UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE CHIMIE SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***PHARMACIE***

Spécialité : Pharmacotechnie

Présentée et soutenue publiquement par

CARTERET CHARLES-EMMANUEL

Le 17 décembre 2025

Mise au point de nouvelles formulations de nanohydrogels pour la vectorisation de substances actives à visée diagnostique

---

Thèse dirigée par **MARIE-CHRISTINE ANDRY**

Co-encadrée par **MAÏTE CALLEWAERT**

JURY

M. Hervé HILLAIREAU,	Professeur,	Institut Galien, Université Paris Saclay,	**Président**
Mme Anne SAPIN-MINET,	Professeur,	Université de Lorraine,	**Rapporteur**
Mme Anne-Claire GROO,	Maître de Conférences HDR,	Université de Caen Normandie,	**Rapporteur**
M. Félix SAUVAGE,	Professeur associé,	Université de Ghent,	**Examinateur**
Mme Marie-Christine Andry,	Professeur émérite,	URCA,	**Directrice de thèse**
Mme Maïté Callewaert,	Maître de Conférences,	URCA,	**Co-encadrante de thèse**

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE CHIMIE SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***PHARMACIE***

Spécialité : Pharmacotechnie

Présentée et soutenue publiquement par

CHARLES-EMMANUEL CARTERET

Le 17 décembre 2025

Mise au point de nouvelles formulations de nanohydrogels pour la vectorisation de substances actives à visée diagnostique

---

Thèse dirigée par **MARIE-CHRISTINE ANDRY**

Co-encadrée par **MAÏTE CALLEWAERT**

JURY

M. Hervé HILLAIREAU,	Professeur, **Président**	Université Paris Saclay,
Mme Anne SAPIN-MINET,	Professeure, **Rapporteur**	Université de Lorraine,
Mme Anne-Claire GROO,	Maîtresse de Conférences HDR, **Rapporteur**	Université de Caen Normandie,
M. Félix SAUVAGE,	Professeur associé, **Examinateur**	Université de Ghent,
Mme Marie-Christine ANDRY,	Professeur émérite, **Directrice de thèse**	Université de Reims Champagne Ardenne,
Mme Maïté CALLEWAERT,	Maîtresse de Conférences, **Co-encadrante de thèse**	Université de Reims Champagne Ardenne,

Remerciements professionnels

Je tiens tout d'abord à remercier Anne SAPIN-MINET, Professeure à l'Université de Lorraine, ainsi que Anne-Claire GROO, Maîtresse de Conférences à l'Université de Caen Normandie, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et pour leur investissement dans l'évaluation de mes travaux de recherche.

Je souhaite ensuite remercier Hervé HILLAIREAU, Professeur à l'Université de Paris-Saclay et Félix SAUVAGE, Professeur associé à l'Université de Ghent, pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour leur présence dans le jury. Merci aussi pour leur bienveillance, leur soutien et pour les conseils qu'ils m'ont donnés durant ces années de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à ma directrice de thèse Marie-Christine ANDRY, Professeure émérite à l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Je tiens à la remercier de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de pharmacie galénique, mais aussi pour sa gentillesse, sa bienveillance et sa confiance qui m'ont permis d'évoluer sereinement tout au long de ces années.

Je souhaite également remercier ma co-encadrante de thèse Maïté CALLEWAERT, Maîtresse de Conférences à l'Université de Reims Champagne Ardenne. Je tiens à la remercier pour avoir accepté de m'encadrer tout au long de cette thèse. Merci énormément Maïté, surtout pour ta disponibilité et ton compagnonnage ces dernières années qui m'ont permis d'appréhender avec plus de facilité la complexité de ce projet. Merci aussi pour ta patience et ton optimisme à toute épreuve qui ont été source de réconfort pour faire face aux divers échecs auxquels j'ai été confronté. Et surtout merci de m'avoir soutenu et poussé à donner mon maximum pendant ces derniers mois très intenses.

Je tiens aussi à remercier :

Monsieur le Professeur Jean-Hugues Renault, pour m'avoir accueilli à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims.

Ce travail s'inscrit dans une collaboration de longue date entre les membres de l'ICMR impliqués dans le développement de nanoparticules pour le diagnostic. Je tiens à remercier tout particulièrement la Professeure Françoise Chuburu, dont l'expertise et les nombreux échanges ont été déterminants pour une grande partie de ce projet.

Madame la Professeure Florence Edwards**,** pour son accueil au sein du laboratoire. Merci pour ta bonne humeur et ton aide tout au long de ces années.

Monsieur le Docteur Cyril Cadiou, pour la synthèse des complexes de gadolinium.

Madame la Professeure Sophie Laurent et Madame la Docteur Céline Henoumont, pour la réalisation des profils NMRD.

Madame la Docteur Sorina Petrache et son équipe, pour sa gentillesse et son accueil en Roumanie lors de notre échange scientifique, merci aussi pour la réalisation des études de biocompatibilité. Et merci pour les moments partagés pendant la découverte de Bucarest.

Monsieur le Docteur Michaël Molinari, pour l'acquisition des images en AFM.

Monsieur le Dr Christophe Portefaix, pour l'acquisition des images en IRM au CHU de Reims

Madame la Professeure Christine Dupont et Monsieur le Docteur Pierre Eloy**,** pour le temps que vous m'avez consacré lors de ma venue à Louvain-la-Neuve et pour l'explication et la réalisation des expérimentations en XPS.

Bruno, pour ta disponibilité, ton aide et ta bonne humeur.

Tous les membres de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) avec qui j'ai pu interagir et avec qui j'ai pu avoir de longues discussions scientifiques ou non, très stimulantes, et notamment à toute l'équipe du Pôle Santé.

Remerciements personnels

Je tiens à dédier cette thèse :

A ma mère, Jocelyne, merci d'avoir toujours été présente pour moi année après année, merci pour ton soutien, pour tes encouragements, c'est grâce à toi que je suis devenu aujourd'hui l'homme que je suis et je ne t'en remercierai jamais assez.

A ma Sœur, Pauline, ton soutien pendant mes années de pharma et notre complicité grandissante d'années en années m'ont été d'une grande aide, notamment pour surmonter les nombreuses épreuves de vie auxquelles j'ai dû faire face, je n'aurais jamais pu les affronter sans toi.

A mon père, Emmanuel, merci pour ton soutien matériel, qui m'a permis de me concentrer sur mes études.

A Brigitte et Thierry, merci pour ces moments de réconfort et de bonheur passés en votre compagnie, merci de m'avoir initié à la gastronomie qui est devenue aujourd'hui une véritable passion.

A Sylvie et Hervé, pour tous ces moments partagés en famille, merci pour toutes ces conversations scientifiques ou non toujours très enrichissantes et stimulantes.

A toute ma famille, merci d'avoir été présent pour moi depuis toutes ces années.

A vous Jean-Charles, Margaux, Antoine, Sarah, Edouard, Pauline, Baptiste, Rizlene, Thomas, merci pour ces soirées tous ensemble ou en petit comité, merci pour ces fous rires et pour m'avoir soutenu et supporté toutes ces années. Merci pour votre indéfectible amitié qui dure pour certains maintenant depuis plus de 15 ans.

A Marc et Maxime, pour nos soirées à Paris ou chez nous en audio qui ont été une grande source de réconfort et un bon défouloir aussi. Merci à vous deux d'être toujours aussi présents malgré la distance. L'amitié que nous avons forgée durera une vie.

A vous Arthur et Anne, merci d'avoir toujours été présent dans les bons comme dans les mauvais moments, merci pour toutes ces soirées passées ensemble à refaire le monde qui ont été source de beaucoup de réconfort. Merci aussi de m'avoir fait confiance pour être le parrain de votre magnifique petite fille.

A Julien, je n'aurais pas pu rêver meilleur collège que toi pour être à mes côtés au laboratoire, merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mon côté très râleur. De cette rencontre est née une véritable amitié.

A Julian et Clémence, merci pour tous ces moments partagés au cours nos études et en dehors. Ces moments ont forgé une amitié qui ne faiblira jamais.

A Anaïs et Marie, notre rencontre à la pharmacie a très vite débouché vers une véritable amitié, merci pour votre soutien et tous ces moments que nous avons partagés.

A Gwladys, notre amitié a été comme une évidence dès notre rencontre, merci pour toutes ces soirées et moments partagés, merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre.

A Sylvie, merci beaucoup pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant mon internat, ainsi que pour ton optimiste constant qui est une grande source de réconfort.

A Valérie Piraube, merci beaucoup pour ton aide et ta bienveillance, ces dernières années

A Ana, Alexis, Andra, Bruno, Dominique, Frédérique, Léa, Malisson, Meile, Michèle, Ngan, Pierre, Sarah, pour votre bonne humeur au quotidien et votre optimiste toujours sans faille, merci pour votre bienveillance et pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles cette année.

A Bérénice, il n'y a pas assez de mots pour décrire toute la gratitude que j'éprouve. Merci d'être présente au quotidien à mes côtés, de supporter mes craintes, mes doutes et mes baisses de moral. Merci de m'avoir aidé à aller jusqu'au bout de ce travail qui a été très éprouvant physiquement et mentalement. Je n'oublierais jamais que je

n’aurais pu terminer ce travail sans ton aide, ton soutien et ta pression (oui un peu quand même). Tu m’as aidé à évoluer en tant que personne et à avoir plus confiance en moi. Je suis très heureux de partager ma vie avec toi et avec nos deux merveilleux enfants.

Résumé

Le diagnostic précoce de pathologies graves, notamment les cancers, constitue un enjeu majeur dans la prise en charge thérapeutique des patients. Dans ce contexte, les agents de contraste à base de gadolinium ont été développés pour améliorer la qualité du diagnostic par imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, leur efficacité demeure limitée et nécessite l'administration de doses élevées. L'objectif de ce projet doctoral est d'élaborer de nouveaux outils diagnostiques pour l'IRM par l'encapsulation d'un complexe de gadolinium (HGdDOTA) au sein de nanohydrogels de biopolymères par gélification ionique, visant à améliorer l'efficacité contrastophore tout en limitant les doses administrées. Ce travail s'articule autour de trois objectifs principaux. Le premier consiste à identifier et optimiser les paramètres de formulation des nanoparticules afin de comprendre leur influence sur les propriétés structurales et physicochimiques. Les nanoparticules doivent présenter des caractéristiques compatibles avec une utilisation en santé humaine. Le deuxième objectif vise à étudier le comportement des nanoparticules dans des milieux mimant les conditions physiologiques. Cette évaluation inclut l'observation de la stabilité colloïdale face à des milieux de force ionique croissante et dans des conditions de pH physiologique. Enfin, le troisième objectif consiste à évaluer l'efficacité du complexe de gadolinium encapsulé. Cette investigation porte sur les performances contrastophores en IRM, la capacité de rétention du complexe au sein du réseau nanoparticulaire, ainsi que la biocompatibilité des formulations développées.

Mots clés : Biopolymères, gélification ionique, nanoparticules, vectorisation, agents de contraste.

Abstract

The early diagnosis of serious pathologies, particularly cancers, represents a major challenge in the therapeutic management of patients. In this context, gadolinium-based contrast agents have been developed to improve the quality of diagnosis by magnetic resonance imaging (MRI). However, their effectiveness remains limited and requires the administration of high doses. The objective of this doctoral project is to develop new diagnostic tools for MRI through the encapsulation of a gadolinium complex (HGdDOTA) within biopolymer nanohydrogels by ionic gelation, aiming to enhance the contrast efficiency while limiting the administered doses. This work is structured around three main objectives. The first consists of identifying and optimizing the formulation parameters of the nanoparticles in order to understand their influence on the structural and physicochemical properties. The nanoparticles must present characteristics compatible with use in human health. The second objective aims to study the behavior of nanoparticles in media mimicking physiological conditions. This evaluation includes the observation of the colloidal stability of formulations when faced with media of increasing ionic strength and under physiological pH conditions. Finally, the third objective consists of evaluating the effectiveness of the encapsulated gadolinium complex. This investigation covers the contrast performance in MRI, the retention capacity of the complex within the nanoparticulate network, as well as the biocompatibility of the developed formulations.

Keywords : Biopolymers, ionic gelation, nanoparticles, vectorization, contrast agents.

Tables des matières

- ***Résumé*** ***8***
- ***Abstract*** ***9***
- ***Table des figures*** ***15***
- ***Table des tableaux*** ***18***
- ***Abréviations*** ***22***
- ***Introduction générale*** ***24***
- ***Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques*** ***27***

1. Polymères utilisables pour la préparation de nanoparticules à charge de surface négative 29

1.1. Polymères naturels 29

1.1.1. Le Chitosane 29

1.1.2. L'Acide hyaluronique 32

1.1.3. La chondroïtine sulfate 34

1.1.4. Les alginates 36

1.2. Polymères synthétiques 38

1.2.1. Le PLA 38

1.2.2. Le PGA 39

1.2.3. Le PLGA 41

1.2.4. La PCL 43

1.2.5. Les Polycyanoacrylates 44

1.2.6. Les PEG 45

1.2.7. La Poly-L-lysine (PLL) 47

2. Méthodes d'élaboration des nanoparticules et amélioration de la stabilité des formulations 49

2.1. Méthodes en émulsion 50

2.1.1. Emulsion-évaporation de solvant 50

2.1.2. Emulsion-diffusion de solvant 51

2.1.3. Emulsion-salting out 52

2.1.4. Double émulsion 52

2.2. Nanoprécipitation 53

2.3. Gélification ionique 54

2.4. Amélioration de la stabilité des formulations 55

2.4.1. Réticulation ionique 56
2.4.2. Réticulation covalente 57

3. Caractérisations des nanoparticules 58

3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) 58
3.2. Diffusion électrophorétique de la lumière (ELS) 60
3.3. Microscopie de force atomique (AFM) 60
3.4. Spectroscopie de photoélectrons à rayon X (XPS) 62

4. IRM et améliorations des agents de contraste 63

4.1. Principe de l'IRM 63
4.2. Agents de contraste utilisés en IRM 66
4.2.1. Les agents paramagnétiques 67
4.2.2. Les agents superparamagnétiques 67
4.2.3. Agents de contraste à base de gadolinium commercialisés 68
4.3. Vectorisation : Principe et application à la santé 75
4.3.1. Les nanovecteurs 76
4.3.2. Utilisation en thérapeutique 77
4.3.3. Utilisation en diagnostic 82

- ***Chapitre 2 : Développement de nanohydrogels de chitosane à charge de surface négative 88***

1. Nanoparticules de CS, HA et TPP 90

1.1. Matériels et méthodes 90
1.1.1. Matériels 90
1.1.2. Élaboration des nanosuspensions 90
1.1.3. Caractérisation des nanoparticules de CS/HA/TPP 91
1.2. Résultats et discussion 92
1.2.1. Effet de la variation des concentrations en polymères 92
1.2.2. Effet de la variation du pH de la phase cationique 99
1.2.3. Correction du pH après formulation : effet de dialyse 101
1.3. Conclusion 101

2. Nanoparticules de CS et ChS 102

2.1. Matériels et méthodes 102
2.1.1. Matériels 102
2.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/ChS 103
2.1.3. Caractérisation des nanoparticules de CS/ChS par DLS/ELS 104
2.1.4. Caractérisation par AFM 105
2.1.5. Détermination du rendement de production des nanoparticules 105
2.1.6. Cinétique de libération 105

2.1.7. Détermination de la composition chimique et de l'organisation de la surface des nanoparticules par XPS 106
2.1.8. Évaluation de la biocompatibilité des formulations 107
2.1.9. Détermination du profil NMRD des nanosuspensions 108
2.1.10. Images IRM 108
2.2. Résultats et discussion 108
2.2.1. Optimisation de la formulation 108
2.2.2. Préparation et caractérisation des nanoparticules de CS/ChS encapsulant des complexes de gadolinium 116
2.2.3. Évaluation de la cinétique de relargage des complexes de gadolinium encapsulés dans les nanoparticules de CS/ChS 119
2.2.4. Détermination de la composition chimique et de l'organisation de la surface des nanoparticules par XPS 121
2.2.5. Mesure de la relaxivité 123
2.2.6. Essai de biocompatibilité 125
2.3. Conclusion 128

3. Nanoparticules de CS et HA 129

3.1. Matériels et méthodes 129
3.1.1. Matériels 129
3.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/HA 130
3.1.3. Préparation des nanoparticules de CS/HA encapsulant le complexe de gadolinium 131
3.1.4. Caractérisation des nanoparticules de CS/HA par DLS/ELS 131
3.2. Résultats et discussion 132
3.2.1. Transposition du protocole de la formulation de CS/HA/TPP 132
3.2.2. Transposition du protocole de la formulation de CS/ChS 135
3.3. Conclusion 139

- ***Chapitre 3 : Stabilité des nanohydrogels dans les milieux physiologiques 141***

1. Stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologiques 143

1.1. Matériels et méthodes 143
1.1.1. Préparation des nanoparticules 143
1.1.2. Milieux utilisés pour mimés les conditions physiologiques 144
1.1.3. Analyse par DLS 145
1.1.4. Etude par AFM *in situ* 145
1.2. Résultats 146
1.2.1. Influence des milieux mimant les conditions physiologiques sur les paramètres par DLS 146
1.2.2. Observation *in situ* de l'instabilité des particules de CS/ChS dans le NaCl par AFM 148
1.3. Comparaison des systèmes et interprétation des données 150

2. Essais de renforcement du réseau de CS et ChS par création de liaisons supplémentaires 153

2.1. Matériels et méthodes ... 153

2.1.1. Préparation de CS/ChS renforcées par réticulation ionique ... 153

2.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/ChS renforcées par réticulation covalente ... 154

2.2. Réticulation ionique des nanoparticules de CS/ChS ... 154

2.3. Réticulation covalente des nanoparticules de CS/ChS ... 155

2.3.1. Influence de l'EDC sur la formulation des nanoparticules de CS et ChS ... 156

2.3.2. Influence de l'EDC sur la stabilisation des nanoparticules en conditions physiologiques . 157

- ***Chapitre 4 : Nanoparticules de PLL/ChS ... 160***

1. Matériels et méthodes ... 162

1.1. Matériels ... 162

1.2. Préparation des nanoparticules de PLL/ChS ... 163

1.3. Caractérisation des nanoparticules de PLL/ChS par DLS/ELS ... 163

1.4. Caractérisation par AFM ... 164

1.5. Détermination du rendement de production des nanoparticules ... 164

1.6. Évaluation de la stabilité des nanoparticules de PLL/ChS obtenues par gélification ionique ... 165

1.7. Cinétique de libération ... 165

1.8. Évaluation de la biocompatibilité des formulations ... 166

1.9. Détermination du profil NMRD des nanosuspensions ... 167

1.10. Évaluation des propriétés de contraste des nanosuspensions par IRM ... 167

2. Résultats et discussion ... 168

2.1. Optimisation de la formulation ... 168

2.1.1. Influence du rapport entre les masses de polymères ... 168

2.1.2. Influence de la vitesse d'agitation pendant l'ajout de phase ... 169

2.2. Caractérisation des nanoparticules de PLL/ChS par AFM ... 170

2.3. Évaluation du rendement de production de la formulation ... 172

2.4. Etude de la stabilité des nanoparticules de PLL/ChS obtenues par gélification ionique ... 172

2.5. Encapsulation du complexe de gadolinium ... 173

2.5.1. Évaluation de la cinétique de relargage des complexes de gadolinium encapsulés dans les nanoparticules de PLL/ChS ... 175

2.5.2. Mesure de la relaxivité des agents de contraste encapsulés ... 175

2.5.3. Imagerie par résonance magnétique ... 176

2.5.4. Tests de biocompatibilité ... 178

2.6. Conclusion ... 180

- ***Conclusions et perspectives ... 183***

- ***Annexe ... 188***

- ***Bibliographie 190***

Table des figures

Figure 1 - Structure du chitosane selon (10) 30
Figure 2 - Structure de l'acide hyaluronique selon (30) 32
Figure 3 - Structure des Chondroïtine sulfate selon (38) 34
Figure 4 - Structure de l'alginate par association d'homopolymères d'acide a-1,4-L-guluronique (GG), d'homopolymères d'acide B-1,4-D-mannuronique (MM) et d'hétéropolymères de G et M selon (50) 37
Figure 5 - Structure de l'acide polylactique selon (65) 39
Figure 6 - Structure de l'acide polyglycolique selon (73) 40
Figure 7 - Utilisation du PGA dans le domaine médical selon (80) 41
Figure 8 - Structure de l'acide poly lactique-co-glycolique selon (82) 42
Figure 9 - Structure de la polycaprolactone selon (98) 44
Figure 10 - Structure du poly alkyl cyanoacrylate selon (108) 45
Figure 11 - Structure du polyéthylène glycol selon (116) 46
Figure 12 - Structure de l'α-poly(L-lysine) et de l'ε-poly(L-lysine) selon (123) 48
Figure 13 - Principe de préparation de NP par émulsion-évaporation de solvant. 50
Figure 14 - Principe de préparation de NP par émulsion-diffusion de solvant. 51
Figure 15 - Principe de préparation de NP par double émulsion. 53
Figure 16 - Principe de préparation de NP par nanoprécipitation 54
Figure 17 - Principe de préparation de NP par gélification ionique. 55
Figure 18 - Structure du tripolyphosphate de sodium 56
Figure 19 - Structure de l'acide phytique 57
Figure 20 - Structure de l'EDC 58
Figure 21 - Nanoparticules observées par AFM selon (151) 61
Figure 22 - Représentation schématique de l'influence d'impulsion de radiofréquence sur l'aimantation macroscopique 65
Figure 23 – Structure des chélates de gadolinium commercialisé selon (162) 69
Figure 24 - Structure de l'Usirem® selon (174) 73
Figure 25 - Schéma des nanovecteurs de 2ème génération 79
Figure 26 - Schéma des nanovecteurs de 3ème génération 81
Figure 27 - Schéma représentant le montage expérimental utilisé pour la production des nanoparticules de CS/HA/TPP. 91

Figure 28 - Evolution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules de CS / HA / TPP en fonction du nombre de moles de CS (a), de HA (b) ou de TPP (c) dans la formulation. Les formulations qui ont sédimenté sont artificiellement considérées comme ayant des diamètres à 1000 nm pour apparaître sur les graphiques, sans signification réelle de la valeur de taille.....97
Figure 29 - Charges portées par les polymères en fonction du pH.....98
Figure 30 - Evolution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules de CS / HA / TPP en fonction du rapport des charges positives (n^+) sur les charges négatives (n^-) présentes dans la formulation à pH 2,5. Les formulations qui ont sédimenté sont artificiellement considérées comme ayant des diamètres à 1000 nm pour apparaître sur le graphique, sans signification réelle de la valeur de taille. 98
Figure 31 - Potentiel zêta des nanoparticules de CS/HA/TPP en fonction du pH de la phase cationique après dissolution du CS dans l'acide acétique (cercles) ou l'acide citrique (triangles) et ajustement avec NaOH 2.5 M. Pour toutes les formulations [CS] = 2,5 mg/mL, [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL. pH de la phase HA/TPP = 9,6. 100
Figure 32 - Schéma représentant le montage expérimental utilisé pour la production des nanoparticules de CS/ChS. 103
Figure 33 - Influence du rapport m_{CS}/m_{ChS} sur les diamètres hydrodynamiques moyens et les potentiels zêta des nanoparticules de CS/ChS mesurés par DLS/ELS. Les autres conditions opératoires (pH, agitation, sonication…) des différents échantillons peuvent varier (se reporter à l'annexe 1). 110
Figure 34 - Influence du pH de la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques moyens et les potentiels zêta des nanoparticules de CS/ChS mesurés par DLS/ELS. Pour tous les échantillons, le rapport m_{CS}/m_{ChS} vaut 1/3. Les autres conditions opératoires (agitation, sonication…) des différents échantillons peuvent varier (se reporter à l'annexe 1). 111
Figure 35 - Charges portées par les constituants des nanoparticules en fonction du pH.....112
Figure 36 - Cinétique de libération du HGdDOTA à 37°C à partir des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS dans un tampon phosphate pH 7,4. 120
Figure 37 - Profil NMRD des nanoparticules CS+HGdDOTA/ChS (•) et du HGdDOTA libre (ligne peine).....124
Figure 38 – (A) Images T_1 en IRM du Dotarem® (ligne 1) et des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS (ligne 2) en fonction de la concentration en Gd, et de l'eau (ligne

