l'inhibition de la migration cellulaire. Enfin, les tests *in vivo* ont montré une accumulation des PS dans la tumeur des souris au bout de 24 heures d'incubation et une efficacité de TPD avec les PS combinés sur les tumeurs solides des souris.

Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'effet synergique de l'activité photodynamique est dû à une différence de localisation subcellulaire des deux PS [35, 36]. L'étude par microscopie à fluorescence a permis d'observer une localisation du ZnPC dans l'appareil de Golgi, alors que les porphyrines cationiques TMPyP semblent se localiser dans les lysosomes. Cette différence de localisation entraînerait une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) simultanément dans différents compartiments cellulaires et pourrait induire ainsi les mécanismes de mort plus rapide et efficace.

2. Conclusion :

La thérapie photodynamique continue à gagner du terrain en tant que traitement alternatif de divers cancers. Le succès de la TPD dans les tissus profonds des tumeurs nécessitera l'optimisation de la délivrance ciblée de médicaments et la photo-irradiation spécifique des cellules tumorales.

Les nanoparticules peuvent fournir une multitude de façons pour améliorer la délivrance ciblée des agents photosensibilisateurs dans les cellules cancéreuses grâce à l'encapsulation optimale du PS, la protection de l'inactivation plasmique ou de la fuite prématurée de la molécule et le ciblage spécifique des tissus de la tumeur.

B. Objectifs du travail :

Dans ce chapitre, nous décrirons l'encapsulation de deux photosensibilisateurs dans les nanocapsules lipidiques et leur efficacité dans le traitement photodynamique *in vitro* sur différentes lignées cancéreuses humaines. Une stratégie de synergie de l'effet thérapeutique sera démontrée par la combinaison de l'effet TPD des deux PS vectorisés dans une même nanocapsule lipidique.

C. Les NCL chargées en PS :

1. Préparation des NCL chargées en PS :

○ Les agents photosensibilisants :

Les photosensibilisateurs utilisés dans cette étude sont l'hypéricine (Hy) et la protoporphyrine IX (PPIX).

L'hypéricine est une molécule photosensibilisante naturelle extraite de l'*Hypericum perforatum*. Elle fait partie de la famille des PS non tétrapyrroliques. La longueur d'onde d'absorption de l'hypéricine est de 590 nm (**Figure 3.11**).

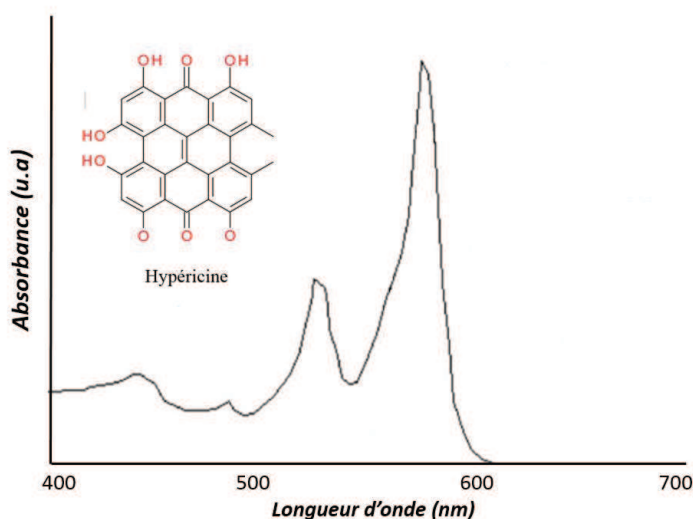


Figure 3.11 : Structure chimique et spectre d'absorption UV-Vis de l'hypéricine.

Le deuxième PS est la PPIX qui fait partie des molécules tétrapyrroliques. C'est une porphyrine qui absorbe dans le domaine du visible et présente un spectre d'absorption très caractéristique (**Figure 3.12**). La bande intense appelée bande de Soret est située entre 390 et 430 nm (proche UV) et les quatre bandes de moindre intensité nommées bandes Q se situent aux longueurs d'ondes entre 500 et 680 nm.

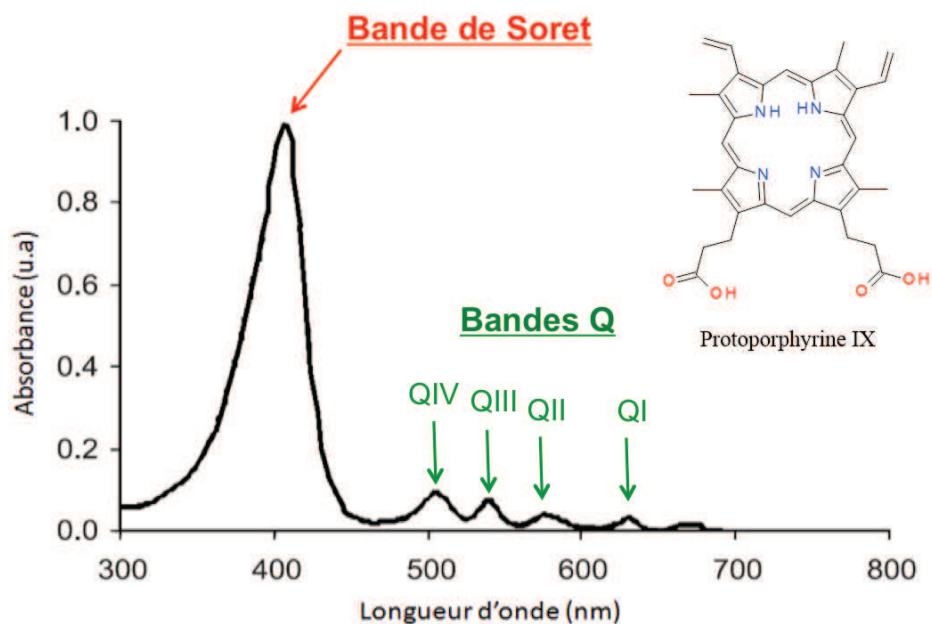


Figure 3.12 : Structure chimique et spectre d'absorption UV-Vis de la protoporphyrine IX.

○ Encapsulation des PS:

La formulation des nanocapsules lipidiques (NCL25) contenant les agents photosensibilisants se fait en solubilisant les PS dans la phase huileuse constituée de Labrafac et de Phospholipon 90G. Ensuite, le processus de formulation des nanocapsules se poursuit selon la méthode d'inversion de phases décrite précédemment [37], en mélangeant le reste des composés dans des proportions données (Solutol HS15, NaCl et eau distillée) (**Figure 3.13**).

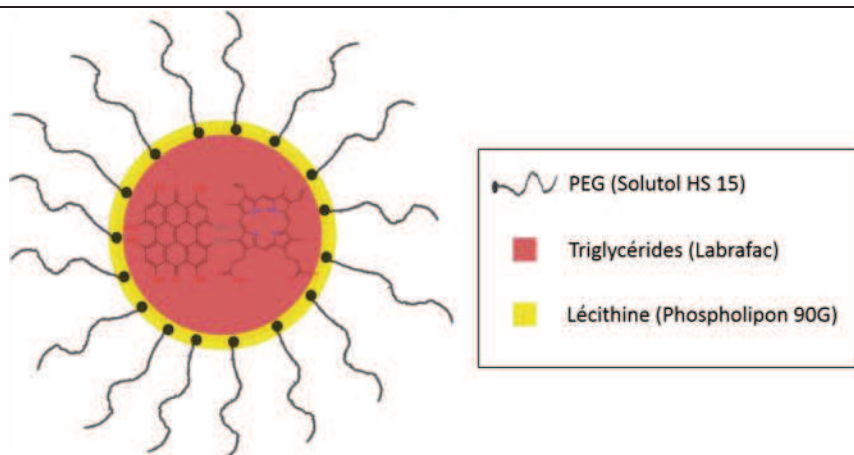


Figure 3.13 : Représentation schématique des nanocapsules lipidiques co-encapsulant les deux PS.

Trois lots de NCL25 chargées en PS ont été préparés de la manière suivante (**Figure 3.14**) :

- ✓ Une formulation avec l'hypéricine à 0,04 % (pourcentage massique d'Hy par rapport à la phase huileuse des nanocapsules) : NCL25-Hy.
- ✓ Un lot de NCL25 encapsulant la protoporphyrine IX à 0,04 % (pourcentage massique du PPIX par rapport à la phase huileuse des NCL) : NCL25-PPIX.
- ✓ La dernière formulation consiste en une co-encapsulation des deux PS (Hy et PPIX) à 0,04 % (pourcentage massique d'Hy 0,02 % et pourcentage massique de PPIX 0,02 %) : NCL25-PPIX-Hy.

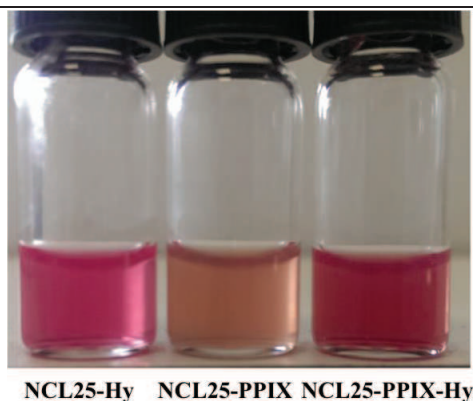


Figure 3.14 : Les nanocapsules lipidiques chargées en PS (NCL25-Hy, NCL25-PPIX et NCL25-PPIX-Hy).

Notre choix de travailler avec les nanocapsules, de diamètre 25 nm, à 0,04 % de PS est dicté par une étude précédente réalisée dans notre équipe portant sur l'encapsulation de l'hypéricine dans les nanocapsules lipidiques [12]. Les résultats ont montré l'efficacité en thérapie photodynamique *in vitro* des nanocapsules lipidiques de taille 25 nm et contenant 0,04 % d'hypéricine. En effet, l'activité photo-toxique des nanocapsules lipidiques chargées en Hy a montré une inhibition de la prolifération cellulaire jusqu'à 50 et 60 % sur les cellules HEK et HeLa, respectivement, à une concentration finale en PS de 0,5 μ M.

D'autre part, une étude réalisée *in vitro* sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome de l'endomètre humain HEC-1A a montré un effet synergique entre l'hypéricine et l'acide 5-aminoévolique (5-ALA, précurseur de la protoporphyrine IX) sur l'activité photo-toxique [38]. Les auteurs ont émis deux hypothèses pour expliquer ce phénomène :

- ✓ L'augmentation de la photo-toxicité est due à une augmentation de la génération de la protoporphyrine IX par le 5-ALA stimulée par l'hypéricine.
- ✓ Chaque PS induit une photo-toxicité propre à son maximum d'absorption dans la cellule.

Dans notre cas, nous avons étudié l'effet sur l'activité photodynamique de la co-encapsulation de l'hypéricine et la protoporphyrine IX dans les nanocapsules lipidiques. Le fait est que les deux PS sont différents de point de vue structure et propriétés spectroscopiques peut impliquer des différences de localisation intracellulaire et mécanisme de destruction cellulaire. Nous avons donc essayé de répondre aux questions suivantes :

L'encapsulation des PS va-t-elle modifier les propriétés spectroscopiques ou avoir un effet sur la production d'oxygène singulet de chaque molécule ? Est-ce que les deux PS vont interagir entre eux à l'intérieur de la nanocapsule lipidique ? Y'aurait-il un effet synergique ou bien additif sur la photo-toxicité cellulaire induite de la combinaison des deux PS ?

2. Caractérisations des NCL chargées en PS :

2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) :

Les nanocapsules lipidiques vides (NCL25) et chargées en PS (NCL25-PS) ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DDL). Cette technique permet de déterminer facilement le diamètre moyen et la charge de surface des nanocapsules en solution.

La méthode de formulation des nanocapsules par inversion de phases offre un bon contrôle de la taille avec une monodispersité importante ($IP < 0,2$). En effet, les NCL chargées en PS se caractérisent par des diamètres moyens inférieurs à 30 nm (**Tableau 3.2**) et la présence des PS à l'intérieur de leurs cœurs huileux n'a pas d'influence sur leurs tailles respectives (par exemple, $27,1 \pm 2,4$ nm pour les NCL25-Hy).

Cependant, le potentiel zêta des nanocapsules contenant les PS est plus négatif ($-18,6 \pm 3,0$ mV pour les NCL25-PPIX-Hy) par rapport aux nanocapsules lipidiques vides (NCL25, $-6,1 \pm 1,5$ mV). Il semblerait que l'hypéricine et la protoporphyrine IX se trouvent dans le cœur huileux des NCL à l'interface huile / tensioactifs, ce qui peut avoir une incidence sur la charge de surface [12].

Les résultats de DDL montrent que les nanocapsules lipidiques peuvent être d'excellents vecteurs pour la thérapie photodynamique. La taille nanométrique (< 30 nm) ainsi que la charge de surface négative de toutes les formulations de NCL chargées en PS représentent des atouts pour la délivrance des PS *in vitro* et *in vivo*. Un potentiel zêta négatif peut réduire le risque de l'élimination de la circulation sanguine par répulsion des opsonines chargées négativement [39]. Cependant, cette même charge négative peut être un frein à l'internalisation cellulaire *in vitro* puisque les membranes cellulaires se caractérisent elles aussi par une charge de surface négative due à la présence de glycoprotéines et phospholipides anioniques.

	Hy (%)	PPIX (%)	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)
NCL25	0	0	26,6 ± 0,8	0,08 ± 0,01	- 6,1 ± 1,5
NCL25-Hy	0,04	0	27,1 ± 2,4	0,15 ± 0,01	- 19,5 ± 2,4
NCL25-PPIX	0	0,04	31,6 ± 1,9	0,17 ± 0,02	- 12,6 ± 1,9
NCL25-PPIX-Hy	0,02	0,02	28,0 ± 3,3	0,13 ± 0,01	-18,6 ± 3,0

Tableau 3.2 – Caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules vides et chargées en PS.

2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

Les taux d'encapsulation de l'hypericine et de la protoporphyrine IX dans les nanocapsules lipidiques ont été déterminés par HPLC. Les deux types de PS s'encapsulent parfaitement dans les NCL25 à des taux d'encapsulation élevés (> 97 %). Le caractère très hydrophobe de l'hypericine et de la protoporphyrine IX leur permet de s'insérer préférentiellement dans le cœur huileux des nanocapsules (**Tableau 3.3**). D'autre part, l'incorporation du mélange des deux PS dans les mêmes nanocapsules n'a pas d'influence sur le rendement d'encapsulation de chaque PS, soulignant la possibilité de co-délivrer différents principes actifs dans un seul nano-vecteur.

	Hy (%)	PPIX (%)	RE d'Hy (%)	RE de PPIX (%)
NCL25-Hy	0,04	0	97,0 ± 2,5	-
NCL25-PPIX	0	0,04	-	99,0 ± 1,0
NCL25-PPIX-Hy	0,02	0,02	98,0 ± 1,6	100,0 ± 0,3

Tableau 3.3 – Rendements d'encapsulation (RE) des PS dans les NCL25.

2.3. Spectroscopie UV-Visible :

Les nanocapsules chargées en PS ont été caractérisées par spectroscopie ultraviolet-visible. Les spectres d'absorption entre 300 et 700 nm de chaque lot de NCL25-PS ont été comparés à ceux correspondant aux PS libres en solution (DMSO) (**Figure 3.14**).

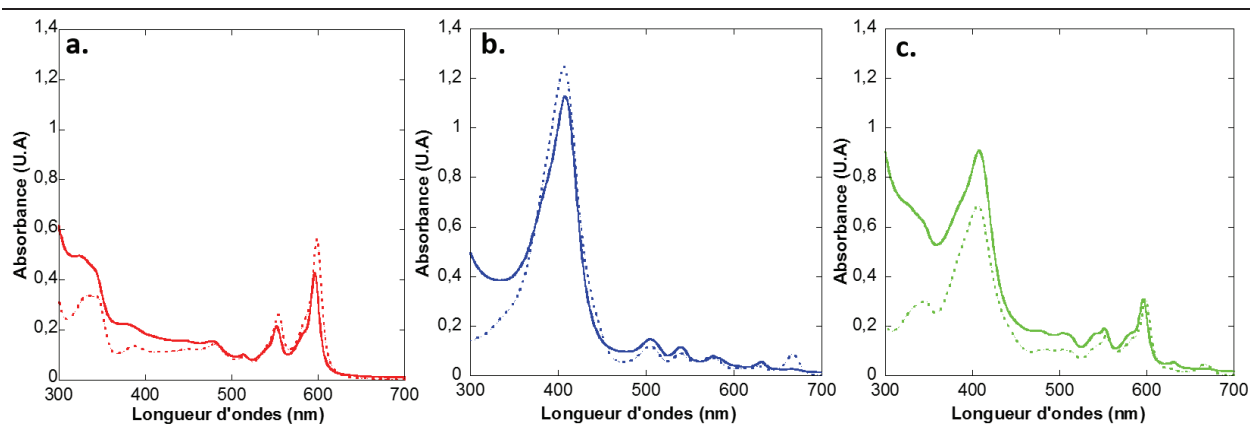


Figure 3.15 – Spectres d’absorption entre 300 et 700 nm de l’Hy solubilisée dans le DMSO (pointillée en rouge), NCL25-Hy (ligne continue en rouge) **(a)** ; de PPIX dans le DMSO (pointillée en bleu), NCL25-PPIX (ligne continue en bleu) **(b)** ; PPIX-Hy dissous dans le DMSO (pointillée en vert), NCL25-PPIX-Hy (ligne continue en vert) **(c)**. Les nanocapsules lipidiques sont dispersées dans de l’eau déionisée.

La **Figure 3.15 (a)** présente les deux spectres d’absorption de l’hypéricine dans le DMSO ou dans les nanocapsules lipidiques (NCL25-Hy) dans l’eau. Les bandes d’absorption maximales sont aux intervalles 300–400, 450–500 et 550–600 nm, avec un pic d’absorption autour de 590 nm. Le profil d’absorption en UV-visible de l’Hy encapsulée montre que le PS est bien solubilisé dans les nanocapsules (absence de nouveaux pics) et que le processus de formulation des NCL25 n’a pas d’effet sur la stabilité physique de la molécule hydrophobe. On remarque néanmoins un petit shift de 2 – 3 nm dans les spectres d’absorption correspondant à la différence de solvant (DMSO et solution aqueuse).

Pour la protoporphyrine IX encapsulée, l’analyse en spectroscopie UV-visible montre que le spectre d’absorption est comparable à celui d’une porphyrine libre avec une bande de Soret à 402 nm et les bandes Q entre 500 et 650 nm (**Figure 3.15 (b)**). D’autre part, ce profil caractéristique montre que le PS est sous forme monomère dans les nanocapsules. En effet, la PPIX est une molécule amphiphile ayant des groupements ionisables (deux azotes pyrroliques et deux acides propioniques) et une large région hydrophobe [40]. *Inamura et al.* [41] ont montré que les porphyrines sont sous forme monomère ($\lambda_{\text{max}} = 405$ nm) et dimère ($\lambda_{\text{max}} = 388$ nm) à pH 1 et 12 respectivement. Aux conditions acides (pH 4,8), il y a formation d’agrégats (MW > 700 kDa).

Cependant, le spectre d'absorption de la PPIX solubilisée dans le DMSO montre une photo-dégradation de la molécule dans ces conditions expérimentales illustrée par l'apparition d'un pic à 670 nm. *Ericson et al.* [42] ont montré que la PPIX est dégradée par photo-oxydation en produisant des composés (photo-protoporphyrine IX) ayant une bande d'absorption caractéristique autour de 670 nm. Le processus de dégradation semble être dépendant de l'oxygène (**Figure 3.16**) [43].

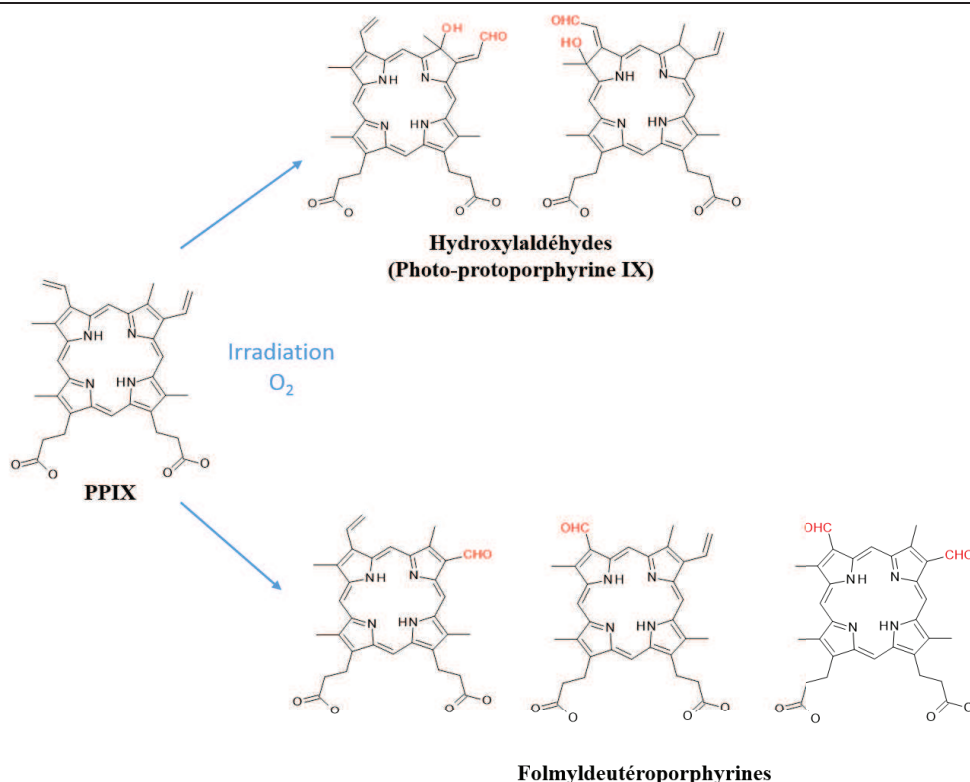


Figure 3.16 : Réaction de photo-oxydation de la protoporphyrine IX (d'après [43, 44]).

Les spectres d'absorption des nanocapsules lipidiques encapsulant les deux PS (NCL25-PPIX-Hy) correspondent à l'addition des bandes d'absorption des NCL25-Hy et NCL25-PPIX (**Figure 3.15 (c)**). L'analyse par spectroscopie UV-Vis a permis de vérifier que les molécules PS étaient parfaitement solubilisées dans le cœur huileux des NCL25. En effet, la comparaison avec les spectres d'absorbance des PS dans le DMSO montre que les nanocapsules lipidiques peuvent être une plateforme pour la vectorisation de PS hydrophobes. Par ailleurs, l'absence du pic à 670 nm est une preuve que l'encapsulation de la protoporphyrine IX dans les nanocapsules protège le PS de la photo-dégradation.

2.4. Spectroscopie de fluorescence :

Les propriétés de fluorescence des nanocapsules lipidiques chargées en PS (NCL25-Hy, NCL25-PPIX et NCL25-PPIX-Hy) ont été déterminées par spectroscopie de fluorescence.

Les spectres d'émission des nanocapsules encapsulant les PS ont été comparés à ceux des molécules photosensibilisantes libres solubilisées dans le DMSO entre 500 et 800 nm (**Figure 3.17**).

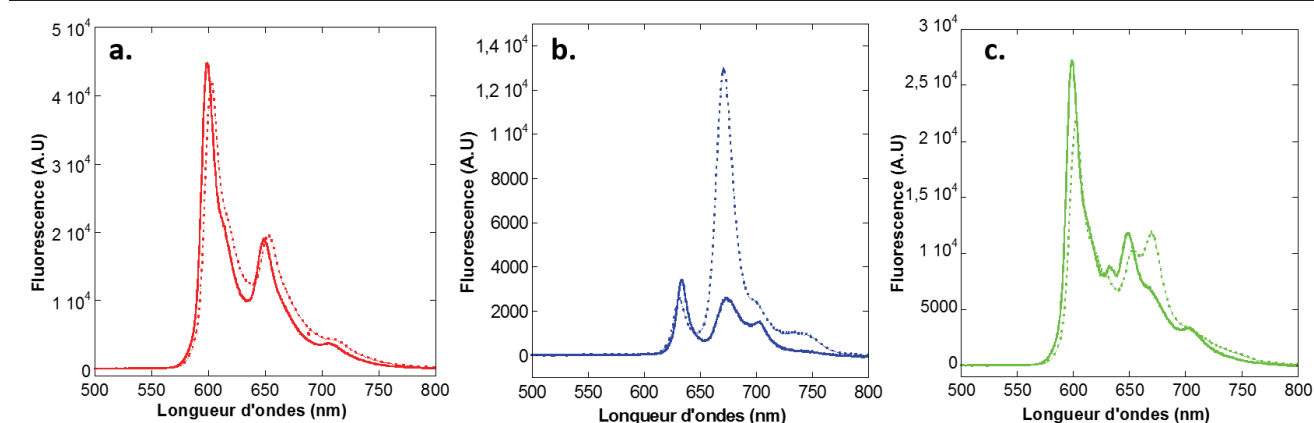


Figure 3.17 – Spectres d'émission de fluorescence de l'Hy solubilisée dans DMSO (pointillée en rouge), NCL25-Hy (ligne continue en rouge) (**a**) ; de PPIX dans le DMSO (pointillée en bleu), NCL25-PPIX (ligne continue en bleu) (**b**) ; PPIX-Hy dissous dans le DMSO (pointillée en vert), NCL25-PPIX-Hy (ligne continue en vert) (**c**). Longueur d'onde d'excitation est 457 nm.

Les nanocapsules lipidiques sont dispersées dans de l'eau déionisée.

L'effet de l'encapsulation sur la solubilité et l'agrégation de chaque PS a été étudiée par spectroscopie de fluorescence en utilisant un laser argon ($\lambda_{exc} = 457$ nm, 10 mW, $t = 1$ s).

L'Hy affiche deux bandes d'émission à 594 et 650 nm (**Figure 3.17 (a)**) pour la forme libre (DMSO) et encapsulée dans les nanocapsules lipidiques dans l'eau. Un petit shift de 3 nm dans le spectre d'émission est dû à l'effet du solvant (DMSO et solution aqueuse). Ces résultats suggèrent que l'encapsulation de l'hypéricine dans les nanocapsules favorise sa solubilisation et le profil de fluorescence montre que la molécule encapsulée est sous forme monomérique [12].

Les spectres d'émission des NCL25-PPIX et de la PPIX libre sont représentés dans la **Figure 3.17 (b)**. L'apparition du pic à 670 nm pour la molécule solubilisée dans le DMSO est due à la photo-

oxydation de la PPIX en formant des sous-produits (photo-protoporphyrine IX) qui émettent à cette longueur d'onde [42, 43]. Le profil de fluorescence de la PPIX encapsulée dans les nanocapsules lipidiques (NCL25-PPIX) montre que l'encapsulation du PS favorise sa protection de la photo-dégradation, puisque le spectre d'émission affiche les deux pics de fluorescence classiques de la PPIX (à 635 et 700 nm) (**Figure 3.17 (b)**). Cependant, l'observation d'un faible pic à 670 nm montre quand même la présence de photo-produit. Ceci peut traduire une faible photo-oxydation du PS même lorsqu'il est dans les NCL, ou bien c'est le fruit de la réaction de synthèse de la PPIX dans le produit initial (la pureté du composé n'est pas à 100 %).

L'analyse du spectre de fluorescence des nanocapsules encapsulant les deux PS montre une addition des profils d'émissions des NCL25-Hy et NCL25-PPIX. Il n'y a pas de pics additionnels détectés dans le mélange des PS (**Figure 3.17 (c)**). Ces résultats sont en accord avec les spectres d'absorption obtenus par analyse UV-visible des nanocapsules lipidiques chargées en PS qui permettent de préserver la structure des molécules encapsulées tout en gardant leurs propriétés d'absorption et de fluorescence intactes.

3. Génération d'oxygène singulet :

La quantité d'oxygène singulet généré peut être déterminée quantitativement en utilisant le p-nitrosodiméthylaniline (RNO). Cette méthode est basée sur le « blanchiment » du RNO induit par réaction spécifique entre l'oxygène singulet et l'imidazole. La formation de l'oxygène singulet est mesurée par suivi de la diminution de l'absorbance à 440 nm.

Les nanocapsules lipidiques chargées en PS à 0,5 μM ont été irradiées en fonction du temps. La quantité d'oxygène singulet produite (Δ -Absorbance à 440 nm) par les NCL25-PS après 10 minutes d'irradiation est représentée dans la **Figure 3.18 (b)**. Comme le montre la **Figure 3.18 (a)**, la quantité d'oxygène singulet augmente avec le temps d'irradiation pour toutes les formulations testées.

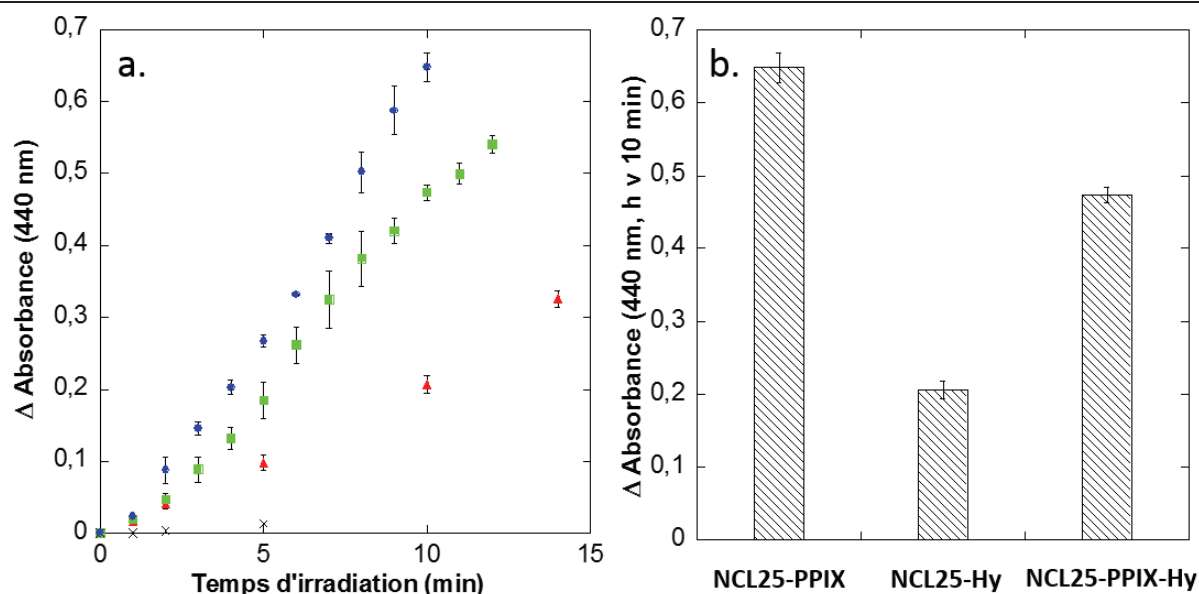


Figure 3.18 – Génération de l'oxygène singulet (Δ -Abs à 440 nm) de NCL25-Hy (0,5 μ M) (triangles en rouge), NCL25-PPIX (0,5 μ M) (cercles en bleu), NCL25-PPIX-Hy (0,5 μ M) (carrés en vert) et PPIX-Hy (1 % DMSO) (croix en noir) dans 50 mM de tampon phosphate (pH 7,4) en fonction du temps d'irradiation (a) et quantité d'oxygène singulet généré (Δ -Abs à 440 nm) par chaque formulation de NCL25-PS après 10 minutes d'irradiation (b).

Les nanocapsules chargées en PPIX affichent une production d'oxygène singulet plus importante comparées aux NCL25-Hy et NCL25-PPIX-Hy à la même concentration en PS. Cependant, la différence avec les nanocapsules chargées avec les deux PS n'est pas vraiment significative. Par ailleurs, les nanocapsules lipidiques NCL25 vides n'induisent pas de formation d'oxygène singulet.

3.1. Rendement quantique de production d'oxygène singulet :

Le rendement quantique de génération de l'oxygène singulet a été estimé en utilisant la méthode comparative avec le Rose Bengale comme référence standard de PS ($\Phi_{RB} = 0,76$) [5].

Comme décrit précédemment, la consommation du RNO par 1O_2 est suivie à 440 nm et les courbes de $\ln(A/A_0)$ en fonction du temps d'irradiation peuvent être ajustées avec la réaction de pseudo premier ordre (Figure 3.19).

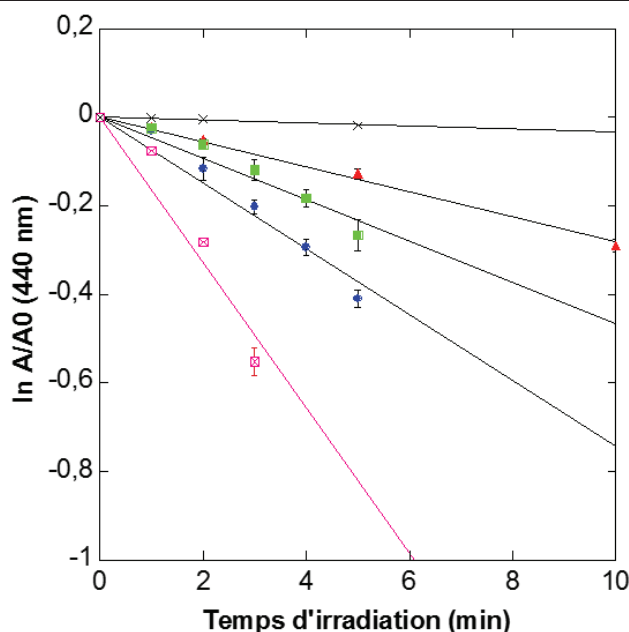


Figure 3.19 – Courbes de pseudo premier ordre de $\ln(A/A_0)$ en fonction du temps d'irradiation de NCL25-Hy (0,5 μM) (triangles rouges), NCL25-PPIX (0,5 μM) (cercles bleus), NCL25-PPIX-Hy (0,5 μM) (carrés verts), PPIX-Hy (1% DMSO) (croix noires) et le Rose Bengale (0,5 μM) (carrés roses) dans 50 mM de tampon phosphate (pH 7,4). Les nanocapsules lipidiques sont dispersées dans de l'eau déionisée.

La vitesse de génération d'oxygène singulet est obtenue à partir de la pente des courbes de pseudo premier ordre. Une courbe similaire correspondant au Rose Bengale comme référence de PS a permis le calcul du rendement quantique de production d' $^1\text{O}_2$ des nanocapsules chargées en PS dans une solution aqueuse en utilisant l'équation :

$$\Phi_{NCL} = \Phi_{RB} \frac{k_{NCL}}{I_{NCL}} \frac{I_{RB}}{k_{RB}}$$

Où : Φ_{RB} correspond au rendement quantique du rose Bengale en solution aqueuse comme référence ($\Phi_{RB} = 0,76$) ; k_{NCL} et k_{RB} sont les constantes de vitesse de la photo-réaction du RNO avec les NCL25-PS et le rose Bengale respectivement ; I_{NCL} et I_{RB} sont les intensités d'absorption de la lumière par les NCL25-PS et le rose Bengale en solution aqueuse, respectivement ; elles sont déterminées par l'intégration des pics d'absorption entre 400 et 700 nm.