3). (B) Intensités lumineuses déterminées d'après les ROI de l'image T_1 du Dotarem ® (triangles) et des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS (cercles) en fonction de la concentration en Gd et valeurs de la ligne de l'eau (croix). 125
Figure 39 – Viabilité des cellules SVEC 4-10 évalué par un test au MTT (A) et un essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de CS+HGdDOTA/ChS. 127
Figure 40 - Viabilité des cellules RAW 264.7 évaluée par un test au MTT (A) et un essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de CS+HGdDOTA/ChS. 127
Figure 41 - Images topographiques des nanoparticules de CS/ChS incubées dans du NaCl à 0,9% m/V avant l'observation par AFM. 149
Figure 42 - Images obtenues par AFM des nanoparticules de CS/ChS dans leur milieu d'élaboration après adsorption sur le mica (image de gauche), puis après remplacement in situ du milieu par une solution de NaCl 0,9% m/V (image de droite). 149
Figure 43 - Représentation schématique des sels de α-poly-L-lysine (à gauche) et de chondroïtine sulfate (à droite) utilisés 162
Figure 44 – Image par AFM des nanoparticules de PLL/ChS obtenues selon le protocole optimisé 171
Figure 45 - Profil NMRD des nanoparticules PLL-HGdDOTA/ChS (•) et du HGdDOTA libre (ligne peine).....176
Figure 46 – (A) Images T_1 en IRM du Dotarem® (ligne 1) et des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS (ligne 2) en fonction de la concentration en Gd, et de l'eau (ligne 3). (B) Intensités lumineuses déterminées d'après les ROI de l'image T_1 du Dotarem ® (triangles) et des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS (cercles) en fonction de la concentration en Gd et valeurs de la ligne de l'eau (croix).....177
Figure 47 - Viabilité des cellules RAW 264.7 par test au MTT (A) et essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS 179
Figure 48 - Viabilité des cellules SVEC4-10 par test au MTT (A) et essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS. 180

Table des tableaux

Tableau 1 - Propriétés des chélates de gadolinium commercialisés selon (162) 70
Tableau 2 - Influence de la concentration en chitosane sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL. 93
Tableau 3 - Influence de la concentration en HA sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [CS] = 2,5 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL. 94
Tableau 4 - Influence de la concentration en tripolyphosphate sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [CS] = 2,5 mg/mL et [HA] = 0,8 mg/mL. 94
Tableau 5 - Influence de la concentration en chitosane, en acide hyaluronique et en tripolyphosphate sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. 96
Tableau 6 - Influence de la nature et de la concentration en acide, et du pH de la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. Pour toutes les formulations [CS] = 2,5 mg/mL, [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2. En gras, formulation de référence. pH de la phase HA/TPP = 9,6. 100
Tableau 7 - Caractéristiques des nanoparticules de CS/HA/TPP non dialysées (ND) et dialysées(D) 101
Tableau 8 – Paramètres de formulation utilisés pour tester l'impact du rapport m_{CS}/m_{ChS} sur la formation de nanoparticules de CS/ChS 109
Tableau 9 - Paramètres de formulation utilisés pour tester l'influence du débit de la pompe péristaltique 112
Tableau 10 - Influence de la vitesse d'ajout de la phase ChS dans la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS 113
Tableau 11 - Paramètres de formulation utilisés pour tester l'influence du débit de l'agitation et de la sonication 114
Tableau 12 - Influence du temps de sonication et de la vitesse d'agitation sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS. 114

Tableau 13 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP. 117
Tableau 14 - Influence de la masse de HGdDOTA sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP. 119
Tableau 15 – Composition chimique de surface (en pourcentage molaire) des nanoparticules de CS/ChS et CS-HGdDOTA/ChS déterminée par XPS. Les compositions des polymères seuls sont données pour comparaison. 121
Tableau 16 – Rappel de la formulation de nanoparticules de CS/HA/TPP la plus proche du point de bascule. 132
Tableau 17 - Rappel des paramètres de structure (Dh, PdI et ZP) de la formulation de CS/HA/TPP aux concentrations respectives de 2,5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 3,75 mg/mL 132
Tableau 18 - Influence du pH de la phase polycationique sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA, préparées selon le protocole des CS/HA/TPP, déterminés par DLS/ELS 133
Tableau 19 – Paramètres de formulation des nanoparticules CS/HA préparée à partir du protocole CS/HA/TPP pour l'encapsulation de HGdDOTA 134
Tableau 20 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA non dialysées, déterminés par DLS/ELS 135
Tableau 21 - Paramètres de formulation de la première formulation de CS/HA à partir du protocole de CS/ChS 135
Tableau 22 - Influence de la masse molaire d'HA sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA non dialysées, déterminés par DLS/ELS. Les valeurs de l'atténuateur utilisé par l'appareil pour la mesure est un indicateur de la concentration en nanoparticules. 137

Tableau 23 - Influence du pH de la phase polycationique sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA, préparées selon le protocole des CS/HA/TPP, déterminés par DLS/ELS. 138
Tableau 24 - Caractérisation des nanoparticules de CS-HGdDOTA/HA et CS/HA-HGdDOTA élaborées à partir du protocole CS/ChS 139
Tableau 25 - Composition du tampon phosphate pH 7,4 utilisé pour les études de stabilité 144
Tableau 26 - Valeurs des forces ioniques calculées pour les différents milieux 145
Tableau 27 - Diamètres hydrodynamiques et indices de polydispersité obtenus par DLS sur les nanosuspensions de nanoparticules CS/HA/TPP non dialysées après incubation dans l'eau (contrôle), les solutions de NaCl ou le tampon phosphate. ...147
Tableau 28 - Influence de l'ajout de crosslinker ionique sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS. 155
Tableau 29 - Influence de la présence d'EDC sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS, déterminés par DLS/ELS 156
Tableau 30 - Diamètres hydrodynamiques et indices de polydispersité des nanoparticules de CS/ChS et CS/ChS + EDC après incubation dans l'eau, les solutions de NaCl ou le tampon phosphate. 157
Tableau 31 - Influence du rapport mPLL/mChS sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les indices de polydispersité et les potentiels zêta des nanoparticules de PLL/ChS mesurés par DLS/ELS. L'agitation appliquée au cours du mélange des phases est fixée à 1200rpm pour ces expériences. 169
Tableau 32 - Influence de la vitesse d'agitation sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de PLL/ChS déterminés par DLS/ELS. Le rapport m_{PLL}/m_{ChS} est de 1:5. 170
Tableau 33 - Paramètres utilisés pour la formulation optimisée des nanoparticules de PLL/ChS 170
Tableau 34 - Diamètres hydrodynamiques (D_H) et indices de polydispersité (PdI) des nanoparticules PLL/ChS après dilution au 1/2 dans l'eau, les solutions de concentrations croissantes en NaCl et le tampon phosphate, déterminés par DLS. 172

Tableau 35 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de PLL/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP. 174

Abréviations

ACE : Agent de contraste extracellulaire

ACSO : Agent de contraste spécifique d'organe

ACV : Agent de contraste vasculaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American type culture collection

BHE : Barrière hémato-encéphalique

ChS : Chondroïtine sulfate

CS : Chitosane

Da : Dalton

DD : Degré de déacétylation

DLS : Dynamic Light Scattering ou Diffusion dynamique de la lumière

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

EDC : (1-éthyl-3-(3-dimethylaminopropyl))carbodiimide

ELS : Electrophoretic Light Scattering ou Diffusion électrophorétique de la lumière

EMA : Agence européenne du médicament

EPR : Enhanced Permeability Retention

FDA : Food and Drud Administration

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

Gd : Gadolinium

HA : Acide hyaluronique

ICP-OES : Spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif

IRM : Résonance Magnétique Nucléaire

LDH : Lactate déshydrogénase

LNPs : Nanoparticules lipidiques

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium)

NMRD : Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion

PEG : Polyéthylèneglycol

PdI : Indice de polydispersité

PLA : Acide polylactique

PLGA : Acide polylactique-o-glycolique

PSMA : Prostate specific membrane antigene

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SA : Substance active

SEM : Microscopie électronique à balayage

SPIO : Small particule iron oxyde

***T_1* :** Temps de relaxation longitudinale

***T_2* :** Temps de relaxation transversal

TEM : Microscopie électronique à transmission

TPP : Tripolyphosphate

USPIO : Ultrasmall particle iron oxyde

XPS : Spectroscopie photoélectronique X

ZP : Potentiel Zeta

Introduction générale

La nanoencapsulation est une technique qui consiste à piéger une substance dans ou à la surface d'une particule de taille nanométrique. Les domaines d'application sont assez variés comme la santé, l'industrie alimentaire ou encore l'agriculture.
En santé, la nanoencapsulation possède de nombreux avantages. En confinant les substances actives à l'intérieur de particules de taille nanométrique, elle permet de protéger les molécules des dégradations métaboliques et donc d'augmenter la demi-vie du médicament, mais aussi à l'inverse, de protéger l'organisme des potentiels effets délétères de ces molécules. De plus, la nanoencapsulation permet de contrôler la libération des substances actives et de les adresser vers un site d'intérêt spécifique, ce qui en fait une technologie très pertinente pour l'élaboration de formulations de nouveaux médicaments, comme des agents anti-cancéreux ou des molécules à visée diagnostique.

De nombreux types de nanoparticules ont été mis au point pour encapsuler des substances actives, comme les liposomes (1), les nanoparticules lipidiques solides (2), les dendrimères (3) ou encore les nanoparticules de polymères (4). D'autres possèdent intrinsèquement une activité thérapeutique ou diagnostique comme les nanoparticules d'or (5) et des oxydes de fers (6).

Le diagnostic précoce est un élément crucial dans la prise en charge thérapeutique du patient. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est aujourd'hui la technique la plus répandue, grâce à sa bonne résolution spatiale et à son innocuité, pour détecter des anomalies dans les tissus de l'organisme. Cependant cette technique manque de sensibilité ce qui impose l'utilisation d'agents de contraste pour améliorer la qualité des images et faciliter le diagnostic (7). Les plus utilisés sont ceux à base de gadolinium. L'utilisation de ces médicaments n'est pas anodine : leur efficacité étant limitée, ils nécessitent d'être injectés à des doses élevées, ce qui peut provoquer des effets secondaires indésirables. Il est donc nécessaire de trouver des moyens pour améliorer leur efficacité. Le développement au laboratoire d'une formulation de nanohydrogels à partir de polymères biocompatibles et biodégradables a mis en évidence l'augmentation importante de l'efficacité *in vitro* des agents de contraste à base de gadolinium confinés dans ces structures (8). Cependant, la nature et les propriétés de surface des nanoparticules créées pourraient limiter leur utilisation *in vivo* à cause des interactions importantes avec les macromolécules et protéines environnantes. Afin de pallier cette limitation, le développement de nanoparticules à

charge de surface négative apparaît comme une stratégie pertinente. Cette approche permettrait de minimiser les interactions avec les macromolécules et protéines environnantes, tout en limitant la capture par les cellules immunitaires innées, en particulier les macrophages.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail sont :

- d'explorer les possibilités de formation de nanohydrogels à partir de polymères biocompatibles et biodégradables en utilisant des procédés de chimie douce. Le procédé de gélification ionique, basé sur la formation d'édifices polyélectrolytiques par interactions électrostatiques entre des polymères de charges opposées, répond à ces critères. Cette méthode devra conduire à l'obtention de nanoparticules dont la taille et la charge de surface seront compatibles avec les applications visées ;

- d'acquérir de nouvelles connaissances sur les phénomènes ayant lieu aux interfaces entre les nanoparticules et leur milieu environnant, pour permettre de mieux appréhender la stabilité des objets en milieu physiologique ainsi que leur devenir *in vivo*.

- d'évaluer l'efficacité des systèmes produits, en tant que vecteur de substances actives pour le diagnostic. Les formulations mises au point devront valider les tests de biocompatibilité et permettre une amélioration de l'efficacité des agents de contraste encapsulés.

Pour cela, après un premier chapitre destiné à mieux replacer l'étude dans son contexte, le travail concernant la mise au point de nanoparticules chargées négativement sera présenté. Grâce à la combinaison de différentes techniques (DLS, AFM, XPS, ICP, relaxométrie…) une caractérisation complète de ces formulations sera établie. Dans un deuxième temps, les formulations les plus intéressantes seront placées dans des milieux mimant les conditions physiologiques afin d'évaluer leur stabilité. Les mécanismes impliqués dans la déstabilisation seront explorés et des hypothèses pour les expliquer seront émises. Enfin, dans un dernier chapitre, une formulation présentant les propriétés les plus prometteuses sera évaluée en tant que vecteur d'agent de contraste et son efficacité pour le diagnostic sera déterminée par IRM.

Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

La recherche sur les nanotechnologies permet d'entrevoir aujourd'hui une future révolution de chaque aspect de notre quotidien dans plusieurs domaines : le sport, l'électronique ou encore la santé. C'est dans ce dernier secteur, qu'émerge depuis plusieurs années un champ de recherche extrêmement actif autour des nanoparticules. Il est alors possible d'envisager l'élaboration d'objets de quelques nanomètres pouvant transporter et acheminer une ou plusieurs substances actives. La recherche dans ce domaine, est motivée par le besoin croissant d'améliorer l'efficacité des médicaments. Protégées par une architecture nanométrique, les substances actives pourront franchir un certain nombre de barrières biologiques telle que la Barrière Hémato-Encéphalique (9) ou ne pas subir la dégradation métabolique, tout en diminuant les effets indésirables ressentis par le patient.

De nombreux matériaux permettent aujourd'hui l'élaboration de nanoparticules, comme certains métaux (or, argent ou zinc), les lipides ou encore les polymères. Pour des raisons de biocompatibilité et de biodégradabilité, les nanoparticules réalisées dans ce travail seront élaborées à partir de polymères. Ces derniers sont des macromolécules, formées d'unités constitutives (ou monomères), liées entre elles par des liaisons covalentes. Les polymères peuvent être naturels comme les polysaccharides, artificiels résultant de la modification chimique d'un polymère naturel, comme les dérivés de la cellulose (acétophtalate de cellulose) ou encore synthétiques, issus de la polymérisation de plusieurs monomères (ex : acide polyglycolique).
Il est dès lors possible de jouer sur différents facteurs pour contrôler certains paramètres des nanoparticules, notamment leur charge de surface.

Dans ce premier chapitre, l'état de l'art permettant de répondre aux principales questions de ce travail ou de les appréhender seront abordés. Les nanoparticules seront d'abord introduites ainsi que la manière pour rendre leur charge de surface négative, notamment en jouant sur la nature des polymères. Puis les méthodes d'élaborations des nanoparticules de polymères, ainsi que leurs méthodes de caractérisations seront expliquées. Ensuite, dans l'optique de renforcer la stabilité des nanoparticules, les différentes méthodes de stabilisation du réseau seront ainsi abordées. Enfin, un des enjeux majeurs de ce travail reste l'optimisation et l'amélioration des agents de contraste utilisées en IRM pour le diagnostic. Dans cette dernière section, le principe de l'IRM ainsi que les principaux agents de contraste

seront décrits, puis l'intérêt de la vectorisation ainsi que l'application aux agents de contraste seront abordés.

1. Polymères utilisables pour la préparation de nanoparticules à charge de surface négative

Un des éléments majeurs sur lequel il est possible d'interagir, pour contrôler la charge de surface des nanoparticules, est la nature des polymères.
En effet l'utilisation de polymères possédant des charges négatives permettrait d'influer directement sur la charge finale des nano-objets. Les principaux polymères utilisés pour la formulation de nanoparticules seront abordés dans cette section. Cependant il est parfois nécessaire d'associer plusieurs polymères entre eux pour obtenir un réseau nanoparticulaire stable. Il faudra alors influer sur la quantité de certains polymères pour remplir les objectifs de formulation.

1.1. Polymères naturels

Les principaux polymères naturels utilisables pour la nanoencapsulation sont : le chitosane, l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate et les alginates.

1.1.1. Le Chitosane

Le chitosane est un polymère d'origine marine, largement utilisé dans la recherche. Il est dérivé de la chitine, qui est un composant extrait à partir de carapaces de crustacés. La chitine, insoluble en milieu aqueux, devra subir une étape de déacétylation pour former le chitosane. Le processus de déacétylation consiste alors à retirer des groupements acétyle de la chitine en utilisant un solvant alcalin. Cette étape, permettant la transformation de la chitine en chitosane, permet aussi de rendre le polymère soluble en milieu aqueux. En effet plus le taux de d'acétylation diminue, plus le polymère devient hydrosoluble. Sa structure est donc composée d'association entre des résidus N-acétylglucosamine et glucosamine en fonction de son degré

d'acétylation (DA). Le nom de chitosane est alors donné lorsque le DA de la chitine devient inférieur à 50% (Figure 1).

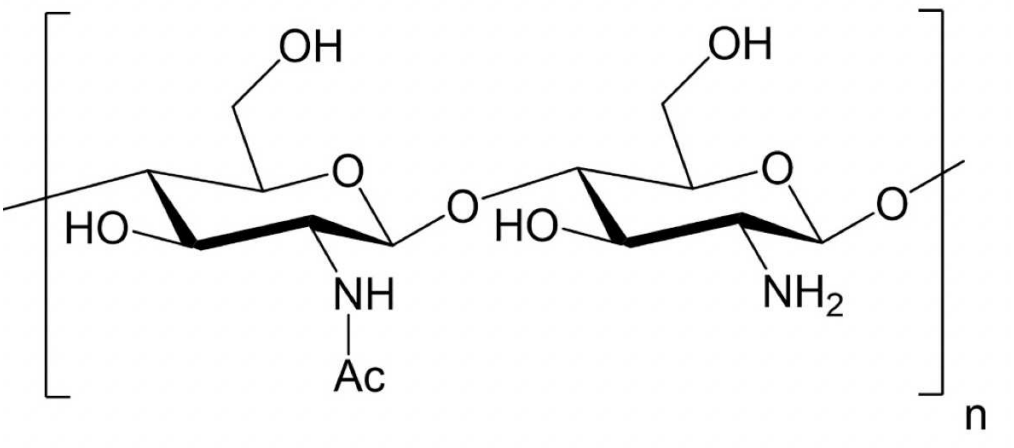

Figure 1 - Structure du chitosane selon (10)

Le chitosane possède un certain nombre de propriétés intéressantes, telles que sa biocompatibilité, sa biodégradabilité ou encore sa capacité à former des films, des hydrogels ou des nanoparticules. Il est donc largement utilisé dans divers domaines, notamment en médecine, dans l'agriculture, dans l'industrie alimentaire ou encore dans l'environnement.

En santé, il est de plus en plus utilisé dans les pansements, puisqu'il a été démontré qu'il possède une action de régénération tissulaire et de régénération des plaies. Cette action est permise par l'emploi d'hydrogels à base de chitosane ou d'autres polysaccharides connus, permettant de créer un environnement humide et légèrement acide, propice à la cicatrisation. Ces hydrogels permettent aussi, de protéger les plaies, de réduire la douleur locale et de favoriser la croissance de nouvelles cellules en réduisant la nécrose des tissus (11).
Le chitosane rentre aussi dans la composition d'implants. Il est alors utilisé comme agent de coating de dispositifs médicaux implantables, pour ses propriétés de biocompatibilité, biodégradabilité ainsi que son action bactéricide contre une large variété de micro-organismes (12,13).
Enfin, il entre dans la composition des fils de sutures grâce à sa biodégradabilité dans les liquides corporels. L'utilisation de ces fils résorbables permet d'éviter le recours à un acte médical de retrait. Cependant, les fils de suture à base de chitosane possèdent une faible force mécanique ainsi qu'un cycle de dégradation relativement long (environ

40 jours), il est donc nécessaire d'adapter leur utilisation au bon type d'acte médical (10). Pour pallier ces limites, des chercheurs travaillent sur la modulabilité du cycle de dégradation et l'amélioration de la force mécanique en ajoutant d'autres polymères (14,15)

En recherche, le chitosane est plébiscité pour un certain nombre de propriétés déjà évoquées mais surtout pour sa capacité à former des nanoparticules. Grâce à ses caractéristiques de biocompatibilité et de biodégradabilité, mais aussi à sa capacité à former des charges positives à sa surface en solution, il est le candidat idéal pour l'élaboration de nanoparticules par gélification ionique. De nombreuses équipes de recherche travaillent sur ce polymère.
C'est notamment le cas de l'équipe du Pr. Hillaireau qui élabore des nanoparticules de chitosane sans avoir recours à un deuxième polymère. Les nanoparticules sont alors stabilisées par l'ajout de tripolyphosphate ou d'ATP (16). Les ions phosphates permettent de créer un réseau nanoparticulaire par interaction avec les groupements amines protonés du chitosane. D'autres équipes de recherche utilisent un polyanion de nature polymérique pour former un complexe polyélectrolytique nanoparticulaire, comme l'acide hyaluronique (17,18), la chondroïtine sulfate (19,20)

Bien qu'étant un polycation, le chitosane est un polymère central pour l'élaboration de nanoparticules du fait de sa capacité à se lier à de nombreux polyanions, et permet d'encapsuler de nombreuses molécules pour différentes indications. Récemment, la recherche sur ces nanoparticules a avancé dans plusieurs domaines, tels que l'oncologie (21,22), l'ophtalmologie (23), l'urologie (24) ou encore l'endocrinologie (25). De plus, le chitosane peut être modifié ou fonctionnalisé pour palier certains problèmes liés à ses caractéristiques intrinsèques. Il est envisageable de modifier son degré de déacétylation ou sa masse molaire, d'y ajouter des groupements de façon covalente ou non, pour améliorer sa solubilité ou pour permettre un auto-assemblage du chitosane sous forme de nanoparticules (26–28).

1.1.2. L'Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un polymère linéaire appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs), composés d'associations répétées d'acide glucuronique avec une N-acétyl-glucosamine (Figure 2). L'acide hyaluronique est présent dans les tissus animaux mais aussi chez l'homme ; il est présent dans la matrice extra-cellulaire (MEC), dans la peau, dans le cartilage et dans le liquide synovial (29).

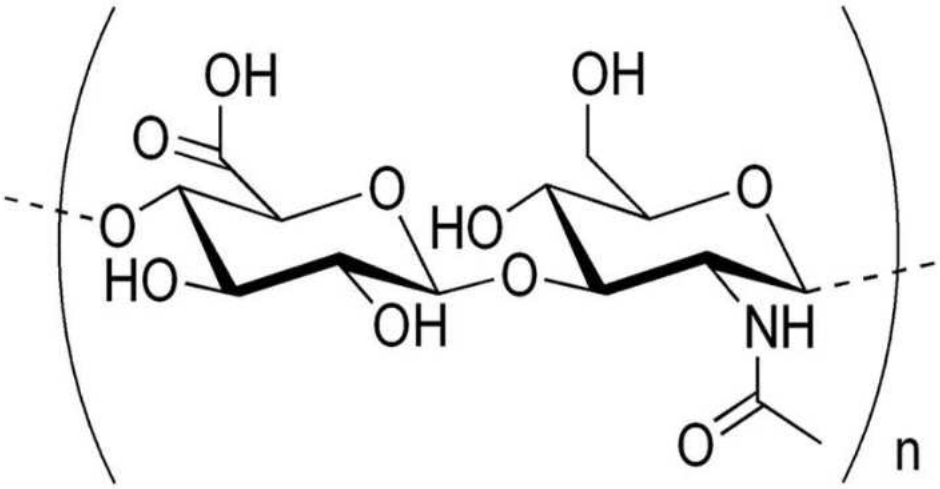

Figure 2 - Structure de l'acide hyaluronique selon (30)

Ce polymère est un biomatériau naturel, biocompatible et biodégradable, ce qui permet son utilisation dans de nombreux domaines, comme le domaine biomédical, la cosmétique ou la médecine (31).

Dans le domaine biomédical, l'HA est utilisé notamment dans l'ingénierie tissulaire, permettant de créer des matrices pour le développement et la différenciation cellulaire, ou comme matériau mucoadhésif (32). Il est aussi utilisé sous forme d'hydrogel, seul ou associé à d'autres molécules, dans la cicatrisation des plaies, puisque l'HA joue un rôle majeur dans le processus de cicatrisation (33).

L'HA est aussi très utilisé dans le milieu de la cosmétique et de l'esthétique, pour son pouvoir hygroscopique, d'hydratation et sa capacité à maintenir l'élasticité de la peau (34).

Enfin, en médecine, il permet notamment de traiter les troubles articulaires par injection *in situ*, et de lubrifier les articulations pour réduire la douleur et l'inflammation locale.

Il est plébiscité en recherche pour l'élaboration de nanoparticules et notamment de nano-hydrogels. L'HA est un polyanion et va donc exprimer des charges négatives en solution. Il est donc possible de jouer sur la quantité de ce polymère pour contrôler la charge de surface des nano-objets. De plus, grâce à son fort pouvoir hygroscopique il a une forte capacité à former des gels. L'HA est un très bon candidat pour l'élaboration de nanoparticules par gélification ionique. De plus, son affinité pour les CD44 fait de lui un polymère de choix pour la vectorisation médicamenteuse. En effet le CD44 est un marqueur très présent à la surface des cellules et surtout à la surface des cellules cancéreuses où il est surexprimé (35). L'élaboration de nanoparticules à base d'HA est donc très prometteuse dans la lutte contre le cancer.

Plusieurs formulations à partir d'HA ont été élaborées dans ce sens. Certaines équipes de recherche se sont concentrées sur le greffage de substances actives directement sur le polymère (36). L'agent anticancéreux, ici le Taxol, est conjugué aux chaînes d'HA pour être délivré aux cellules cancéreuses surexprimant le CD44. Une fois internalisée, cette pro-drogue sera hydrolysée par les enzymes intracellulaires et libérera l'agent anticancéreux dans la cellule. Le problème majeur de ce genre de formulation est le risque d'agrégation de substances actives hydrophobes et donc un risque accru d'embolisation des vaisseaux sanguins. D'autres formulations ont été ensuite développées pour limiter ces risques, notamment l'élaboration de micelles polymériques. Ces nanoparticules amphiphiles, sont élaborés par la formation d'une région hydrophobe sur le polymère, entraînant un auto-assemblage sous forme de nanoparticules, permettant d'encapsuler des agents anticancéreux hydrophobes en diminuant le risque d'embolisation des vaisseaux (37). Enfin, des nanovecteurs hygroscopique stabilisés par des cross-linkers (covalents ou ioniques) ont été élaborés. Ces formulations sont de très bons systèmes de délivrance ; ils sont moins sensibles à la dégradation enzymatique que les précédentes formulations et possèdent une meilleure biocompatibilité. Cependant ces systèmes ne peuvent encapsuler que des substances actives hydrophiles.

1.1.3. La chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate est un polymère appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Elle est constituée par la répétition d'unités d'acide glucuronique et de N-acétyl-galactosamine sulfatés à différents endroits.

On distingue plusieurs types de chondroïtine sulfate en fonction de la position du groupement sulfate : la chondroïtine-4-sulfate ou chondroïtine sulfate A qui présente un groupement sulfate sur le carbone 4 de l'unité N-acétyl-galactosamine (GalNAc), la chondroïtine-6-sulfate ou chondroïtine sulfate C où le groupement sulfate est situé cette fois-ci sur le carbone 6 de l'unité GalNAc, la chondroïtine 2,6 sulfate ou chondroïtine sulfate D qui présente deux groupements sulfate, le premier sur le carbone 2 de l'acide glucuronique et le deuxième sur le carbone 6 de l'unité GalNAc et enfin la chondroïtine 4,6 sulfate ou chondroïtine E possédant deux groupements sulfates sur les carbones 4 et 6 de l'unité GalNAc. Ces chondroïtines sulfates sont extraites de diverses sources animales, en fonction de leur type ; les ChS A et C sont plutôt extraites à partir du cartilage de bovins ou de porcs, alors que les ChS D et E proviennent de cartilages de requins (38). Cependant, ce polymère peut aussi être obtenu par synthèse permettant de limiter l'hétérogénéité des chaînes (39) (Figure 3).

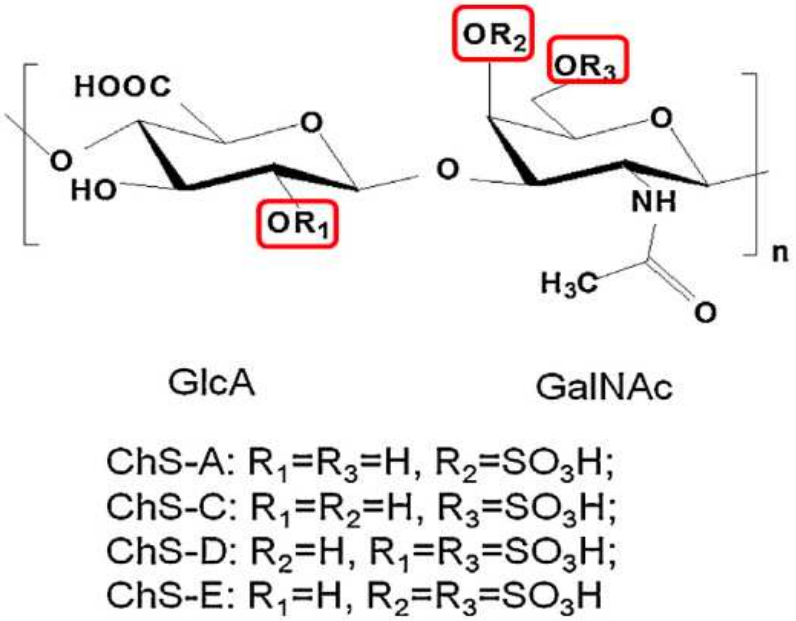

Figure 3 - Structure des Chondroïtine sulfate selon (38)

Dans l'organisme, la chondroïtine sulfate est fortement concentrée dans le cartilage permettant une hydratation de l'articulation et une protection contre les chocs. Elle est utilisée par voie orale en santé pour le traitement symptomatique de l'arthrose. Commercialisée sous le nom de Chondrosulf®, ce médicament va réduire l'inflammation locale engendrée par l'arthrose. Bien que contestée par le domaine médical, la prise de chondroïtine sulfate permet de diminuer l'utilisation des AINS par les patients. Cependant, à cause de son action peu probante, la ChS n'a qu'une place très mineure dans la stratégie thérapeutique contre l'arthrose (40).

Son utilisation en thérapeutique ne s'arrête pas là. Des études plus récentes mettent en évidence l'utilisation prometteuse de ce polymère dans la prise en charge de l'ulcère gastrique éthanol induit. L'utilisation de chondroïtine sulfate extraite de requin, permettrait d'obtenir une gastro protection contre l'ulcère, égale à celle obtenue par traitement à base d'oméprazole (41).

La ChS peut aussi être utilisée comme vecteur pour la délivrance médicamenteuse. A l'image de l'HA, son affinité pour un certain nombre de récepteurs cellulaires, notamment le CD44 permet d'envisager l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance ciblée de médicaments (38). De plus sa biocompatibilité et sa biodégradabilité font de la ChS un polymère de choix pour une utilisation en santé humaine. Plusieurs manières d'obtention de nanovecteurs à partir de chondroïtine sulfate sont décrites dans la littérature.
Il est tout d'abord possible d'obtenir des nanoparticules par auto-assemblage en modifiant la ChS pour y ajouter des groupements hydrophobes. Ces groupements peuvent être des molécules actives, comme la prednisolone par exemple (42) ; on parle alors de pro-drogue. La prednisolone deviendra active lors de son clivage à partir du squelette de ChS. L'avantage de ces prodrogues réside dans l'augmentation de la solubilité en milieu aqueux des molécules hydrophobes ainsi que dans la forte capacité de greffage de la substance active. Ces groupements hydrophobes peuvent aussi être inertes servant uniquement à former un nanovecteur amphiphile. En ajoutant un groupement hydrophobe, la ChS s'auto-assemble sous forme de micelles polymériques nanoparticulaires possédant un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile. Ces micelles polymériques permettent d'encapsuler dans leur cœur des substances actives hydrophobes et sont une bonne alternative aux nanoparticules de

polymères synthétiques, car elles possèdent un meilleur profil de biocompatibilité – biodégradabilité – activité métabolique que ces dernières (38).
La chondroïtine sulfate peut ensuite être fixée à d'autres structures pour plusieurs applications. En premier lieu, elle est utilisée comme agent de coating de nanoparticules pour la vectorisation, notamment pour sa capacité, à se fixer sur le CD44, à cibler le cartilage (43) ou encore pour contrôler la charge de surface des nanoparticules. En deuxième lieu, elle peut servir à la stabilisation de nanoparticules de métal, notamment dans la formulation de nanoparticules d'or et d'argent. La répulsion électrostatique générée par les chaînes de ChS, combinée à un fort encombrement stérique lié à sa structure, permet d'éviter l'agglomération des particules d'argent et de leur conférer une grande stabilité (38,44).
Enfin la ChS peut être utilisée en association avec un autre polysaccharide, pour former des complexes polyélectrolytiques grâce à la technique de gélification ionique. Selon Ahmare et al, qui ont recensé les publications traitant de l'utilisation de la chondroïtine sulfate, dans l'élaboration de nanoparticules, à des fins de vectorisation médicamenteuse, très peu de systèmes polyélectrolytiques à base de ChS ont été élaborés et étudiés à ce jour (45). Bien qu'assez peu documentés, les complexes polyélectrolytiques à base de CS et ChS sont très prometteurs, notamment en ce qui concerne la délivrance oculaire, articulaire ou l'encapsulation de substances actives anti-cancéreuses (46–49).

1.1.4. Les alginates

L'alginate de sodium est l'un des polysaccharides naturels les plus utilisés. Il est constitué de l'association d'acide β-D-mannuronique (M) lié en position 1-4 avec des résidus d'acide α–L-guluronique (G). La structure de l'alginate est un mélange entre plusieurs blocs de résidus GG, MM et GM, la proportion de ces trois types de blocs joue un rôle critique dans les propriétés physiques des alginates (50) (Figure 4). Ces polysaccharides sont obtenus majoritairement à partir d'algues brunes du genre *Ascophyllum, Durvillaea, Ecklonia* ect …), mais peuvent aussi être obtenus à partir de souches bactériennes (50,51). L'acide alginique est extrait des algues à l'aide d'HCl, puis soit du NaCl soit du $CaCl_2$ est ajouté à l'extrait pour obtenir respectivement de l'alginate de sodium ou de l'alginate de calcium (52).

Les alginates sont très utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire ou de la cosmétique comme agents viscosifiants, épaississants ou de conservation des aliments (53,54).

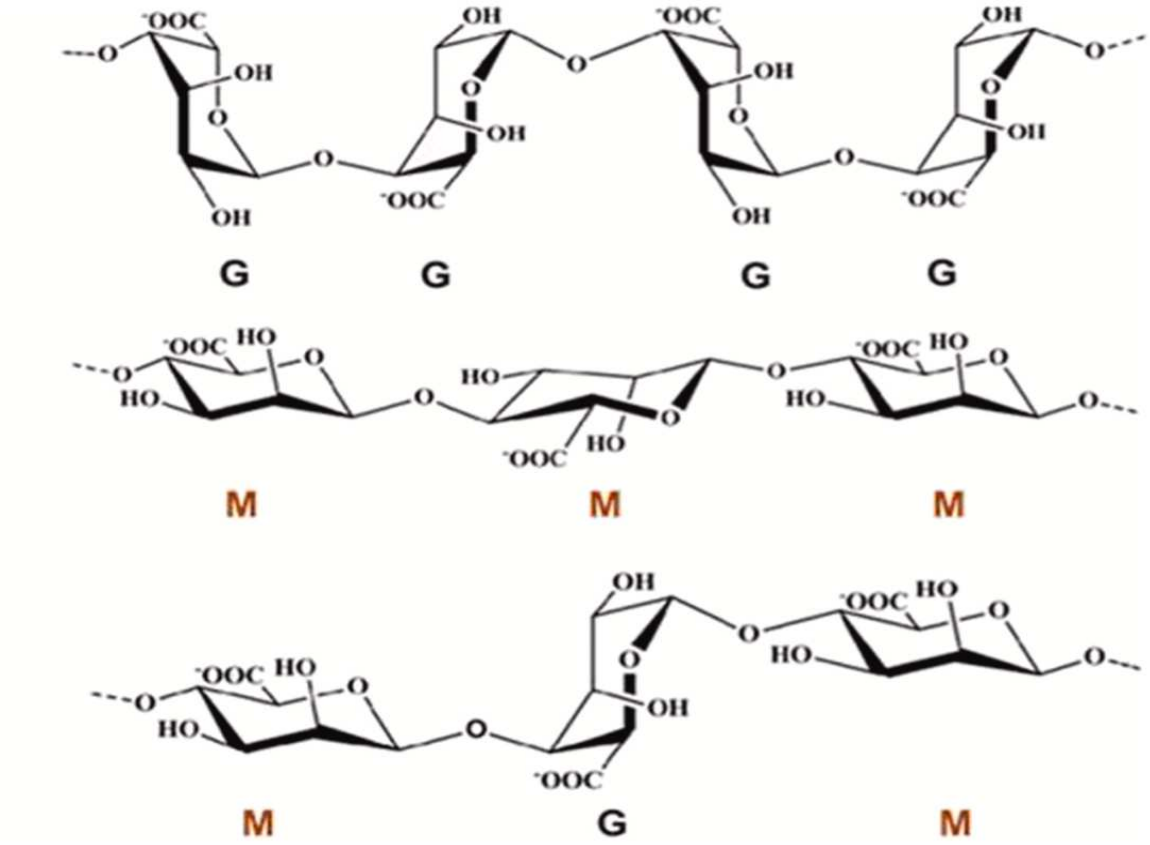

Figure 4 - Structure de l'alginate par association d'homopolymères d'acide a-1,4-L-guluronique (GG), d'homopolymères d'acide B-1,4-D-mannuronique (MM) et d'hétéropolymères de G et M selon (50)

Cependant son utilisation dans le domaine biomédical est tout aussi intéressante, puisqu'une des propriétés principales des alginates est la capacité de former des hydrogels. Ceux-ci peuvent être formés par activation des alginates grâce à un ion divalent comme le calcium. Ces ions vont se substituer aux ions sodium des acides guluroniques, et créer une réticulation de leur structure (55).

Cette propriété à former des hydrogels est plébiscitée dans le milieu de la recherche. Il est alors possible d'envisager l'élaboration à la fois de microgels ou de nanogels en fonction de leur taille (56). La recherche sur les hydrogels d'alginate se concentre notamment sur deux grands domaines.

Tout d'abord, grâce à leur propriété d'hygroscopicité, de biocompatibilité et leur capacité à encapsuler des SA, les hydrogels d'alginate sont les parfaits candidats pour

le développement de structures de délivrance de SA, en particulier dans le domaine de l'oncologie (52). De nombreuses structures ont été élaborées dans le but de réduire les effets indésirables des substances actives et d'améliorer leur efficacité (57–61).

Enfin, les alginates sont de parfaits candidats pour le traitement et la cicatrisation des plaies, grâce à leurs propriétés hygroscopiques, hémostatiques et non immunogènes. L'élaboration d'hydrogels d'alginate permet de créer un environnement humide nécessaire à la cicatrisation tout en absorbant les exsudats des plaies ; de plus, leur capacité à favoriser localement la production de cytokines permet une accélération de la cicatrisation (62). Récemment une équipe de recherche a mis au point un hydrogel prometteur à base d'alginate de sodium et de povidone iodine dans le but d'accélérer la cicatrisation et de limiter la contamination bactérienne et fongique des plaies (63).

1.2. Polymères synthétiques

Nous aborderons dans ce paragraphe les polymères suivants : l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglyclique (PGA), les copolymères d'acide lactique et glycolique (PLGA), la polycaprolactone (PCL), les polycyanoacrylates, les PEG et la poly-L-lysine (PLL).

1.2.1. Le PLA

L'acide polylactique (PLA) est un polymère hydrophobe aliphatique synthétique, biodégradable, biocompatible, fabriqué à partir de matières premières renouvelables. Le PLA est obtenu par polymérisation de monomères d'acide lactique. Ce dernier, obtenu par fermentation du blé, du riz ou encore du maïs, est chiral. On observe donc plusieurs formes de PLA, en fonction des énantiomères d'acide lactique choisis. Il est possible d'obtenir des PLA issus de mélange d'acide L-lactique ou D-lactique ou encore des PLA issus uniquement d'acide L-lactique ou D-lactique (64) (Figure 5).

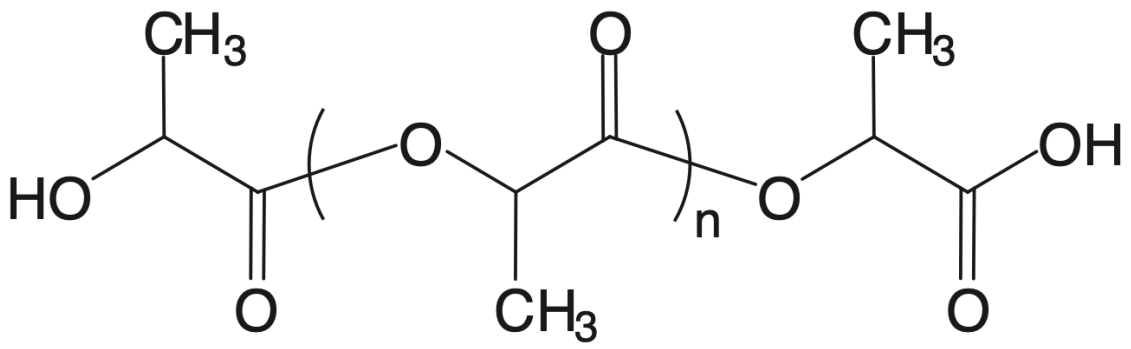

Figure 5 - Structure de l'acide polylactique selon (65)

Historiquement, le PLA comme beaucoup de polymères synthétiques a été développé comme alternative aux plastiques issus du pétrole (66). Ce polymère a ensuite été utilisé dans le milieu de la santé à partir du moment où la FDA a approuvé son emploi au contact des fluides biologiques (67), ayant pour conséquence, son apparition dans les fils de sutures, l'ingénierie tissulaire ou encore dans la conception de matrices (68). Le PLA est aussi utilisé pour l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance de substances actives. Différentes méthodes d'élaboration de nanoparticules à partir de PLA existent ; elles sont basées sur les propriétés désirées des nano-objets ou encore sur la nature de la SA (69,70).

1.2.2. Le PGA

L'acide polyglycolique est un polymère hydrophobe, biodégradable et biocompatible, obtenu à partir de monomères d'acide glycolique ou de glycolide (Figure 6). Plusieurs voies d'obtention sont possibles à ce jour. Le PGA peut être obtenu *via* polymérisation par ouverture de cycle de glycolide (71) ou encore par condensation d'acide glycolique (72).

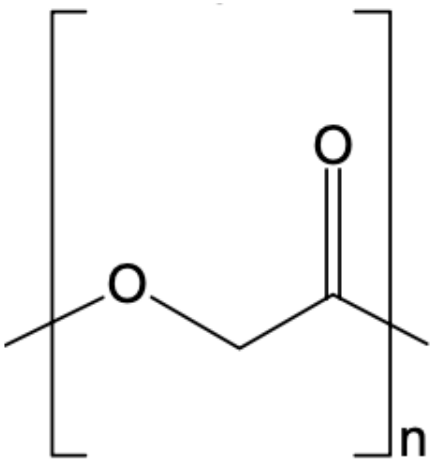

Figure 6 - Structure de l'acide polyglycolique selon (73)

Le PGA a trouvé son utilité dans la santé, dès les années 1960. En 1962, des fils de sutures biodégradables de PGA, ont été développés sous le nom de Dexon® (74). Son utilisation validée par la FDA en 1969, a suscité un fort intérêt envers ce polymère pour son utilisation dans le domaine biomédical, dans lequel son utilisation est dorénavant très variée.

Il peut être utilisé :

- Comme barrière membranaire pour la régénération tissulaire ou osseuse ; il permet d'éviter la migration de cellules ou tissus indésirables pendant le processus de régénération (75),
- Comme peau artificielle (76), permettant de maintenir un environnement humide tout en protégeant localement des infections sans induire d'inflammation.
- En orthopédie pour l'élaboration de matrices servant à la régénération des ligaments, tendons ou os. La matrice, biodégradable en quelques semaines, permettra alors une meilleure régénération ainsi qu'une meilleure intégration du dispositif (77,78).

Le PGA entre aussi dans la composition des stents et des fils de sutures, il peut être envisagé de les rendre actifs par ajout d'une substance active à libération prolongée.

Le PGA est enfin utilisé dans l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance de substances actives (79). Comme tous les polymères synthétiques, leurs propriétés peuvent être modulées par modification de leur structure pendant leur synthèse. Ces

modifications permettent au PGA d'être utilisé dans de nombreuses formulations de nanoparticules. Cependant ces dernières années le PGA n'est plus très utilisé seul, mais plutôt en association avec le PLA (Figure 7).