Les résultats des calculs sont consignés dans le **Tableau 3.4**. L'estimation quantitative du rendement quantique de génération d'oxygène singulet varie dans l'intervalle de 0,31 – 0,38 pour les trois formulations de nanocapsules chargées en PS.

Formulation	Constante de vitesse k_{obs} (min^{-1})	Rendement quantique Φ
NCL25-Hy	$-0,0290 \pm 0,0014$	$0,38 \pm 0,01$
NCL25-PPIX	$-0,0744 \pm 0,0048$	$0,31 \pm 0,02$
NCL25-PPIX-Hy	$-0,0460 \pm 0,0064$	$0,32 \pm 0,04$
PPIX-Hy	$-0,0037$	$0,03$
RB	$-0,1640 \pm 0,0065$	$0,76$

Tableau 3.4 – Paramètres cinétiques et rendements quantiques d' $^1\text{O}_2$ des NCL25-PS.

4. Etude du photo-blanchiment des NCL25-PS :

Le photo-blanchiment est un phénomène de photo-dégradation du PS sous l'action de la lumière. Il est observé lorsqu'il y a diminution de la fluorescence et/ou de l'absorbance de sensibilisateur dans les cellules ou en solution sans l'apparition de nouveaux pics. *Moan et al.* ont été les premiers à décrire ce phénomène observé en thérapie photodynamique [45].

L'étude du photo-blanchiment des PS encapsulés dans les nanocapsules lipidiques (NCL25-Hy, NCL25-PPIX et NCL25-PPIX-Hy) a été réalisée par spectrophotométrie UV-Vis.

Les nanocapsules chargées en PS à 5 μM ont été irradiées par la lumière visible (puissance de 0,6 W) au cours du temps (1 heure). Les résultats du photo-blanchiment de la PPIX et de l'Hy sont représentés dans la **Figure 3.20**.

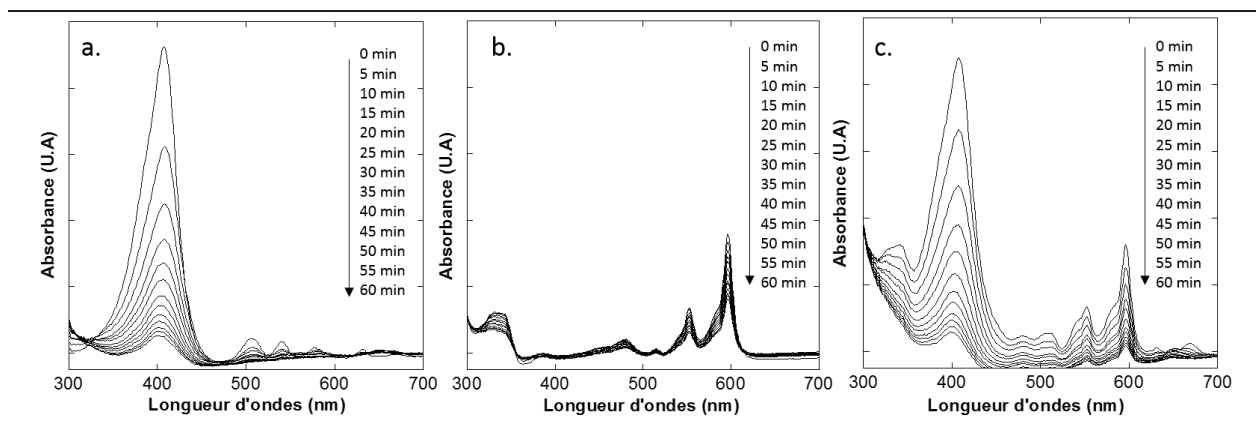


Figure 3.20 – Effet de la photo-irradiation sur le spectre d’absorption des NCL25-PPIX **(a)**, NCL25-Hy **(b)** et NCL25-PPIX-Hy **(c)** à 5 μM de chaque PS dans 50 mM de tampon phosphate en fonction du temps d’irradiation.

Les courbes d’absorbance des nanocapsules encapsulant les PS montrent une diminution continue de l’intensité des pics sous l’effet de l’irradiation, sans l’apparition de nouvelles bandes. L’encapsulation donc de l’hypéricine et de la protoporphyrine IX dans les cœurs huileux des nanocapsules n’inhibe pas leur photo-blanchiment qui est associé souvent à une efficacité du traitement photodynamique. En effet, la photo-dégradation du PS permet d’une part la formation de sous-produits pouvant avoir aussi un effet photosensibilisant [46] et limite la photosensibilité des patients après le traitement photodynamique par élimination de la molécule de l’organisme [47].

La **Figure 3.21** montre les cinétiques de photo-blanchiment de l’hypéricine et de la protoporphyrine IX dans les nanocapsules au cours du temps d’irradiation.

Les vitesses de photo-dégradation de la PPIX encapsulée dans les nanocapsules lipidiques sont plus importantes comparées à la molécule libre solubilisée dans le DMSO (**Figure 3.21 (a)**). Cependant, aucune différence dans la cinétique du photo-blanchiment n’a été notée entre les NCL25-PPIX et les NCL25-PPIX-Hy.

Pour l’hypéricine, le suivi de sa photo-dégradation au cours du temps d’irradiation montre une cinétique plus rapide lorsque la molécule est co-encapsulée avec la protoporphyrine IX dans les nanocapsules lipidiques (**Figure 3.21 (b)**). Cette observation peut être expliquée par le fait que le photo-blanchiment de la PPIX favorise la dégradation de l’hypéricine dans les nanocapsules en

généralisant des ERO sous l'effet de la lumière. En effet, des études ont montré que la photo-dégradation de la protoporphyrine IX entraîne non seulement la diminution de la bande de Soret mais aussi peut induire la formation de photo-produits [48, 49].

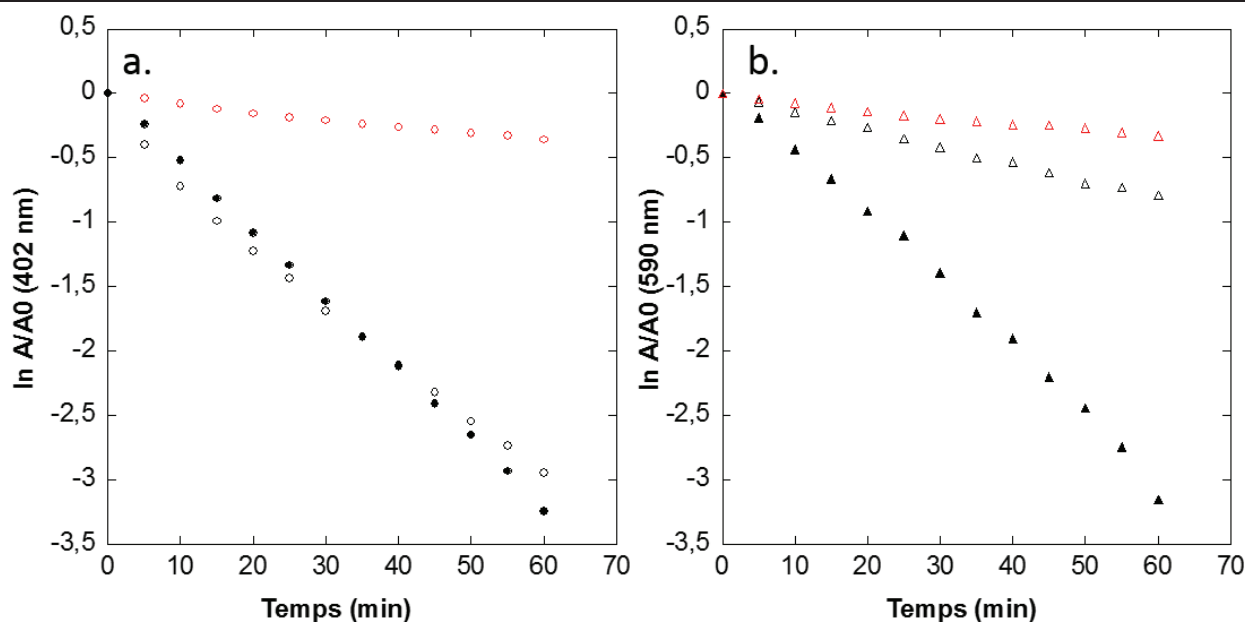


Figure 3.21 – Vitesse de photo-blanchiment correspondant aux pics d'absorption de PPIX à 402 nm (a) et à l'Hy à 590 nm (b) ; cercles rouges : PPIX, cercles vides : NCL25-PPIX, cercles noirs : NCL25-PPIX-Hy, triangles rouges : Hy, triangles vides : NCL25-Hy, triangles noirs : NCL25-PPIX-Hy.

5. Etudes biologiques *in vitro*:

5.1. Photo-toxicité des NCL25-PS:

L'étude de l'effet photodynamique des nanocapsules lipidiques chargées en PS (hypéricine et / ou protoporphyrine IX) *in vitro* a été réalisée sur deux différentes lignées cellulaires : les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et les cellules du cancer de l'utérus HeLa. Le test biochimique de prolifération cellulaire permet l'estimation de la viabilité cellulaire par la transformation des enzymes de cellules vivantes du MTT en composé coloré.

Pour l'étude de la photo-toxicité, les cellules ont été irradiées avec de la lumière visible (puissance de 10 mW) pendant 12 min. La viabilité cellulaire a été estimée comme étant le pourcentage de cellules viables après traitement TDP par rapport au témoin négatif (cellules non traitées).

Dans un premier temps, la toxicité des nanocapsules lipidiques vides (NCL25) a été évaluée avec et sans irradiation sur les cellules MDA-MB-231 et HeLa. La **Figure 3.22** résume les résultats de viabilité cellulaire obtenus pour des concentrations en NCL25 correspondant à celles utilisées en TPD avec les nanocapsules chargées en PS (NCL25-PS).

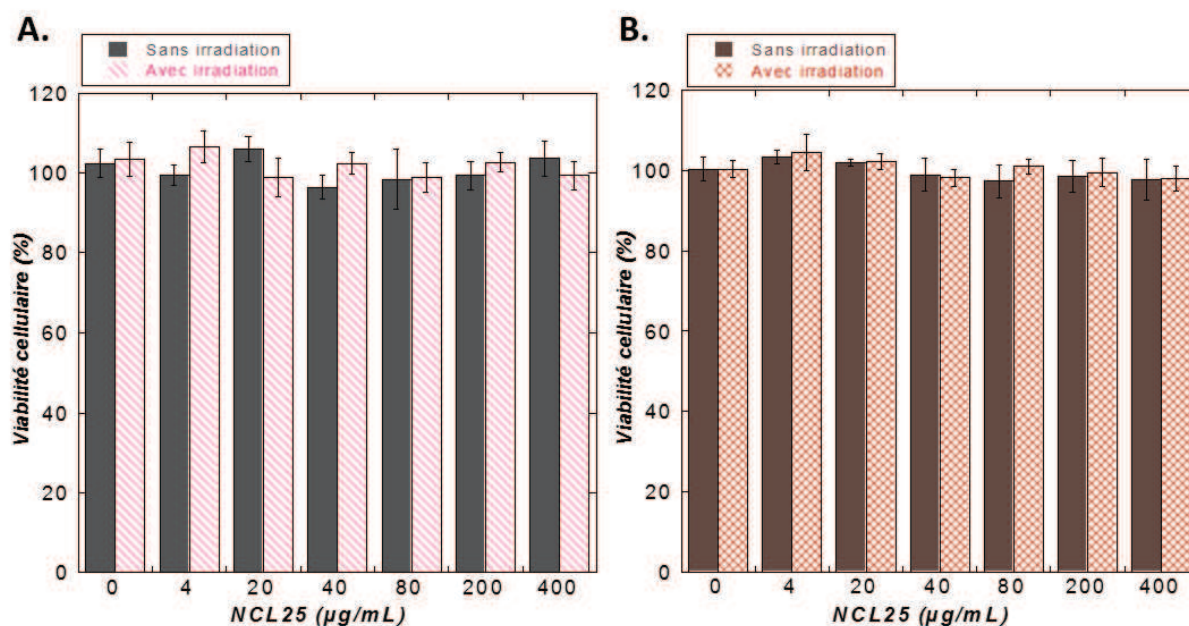


Figure 3.22 : Cytotoxicité des NCL25 vides avec et sans irradiation sur des cellules MDA-MB-231 **(A)** et des cellules HeLa **(B)**.

Les deux types de cellules affichent une viabilité cellulaire de presque 100 %. Les nanocapsules vides n'induisent donc aucune toxicité *in vitro* avec et sans lumière après une incubation de 8 heures. Cette première observation est un atout pour le développement d'un nano-système pour la thérapie photodynamique. Il est important toutefois de noter que la lumière visible ne semble pas induire de cytotoxicité.

L'évaluation du potentiel photodynamique des nanocapsules lipidiques chargées en PS a été déterminée en incubant les cellules 8 heures en présence des NCL25-Hy, NCL25-PPIX et NCL25-PPIX-Hy à des concentrations en PS allant de 0,01 à 1 µM. Les cellules ont été irradiées pendant 12 min par la lumière visible et maintenues en culture pendant 16 heures à 37°C.

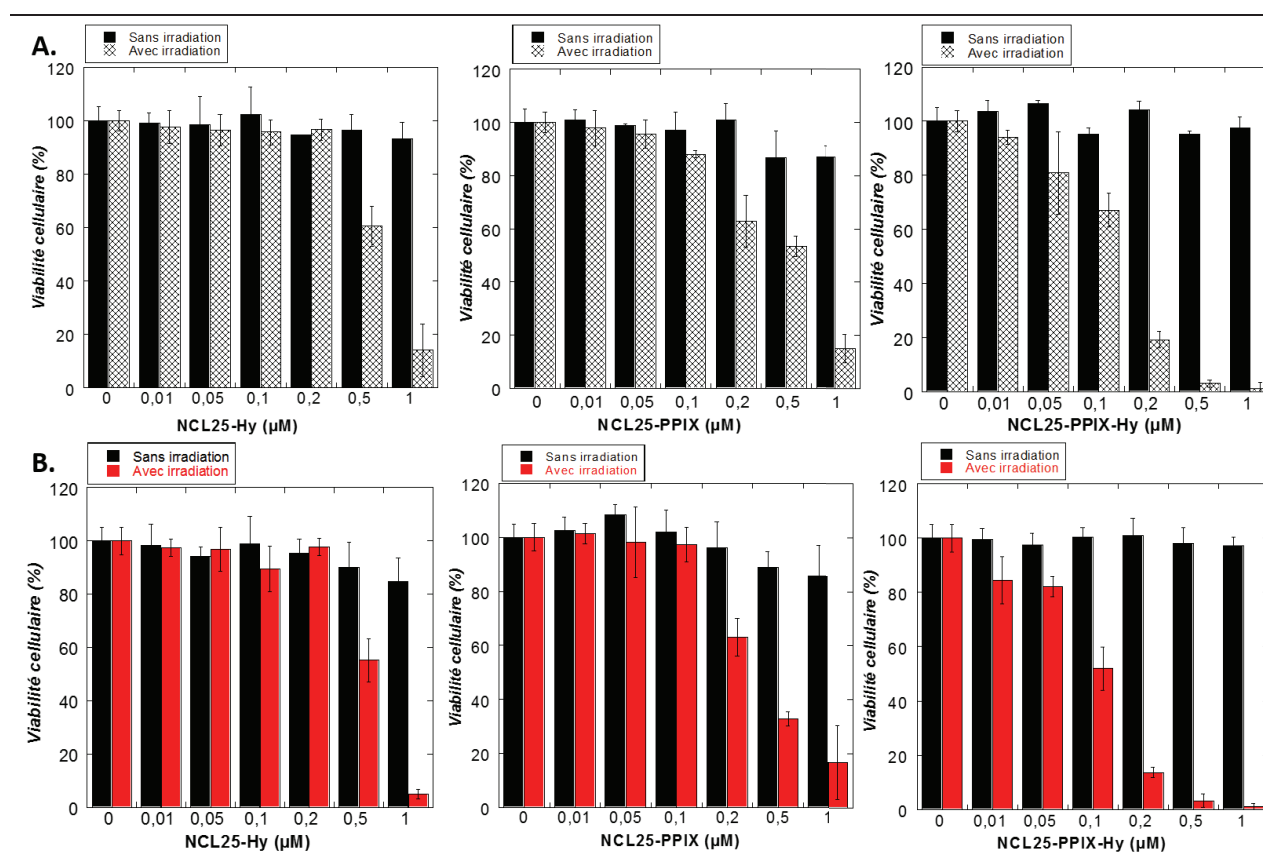


Figure 3.23 : Cytotoxicité avec et sans irradiation des NCL25-PS sur les cellules HeLa (A) et cellules MDA-MB-231 (B).

Les résultats du test MTT montrent que la viabilité des cellules incubées avec les NCL25-PS non irradiées était supérieure à 95 % pour toutes les formulations, à l'exception d'une faible cytotoxicité observée pour les nanocapsules chargées en PPIX aux concentrations de 0,5 et 1 μM (viabilité de 85 %) (**Figure 3.23**). En outre, la co-encapsulation de l'Hy et la PPIX dans les nanocapsules lipidiques réduit la cytotoxicité des PS (sans irradiation) puisque les cellules affichent une viabilité de presque 100 % pour toutes les concentrations testées.

Pour les tests de photo-toxicité, les résultats de viabilité *in vitro* des cellules HeLa et MDA-MB-231 ont montré une évolution de la mort cellulaire dépendant de la dose en PS. Les nanocapsules lipidiques chargées en hypericine (NCL25-Hy) ou en protoporphyrine IX (NCL25-PPIX) affichent

un effet photodynamique très comparable sur les deux lignées cellulaires. En effet, les IC_{50} observés avec les NCL25-Hy sont de 0,62 et 0,56 μM sur les cellules HeLa et MDA-MB-231, respectivement. Pour les NCL25-PPIX, les valeurs des IC_{50} sont de 0,55 μM sur les cellules HeLa et de 0,50 μM sur les cellules MDA-MB-231.

Cependant, les nanocapsules co-chargées en Hy et PPIX ont montré une photo-toxicité nettement plus élevée que pour les nanocapsules encapsulant un seul type de PS sur les deux lignées cellulaires. Les valeurs des IC_{50} montrent bien la synergie de l'activité photodynamique des deux molécules PS encapsulées dans les mêmes nanocapsules (0,28 et 0,27 μM sur les cellules HeLa et MDA-MB-231 respectivement).

L'étude du traitement photodynamique a été aussi testé pour les agents photosensibilisants libres (1 % de DMSO) *in vitro* sur les cellules HeLa et les cellules MDA-MB-231. La **Figure 3.24** montre l'efficacité des PS (Hy et PPIX) dans l'inhibition de la prolifération des cellules à partir d'une certaine concentration après irradiation avec la lumière visible (10 mW pendant 12 min). Une synergie d'effet photodynamique est observée quand les deux types de molécules sont incubés simultanément avec les cellules.

Les valeurs des IC_{50} sont comparables pour les PS encapsulés (NCL25-PS) et libres en solution. En effet, les nanocapsules chargées avec les deux PS présentent par exemple un IC_{50} de 0,27 μM sur les cellules MDA-MB-231, contre 0,26 μM pour les PS libres. Toutefois, une cytotoxicité des photosensibilisateurs est observée à partir de 0,2 μM dans les conditions de non irradiation sur les deux lignées cellulaires (l'hypéricine et la PPIX affichent une viabilité cellulaire de 85 % sur les cellules HeLa contre 97 % pour les NCL25-PPIX-Hy à la même concentration de 1 μM). L'encapsulation des PS dans les nanocapsules lipidiques permet ainsi d'éviter leur problème de toxicité lié à un effet de dose qui est la dose létale dans le cadre de la thérapie photodynamique.

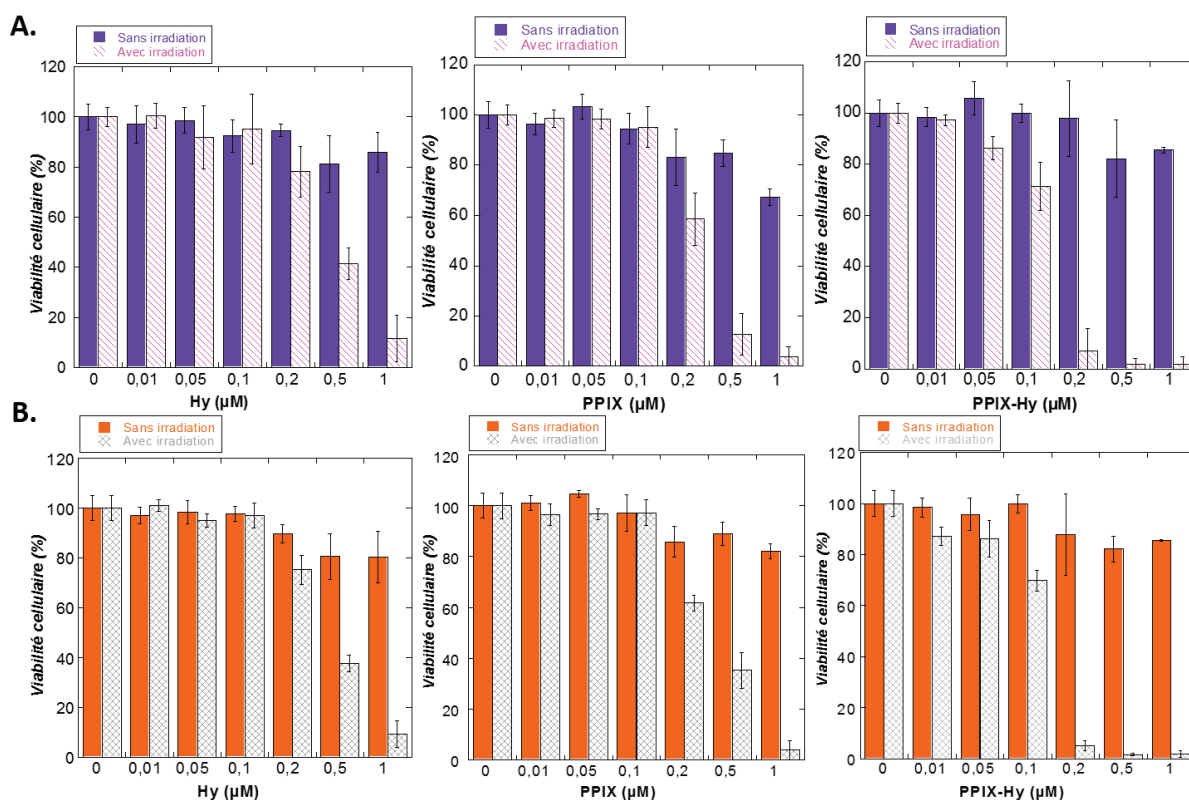


Figure 3.24 : Cytotoxicité avec et sans irradiation des PS libres (1 % DMSO) sur les cellules HeLa (A) et les cellules MDA-MB-231 (B).

5.2. Analyse du cycle cellulaire de l'ADN:

Le cycle cellulaire comprend les différentes phases de croissance d'une cellule : la réplication de l'ADN, la distribution des chromosomes dupliqués aux cellules filles et la division cellulaire. Il existe donc quatre phases hautement coordonnées : M (mitose), G₁, S et G₂ (**Figure 3.25**).

Dans la plupart des cellules, la coordination entre les différentes phases du cycle cellulaire est dépendante d'un système de points de contrôle qui empêchent l'entrée dans la phase suivante du cycle de la cellule jusqu'à ce que les événements de l'étape précédente aient été accomplis.

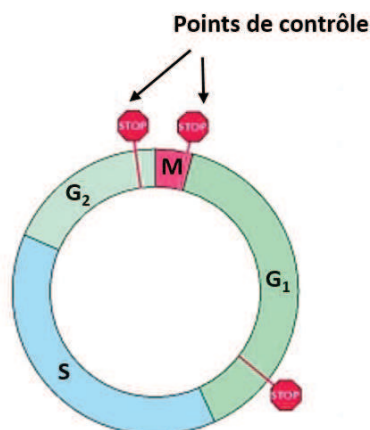


Figure 3.25 : Les phases du cycle cellulaire d'une cellule eucaryote (d'après [50]).

Les cellules à différents stades du cycle cellulaire peuvent être distinguées par leur teneur en ADN. Expérimentalement, la quantité d'ADN cellulaire peut être déterminée par incubation des cellules avec un colorant fluorescent qui se lie à l'ADN, suivie d'une analyse de l'intensité de fluorescence des cellules individuelles par un cytomètre de flux, en distinguant ainsi les cellules en G₁, S, G₂ et M du cycle.

L'effet de nanocapsules lipidiques chargées en hypericine ou/et protoporphyrine IX sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 et HeLa a été évalué par cytométrie de flux.

Les cellules ont été incubées avec les NCL25-PS à la même concentration de 0,5 μ M. Après irradiation des plaques (12 minutes à 10 mW), les cellules sont analysées par FACS, deux heures post-TPD. L'analyse cytométrique permet d'obtenir le pourcentage de cellules à chaque phase du cycle : G₀ – G₁, S et G₂ – M (**Figure 3.26**).

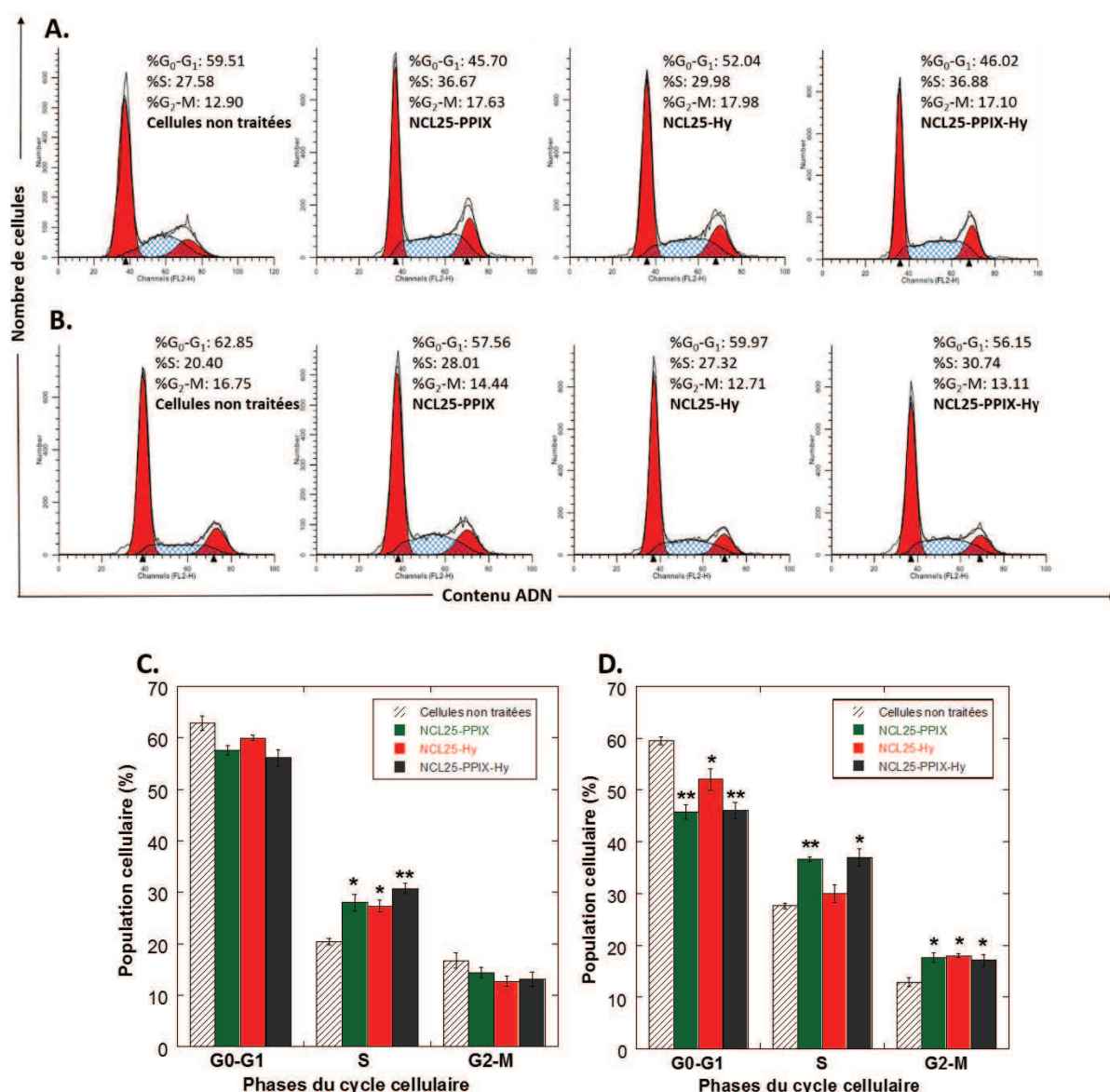


Figure 3.26 – Analyse de l’ADN par cytométrie de flux des cellules MDA-MB-231 (A) et des cellules HeLa (B) ; le pourcentage des cellules en phase G₀ – G₁, S et G₂ – M est représenté pour les cellules HeLa (C) et les cellules MDA (D). Différence statistique par rapport aux cellules non traitées : *p < 0,05 ; **p < 0,01.

L’étude du cycle cellulaire a montré que le traitement photodynamique des cellules avec les nanocapsules chargées en PS avait un effet sur le cycle de l’ADN intracellulaire. Les NCL25-PS induisent une augmentation de population cellulaire en phase S accompagnée d’une diminution de la population G₀ – G₁ pour les deux lignées étudiées (MDA-MB-231 et HeLa).

Par ailleurs, les cellules HeLa affichent une faible diminution de la phase G₂ – M suggérant un arrêt de la phase S du cycle cellulaire en bloquant la transition de S vers G₂ – M et la mitose. La phase S est la phase de synthèse d'ADN, son arrêt va favoriser l'apoptose des cellules. Ces résultats ont été obtenus avec un PS porphyrrique (DTPP) sur une lignée murine d'adénocarcinomes du poumon (LA795) [51]. Les cellules MDA-MB-231 affichent une accumulation de cellules en phase G₂ – M (**Figure 3.26**). Cette observation a été rapportée par *Sackova et al.* [52] dans l'étude de l'effet TPD de l'hypéricine sur des cellules humaines du cancer du côlon.

Il existe deux stades de transformation importants dans le cycle cellulaire, G₁/S et G₂/M, qui ont leurs propres points de contrôle permettant de suivre la progression du cycle [53]. Un grand nombre d'expériences ont montré que de nombreux médicaments anticancéreux pouvaient affecter le cycle cellulaire, probablement par la surexpression de protéines de régulation et d'autres facteurs [51].

La différence dans le profil du cycle cellulaire entre les cellules HeLa et MDA-MB-231 est probablement due à des réponses spécifiques à chaque photosensibilisateur et à chaque type cellulaire. L'étude plus en détails de la régulation du cycle cellulaire pourrait conduire à une meilleure compréhension du mécanisme impliqué dans l'action antinéoplasique (bloquant la division des cellules) de la TPD.

5.3. Localisation intracellulaire des NCL25-PS :

L'étude de la localisation intracellulaire des PS, le plus souvent par les techniques de microscopie confocale et de fluorescence, se fait en utilisant leurs propriétés de fluorescence caractéristiques à chaque type de molécule. La localisation d'un PS dans les cellules dépend de plusieurs paramètres notamment ses caractéristiques physico-chimiques, sa concentration mais aussi de la durée d'incubation avec les cellules [54].

Afin de comprendre d'avantage le mécanisme de la synergie de l'effet TPD, la localisation intracellulaire des NCL25 chargées en PS a été étudiée par microscopie à fluorescence sur deux lignées cellulaires (HeLa et MDA-MB-231).

Après traitement des cellules avec les nanocapsules chargées en PS à 1 µM pendant 2 h et 6 h, les échantillons ont été observés avec un vidéo microscope équipé de filtres de fluorescence appropriés.

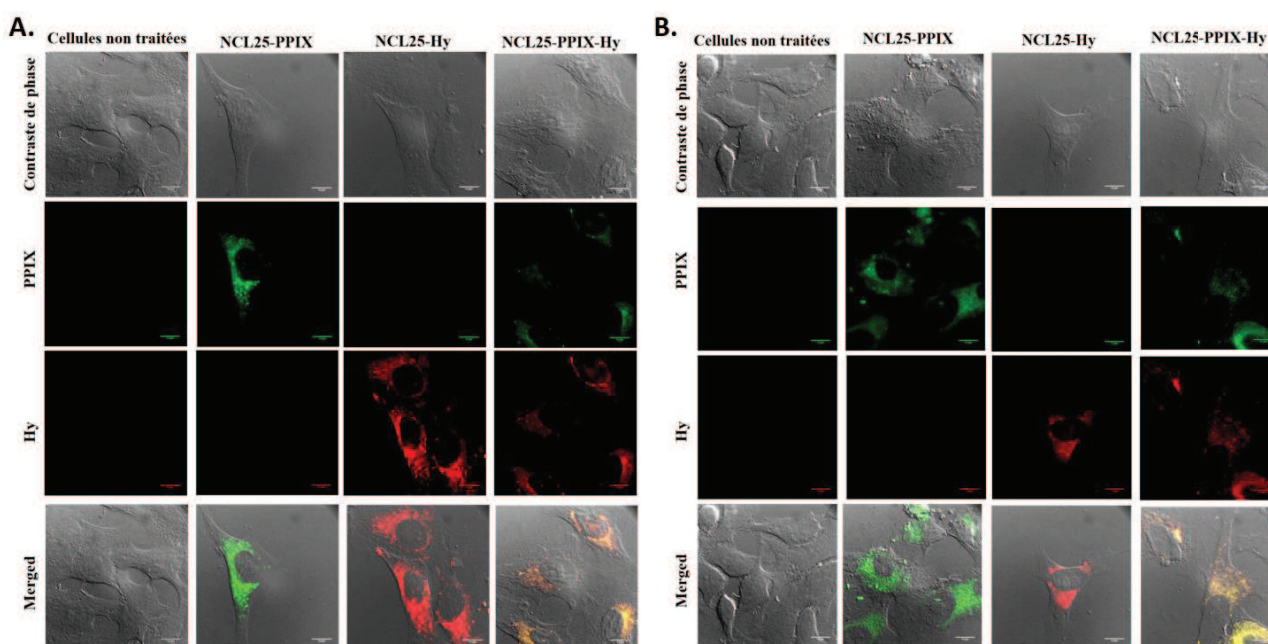


Figure 3.27 : Localisation intracellulaire des NCL25-PS (1 μ M) après 2 h **(A)** et 6 h **(B)** d'incubation avec les cellules HeLa. Le grossissement de l'objectif est 100 X. L'échelle représente 10 μ m.