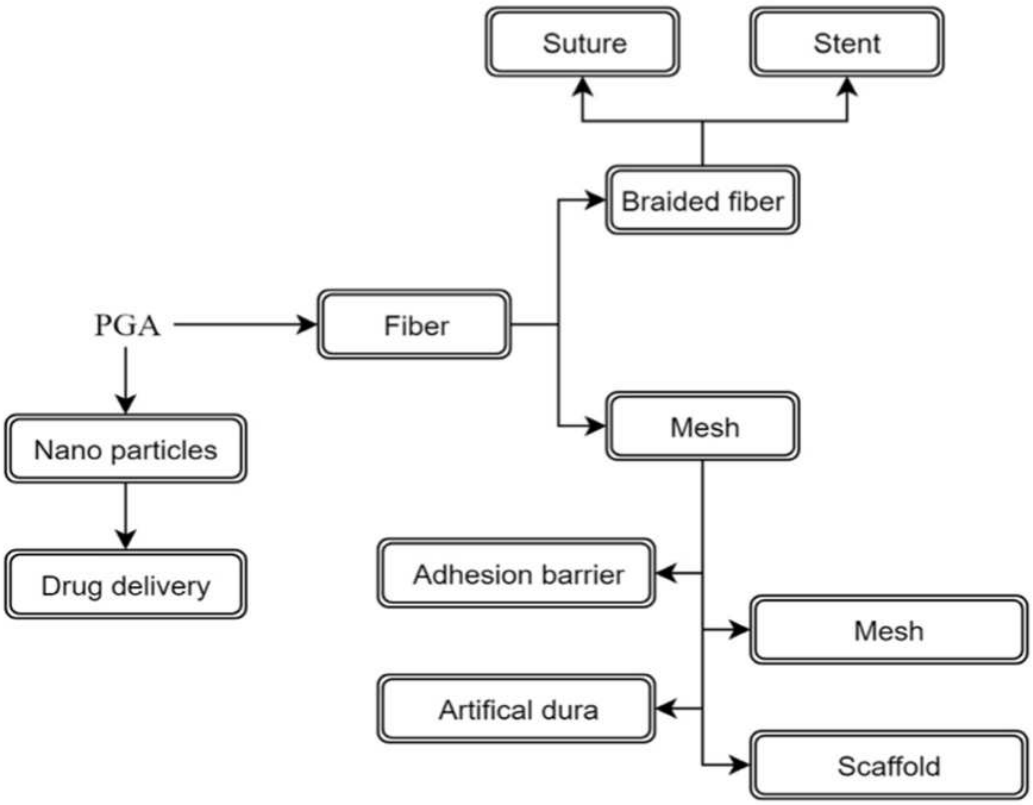

Figure 7 - Utilisation du PGA dans le domaine médical selon (80)

1.2.3. Le PLGA

Le PLGA est un co-polymère synthétisé par polymérisation d'acide poly-lactique et d'acide poly-glycolique. Le ratio entre ces deux unités constitutives va influer les propriétés du PLGA, notamment en ce qui concerne l'encapsulation de substances actives. En effet, un PLGA plus riche en acide lactique va augmenter son hydrophobie, permettant une vitesse de dégradation et de libération de la substance active plus lente (81) (Figure 8).

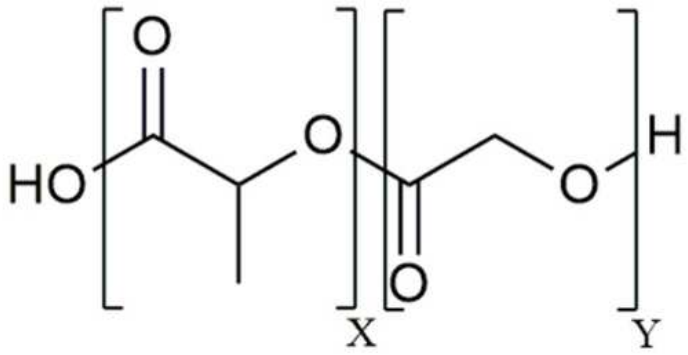

Figure 8 - Structure de l'acide poly lactique-co-glycolique selon (82)

Ce polymère possède de nombreuses propriétés très intéressantes pour l'élaboration de nanoparticules. Il est biocompatible et biodégradable, s'érode peu avec le temps et peut être aisément modifié pour moduler certaines de ses propriétés (83). Il est en outre possible de contrôler sa masse molaire et par extension la taille des nanoparticules formées, ainsi que le ratio acide polylactique/acide polyglycolique, en fonction de la substance active à encapsuler (84–86). De plus, le PLGA est un bon candidat pour la modification ou la fonctionnalisation de sa structure, permettant d'envisager son utilisation dans l'encapsulation de substances actives, aussi bien hydrophiles que hydrophobes.

Grâce à ses propriétés, le PLGA est le polymère le plus utilisé en recherche dans la réalisation de nanoparticules, dans de nombreux domaines thérapeutiques.

Il est tout d'abord utilisé dans le domaine cardiovasculaire, où le traitement de la resténose a été étudié par encapsulation de bloqueur de PDGF (platelet-derivated growth factor)(87).

Le PLGA est aussi utilisé dans les maladies inflammatoires : des équipes de recherche ont tenté tout d'abord d'encapsuler de l'atorvastatine dans des nanoparticules de PLGA et de chitosane, pour traiter l'inflammation oculaire locale, grâce à l'action anti-inflammatoire de l'atorvastatine et les propriétés muco adhésives du chitosane (88).

Le PLGA a ensuite été investigué dans le traitement des MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, par la réalisation de nanoparticules de PLGA et de chitosane fonctionnalisées avec des PEG pour le ciblage des muqueuses intestinales (89).

Enfin les nanoparticules de PLGA sont surtout utilisées dans le domaine de l'oncologie, où la notion de vectorisation est un élément central dans la recherche de nouvelles armes thérapeutiques. De nombreuses équipes de recherche se sont concentrées sur cette thématique, ce qui explique une littérature fournie dans ce domaine. L'encapsulation de nombreux anticancéreux comme la doxorubicine (90,91), le paclitaxel (92), ou encore l'étoposide (93,94) a été tentée en fonctionnalisant les nanoparticules de PLGA avec différents ligands pour cibler certains types de récepteurs. Ces études ont montré une amélioration de l'activité cytotoxique des substances actives contre les cellules cancéreuses, tout en diminuant les effets indésirables liés à ces substances.

Très utilisé aujourd'hui pour l'élaboration de nanoparticules, le PLGA fait l'objet d'une attention particulière, notamment en ce qui concerne la toxicité de ces nanoplastiques. Récemment, une étude a mis en évidence un risque accru de dysfonction cardiovasculaire sur un modèle murin après injection intraveineuse de nanoparticules de PLGA pendant deux semaines (95). Bien qu'isolée, cette étude pourrait être une porte d'entrée à de nombreuses autres, limitant ainsi l'utilisation des polymères synthétiques, au profit des biopolymères réputés pour leur excellente biocompatibilité.

1.2.4. La PCL

La polycaprolactone est un polymère aliphatique hydrophobe. La PCL est obtenue par polymérisation de monomères de caprolactone par ouverture de cycle (Figure 9). Grâce à ses propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, la FDA et l'EMA ont approuvé la PCL pour son utilisation dans le domaine biomédical, notamment pour l'ingénierie tissulaire, la fabrication de matrice osseuse ou comme composant des systèmes de pontages vasculaires (96,97).

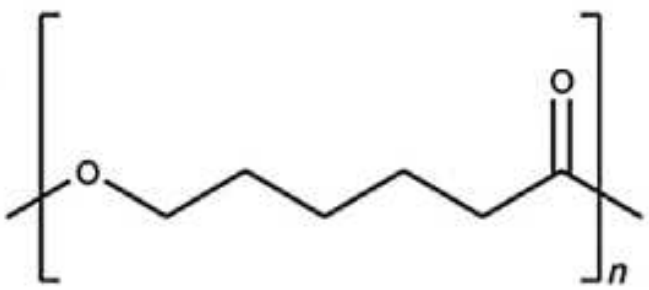

Figure 9 - Structure de la polycaprolactone selon (98)

En recherche, la PCL est très utilisée dans l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance de substances actives et ce, dans de nombreux domaines thérapeutiques. Dans le domaine cardiovasculaire, elle est à la base de formulations pour lutter contre l'hypertension artérielle ; Gimenez et al ont mis au point des nanoparticules à base de PCL pour l'encapsulation d'un antihypertenseur, l'anandamide. Cette nanoformulation protègerait, chez l'homme, cette SA très fragile lui permettant d'agir sur la baisse de pression artérielle ainsi que sur les marqueurs inflammatoires du remodelage cardiaque (99).

Très utilisées dans le domaine de l'oncologie, les formulations à base de PCL sont nombreuses pour améliorer l'efficacité des anticancéreux, tout en diminuant leur effet indésirable. De nombreuses SA hydrophobes ont donc été encapsulées dans des nanoparticules de PCL, comme la doxorubicine (100), le docetaxel (101), le paclitaxel (102) ou encore la curcumine (103).

1.2.5. Les Polycyanoacrylates

Les polycyanoacrylates sont des polymères aliphatiques hydrophobes élaborés par polymérisation de plusieurs monomères de cyanoacrylates (Figure 10). Historiquement, ces monomères ont été inventés dans les années 1950, plus connus sous le nom de « super glue », utilisés comme colle aussi bien dans l'industrie qu'en santé. Ces cyanoacrylates sont obtenus par condensation de formaldéhyde avec du cyanoacétate d'alkyle (104).

Les propriétés bactériostatique, hémostatique et adhésive des cyanoacrylates ont permis d'envisager leur utilisation en chirurgie, notamment pour la fermeture des plaies, comme alternative aux sutures (105).

Dans les années 1980, l'équipe du Pr. Couvreur a élaboré avec succès les premières nanoparticules à partir de polycyanoacrylate et plus précisément à base de poly isobutyl polyacrylate (106) et à base de poly alkyl cyanoacrylate (PACA)(107).

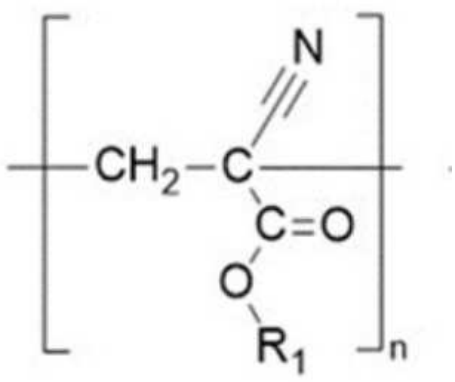

Figure 10 - Structure du poly alkyl cyanoacrylate selon (108)

Des nombreuses formulations de nanoparticules de PACA ont vu le jour à partir de ces travaux. Plusieurs types de nanoparticules peuvent alors être préparés comme des nanosphères (109) ou des nanocapsules à cœur lipidique (110) ou aqueux (111), permettant d'envisager un large choix de SA à encapsuler (112). Les nanoparticules de polycyanoacrylate ont été étudiées notamment, pour la délivrance de peptides par voie orale et plus particulièrement l'insuline (113), pour la délivrance de SA au cerveau, ou encore pour la délivrance d'agents anticancéreux (114)

1.2.6. Les PEG

Le polyéthylène glycol est un polymère linéaire constitué d'unités éthoxy, obtenues par la polymérisation d'oxyde d'éthylène (Figure 11). Il est constitué de nombreux groupements hydroxyles, permettant de le conjuguer facilement avec d'autres groupements (115). Les PEG sont utilisés aussi bien, en industrie agro-alimentaire dans l'emballage de denrées alimentaires, qu'en thérapeutique en tant que laxatif osmotique pour le traitement des constipations.

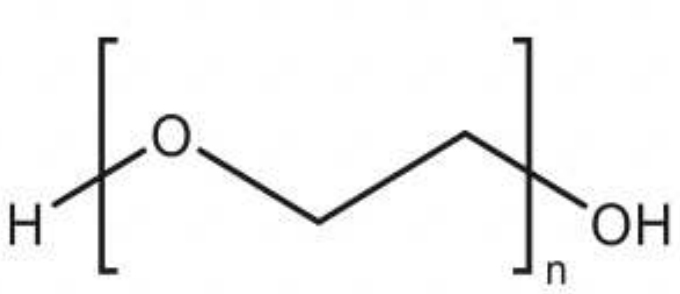

Figure 11 - Structure du polyéthylène glycol selon (116)

Les PEG sont aussi très utilisés comme vecteurs pour la délivrance de substances actives. Ils vont alors être directement conjugués avec des substances actives ou greffés sur des nanoparticules ; ce processus est appelé pégylation. Ce processus va permettre alors d'allonger le temps de présence des SA (augmentation de la demi-vie) tout en réduisant leur métabolisation et leur immunogénicité (117).

Lorsque la pégylation est réalisée à la surface des nanoparticules, les longues chaînes de PEG vont diminuer l'adsorption des opsonines à la surface des nanoparticules et diminuer leur reconnaissance par le système immunitaire par répulsion stérique. La pégylation permet donc une augmentation de la demi-vie des nanoparticules en leur conférant une certaine furtivité. De plus, ce processus permet aussi d'envisager un greffage (sur les chaines de PEG) de différents groupements comme des peptides ou des ligands pour affiner le ciblage des nanoparticules (115,117,118).

Plusieurs formes pégylées de SA ou de nanostructures sont aujourd'hui disponibles sur le marché, témoignant de l'intérêt de ces polymères en thérapeutique.

Le premier médicament pégylé sorti sur le marché est l'Adagen® en 1990, aux États-Unis. Ce médicament est une forme pégylée d'adénosine déaminase bovine pour le traitement des déficits immunitaires combinés sévères (DICS)(119). Il faudra attendre les années 1995 pour voir arriver sur le marché la première formulation de nanoparticules composées de PEG, commercialisée sous le nom Doxil® (120). Il s'agit alors de liposomes pégylés encapsulant de la doxorubicine. Plus récemment, les PEG ont été utilisés dans la réalisation de vaccins contre la COVID-19, les vaccins Moderna et Pfizer/BioNTech élaborés à partir de nanoparticules lipidiques pégylées (114).

Cependant, des études récentes ont mis en évidence un potentiel risque anaphylactique chez certains patients, probablement causé par les PEG (117,121,122). D'autres études sont donc nécessaires pour confirmer le potentiel allergique de ce polymère. Cette donnée est à prendre en compte avec précaution. En

effet, elle a été mise en exergue par des études menées chez l'homme sur les vaccins à ARNm contre la COVID-19. Compte-tenu du nombre d'études réalisées et du nombre de patients ayant été traités par ces vaccins à ARNm, la probabilité de survenue d'évènements indésirables graves est donc fortement augmentée, comparée à l'étude des autres polymères. Il est aussi à noter que le recul d'environ 35 ans sur l'utilisation des PEG en santé est un argument en faveur de sa sécurité.

1.2.7. La Poly-L-lysine (PLL)

Elle est synthétisée par polymérisation de plusieurs résidus de lysine. Il existe deux énantiomères de la lysine, la L-lysine et la D-lysine, donc deux énantiomères de la polylysine : la poly-L-lysine et la poly-D-lysine. La L-lysine est l'énantiomère présent dans l'organisme alors que la D-lysine est synthétisée et utilisée pour sa meilleure résistance à la dégradation enzymatique. Pendant la synthèse, la polylysine peut prendre deux formes différentes en fonction de la position de l'acide aminé pendant la polymérisation. Si la polymérisation des résidus de lysine a lieu en position α, on parlera de α-polylysine alors que si la polymérisation a lieu en position ε, on parlera de ε-polylysine (Figure 12). La position de polymérisation va impacter la structure de ces deux formes de polylysine. L'α-polylysine possède une structure beaucoup plus branchée permettant une meilleure disponibilité des fonctions amines et donc bien plus intéressantes pour l'association avec d'autres molécules pour l'élaboration de nanoparticules. L'ε-polylysine possède une structure très linéaire qui limite la disponibilité des fonctions amines avec d'autres composants ; cependant sa structure permet *in* vivo de réduire les interactions avec les cellules et de réduire sa cyctoxicité

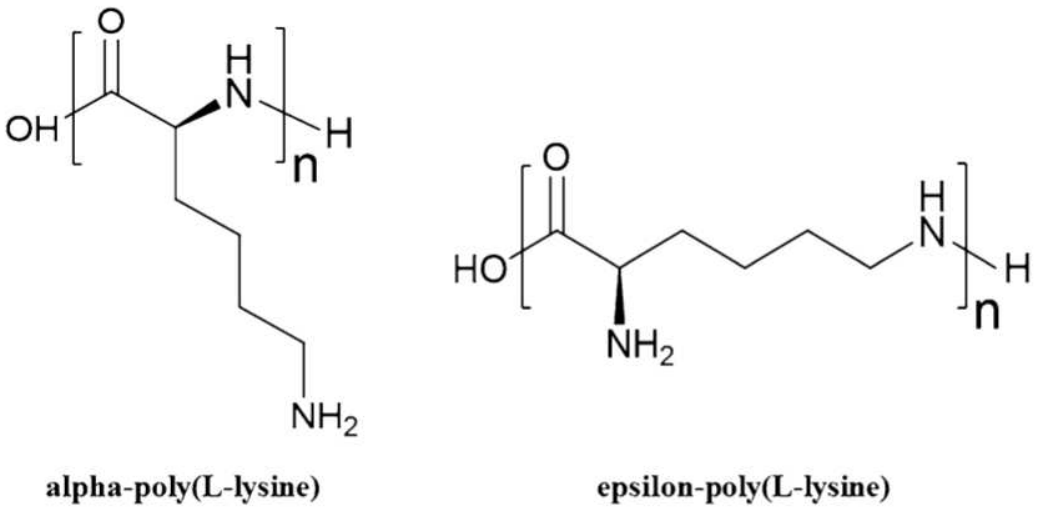

Figure 12 - Structure de l'α-poly(L-lysine) et de l'ε-poly(L-lysine) selon (123)

La polylysine est un polypeptide fortement utilisé pour la vectorisation médicamenteuse et pour l'élaboration de nanoparticules (124). De nombreuses formulations ont été élaborées à l'aide de ce polymère pour de nombreuses applications. La PLL est largement étudiée pour l'élaboration de nanostructures dans le domaine de l'oncologie, ainsi qu'en infectiologie grâce à ses propriétés antimicrobiennes (125–129).
Elle est de plus, un parfait candidat pour la délivrance de vaccins ; une équipe de recherche a démontré la possibilité pour des nanoparticules de PLL et d'alginate de sodium de délivrer un antigène encapsulé, ce qui est extrêmement prometteur pour une utilisation future en infectiologie (130).

Tout ce panel de polymères, permet d'envisager de nombreuses combinaisons. Pour obtenir des nanoparticules, il est alors nécessaire d'utiliser les bons polymères avec les bonnes méthodes d'élaboration et pour la bonne substance active.

2. Méthodes d'élaboration des nanoparticules et amélioration de la stabilité des formulations

Les nanoparticules polymères sont divisées en deux catégories : les nanocapsules et les nanosphères.

Les nanocapsules sont des structures dites « réservoir ». Elles sont composées d'une couronne de polymère solide ou « shell » formant leur enveloppe, renfermant un cœur ou « core » aqueux, liquide ou semi-solide (131). Les nanosphères sont des systèmes dits « matriciels » qui sont constitués de polymères enchevêtrés en réseau (132).

Plusieurs méthodes permettent d'élaborer les nanoparticules. Ces diverses méthodes ont été mises au point pour contrôler la structure ou encore les caractéristiques des nanoparticules à réaliser.
Une fois produite, les nanoparticules peuvent être chargées en substance active soit par encapsulation au sein des nanoparticules, soit par adsorption ou encore par greffage sur un des composants du réseau (133).
Dans la première situation, la substance active sera introduite pendant le processus d'élaboration des nanoparticules alors que pour la seconde, la substance active pourra être incubée après l'élaboration (134). Ces méthodes d'encapsulation sont à adapter à la SA à encapsuler : en effet, si cette dernière est très sensible aux réactions de dégradations enzymatiques ayant lieu dans l'organisme, il sera préférable de la piéger au sein des nanoparticules ; à l'inverse, si la SA risque d'être dégradée par le procédé d'élaboration des nanoparticules, une méthode d'adsorption sera à privilégier (132).

De manière générale, les nanoparticules polymères possèdent de nombreux avantages en santé, notamment une forte capacité de charge en substances actives ou encore leurs propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité (131).

Les nanoparticules polymères sont obtenues majoritairement à partir de polymères préformés. Plusieurs méthodes d'élaboration ont été décrites dans la littérature pour obtenir des nanoparticules : les méthodes en émulsion, la nanoprécipitation et la gelation ionique.

2.1. Méthodes en émulsion

2.1.1. Emulsion-évaporation de solvant

La méthode par émulsion-évaporation est la première qui a été décrite pour l'obtention de nanoparticules à partir de polymères pré-formés (135). Dans cette méthode, une

émulsion sera formée entre une phase organique volatile contenant le polymère et une phase aqueuse contenant un tensio-actif, en veillant à ce que le solvant organique ne soit pas miscible à l'eau. Le solvant organique, ne diffusant pas dans le non-solvant, sera éliminé par évaporation. Le polymère va alors progressivement se désolvater et précipiter à l'interface phase organique/phase aqueuse (136) (Figure 13). Cette méthode est fortement utilisée pour la réalisation de nanoparticules de polymères synthétiques (PLA, PLG ou PLGA) et convient mieux à l'encapsulation de SA hydrophobes non volatiles. En effet les substances actives hydrophiles vont préférentiellement diffuser vers le milieu aqueux, et les matrices hydrophobes auront du mal à les retenir.

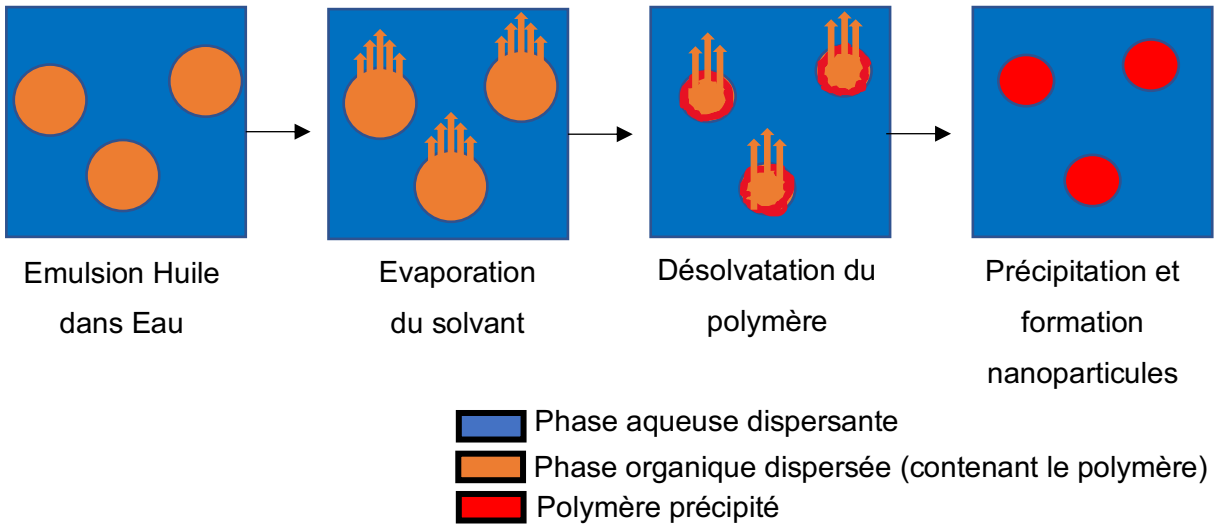

Figure 13 - Principe de préparation de NP par émulsion-évaporation de solvant.

2.1.2. Emulsion-diffusion de solvant

La méthode appelée « émulsion-diffusion », décrite pour la première fois par Quintanar-Guerrero *et al*, permet la formation de nanocapsules à partir de polymère pré-formé par émulsion (137). Elle repose sur la formation d'une émulsion entre une phase organique contenant le polymère (le solvant devra être partiellement miscible à l'eau) avec une phase aqueuse contenant un tensio-actif. L'émulsion huile-dans-eau

obtenue est ensuite diluée par ajout d'eau. L'augmentation du volume de la phase aqueuse entraîne la diffusion du solvant organique (partiellement miscible à l'eau), puis la désolvatation du polymère et enfin sa précipitation pour former des nanoparticules (Figure 14). Cette technique permet de contrôler la taille des nanoparticules obtenues, notamment en utilisant des procédés d'homogénéisation de haute énergie, en augmentant le volume du milieu de dilution ou encore en augmentant la concentration en tensio-actifs (131). Comme pour la technique de nanoprécipitation, cette méthode permet l'encapsulation de substances actives hydrophobes.

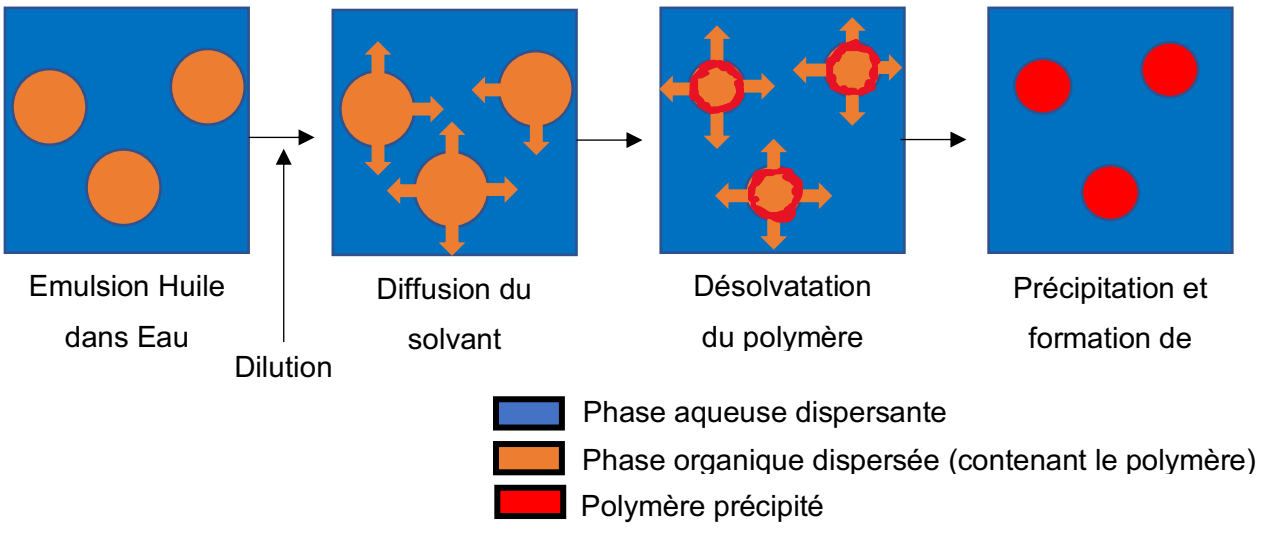

Figure 14 - Principe de préparation de NP par émulsion-diffusion de solvant.

2.1.3. Emulsion-salting out

La méthode de salting-out est une autre technique d'élaboration de nanoparticules en émulsion, très proche de la méthode d'émulsion/diffusion. Elle est parfaitement adaptée pour les formulations de nanoparticules à partir de polymères synthétiques comme le PLA ou le PLGA (138). Concrètement, le polymère utilisé sera dissout dans une phase organique miscible à l'eau (classiquement du tétrahydrofurane ou de l'acétone). Une phase aqueuse sera ensuite constituée de surfactant et d'une solution saturée en électrolytes qui ne devront pas être solubles dans le solvant organique.

Les électrolytes les plus utilisés dans ce procédé sont le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), le chlorure de calcium ($CaCl_2$) ou encore l'acétate de magnésium ($Mg[CH_3COO]_2$) (139). Une émulsion huile dans eau sera ensuite réalisée sous forte agitation magnétique. Contrairement à la méthode d'émulsion/diffusion, bien que le solvant organique soit soluble dans la phase aqueuse, il n'y a pas ici d'étape de diffusion du solvant à cause de la présence de sels. Pour diminuer la force ionique liée à la présence de ces électrolytes, de l'eau distillée sera alors ajoutée à l'émulsion, permettant au solvant organique (miscible à l'eau) de migrer de la phase organique à la phase aqueuse, entraînant pour finir la formation de nanoparticules. Enfin, l'excédent d'électrolytes sera éliminé de l'émulsion par une technique de purification.

2.1.4. Double émulsion

Les différentes méthodes d'obtention de nanoparticules par émulsion simple sont très utilisées, mais ne sont pas optimales pour l'encapsulation de substances actives hydrophiles, qui sont très mal retenues par les matrices hydrophobes formées. Les techniques de double émulsion encore appelées « émulsion d'émulsion » ont donc été mises au point pour permettre l'encapsulation d'agents hydrophiles (140).
Il existe plusieurs types de double émulsion : huile dans eau dans huile (O/W/O) ou encore eau dans huile dans eau (W/O/W) qui sera utilisée pour les substances actives hydrophiles. Dans le cas de cette dernière, une première émulsion eau dans huile (W/O) sera réalisée en ajoutant des gouttelettes de phase aqueuse, contenant la SA hydrophile, dans une phase organique, contenant un tensio-actif lipophile et le polymère, pour stabiliser la première émulsion. Puis une 2ème émulsion (W/O/W) sera

réalisée par ajout d'eau et d'un tensio-actif hydrophile dans la 1ère émulsion. Il en résulte la formation de gouttelettes lipidiques dispersées dans une phase aqueuse, présentant en leur sein des gouttelettes aqueuses dispersées. Pour obtenir des nanoparticules, la désolvatation du polymère pourra se faire par diffusion ou par évaporation de solvant comme décrit dans la figure 15.

Dans le cas d'une diffusion, le solvant organique devra être partiellement miscible dans la phase aqueuse alors que pour une évaporation le solvant organique ne devra pas être miscible à la phase aqueuse.

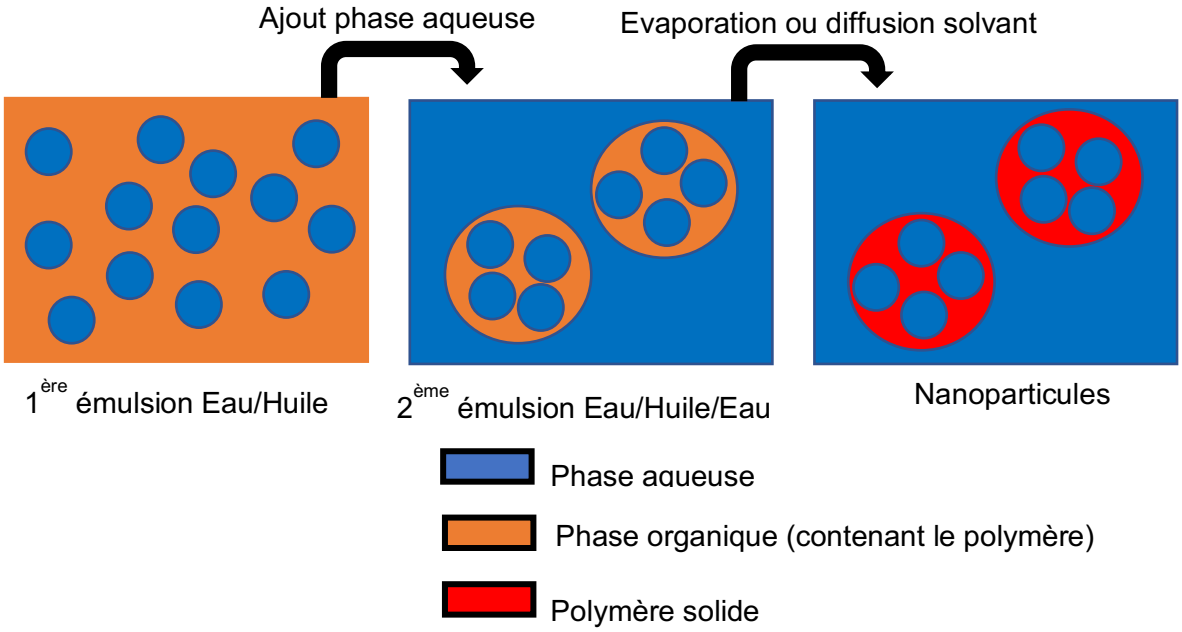

Figure 15 - Principe de préparation de NP par double émulsion.

2.2. Nanoprécipitation

La méthode dite de « nanoprécipitation », développée par Fessi *et al.* (141), est une technique simple, rapide, peu coûteuse et utilisant des polymères préformés (131). Elle nécessite trois composants : le polymère (synthétique, semi-synthétique ou naturel), le solvant dans lequel le polymère est soluble et le non-solvant. Le solvant et le non-solvant doivent être miscibles.

Lors du procédé, des gouttelettes d'une solution de polymère dans le solvant sont ajoutées au non-solvant. Spontanément, il se forme une émulsion entre les deux phases. Le solvant étant miscible au non-solvant, il va diffuser dans le non-solvant et le polymère va donc progressivement se désolvater. En perdant du solvant, il va

précipiter à l'interface entre solvant/non solvant sous forme de nanoparticules (136) (Figure 16).
Dans la majorité des cas, le polymère est solubilisé dans une phase organique, qui sera miscible dans une phase aqueuse, dans laquelle le polymère ne sera pas soluble. On peut citer l'exemple de l'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) qui forme des nanoparticules quand l'acétone, dans laquelle il est solubilisé, est ajoutée progressivement à de l'eau dans laquelle il est insoluble. En contrôlant certains paramètres, comme la taille des gouttes ou encore la vitesse de désolvatation du polymère, il est possible d'obtenir des nanosphères ou des nanocapsules.

Les nanoparticules élaborées par nanoprécipitation permettent souvent une forte encapsulation des SA hydrophobes (142).

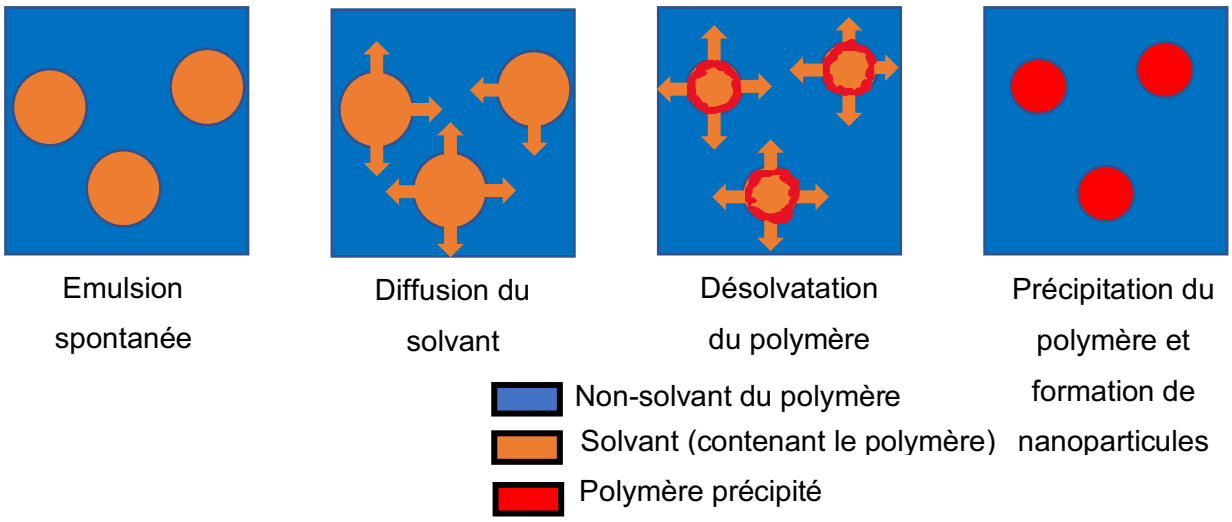

Figure 16 - Principe de préparation de NP par nanoprécipitation

2.3. Gélification ionique

Cette méthode permet l'obtention de nanosphères, appelées dans ce cas nanogels, à partir de polymères pré-formés. Elle consiste en la formation de liaisons ioniques par interactions électrostatiques entre deux polymères possédant des charges opposées en milieu aqueux (Figure 17).
Cette méthode utilise majoritairement des polymères naturels et convient à l'encapsulation de SA hydrophiles. La gélification ionique est une des rares techniques ne faisant pas appel à des solvants organiques ; elle permet l'obtention de particules

biocompatibles et s'inscrit ainsi dans une dynamique de chimie verte. Elle est de plus, rapide à mettre en place et peu coûteuse. Cependant, comparée aux méthodes en émulsion utilisant des polymères synthétiques, il est plus difficile de contrôler la polydispersité et la forme de ces nanosphères à cause de la nature des polymères utilisés (143).

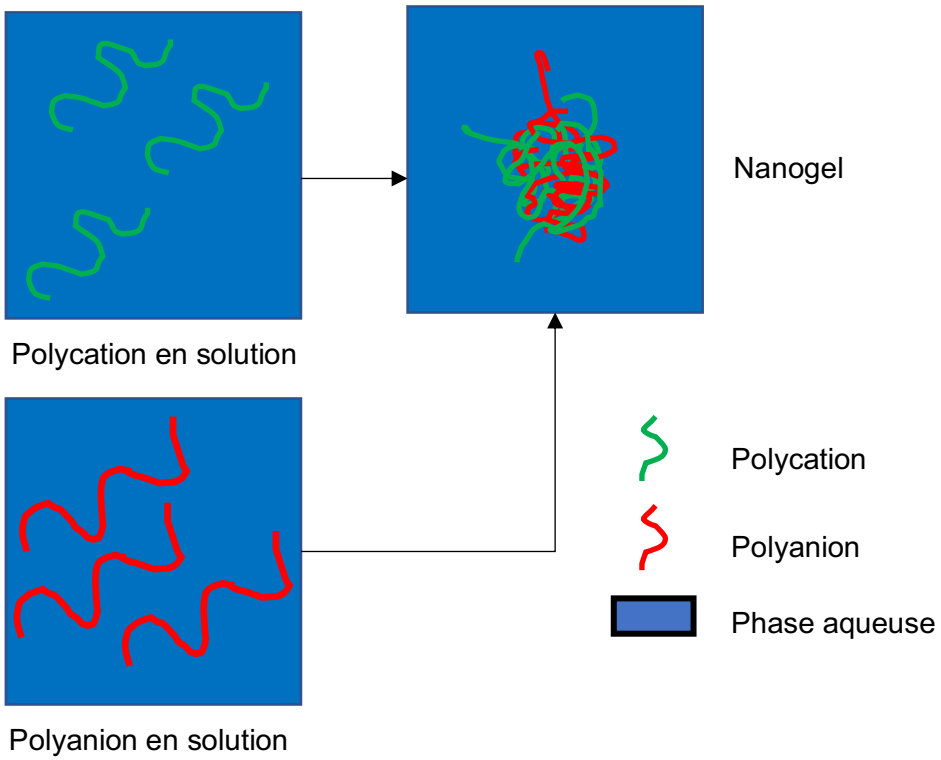

Figure 17 - Principe de préparation de NP par gélification ionique.

2.4. Amélioration de la stabilité des formulations

Après avoir élaboré des formulations de nanoparticules, il est nécessaire de s'enquérir de leur stabilité ainsi que des interactions possibles avec leur milieu environnant. Sachant que les nanoparticules élaborées dans ce travail sont destinées à la voie parentérale, il est alors nécessaire d'obtenir un réseau stable capable de résister et de conserver son intégrité après injection.

Deux techniques ont été étudiées pour améliorer la stabilité des formulations : la réticulation ionique et la réticulation covalente.

2.4.1. Réticulation ionique

Pour stabiliser le réseau des nanoparticules élaborées par gélification ionique, il est possible d'utiliser des agents de réticulation ionique. Ces molécules ont la capacité de s'ioniser en solution, permettant ensuite de faire des pontages intra nanoparticulaires. Les principaux crosslinkers utilisés en formulation sont des agents à base de polyphosphates solubles dans l'eau, comme le tripolyphosphate ou l'acide phytique. Ces molécules ont l'avantage d'être biocompatibles, les groupements polyphosphates seront hydrolysés en phosphates, qui sont présents en grande quantité dans les membranes cellulaires de notre organisme (144,145).
Le TPP ou tripolyphosphate est un penta-anion stabilisé sous forme de sel comme le tripolyphosphate de sodium. Cette molécule est notamment utilisée dans l'agro-alimentaire comme conservateur. Il est aussi employé comme agent de réticulation ionique pour l'élaboration de nanoparticules.

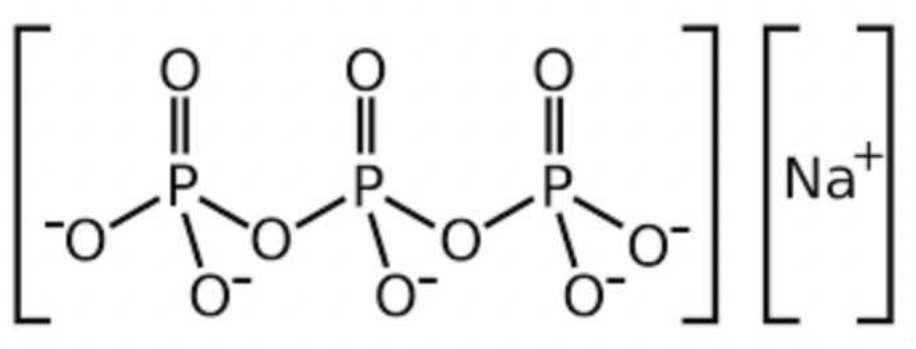

Figure 18 - Structure du tripolyphosphate de sodium

L'acide phytique ou acide myo-inositol hexaphosphorique est une molécule composée d'un cycle central myo-isonitol dont chaque groupement hydroxyle est monophosphorylé. Il est retrouvé dans les végétaux où il se forme durant la maturation des graines. Il est donc fortement consommé en alimentation humaine et présent abondamment dans les céréales, les légumineuses ou encore les graines oléagineuses. Les pKa des fonctions phosphate de l'acide phytique varient de 1,9 à 9,5 (146) ce qui signifie que l'acide phytique est chargé négativement du fait de l'ionisation des phosphates. L'avantage de cette molécule réside dans le nombre de groupements phosphate. En effet l'acide phytique possède plus de groupements phosphate donc un potentiel de réticulation plus important que le TPP. Cependant cet

avantage est aussi un inconvénient, puisque le risque de réticulation entre les nanoparticules augmente proportionnellement au nombre de groupements phosphates.

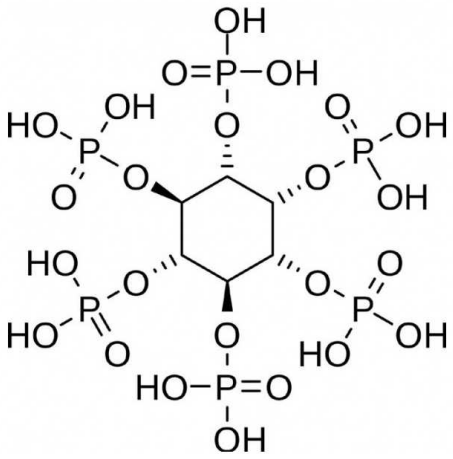

Figure 19 - Structure de l'acide phytique

En solution, les groupements phosphates de ces agents réticulant vont s'ioniser en ions phosphates et exprimer des charges négatives. Elles vont ensuite interagir avec les charges positives du polycation, entrant dans la composition des nanoparticules, et permettre de stabiliser le réseau nanoparticulaire. L'inconvénient de ces agents réticulants, réside dans leur capacité à réaliser des pontages inter nanoparticulaires. Il est donc nécessaire de trouver le juste équilibre avec les constituants des nanoparticules (144).

La réticulation ionique est un bon moyen de stabiliser le réseau, cependant les liaisons ainsi créées ne sont pas toujours suffisantes, pour créer un réseau suffisamment stable pour résister aux conditions imposées par les milieux physiologiques. Il est alors nécessaire d'explorer d'autres modes de réticulation.

2.4.2. Réticulation covalente

La réticulation covalente est un processus dans lequel des liaisons covalentes sont formées entre les chaînes de polymères pour stabiliser le réseau. Ces liaisons sont des liens forts dans lesquels les atomes se partagent des paires d'électrons. Les

liaisons covalentes sont ainsi plus difficiles à briser que les liaisons ioniques et permettent de mieux réticuler le réseau de polymères. La création de liaisons covalentes peut se faire de plusieurs manières, soit par chauffage, soit par rayonnement ou encore par ajout d'agents de réticulation.

Cette dernière méthode est la seule n'utilisant pas de procédés de haute énergie et sera donc privilégiée. Un certain nombre d'agents de réticulation sont alors envisageables pour réticuler un réseau de polymères. Les principaux utilisés sont les dialdéhydes (glutaraldéhyde, formaldéhyde) ou encore l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)) (145,147). Bien que souvent employés, les dialdéhydes sont assez décriés à cause de leur toxicité neurologique et de leur pouvoir mutagène (145). L'EDC étant bien moins toxique, il sera privilégié dans ce travail. Cet agent de réticulation ionique permet, la formation de liaisons amides (RCO-NR) à partir des groupements carboxyles de l'acide hyaluronique et des amines protonées du chitosane.

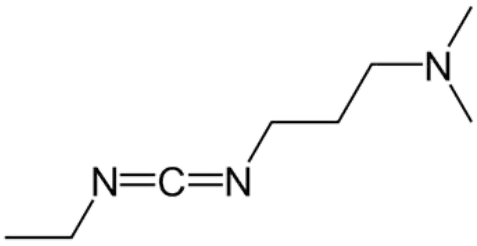

Figure 20 - Structure de l'EDC

3. Caractérisations des nanoparticules

Après avoir choisi les bons polymères ainsi que la ou les bonnes méthodes d'élaboration des nanoparticules, il est nécessaire de contrôler un certain nombre de paramètres pour s'assurer qu'elles soient conformes aux spécifications imposées.

3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de déterminer la taille des nanoparticules (diamètre hydrodynamique et indice de polydispersité).