La **Figure 3.27** montre la fluorescence de la PPIX (couleur verte) et Hy (couleur rouge) dans le cytoplasme des cellules HeLa après 2 heures **(A)** et 6 heures **(B)** d'incubation. Il semblerait que les nanocapsules chargées avec un seul PS (NCL25-Hy et NCL25-PPIX) se localisent dans tous les organites intracellulaires présents dans le cytoplasme. Pour les nanocapsules encapsulant les deux PS, une superposition de la fluorescence des 2 PS est observée. En plus de la localisation cytoplasmique, la fluorescence des PS s'intensifie dans des régions intracellulaires (vésicules plus brillantes). Cette observation peut être due à la présence de vésicules d'endocytose véhiculant les nanocapsules lipidiques chargées en PS.

Barras et al. [12] ont étudié la localisation intracellulaire de l'hypéricine libre et encapsulée dans les NCL dans les cellules HeLa. Les résultats ont montré que l'hypéricine libre se localisait dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries après 5 heures d'incubation. Le mécanisme d'internalisation est régi par un phénomène de diffusion à travers les membranes cellulaires. Pour les nanocapsules lipidiques chargées en Hy, l'étude par marquage fluorescent des organites cellulaires a montré que les NCL se localisaient plus dans le réticulum endoplasmique que les

mitochondries. La présence de vésicules souligne le mécanisme d'endocytose, déjà observé dans d'autres études [55, 56], pour la pénétration des nanocapsules.

La même étude de localisation intracellulaire avec les nanocapsules chargées en PS a été réalisée sur les cellules du cancer du sein MDA-MB-231. L'observation microscopique à fluorescence a montré un profil de localisation des PS un peu différent que celui obtenu avec les cellules HeLa.

La **Figure 3.28 (A)** affiche les images des cellules incubées avec les différentes formulations de nanocapsules encapsulant les PS (NCL25-PPIX, NCL25-Hy et NCL25-PPIX-Hy) après 2 heures d'incubation. On remarque une plus faible intensité de fluorescence correspondant aux deux PS (verte et rouge pour la PPIX et l'Hy, respectivement) et une superposition des deux fluorescences pour les nanocapsules chargées avec les deux PS. Ces résultats suggèrent qu'après deux heures d'incubation, on observe une internalisation des NCL25-PS qui gardent encore les deux types de PS encapsulés. La présence de vésicules (probablement d'endocytose) confirme ces résultats.

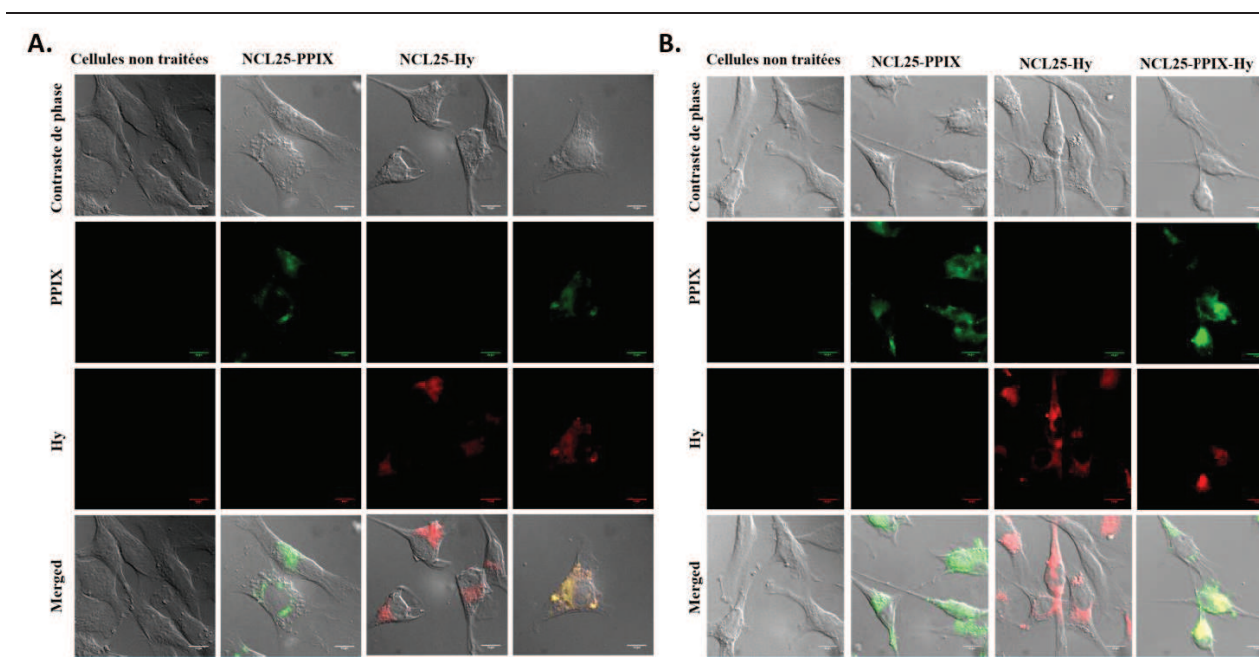


Figure 3.28 : Localisation intracellulaire des NCL25-PS (1 μ M) après 2 h **(A)** et 6 h **(B)** d'incubation sur les cellules MDA-MB-231. Le grossissement de l'objectif est 100 X. L'échelle représente 10 μ m.

Après 6 heures d'exposition des cellules MDA-MB-231 avec les nanocapsules chargées en PS (**Figure 3.28 (B)**), l'observation par microscopie en fluorescence montre une plus forte intensité

de fluorescence relative à chaque molécule (protoporphyrine IX et hypéricine) indiquant une diffusion des PS dans le cytoplasme cellulaire. D'autre part, les images correspondant aux nanocapsules co-encapsulant l'hypéricine et la PPIX affichent une intensité de fluorescence plus importante pour la PPIX (couleur verte). Cette observation montre un relargage plus rapide de la protoporphyrine IX des nanocapsules comparé à l'hypéricine.

Les PS hydrophobes ont une affinité importante pour les membranes cellulaires à travers lesquelles ils peuvent diffuser passivement mais aussi les membranes des organites présentes dans les cellules telles que les mitochondries, le réticulum endoplasmique. En effet, *Kleemann et al.* [57], ont montré que l'hypéricine se localisait dans les membranes du réticulum endoplasmique, mitochondries, et les lysosomes des cellules du mélanome.

Un autre phénomène a été rapporté dans la littérature évoquant la relocalisation des PS pendant d'irradiation. *Ruck et al.* [58], ont montré qu'un phénomène de redistribution de certains photosensibilisateurs pouvait se produire après l'irradiation des molécules impliquant la localisation dans des sites secondaires.

6. Conclusion:

Dans cette étude nous avons démontré le potentiel photodynamique des nanocapsules lipidiques chargées en agents photosensibilisants *in vitro*.

La méthode de formulation utilisée permet l'obtention de nanocapsules stables de taille nanométrique (autour de 25 nm) encapsulant les molécules PS hydrophobes avec un rendement élevé. L'incorporation de l'hypéricine et de la protoporphyrine IX permet leur protection des phénomènes d'agrégation et de dégradation et garder leurs caractéristiques spectroscopiques intactes.

L'estimation quantitative du rendement quantique de génération d'oxygène singulet a permis de confirmer que les nanocapsules lipidiques étaient une excellente alternative de solubilisation des PS hydrophobes.

Enfin, les tests biologiques *in vitro* réalisés sur deux lignées cancéreuses humaines (HeLa et MDA-MB-231) ont montré un réel effet de synergie de l'activité photodynamique des deux types de PS encapsulés dans les mêmes nano-vecteurs. La compréhension des mécanismes impliqués dans ce phénomène reste encore incomplète, notamment avec les résultats obtenus après l'étude du cycle cellulaire et la localisation intracellulaire des PS.

Références bibliographiques:

1. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. Cancer Res, 1978. **38**(8): p. 2628-35.
2. Miller, J.D., et al., *Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **224**(3): p. 290-9.
3. Master, A., et al., *Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges*. J Control Release, 2013. **168**(1): p. 88-102.
4. Weiss, R.B., et al., *Hypersensitivity reactions from taxol*. J Clin Oncol, 1990. **8**(7): p. 1263-8.
5. DeRosa, M.C., et al., *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chem Rev, 2002. **233-234**: p. 351-371.
6. Fakhar-e-Alam, M., et al., *Sensitivity of A-549 human lung cancer cells to nanoporous zinc oxide conjugated with Photofrin*. Lasers Med Sci, 2012. **27**(3): p. 607-14.
7. Yin, M., et al., *Photosensitizer-incorporated G-quadruplex DNA-functionalized magnetofluorescent nanoparticles for targeted magnetic resonance/fluorescence multimodal imaging and subsequent photodynamic therapy of cancer*. Chem Commun (Camb), 2012. **48**(52): p. 6556-8.
8. Simon, V., et al., *Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with in vitro tumor cell lines and in vivo mouse models of human cancers*. Photochem Photobiol, 2010. **86**(1): p. 213-22.
9. Hu, Z., et al., *Meso-tetra (carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) nanoparticles were internalized by SW480 cells by a clathrin-mediated endocytosis pathway to induce high photocytotoxicity*. Biomed Pharmacother, 2009. **63**(2): p. 155-64.
10. Brevet, D., et al., *Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy*. Chem Commun (Camb), 2009(12): p. 1475-7.
11. Zhao, L., et al., *Self-assembled photosensitizer-conjugated nanoparticles for targeted photodynamic therapy*. J Biomater Appl, 2013. **28**(3): p. 434-47.
12. Barras, A., et al., *Hypericin-loaded lipid nanocapsules for photodynamic cancer therapy in vitro*. Nanoscale, 2013. **5**(21): p. 10562-72.
13. Castano, A.P., et al., *Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2004. **1**(4): p. 279-293.
14. Geze, M., et al., *Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications*. J Photochem Photobiol B, 1993. **20**(1): p. 23-35.
15. Berg, K., et al., *Lysosomes as photochemical targets*. Int J Cancer, 1994. **59**(6): p. 814-22.
16. MacDonald, I.J., et al., *Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives*. Photochem Photobiol, 1999. **70**(5): p. 789-97.
17. Morgan, J., et al., *Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **49**(1-2): p. 71-86.
18. Rashid, F., et al., *Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches*. Histochemistry, 1990. **94**(3): p. 303-8.
19. Teiten, M.H., et al., *Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells*. Br J Cancer, 2003. **88**(1): p. 146-52.
20. Panzarini, E., et al., *Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy*. Int J Photoenergy, 2011. **2011**: p. 1-11.

21. Castano, A.P., et al., *Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2005. **2**(1): p. 1-23.
22. Plaetzer, K., et al., *Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT*. Photochem Photobiol Sci, 2002. **1**(3): p. 172-7.
23. Kessel, D., et al., *Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME)*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(1): p. 94-6.
24. Mroz, P., et al., *Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer*. Cancers (Basel), 2011. **3**(2): p. 2516-39.
25. Mathew, R., et al., *Role of autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 961-7.
26. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(4): p. 250-81.
27. Reiners, J.J., Jr., et al., *Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy*. Autophagy, 2010. **6**(1): p. 7-18.
28. Castano, A.P., et al., *Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2005. **2**(2): p. 91-106.
29. Fingar, V.H., et al., *The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response*. Photochem Photobiol, 1993. **58**(2): p. 251-8.
30. Canti, G., et al., *Immunopharmacology studies on photosensitizers used in Photodynamic therapy (PDT)*, 1994. Doi:10.1117/12.168663.
31. Wei, X.Q., et al., *Synergistic anticancer activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in combination with low-dose cisplatin on Hela cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(5): p. 3023-8.
32. Torres, T., et al., *Photodynamic therapy as adjunctive therapy for morpheaform basal cell carcinoma*. Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat, 2011. **20**(1): p. 23-5.
33. Bai, D., et al., *Hypocrellin B-encapsulated nanoparticle-mediated rev-caspase-3 gene transfection and photodynamic therapy on tumor cells*. Eur J Pharmacol, 2011. **650**(2-3): p. 496-500.
34. Kwitniewski, M., et al., *Immunotherapy: a way to improve the therapeutic outcome of photodynamic therapy?* Photochem Photobiol Sci, 2008. **7**(9): p. 1011-7.
35. Acedo, P., et al., *Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1122.
36. Villanueva, A., et al., *A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by combining two different photosensitizers*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(3): p. 295-7.
37. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 875-80.
38. Schneider-Yin, X., et al., *Hypericin and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX induce enhanced phototoxicity in human endometrial cancer cells with non-coherent white light*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009. **6**(1): p. 12-8.
39. Tsai, H.C., et al., *Stimulated release of photosensitizers from graft and diblock micelles for photodynamic therapy*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1827-37.
40. Scolaro, L.M., et al., *Aggregation behavior of protoporphyrin ix in aqueous solutions: Clear evidence of vesicle formation*. J Phys Chem B, 2002. **106**: p. 2453 - 2459.
41. Inamura, I., et al., *Association behavior of protoporphyrin ix in water and aqueous Poly(N-vinylpyrrolidone) solutions. Interaction between protoporphyrin ix and Poly(N-vinylpyrrolidone)*. Bull Chem Soc Jpn, 1991. **64**: p. 2005-2007.

42. Ericson, M.B., et al., *A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution*. Lasers Med Sci, 2003. **18**(1): p. 56-62.
43. Cox, G.S., et al., *Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin ix in solution*. J Am Chem Soc, 1982. **104**: p. 516 - 521.
44. Cox, G.S., et al., *Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX derivatives in aqueous surfactant solutions: product and mechanistic studies*. J Am Chem Soc, 1982. **104**: p. 6930 - 6937.
45. Moan, J., *Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during Photodynamic Therapy*. Cancer Lett, 1986. **33**: p. 45 - 53.
46. Zeng, H., et al., *Monitoring photoproduct formation and photobleaching by fluorescence spectroscopy has the potential to improve PDT dosimetry with a verteporfin-like photosensitizer*. Photochem Photobiol, 2002. **75**(4): p. 398-405.
47. Spikes, J.D., *Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, Photofrin II, tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and uroporphyrin*. Photochem Photobiol, 1992. **55**(6): p. 797-808.
48. Rotomskiene, J., et al., *Light-induced transformations of hematoporphyrin diacetate and hematoporphyrin*. J Photochem Photobiol B, 1988. **2**(3): p. 373-9.
49. Rotomskis, R., et al., *Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy*. J Photochem Photobiol B, 1996. **33**(1): p. 61-7.
50. Cooper, G., *The cell: A molecular approach*. Second edition, 2000. Sinauer Associates.
51. Liu, J., et al., *Effect of DTPP-mediated photodynamic therapy on cell morphology, viability, cell cycle, and cytotoxicity in a murine lung adenocarcinoma cell line*. Lasers Med Sci, 2014. DOI 10.1007/s10103-014-1637-x.
52. Sackova, V., et al., *Hypericin-induced photocytotoxicity is connected with G2/M arrest in HT-29 and S-phase arrest in U937 cells*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(5): p. 1285-91.
53. Shao, J., et al., *Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitizer photocyanine: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest*. Eur J Cancer, 2012. **48**(13): p. 2086-96.
54. Rosenkranz, A.A., et al., *Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(4): p. 452-64.
55. Roger, E., et al., *Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis*. J Control Release, 2009. **140**(2): p. 174-81.
56. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7542-54.
57. Kleemann, B., et al., *St John's Wort (Hypericum perforatum L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103762.
58. Ruck, A., et al., *Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers*. J Photochem Photobiol B, 1992. **12**(4): p. 403-12.

Chapitre 4 : Ciblage des canaux ioniques TRPM8 avec les Nanocapsules Lipidiques

A. Introduction bibliographique :

L'étude des mécanismes physiologiques et cellulaires a permis de mieux comprendre le rôle que peuvent jouer les protéines transmembranaires dans le développement de certaines pathologies comme le cancer de la prostate chez l'homme. Parmi ces protéines, les canaux ioniques sont devenus récemment la cible majeure des médicaments. En effet, l'identification de canaux TRP « *Transient Receptor Potential* » impliqués dans la cancérogenèse prostatique a permis de diriger les recherches vers le ciblage des canaux calciques comme nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette revue bibliographique, nous présenterons les canaux ioniques et plus particulièrement les canaux TRP. Les agonistes et antagonistes du canal cationique TRPM8 seront discutés par la suite. Enfin, l'intérêt de l'utilisation des nanoparticules pour l'étude des canaux ioniques sera exposée par les quelques exemples présents dans la littérature.

1. Les canaux ioniques :

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires, présentes chez toutes les cellules ; elles permettent le passage sélectif de certains ions ou molécules à travers les membranes cellulaires. Ce sont des pores de 3 à 5 Å de diamètre permettant le transport rapide des ions entre les milieux intra et extracellulaires, et jouant ainsi un rôle important dans la physiologie des cellules notamment la transmission de signaux dans le système nerveux, la perception sensorielle, la régulation de l'équilibre osmotique et le pH intracellulaire...

Il existe plusieurs familles de canaux ioniques à ce jour (~ 150 membres). Ils peuvent être sélectifs à un seul ion (par exemple : les canaux sodiques pour l'ion sodium Na⁺), ou pour plusieurs ions à la fois (sodium, calcium, potassium et ion chlorure).

Nous nous sommes intéressés, dans ce chapitre, à une classe en particulier de canaux ioniques appelées les canaux TRP « *Transient Receptor Potential* » et précisément aux canaux TRPM8 en raison de leurs rôles dans la cancérogenèse de la prostate.

1.1. La superfamille des canaux TRP :

Les canaux TRP sont une classe importante des canaux ioniques, ils sont caractérisés par une structure commune et une perméabilité aux cations monovalents et ions calcium (Ca^{2+}). Ils peuvent être classés en 7 sous-familles (**Figure 4.1**) :

- TRPC (Canoniques), TRPV (Vanilloïde), TRPM (Mélastatine), TRPN (*no mechanoreceptor potential C*, NOMPC), TRPA (Akyrine), TRPP (Polycystine), TRPML (Mucolipine).

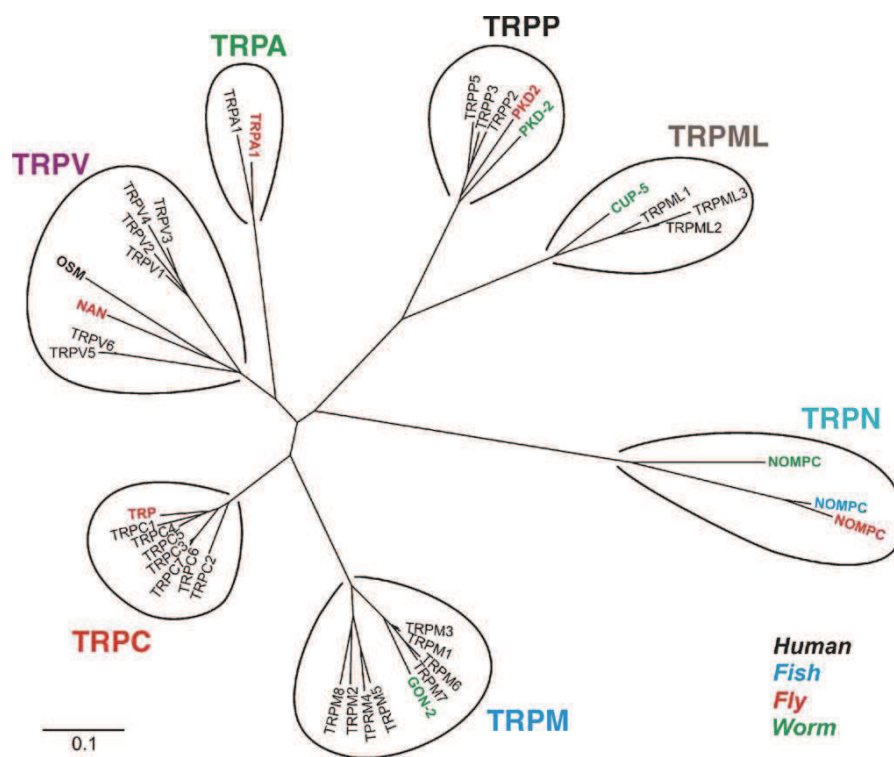


Figure 4.1 – Arbre phylogénétique de la superfamille des canaux TRP [1].

L'organisation générale des canaux TRP est sous forme de tétramères : homotétramères (combinaison de monomères de même type) ou hétérotétramère (combinaison de différents monomères) [2]. Chaque monomère se caractérise par une structure commune. Il possède six segments transmembranaires (S1 à S6) hydrophobes séparés par des boucles hydrophiles (**Figure 4.2**).

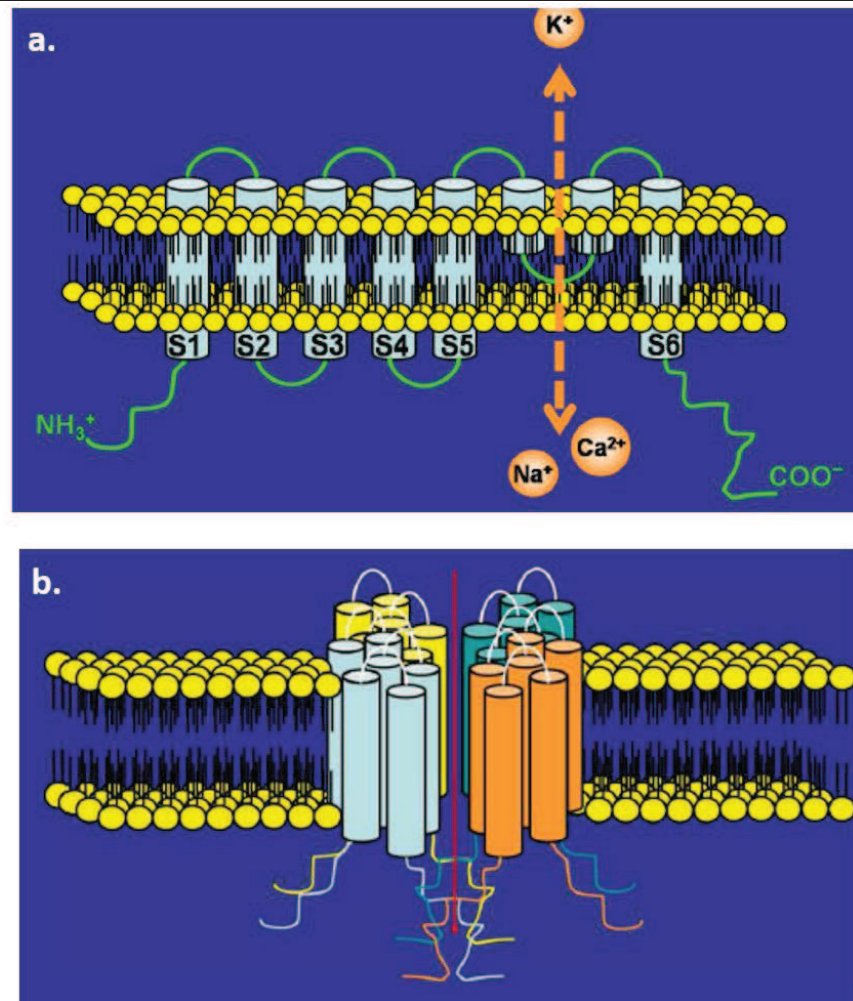


Figure 4.2 : Représentation schématique de la structure des canaux TRP (d'après [3]) . (a) Structure de la sous-unité TRP, (b) association en tétramère des sous-unités TRP.

Les canaux TRP peuvent être activés par plusieurs stimuli y compris des messagers intra et extracellulaires, des stimuli chimiques, physiques ou mécaniques [4]. Des études ont montré l'implication de ces canaux dans divers processus physiologiques importants tels que la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. Cependant, les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux rôles que peuvent jouer les canaux TRP dans certaines pathologies et notamment le cancer.

En effet, *Lehen'hyi et al.* [5] ont démontré que la prolifération et la survie des cellules prostatiques cancéreuses sont favorisées par la surexpression des canaux TRPV6 au cours de la cancérogenèse.

D'autre part, *Tsavalier et al.* ont proposé comme nouveau marqueur du cancer de la prostate, le canal TRPM8, suite à l'observation d'une forte surexpression du gène *trpm8* dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants [6]. Ainsi, le canal ionique TRPM8 semble jouer un rôle crucial dans la physiopathologie du cancer de la prostate et devient donc une nouvelle cible thérapeutique.

1.1.1. Le canal TRPM8 :

Depuis la découverte du gène *trpm8* en 2001 [6], le canal ionique TRPM8, mieux connu sous le nom « récepteur de froid », a été la cible de l'industrie pharmaceutique pour produire des petites molécules agonistes et antagonistes de ce récepteur pour diverses applications thérapeutiques allant du cancer et de troubles urologiques au traitement de l'hypersensibilité au froid et de la douleur [7].

Le canal TRPM8 est un canal cationique non sélectif faisant partie de la grande famille des canaux ioniques TRP thermorécepteurs (**Figure 4.3**). Ce sont des canaux stimulés par une variation de température ou par des molécules mimant une variation de température comme le menthol et la capsaïcine [7].

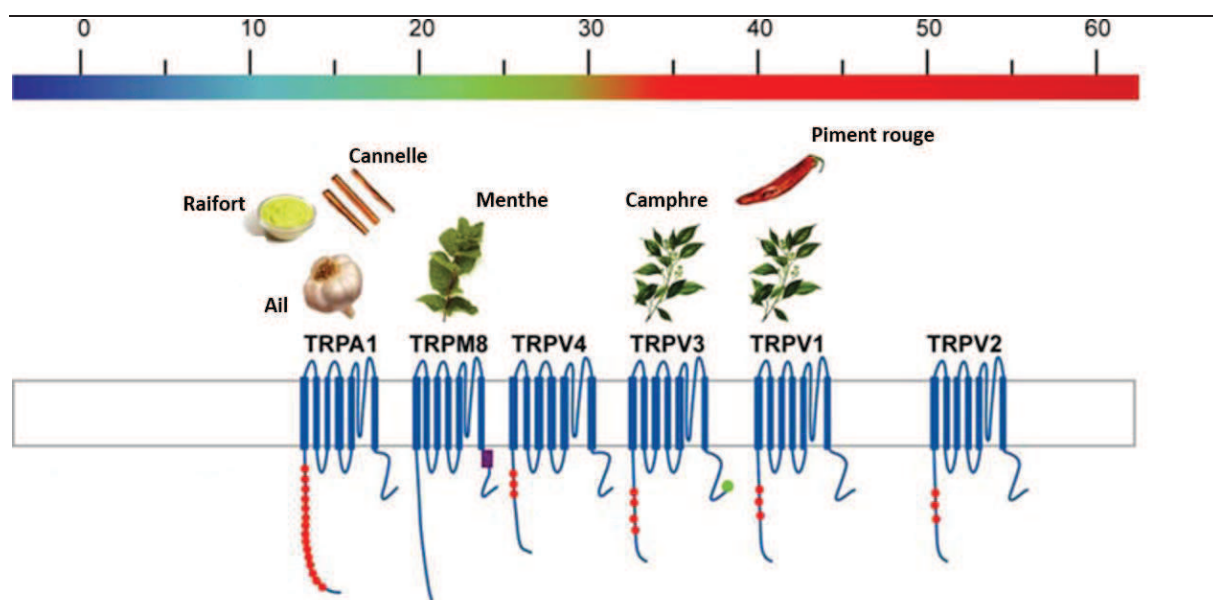


Figure 4.3 : Représentation schématique des canaux « thermorécepteurs » TRP en fonction de leurs températures d'activation [8].

Le canal TRPM8 peut être activé par la température, des agents chimiques (menthol, iciline...), les potentiels de membranes positifs ou encore la signalisation lipidique endogène. Cependant, le mécanisme par lequel ces différents stimuli activent le récepteur est inconnu.

Le canal TRPM8 est une protéine transmembranaire de 1104 résidus dont la structure fonctionnelle se compose d'un homotétramère : 4 hélices transmembranaires S1-S4 contiennent les sites de fixation des agonistes chimiques (menthol, iciline...). Il a été établi après des études de mutagenèse que deux régions sont nécessaires pour avoir un effet pharmacologique du menthol : le domaine transmembranaire S2 et une région du domaine C-terminal appelée la boîte TRP [7].

1.1.2. TRPM8 et le cancer de la prostate :

Les travaux menés par *Tsavalier et al.* [6] ont permis l'identification par analyse d'ADNc du gène *trpm8* (anciennement désigné *trp-p8*) exprimé dans les cellules épithéliales de la prostate normale mais surexprimé dans le tissu tumoral. Ils ont conclu que cette surexpression du gène pourrait jouer un rôle de protection des cellules cancéreuses de l'apoptose.

Zhang et al. [9] ont par la suite montré par des techniques d'immunofluorescence que la protéine TRPM8 était exprimée dans le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique cellulaires. La survie des cellules du cancer de la prostate semble dépendre de l'expression de ce canal. Ces résultats indiquent que le récepteur TRPM8 est un indicateur important de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales de la prostate, et peut être une cible potentielle pour la thérapie du cancer prostatique.

D'autre part, l'expression de TRPM8 dans le tissu de la prostate est régulée par les androgènes. Cependant, des études ont montré que cette expression varie en fonction du stade d'évolution du cancer prostatique. En effet, l'expression du canal cationique est importante dans les cancers de la prostate androgéno-dépendants [6] (stade précoce) et disparaît complètement quand le cancer devient androgéno-indépendant (stade avancé) [10, 11]. Ainsi, l'expression de TRPM8 est considérée comme marqueur de diagnostic pour l'évolution du cancer prostatique [12].

Un certain nombre de petites molécules ont été développées en tant que ligands à haute affinité pour le récepteur TRPM8 pour leurs effets thérapeutiques dans de nombreuses

pathologies telles que le cancer de la prostate, les troubles urologiques, l'hypersensibilité neuropathique associée au froid...

1.1.2.1. Les agonistes :

❖ *Le menthol :*

Le menthol, un produit naturel de la plante de menthe poivrée *Mentha X piperita* (*Lamiaceae*), est un monoterpène cyclique (**Figure 4.4**) obtenu par synthèse ou par extraction de l'huile essentielle de menthe [13].

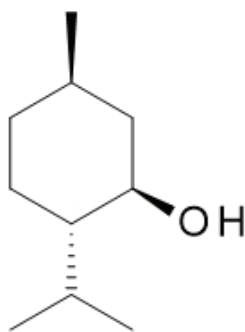


Figure 4.4 – Structure chimique du L-Menthol.

C'est l'un des produits naturels les plus utilisés comme complément, dans les produits cosmétiques, comme arôme ou dans la production d'autres composés. Il possède différentes propriétés biologiques telles que l'activité anti-microbienne, anti-cancéreuse et anti-inflammatoire [14].

Le menthol est bien connu surtout pour son effet de refroidissement, en raison de sa capacité à activer chimiquement le récepteur de sensibilité au froid : le canal de cations TRPM8. C'est l'agoniste classique du TRPM8 qui se lie à ce dernier à un EC_{50} de $66,7 \pm 3,3 \mu M$ dans les ovocytes de *Xenopus* [15] et de $30 \mu M$ dans des cellules CHO transfectées [16] (EC_{50} correspond à la concentration à partir de laquelle il y a 50 % d'efficacité de l'effet). Cependant, cette molécule n'est pas sélective, elle peut activer le canal TRPV3 (EC_{50} de 20 mM), inhiber le canal TRPA1 chez la souris (IC_{50} de $68 \mu M$) [16] et activer TRPA1 humain [17].

Karashima *et al.* [18] ont montré que le menthol pouvait avoir une action bimodale sur l'ARNm TRPA1, activant ce récepteur à faibles concentrations et l'inhibant à fortes concentrations.

Par ailleurs, le menthol est connu pour avoir des effets anesthésiques, analgésiques et anti-irritants qui sont dus à son activité avec le canal TRPM8.

❖ *Les autres agonistes à base de menthane :*

Etant donné que le gène *trpm8* et l'ARNm ont été identifiés à l'origine dans le tissu de la prostate (tissu sain et malade), les ligands TRPM8 ont été étudiés pour leur efficacité dans le traitement du cancer de la prostate et l'hyperplasie bénigne de la prostate.

L'entreprise Dendreon a déposé de nombreux brevets sur les agonistes et antagonistes au canal TRPM8 pour le traitement du cancer de la prostate [19-21].

La réduction *in vivo* du volume de tumeur solide chez les rats injectés avec des cellules CHO/TRPM8 ayant reçu les agonistes à base de menthane **1** et **2**, a été observée (**Figure 4.5**).

D'autre part, le benzimidazole D3263, un agoniste biodisponible par voie orale, a été avancé à la phase I des essais cliniques sur des patients malades, et semble être bien toléré, montrant l'efficacité préliminaire dans la stabilisation du cancer de la prostate chez trois des huit patients traités [22]. Ces agonistes induisent la nécrose ou l'apoptose des cellules CHO/TRPM8 en augmentant l'influx calcique, et inhibent la croissance des tumeurs sous cutanées exprimant les canaux TRPM8.

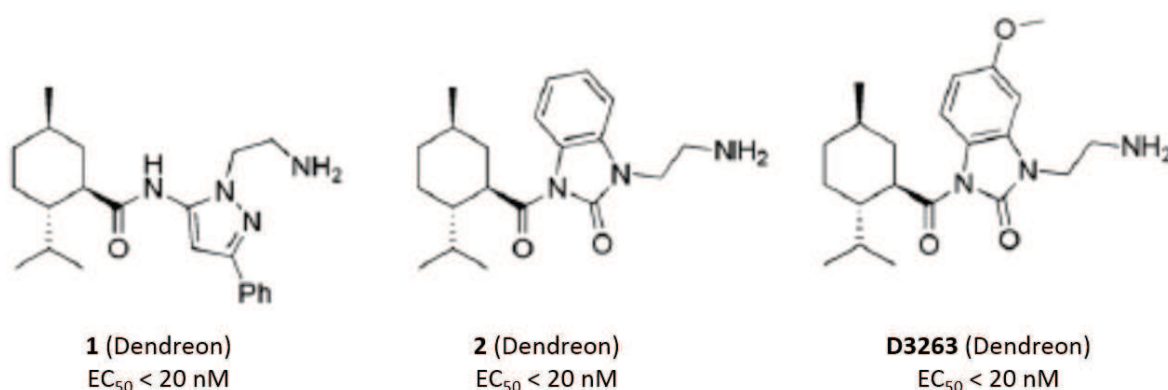


Figure 4.5 : Structures chimiques des agonistes à base de menthane (d'après [7]).