Cette technique est basée sur le mouvement brownien des nanoparticules et leur capacité à diffuser la lumière. L'intensité de la lumière diffusée est dépendante de la taille et du mouvement des nanoparticules, les petites particules diffusant peu la lumière mais se déplaçant très vite. Le diamètre hydrodynamique D_H, c'est-à-dire le diamètre de la particule en suspension dans un liquide, se réfère à la façon dont elle se déplace dans ce liquide sous l'effet du mouvement brownien. Sa valeur est déduite de l'équation de Stokes-Einstein qui relie le diamètre hydrodynamique au coefficient de diffusion translationnel D_0, lui-même estimé grâce aux fluctuations de la lumière diffusée.

$$D_0 = \frac{\kappa_B T}{3\pi\eta d_h}$$

D_0 : Coefficient de diffusion ($cm^2.s^{-1}$)
κ_B : Constante de Boltzman (1,3805 x 10^{-23} $J.K^{-1}$)
T : Température (K)
d_h : Diamètre hydrodynamique (cm)
η : Viscosité de la phase de diffusion (cP)

La DLS permet aussi d'apprécier la stabilité de la nanosuspension, notamment par la détection des phénomènes d'agrégation ne pouvant pas être observés à l'œil nu. L'Indice de Polydispersité (PdI) permet quant à lui d'apprécier l'homogénéité des populations de nanoparticules : un PdI proche de 0 signifie que les nanoparticules sont homogènes en taille alors qu'un PdI se rapprochant de 1 signifie qu'il existe plusieurs populations de tailles différentes dans l'échantillon.
Cependant, la DLS ne permet d'obtenir qu'une distribution moyenne de taille (encore appelé z-average) et non la taille exacte de chaque nanoparticule dans l'échantillon.
Il est possible d'apprécier le diamètre moyen des nanoparticules par des techniques de microscopie, comme la microscopie électronique à transmission (TEM), la microscopie électronique à balayage (SEM) ou encore la microscopie à force atomique (AFM). Cependant ces méthodes obligent à préparer les échantillons sous forme solide. Le diamètre moyen ainsi obtenu ne prend donc pas en compte la couche d'hydratation des nanoparticules présentes en solution, entraînant alors une différence non négligeable entre les tailles observées par DLS (148).

3.2. Diffusion électrophorétique de la lumière (ELS)

Les nanoparticules possèdent une charge de surface (ou potentiel zêta) qui peut être déterminée par Diffusion Electrophorétique de la Lumière (ELS). Un champ électrique appliqué à la nanosuspension induit un déplacement des nanoparticules vers l'électrode du signe opposé à leur charge, à une certaine vitesse, qui déterminera ensuite la valeur du potentiel zêta. Sa valeur est alors obtenue grâce à l'équation de Smoluchowski.

$$\xi = \frac{113\eta}{D_0} \times \mu_e$$

ξ : Potentiel zêta (mV)

μ_e : Mobilité électrophorétique en $cm^2.s^{-1}.V^{-1}$

η : Viscocité du milieu (P)

La valeur du ZP permet de prédire la stabilité de la nanosupension : plus le potentiel zêta est élevé (en valeur absolue) plus les forces de répulsion entre les nanoparticules seront fortes et donc plus la nanosuspension sera stable.
Bien que les informations obtenues par DLS/ELS soient très intéressantes et donnent un certain nombre d'informations sur les paramètres de structure des nanoparticules, il peut être nécessaire de confirmer ces résultats par d'autre techniques de caractérisations ou d'obtenir d'autres informations concernant la forme des nanoparticules.

3.3. Microscopie de force atomique (AFM)

La microscopie de force atomique est une technique de microscopie à haute résolution utilisée pour imager les surfaces à l'échelle nanométrique.

Pour les nanoparticules, il est alors possible d'apprécier leur morphologie, leur aspect de surface ou encore l'élasticité de leur structure sous l'effet de contraintes mécaniques (Figure 18).

L'AFM est composé d'un levier flexible comportant une pointe très fine à son extrémité mesurant quelques nanomètres.

La pointe sera ensuite amenée à proximité de l'échantillon à analyser. Les forces entre la pointe et la surface de l'échantillon provoqueront une déflexion de la pointe. Concrètement, la pointe va parcourir la surface de l'échantillon à analyser, chaque déflexion de la pointe sera détectée par un système optique et sera traduite en image en trois dimensions. Il est aussi possible de déterminer les propriétés mécaniques d'échantillons comme la dureté ou l'élasticité en mesurant la déflexion du levier après application de différentes contraintes (148–150).

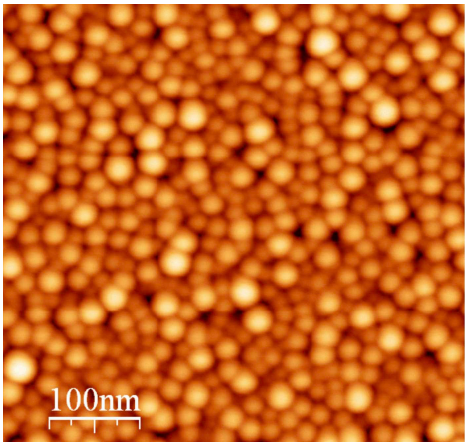

Figure 21 - Nanoparticules observées par AFM selon (151)

Cette technique permet littéralement de voir les nanoparticules et notamment d'apprécier leur aspect de surface.

Cependant pour réellement comprendre et prédire les interactions des nanoparticules entre elles ou au contact de milieux physiologiques, il est nécessaire d'aller encore plus loin et de connaître leur composition de surface.

3.4. Spectroscopie de photoélectrons à rayon X (XPS)

La spectroscopie de photoélectons à rayon X est une technique analytique utilisée pour étudier la composition chimique et l'état électronique de matériaux.
Concrètement, l'échantillon à analyser est bombardé par des rayons X. Les photons émis par les rayons X excitent les électrons de cœur (électrons de la couche interne) des atomes de l'échantillon et leur transmettre leur énergie. Si l'énergie du photon X est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron qu'il a bombardé, cet électron est arraché de l'atome et est nommé électron photoélectrique. Tous ces électrons arrachés sont analysés et leur énergie cinétique est mesurée grâce à un analyseur d'électrons. L'énergie de liaison (E_B) des électrons des atomes est déterminée par la différence entre l'énergie du photon X incident (hv) et l'énergie cinétique des électrons arrachés (E_K)

$$E_B = hv - E_K$$

Les résultats sont ensuite rendus sous forme de pics. Chaque pic correspond aux différentes énergies de liaisons des différents éléments constituant l'échantillon. Chaque élément chimique a un ensemble unique d'énergies de liaison pour ses électrons de cœur, ce qui permet ainsi d'identifier avec certitude les éléments constitutifs de l'échantillon. Cependant, les énergies de liaison des électrons peuvent être légèrement modifiées par l'environnement chimique de l'atome, ce qui permet de déterminer le cas échéant, des états d'oxydation et des liaisons chimiques des éléments. Bien que l'XPS soit une très bonne technique pour étudier la composition chimique d'un échantillon elle possède un inconvénient, notamment en ce qui concerne la caractérisation des nanoparticules. Elle n'est capable de donner la composition chimique que de la surface des nanoparticules avec une profondeur de seulement quelques nanomètres. En effet, les électrons éjectés des couches profondes de l'échantillon vont perdre de l'énergie en traversant l'échantillon avant d'atteindre la chambre d'analyse, réduisant la contribution au signal.

L'XPS est donc une technique de choix à la fois, pour identifier les éléments présents à la surface d'un échantillon, pour déterminer les états d'oxydation des éléments d'un

échantillon ou encore pour contrôler la qualité d'un échantillon en vérifiant sa composition de surface.

Bien que l'état de l'art nous ait permis de répondre à certaines questions ou d'entrevoir certaines possibilités, notamment en ce qui concerne l'élaboration et la stabilité des nanoparticules, il est maintenant nécessaire de se concentrer sur les substances actives et les agents de contrastes à encapsuler.

4. IRM et améliorations des agents de contraste

L'histoire de l'imagerie par résonance magnétique commence en 1946, grâce à deux physiciens, Edward Purcell et Felix Bloch, qui ont posé les bases du phénomène de résonance magnétique nucléaire (152,153). C'est à partir de la découverte de ce phénomène, que l'IRM a pu voir le jour grâce aux travaux du Docteur Raymond Damadian. Il a été le premier à décrire l'utilisation de la résonance magnétique pour différencier les tissus sains des lésions cancéreuses (154). Deux ans plus tard, en 1973, le chimiste Paul Lauterbur, a établi qu'il était possible d'utiliser la résonance magnétique nucléaire pour créer une image (155). Il a d'ailleurs obtenu pour ses travaux, menés conjointement avec le physicien Peter Mansfield, le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2003. Riches de ces avancées, il a fallu attendre 1977 pour que les premières images par résonance magnétique d'un être humain soient acquises. Bien que révolutionnaire, cette technique n'en était qu'à ses débuts, et de nombreuses améliorations ont été apportées au cours du temps pour faire de l'IRM, la technique d'imagerie médicale la plus largement utilisée en pratique courante grâce à sa très bonne résolution spatiale et à son caractère non invasif (156).

4.1. Principe de l'IRM

Les noyaux de certains atomes possèdent un spin non-nul, qui est une grandeur vectorielle associée à la rotation des noyaux sur eux-mêmes. La valeur de spin (*I*) est dépendante du numéro atomique (Z) et du nombre de masse de l'atome (N). Si l'atome possède un nombre de masse (N) impair, alors le nombre de spin sera un demi entier (1/2, 3/2 …), si le nombre de masse est pair et le numéro atomique impair, le nombre

de spin sera entier (1, 2, 3 …) et enfin si le nombre de masse et le numéro atomique sont pairs, alors le nombre de spin sera nul. Ce nombre de spin, uniquement s'il est non nul, va alors conférer aux noyaux de ces atomes un moment magnétique μ. Ce moment magnétique sera alors directement proportionnel à la valeur de spin (I) et à une constante spécifique du noyau, le rapport gyromagnétique (γ).

$$\mu = \gamma . I$$

μ : Moment magnétique
γ : Rapport gyromagnétique du noyau
I : Spin du noyau

En IRM, l'atome étudié sera l'hydrogène ^{1}H, puisque c'est l'atome le plus abondant dans l'organisme. Il sera donc pris comme exemple par la suite. Cet atome possède un spin de ½ et le moment magnétique le plus important de tous les atomes stables. Ces propriétés conduisent les noyaux d'hydrogène à se comporter comme de petits aimants pouvant être affectés par des phénomènes extérieurs comme un champ magnétique. L'interaction du moment magnétique des noyaux d'hydrogène avec champ magnétique externe (B_0) provoque l'alignement des spins dans la direction imposée par ce champ magnétique. Cependant les spins ne s'alignent pas uniquement en direction du champ magnétique, ils subissent aussi un effet d'oscillation dans la direction imposée par ce champ. Ce mouvement appelé précession, comparable au mouvement d'une toupie sur un axe, est proportionnelle au champ magnétique imposé. La fréquence de ce mouvement est aussi appelée fréquence de Larmor (ω)

$$\omega = \gamma . B_0$$

ω : Fréquence de Larmor
γ : Rapport gyromagnétique du noyau
B_0 : Force champ magnétique

Lors de l'application d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques des protons tendent à s'aligner soit parallèlement (spin-up), soit antiparallèlement (spin-down) à ce champ. Cette séparation de direction des atomes, appelée effet Zeeman

correspond à deux états d'énergie différents. La distribution de ces états d'énergie, normalement en faveur de l'alignement parallèle car considéré plus stable, suit une distribution de Boltzmann.

Pour un échantillon macroscopique, comme l'acquisition d'une image IRM sur un patient par exemple, il existe une aimantation macroscopique *M*, correspondant à la somme de tous les moments magnétiques de chaque atome. En absence d'application de champ magnétique, l'aimantation *M* est très proche de zéro car les moments magnétiques sont dirigés de façon totalement aléatoire. Cependant, lors de l'application d'un champ magnétique, les moments magnétiques tendent à s'aligner, de façon plus importante parallèlement à ce champ, créant ainsi une aimantation macroscopique de même direction.

Dans un espace en trois dimensions, les moments magnétiques sous l'influence d'un champ magnétique, vont s'orienter sur un axe-z, possédant alors une aimantation dite longitudinale, M_z. Logiquement, dans ce même cas, l'aimantation transversale, M_{xy} (aimantation dans le plan xy) est nulle. Il est alors possible de manipuler ces vecteurs d'aimantation par l'application d'impulsion de radiofréquence (B_1). Ces impulsions vont alors faire basculer l'aimantation dans le plan xy. L'aimantation longitudinale M_z va donc devenir nulle au profit de l'aimantation transversale M_{xy} (Figure 22). A la fin des impulsions, l'aimantation tend à retrouver son état initial, selon l'axe z, appelé aussi phénomène de relaxation.

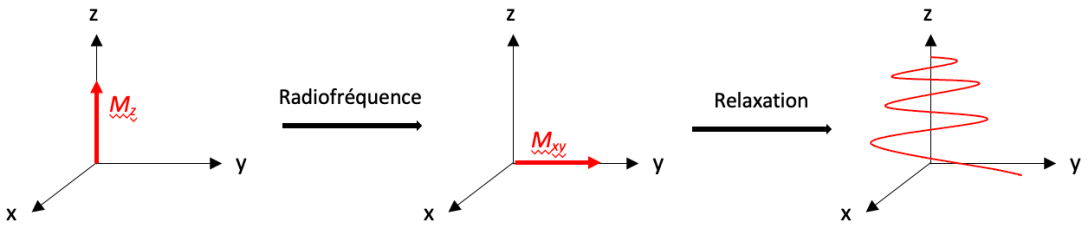

Figure 22 - Représentation schématique de l'influence d'impulsion de radiofréquence sur l'aimantation macroscopique

Ce phénomène de retour à l'équilibre peut être décrit à l'aide de temps de relaxation. Tout d'abord le temps de relaxation T_1, ou temps de relaxation longitudinale, correspond au temps requis pour que l'aimantation longitudinale retrouve 63% de sa valeur d'origine. Ce temps est aussi appelé temps de relaxation spin-réseau.

Puis le temps de relaxation T_2, ou temps de relaxation transversale, qui décrit la décroissance de l'aimantation transversale au cours du temps et plus précisément au temps nécessaire pour que l'aimantation transversale tombe à 37% de sa valeur d'origine. Ce temps est aussi appelé temps de relaxation spin-spin.

Il est alors possible d'obtenir des images IRM de l'organisme, en exploitant les différents temps de relaxation inhérents aux structures biologiques du corps humain. Le retour à l'état d'équilibre des protons s'accompagne d'une libération d'énergie qui est à la base de l'acquisition d'image en IRM.
Notre organisme est composé en majorité d'eau (donc de protons), les divers organes et tissus sains de l'organisme possèdent des teneurs en eau variées et donc une densité de protons différente. Un contraste sur les images sera alors observé en fonction du temps de relaxation de ces structures. Les lésions des tissus de l'organisme entraînent dans de nombreux cas une modification hydrique de ces tissus (et donc en protons). Il est alors possible de repérer sur ces images une différence de contraste entre tissus sains et tissus lésés.
Cependant dans de nombreux cas, cette modification de contraste n'est pas suffisante pour être visible, ou alors est visible à un stade trop avancé d'une maladie. Pour pallier ce problème, il est possible d'utiliser des agents de contraste.

4.2. Agents de contraste utilisés en IRM

L'utilisation des agents de contraste permet d'augmenter le contraste sur les images acquises en IRM, améliorant ainsi la détection des tissus lésés. Il existe aujourd'hui deux grandes familles d'agents de contraste : les agents paramagnétiques et les agents superparamagnétiques. Ils agissent alors comme des potentialisateurs de l'effet de relaxation des protons des molécules à leur voisinage. Les temps de relaxation T_1 (relaxation longitudinale) et T_2 (relaxation transversale) vont alors être réduits, alors que les vitesses de relaxation correspondantes ($1/T_1$ et $1/T2$) vont être augmentées. Cette augmentation de vitesse se traduit alors par une augmentation de l'intensité des signaux des images pondérés en T_1 ou en T_2.
La capacité d'un agent de contraste à augmenter l'intensité du signal en IRM est exprimée par sa relaxivité r_1 ou r_2. Cette relaxivité est alors représentée par la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau en fonction de la concentration en agent

de contraste. Pour savoir si un agent de contraste est à utiliser pour des images en IRM pondérés en T_1 ou en T_2, son rapport r_2 / r_1 peut être déterminé. Ceux possédant un rapport r_2 / r_1 faible vont générer une augmentation du contraste sur les images pondérées en T_1, alors que ceux possédant un rapport r_2 / r_1 élevé vont entraîner une diminution de l'intensité du signal sur les images pondérées en T_2.

4.2.1. Les agents paramagnétiques

Ces agents de contraste sont majoritairement composés d'ions métalliques tels que le manganèse (Mn^{2+}) ou le gadolinium (Gd^{3+}). Ces ions possèdent des électrons célibataires leur conférant des propriétés paramagnétiques et donc un fort moment magnétique. A cause des interactions entre les moments magnétiques des protons des molécules d'eau et les agents paramagnétiques, les temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2) sont diminués, ce qui a pour effet d'augmenter l'intensité du signal des images acquises en T_1 et de diminuer l'intensité des images acquises en T_2. Cependant, les ions métalliques sont toxiques pour l'organisme car ils peuvent se fixer aux protéines plasmatiques et s'accumuler dans le foie, la rate, les os ou encore le cerveau. Il est donc nécessaire de chélater ces ions grâce à un ligand pour pouvoir les utiliser chez l'homme. Pour les complexes de manganèse, il n'existe à ce jour qu'un seul chélate commercialisé et autorisé par l'EMA et la FDA, le Teslascan® (Mangafodipir) (157). Ce médicament est un chélate de Mn-DPDP, utilisé pour la détection des lésions hépatiques. Il empêche la libération prématurée du manganèse, améliore l'intensité du signal en T_1, tout en diminuant les effets indésirables du cation métallique. L'élimination du chélate se fera en deux temps, tout d'abord une phase de dissociation du DPDP et du manganèse, puis une phase d'excrétion, biliaire pour le manganèse et rénale pour le DPDP (157).
Du fait de son fort moment magnétique, le gadolinium est l'agent de contraste paramagnétique le plus utilisé aujourd'hui. La classification des complexes de gadolinium sera abordée plus en détail par la suite.

4.2.2. Les agents superparamagnétiques

Les agents superparamagnétiques sont des particules d'oxyde de métal de taille nanométrique, le plus souvent à base de fer. Ces particules sont classées en deux

catégories en fonction de leur taille, d'un côté les SPIO ou « Super Paramagnetic Iron Oxyde » pour les particules supérieures à 50 nm et de l'autre les USPIO ou « Ultra Small Super Paramagnetic Iron Oxyde » pour les particules inférieures à 50 nm. Ces agents possèdent un fort moment magnétique lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique. Dans ce cas, ils agissent en diminuant le temps de relaxation longitudinale (T_2), générant des images plus sombres en IRM (158). Ces agents de contraste sont considérés plus biocompatibles que les agents paramagnétiques, car ils sont à base de fer, un métal nécessaire à certains processus métaboliques de l'organisme (159).

Les SPIO sont des agents de contraste parfaits pour un ciblage hépatique. En effet, leur accumulation passive au niveau du foie, permet aux particules de fer de se concentrer dans cet organe. Cependant, le signal T_2 peut être perturbé par certains bruits de fond comme des saignements ou encore des calcifications, induisant une confusion dans le diagnostic (160).

Les USPIO, quant à eux, possèdent de nombreux avantages : leur petite taille leur permet d'agir à la fois sur le T_1 et le T_2, d'améliorer leur biocompatibilité et enfin de réduire leur captation macrophagique (160).

4.2.3. Agents de contraste à base de gadolinium commercialisés

Comme vu précédemment, les agents de contraste à base de gadolinium sont très plébiscités pour leur fort moment magnétique et donc leur forte capacité à réduire le T_1. Cependant le gadolinium ne peut être utilisé sous sa forme ionique libre (Gd^{3+}) à cause de sa forte toxicité. Ces ions vont rentrer en compétition avec les ions Ca^{2+}, bloquant ainsi les canaux calciques voltages dépendant, inhibant par la même occasion de nombreux processus physiologiques calcium dépendants. Les ions gadolinium, vont aussi s'accumuler dans le foie, la moelle osseuse et le cerveau, entraînant des dommages organiques (161,162). Cependant, la toxicité de ces ions peut être minimisée en les chélatant à l'aide de ligands spécifiques : les polycarboxylates linéaires ou macrocycliques. La chélation va piéger l'ion métallique, l'empêchant de s'accumuler sous forme libre dans l'organisme et limitant par la même occasion leur toxicité. Il est important que ces ligands chélateurs soient spécifiques des ions gadolinium, pour éviter l'échange avec d'autres cations métalliques présents

dans l'organisme comme le Zinc ou le Cuivre. Ce phénomène aussi appelé transmétallation est plus présent pour les chélates linéaires (163). Les agents de contraste à base de gadolinium dominent le marché, ce qui explique qu'il existe dix chélates commercialisés à ce jour, présentant chacun des spécificités (162). Leur structure et propriétés sont données dans la figure 23 et le tableau 1. Ces complexes peuvent être classés selon leur application : les agents de contraste extra-cellulaires, les agents de contraste vasculaires et les agents de contraste spécifiques d'organes.

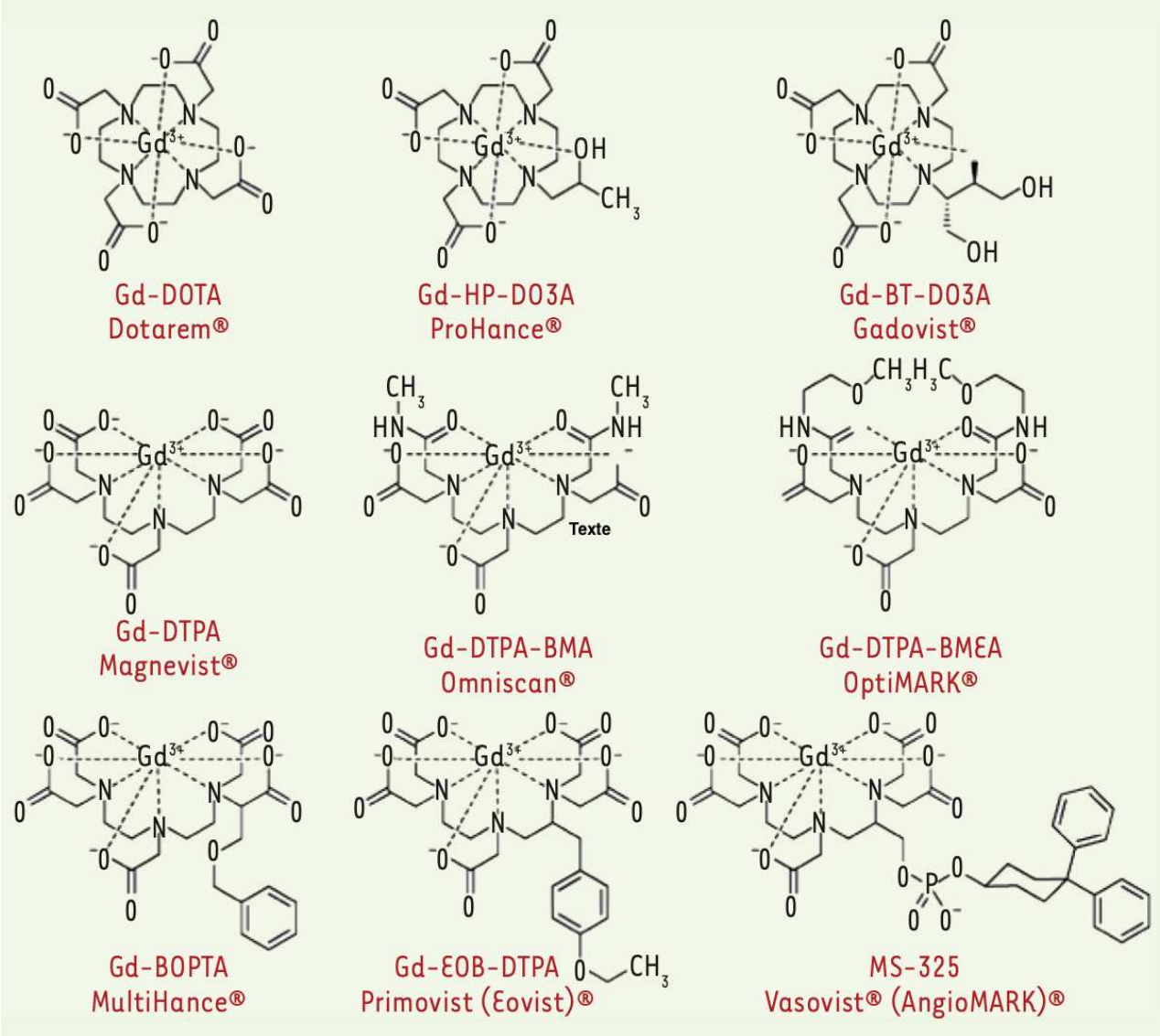

Figure 23 – Structure des chélates de gadolinium commercialisé selon (162)

Tableau 1 - Propriétés des chélates de gadolinium commercialisés selon (162)

Nom	Nom commercial	Fabricant	Relaxivité[1]	Excrétion	Risque FNS[2]
Gadodiamide	Omniscan®	GE	4	Rénale	Important
Gadoversetamide	Optimark®	Mallinckodt	4,5	Rénale	Important
Godepentetate dimeglumine	Magnevist®	Bayer	3,7	Rénale	Important
Gadobenate dimeglumine	Multihance®	Bracco	5,5	Rénale Hépato-biliaire 4-5%	Moyen
Gadoxetate disodium	Primovist®	Bayer	6,2	Rénale 50% Hépato-biliaire 50%	Moyen
Gadofosveset trisodium	Vasovist®	Lantheus Medical Imaging	9,9	Rénale Hépato-biliaire 4-5%	Moyen
Gadobutrol	Gadovist®	Bayer	5	Rénale	Faible
Gadoteridol	Prohance®	Braco	3,7	Rénale	Faible
Gadoterate meglumine	Dotarem®	Guerbet	3,5	Rénale	Faible

[1] : 3T, plasma en L/mmol.s^{-1}

[2] : Fibrose néphrogénique systémique

4.2.3.1 Agents de contraste extra-cellulaires

Les agents de contraste extra-cellulaires (ACE), sont non spécifiques d'organes. Après une injection intraveineuse, ils vont rapidement quitter la circulation systémique pour atteindre le compartiment interstitiel de l'organisme. Leur demi-vie de distribution est relativement courte, de l'ordre de 5 minutes, ce qui implique que l'acquisition d'images en IRM doit se faire rapidement après l'injection. Chez les patients sains, ces chélates sont éliminés majoritairement par filtration glomérulaire, avec une demi-vie d'élimination d'environ 1,5 heure, ce qui signifie qu'il faudra atteindre 7,5 heures pour leur complète excrétion de l'organisme (164).

Les ACE, bien que ne pénétrant normalement pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) peuvent être utilisés pour de l'imagerie cérébrale. En effet, à cause de leur forte hydrophilie, les ACE ne peuvent pas passer à travers la BHE, cependant certaines pathologies cérébrales vont altérer la perméabilité capillaire et permettre aux ACE de se concentrer dans les tissus cérébraux (165). Les ACE comptent de nombreux chélates de Gd, aussi bien linéaires que macrocycliques.
Le premier d'entre eux est le Magnévist® (Gadopentetate dimeglumine), commercialisé en 1988. Ce complexe est un chélate de Gd linéaire ionique, chargé deux fois négativement. Du fait de sa charge négative, de la méglumine est utilisée pour former un sel de diméglumine neutre, pouvant alors être injecté au patient. La méglumine est utilisée dans de nombreuses formulations de complexe de gadolinium chargées négativement. Ces propriétés de chélation permettent d'améliorer la stabilité du complexe pour éviter la fuite du Gd, tout en étant bien tolérée par l'organisme. Cependant, les sels de méglumine, une fois injectés, sont hyperosmolaires au plasma, pouvant entraîner des dommages cellulaires. Pour contrer ce problème, des ACE neutres ont été élaborés.

Le deuxième ACE commercialisé est le Prohance® (Gadoteridol), en 1992. Ce complexe est le premier chélate macrocyclique neutre mis sur le marché. Le Prohance® a été élaboré à partir du ligand DO3A, premier ligand pour l'élaboration de chélate macrocyclique neutre, qui en l'état n'a pas reçu d'approbation pour des évaluations cliniques. Ce complexe a été élaboré pour répondre au problème de tolérance du Magnévist®. Grâce à sa neutralité, l'injection intraveineuse de ce complexe perturbe moins l'osmolalité plasmatique, de plus son ligand macrocyclique réduit, quant à lui, le risque de toxicité lié à la fuite des ions Gd^{3+}. En termes d'efficacité le Prohance® est équivalent au Magnévist® puisqu'il possède une relaxivité identique d'environ 4 $L/mmol.s^{-1}$ (Tableau 1).

Le troisième ACE commercialisé est l'Omniscan® (Gadodiamide), en 1993. Il s'agit d'un produit de contraste de 2ème génération linéaire et neutre, qui a été élaboré sur la base du Magnévist®, dans le but d'améliorer son comportement *in vivo*.
En modifiant deux fonctions carboxylate en fonction méthyl-amide, la charge du complexe devient nulle. L'osmolalité est alors fortement diminuée, permettant à Omniscan® d'être mieux toléré, en réduisant le risque de complications physiologiques

(166). Cependant en termes d'efficacité, Omniscan semble égal à Magnévist en comparant leur relaxivité (Tableau 1).

Un autre ACE a été élaboré sur la base du Magnévist®, il s'agit de l'OptiMARK™. Ce chélate est un produit de contraste de 2ème génération neutre et linéaire commercialise en 1999. Sa structure très proche de l'Omniscan®, lui confère les mêmes propriétés de tolérance, cependant il se révèle être un peu plus efficace pour intensifier le signal en IRM, puisque sa relaxivité est supérieure à celle du Magnévist® et de l'Omniscan® (Tableau 1).

Il a ensuite fallu quelques années pour voir apparaître sur le marché les ACE suivants. Le Gadovist® (Gadobutrol), est un chélate de gadolinium macrocyclique neutre, commercialisé en 2011. Il dérive du ligand DO3A et il donc est un analogue du Prohance®. Bien qu'ils soient analogues, la stabilité du Gadovist® semble légèrement inférieure à celle du Prohance (167). La comparaison des relaxivités de ces deux dérivés du DO3A, prédit une meilleure efficacité du Gadovist® (Tableau 1). Cependant des études cliniques sur l'imagerie de tumeur cérébrale, semblent montrer que les deux chélates sont identiques en terme d'efficacité (168,169).

Le Dotarem® (Gadoterate de méglumine), est un chélate de gadolinium macrocyclique, portant une charge négative (DOTA), obligeant son association avec de la méglumine pour former un sel. Bien que ressemblant au Magnévist®, la structure macrocyclique du Dotarem® lui confère une bien meilleure stabilité et une meilleure tolérance (166). Même si le Dotarem® est un des derniers ACE commercialisés (2013), il est le premier chélate macrocyclique à avoir été étudié pour des applications en IRM dès 1986 (166). Son efficacité en termes de relaxivité est comparable à celle du Prohance®. Le Dotarem® est aujourd'hui l'agent de contraste à base de gadolinium le plus stable et le moins toxique, ce qui explique qu'il soit le plus utilisé en pratique courante (170)

Enfin, l'Usirem® (Gadopiclénol) est un tout nouvel ACE, commercialisé en 2022. Ce nouvel agent de contraste est un chélate de gadolinium macrocyclique neutre élaboré à partir d'un cycle pyclen (Figure 24). Il s'avère être bien plus efficace que tous les autres ACE macrocycliques puisqu'il a été prouvé qu'une injection de concentration deux fois plus faible d'Usirem® (0,05 mmol/kg) comparé au Gadovist® (0,1 mmol/kg)

montre des résultats d'efficacité identique (171). Bien qu'aucune étude croisée de tolérance de l'Usirem® n'ait encore été réalisée, comparé à tous les autres ACE macrocycliques, ce chélate montre une bonne tolérance (172,173). Au vu de ces propriétés il est possible que l'Usirem® devienne dans les prochaines années, le nouveau Gold standard des ACE et supplante le Dotarem®.

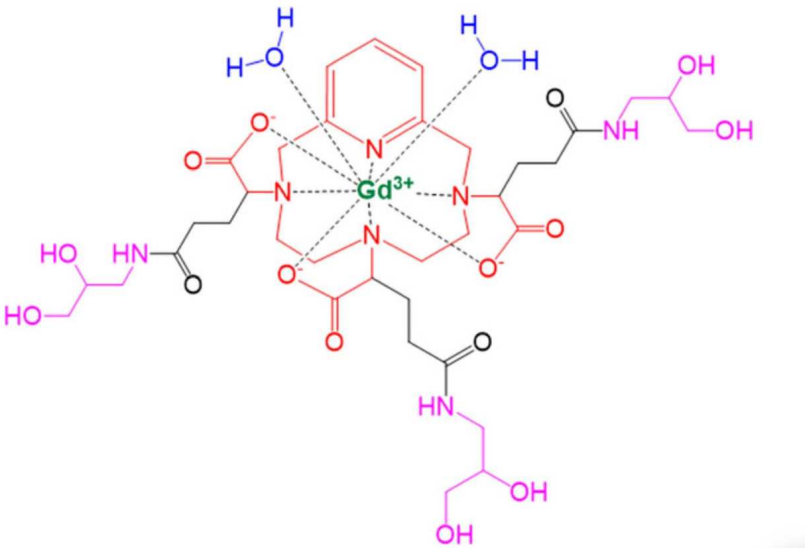

Figure 24 - Structure de l'Usirem® selon (174)

4.2.3.2 Agents de contraste vasculaires

Les agents de contraste vasculaires (ACV), comme leur nom l'indique sont élaborés pour rester le plus longtemps possible dans la circulation systémique. Leur taille, beaucoup plus imposante que les ACE, leur permet, de retarder le plus possible leur passage dans le compartiment interstitiel et d'augmenter leur relaxivité. Les ACV peuvent rester dans le plasma beaucoup plus longtemps que les ACE (environ 1h). Cet allongement du temps de présence plasmatique, permet d'élargir la fenêtre d'acquisition des images d'une minute à une heure, permettant de réitérer les prises de clichés et donc d'obtenir des résultats plus précis (165).

Dans l'union européenne, seul un ACV possède l'AMM pour l'angiographie, il s'agit du Vasovist® (Gadofosveset) ou MS-325, commercialisé en 2008. C'est un chélate de gadolinium linéaire ionique dérivé du DTPA, stabilisé par du fosveset et substitué par un groupement diphénylcyclohéxyl. Bien qu'étant un chélate de gadolinium ionique, il possède une osmolalité comparable au chélate de gadolinium neutre. Comme attendu,

à cause de sa taille, le Vasovist® montre une relaxivité plus élevée que les ACE (Tableau 1). Il montre aussi un bon profil de tolérance, puisqu'il semble être aussi bien supporté par les patients que les autres chélates de gadolinium (175). Son indication est plutôt limitée à l'angiographie par IRM, ou pour le diagnostic des anomalies cardiovasculaires.

4.2.3.3 Agents de contraste spécifiques d'organes

Les agents de contraste spécifiques d'organes (ACSO), comme leur nom l'indique ont été élaborés pour cibler des organes spécifiques. En effet les ACE, à cause de leur distribution trop rapide dans l'organisme ne permette pas d'avoir des images précises d'un organe en particulier. De même que pour les ACV, leur persistance trop longue dans la circulation générale ne leur permet pas de se concentrer de façon suffisante dans certains organes spécifiques. Des chélates de gadolinium ont donc été mis au point en ce sens.

Les seuls ACSO commercialisés aujourd'hui ont été élaborés pour un ciblage préférentiellement hépatique. Leur structure dérive du DTPA avec l'ajout d'un cycle aromatique permettant un ciblage des hépatocytes. L'ajout de ce cycle permet d'augmenter leur lipophilie et donc la possibilité d'être excrétés par voie biliaire. L'accumulation dans l'arbre hépato-biliaire permet d'améliorer le contraste des images obtenues par IRM. Deux chélates de gadolinium ont obtenu une autorisation de mise sur le marché à la fois en Europe et aux États-Unis : le Multihance® (Gadobenate de dimeglumine) et le Primovist® (Acide gadoxetique).

Le Multihance® est un chélate de gadolinium linéaire ionique. Bien que ciblant l'arbre hépato-biliaire, il est aussi indiqué pour l'imagerie du système nerveux central (SNC)(164). De plus, il possède une capacité, certes faible et transitoire, de fixation aux protéines plasmatiques, permettant d'envisager un intérêt en angiographie.
Après injection, il se comporte comme les ACE pendant quelques minutes, puis il se comporte comme un agent spécifique du foie pendant une plus longue période (40 à 120 minutes après injection). Ce chélate est absorbé par les hépatocytes pour environ 2 à 4% de la dose injectée, qui sera ensuite excrété par voie biliaire. Le reste de la dose (96 à 98%) sera éliminé par filtration glomérulaire (164).

Le Primovist® est lui aussi un chélate de gadolinium linéaire ionique. Après injection, il passe rapidement dans le compartiment extra-cellulaire, puis la dose injectée est absorbée à moitié par les hépatocytes et éliminée à moitié par filtration glomérulaire. Le Primovist® se concentre plus dans les hépatocytes que le Multihance®, permettant de diminuer la dose à injecter (164).

Pour conclure sur les chélates de gadolinium commercialisés, il est à noter, que des études mettent en évidence un risque de toxicité rénale et plus particulièrement de fibrose néphrogénique systémique (NFS). Bien que ce risque soit rare et surtout présent chez des patients déjà atteints de pathologies rénales graves, il n'est pas à négliger et doit être pris en compte lors de la prescription (165,176,177). Ce risque est d'ailleurs plus élevé pour les chélates de gadolinium linéaires (162).
Récemment, des études sur la rétention du gadolinium dans le cerveau ont été menées. Ces études ont abouti en Europe à la révision de plusieurs AMM de chélates de gadolinium linéaires de la part de l'EMA. En outre, toutes les AMM des chélates de gadolinium linéaires ont été suspendues à l'exception, du Multihance® qui reste disponible uniquement pour l'imagerie du foie, du Magnevist® uniquement pour l'imagerie intra-articulaire (à noter qu'il n'est plus commercialisé en France depuis 2016) (178).

4.3. Vectorisation : Principe et application à la santé

Bien que les agents de contraste soient de bons outils d'aide au diagnostic en IRM, ils ne sont pas suffisamment efficaces pour diagnostiquer à temps, un certain nombre de pathologies, notamment les pathologies cancéreuses, pour lesquelles le diagnostic précoce est un élément fondamental dans la prise en charge thérapeutique.

Cette problématique, couplée à un risque de toxicité du gadolinium, lié à la dose administrée et aussi à la récurrence des examens pour un certain nombre de patients, a naturellement conduit à la recherche de l'optimisation de ces chélates.

La recherche s'étant concentrée pendant de nombreuses années sur la vectorisation de substances actives à visée thérapeutique, il est normal qu'elle se soit finalement ouverte à l'optimisation et la vectorisation d'agent de contraste dans un but

diagnostique. C'est dans cette optique que le recherche s'est orientée sur l'élaboration de sondes hypersensibles, permettant à la fois d'augmenter le contraste des images en IRM, tout en diminuant la dose de complexe de Gd à injecter aux patients (8).

4.3.1. Les nanovecteurs

Le développement de la recherche sur les nanoparticules a permis de mettre au point la technique de vectorisation. Elle correspond à l'adressage de molécules actives directement vers une zone cible de l'organisme. Cette technique est extrêmement prometteuse car elle permettrait de palier aux principales limites des molécules actives. A savoir, protéger la substance active des effets de dégradations métaboliques de l'organisme, en augmentant par ailleurs sa demi-vie. Mais aussi protéger l'organisme des effets délétères de certaines substances actives, notamment les agents de chimiothérapie. Dès le début des années 1900, Paul Ehrlich, le pionnier de la vectorisation, imaginait déjà la « Magic Bullet », à savoir une manière d'amener directement le médicament à un site d'action, en maximisant son action thérapeutique et en minimisant les effets indésirables. L'avènement des nanotechnologies pourrait permettre de faire de ce rêve une réalité. Cependant au vu de la complexité d'élaboration des nanoparticules, il a fallu atteindre les années 1970 pour voir apparaître les premiers vecteurs : les liposomes (179).

Ces premiers vecteurs, bien que très prometteurs sont non-naturels et donc n'appartiennent pas au « soi ». Par conséquent, ils peuvent activer une cascade de mécanismes de défenses immunitaires, conduisant à l'inactivation et à la clairance rapide de ces vecteurs. En conséquence, plusieurs générations de nanovecteurs ont vu le jour au cours du temps, apportant à chaque fois des améliorations significatives de l'adressage (180).

Animés par un besoin croissant de nouvelles molécules ou de nouvelles solutions thérapeutiques dans le domaine de la santé humaine, la recherche s'est concentrée principalement sur l'utilisation de la vectorisation à des fins thérapeutiques. Riche de ce recul et de l'avancée des technologies, la recherche a finis par s'intéresser à l'optimisation des produits de contraste et dans un sens plus large, à l'amélioration de nos outils de diagnostic. Il est donc important de présenter les principales percées en

termes de vectorisation thérapeutique, qui directement ou indirectement, ont mené à l'état actuel des connaissances dans le domaine de la vectorisation à visée diagnostic.

4.3.2. Utilisation en thérapeutique

4.3.2.1 Exemple de systèmes commercialisés

Au cours de ces vingt dernières années, de nombreux nanomédicaments approuvés par la FDA et/ou l'EMA ont pu être ajoutés à l'arsenal thérapeutique, pour améliorer de façon significative la prise en charge thérapeutique ou diagnostic des patients. On estime qu'environ 80 nanomédicaments ont été approuvés par ces deux institutions (181). Ce qui montre bien l'intérêt croissant pour ces types de médicaments. Voici quelques exemples de nanomédicaments utilisés aujourd'hui en pratique médicale :

AmBisome®

L'AmBisome® est un des premiers nanomédicaments à avoir été approuvé en 1990 par l'EMA (181). Il s'agit d'une forme liposomale d'amphotéricine B, mise au point pour traiter les infections fongiques systémiques. Cette forme liposomale a été élaborée pour permettre de réduire de façon significative la néphrotoxicité inhérente à la substance active, surtout observée chez les patients à risques de troubles rénaux (182). Bien que l'efficacité des formes liposomales ne semble pas significativement supérieure à l'amphotéricine B seule (183), leur capacité à limiter les risques de néphrotoxicité en font des outils de choix dans la prise en charge des infections fongiques systémiques. L'AmBisome® appartient au groupe des nanovecteurs de première génération, ce sont les premières nanoparticules élaborées pour la vectorisation médicamenteuse. Ces vecteurs sont non fonctionnalisés et sont dits de « ciblage passif ». Lorsqu'ils sont injectés dans l'organisme, ces nano-objets vont très rapidement être reconnus par le système immunitaire.

Les protéines de reconnaissance, nommées les opsonines, vont s'adsorber à la surface des nanoparticules permettant la phagocytose par les cellules du système immunitaire inné (polynucléaires neutrophiles et macrophages). Les nanoparticules, seront ainsi transportées vers les organes riches en macrophages (foie, rate). Ce système de clairance peut être mis à profit pour permettre un adressage naturel de

ces vecteurs. Cependant ils présentent des limites, notamment au niveau de la biodistribution, les nanoparticules ne restant dans la circulation systémique que pendant quelques minutes avant d'être prises en charge par les macrophages. De plus, l'accumulation de la substance active dans les tissus riches en macrophages peut entraîner des effets toxiques (180).

Vyxeos®

Le Vyxeos® est le plus récent des nanomédicaments sous forme liposomale approuvé, si on ne prend pas en compte les vaccins à ARNm COVID-19 élaborés par Moderna® et Pfizer/BioNTech® (184).

Le Vyxeos® est donc une forme liposomale encapsulant deux agents de chimiothérapie, la cytarabine et la daunorubicine indiquées dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë. Le traitement classique de cette pathologie est une association non encapsulée de ces deux agents de chimiothérapie, d'un côté la cytarabine appartenant à la famille des antimétabolites, et de l'autre, la daunorubicine, appartenant à la famille des anthracyclines, fortement décriée pour sa toxicité cardiaque (185). L'encapsulation de ces agents dans une forme nanoparticulaire a été entreprise pour améliorer l'efficacité des substances actives tout en diminuant la toxicité cardiaque induite par la daunorubicine. Des études ont montré que le Vyxeos® améliore de façon significative la prise en charge de la leucémie myéloïde aigüe, les liposomes contenant les agents de chimiothérapie vont se concentrer dans la moelle osseuse et alors retarder leur métabolisation précoce. Cependant, aucune diminution des effets indésirables des deux agents de chimiothérapie n'a été constatée (186,187).

Caelyx®

Le Caelyx® est une forme liposomale pégylée de la doxorubicine, un agent de chimiothérapie de la famille des anthracyclines, indiqué dans le traitement du cancer du sein et des ovaires ainsi que dans la prise en charge du syndrome de Kaposi.

Ce nanomédicament est un vecteur de 2ème génération puisqu'il conjugue à la fois une forme liposomale, ainsi qu'un greffage de chaîne de polyéthylèneglycol (PEG). Cette conjugaison permet de limiter les effets cardiotoxiques de l'anthracycline, tout en diminuant sa reconnaissance par le système immunitaire, prolongeant alors son efficacité (188). Des études ont d'ailleurs mis en évidence l'avantage de l'utilisation de

la doxorubicine liposomale pégylée *versus* la doxorubicine libre chez les patients âgés ou à risque cardiaque (189).

Les nanovecteurs de 2ème génération sont nés en se basant sur les recherches de l'équipe du Pr. De Gennes en 1990, qui a introduit le concept de la répulsion stérique. Ces vecteurs, dits « de ciblage passif » ont été construits en greffant à leur surface des polymères très hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) (Figure 25). Ce greffage empêche l'adsorption des molécules de reconnaissance du système immunitaire à la surface des nanovecteurs par encombrement stérique (190).

Cet échappement au système immunitaire entraîne une augmentation de leur temps de présence dans la circulation systémique de quelques minutes à quelques heures, et induit une réduction de la concentration hépato-splénique des nanovecteurs. Ces derniers peuvent donc atteindre d'autres cibles et notamment les tumeurs grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). En effet, il a été démontré que la perméabilité de l'endothélium vasculaire des tumeurs est augmentée et permet à des objets ayant une taille d'environ 100 nm de traverser l'endothélium pour se concentrer dans la tumeur (180,191).