❖ *Iciline :*

L'iciline est caractérisée comme étant un puissant agoniste au canal TRPM8 et agent de refroidissement. Elle affiche une plus grande efficacité que le menthol avec un EC_{50} de 0,36 μ M [23]. Comme le menthol, l'iciline active également le canal TRPA1, cependant elle semble être le seul agoniste TRPM8 dont la structure n'est pas à base de menthane (**Figure 4.6**). La dissemblance entre les structures du menthol et de l'iciline montre que les sites de fixation ou les mécanismes d'activation du récepteur TRPM8 sont différents. De plus, l'activation de TRPM8 par l'iciline est modulée par le pH intracellulaire, qui n'est pas le cas pour le menthol [24].

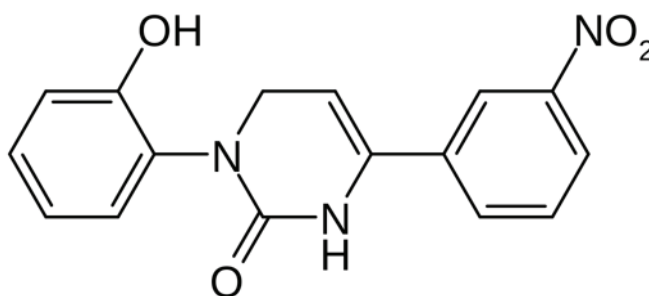


Figure 4.6 : Structure chimique de l'iciline.

1.1.2.2. Les antagonistes :

L'industrie pharmaceutique a entrepris beaucoup d'efforts dans le développement de molécules antagonistes au récepteur TRPM8 pour diverses applications thérapeutiques, notamment la douleur. Plusieurs antagonistes au TRPM8 ont été rapportées par Bayer Healthcare, incluant les dérivés amides d'acide 4-benzyloxy-benzoïque substitué (**Figure 4.7**). Ces composés sont brevetés pour le traitement des troubles urologiques, bien qu'il n'y ait aucune donnée sur l'efficacité *in vivo* de ces molécules contre ces pathologies [7]. Les antagonistes M8-B, AMTB et PBMC ont été utilisés par les chercheurs comme marqueurs pharmacologiques sélectifs au TRPM8 pour mieux comprendre les maladies associées au blocage de ce récepteur.

Almeida et al. ont découvert que la température corporelle est régulée par le canal TRPM8. En utilisant l'antagoniste puissant M8-B, qui inactive les défenses contre le froid, les auteurs ont

montré que le blocage de TRPM8 peut réduire la température corporelle et induire une légère hypothermie. Ils ont en outre émis l'hypothèse que cet effet antagoniste peut être utilisé comme option de traitement des arrêts cardiaques, encéphalopathie néonatale et autres pathologies qui impliquent une élévation de température corporelle [25].

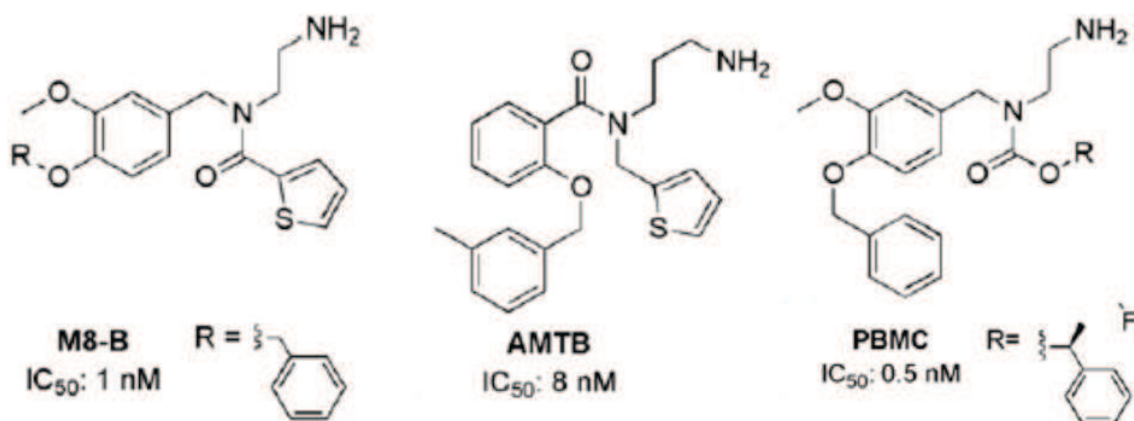


Figure 4.7 : Structures chimiques des antagonistes développés par Bayer (d'après [7]).

D'autre part, *Ortar et al.* ont rapporté une série d'antagonistes à base de menthylamine (**Figure 4.8**). L'affinité et la sélectivité au canal TRPM8 ont été obtenues par greffage des substituants trouvés sur des ligands TRPV1 sur les molécules antagonistes tel que le BCTC [26]. Le composé **1** de la **Figure 4.8**, un antagoniste puissant (IC_{50} de 20 nM) affiche une sélectivité au canal TRPM8 de 80 fois plus que pour le TRPA1, et était significativement plus sélectif au TRPV1.

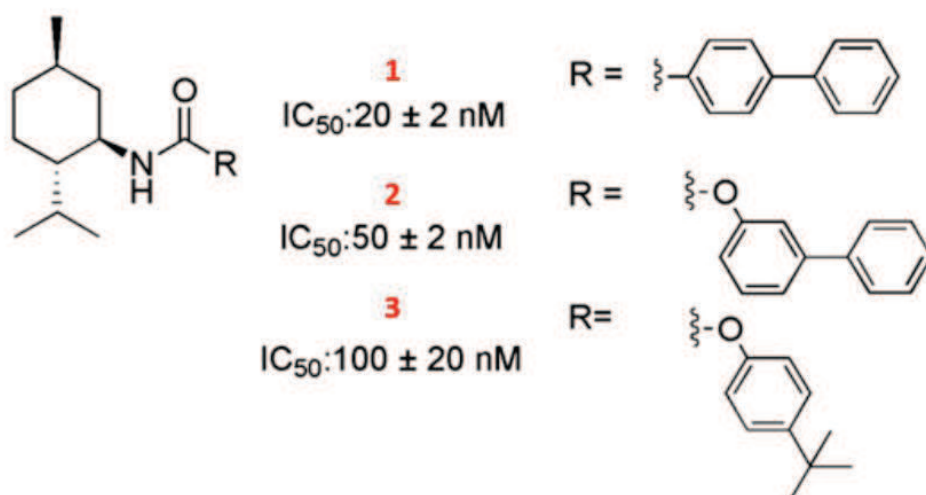


Figure 4.8 : Structures chimiques des antagonistes à base de menthane (d'après [7]).

Comme le montre cette étude bibliographique, de nombreux agonistes et antagonistes du canal TRPM8 puissants et sélectifs ont été développés principalement par l'industrie pharmaceutique. Plusieurs d'entre eux ont été optimisés pour la recherche préclinique comme médicaments potentiels pour diverses pathologies. Cependant, un des défis étant la conception de ligands TRPM8 sélectifs avec une activité spécifique importante (minimiser l'effet sur les autres canaux TRP étroitement liés).

2. Utilisation de nanoparticules pour le ciblage de canaux ioniques :

L'implication des canaux ioniques dans le processus de cancérogenèse dans certaines tumeurs est de plus en plus confirmée par le nombre croissant de publications dans ce sens. La stratégie commune des chercheurs étant l'utilisation de molécules agonistes ou antagonistes à chaque récepteur afin d'étudier les mécanismes par lesquels ces protéines peuvent favoriser la croissance tumorale.

Cependant, l'efficacité thérapeutique nécessite un ciblage spécifique et sélectif du canal impliqué qui reste délicat à réaliser étant donné la ressemblance structurale entre les canaux ioniques. Les nanoparticules peuvent ainsi être une alternative intéressante permettant le ciblage et la vectorisation des agonistes ou antagonistes au canal ionique.

Huang *et al.* [27] ont développé des nanoparticules magnétiques capables de cibler les canaux TRP thermorécepteurs TRPV1. L'approche est basée sur le chauffage des nanoparticules par fréquence radio en champs magnétique générant une augmentation de température capable d'activer les canaux TRPV1 induisant un influx de calcium au travers de la membrane cellulaire (**Figure 4.9**).

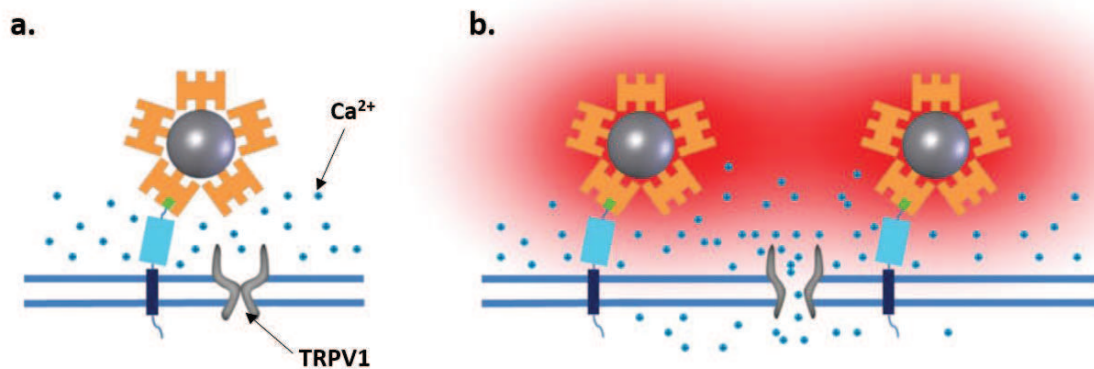


Figure 4.9 : Représentation schématique du principe de l'application de nanoparticules magnétiques pour cibler les canaux TRPV1. (a) en absence de champs magnétique, (b) en présence de champs magnétique (d'après [27]).

Cette approche a été utilisée comme outil puissant pour analyser les connexions neurologiques et la communication cellulaire. Plusieurs groupes ont développé des méthodes pour activer les canaux ioniques par la lumière. Cependant, la profondeur des cellules *in vivo* a limité l'efficacité de tels systèmes activés principalement par la lumière proche de l'UV. Les champs magnétiques pénètrent plus facilement, ce qui rend l'accès aux canaux ioniques une possibilité très excitante.

Par ailleurs, les auteurs proposent l'application de ces nanoparticules magnétiques ciblant les canaux TRP dans le cadre du traitement du cancer par hyperthermie puisque les résultats montrent une concentration locale des nano-objets à la membrane des cellules cibles assez importante pour permettre une élévation de température optimale favorisant l'apoptose des cellules tumorales.

B. Objectifs du travail :

Le projet de recherche présenté dans ce chapitre s'inscrit dans le contexte de développement de plateformes permettant l'étude par ciblage du canal ionique (TRPM8) présent sur les cellules tumorales de la prostate. L'originalité étant l'utilisation de nanoparticules comme vecteurs d'agonistes au récepteur TRPM8 et permettant un ciblage spécifique.

Nous présenterons les résultats préliminaires obtenus avec l'encapsulation de l'agoniste au TRPM8 (le menthol) dans des nanocapsules lipidiques. Les tests biologiques d'internalisation et d'activation des canaux ioniques ont été réalisés *in vitro* par des techniques de microscopie de fluorescence et imagerie calcique.

C. Les nanocapsules lipidiques chargées en menthol :

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, le menthol est l'agoniste classique du canal cationique TRPM8. La première étape était donc la formulation de nanocapsules lipidiques chargées en menthol (**Figure 4.10**). Le processus de formulation est basé sur le principe d'inversion de phases introduit par *Heurtault et al.* [28].

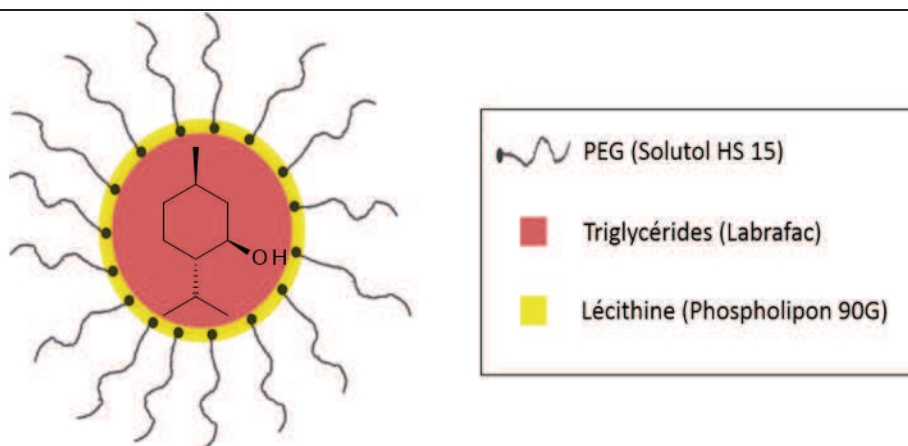


Figure 4.10 : Représentation schématique des nanocapsules lipidiques encapsulant le menthol.

1. Préparation et caractérisation des NCL de menthol :

Des nanocapsules lipidiques (25 nm) encapsulant le menthol à 10 mM ont été formulées et filtrées sur colonne d'exclusion stérique. Les NCL sont ensuite analysées par DDL. Les résultats montrent que le diamètre moyen des NCL chargées en menthol (NCL25-M) est de $25,3 \pm 1,4$ nm et présentent une faible polydispersité ($IP < 0,2$). Ces résultats suggèrent que l'encapsulation du menthol n'induit pas de perturbation de la stabilité physico-chimique des suspensions de nanocapsules. Le potentiel zêta ($-10,8 \pm 0,3$ mV) devient plus négatif comparé aux NCL vides ($-5,1 \pm 1,4$ mV). Ceci peut être expliqué par le fait que le menthol se localiserait à l'interface huile – tensioactifs à l'intérieur des nanocapsules et la présence des groupements hydroxyles du menthol (chargés négativement) aurait une influence sur la charge de surface.

2. Etudes biologiques *in vitro* :

2.1 Microscopie à fluorescence :

Le marquage des nanocapsules contenant le menthol a été réalisé en co-encapsulant simultanément le colorant DiI avec le menthol (NCL25-M-DiI). Les NCL ainsi formulées ont été caractérisées et incubées pendant 4 heures avec des cellules HeLa à 37°C.

Les résultats d'observation des cellules en microscopie à fluorescence sont consignés dans la **Figure 4.11**.

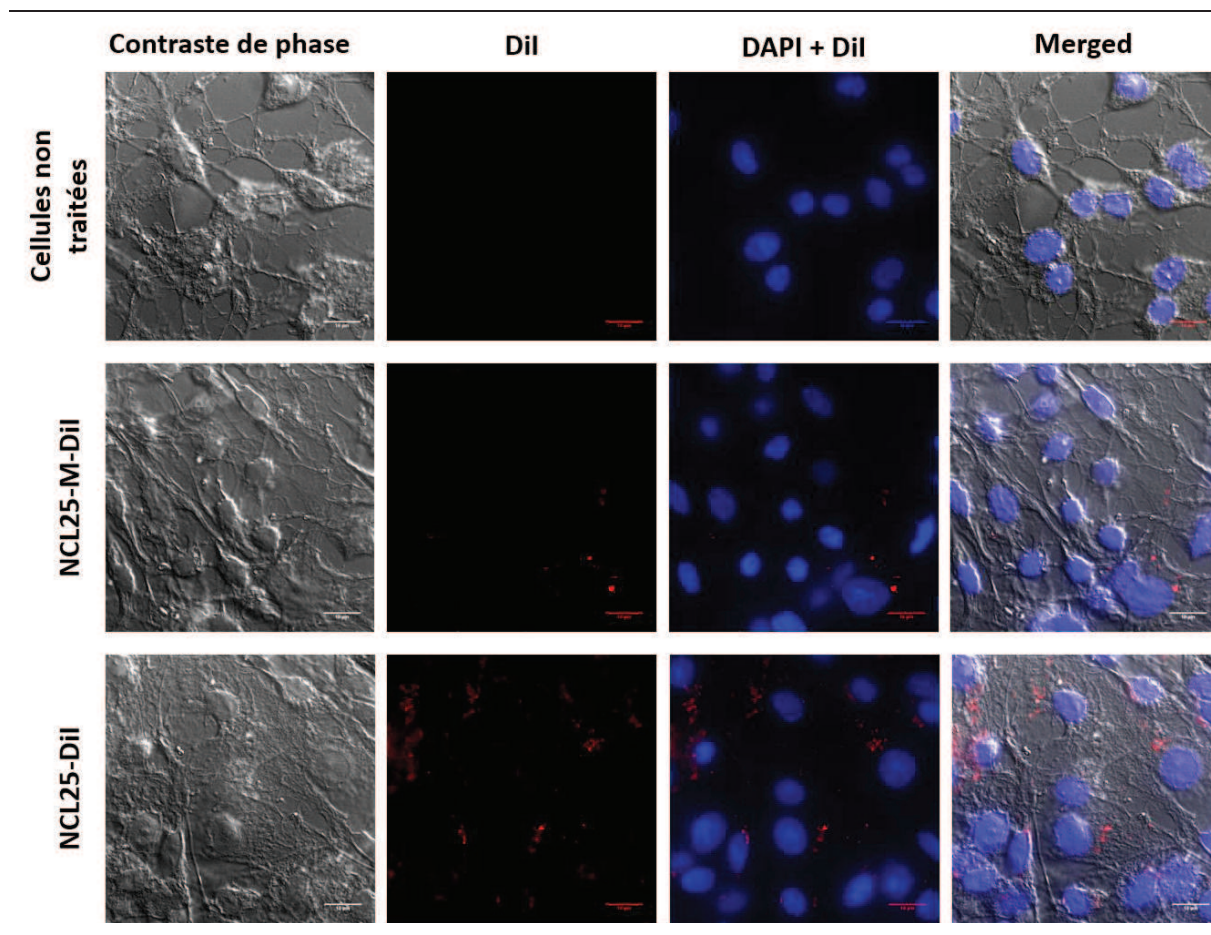


Figure 4.11 – Microscopie à fluorescence des cellules HeLa après 4 heures d’incubation avec NCL25-DiI et NCL25-M-DiI à 250 $\mu\text{g/mL}$: DAPI (marquage du noyau en bleu), DiI (fluorescence des NCL), Merged (fusion des trois images).

L’observation microscopique montre que les nanocapsules contenant le DiI seul (NCL25-DiI) se retrouvent plus rapidement dans les cellules que les nanocapsules lipidiques chargées en menthol et DiI. Cette première observation est tout à fait justifiée par les caractéristiques physico-chimiques des NCL25-M-DiI, notamment la charge de surface.

En effet, la mesure par diffusion dynamique de la lumière des nanocapsules contenant le menthol et le DiI montre que le diamètre moyen ne varie pas par rapport aux NCL25-DiI ($27,1 \pm 0,2$ nm) avec un indice de polydispersité très faible ($0,13 \pm 0,01$). Cependant, la co-encapsulation du menthol avec le DiI influe fortement sur la charge de surface des nanocapsules et le potentiel zêta devient négatif ($-9,27 \pm 1,94$ mV). Ceci a donc un impact sur la cinétique d’entrée des nanocapsules dans les cellules car la membrane cellulaire se caractérise par une charge de surface négative due à la présence de phospholipides et

protéines membranaires anioniques. Par effet de répulsion électrostatique, l'internalisation des nanocapsules NCL25-M-DiI se fait plus lentement que les NCL25-DiI.

Nous avons ensuite étudié la cinétique au cours du temps de l'internalisation des nanocapsules lipidiques chargées en menthol et DiI incubées avec des cellules HeLa à 37°C.

La visualisation en microscopie à fluorescence (**Figure 4.12**) a permis de confirmer que l'internalisation des NCL25-M-DiI (1 heure minimum) est moins rapide que celle des NCL25-DiI (30 minutes d'exposition suffisent pour pénétrer dans les cellules).

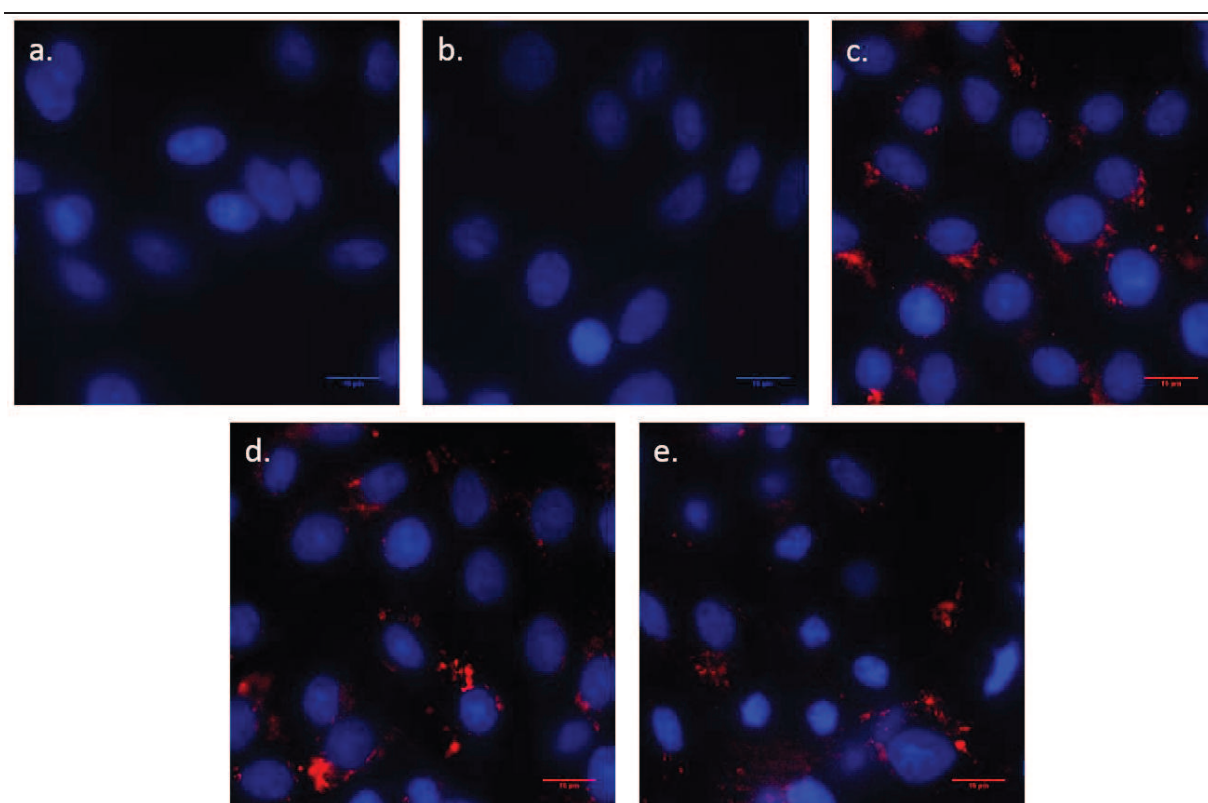


Figure 4.12 - Microscopie à fluorescence de cellules HeLa (noyau en bleu et NCL25-M-DiI en rouge), a : Cellules non traitées ; b : NCL25-M-DiI (250 µg/mL) après 30 minutes d'incubation ; c : NCL25-M-DiI après 1 heure d'incubation ; d : NCL25-M-DiI après 2 heures d'incubation ; e : NCL25-M-DiI après 4 heures d'incubation.

2.2 Imagerie calcique :

L'imagerie calcique par fluorescence est une méthode de microscopie qui permet de visualiser le calcium dans les cellules ou un milieu. Cette technique permet de mesurer les variations de Ca^{2+} simultanément sur plusieurs cellules. Elle est facile à réaliser et permet d'évaluer rapidement l'effet d'un principe actif ou un traitement donné sur l'homéostasie calcique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet que pouvaient avoir les nanocapsules lipidiques vides ou chargées en menthol sur les cellules HEK (lignée sauvage). La **Figure 4.13** montre la réponse calcique des cellules HEK au cours du temps suite à l'injection des NCL.

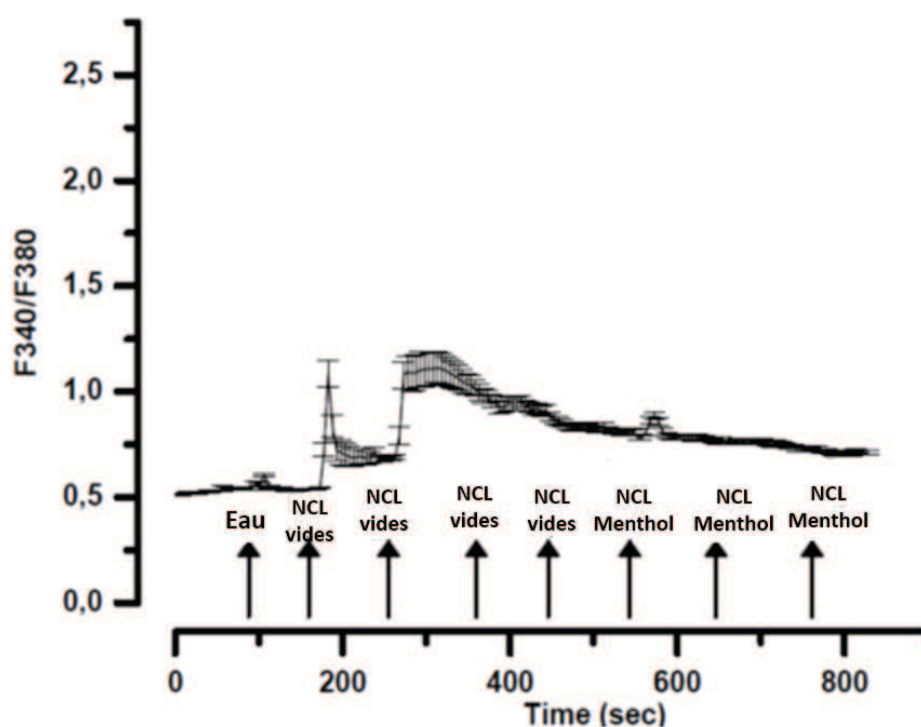


Figure 4.13 – Imagerie calcique sur des cellules HEK ; NCL vides : nanocapsules lipidiques vides (0,3 mg/mL), NCL Menthol : nanocapsules contenant du menthol (0,3 mg/mL en NCL et 25 μM en menthol).

Les nanocapsules chargées en menthol ne semblent pas induire de réponse calcique chez les cellules HEK. Il est toutefois important de noter que les nanocapsules lipidiques vides montrent un léger effet sur la réponse calcique probablement dû à un effet mécanique.

L'expérience suivante consistait à tester les mêmes lots de nanocapsules (vides ou chargées en menthol) sur une lignée de cellules HEK qui surexpriment les récepteurs calciques TRPM8.

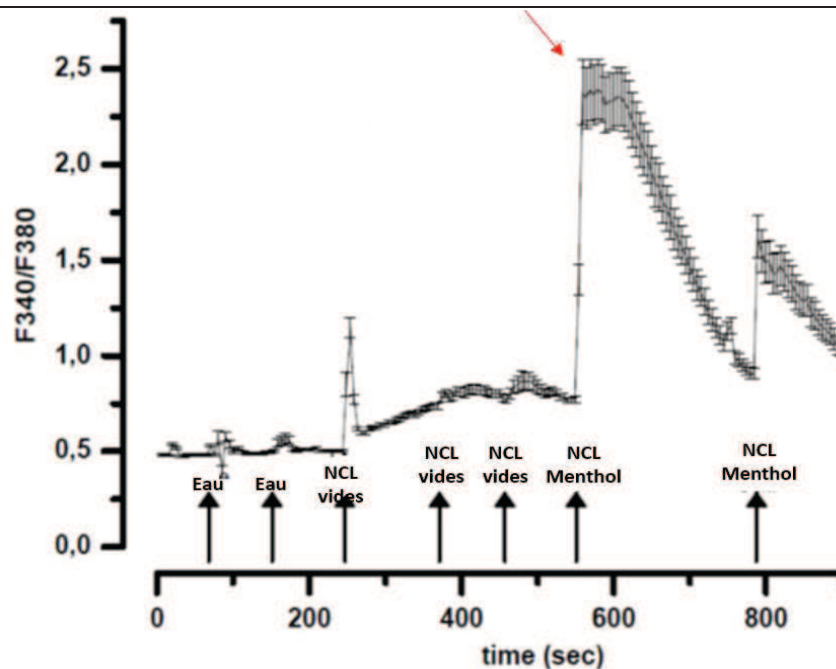


Figure 4.14 - Imagerie calcique sur des cellules HEK-M8 ; NCL vides : nanocapsules lipidiques vides (0,3 mg/mL), NCL Menthol : nanocapsules contenant du menthol (0,3 mg/mL en NCL et 25 μ M en menthol).

Comme observé ci-dessus, les nanocapsules vides induisent une légère modification de la réponse calcique sur les cellules. Cependant, la **Figure 4.14** montre une réponse spécifique importante suite à l'injection de NCL chargées en menthol (flèche en rouge). Cette réponse est observée une seconde fois lors de la deuxième injection de nanocapsules contenant le menthol mais l'effet est moins important. Ces résultats confirment l'interaction spécifique entre le menthol et les récepteurs des canaux ioniques TRPM8.

L'étude par imagerie calcique a été menée par la suite sur deux lignées du cancer de la prostate PC3 et PC3-M8. Les résultats de la réponse calcique sur la lignée sauvage des PC3 montrent que ces cellules réagissent fortement suite à l'injection des nanocapsules (**Figure 4.15**). Cet effet ne semble pas être lié à une réponse calcique spécifique mais plutôt à un effet mécanique puisque l'ajout d'une quantité d'eau ultrapure engendre le même effet mais en plus faible intensité. Par ailleurs, les cellules semblent s'adapter à la présence des NCL dans le milieu car la réponse est stabilisée au bout de plusieurs injections successives. Enfin, l'injection de nanocapsules chargées en menthol n'induit pas de réponse calcique sur les cellules PC3.

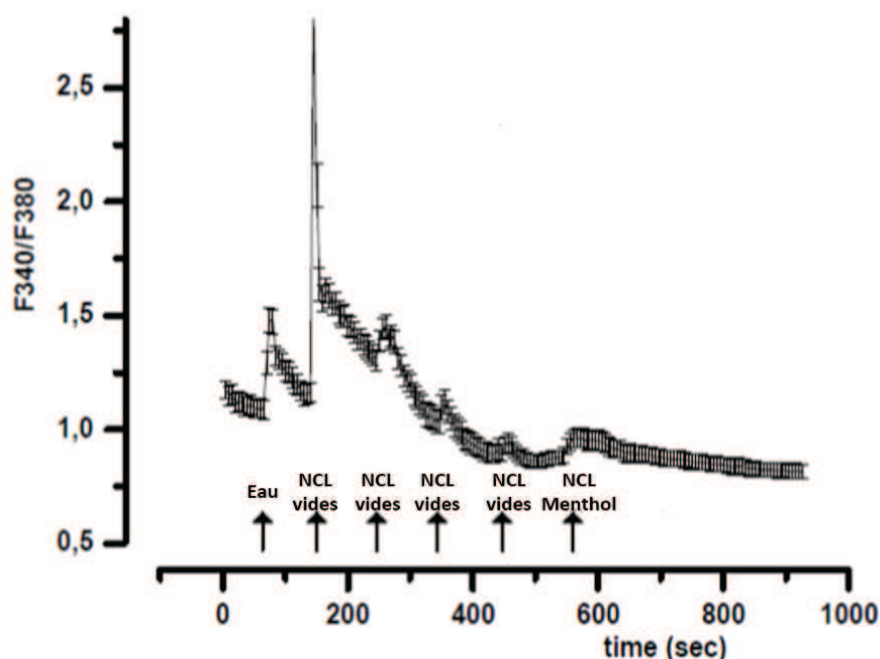


Figure 4.15 - Imagerie calcique sur des cellules PC3 ; NCL vides : nanocapsules lipidiques vides (0,3 mg/mL), NCL Menthol : nanocapsules contenant du menthol (0,3 mg/mL en NCL et 25 μ M en menthol).

Les cellules PC3-M8 surexprimant les récepteurs TRPM8 réagissent de la même manière que les cellules PC3 après injection d'eau et de nanocapsules vides. Cependant, une réponse calcique spécifique est observée quand les nanocapsules contenant le menthol sont injectées

(Figure 4.16). Ceci concorde avec les résultats obtenus avec les lignées cellulaires HEK et HEK-M8.

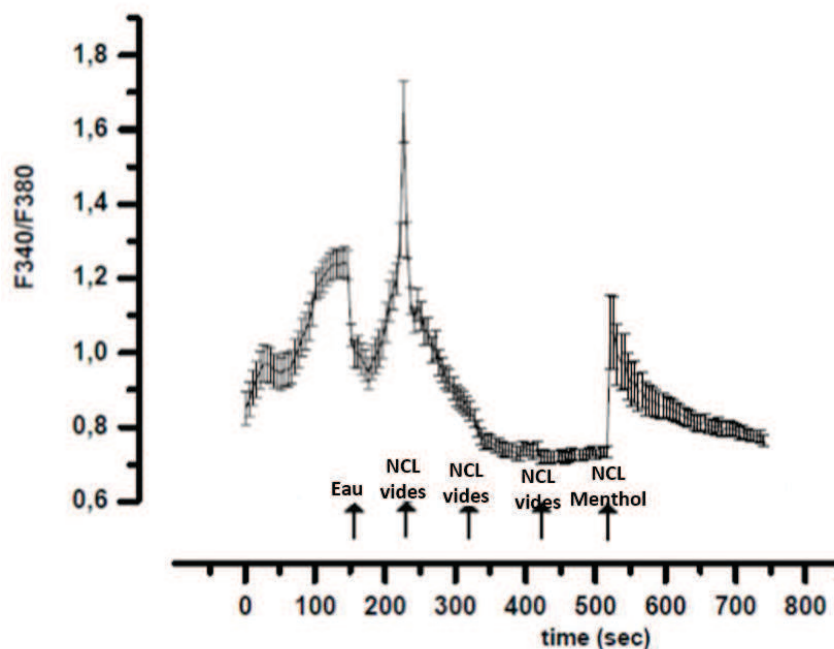


Figure 4.16 - Imagerie calcique sur des cellules PC3-M8 ; NCL vides : nanocapsules lipidiques vides (0,3 mg/mL), NCL Menthol : nanocapsules contenant du menthol (0,3 mg/mL en NCL et 25 μ M en menthol).

L'étude de la réponse calcique des cellules HEK et PC3 en présence de nanocapsules lipidiques nous a permis de confirmer la spécificité du menthol aux canaux ioniques TRPM8 d'une part, mais aussi d'un effet propre aux nanocapsules. Cependant, en raison de la fragilité des cellules prostatiques PC3, nous nous sommes intéressés en particulier, pour la suite des expériences, à la lignée cellulaire HEK-M8.

Le premier test consistait à injecter les différents constituants des nanocapsules lipidiques et observer l'évolution du flux calcique au cours du temps. L'autre paramètre étudié dans cette expérience est l'effet de la concentration en menthol dans les NCL chargées.

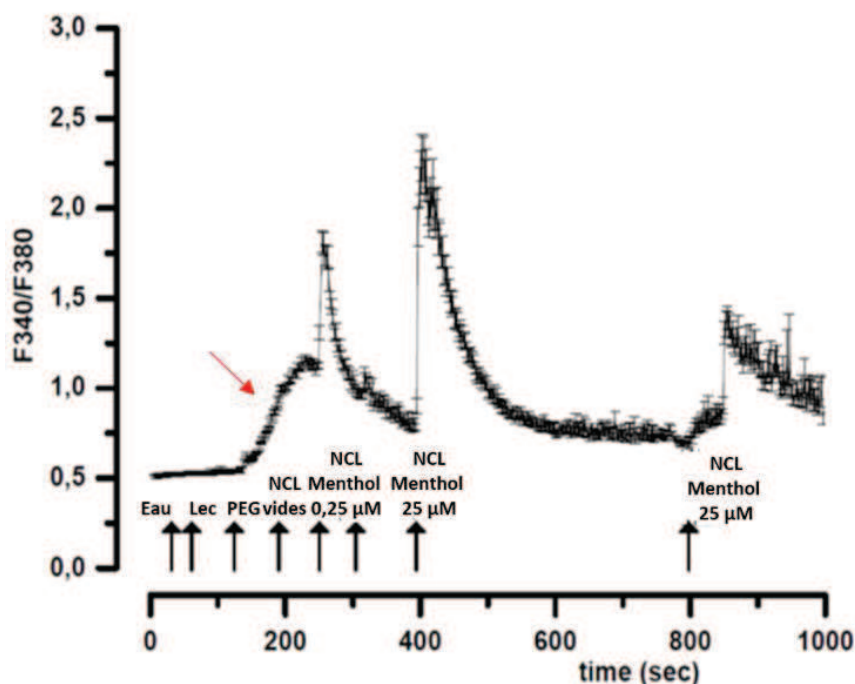


Figure 4.17 - Imagerie calcique sur des cellules HEK-M8 ; NCL vides : nanocapsules lipidiques vides (0,3 mg/mL), NCL Menthol : nanocapsules contenant du menthol (0,3 mg/mL en NCL et 25 μ M en menthol), Lec : lécithine, PEG : Solutol HS15.

La **Figure 4.17** montre que la lécithine, un des constituants des NCL, n'induit pas de réponse calcique sur les cellules HEK-M8. Cependant, il semblerait que le PEG (composé de la couche externe des nanocapsules) active les récepteurs ioniques TRPM8 puisque une légère réponse de signal calcique apparaît après injection du Solutol HS 15 (flèche en rouge). L'autre résultat observé est la relation entre la réponse spécifique des canaux ioniques et la concentration en menthol. En effet, les nanocapsules chargées en menthol à faible concentration (0,25 μ M) induisent un signal moins important que celui des NCL-menthol à 25 μ M. Il est toutefois important de noter que les cellules HEK-M8 ont un seuil de saturation par rapport à la réponse calcique spécifique, autrement dit une saturation des récepteurs TRPM8.

3. Conclusion :

Nous avons montré dans ce chapitre que les nanocapsules lipidiques offraient une alternative intéressante dans le cadre de l'étude et le ciblage des canaux ioniques TRPM8. En effet,

l'encapsulation d'agonistes hydrophobes (le menthol) a permis l'activation du canal TRPM8 observée par imagerie calcique. L'induction d'une réponse calcique a montré une spécificité aux nanocapsules chargées en menthol. Ceci confirme le potentiel d'utilisation de tels nano-objets pour le ciblage des canaux.

Références bibliographiques :

1. Pedersen, S.F., et al., *TRP channels: an overview*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 233-52.
2. Kedei, N., et al., *Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28613-9.
3. Bavencoffe, A., *Etude des mécanismes de modulation du canal TRPM8: implication dans la physiopathologie sensorielle et prostatique*. 2009, Thèse Univ Lille 1 Sciences et Techniques.
4. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-24.
5. Lehen'kyi, V., et al., *TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways*. Oncogene, 2007. **26**(52): p. 7380-5.
6. Tsavaler, L., et al., *Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3760-9.
7. Journigan, V.B., et al., *TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology*. Life Sci, 2013. **92**(8-9): p. 425-37.
8. Dhaka, A., et al., *Trp ion channels and temperature sensation*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 135-61.
9. Zhang, L., et al., *Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8365-73.
10. Fuessel, S., et al., *Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR*. Int J Oncol, 2003. **23**(1): p. 221-8.
11. Kiessling, A., et al., *Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8*. Prostate, 2003. **56**(4): p. 270-9.
12. Zhang, L., et al., *TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function?* Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 27-38.
13. Kamatou, G.P., et al., *Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties*. Phytochemistry, 2013. **96**: p. 15-25.
14. Farco, J.A., et al., *Menthol – Pharmacology of an Important Naturally Medicinal “Cool”*. Med Chem 2013. **13**: p. 124 - 131.
15. McKemy, D.D., et al., *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 52-8.
16. Macpherson, L.J., et al., *More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds*. Mol Cell Neurosci, 2006. **32**(4): p. 335-43.
17. Xiao, B., et al., *Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels*. J Neurosci, 2008. **28**(39): p. 9640-51.
18. Karashima, Y., et al., *Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1*. J Neurosci, 2007. **27**(37): p. 9874-84.
19. Moreno, O., et al., *Preparation of menthylcarbonylbenzimidazolones and related compounds modulators of Trp-p8 (transient receptor potential-p8) activity*. 2007. WO 2007095340 A2.
20. Moreno, O., et al., *Small-molecule modulators of Trp-p8 activity*. 2008. US 20080255185 A1.
21. Moreno, O., et al., *Small-molecule modulators of Trp-p8 activity*. 2009. WO 2009067410 A1.

22. Tolcher, A., et al., *Preliminary results from a phase I study of D-3263 HCl, a TRPM8 calcium channel agonist, in patients with advanced cancer*. Eur J Cancer Suppl, 2010. **8**(7): p. 119.
23. McKemy, D.D., et al., *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 52-8.
24. Andersson, D.A., et al., *TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH*. J Neurosci, 2004. **24**(23): p. 5364-9.
25. Almeida, M.C., et al., *Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature*. J Neurosci, 2012. **32**(6): p. 2086-99.
26. Ortar, G., et al., *(-)-Menthylamine derivatives as potent and selective antagonists of transient receptor potential melastatin type-8 (TRPM8) channels*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(9): p. 2729-32.
27. Huang, H., et al., *Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles*. Nat Nanotechnol, 2010. **5**(8): p. 602-6.
28. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 875-80.

Conclusion générale et Perspectives

Le développement de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs est en plein essor dans le domaine biomédical comme en témoigne les nombreuses publications et brevets ces dernières décennies. Le traitement du cancer étant un des défis majeurs pour la santé publique, la recherche se dirige de plus en plus vers l'application de nano-systèmes dans les thérapies déjà existantes notamment la chimiothérapie, la thérapie génique et la thérapie photodynamique (TPD).

Dans ce contexte, l'un des axes de recherche dans notre équipe est le développement et l'utilisation de nanoparticules à base de lipides pour le transport de substances d'intérêt pharmaceutique. Ce nano-système développé dans l'équipe de Jean-Pierre BENOIT à l'Université d'Angers est appelé nanocapsule lipidique.

Les nanocapsules lipidiques sont formulées selon un processus simple et facile se basant sur le principe d'inversion de phases d'une émulsion (huile dans eau et eau dans huile). Cette méthode permet l'obtention de capsules lipidiques de taille nanométrique (diamètre de 20 à 100 nm) ayant une structure particulière qui offre des atouts intéressants pour des applications en nanomédecine :

- De par leur cœur huileux liquide, les nanocapsules lipidiques permettent l'encapsulation de plusieurs molécules thérapeutiques hydrophobes ou encore des sondes pour le marquage fluorescent.
- Leur couche externe constituée de tensioactifs (PEG) confère aux nanocapsules lipidiques une stabilité physico-chimique (supérieure à 18 mois) et surtout des propriétés de furtivité nécessaires pour des applications *in vivo*.

Les résultats expérimentaux présentés **dans le premier chapitre de ce travail** montrent le potentiel de ces nanocapsules en tant que nano-vecteurs. En effet, nous avons observé la stabilité physico-chimique (de point de vue diamètre moyen et charge de surface) au cours du stockage pendant dix semaines mais aussi après une heure d'incubation dans différents milieux biologiques (tampon PBS, milieux de culture cellulaire DMEM avec et sans sérum).

L'autre aspect traité au cours de cette étude est la cytotoxicité *in vitro*. C'est un paramètre très important à prendre en considération lors de la conception de nano-vecteurs pour des applications biologiques. Les nanocapsules lipidiques affichent une faible cytotoxicité après une exposition de 24 heures avec les cellules HeLa et HEK. La non-toxicité de ces nanocapsules, confirmée sur deux différentes lignées cellulaires (HeLa et HEK), souligne encore une fois leur potentiel en nanomédecine. Enfin, la possibilité de marquage de ces

nanocapsules par fluorescence (encapsulation de DiI) a permis l'étude de leur internalisation cellulaire *in vitro*. Les résultats viennent confirmer ceux déjà retrouvés dans la littérature et qui montrent que l'internalisation rapide des nanocapsules lipidiques (au bout de 30 minutes) se fait par endocytose.

Nous avons démontré par la suite diverses applications des nanocapsules lipidiques dans le cadre de thérapie anti-cancéreuse.

Dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, l'étude expérimentale porte sur la fonctionnalisation des nanocapsules lipidiques par transacylation avec le polymère cationique PEI (polyéthylèneimine). L'objectif de cette étude est le développement de nanocapsules lipidiques cationiques capables de co-délivrer un plasmide ADN et un anti-cancéreux hydrophobe. L'idée est d'utiliser à la fois leur cœur huileux pour encapsuler un agent chimiothérapeutique (le paclitaxel) et leur surface fonctionnalisée par des charges cationiques afin de condenser l'ADN. La difficulté consiste à vectoriser les deux principes actifs dans le même nano-système d'une part, et d'avoir l'effet spécifique attendu (expression de la protéine codée par l'ADN et délivrance de l'anti-cancéreux) d'une autre part.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis de démontrer la possibilité d'utiliser les nanocapsules lipidiques comme plateforme thérapeutique. En effet, la fonctionnalisation avec le PEI a permis de modifier la charge de surface des nanocapsules devenues cationiques sans pour autant changer leur taille nanométrique (inférieure à 30 nm). La complexation de l'ADN avec les nanocapsules fonctionnalisées permet la formation de complexes (NCL cationiques/ADN) de taille moyenne inférieure à 50 nm capables de protéger le plasmide de la dégradation enzymatique.

L'analyse microscopique a montré l'expression de la protéine GFP codée par le plasmide ADN vectorisé par les nanocapsules lipidiques *in vitro*. De plus, le taux de transfection obtenu avec les nanocapsules cationiques est 2,8 fois plus important que celui du polymère PEI utilisé seul dans les mêmes conditions expérimentales. Par ailleurs, le test de prolifération cellulaire MTT a montré qu'aucune cytotoxicité n'est observée avec les complexes nanocapsules lipidiques/ADN *in vitro*.

La deuxième application est la vectorisation de l'anti-cancéreux hydrophobe, le paclitaxel, dans les nanocapsules lipidiques. La caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance montre que l'encapsulation du paclitaxel dans les nanocapsules lipidiques est

quantitative. Nous avons remarqué toutefois que la réaction de transacylation réalisée à un pH basique induisait une perte en paclitaxel.

Le mécanisme de mort cellulaire induit par le paclitaxel (l'apoptose) est préservé lors de la vectorisation avec les nanocapsules cationiques *in vitro*. En effet, la protection des molécules thérapeutiques de la dégradation est l'un des avantages de leur encapsulation dans les nanocapsules lipidiques. Enfin, les résultats de viabilité cellulaire ont montré que les nanocapsules cationiques chargées en anti-cancéreux permettaient une destruction des cellules tumorales aussi bien que la molécule libre en solution.

Bien que les deux principes actifs utilisés aient des effets antagonistes (expression de protéine codée par un plasmide ADN et destruction cellulaire par l'anti-cancéreux), cette étude peut s'inscrire comme étant une preuve de concept relayant l'utilisation de nanocapsules lipidiques comme vecteurs de plusieurs molécules thérapeutiques dans le cadre d'une thérapie combinée (thérapie génique et chimiothérapie).

Comme nous l'avons constaté dans ce travail, plusieurs défis doivent être surmontés afin d'améliorer l'efficacité des nanocapsules lipidiques comme vecteurs de principes actifs :

- ❖ L'utilisation de nanocapsules lipidiques cationiques pour la co-vectorisation de séquences d'ARNsi dont la fonction est d'inhiber l'expression d'un gène donné (i.e. des ARNsi Bcl-2 et MDR-1) et un anti-cancéreux (i.e. le paclitaxel) dont l'effet combiné sera d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses.
- ❖ Une autre limitation est liée au faible taux de transfection avec les NCL dans des milieux riches en sérum. En effet, la présence de protéines capables de se fixer aux complexes NCL/ADN constitue encore un frein à la transfection *in vivo* et *in vitro* dans des milieux complets. Nous proposons donc l'approche de modification de surface des nanocapsules lipidiques cationiques par LBL « *Layer By Layer* ». Cette méthode consiste à alterner des couches de molécules ou polymères chargés positivement ou négativement. L'adsorption entre couches est basée sur des interactions électrostatiques entre les deux charges. Concrètement, notre nano-système se présentera comme indiqué sur le schéma ci-dessous :

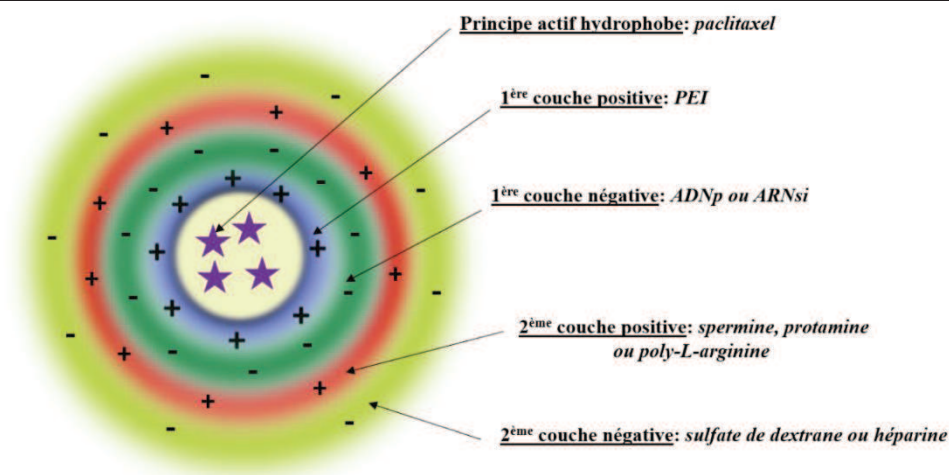


Figure 1 : Représentation schématique de nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec la technique LBL.

Le troisième chapitre de cette thèse est consacré à l'application des nanocapsules lipidiques dans la thérapie photodynamique (TPD). Le principe de la TPD étant la génération d'espèces réactives de l'oxygène suite à l'irradiation d'un agent photosensibilisant (PS) nécessite plusieurs paramètres :

- ✓ Une cytotoxicité nulle du photosensibilisateur en absence d'irradiation (dans l'obscurité). Cette condition nécessite l'utilisation de faibles concentrations en PS tout en garantissant une génération d'une quantité d'oxygène singulet optimale pour la destruction de cellules.
- ✓ L'internalisation du PS dans les cellules cancéreuses en quantité suffisante pour l'induction de la mort sous irradiation.
- ✓ La photo-dégradation du PS sous l'effet de l'irradiation doit être contrôlée afin de pouvoir éliminer rapidement les restes des molécules de l'organisme.
- ✓ La fluorescence des PS est un paramètre important dans le suivi de la TPD et dosimétrie.
- ✓ Le rendement quantique de génération d'oxygène singulet du PS doit être important.

Une nouvelle approche a été mise en évidence dans cette partie : la co-encapsulation de PS (l'hypéricine, Hy et la protoporphyrine IX, PPIX) dans des nanocapsules lipidiques afin d'améliorer l'effet photodynamique et la toxicité des molécules photosensibilisantes. La caractérisation des nanocapsules chargées en PS a permis d'arriver aux conclusions suivantes :

- ✚ L'encapsulation de PS n'a pas d'effet sur la taille nanométrique des nanocapsules (diamètre moyen inférieur à 30 nm) mais la charge de surface est devenue plus négative (potentiel zêta égal à ~ -18 mV pour des nanocapsules chargées avec les deux PS). Bien que ce dernier paramètre puisse avoir une incidence sur l'internalisation cellulaire (effet de répulsion avec la membrane plasmique chargée négativement), un potentiel zêta négatif favorise la stabilité des nanoparticules en suspension et permet aussi d'augmenter le temps de circulation sanguine *in vivo*.
- ✚ L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) montre que le rendement d'encapsulation de l'Hy et la PPIX seul ou combiné dans les nanocapsules lipidiques est supérieur à 97 %, favorisé par le caractère hydrophobe de ces deux molécules.
- ✚ Les techniques de spectroscopie UV-Vis et de fluorescence ont permis d'observer d'une part que les propriétés d'absorption et de fluorescence propres à chaque PS sont préservées lors de l'encapsulation dans les nanocapsules. D'autre part, la formulation de nanocapsules chargées avec les deux PS montre une absence d'interaction entre les deux molécules à l'intérieur des nano-objets. Cependant, nous avons noté que la photo-dégradation de la PPIX est plus ralentie dans les nanocapsules lipidiques comparée à la molécule libre.

Nous avons démontré par la suite, la capacité des nanocapsules lipidiques chargées en PS à produire de l'oxygène singulet nécessaire à l'activité photodynamique. Les rendements quantiques de génération d'oxygène singulet varient entre 0,31 et 0,38 pour les nanocapsules chargées en PS. De plus, les vitesses de photo-blanchiment des PS encapsulés montrent une cinétique plus rapide lorsque la molécule est présente dans les nanocapsules lipidiques.

Les tests biologiques réalisés sur deux lignées cellulaires cancéreuses montrent un effet synergique de l'activité phototoxique de l'hypéricine et la protoporphyrine IX encapsulés dans les mêmes nanocapsules. En effet, la combinaison des deux PS entraîne une activité photodynamique significativement plus importante sur les deux lignées cellulaires étudiées (HeLa et MDA-MB-231). Par ailleurs, la co-encapsulation des deux PS diminue leur cytotoxicité dans les conditions d'absence d'irradiation (dans le noir) puisque les cellules affichent une viabilité cellulaire de presque 100 % pour toutes les concentrations testées.

L'analyse du cycle cellulaire de l'ADN après traitement photodynamique (deux heures post-TPD) avec les nanocapsules lipidiques chargées en PS montre un effet sur le cycle de l'ADN

intracellulaire. Tout semble croire que l'activité phototoxique est induite à l'arrêt de la phase S du cycle cellulaire qui est la phase de synthèse de l'ADN.

L'étude de la localisation intracellulaire par microscopie à fluorescence montre que les deux PS se trouvent dans le cytoplasme cellulaire sous forme de vésicules, probablement d'endocytose après deux heures d'incubation. Il semblerait d'autre part qu'un phénomène de diffusion ou de relargage des PS des nanocapsules se produit dans les cellules au bout de six heures d'incubation.

Pour la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés au potentiel *in vivo* des nanocapsules lipidiques chargées en PS. Ayant les caractéristiques physico-chimiques favorables à un ciblage passif de tumeurs *in vivo*.

Par ailleurs, comme perspectives futures, l'amélioration de l'efficacité photodynamique des nanocapsules lipidiques chargées en PS peut se traduire par la co-encapsulation de l'anti-cancéreux (le paclitaxel). Cette approche de thérapie combinée (TPD et chimiothérapie) commence à prendre une place considérable dans les nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le chapitre 4 est dédié à l'application des nanocapsules lipidiques dans le ciblage de canaux ioniques TRP. Ce projet porte sur l'encapsulation d'un agoniste au canal TRPM8 (le menthol) qui est surexprimé sur les cellules cancéreuses de la prostate. La présence de menthol dans les nanocapsules n'a pas d'incidence sur leur taille (diamètre moyen égal à $25,3 \pm 1,4$ nm) mais entraîne une charge de surface négative ($-10,8 \pm 0,3$ mV) due aux groupements hydroxyles du menthol. Les résultats obtenus par imagerie calcique montrent une spécificité de la réponse calcique aux nanocapsules lipidiques chargées en menthol. Ces données préliminaires vont permettre la poursuite de l'étude pour le ciblage spécifique des canaux TRPM8 considérés comme nouvelle stratégie thérapeutique contre le cancer prostatique.

La possibilité d'utiliser les nanotechnologies pour modifier les caractéristiques d'un médicament et augmenter sa biodisponibilité au site d'action promet d'améliorer l'efficacité tout en réduisant les effets secondaires indésirables.

Pour la suite de ce projet, nous proposons deux stratégies différentes dont l'axe principal est l'utilisation des nanocapsules lipidiques comme plateforme multifonctionnelle :

- ✓ La fonctionnalisation de surface des nanocapsules avec des anticorps spécifiques aux canaux ioniques surexprimés sur les cellules cancéreuses ou encore avec des dérivés d'agonistes (comme le menthol) d'une part, et encapsuler un anti-cancéreux dans leur

cœur huileux d'autre part dans le but de délivrer spécifiquement le médicament dans le tissu malade.

- ✓ Comprendre le rôle des canaux ioniques et leur régulation au cours du développement de cancer de la prostate nécessite le suivi de la dynamique de ces protéines et leurs interactions avec les ligands dans les cellules et tissus. La difficulté consiste alors à suivre la localisation des médicaments dans la cellule. Le marquage fluorescent des nanocapsules lipidiques pourrait faciliter cette étape et permettre l'étude des mécanismes régissant l'interaction des agonistes avec les canaux ioniques.

En conclusion, ce travail de thèse (**Figure 2**) s'inscrit comme une preuve de concept, montrant le potentiel des nanocapsules lipidiques dans la vectorisation de principes actifs. La structure particulière de ces nano-objets leur confère l'aptitude de se rapprocher du concept nanoparticule multifonctionnelle utilisée à la fois comme moyen d'imagerie et comme plateforme pour le relargage de médicament. Cependant, des études complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre le comportement *in vivo* des nanocapsules chargées en principes actifs, leur biodistribution et surtout leur toxicité.

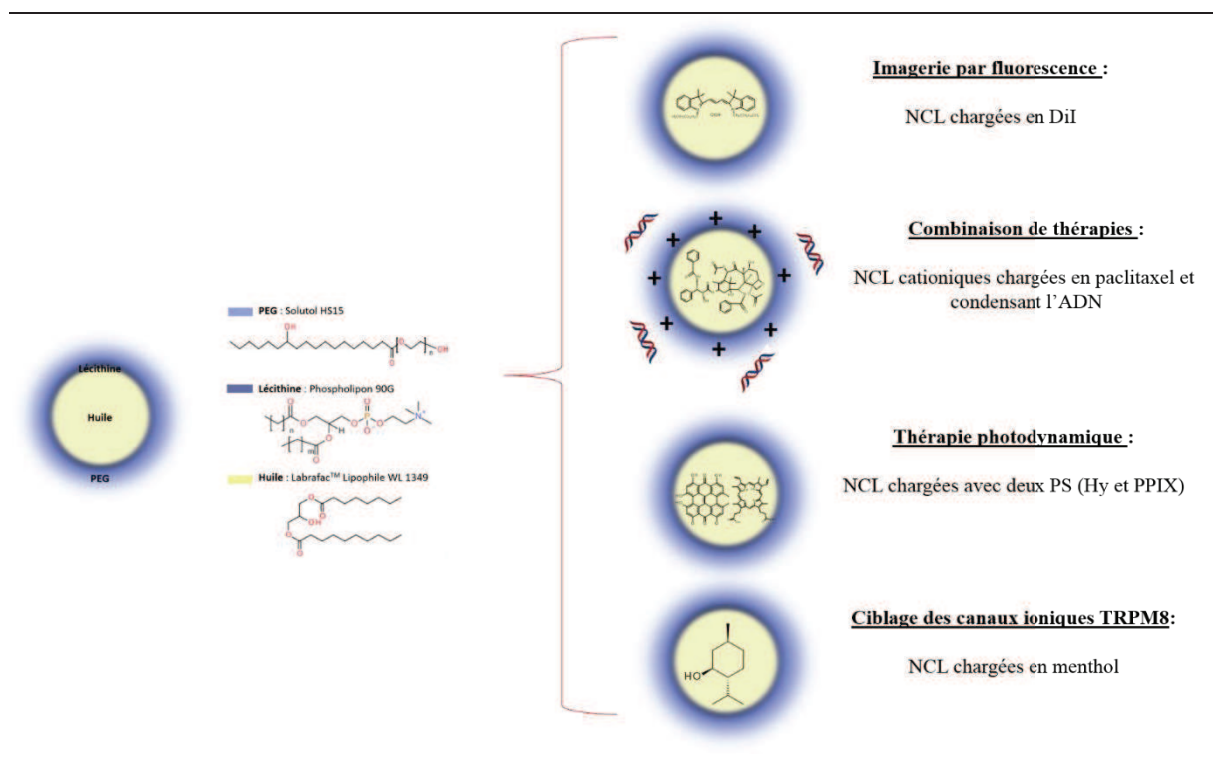


Figure 2 : Récapitulatif des nanocapsules lipidiques formulées au cours de cette thèse.

Partie expérimentale

1. Matériels :

Les nanocapsules lipidiques sont constituées de Labrafac Lipophile WL 1349 (triglycérides capryliques et capriques), de Phospholipon 90G (lécithine de soja à 97,1 % en phosphatidylcholine), et de Solutol HS15 (un mélange de polyéthylène glycol 660 libre et de polyéthylène glycol 660 hydroxystéarate), généreusement fournis par Gattefossé S.A (Saint-Priest, France), Phospholipid GmbH (Köln, Allemagne), et Laserson (Etampes, France), respectivement. Le polyéthylèneimine (PEI, 1,8 kDa), DNase I (Type IV, D5025), 1,1'-dioctadécyl -3,3,3',3' perchlorate tétraméthylindocarbocyanine (Dil, 97 %) , le 4,6- diamidino -2- phénylindole (DAPI), le paclitaxel (PTX, ≥ 95 %) et la protoporphyrine IX proviennent de chez Sigma -Aldrich (Saint-Quentin Fallavier , France). L'hypéricine (Hy, 99%) provient de Planta Natural Products (Vienne, Autriche).

Le milieu biologique (DMEM), la trypsine, le sérum fœtal bovin (FBS), dodécyl sulfate de sodium (SDS), l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), OptiMEM, la pénicilline/Streptomycine ont été achetés chez Fisher Scientific S.A (Illkirch, France).

L'ADN plasmidique (pEGFP-N1) provient de chez Clontech. L'eau déionisée est obtenue à partir d'un système Milli-Q plus (Millipore, Paris, France). Tous les autres réactifs et solvants chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint- Quentin Fallavier, France).

2. Techniques expérimentales :

2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) :

C'est une méthode d'analyse spectroscopique non invasive et facile à utiliser. Le principe de la méthode est la diffusion de la lumière (laser) par les particules de l'échantillon, soumises à des mouvements thermiques aléatoires. Des corrélations mathématiques permettent de déduire la taille des nanoparticules dans un liquide donné. L'appareil utilisé est un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, S.A., Worcestershire, UK).

Le potentiel zêta représente la charge de surface des nanoparticules dispersées dans une solution. Il traduit la mobilité électrophorétique d'une suspension chargée dans un champ électrique. Il est mesuré en utilisant le mode électrophorétique du Zetasizer.

2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique de séparation et d'analyse d'un ou plusieurs composés d'un échantillon. Elle se compose d'une phase mobile liquide (l'éluant) et d'une phase stationnaire (la colonne chromatographique). Le principe est la séparation des composés selon leur affinité et leur interaction avec la phase stationnaire constituée d'un support de gel. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

L'appareil utilisé dans notre laboratoire est le Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japon) avec une colonne C₄ de 5 µm QS Uptisphere® 300 Å, 250 x 4,6 mm (Interchim, Montluçon, France). Le détecteur est un détecteur UV. La phase mobile est composée d'un mélange d'éluant A (acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'eau déionisée) et d'éluant B (acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'acétonitrile) à un débit de 1 mL / min. La colonne est chauffée à 40 °C et l'élution des composés s'effectue selon un gradient linéaire de 0 à 80 % en 30 minutes. L'échantillon à analyser est injecté à un volume de 40 µL.

2.3. Spectroscopie en UV-visible :

Les mesures spectroscopiques en UV-visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 950 dual beam avec une résolution de 1 nm dans une cuve spectrométrique de 1 cm (quartz). La ligne de base correspond à la mesure du blanc contenant seulement le solvant dans lequel l'échantillon a été solubilisé. Dans le cas des nanocapsules, il s'agit de l'eau déionisée.

2.4. Spectroscopie en fluorescence :

La fluorescence est mesurée grâce à un spectromètre HORIBA Jobin Yvon IHR 320 couplé à un microscope avec un laser argon ($\lambda_{\text{excitation}} = 457 \text{ nm}$, 10 mW, 1 s) à température ambiante. Le faisceau du laser est focalisé sur le liquide avec un objectif de microscope 10 X, produisant une taille de $\sim 1,5 \text{ mm}$ sur une lentille remplie avec l'échantillon (400 µL).

2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose :

Cette technique est utilisée pour la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un marquage fluorescent (le bromure d'éthidium). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est donc une technique très sensible, rapide et facile à mettre en œuvre.

La concentration en agarose (exprimée en pourcentage de masse d'agarose par volume du gel) détermine la taille des pores du gel et par conséquent la taille des fragments ADN à séparer : un fragment ADN d'une taille donnée va migrer d'autant plus vite que le pourcentage d'agarose est plus faible.

Dans notre cas, l'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1 % (w/v) contenant du bromure d'éthidium dans un tampon Tris-acétate-EDTA (TAE, 1x) pendant 50 min à 90 V. Les résultats de la migration des échantillons sont visualisés sur un transilluminateur UV en utilisant le système d'analyse Gel Doc.

2.6. Microscopie confocale à fluorescence :

Le microscope confocal Nikon A1-R (Nikon Instruments, Tempe, AZ) a été utilisé avec l'objectif (Nikon Ph1 DLL 10x/0.30 objectif Plan de Fluor) et une excitation à 488 nm pour la visualisation de GFP (vert) et une excitation à 561 nm pour la visualisation du DiI (rouge).

2.7. Cytométrie de flux (FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*) :

La cytométrie de flux est une technique d'analyse utilisée pour l'examen et le comptage des particules microscopiques telles que des cellules individuelles sur la base de leur fluorescence (**Figure P-1**). Une de ses caractéristiques uniques est qu'elle mesure la fluorescence par cellule ou particule. Le tri de cellules activé par fluorescence (FACS) est un type de cytométrie de flux. La grande vitesse du tri (10 000 cellules /seconde) permet le tri d'un mélange hétérogène en fonction de la fluorescence et la diffusion de la lumière de chaque cellule. Elle permet d'enregistrer rapidement et quantitativement la fluorescence de cellules individuelles ainsi que la séparation physique des cellules d'intérêt particulier.

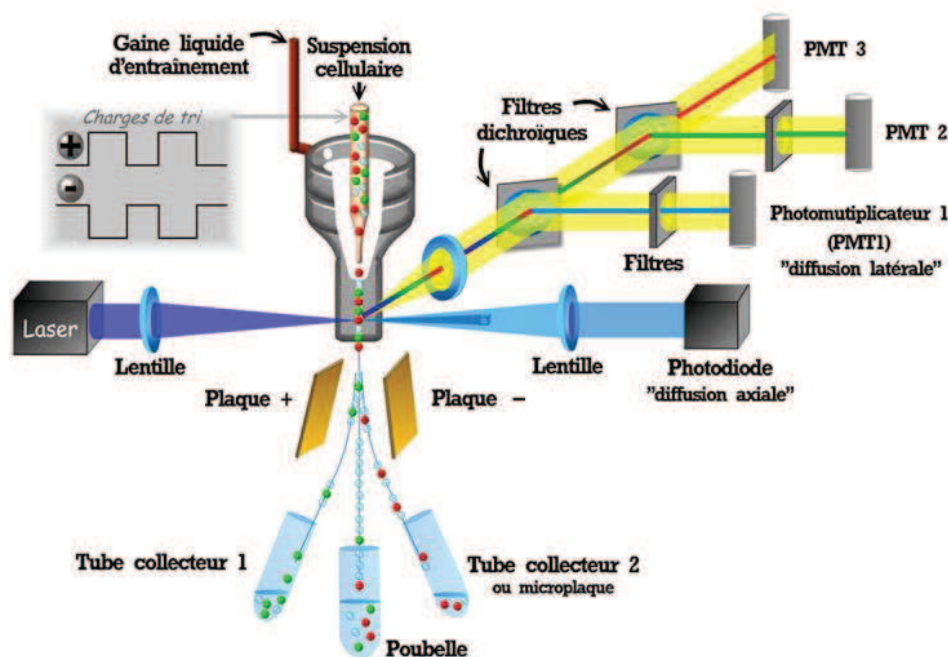


Figure P-1 : Représentation schématique d'un cytomètre de flux.

2.8. Microscopie calcique :

C'est une technique d'imagerie couramment utilisée pour la mesure de la variation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]$) (Figure P-2). Elle se base sur le principe de microscopie par fluorescence classique. Cette technique, simple à réaliser, présente l'avantage de mesurer les variations de $[\text{Ca}^{2+}]$ simultanément sur plusieurs cellules et permet ainsi d'observer l'effet d'une molécule ou un prétraitement sur l'homéostasie calcique (dans notre cas les nanocapsules lipidiques chargées en menthol). Les résultats obtenus représentent un élément important dans l'étude préliminaire des canaux ioniques.

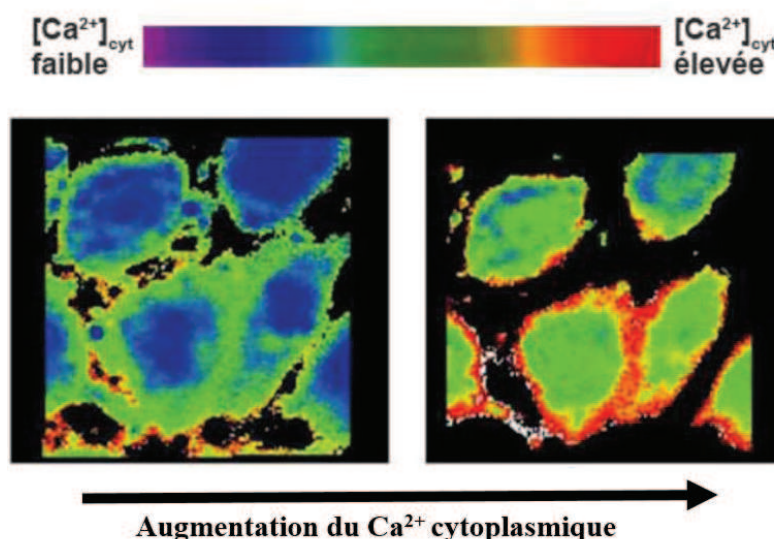


Figure P-2 : Principe du fonctionnement de l'imagerie calcique (d'après [1]).

Le suivi de la $[Ca^{2+}]$ dans les cellules se fait par une sonde calcique appelée Fura-2/AM (acétoxyméthylester). Cette sonde est capable de pénétrer dans les cellules, où le groupement acétoxyméthyl-ester est clivé par les estérases cytoplasmiques. Elle est alors stabilisée dans le cytoplasme et émet de la fluorescence à 510 nm en fonction de la concentration en Ca^{2+} (**Figure P-3**). Ainsi, lorsque la $[Ca^{2+}]$ augmente, la fluorescence émise après excitation de la sonde à 340 nm augmente tandis que celle émise après excitation à 380 nm diminue. Le rapport des intensités de fluorescence émises après excitation à 340 et 380 nm permet d'estimer la variation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire.

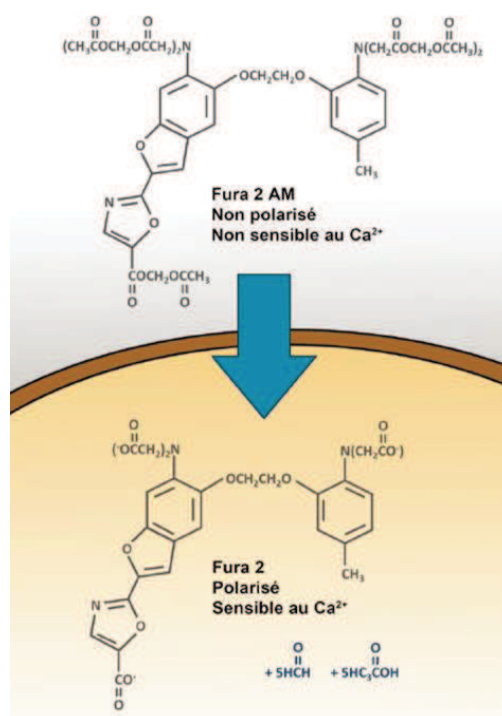


Figure P-3 : Représentation schématique de la modification de la structure du Fura-2/AM dans les cellules (d'après [1]).

3. Préparation des nanocapsules lipidiques :

Les NCL sont formulées selon un procédé d'inversion de phases d'un système huile/eau, développé par *Heurtault et al.* [2]. Cette inversion de phases est provoquée par plusieurs cycles d'élévation et de diminution de températures. La phase huileuse constituée de Labrafac WL 1349 et de Phospholipon 90G est mélangée à la phase aqueuse qui se compose de Solutol HS 15, de chlorure de sodium et d'eau déionisée à des proportions précises. Le mélange est porté à 85°C sous agitation magnétique et est ensuite soumis à trois cycles de température de 70 à 90°C. Puis la solution est refroidie à 78°C et est diluée avec 3,3 mL d'eau déionisée à 0°C. Enfin la suspension est mise sous agitation magnétique à température ambiante pendant 10 minutes. La composition des différentes formulations est résumée dans le **Tableau P-1**.

	LabrafacWL 1349 (%)	Solutol HS 15 (%)	Phospholipon 90G (%)	NaCl (%)	Eau déionisée (%)
NCL25	20,0	32,4	3,0	1,7	42,9
NCL50	33,3	19,1	3,0	1,7	42,9
NCL100	40,0	12,4	3,0	1,7	42,9

Tableau P-1 - Composition des NCL pour une masse totale initiale de 1,26 g.

❖ **Estimation de la concentration en nanocapsules lipidiques :**

La concentration en NCL correspond à la masse sèche de tous les constituants dans un volume de suspension connu (250 μ L) après évaporation de l'eau. Les mesures sont réalisées en triplicat.

3.1 Encapsulation de principes actifs :

Le principe actif est d'abord solubilisé dans le solvant organique approprié. Il est ensuite mélangé avec la phase huileuse des nanocapsules (Labrafac WL 1349 et Phospholipon 90G). La quantité de chaque principe actif figure dans le **Tableau P-2**. Le solvant est éliminé par évaporation (évaporateur rotatif) (sauf le DMSO). La formulation des nanocapsules se poursuit selon le même protocole décrit ci-dessus.

Formulation	Principe actif	Solvant organique	PA (%)
NCL25-DiI	DiI	Dichlorométhane	0,04
NCL25-PTX	Paclitaxel	Acétone	0,08
NCL25-Hy	Hypéricine	DMSO	0,04
NCL25-PPIX	Protoporphyrine IX	DMSO	0,04
NCL25-PPIX-Hy	Hypéricine + Protoporphyrine IX	DMSO	0,02 (Hy) + 0,02 (PPIX)
NCL25-M	Menthol	Méthanol	1

Tableau P-2 - Composition des nanocapsules lipidiques en principes actifs par rapport à la masse totale de 1,26 g.

3.2 Préparation des nanocapsules cationiques (NCL25-T) et (NCL25-PTX-T) :

Les nanocapsules lipidiques vides ou chargées en paclitaxel ont été fonctionnalisées avec le polymère polyéthylèneimine (PEI) par une réaction de transacylation. Cette méthode de modification de surface des nanoparticules, décrite par *Benoit et al.*, [3] se base sur le principe qu'à un pH alcalin, un échange de groupements acyles se fait entre les polymères cationiques en excès (PEI) et les groupements PEG à la surface des nanocapsules.

Une solution de NCL25, vides ou chargées en PTX, à une concentration de 25 mg/mL est mélangée avec une solution basique de NaOH (1 M) pour avoir un pH de $\sim 10,5$. Elle est ensuite agitée pendant 30 minutes à température ambiante. Puis, 500 μL d'une solution aqueuse de PEI (10 % w/v) est ajoutée. La suspension est laissée sous agitation magnétique pendant 30 minutes et est par la suite neutralisée avec une solution aqueuse de HCl (1M) pour atteindre un pH final de 7,4. Enfin, la solution est purifiée par dialyse (taille des pores : 6000-8000 Da) contre de l'eau déionisée pendant 2 jours (changée trois fois par jour).

3.3 Préparation des complexes NCL cationiques / ADN :

Le plasmide pEGFP-N1 a été amplifié dans *Escherichia coli* et purifié en utilisant un kit de purification NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel), selon le protocole du fournisseur. Le rendement de l'ADN purifié a été déterminé en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm et ajusté à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Les complexes des nanocapsules cationiques, vides ou chargées avec le paclitaxel, avec le plasmide ADN ont été préparés en mélangeant la même quantité d'ADN (1 μg) avec différentes concentrations de nanocapsules NCL25-T ou NCL25-PTX-T correspondant aux ratios massiques de 1/1 à 500/1. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante sous agitation afin de permettre la formation des complexes NCL/ADN par interaction électrostatique.

4. Purification des nanocapsules lipidiques :

Les nanocapsules lipidiques sont purifiées en utilisant des colonnes de dessalage à usage unique PD-10 (Sephadex [®] G-25 pour filtration sur gel en tant que phase stationnaire, Amersham Biosciences). La colonne a été stabilisée avec 25 mL d'eau déionisée. 2 mL de suspension de NCL a été déposé sur la colonne, et 0,5 mL d'eau est ajoutée pour compléter le volume mort de la colonne. Ensuite, les NCL purifiées sont éluées en ajoutant 4 mL d'eau sur la colonne. La solution de nanocapsules ainsi collectée est dialysée dans un sac (taille des pores : 6000-8000

Da) pendant la nuit contre de l'eau déionisée. Enfin, la suspension est séchée et pesée afin d'estimer la concentration.

5. Caractérisations des nanocapsules lipidiques :

5.1 Détermination de la taille et la charge de surface des NCL :

Le diamètre moyen et l'indice de polydispersité des NCL sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière. Le potentiel zêta est mesuré en utilisant le mode électrophorétique avec le Zetasizer. Les suspensions de NCL sont diluées au 1/10 (v/v) dans l'eau déionisée avant analyse et les mesures sont réalisées en triplicat.

5.2 Détermination de la taille et charge de surface des complexes NCL cationiques/ADN :

Les complexes formés avec les nanocapsules cationiques et le plasmide ADN (NCL25-T/ADNp) sont caractérisés par DDL à différents ratios massiques (de 1/1 à 500/1). La quantité de plasmide est fixée à 1 µg/mL et les différents échantillons sont préparés en ajoutant les NCL25-T à des concentrations de 1 µg/mL à 500 µg/mL dans un volume total de 1 mL. La mesure du diamètre moyen ainsi que du potentiel zêta des complexes se fait directement dans la cuve contenant l'échantillon en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, S.A., Worcestershire, UK).

5.3 Détermination de la morphologie des nanocapsules lipidiques:

La morphologie des nanocapsules lipidiques (NCL25) a été visualisée par microscopie électronique en transmission (MET). Elles ont été marquées par coloration négative. La solution de NCL25 est déposée sur une grille recouverte de Formvar pendant 30 secondes puis rincée avec de l'acétate d'uranyle à 2 % dans l'eau déionisée (deux rinçages courts et un rinçage de 1 minute). Les grilles sont séchées puis observées directement au MET.

5.4 Détermination du taux d'encapsulation des principes actifs :

Le taux d'encapsulation des principes actifs (PA) a été déterminé par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Des solutions de PA sont préparées à différentes concentrations et sont injectées sur la colonne. La courbe de calibration est obtenue par régression linéaire de l'aire du pic en fonction de la concentration en PTX (**Tableau P-3**). La longueur d'onde de détection de chaque principe actif figure dans le **Tableau P-3**.

Principe actif (PA)	Temps de rétention	Régression linéaire ^a	k_{PA}	Domaine de linéarité	$r^2,^b$	Détection (nm)
PTX	18,5 min	$Y = 65885 X$	65885	1 - 100 $\mu\text{g/mL}$	1	227
PEI	8,5 min	$Y = 2472800 X$	2472800	0,5 - 5 mg/mL	0,9954	215
Hy	26,6 min	$Y = 54260 X$	54260	1 - 100 μM	0,9962	590
PPIX	20 min	$Y = 373350 X$	373350	1 - 100 μM	0,9999	402

^aEquation, où Y correspond à l'aire du pic et X à la concentration du PA.

^bCoefficient de corrélation ($n = 10$).

Tableau P-3 - Courbe de calibration et régression linéaire pour les différents principes actifs.

Pour la détermination des taux d'encapsulation, la concentration en PA est mesurée par HPLC avant et après purification des NCL par gel filtration. Le rendement d'encapsulation (RE) est calculé par l'équation (1) :

$$RE(\%) = \frac{[PA]_{NCL}}{[PA]_{TOTAL}} \times f \times 100 \quad (1)$$

$[PA]_{NCL}$: concentration en PA dans les NCL ; $[PA]_{TOTAL}$: concentration totale en PA dans la suspension de NCL avant purification ; f : facteur de dilution pour la gel filtration.

5.5 Détermination de la capacité tampon :

La capacité tampon du PEI, NCL25 et NCL25-T a été étudiée en déterminant la variation du pH au cours du titrage de suspension (NCL25 ou PEI) basique avec une solution de HCl (0,1 M). 3 mL de NCL25-T (200 $\mu\text{g/mL}$) ont été dispersé dans l'eau déionisée, et le pH de la solution a été ajusté à $10,5 \pm 0,1$ avec une solution de NaOH (0,1 M). Ensuite, une solution acide HCl (0,1 M) est ajoutée progressivement à la suspension et le pH est enregistré.

5.6 Détermination de la force de liaison des nanocapsules cationiques avec l'ADN :

La capacité des nanocapsules (NCL25-T) à condenser l'ADN (ADNp) a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les complexes NCL25-T/ADNp ont été préparés à différents ratios de 1/1 à 500/1 dans un volume total de 20 μL . Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 1 % (w/v).

5.7 Etude de la protection de l'ADN de la DNaseI :

Les complexes NCL25-T/ADNp sont préparés comme décrit ci-dessus à différents ratios massiques de 1 à 500 dans un volume final de 20 μ L. La DNase I est ajoutée aux échantillons à analyser (contrôles et complexes NCL/ADN) à une concentration finale de 1 U de DNase I/ μ g d'ADN. Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 30 min. La digestion enzymatique est arrêtée par ajout d'EDTA à une concentration finale de 5 mM. Le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) est ensuite ajouté aux échantillons à une concentration finale de 1% pour dissocier l'ADN des nanocapsules, étant aussi un composé chargé négativement. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, les échantillons sont soigneusement montés sur un gel d'agarose à 1 % (w/v) contenant du bromure d'éthidium et laissés migrer à 90 V pendant 50 min. L'intégrité de l'ADN dans chaque échantillon a été comparée à l'ADN non traité.

5.8 Etude du photo-blanchiment des NCL25-PS :

Les cinétiques du photo-blanchiment des nanocapsules lipidiques chargées en PS ont été déterminées par analyse spectrophotométrique en UV-Vis. Les NCL25-PS à 5 μ M sont préparées dans une solution tampon phosphate (50mM, pH 7,4). Les échantillons placés dans une cuve spectrométrique de 1 cm sont irradiés à température ambiante pendant 60 minutes par une lampe visible (400 – 700 nm, L9566-03, Hamamatsu, Japon). L'intensité de la lumière a été mesurée en utilisant un PM600TM Laser Fiber Power Meter (Coherent Inc, USA) et la puissance était de 0,6 W.

6. Etudes biologiques *in vitro* :

6.1 Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse :

- HEK : des cellules embryonnaires de rein humain.
- HELA : des cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus.
- MDA-MB-231 : des cellules humaines du cancer de sein.
- PC3 : des cellules humaines du cancer de la prostate.
- PC3-M8 : cellules humaines du cancer de la prostate surexprimant le récepteur TRPM8.
- HEK-M8 : cellules embryonnaires de rein humain surexprimant le récepteur TRPM8.

Les deux lignées surexprimant les canaux TRPM8 (HEK-M8 et PC3-M8) sont le résultat de la transfection stable des cellules avec le gène *trpm8* cloné à partir de cellules prostatiques humaines.

Les cellules humaines sont maintenues en culture dans le milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contenant 10 % de sérum bovin fœtal (*Fetal Bovine Serum*, FBS) et 1% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) à 37 °C sous une atmosphère humide contrôlée (5 % de CO₂).

6.2 Test de prolifération cellulaire MTT :

6.2.1 Cytotoxicité des nanocapsules lipidiques :

Les cellules HEK et HeLa ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10⁴ cellules par 100 µL par puits) pendant 48 h. Après un lavage avec du PBS, les cellules sont incubées avec les nanocapsules lipidiques vides à des concentrations de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mg/mL pendant 8 heures et 24 heures. Après incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et maintenues en culture pendant encore 24 heures.

La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par colorimétrie avec le test MTT. Après élimination du milieu et lavage avec du PBS chaud, 100 µl de solution MTT (dilution au 1/10 de solution mère à 5 mg/mL dans du PBS) sont ajoutés et laissés incubés pendant 3 heures.

Ce test utilise le sel de tétrazolium MTT comme réactif, qui sera transformé en formazan (cristaux bleus) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives (**Figure P-4**). La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

Après incubation des cellules avec le MTT, le formazan formé sera dissous par ajout de 100 µL de DMSO et l'intensité de l'absorbance à 570 nm (soustraction du fond à 650 nm) est mesurée en utilisant un lecteur de microplaque (PHERAstar FS, BMG LABTECH GmbH, Allemagne). La viabilité cellulaire est représentée en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules non traitées.

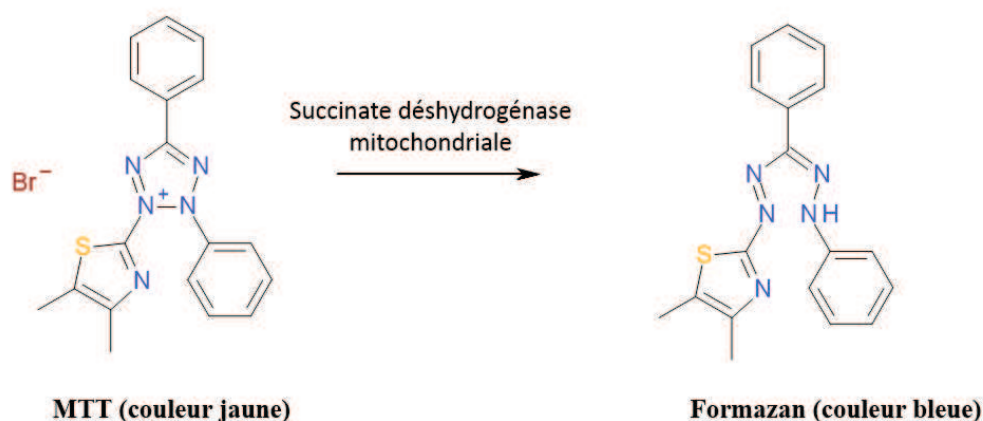


Figure P-4 : Réduction du MTT par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan.

6.2.2 Cytotoxicité des complexes NCL cationiques/ADN :

Les cellules HEK sontensemencées dans des plaques à 24 puits (10^5 cellules/ puits) 48 h avant de commencer les expériences. Les cellules sont par la suite lavées avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu DMEM sans sérum et contenant les complexes NCL25-T/ADNp à différents ratios massiques (de 50/1 à 500/1). Après 6 h d'incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et ensuite maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10 % de FBS. Au bout de 18h à 37 °C, la viabilité cellulaire est évaluée par colorimétrie avec le test MTT selon le protocole décrit ci-dessus.

6.2.3 Etude du relargage du PTX :

Les cellules HEK sontensemencées dans des plaques à 24 puits (10^5 cellules par puits) et incubées pendant 24 h. Elles sont ensuite mises en présence du PTX libre, des NCL25-PTX-T/ADN (concentrations des NCL de 100 à 500 $\mu\text{g/mL}$, concentrations de PTX de 0,22 à 1,10 $\mu\text{g/mL}$) et des NCL25-T/ADN (concentrations de NCL de 100 à 500 $\mu\text{g/mL}$) pendant 4 h, lavées avec du PBS et incubées pendant 20 h à 37°C. Après l'incubation, le taux de relargage du paclitaxel est déterminé avec le test de prolifération cellulaire MTT selon le même protocole décrit ci-dessus.

6.2.4 Photo-toxicité des NCL25-PS :

Les cellules MDA-MB-231 et HeLa sont cultivées dans des plaques à 96 puits (10000 cellules par puits) 48 h avant les expériences. Les cellules sont lavées avec du PBS et le milieu est remplacé avec 100 μ L de DMEM sans sérum contenant les NCL25-Hy, NCL25-PPIX, NCL25-PPIX-Hy et les PS libres en solution (1 % DMSO) à des concentrations allant de 0,01 à 1 μ M. Après 8 h d'incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS et maintenues dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum (10 % de FBS). Puis, les cellules sont irradiées pendant 12 min en utilisant une lampe visible (Spot Light Source 400 – 700 nm, L9566-03, Hamamatsu, Japon). L'intensité de la lumière est mesurée et fixée à 10 mW avec un PM600TM Laser Fiber Power Meter (Coherent, Inc, USA). Après 16 h d'incubation à 37°C, la viabilité cellulaire est mesurée par le test colorimétrique MTT selon le protocole décrit ci-dessus.

6.3 Observation des NCL par microscopie à fluorescence :

Les cellules HeLa ont étéensemencées sur des lamelles de microscope de 12 mm placées dans une plaque à 24 puits (10⁵ cellules par 500 μ l par puits). Après 24 h de culture, les cellules sont incubées avec les nanocapsules fluorescentes (NCL25-DiI, 250 μ g/mL) pendant 4 h à 4°C et 37°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, fixées avec 4% de paraformaldéhyde à température ambiante pendant 15 minutes et marquées au DAPI (0,1 mg/mL dans du PBS). Les lamelles sont montées sur des lames de verre et observées au microscope confocal (Nikon A1-R, Nikon Instruments, Tempe, AZ) avec longueur d'onde d'excitation à 404 nm pour le DAPI et 561 nm pour le DiI.

6.4 Observation des NCL par microscopie électronique en transmission :

Les cellules HEK cultivées dans des flacons de 75 cm² sont fixées pendant 15 min sur la glace dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4 avec 2,5 % de glutaraldéhyde, puis rincées 4 fois 5 min dans un tampon cacodylate seul. Elles sont grattées et récupérées dans un tube Eppendorf puis centrifugées pendant 3 min à 600 x g. Le culot cellulaire est alors post-fixé pendant 15 min dans du tétroxyde d'osmium 1 %, cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4. Il est ensuite rincé 10 min dans du tampon cacodylate de sodium et contrasté à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyle 2 % dans l'eau pendant 15 min (coloration « en bloc »). Il est rincé 5 min dans l'eau et déshydraté dans des bains de 10 min d'acétonitrile/eau dont le rapport est croissant (50/50 ; 70/30 ; 90/10). Enfin, le culot cellulaire est placé dans 3 bains d'acétonitrile de 10 min puis passé dans un mélange de résine Epon® et d'acétonitrile (50/50) pendant 2 h puis

renouvelé et laissé incubé 1 nuit. Trois bains de 2 h de résine pure sont effectués jusqu'à inclusion définitive. Les échantillons sont mis à l'étuve 70°C durant 3 jours. Grâce à un ultramicrotome (Reichert Ultracut E), des coupes d'environ 90-100 nm sont réalisées et récupérées sur des grilles de cuivre 150 mesh. Leur contraste est augmenté par des bains d'acétate d'uranyle (4 min) et de citrate de plomb (4 min) selon la technique de Reynolds [4]. Les coupes sont observées au microscope électronique à transmission (Hitachi H600) à 75 kV.

6.5 Imagerie calcique :

Les cellules, cultivées sur des lamelles en verre dans des boîtes de pétri, sont mises en contact avec une sonde calcique Fura-2/AM (2,5 μ M dans le milieu de culture) pendant 45 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite incubées 10 minutes supplémentaires avec du milieu sans sonde pour rincer le surplus du milieu extracellulaire. Les cellules sont enfin rincées avec du tampon PBS et observées au microscope à épifluorescence (Olympus IX 70).

6.6 Etude de la transfection :

Les cellules HEK sont cultivées dans des plaques à 12 puits (2 x 10⁵ cellules / puits) 48 h avant les expériences. Les cellules sont lavées avec du PBS, maintenues dans du milieu DMEM dépourvu de sérum et incubées pendant 4 h en présence de complexes PEI/ADNp et NCL25-T/ADNp à 37 °C dans une atmosphère CO₂ à 5 %. Après incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et maintenues dans du milieu supplémenté avec 10 % FBS pendant 20h à 37°C.

6.6.1 Microscopie confocale :

Les cellules transfectées sont lavées avec du PBS chaud, fixées avec du paraformaldéhyde 4 % à température ambiante pendant 15 min. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, montées sur une lame en verre et observées à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1-R (Nikon Instruments, Tempe, AZ) (Nikon Ph1 DLL 10x/0.30 objectif Plan de Fluor) avec une excitation à 488 nm.

6.6.2 Cytométrie de flux :

Le taux de transfection a été évalué par cytométrie de flux. Les cellules exprimant la GFP ont été quantifiées en utilisant un cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences). Un total de 10 000 populations a été analysé pour chaque échantillon. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel CellQuest.

6.7 Etude de l'apoptose induite par le paclitexel :

L'apoptose a été identifiée morphologiquement avec le colorant DAPI. Les cellules cultivées dans des plaques à 24 puits contenant des lamelles en verre (25 000 cellules par puits) sont maintenues en culture pendant 24 h à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures avec du PTX (1 mg/mL), les NCL25-T (concentration en NCL25-T de 500 µg/mL), les NCL25-PTX-T (concentration en nanocapsules de 500 µg/mL et en PTX de 1 mg/mL) et du milieu de culture comme contrôle négatif. Les échantillons sont fixés avec 4 % de PFA dans du PBS à température ambiante pendant 15 minutes, marqués avec 0,1 mg/mL de DAPI dans du PBS à température ambiante pendant 15 minutes et rincés deux fois avec du PBS. Les lamelles sont montées sur des lames en verre et observées au microscope à fluorescence en utilisant le filtre DAPI. L'énumération des noyaux apoptotiques (à peu près 300 cellules ont été comptées) est effectuée de façon aléatoire et en deux expériences indépendantes.

6.8 Etude du cycle cellulaire de l'ADN :

Les cellules HeLa et MDA-MB-231 cultivées dans des plaques à 12 puits (2×10^5 cellules / puits) sont traitées avec les NCL25-PS à 1 µM de PS pendant 8h dans du milieu DMEM sans sérum. Elles sont ensuite lavées avec du PBS et le milieu DMEM complet est rajouté dans les puits. Les cellules sont alors irradiées avec la lampe visible pendant 12 min à 10 mW et maintenues en culture pendant 2 h à 37°C. Après un traitement à la trypsine, les cellules sont fixées avec l'éthanol froid à -20°C. La suspension cellulaire est centrifugée, rincée deux fois au PBS et le culot est resuspendu dans 500 µL de solution PBS contenant de la ribonucléase A (200 µg/mL) et de l'iodure de propidium (IP, 100 µg/mL). La fluorescence de l'IP est détectée dans une échelle linéaire en utilisant un cytomètre de flux (FACS) équipé d'un laser d'excitation de 488 – 633 nm. Au moins 10 000 événements sont recueillis pour chaque échantillon.

6.9 Localisation intracellulaire des NCL25-PS :

Les cellules HeLa et MDA-MB-231 sontensemencées sur des lamelles en verre dans des plaques à 12 puits (2×10^5 cellules / puits) 48 h avant les expériences. Les cellules sont lavées avec du PBS, maintenues avec du milieu sans sérum et incubées pendant 6 h en présence de NCL25-PPIX, NCL25-Hy et NCL25-PPIX-Hy à 1 µM de PS. Après incubation à 37°C, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS puis fixées au PFA 4% pendant 15 min à température ambiante. Les cellules fixées sont ensuite rincées avec du PBS, montées et observées en utilisant un microscope à fluorescence le vidéo-microscope Leica AF6000 Lx avec les filtres appropriés

(CFP (λ_{exc} 427 nm) pour la fluorescence de PPIX et Mcherry (λ_{exc} 560 nm) pour la fluorescence de l'hypéricine).

7. Génération d'oxygène singulet :

La génération de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ par les nanocapsules lipidiques chargées en PS est réalisée par la méthode indirecte du blanchiment du RNO à 440 nm. Une solution contenant les NCL25-Hy, NCL25-PPIX ou NCL25-PPIX-Hy est préparée en présence d'imidazole (8 mM) et de RNO (12,5 μM) dans un tampon phosphate à 50 mM (pH = 7,4). Les échantillons placés dans une cuvette de spectrométrie de 1 cm sont irradiés à température ambiante pendant 15 minutes en utilisant une lampe visible (Spot Light Source de 400-700 nm, L9566-03, Hamamatsu, Japon). L'intensité de la lumière est fixée à 0,6 W. La diminution de l'absorbance maximale à 440 nm causée par le blanchiment du RNO est suivie par le spectrophotomètre avec une résolution de 1 nm dans la région de 350-550 nm. Toutes les mesures sont effectuées en triplicat.

Références bibliographiques :

1. Vandenberghe, M., *Implication des canaux perméables au calcium dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain*. 2011, Thèse à l'Université de Lille 1.
2. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 875-80.
3. Benoit, J.P., et al., *Method for preparing functionalized lipid capsules*. 2010. Patent WO 2010113111 A1.
4. Reynolds, E.S., *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 208-12.

Annexe

Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging†

Cite this: *Nanoscale*, 2014, 6, 7379Nadia Skandrani,^{ab} Alexandre Barras,^a Dominique Legrand,^c Tijani Gharbi,^{bd} Hatem Boulahdour^{bd} and Rabah Boukherroub^{*a}

The paper reports on the preparation of lipid nanocapsules (LNCs) functionalized with poly(ethyleneimine) (PEI) moieties and their successful use as drug and gene delivery systems. The cationic LNCs were produced by a phase inversion process with a nominal size of 25 nm and subsequently modified with PEI chains using a transacylation reaction. The functionalization process allowed good control over the nanoscale particle size (26.2 ± 3.9 nm) with monodisperse size characteristics ($PI < 0.2$) and positive surface charge up to +18.7 mV. The PEI-modified LNCs (LNC25-T) displayed good buffering capacity. Moreover, the cationic LNC25-T were able to condense DNA and form complexes via electrostatic interactions in a typical weight ratio-dependent relationship. It was found that the mean diameter of LNC25-T/pDNA complexes increased to ~40–50 nm with the LNC25-T/pDNA ratio from 1 to 500. Gel electrophoresis and cell viability experiments showed that the LNC25-T/pDNA complexes had high stability with no cytotoxicity due to the anchored PEI polymers on the surface of LNCs. Finally, the transfection efficiency of the LNC25-T/pDNA complexes was studied and evaluated on HEK cell lines in comparison with free PEI/pDNA polyplexes. The combination of cationic LNCs with pDNA exhibited more than a 2.8-fold increase in transfection efficiency compared to the standard free PEI/pDNA polyplexes at the same PEI concentrations. Moreover, we have demonstrated that LNC25-T/pDNA loaded with a hydrophobic drug, paclitaxel, showed high drug efficacy. The high transfection efficiency combined with the potential of simultaneous co-delivery of hydrophobic drugs, relatively small size of LNC25-T/pDNA complexes, and fluorescence imaging can be crucial for gene therapy, as small particle sizes may be more favorable for *in vivo* studies.

Received 27th February 2014
Accepted 19th April 2014

DOI: 10.1039/c4nr01110d

www.rsc.org/nanoscale

Introduction

Intracellular delivery of DNA is a major topic in the field of drug delivery. The successful administration of healthy genes in the body is a very promising technique to treat various diseases that display a genetic component. Despite the progress in gene therapy, there has been only limited progress toward this goal, mainly due to the lack of broadly applicable delivery systems. Additional needs are also necessary for the development of systemic gene delivery.^{1,2} Indeed such carriers can reach directly non-accessible tumors or metastases. *In vitro*, primary cell lines

also appear to be essential and biologically relevant for gene therapy investigation. Unfortunately, transfection of primary cells is still limited and often failed.³

Two different systems, namely viral and non-viral vectors, have been explored for gene transfection. Even though viruses appear as ideal delivery systems, the associated risks can be insertional mutagenesis and/or problems related to high immunogenicity and cytotoxicity.⁴ Compared to the viral vectors, nanoparticle systems for gene delivery have been utilized in spite of their low efficacy for intracellular gene transfer.⁵ The main challenge is thus to prepare a non-toxic and effective delivery system. The production of non-viral delivery systems appears also cost effective compared to viral vectors. In this respect, the use of cationic lipids or polymers, lipid nanoparticles and liposomes as non-viral carriers for gene therapy has been investigated.^{6,7} Cationic lipid- and polymer-based carriers are by far the most representative utilized systems.^{8–11} Cationic lipid-based vectors, called lipopolyplexes, were first introduced by Felgner *et al.*¹² and prepared through simple electrostatic interactions between the positive charges of the cationic lipids and the negatively charged phosphate backbones of

^aInstitut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, USR CNRS 3078), Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: rabah.boukherroub@iri.univ-lille1.fr; Fax: +33 3 62 53 17 01; Tel: +33 3 62 53 17 24

^bLaboratoire de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique, Université de Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France

^cUnité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576), Institut Fédératif de Recherche no. 147, Université Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^dCHRU Jean Minjoz, 3 Bd Alexandre Fleming, 25030 Besançon, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4nr01110d

oligonucleotides. DOTMA and DOTAP, which are both two acyl chains linked to a propyl ammonium group, are the most utilized cationic lipids. The efficiency of DNA delivery using these systems depends on a number of factors. These include not only the nature of the lipids and co-lipids, but also the morphology of the lipoplexes (size, charge and stability).

An alternative gene carrier to cationic lipid-based vectors, called polyplexes (cationic polymer-DNA complexes), was introduced by Wu *et al.*¹³ These systems differ from lipids in that they do not contain a hydrophobic moiety and are completely soluble in water. Furthermore, cationic polymers offer a much higher flexibility as they not only can be easily synthesized in different lengths and geometries, but also can be modified with various functional groups.¹⁴ For example, Forrest *et al.*¹⁵ showed an enhancement in gene transfection efficiency of modified PEIs by acetylation. This has been attributed to the modulation of the 'proton-sponge' effect and plasmid DNA interaction with the modified PEIs. More importantly, cationic polymers can condense DNA molecules to a relatively small size, as compared to cationic liposomes. This property can be crucial for gene therapy, as small particle sizes may be more favorable for *in vivo* studies.¹⁶ The chemical properties of synthetic polymers, such as polyethyleneimine (PEI) and polylysine (PLL), are frequently used to condense plasmid DNA, leading to particles that are able to transfect cells. PEI exhibits a high density of amino groups and retains buffering capacity over a wide range of pH.¹⁷

Lipid nanocapsules (LNCs) belong to this generation of stealth colloidal carriers.¹⁸ These nanocapsules are obtained without an organic solvent and with pharmaceutically acceptable excipients. Such nanocapsules present a stable monodisperse size distribution and their mean diameter can be well-controlled in the range of 20–95 nm.¹⁹ They are made up of an oily liquid triglyceride core surrounded by a hydrophilic surfactant, solutol® HS15, which exposes a medium PEG chain containing an average of 15 ethyleneglycol units conferring long-circulating properties²⁰ and inhibiting the P-glycoprotein efflux pump (P-gp).^{21,22} More recently, gene delivery carriers based on the encapsulation of DNA lipoplexes into lipid nanocapsules have been designed, leading to the formation of neutral 110 nm-DNA nanocapsules.²³ Amphiphilic and flexible polyethylene glycol polymer coatings were also selected to make long-circulating DNA lipid nanocapsules.^{24,25} However, even if PEG-functionalized nanoparticles can extend plasma circulation time and protect the vector in blood circulation, PEG coating represents paradoxically a major barrier for internalization. Therefore, galactosylated-PEG-coated DNA lipid nanocapsules increased the transfection efficiency compared to non-targeted ones.²⁶ More recently, Weyland *et al.*²⁷ have reported an elegant method for pDNA or siRNA delivery, using LNCs functionalized with a L1 papillomavirus type-16 capsid-derived lipopeptide on their surface, into U87MG glioma cells and Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells. The results showed that even though the peptide functionalized L1-LNCs were able to form complexes with both pDNA and siRNAs, the pDNA/L1-LNC complexes displayed only weak transfection efficiency.

The aim of our study is to evaluate cationic PEI-functionalized LNCs for gene delivery (Fig. 1). Taking advantage of the

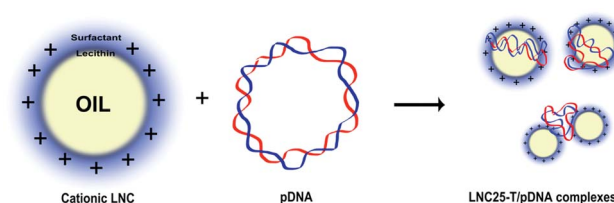


Fig. 1 Schematic representation of PEI modified lipid nanocapsules (LNC25-T), plasmid DNA and LNC25-T/pDNA complexes.

high transfection of PEI, the amino groups of small "PEI-dendrimer-like"-LNCs will participate in pDNA binding, condense it into very small size particles and increase its cellular entry, while maintaining the 'proton-sponge' effect and the endosomal escape.¹⁷

In this work, we report on the preparation and characterization of PEI-modified LNCs. The resulting cationic LNCs were characterized in terms of size, charge and PEI loading. The PEI-modified LNCs were subsequently used for plasmid DNA condensation. The PEI-modified LNC/pDNA (LNC25-T/pDNA) complexes were evaluated for their binding capacity, their cellular toxicity, and their transfection efficacy. Furthermore, LNC25-T/pDNA loaded with a hydrophobic anti-cancer drug, paclitaxel, showed good drug efficacy, indicating the potential of these carriers for co-delivery of pDNA and paclitaxel.

Experimental section

Materials

Lipid nanocapsules were made of Labrafac™ Lipophile WL 1349 (caprylic/capric triglyceride), Phospholipon® 90G (soybean lecithin at 97.1% of phosphatidylcholine), and Solutol® HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) generously provided by Gattefosse S.A.S. (Saint-Priest, France), Phospholipid GmbH (Köln, Germany), and Laserson (Etampes, France), respectively. Polyethyleneimine (PEI, MW 1.8 kDa), DNase I (Type IV, D5025), 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, 97%), 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO), 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and paclitaxel (PTX, ≥95%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), trypsin, fetal bovine serum (FBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Opti-MEM, penicillin/streptomycin, and L-glutamine were purchased from Fisher Scientific SAS (Illkirch, France). Plasmid DNA (pEGFP-N1) was purchased from Clontech (Mountain view, CA). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France). All other chemical reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and used as received.

Preparation of lipid nanocapsules (LNC25) and paclitaxel-loaded LNCs (LNC25-PTX)

LNCs were formulated at a nominal size of 25 nm using a phase inversion method of an oil/water system, as described by

Heurtault.¹⁸ Briefly, the oil phase was mixed with appropriate amounts of Solutol, Phospholipon 90G, NaCl and distilled water, and heated under magnetic stirring up to 85 °C. The mixture was subjected to 3 temperature cycles from 70 to 90 °C under magnetic stirring and was cooled to 78 °C. 3.3 mL of distilled cold water (0 °C) were added, and the suspension was kept under stirring at room temperature for another 10 min before further use. The composition of the formulation is summarized in Table 1.

For dye-loaded LNC25, a fluorescent dye (DiI or DiO) was mixed with Labrafac at a concentration of 0.2 wt% and the formulation was achieved as described above.

For the formulation of PTX-loaded LNCs, the drug (PTX, 1 mg in acetone) was first solubilized in Labrafac. Acetone was removed by evaporation (rotary evaporator). Solutol HS15, Phospholipon 90G, NaCl and water were then added to this solution, and LNCs were produced as described above.

The percentage composition is just the mass percentage of the components of the lipid nanocapsules (a total initial mass of 1.26 g). LNCs were purified from the supernatant using disposable PD-10 desalting columns (Sephadex® G-25 for gel filtration as the stationary phase, Amersham Biosciences). A column was stabilized with 25 mL of distilled water; 2 mL of a suspension of LNCs were deposited on the column and 0.5 mL of water was added to complete the dead volume of the column. Then 4 mL of distilled water was eluted and the LNCs were collected as eluant. The suspension was dialyzed (pore size: 6000–8000 Da) against deionized water overnight. The solution was freeze-dried and weighed in order to estimate the concentration.

Determination of drug loading

The drug loading was determined by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). RP-HPLC analyses were performed on a Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of a mixture of eluent A (trifluoroacetic acid 0.1% in water) and eluent B (trifluoroacetic acid 0.1% in acetonitrile) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The reverse phase column was a 5 µm C4 QS Uptisphere® 300 Å, 250 × 4.6 mm column (Interchim, Montluçon, France). The column was maintained at 40 °C. The linear gradient was 0 to 80% of eluent B during 30 min. The sample solution was injected at a volume of 40 µL and the detection wavelength was 227 nm. The HPLC was calibrated with standard solutions of 1 to 100 µg mL⁻¹ of PTX dissolved in acetonitrile. Calibration curves were obtained by linear regression of the PTX concentration (µg mL⁻¹) versus the peak area (Table 2).

Table 1 Composition of the components for lipid nanocapsule preparation for a total initial mass of 1.26 g

	Labrafac (%)	Solutol (%)	Phospholipon 90G (%)	NaCl (%)	Water (%)
LNC25	20.0	32.4	3.0	1.7	42.9

Table 2 Calibration curves and linear regression of PTX

Compounds	Retention time	Regression equation ^a	k _{PTX}	Linear range	r ^{2b}
PTX	18.5 min	Y = 65 885X	65 885	1–100 µg mL ⁻¹	1

^a Equation, where Y is the peak area and X is the concentration of compounds. ^b Correlation coefficient (n = 10).

Preparation of PEI-transacylated lipid nanocapsules (LNC25-T) and (LNC25-PTX-T)

Paclitaxel-loaded LNCs or drug-free LNCs were functionalized with PEI using a transacylation reaction, as described by Benoit *et al.*²⁸ Briefly, a mixture of 4 mL of LNC25 solution (25 mg mL⁻¹) and 1 M NaOH solution (2 µL, pH ~ 10.6) was stirred for 30 min at room temperature. Then, 500 µL of an aqueous solution of PEI (10% by weight) was added. The resulting suspension was left to react for 30 min under stirring and neutralized with 1 M HCl aqueous solution (pH 7.4). The suspension was then dialyzed (pore size: 6000–8000 Da) against deionized water for 2 days (changed thrice daily) to yield 15 mg mL⁻¹ of LNC-25T or LNC25-PTX-T.

Preparation of LNC25-T/pDNA and LNC25-PTX-T/pDNA complexes

pEGFP-N1 pDNA was amplified in *Escherichia coli* and purified using a NucleoBond Xtra Midi plasmid purification kit (Macherey-Nagel), according to the supplier's protocol. The yield and quality of the purified pDNA were determined by measuring the absorbance at 260 and 280 nm and adjusted at 1 µg µL⁻¹. LNC25-T/pDNA or LNC25-PTX-T/pDNA complexes were prepared by mixing a constant amount (1 µg) of plasmid DNA with different amounts of LNC25-T or LNC25-PTX-T. LNC25-T or LNC25-PTX-T/pDNA complexes were formulated by briefly vortexing 1 µg pDNA solution in water with various amounts of LNC25-T or LNC25-PTX-T stock suspension (15 mg mL⁻¹), corresponding to LNC25-T or LNC25-PTX-T/pDNA weight ratios ranging from 1 to 500, in a final volume of 1 mL. The mixture was incubated for 30 min at room temperature for the formation of LNC25-T/pDNA or LNC25-PTX-T/pDNA complexes.

Particle size and zeta potential

The LNC average diameter and polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). The zeta potential was measured in the electrophoretic mode with the Zetasizer®. All the batches were diluted at 1/10 (v/v) in distilled water (filtered over 0.22 µm) prior to the analysis and performed in triplicate.

Quantitative analysis of PEI incorporation by RP-HPLC

The amount of PEI was directly determined by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). RP-HPLC analyses were performed on a Shimadzu LC2010-HT

(Shimadzu, Tokyo, Japan). A 5 μm C₄ QS Uptisphere® 300 Å, 250 $\times$ 4.6 mm column (Interchim, Montluçon, France) was used as the analytical column. The column was heated to 40 °C. The mobile phase was a mixture of eluent A (trifluoroacetic acid 0.1% in H₂O) and eluent B (trifluoroacetic acid 0.1% in CH₃CN) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The linear gradient was 0 to 80% of eluent B during 30 min and detection was performed at 215 nm. A 10 mg mL⁻¹ stock solution of PEI was prepared in water for the calibration curve. Concentrations of 0.5–5 mg mL⁻¹ of PEI in water were prepared from this stock. Each sample was injected (40 μL) into the RP-HPLC column. Calibration curves were obtained by linear regression of the PEI concentration (mg mL⁻¹) versus the peak area; the results are shown in Table 3.

Determination of the buffering capacity

The buffering capacity of PEI, LNC25 and LNC25-T was determined by recording the pH variation during the titration of the basic LNC suspension with 0.1 M HCl solution. 3 mL of the LNCs (200 μg mL⁻¹) were dispersed in water, and the pH of the solution was adjusted to 10.6 ± 0.1 with 1.0 M NaOH. Then 0.1 M HCl solution was added slowly to the suspension and the pH was recorded.

Gel retardation assay

The condensation ability of LNC25-T with pDNA was assessed by gel retardation assay. The complexes containing pDNA (1 μg in a final volume of 20 μL) were prepared in water at various LNC25-T/pDNA ratios ranging from 1 to 500. After 30 min incubation at room temperature, electrophoresis was carried out with 1% agarose gel (w/v) containing ethidium bromide in 1 $\times$ Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at 90 V for 50 min. The retardation of complexes was visualized on a UV trans-illuminator using a Gel Doc System. The values represent the weight ratios of LNC25-T/pDNA in a 20 μL volume.

DNase I protection assay

LNC25-T/pDNA complexes were prepared as described above at various LNC25-T/pDNA ratios ranging from 1 to 500 in a final volume of 20 μL . DNase I was added to naked pDNA (1 μg), LNC25 (100 μg) and each complex to a final concentration of 1U DNase I/ μg pDNA. The samples were incubated at 37 °C for 30 min. The digestion was stopped by the addition of EDTA to a final concentration of 5 mM. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was added to the samples to a final concentration of 1% to release pDNA from LNCs. The mixtures were further incubated at room temperature for 30 min. Finally, the samples were carefully applied on a 1% agarose gel (w/v) containing ethidium bromide in 1 $\times$ Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at 90 V for 50 min. The

integrity of pDNA in each sample was compared with untreated pDNA.

Cell culture and MTT-based cell viability assay

HEK293 (Human Embryonic Kidney) cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were seeded into 24-well plates (1 $\times$ 10⁵ cells per 500 μL media per well) 48 h before experiments. Prior to incubation, cells were washed with PBS. The medium was replaced with 500 μL of serum-free medium containing LNC25-T/pDNA complexes. After 6 h incubation, cells were washed three times with PBS and then maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. After 18 h at 37 °C, cell viability was colorimetrically measured by performing MTT assays. After removing the medium and washing with warm PBS, 500 μL of MTT solution (1 : 10 dilution of 5 mg mL⁻¹ fresh MTT stock solution in PBS) were added. After incubation for another 3 h, the resultant formazan dye was dissolved in dimethylsulfoxide (100 μL) and the absorbance intensity was measured using a microplate reader (PHERAstar FS, BMG LABTECH GmbH, Germany) at 570 nm with background subtraction at 650 nm. Cell viability was displayed as the percentage of live cells per total non-treated cells.

In vitro transfection studies

HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were seeded into 12-well plates (2 $\times$ 10⁵ cells per 1 mL media per well) 48 h before experiments. Cells were washed with PBS, maintained in serum-free medium and incubated for 4 h in a CO₂ atmosphere at 37 °C in the presence of free PEI/pDNA in water and LNC25-T/pDNA complexes. After incubation, cells were washed three times with PBS and then maintained in DMEM supplemented with 10% FBS for 20 h.

Apoptosis induced by paclitaxel-loaded nanocapsules (LNC25-PTX-T)

Apoptosis was identified morphologically by 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. HEK293 cells were seeded in a 24-well plate containing a coverslip with 25 000 cells per well and cultured at 37 °C for 24 h. Cells were then incubated for 4 h with PTX (a concentration of 1 μg mL⁻¹), LNC25-T (at LNC concentration of 500 μg mL⁻¹), LNC25-PTX-T (at LNC concentration of 500 μg mL⁻¹ and a PTX concentration of 1 μg mL⁻¹) and culture medium as the control. Samples were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min, stained with 0.1 μg mL⁻¹ DAPI in PBS at room temperature for 15 min, and washed twice with PBS and water. Coverslips

Table 3 Calibration curves and linear regression of PEI

Compounds	Retention time	Regression equation ^a	k_{PEI}	Linear range	r^{2b}
PEI	8.5 min	$Y = 2\,472\,800X$	2 472 800	0.5–5 mg mL ⁻¹	0.9954

^a Equation, where Y is the peak area and X is the concentration of compounds. ^b Correlation coefficient ($n = 10$).

were mounted onto glass slides. The slides were then examined using a fluorescent microscope with a DAPI excitation filter. Enumeration of apoptotic nuclei (about 300 cells were counted) was made on slides picked up at random by two independent experimenters.²⁹

In vitro delivery of paclitaxel

HEK293 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The cells were maintained in an incubator supplied with 5% CO₂ at 37 °C. HEK293 cells were seeded in 24-well plates at the density of 10⁵ cells per well and incubated 24 h to allow cell attachment. The cells were then incubated with free PTX, LNC25-PTX-T/pDNA (LNC concentrations of 100 to 500 µg mL⁻¹, PTX concentrations of 0.22 to 1.10 µg mL⁻¹) and drug-free LNC25-T/pDNA (LNC concentrations of 100 to 500 µg mL⁻¹) for 4 h, washed with PBS and incubated for an additional 20 h at 37 °C. At determined time, the cells were incubated with DMEM medium containing MTT (5 mg mL⁻¹) for 4 h. MTT was removed and DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm. Untreated cells were taken as the control with 100% viability.²⁹

Cell imaging

HEK cells were seeded onto 12 mm sterile coverslips in a 24-well plate. After 24 h, cells were incubated with LNC25-T/pDNA loaded with DiI or LNC25-T/pDNA loaded with DiO (final concentration of 100 µg mL⁻¹ and 1 µg for pDNA) for 4 h at 37 °C. After incubation, the cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min and then stained with 0.1 µg mL⁻¹ DAPI in PBS. Coverslips were mounted on glass slides and observed using a Nikon A1-R (Nikon Instruments, Tempe, AZ) laser confocal microscope excited at 404 nm (DAPI), 561 nm (DiI) and 488 nm (DiO).

Confocal microscopy

Transfected cells were washed with warm PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min. Cells were then washed three times with PBS, mounted and observed using a Nikon A1-R (Nikon Instruments, Tempe, AZ) laser confocal microscope (Nikon Ph1 DLL 10×/0.30 Plan Fluor objective) excited at 488 nm.

FACS analysis

Transfection efficiency analysis was performed in triplicate and was evaluated by scoring the percentages of cells expressing GFP using a FACSCalibur flow cytometer (BD, Biosciences). A total of 10 000 events were acquired for each sample. The data analysis was performed using CellQuest software.

Statistical analysis

The results are presented as mean ± standard deviation (SD) and comparisons between the groups were made using Student's *t* test; *p*-values less than 0.05 were considered to indicate a significant difference.

Results and discussion

Preparation and characterization of PEI-transacylated LNCs (LNC25-T) and LNC25-PTX-T

It is well-documented that the physical properties of non-viral vectors can modify their cytotoxicity and delivery efficiency.³⁰ Lipid nanocapsules (LNCs) with a nominal size of 25 nm, investigated in the present study, were produced using an established experimental protocol.¹⁸ Briefly, LNC formulation was achieved by mixing labrafac, solutol, and phospholipon at optimized concentrations using the phase inversion-based process as described above. This method offers good control over the nanocapsules' size (27.3 ± 0.6 nm) with monodisperse size characteristics (PI < 0.2) (Table 4).

Paclitaxel (PTX) was encapsulated in the LNCs using the same protocol as above. PTX was entrapped in the LNCs with high encapsulation efficiency (~100%), favored by the low solubility of PTX in water. The physicochemical properties of LNC25-PTX are comparable to those of the blank LNCs, and the presence of PTX had no effect on the mean diameter and the polydispersity index. Similarly, the zeta potential of the LNCs was not affected by PTX loading (Table 4).

LNC functionalization with polyethyleneimine (PEI, MW 1.8 kDa) was achieved using the transacylation method (Fig. 2).²⁸ Briefly, mixing PEI with a suspension of LNCs under basic conditions (pH ~ 10.6) leads to the formation of cationic lipid nanocapsules (LNC25-T). The PEI-functionalized LNC25 were purified by dialysis in order to remove unbound and excess PEI.

The transacylation reaction has the advantage of controlling the amount of PEI molecules to be incorporated onto the LNC surface. Indeed, a high concentration of PEI on the capsules' surface may severely alter the interesting properties of the PEG moieties such as long circulation time and the "enhanced permeability and retention (EPR) effect". As described by Petersen *et al.*, the degree of PEGylation of PEI-graft-PEG copolymer/DNA complexes was found to modulate DNA condensation and subsequently affect the transfection efficiency.³¹

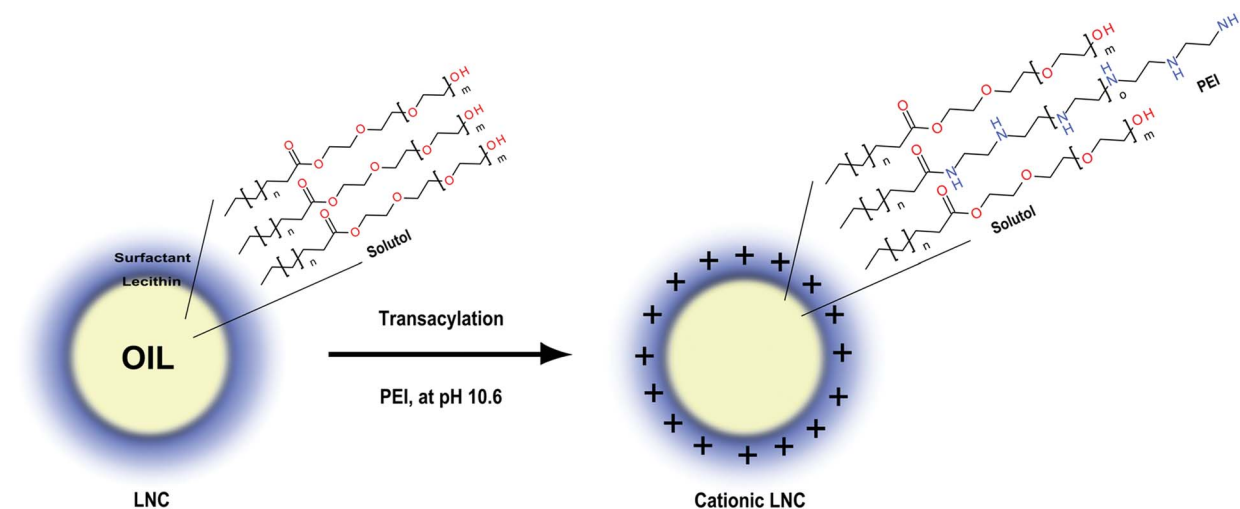
The choice of PEI was made on the basis of previous studies on the effect of the polymer molecular weight on the transfection efficiency and cytotoxicity.^{32–34} Indeed, it is well-established that high molecular weights and branched PEIs have not only high transfection efficiency, but also high toxicity due to high cationic charge. In contrast, low molecular weight PEIs are less toxic but display low transfection efficiency. To achieve high transfection efficacy and good biocompatibility, PEI modification with hydrophobic moieties such as cholesterol,^{30,35–39} myristate,³⁹ dodecyl iodide,⁴⁰ hexadecyl iodide,⁴⁰ palmitic acid,^{41,42} oleic acid,⁴³ stearic acid,^{43,44} and phosphatidylcholine^{45,46} has been undertaken as a common strategy. We have applied this approach by using a low molecular weight PEI (1.8 kDa) directly inserted to the long alkyl chain of the solutol (Fig. 2). The linear PEI with a low molecular weight will allow modulating the positive surface charge of LNCs, favorable for DNA condensation, while limiting the toxicity and the size of the resulting LNC-T/pDNA complex.

As shown in Table 4, the mean diameter of the LNC after transacylation with PEI remained roughly constant (26.2 nm)

Table 4 Characterization of the lipid nanocapsules before and after functionalization with PEI^b

	Mean diameter (nm)	PI ^a	Zeta potential (mV)	PTX	EE (%)
LNC25	27.3 ± 0.6	0.183 ± 0.032	+0.8 ± 0.4	—	—
LNC25-T	26.2 ± 3.9	0.199 ± 0.050	+18.7 ± 1.6	—	—
LNC25-PTX	25.1 ± 0.9	0.13 ± 0.019	−1.9 ± 0.9	+	100.2 ± 1.4
LNC25-PTX-T	25.7 ± 0.7	0.19 ± 0.003	+16.6 ± 0.5	+	33 ± 0.8

^a Polydispersity index. ^b Mean ± SD, *n* = 3.

**Fig. 2** Schematic representation of the transacylation reaction of LNCs with PEI at pH 10.6.

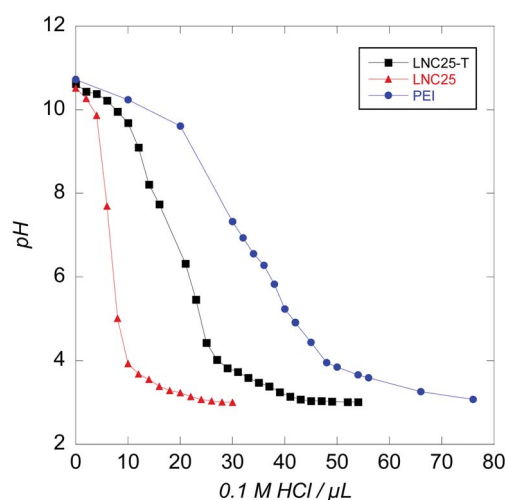
with a narrow-size distribution ($PI < 0.2$). Compared to LNC25, the surface charge of LNC25-T increased from +0.8 mV to +18.7 mV, in accordance with the chemical nature of PEI grafted on the LNC surface.

In order to determine the amount of PEI on the LNC surface, quantitative analysis was performed by RP-HPLC. The results indicate ~0.131 mg PEI incorporation per mg of LNCs.

The LNCs loaded with PTX were functionalized with PEI moieties using the transacylation reaction under otherwise similar conditions as those used for drug-free LNCs. PEI grafting on the LNC25-PTX did not affect the size of the capsules. Indeed, LNC25-PTX-T displayed an average diameter of 25.7 nm with a narrow size distribution ($PI < 0.2$). However, the zeta potential of the LNC25-PTX-T increased from −1.9 to +16.6 mV, suggesting PEI grafting on the LNC surface. It is important to notice that upon PEI functionalization, there is significant release (about 67%) of PTX from the capsules (Table 4). The PTX leakage was most likely accelerated by the basic conditions required by the transacylation reaction.

Molecules entering cells through endocytosis will experience a change in the pH from neutral to 5.0,⁴⁷ and lysosomal degradation of therapeutic genes was one of the main cellular barriers to effective gene delivery. The “proton sponge” property of PEIs is believed to lead to buffering in endosomes and is responsible for the endosomal release of pDNA complexes.⁴⁸ To assess the capacity of LNC25-T/pDNA to buffer the pH drop, the change of the pH of initially basic aqueous solutions of PEI

(1.8 kDa), LNC25 and LNC25-T/pDNA was measured upon addition of increasing amounts of 0.1 M HCl (Fig. 3). It has been established that PEIs possess a high buffering capacity over a pH range of 3–10.⁴⁹ Indeed, these polymers experience a small change in pH upon addition of small amounts of HCl during titration. This contrasts the behavior of naked LNC25 upon

**Fig. 3** Titration curves recorded by titrating aqueous suspensions of LNC25-T (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, black), LNC25 (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, red) and free PEI (27 $\mu\text{g mL}^{-1}$, blue) in water with 0.1 M HCl.

addition of increasing amounts of 0.1 M HCl, where a rapid change of the pH was observed upon addition of a small amount of 0.1 M HCl. Similarly, titration of initially basic aqueous LNC25-T with HCl showed that the PEI-modified nanocapsules maintained a partial buffering capacity compared to LNCs; the solution pH of LNC25-T changed more slowly (Fig. 3).

This proton absorption character must be the initial requirement for endolysosomal disruption *via* the 'proton sponge effect'.

Preparation and characterization of LNC25-T/pDNA complexes

Condensation of pDNA to cationic lipid nanocapsules appears to be a key step for gene delivery. Mixing cationic lipid nanocapsules with negatively charged pDNA leads to the formation of stable LNC25-T/pDNA complexes through electrostatic interaction. The size and zeta potential measurements of LNC25-T/pDNA complexes at various weight ratios were recorded and the results are shown in Fig. 4. Positively charged LNC25-T were able to form complexes with pDNA *via* electrostatic interactions in a typical weight ratio-dependent relationship. It was found that the mean diameter of LNC25-T/pDNA complexes increased to ~40–50 nm with the LNC25-T/pDNA ratio from 1 to 500. We also studied the zeta potential of these LNC25-T/pDNA complexes. The complexation of pDNA with LNC25-T leads to the neutralization of the positive charge of LNC25-T. As expected, with an excess of pDNA (1 : 1 ratio), the average zeta potential became negative (−19 mV). When the LNC25-T/pDNA ratio was increased, the surface charge of the complexes became positive ~+20 mV. At LNC25-T/pDNA ratio = 50, the complex displayed a size of 33 nm and a surface charge equal to +22 mV. Thus, the ideal ratio seems to be around 50 or higher. A positive surface charge is important not only for DNA binding *via* electrostatic interactions, but also for the cellular uptake. Indeed, a positive charge of LNC25-T/pDNA complexes could facilitate their endocytosis.⁶ Unmodified LNC25 showed a much weaker interaction with pDNA compared to LNC25-T and zeta potentials of LNC25/pDNA did not reach positive values for any weight ratio (data not shown).

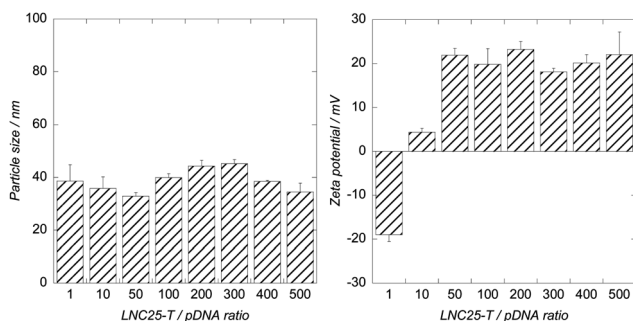


Fig. 4 Size and zeta potential measurements of LNC25-T/pDNA complexes in aqueous solutions (1 mL); pDNA (1 μ g) was incubated with increasing amounts of LNC25-T in water for 30 min at room temperature.

In contrast, incubation of pDNA (1 μ g) with increasing amounts of PEI for 30 min at room temperature led to large PEI/pDNA complexes with a minimum size of 500 nm for a PEI/pDNA ratio of 500 and exceeding 800 nm for a PEI/pDNA ratio of 50 (Fig. S1†). This particle size is comparable to that reported for 1800 Da PEI/DNA complexes (800 nm) by Chen *et al.*⁵⁰ and was ascribed to the low cationic charge density and binding ability of 1800 Da PEI. This result highlights the ability of the LNC25-T vectors to condense pDNA into nano-sized particles (<50 nm) at all selected LNC25-T/pDNA complex weight ratios, which is favorable for efficient entry into the cells *via* endocytosis. The LNC25-T/pDNA size is also lower than that reported for other pDNA complexes formed using PEI of the same molecular weight (1.8 kDa) such as PEI-thioctic acid (199 nm), PEI-lauric acid (181–212 nm)⁵⁰ and heparin-conjugated PEI (250 nm).⁵¹ This result may account not only for the use of low molecular weight PEI, but also for the low density and organization of the PEI chains covalently grafted on the LNC surface.

pDNA binding to LNC25-T was further studied using agarose gel retardation assay at different weight ratios (Fig. 5A). To confirm the optimal ratio between LNC25-T and pDNA, different complexes were prepared at various weight ratios of 1 : 1, 10 : 1, 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1, 300 : 1, 400 : 1, and 500 : 1. At 1 : 1 and 10 : 1 ratios, complete binding was not observed and a free pDNA band appeared in the gel. Complete retardation of 1 μ g of pDNA required 50 μ g of LNC25-T, suggesting that pDNA was bound tightly and completely with LNC25-T for a weight ratio superior or equal to 50, whereas control LNC25 (100 μ g) were not able to retard pDNA. The results indicated a nearly complete neutralization of the negative charge of pDNA and confirm that the ratio 50 : 1 or higher can condense all pDNA.

Protection of pDNA from deoxyribonuclease degradation such as DNase I is an essential factor for high transfection efficiency *in vitro* and *in vivo*. The stability of LNC25-T/pDNA complexes against the enzymatic degradation was evaluated by incubating the complexes with DNase I for 30 min at 37 °C (Fig. 5B). While naked pDNA and the pDNA complex with LNC25 before transacylation (ratio LNC : pDNA = 100 : 1) were completely degraded by the enzyme, the LNC25-T/pDNA complexes (ratios 50 to 500) showed protection of the condensed DNA against enzymatic degradation. The results suggest that the LNC25-T/pDNA complexes increased the resistance of the complexed DNA toward the action of DNase. It is to be noticed that free pDNA consists of two forms: relaxed and supercoiled forms with the latter form being more abundant (Fig. 5B, right column).⁵² Upon DNase I treatment of the LNC25-T/pDNA complexes, agarose gel electrophoresis shows an intense band for the relaxed form. Without any experimental evidence, we believe that either the supercoiled pDNA form was preferentially damaged by DNase or it was not released from the nanocapsules under our experimental conditions (presence of a retarded band on the agarose gel).

Cytotoxicity studies

Cytotoxicity of vectors can affect the transfection efficiency. It is known that high molecular weight (MW) PEIs show high toxicity because of high cationic density and membrane

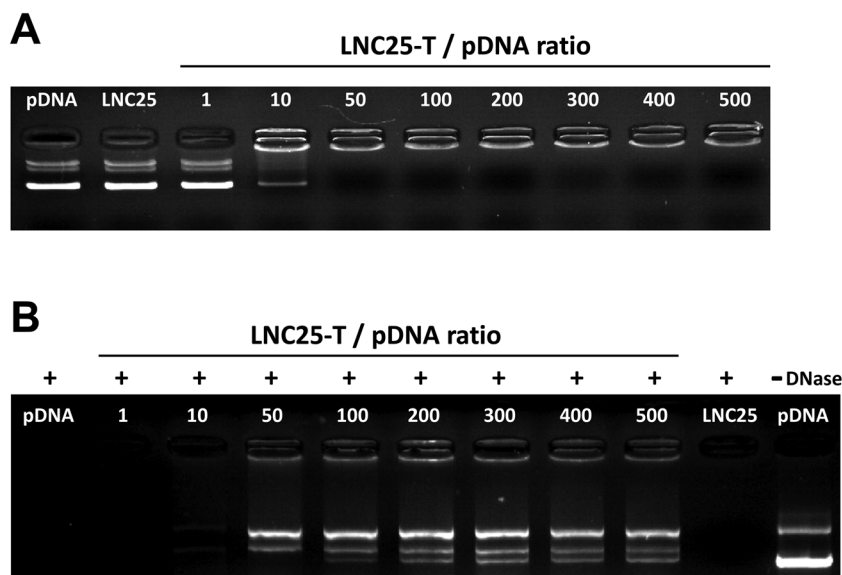


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis: (A) gel retardation assay of pDNA (1 μ g), LNC25 (lipid nanocapsules before transacylation (100 μ g), as a negative control) and LNC25-T/pDNA complexes at different ratios; (B) DNase I protection assay of pDNA (1 μ g), LNC25-T/pDNA complexes at different ratios, and LNC25 (lipid nanocapsules before transacylation (100 μ g), as a negative control). pDNA (1 μ g) in the absence of DNase is also shown as a control.

destabilization.^{53,54} However, low MW PEIs (PEI-1.8) were almost non-toxic to cells.³³ Thus, it is of primary importance for designing PEI conjugates that allow enhanced transfection efficacy, while reducing the cytotoxicity. In this study, the cytotoxicity of LNC25-T/pDNA complexes was studied on Human Embryonic Kidney (HEK) cells. The cells were incubated in the presence of LNC25-T/pDNA complexes at different ratios for 6 h. After 1 day post-incubation, the cytotoxicity was assessed by a classical MTT assay. As shown in Fig. 6, all LNC25-T/pDNA ratios (from 50 : 1 to 500 : 1) retained cell viability close to 100%, indicating the absence of cell toxicity.

In vitro cytotoxicity of PEI/pDNA complexes at different ratios was also evaluated on the HEK cell culture by using the MTT

assay (Fig. S2†). The PEI/pDNA complexes exhibited an increasing cytotoxicity when the PEI fraction was increased to reach 70% cell viability for a PEI/pDNA ratio of 300. This again shows the improved biocompatibility of surface-bound PEI, as compared to free PEI. Similar results have been recently reported by Tao *et al.* on PEI-modified gold nanocrystals.⁵⁵

Transfection studies

Transfection studies were performed using the reporter gene (green fluorescent protein pDNA, pEGFP-N1 pDNA). LNC25-T/pDNA complexes were prepared by mixing a constant amount (1 μ g) of plasmid DNA with different amounts of LNC25-T. The level of transfection of these complexes and free PEI/pDNA polyplexes was evaluated on HEK cell lines. The transfection efficiency of LNC25-T/pDNA complexes was compared systematically with initial free PEI1.8 at the same concentration. Although the LNC25-T/pDNA complexes at a weight ratio of 50 : 1 displayed good physicochemical properties (a size of 33 nm and a surface charge equal to +22 mV), this complex was not efficient for cell transfection (low transfection efficiency). After incubation of HEK cells with LNC25-T/pDNA complexes at weight ratios ranging from 100 : 1 to 500 : 1 during 4 h, the expression of green fluorescent proteins (GFPs) of transfected cells was evaluated by flow cytometry and confocal microscopy under *in vitro* conditions (Fig. 7).

As shown in Fig. 7A, the PEI-based LNCs exhibited 1.3 to 2.8 times higher transfection efficiency. Interestingly, the LNC25-T/pDNA complex at the optimal weight ratio of 200 displayed 2.8 times higher transfection efficacy than PEI/pDNA at the same concentration. The increased efficiency of the PEI-modified LNCs to transfect cells is most likely due to both improved uptake and endosomal escape. Indeed, it has been previously

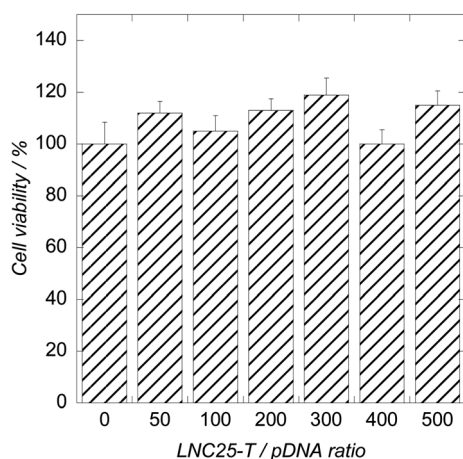


Fig. 6 *In vitro* cytotoxicity of LNC25-T/pDNA complexes. MTT assay data for cells and LNC25-T/pDNA complexes at different ratios on the HEK cell culture.

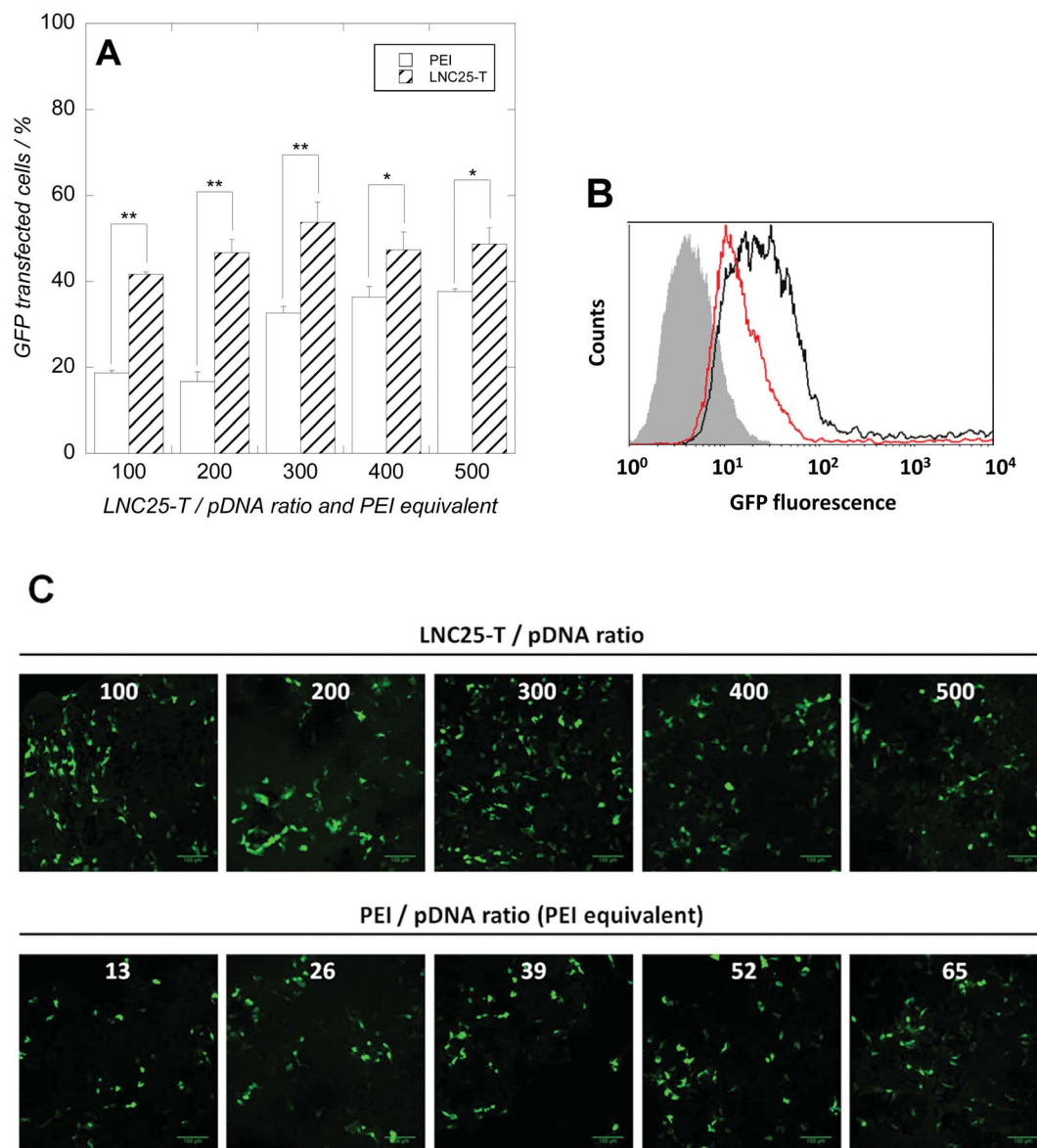


Fig. 7 *In vitro* GFP transfected cells. (A) Percentage of HEK cells that were transfected *in vitro* using LNC25-T/pDNA complexes at different ratios and free PEI/pDNA at the same concentration. The results are determined by flow cytometry. (B) FACS analysis of HEK cells (grey) and transfected HEK cells with 26.2 μg of PEI/pDNA (red) and 200 μg of LNC25-T/pDNA (black). (C) Confocal microscopy image of HEK cells showing GFP expression. The bar scale represents 100 μm. HEK cells were transfected with a total of 1 μg of pDNA at various ratios of LNC25-T/pDNA complexes. Error bars represent SD ($n = 3$); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

demonstrated that LNCs are rapidly accumulated within cells and they can bypass the endolysosomal compartment.⁵⁶ Furthermore, the PEI-modified LNCs showed partial buffering capacity; this proton absorption character will enhance endolysosomal disruption *via* the 'proton sponge effect'. FACS analysis of HEK cells and transfected HEK cells with 26.2 μg of free PEI/pDNA and 200 μg of LNC25-T/pDNA is displayed in Fig. 7B. Furthermore, these complexes showed no cytotoxicity due to the anchored PEI polymers on the LNCs surface, as demonstrated above with the MTT assays. A representation of HEK cells showing GFP expression for all ratios is shown in Fig. 7C and it confirmed the good morphology of transfected cells. Thereby, the increase of free PEI concentrations up to

65 μg mL⁻¹ did not achieve the transfection rate (38%) obtained with the LNC25-T/pDNA complex at the optimal weight ratio (54%). The results revealed the synergistic effect of PEI-based LNCs as a potent gene delivery vector possessing both biocompatibility and better transfection efficacy compared to free PEI.

It has to be noticed that transfection studies of HEK cells performed in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) led to low transfection efficiency (<3%) for both LNC25-T/pDNA (100 to 500 μg mL⁻¹) and PEI/pDNA complexes (data not shown). These results are similar to the low transfection efficacy of different systems in serum media.^{57–59}

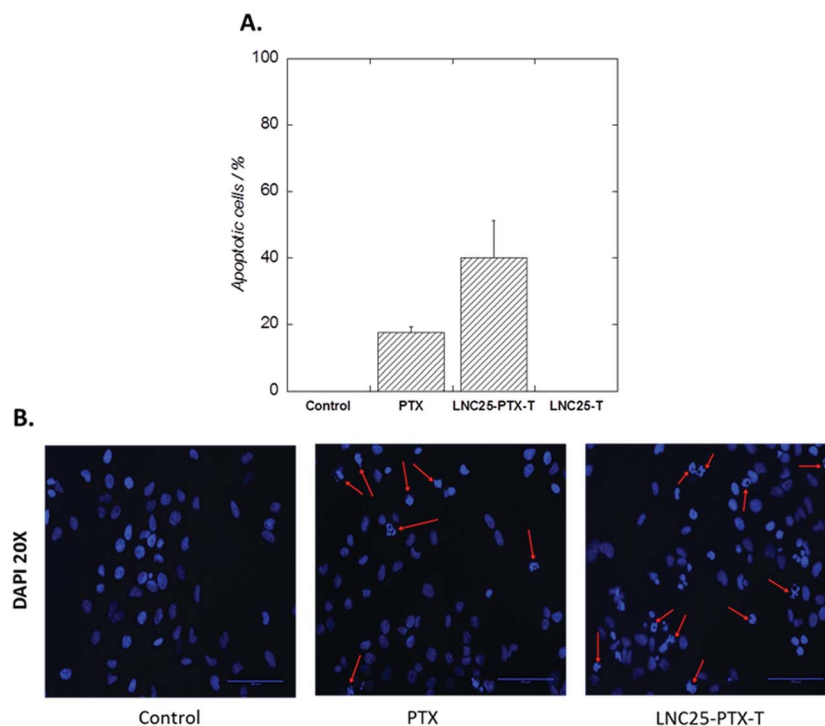


Fig. 8 DAPI staining of HEK cells after incubation for 4 h in the culture medium as the control, PTX ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), LNC25-T (LNC concentration $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) and LNC25-PTX-T (LNC concentration $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, and PTX concentration $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). (A) Percentage of apoptotic cells. Enumeration of apoptotic nuclei (about 300 cells were counted) was made on slides picked up at random by two independent experimenters. (B) Untreated cells as the control, paclitaxel ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) and LNC25-PTX-T (LNC concentration $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ and PTX concentration $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). The red arrows show fragmented nuclei.

Apoptosis induced by paclitaxel-loaded LNCs functionalized with PEI (LNC25-PTX-T)

One of the appealing features of carrier systems is their ability to simultaneously deliver two or more active components. The potential of LNC25-T for co-delivery of pDNA and hydrophobic drugs was examined through encapsulation of paclitaxel (PTX) in the oily core of the capsules. PTX-loaded LNCs were then modified with PEI in a similar way as that used for LNC25-T. DAPI staining was used to assess whether PTX encapsulation in the LNCs affects the apoptosis induced by PTX. The nuclei of untreated HEK cells showed homogenous fluorescence with no evidence of segmentation and fragmentation after DAPI staining. Exposure of the cells for 4 h at 37°C to PTX and LNC25-PTX-T ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PTX) led to segregation of the cell nuclei into segments, indicating breakdown in the chromatin followed by DNA condensation (Fig. 8). The red arrows in the higher magnification image (Fig. S3†) show that the cell nuclei begin to fragment due to the effect of released paclitaxel. The percentage of apoptotic cells induced by LNC25-PTX-T was slightly higher than that of free PTX, suggesting that PTX encapsulation in LNCs did not alter the mechanism of action of PTX as compared to free PTX under our experimental conditions (Fig. 8). PTX encapsulated in the nanocapsules or released in the extracellular medium was able to induce apoptosis.²⁹

LNC functionalization with PEI confers a positive charge to the nanocapsules loaded with PTX and most likely allowed their

higher uptake than free PTX under our experimental conditions. As such, it is likely that the PTX concentration inside the cells is higher, leading to a slight increase of apoptotic cells.

In vitro delivery of paclitaxel using LNC25-PTX-T/pDNA

Finally, the *in vitro* cytotoxic activity of free PTX, PTX-free functionalized LNCs (LNC25-T) and PTX-loaded LNCs functionalized with PEI and pDNA (LNC25-PTX-T/pDNA) was evaluated by the MTT assay using the HEK293 cell line. The range of concentrations of PTX (0.22 to $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) corresponds to the concentrations of the drug encapsulated in the LNCs after functionalization with PEI (from 100 to $500 \mu\text{g mL}^{-1}$).²⁹ Following 24 h incubation, $32.2 \pm 3.5\%$ of HEK cells treated with the highest dose of PTX survived, compared to $35.4 \pm 6.7\%$ for LNC25-PTX-T at the same concentration of the drug. The LNC25-T without PTX were not cytotoxic (Fig. 9).

The results clearly indicate that PTX encapsulated in LNCs modified with pDNA can induce toxic effects comparable to that of free PTX at the same concentration. This property is of primary importance for the conception of nanocarriers based on lipid nanocapsules for co-delivery of pDNA and hydrophobic drugs. To demonstrate the synergistic effect of co-administration of pDNA and a hydrophobic drug, we are currently investigating the co-delivery of anticancer drug paclitaxel (PTX) and a p53 gene for potential cancer therapy.

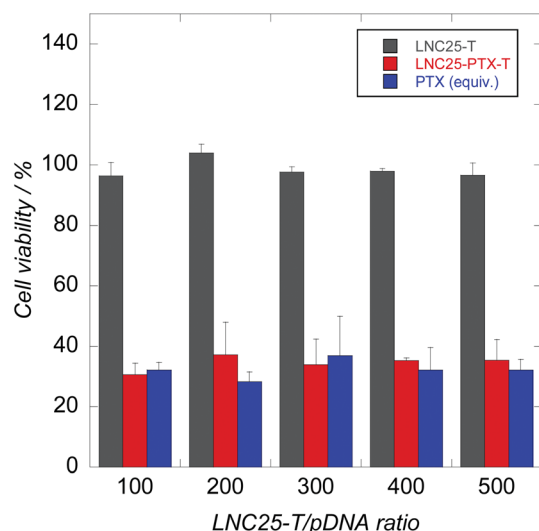


Fig. 9 Cytotoxic effects of free PTX, LNC25-T/pDNA and LNC25-PTX-T/pDNA on the HEK293 cell line determined by MTT cytotoxic assay.

Finally, the potential of the LNC not only as a pDNA vector but also as a fluorescent probe was demonstrated by incubation of HEK cells with LNC25-T-pDNA loaded with DiI or DiO fluorophores (Fig. S4†). The high magnification images in Fig. S5† clearly show the formation of endosomes after 1 h incubation, followed by dye diffusion throughout the cell after 4 h incubation. The fluorescence images clearly show intense fluorescence due to the LNCs inside the cells, suggesting the potential of the LNC vectors for bioimaging and co-delivery of hydrophobic drugs and genes.

Conclusion

In conclusion, various polymers and vectors have emerged for non-viral gene delivery with the aim to increase transfection efficiency *in vitro*. In the present work, we have demonstrated the synergistic effect of a low molecular weight PEI and lipid nanocapsules for condensing plasmid DNA. The PEI moieties were introduced on the LNC through a simple and straightforward transacylation reaction. We have found that the LNC25-T/pDNA ratio equal to or higher than 50 can condense effectively the pDNA into nano-sized vectors <50 nm, while protecting the complexed DNA toward the action of DNase. The LNC25-T/pDNA complex at the optimal weight ratio of 200 showed 2.8 times higher transfection efficiency and low toxicity on the HEK cell line in comparison with free PEI/pDNA polyplexes. The PEI-based LNCs can be used to modulate the pDNA interaction, the condensation and the 'proton-sponge' effect that may be necessary for the enhanced efficiency. The particular structure of LNCs (oily core and shell) offers the possibility for encapsulation of hydrophobic drugs and this property was successfully used for co-delivery of paclitaxel and pDNA. Indeed, we have demonstrated that paclitaxel-loaded LNC25 functionalized with PEI/pDNA are capable of efficiently delivering both pDNA and paclitaxel into cells. Finally, loading the LNC vectors with

fluorescent molecules allowed cell imaging. The conception of nanocarriers for co-delivery and imaging are of particular interest and holds promise for creating multi-active vectors for theranostics in gene therapy. Further work will focus on the optimization of the stability of the LNCs-T-pDNA in serum medium through modification using the LbL technique. Finally, the combination of gene and drug therapy will be investigated in an animal model.

Acknowledgements

A. B. and R. B. gratefully acknowledge financial support from The Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), the Université Lille 1 and the Nord Pas de Calais region.

References

- 1 S. D. Li and L. Huang, *Gene Ther.*, 2006, **13**, 1313.
- 2 M. Ogris and E. Wagner, *Drug Discovery Today*, 2002, **7**, 479.
- 3 O. Gresch and L. Altrogge, *Methods Mol. Biol.*, 2012, **801**, 65.
- 4 C. E. Thomas, A. Ehrhardt and M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 346.
- 5 M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul and J. P. Benoit, *Biomaterials*, 2008, **29**, 3477.
- 6 W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 5177.
- 7 D. A. Jackson, S. Juranek and H. J. Lipps, *Mol. Ther.*, 2006, **14**, 613.
- 8 M. C. Pedroso de Lima, S. Simoes, P. Pires, H. Faneca and N. Duzgunes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **47**, 277.
- 9 T. Merdan, J. Kopecek and T. Kissel, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, **54**, 715.
- 10 A. Elouahabi and J. M. Ruysschaert, *Mol. Ther.*, 2005, **11**, 336.
- 11 M. S. Al-Dosari and X. Gao, *AAPS J.*, 2009, **11**, 671.
- 12 P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413.
- 13 G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 4429.
- 14 M. Jager, S. Schubert, S. Ochrimenko, D. Fischer and U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4755.
- 15 M. L. Forrest, G. E. Meister, J. T. Koerber and D. W. Pack, *Pharm. Res.*, 2004, **21**, 365.
- 16 C. Tros de Ilarduya, Y. Sun and N. Duzgunes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, **40**, 159.
- 17 O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 7297.
- 18 B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust and J. P. Benoit, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 875.
- 19 B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M. C. Venier-Julienne, J. E. Proust, R. Phan-Tan-Luu and J. P. Benoit, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, **18**, 55.
- 20 S. Ballot, N. Noiret, F. Hindre, B. Denizot, E. Garin, H. Rajerison and J. P. Benoit, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2006, **33**, 602.

- 21 E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei and J. P. Benoit, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 1710.
- 22 A. Lamprecht and J. P. Benoit, *J. Controlled Release*, 2006, **112**, 208.
- 23 A. Vonarbourg, C. Passirani, L. Desigaux, E. Allard, P. Saulnier, O. Lambert, J. P. Benoit and B. Pitard, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3197.
- 24 M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J. P. Benoit and C. Passirani, *Biomaterials*, 2010, **31**, 321.
- 25 M. Morille, C. Passirani, S. Dufort, G. Bastiat, B. Pitard, J. L. Coll and J. P. Benoit, *Biomaterials*, 2011, **32**, 2327.
- 26 M. Morille, C. Passirani, E. Letrou-Bonneval, J. P. Benoit and B. Pitard, *Int. J. Pharm.*, 2009, **379**, 293.
- 27 M. Weyland, A. Griveau, J. Bejaud, J.-P. Benoit, P. Coursaget and E. Garcion, *Int. J. Pharm.*, 2013, **454**, 756.
- 28 J.-P. Benoit and T. Perrier, Method for preparing functionalized lipid capsules, WO2010113111, 2010.
- 29 F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron and V. Préat, *J. Controlled Release*, 2009, **133**, 11.
- 30 M. A. Maslov and M. A. Zenkova, in *Non-Viral Gene Therapy*, 2011, p. 349.
- 31 H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, D. Fischer, M. C. Davies and T. Kissel, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 845.
- 32 W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *J. Controlled Release*, 1999, **60**, 149.
- 33 R. R. Sawant, S. K. Sriraman, G. Navarro, S. Biswas, R. A. Dalvi and V. P. Torchilin, *Biomaterials*, 2012, **33**, 3942.
- 34 H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *J. Controlled Release*, 2006, **114**, 100.
- 35 A. Bajaj, P. Kondaiah and S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1640.
- 36 D. A. Wang, A. S. Narang, M. Kotb, A. O. Gaber, D. D. Miller, S. W. Kim and R. I. Mahato, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 1197.
- 37 S. Han, R. I. Mahato and S. W. Kim, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 337.
- 38 O. Gusachenko Simonova, Y. Kravchuk, D. Konevets, V. Silnikov, V. V. Vlassov and M. A. Zenkova, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2009, **20**, 1091.
- 39 S. Kim, J. S. Choi, H. S. Jang, H. Suh and J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2001, **22**, 1069.
- 40 M. Thomas and A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 14640.
- 41 A. Brownlie, I. F. Uchegbu and A. G. Schatzlein, *Int. J. Pharm.*, 2004, **274**, 41.
- 42 V. Incani, E. Tunis, B. A. Clements, C. Olson, C. Kucharski, A. Lavasanifar and H. Uludag, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2007, **81**, 493.
- 43 A. Alshamsan, A. Haddadi, V. Incani, J. Samuel, A. Lavasanifar and H. Uludag, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 121.
- 44 W. T. Kuo, H. Y. Huang and Y. Y. Huang, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, **10**, 5540.
- 45 Y. T. Ko, A. Kale, W. C. Hartner, B. Papahadjopoulos-Sternberg and V. P. Torchilin, *J. Controlled Release*, 2009, **133**, 132.
- 46 G. Navarro, R. R. Sawant, S. Essex, C. Tros de Ilarduya and V. P. Torchilin, *Drug Delivery Transl. Res.*, 2011, **1**, 25.
- 47 F. R. Maxfield and T. E. McGraw, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, **5**, 121.
- 48 D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun and P. S. Stayton, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2005, **4**, 581.
- 49 W. T. Godbey, M. A. Barry, P. Saggau, K. K. Wu and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **51**, 321.
- 50 X. Chen, Z. Yuan, X. Yi, R. Zhuo and F. Li, *Nanotechnology*, 2012, **23**, 415602.
- 51 O. Jeon, H. S. Yang, T.-J. Lee and B.-S. Kim, *J. Controlled Release*, 2008, **132**, 236.
- 52 S. Even-Chen and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1509**, 176.
- 53 S. M. Moghimi, P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska and A. Szewczyk, *Mol. Ther.*, 2005, **11**, 990.
- 54 L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, T. L. Andresen and S. M. Moghimi, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4001.
- 55 Y. Tao, Z. Li, J. Ren and X. Qu, *Nanoscale*, 2013, **5**, 6154.
- 56 A. Paillard, F. Hindré, C. Vignes-Colombeix, J.-P. Benoit and E. Garcion, *Biomaterials*, 2010, **31**, 7542.
- 57 P. Li, D. Liu, L. Miao, C. Liu, X. Sun, Y. Liu and N. Zhang, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 925.
- 58 S. K. Tripathi, S. Yadav, K. C. Gupta and P. Kumar, *Mol. Biosyst.*, 2012, **8**, 1426.
- 59 N. Oku, Y. Yamazaki, M. Matsuura, M. Sugiyama, M. Hasegawa and M. Nango, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **52**, 209.

SUPPORTING INFORMATION

Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging

Nadia Skandrani,^{1,2} Alexandre Barras,¹ Dominique Legrand,³ Tijani Gharbi,^{2,4} Hatem Boulahdour,^{2,4}

Rabah Boukherroub^{1*}

¹*Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, USR CNRS 3078), Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de
Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France*

²*Laboratoire de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique, Université de Franche-Comté, 16 Route de
Gray, 25030 Besançon, France*

³*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576), Institut Fédératif de
Recherche n°147, Université Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

⁴*CHRU Jean Minjoz, 3 Bd Alexandre Fleming, 25030 Besançon, France*

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 62 53 17 24; Fax: +33 3 62 53 17 01; E-mail: rabah.boukherroub@iri.univ-lille1.fr

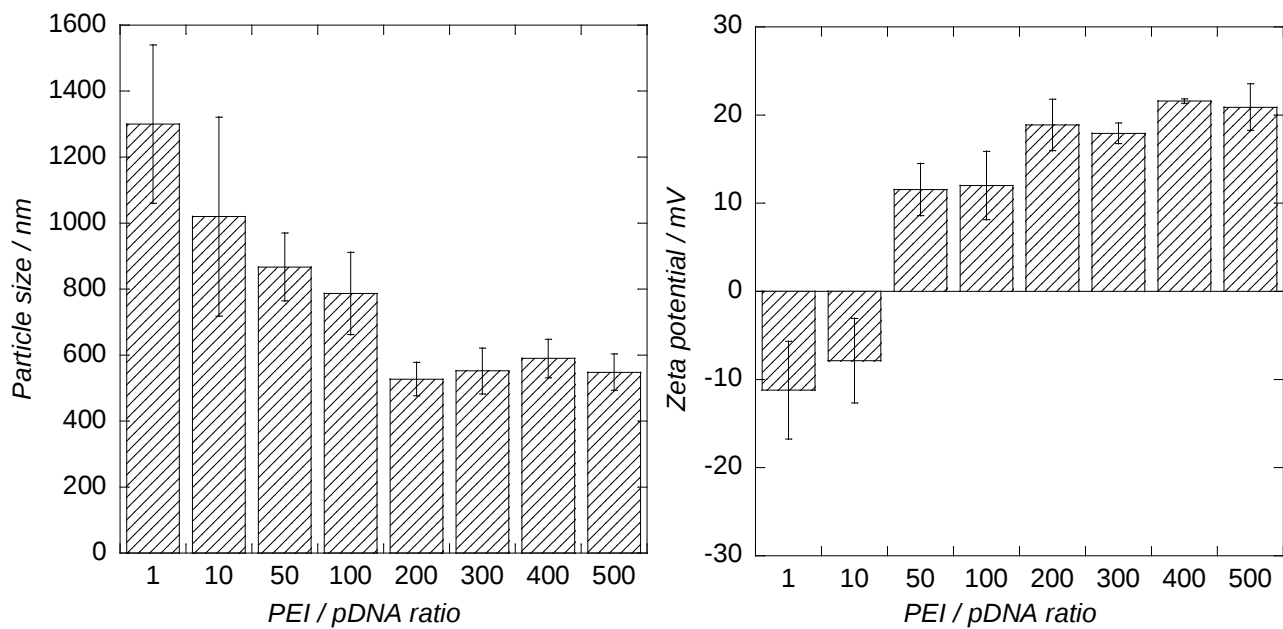


Figure S1: Size and zeta potential measurements of PEI/pDNA complexes in aqueous solutions (1 mL); pDNA (1 μ g) was incubated with increasing amounts of PEI for 30 min at room temperature.

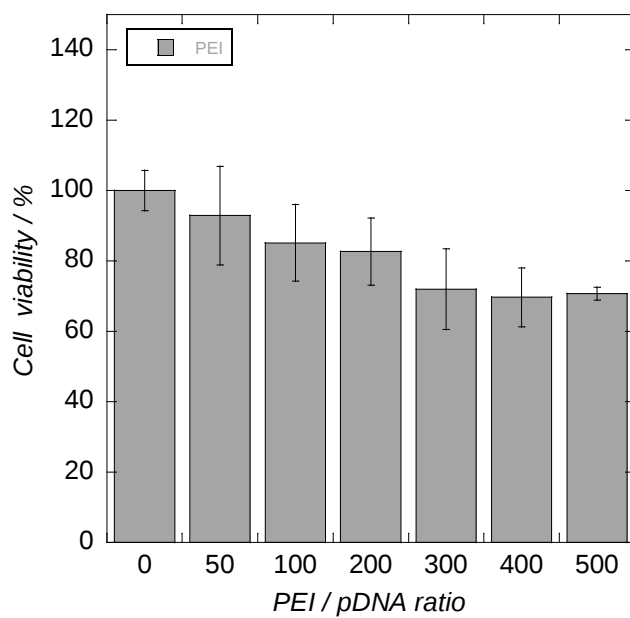


Figure S2. *In vitro* cytotoxicity of PEI/pDNA complexes. MTT assay data for cells and PEI/pDNA complexes at different ratios on the HEK cell culture.

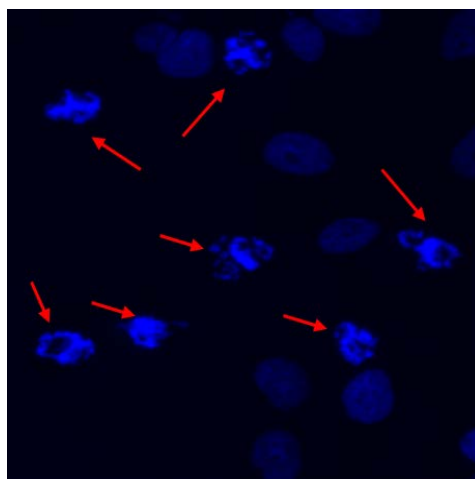


Figure S3: High magnification of Figure 8B (right image), corresponding to DAPI staining of HEK cells after incubation for 4 h with LNC25-PTX-T (LNC concentration 500 $\mu\text{g/mL}$, PTX concentration 1 $\mu\text{g/mL}$). The red arrows point to fragmented nuclei.

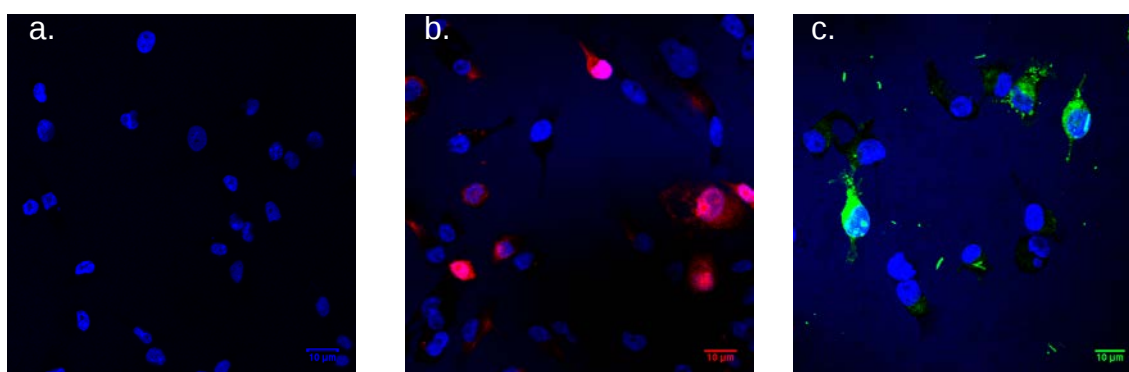


Figure S4: Fluorescence images of HEK cells untreated (a) as negative control, and treated with LNC-T/pDNA loaded with DiI (100 $\mu\text{g/mL}$) (b) and DiO (100 $\mu\text{g/mL}$) (c). The scale bare represents 10 μm . The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min, stained with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI in PBS at room temperature for 15 min and washed twice with PBS and water.

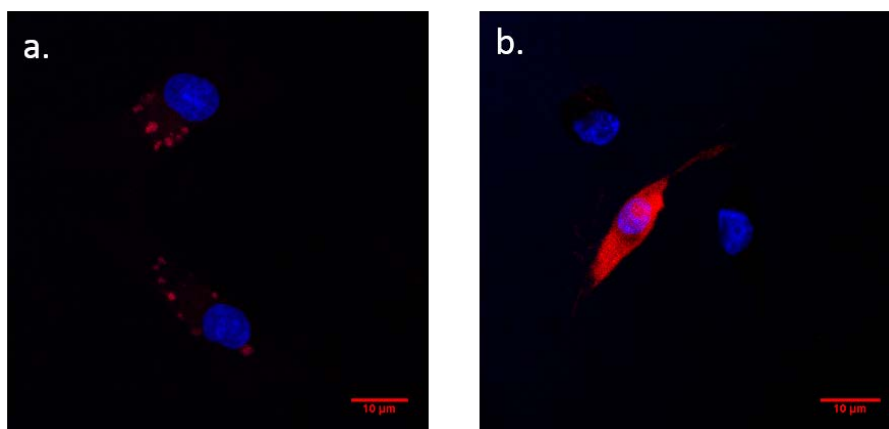


Figure S5: High magnification of the Figure S4b (HEK cells treated with LNC-T/pDNA loaded with DiI (100 µg/mL) after 1 h (a) and 4 h (b) incubation.

The logo for SPIM (École doctorale SPIM) features a solid yellow horizontal bar on the left, followed by the letters 'SPIM' in a white, sans-serif font.

■ École doctorale SPIM 16 route de Gray F - 25030 Besançon cedex
■ tél. +33 (0)3 81 66 66 02 ■ ed-spim@univ-fcomte.fr ■ www.ed-spim.univ-fcomte.fr

The logo of the University of Franche-Comté (UFC) consists of the letters 'UFC' in a large, bold, serif font. A small yellow vertical bar is positioned between the 'U' and the 'F'. Below 'UFC', the words 'UNIVERSITÉ' and 'DE FRANCHE-COMTÉ' are written in a smaller, sans-serif font.

Titre de la thèse :

Développement de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs

Résumé :

Le développement des nanotechnologies dans le domaine médical a suscité un engouement considérable ces dernières années, notamment l'utilisation de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs. Les nanoparticules offrent des perspectives uniques pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs qu'ils soient des gènes (thérapie génique), des anti-cancéreux (chimiothérapie) ou encore des agents photosensibilisateurs (photothérapie dynamique, TPD). Le défi majeur reste cependant l'acheminement des molécules thérapeutiques jusqu'à leur site d'action, tout en gardant leur intégrité ainsi que leur effet thérapeutique.

L'axe de recherche de cette thèse est l'utilisation des nanocapsules lipidiques comme plateforme multifonctionnelle pour la délivrance de principes actifs. Un des objectifs étant le développement de nanocapsules lipidiques, stables de point de vue physico-chimique, et fonctionnalisées avec du polyéthylèneimine capables de délivrer efficacement un plasmide ADN et un anti-cancéreux (paclitaxel) dans le cadre d'une thérapie combinée. Les applications de ces nanovecteurs pour la transfection de gènes et la vectorisation de chimiothérapeutique in vitro ont été réalisées.

Par ailleurs, l'aptitude de nanocapsules lipidiques à vectoriser des agents photosensibilisants pour la thérapie photodynamique a été aussi étudiée in vitro, et les résultats ont montré que l'encapsulation de deux molécules de PS dans les nanocapsules permet une synergie de l'effet photodynamique tout en gardant les propriétés physico-chimiques de chaque PS.

Enfin, l'encapsulation d'un agoniste au canal ionique TRPM8, le menthol, fait l'objet du dernier chapitre. L'étude par imagerie calcique du relargage de cette molécule lipophile in vitro a permis de confirmer le potentiel des NCL comme nanovecteurs de principes actifs.

Mots-Clés :

Nanocapsules lipidiques (NCL), transacylation, transfection, thérapie génique, thérapie photodynamique, photosensibilisateurs (PS), canal TRPM8, menthol.

Title of thesis :

Development of lipid nanocapsules for drug delivery

Abstract :

The development of nanotechnology in the medical field has attracted considerable interest in recent years, including the use of nanoparticles for drug delivery. Nanoparticles offer unique opportunities for delivery of active drugs such as genes (gene therapy), anti-cancer (chemotherapy) or photosensitizers (photodynamic therapy, PDT). The major challenge, however, remains the delivery of therapeutic molecules to their site of action while keeping their integrity and their therapeutic effect.

The research focus of this thesis is the use of lipid nanocapsules as a multifunctional platform for the delivery of drugs.

One goal is the development of stable lipid nanocapsules, functionalized with polyethyleneimine and capable of effectively delivering a plasmid DNA and an anti-cancer (paclitaxel) as part of a combination therapy. The applications of these nanocarriers for transfection and delivery of chemotherapeutic were performed in vitro.

Moreover, the ability of lipid nanocapsules to encapsulate photosensitizers for photodynamic therapy has been studied in vitro, and the results showed that the encapsulation of two molecules of PS in the nanocapsules allows a synergy photodynamic effect while protecting the PS from photo degradation.

Finally, encapsulating an ion channel TRPM8 agonist (menthol) is the subject of the last chapter. The study by calcium imaging of the release of this lipophilic molecule in vitro confirmed the potential of lipid nanocapsules as nanocarriers of drugs.

Keywords :

Lipid nanocapsules (LNC), transacylation, transfection, photodynamic therapy, gene therapy, photosensitizers (PS), channel TRPM8, menthol.