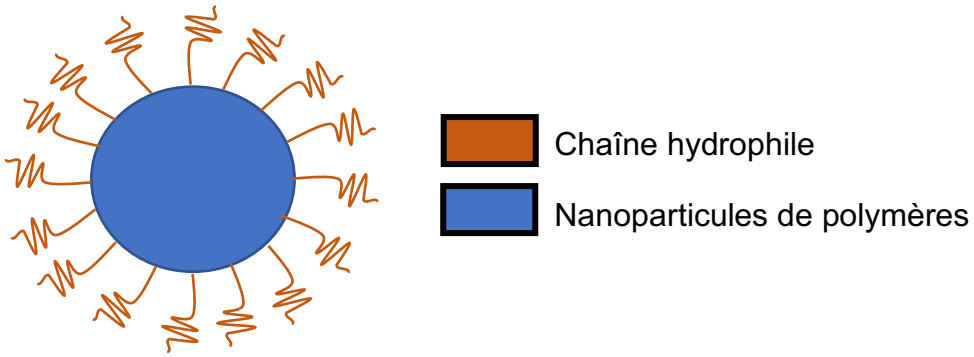

Figure 25 - Schéma des nanovecteurs de 2ème génération

Hensify®

Hensify® est le dernier né des nanoparticules de 4ème génération. Ces nanovecteurs sont dits « intelligents » car ils ont la capacité de libérer leur contenu sous l'effet de différents stimuli, de type physique (changement de température, ultrason, lumière), chimique (changement de pH ou de force ionique) ou encore biologique (présence d'une enzyme spécifique). Ces nanovecteurs sont élaborés à partir de matériaux dont les propriétés physico-chimiques sont modifiées au contact de ces stimuli. Ils

permettent ainsi une libération ciblée et contrôlée du contenu des nanoparticules (180,192). Hensify® est un dispositif médical, ayant obtenu son marquage CE en 2019, composé de nanoparticules d'oxyde d'hafnium. Ces nanovecteurs seront introduits directement dans la tumeur puis seront activés par radiothérapie. Après activation, elles émettront une importante quantité d'énergie thermique, permettant de traitement le cancer au contact direct des cellules tumorales (193,194).

Il existe certains nanomédicaments élaborés à partir de polymères, cependant ces derniers ne sont pas des systèmes nanoparticulaires à proprement dit. En effet, les substances actives sont dans ce cas conjuguées à des chaînes de PEG, permettant de diminuer l'immunogénicité de ces médicaments et de retarder leur clairance par le système immunitaire. La grande majorité des nanosystèmes commercialisés aujourd'hui sont élaborés à partir de nanoparticules lipidiques, ce phénomène s'explique notamment par le recul de la recherche plus important sur ce genre de système, par leur bonne biocompatibilité/dégradabilité, ainsi que le bon taux d'encapsulation.

4.3.2.2 Exemples de systèmes en essai clinique

Depuis 2016, ce sont environ 75 nouveaux essais cliniques qui ont été débutés avec encore une fois, une grande majorité de liposomes ou de nanoparticules lipidiques ; cependant des formulations de nanoparticules de polymères ont été engagées dans un processus d'essai clinique de phase II et phase III, c'est notamment le cas du BIND-014 (195) en phase II et du NK-105 ainsi que du NC-6004 en phase III (181).

Le BIND-014 est une formulation de nanoparticules de PLA pégylées, encapsulant du docétaxel et présentant un ligand ciblant le PSMA (Prostate-specific membrane antigen) pour le traitement du cancer de la prostate (193). Cet agent de chimiothérapie fait partie de la famille des taxanes ; il va stimuler l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules, entraînant par la suite l'inhibition de leur réorganisation dynamique, processus vital dans la mitose des cellules. Il cause de nombreux effets indésirables de type hématologiques, mais il est aussi la cause de neuropathies sensitives périphériques. Cette étude prouve que le BIND-014 est mieux toléré par les patients et que son action reste dépendante du niveau d'expression du PSMA.

Le BIND-014 fait partie des nanovecteurs de 3ème génération. Ce sont des vecteurs de ciblage actif spécifique. Ils reprennent les caractéristiques d'échappement au système immunitaire de la 2ème génération, en y ajoutant à leur surface des ligands ou récepteurs (Figure 26). Cet ajout permet aux particules de cibler de manière spécifique des tissus ou des cellules afin d'y acheminer la substance active. De manière concrète, ces vecteurs possèdent à leur surface des PEG pour échapper au système immunitaire, ainsi que des ligands qui leur permettent de se fixer à leur récepteur. Cependant ils sont plus complexes à élaborer, un juste équilibre entre furtivité et ciblage étant nécessaire : trop de PEG peut entraîner une difficulté d'accès du ligand à son récepteur, trop de ligand entraîne une augmentation de la reconnaissance du nanovecteur par le système immunitaire et réduit sa furtivité (180,192).
De nombreux ligands peuvent aujourd'hui être utilisés comme l'acide folique (196), la transferrine (197), ou encore des anticorps monoclonaux (198).

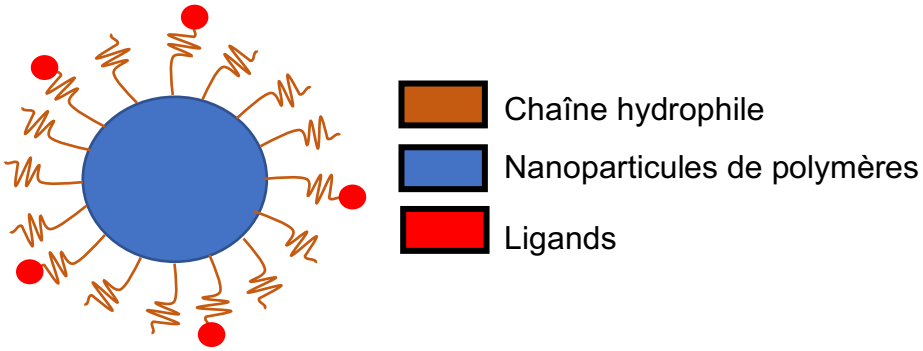

Figure 26 - Schéma des nanovecteurs de 3ème génération

Le NK-105 est une nouvelle formulation de nanoparticules composée de micelles polymériques encapsulant du paclitaxel. Cet agent de chimiothérapie fait partie de la famille des taxanes. Le NK-105 a fait l'objet récemment d'un essai clinique multicentrique, ouvert, randomisé, de phase III pour comparer son efficacité à un traitement à base de paclitaxel dans la prise en charge du cancer du sein. L'étude n'a pas montré d'infériorité, en termes de survie sans progression de tumeur, du NK-105 comparé au paclitaxel, malgré une dose plus faible de NK-105 utilisée. Elle a cependant mis en évidence une diminution significative des neuropathies sensitives périphériques chez les patients sous NK-105 (199). D'autres études sont toutefois nécessaires pour confirmer ou infirmer la tendance observée.

Le NC-6004 est une formulation de nanoparticules de micelles polymériques encapsulant du cisplatine. Cette substance active appartient à la famille des complexes de platine, qui agissent comme des agents alkylants. Le cisplatine est une prodrogue, qui libère un dérivé du platine réactif, qui va former un adduit sur les brins d'ADN. La formation de liaison intra-brins ou de ponts inter-brins va conduire à une inhibition de la synthèse de l'ADN. Ces agents de chimiothérapie sont extrêmement agressifs et sont responsables de néphrotoxicité et d'ototoxicité, entraînant une diminution de dose ou un arrêt du traitement par le patient (200). De nombreuses études sur le NC-6004 à la fois chez l'animal et chez l'homme ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'efficacité du complexe de platine une fois encapsulé, et une réduction de la néphrotoxicté, de l'ototoxicité et de la toxicité cérébrale (201–208). Le NC-6004 est actuellement en essai de phase III pour le traitement du cancer du pancréas (209). Riche de toute cette connaissance dans le milieu thérapeutique, la nano encapsulation ne tarda pas à trouver toute sa place dans le monde du diagnostic médical.

4.3.3. Utilisation en diagnostic

Dans un but d'améliorer l'efficacité des agents de contraste, la recherche s'est concentrée sur l'élaboration de formulations de nanoparticules encapsulant des complexes de gadolinium. La technique de nanoencapsulation permet d'augmenter la demi-vie des agents de contraste, tout en diminuant les effets indésirables liés au relargage possible des ions gadolinium depuis les chélates. De plus, la nanoencapsulation permet d'envisager un ciblage particulier de ces chélates pour renforcer l'arsenal thérapeutique. Dans ce but, un certain nombre de nanoparticules ont été étudiées pour encapsuler des chélates de gadolinium (8). Une attention particulière sera portée ici sur les stratégies d'optimisation des chélates de gadolinium à l'aide de deux grands types de nanoparticules : les nanoparticules lipidiques et les nanoparticules de polymères.

4.3.3.1 Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques (LNPs) connaissent un très grand succès dans le domaine médical, grâce à leur capacité prometteuse à encapsuler de nombreuses

substances actives. Leur application a d'ailleurs été étendue à de nombreux autres domaines comme la cosmétique ou l'agroalimentaire.
Parmi les LNPs, il est utile de mentionner les liposomes. Ce sont les premières nanostructures lipidiques à avoir été mises au point dans les années 1960 (210). Les liposomes sont des nanostructures très polyvalentes, composées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, de taille variant d'une dizaine de nanomètres jusqu'au micromètre. Leur structure permet d'envisager l'encapsulation de substances actives hydrophiles (dans le cœur) ainsi que de substances actives hydrophobes (dans les chaînes carbonées de la bicouche lipidique). Ces nanoparticules sont particulièrement adaptées à l'oncologie, puisqu'environ 40% des agents de chimiothérapie sont hydrophobes. De plus, les liposomes sont les premières nanostructures à avoir franchi avec succès le passage de la recherche fondamentale à l'utilisation en clinique, faisant d'eux de parfaits candidats pour la recherche translationnelle (211). Leurs propriétés et le recul déjà existant sur leur utilisation, ont permis à ces nanostructures d'être étudiées pour l'optimisation des chélates de gadolinium.

L'ajout des chélates de gadolinium dans les liposomes peut se faire selon deux manières, soit par encapsulation de chélates hydrophiles dans leur cœur, soit par incorporation de chélates amphiphiles dans la bicouche lipidique (8).

Dans le premier cas, Ayyagari et al, ont élaboré une formulation de liposomes pégylés encapsulant un ACE, le gadodiamide. Comme attendu, le temps de présence intravasculaire a été fortement augmenté, permettant d'entrevoir des applications en angiographie. Cependant, la relaxivité mesurée à 40°C, montre une diminution d'un facteur 4 de cette formulation comparée au Gd-DTPA libre. Ce mauvais résultat est expliqué par une faible interaction du gadolinium avec l'eau environnante, puisque la bicouche phospholipide des liposomes est très peu perméable à l'eau (212). Pour faire face à ce problème, Cheng et al (213) ont mis au point une formulation de liposomes poreux, encapsulant un chélate de gadolinium stabilisé par du dextran. Les liposomes, élaborés à partir de phospholipides particuliers (bis-Sorb PC), possèdent des pores qui leur confèrent une forte perméabilité, comparée à la majorité des autres liposomes (214). Le chélate de gadolinium est alors greffé avec du dextran pour éviter qu'il ne fuite à travers les pores des nanoparticules. Cette formulation montre une relaxivité à 60 MHz, certes identique à l'agent de contraste libre, mais une forte encapsulation du

nombre de chélates de gadolinium dans les liposomes conduit à une forte augmentation de contraste observé en IRM à 9,4 T. Même si les résultats semblent encourageants, aucune acquisition de données en IRM, aux champs magnétiques utilisés en pratique médicale courante n'a été réalisée.

Il est alors possible de fonctionnaliser les chélates de gadolinium et permettre l'incorporation dans la bicouche lipidique. Les agents de contraste sont alors disposés majoritairement dans la couche externe du liposome, permettant un accès à l'eau plus aisé que dans leur cœur. C'est dans ce sens que Pitchaimani et al (215), ont élaboré des liposomes à visée théranostique encapsulant du Gd-DOTA et de la doxorubicine. Le Gd-DOTA est lié de façon covalente à la partie hydrophile située entre la bicouche de phospholipides. En termes d'efficacité, la relaxivité mesurée de ces liposomes à 14,1 T est trois fois plus élevée que celle du Gadodiamide à 14,1T. Bien que cette formulation semble prometteuse, la relaxivité de cette formulation n'a pas été testée aux champs magnétiques utilisés en pratique courante.
A notre connaissance, aucune formulation à base de liposomes pour l'encapsulation de chélate de gadolinium n'a franchi l'étape de la recherche fondamentale. La difficulté d'accès, pour les chélates de gadolinium, à un environnement riche en eau semble être un frein pour le passage de ces formulations en clinique.

4.3.3.2 Nanoparticules de polymères

Déjà décrites précédemment, les propriétés des nanoparticules de polymères, aussi bien synthétiques que naturels, font d'elles de parfaites candidates pour l'encapsulation de chélates de gadolinium (216–218).

Par exemple, Ratzinger et al (219) ont mis au point des nanoparticules de PLGA greffées avec du Gd-DTPA et Gd-DOTA de façon covalente, obtenus par une technique d'émulsion évaporation de solvant.
En terme d'efficacité, ces nanoparticules présentent des relaxivités r_1 à 1,4 T respectivement de 11,9 et 16 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 60 MHz, qui sont environ 3 à 4 fois supérieures à la valeur des chélates de gadolinium libre (162,216). Pour essayer d'améliorer encore plus l'efficacité des chélates, Courant et al (220) ont décidé d'encapsuler divers agents de contrastes commerciaux (Magnévist®, Multihance®, et Prohance®) dans des

nanoparticules de PLGA. Pour permettre d'encapsuler ces substances actives hydrophiles, une technique de double émulsion a été choisie pour la préparation des nanoparticules. Cependant, les chélates, justement à cause de leur forte hydrophilie, ont rapidement fuité des nanoparticules. Dans cette même équipe, pour tenter d'améliorer l'encapsulation des chélates de gadolinium, Rigaux et al (221) ont élaboré des nanoparticules de PLGA par nanoprécipitation pour encapsuler un chélate lipophile de Gd-DO3A. Les résultats indiquent qu'une bonne encapsulation est permise grâce à l'augmentation de la lipophilie du complexe, et qu'une bonne efficacité de la formulation est obtenue. La relaxivité r_1 du nano complexe est de 19,4 $mM^{-1}s^{-1}$ à 40 MHz contre 3 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour le Dotarem® libre, soit une augmentation d'un facteur 6 qui traduit une efficacité de la formulation. Ces bons résultats sont en partie dus à la très forte concentration en chélate au sein des nanoparticules.

Comme vu précédemment, l'environnement aqueux au contact du gadolinium est un élément crucial dans la stratégie d'optimisation des chélates de gadolinium. C'est pourquoi l'encapsulation de ces agents au sein de nanohydrogels a été tentée. Courant et al (222) ont développé une formulation de nanohydrogels par gélification ionique entre le chitosane et l'acide hyaluronique. Ces nanostructures, possédant une charge de surface, stabilisée par réticulation ionique à l'aide de tripolyphosphate, ont permis d'encapsuler du Gd-DOTA.

Cette formulation montre de très bons résultats avec une relaxivité r_1 augmentée d'un facteur 24 pour le Gd-DOTA encapsulé dans le nanogel (72,3 $mM^{-1}s^{-1}$) comparé à sa forme libre (3 $mM^{-1}s^{-1}$) à 60 MHz. Cet effet d'exaltation du signal est en grande partie dû à la nature de la nanostructure. La capacité hygroscopique à la fois du chitosane et de l'acide hyaluronique permet aux chélates de gadolinium d'être au contact direct avec un milieu fortement aqueux. Toujours dans la même équipe et pour aller plus loin, Callewaert et al (223) ont élaboré des nanohydrogels à partir de chitosane, chargés positivement et encapsulant deux chélates de gadolinium (Vasovist® ou Gd-DOTP) selon deux méthodes. Dans une première méthode, les nanogels ont été obtenus par nanoprécipitation du chitosane par augmentation de pH à l'aide de soude. Dans une deuxième méthode, ils ont été obtenus par un processus de gélification ionique entre le chitosane, l'acide hyaluronique et le tripolyphosphate déjà décrit précédemment. Seule la deuxième méthode a permis d'obtenir des nanogels pour les deux chélates.

De plus, les résultats en termes de relaxivité sont extrêmement prometteurs puisqu'ils indiquent des valeurs respectives de 98 $mM^{-1}s^{-1}$ et 52,9 $mM^{-1}s^{-1}$ pour le Gd-DOTP et le Vasovist® contre 4,2 $mM^{-1}s^{-1}$ et 5,9 $mM^{-1}s^{-1}$ pour ces mêmes complexes libres à 40 Mhz, confirmant les résultats obtenus par Courant et al. De plus, une cinétique de libération *in vitro*, effectuée dans un milieu plasma simulé, concernant le Gd-DOTP encapsulé au sein des nanogels de CS/HA/TPP a été effectuée et ne montre aucune libération de ce complexe jusqu'à 72h.

Les très bons résultats obtenus par ces nanohydrogels ont permis de passer à l'évaluation *in vivo* chez l'animal. Les nanohydrogels de CS/HA/TPP encapsulant le Gd-DOTA ont été injectés à des souris par voie sous-cutanée. Cette voie a été choisie, car les nanohydrogels étaient trop visqueux pour être injectés par voie intraveineuse. De plus, la voie sous cutanée permet à la fois d'atteindre la circulation systémique pour une distribution générale, ainsi que la voie lymphatique pour une distribution lymphatique très utile pour une application en oncologie. La migration des nanoparticules a ensuite été visualisée par IRM des souris. Cependant les nanogels n'ont pas réagi comme prévu et n'ont pas migré à partir du site d'injection. Ce comportement semble dû à la charge de surface positive des nanogels. Ces derniers semblent réagir avec les nombreuses macromolécules chargées négativement présentes dans le tissu sous-cutané.

Bien qu'à notre connaissance, aucune formulation à partir de nanoparticules de polymères ne soit en phase d'essais cliniques pour l'encapsulation de chélates de gadolinium, ces dernières sont extrêmement prometteuses et montrent de bonnes propriétés d'exaltation du signal en IRM.

Nous avons alors décidé de poursuivre ce travail, à partir des derniers travaux présentés sur les nanohydrogels. L'un des défis consistait à comprendre les mécanismes de rétention au site d'injection de la formulation de CS/HA/TPP et de mettre en place des stratégies de formulation pour contourner cette limite. En effet, la charge positive des nanogels semble être un frein pour la délivrance lymphatique. Le tissu sous-cutané est composé de lipides, de nombreuses protéines comme le collagène ou l'élastine ainsi que de nombreuses cellules comme des fibroblastes ou des macrophages. Pour le ciblage lymphatique, il semblerait que les nanoparticules

chargées positivement soient susceptibles d'être piégées dans la matrice extracellulaire interstitielle, conduisant à une faible migration et à une faible concentration dans les ganglions lymphatiques (224,225). De plus, l'interaction connue des nanoparticules chargées positivement avec les membranes cellulaires, augmente la probabilité d'interaction avec les macrophages et donc augmente la clairance locale des nanostructures.

Chapitre 2 : Développement de nanohydrogels de chitosane à charge de surface négative

Le laboratoire a mis au point il y a quelques années une formulation de nanoparticules à base de deux biopolymères, le chitosane et l'acide hyaluronique, formant un réseau par gélification ionique pour encapsuler des complexes de gadolinium (220,222). Les structures obtenues, grâce aux propriétés hygroscopiques des polymères utilisés, sont des nanohydrogels. Leur caractérisation a démontré qu'il s'agissait de structures sphériques, bien individualisées, biocompatibles, de tailles comprises entre 200 et 300 nm, avec un potentiel de surface largement positif et permettant l'encapsulation d'agents de contraste dans des gammes de concentration de l'ordre 10^{-5} M. Les complexes de gadolinium séquestrés dans cet environnement riche en eau voient leur efficacité, exprimée par la valeur de la relaxivité r_1, fortement améliorée. De même, le contraste observé en imagerie est plus important en comparaison avec les complexes de Gd seuls. Cependant, la charge positive de surface des nanoparticules formées, bien que permettant une bonne stabilité dans le temps, pourrait être un frein à leur distribution dans l'organisme. En effet, les protéines et macromolécules chargées négativement présentes *in vivo* vont rapidement s'adsorber par interactions électrostatiques sur les surfaces des nano-objets (226,227). Selon la voie d'administration choisie, cela pourrait provoquer une opsonisation rapide et donc une élimination rapide de la circulation dans le cas d'une injection par voie IV (228), ou une faible mobilité et donc une faible résorption au niveau du site d'injection dans le cas d'une injection sous-cutanée (229). Cet effet « dépôt » au site d'injection est parfois recherché, comme dans le cas de la vaccination par exemple (229). Cependant, pour la vectorisation d'agent de contraste, il faut que les particules puissent migrer vers les zones pathologiques.

L'objectif de cette première partie du travail a donc été de modifier la charge de surface des nanohydrogels tout en conservant les caractéristiques morphologiques et l'efficacité IRM des NPS de la formulation initiale.

1. Nanoparticules de CS, HA et TPP

Sur la base de la formulation établie préalablement au laboratoire, une série d'expériences visant à moduler la charge de surface est menée. Les différents paramètres qui interviennent dans la préparation des particules sont pour cela modifiés séparément ou en combinaison, pour en déterminer l'effet sur leurs propriétés.

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Matériels

Le chitosane utilisé provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Il est extrait de carapaces de crevettes, sa masse molaire est de 56kDa avec un degré de déacétylation de 86%, déterminé par spectrométrie NMRD ^{1}H NMRD (230).
L'acide hyaluronique provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Les données du fournisseur donnent une masse molaire moyenne de 1000 kDa. Le tripolyphosphate provient de chez Acros Organics (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). L'eau utilisé pour la synthèse des nanoparticules et pour les autres expérimentations est systématiquement de l'eau ppi (Laboratoire Aguettant, Lyon, France). Les autres produits utilisés sont de grade analytique, utilisés sans purification supplémentaire.

1.1.2. Élaboration des nanosuspensions

Le protocole d'élaboration des nanoparticules a été mis au point au laboratoire et décrit dans plusieurs publications antérieures (220,222). Il repose sur l'édification de complexes polyélectrolytiques entre deux polymères de charges opposées. Pour cela, la phase polycationique est obtenue par dissolution de chitosane dans une solution aqueuse d'acide citrique à 10% à la concentration de 2,5 mg/L. Après dissolution, il est possible d'observer la présence de résidus insolubles. Ceux-ci sont éliminés par centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes. La phase polyanionique est obtenue par dissolution d'acide hyaluronique et de tripolyphosphate de sodium, aux concentrations respectives de 0,8 mg/mL et 1,2 mg/mL dans de l'eau ppi.

Pour obtenir les nanoparticules, 4,5 mL de la phase polyanionique sont ajoutés à 9 mL de la phase polycationique au goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 3 mL/min sous sonication (750 W, amplitude 32%, Vibra Cell™, Bioblock). Afin d'empêcher un échauffement de la solution, on utilise un bain de glace fondante. A la fin de l'ajout, les ultrasons sont maintenus 30 sec, puis la suspension est agitée magnétiquement pendant 10 min pour assurer la stabilisation du système. Le montage expérimental utilisé est présenté sur la figure 27

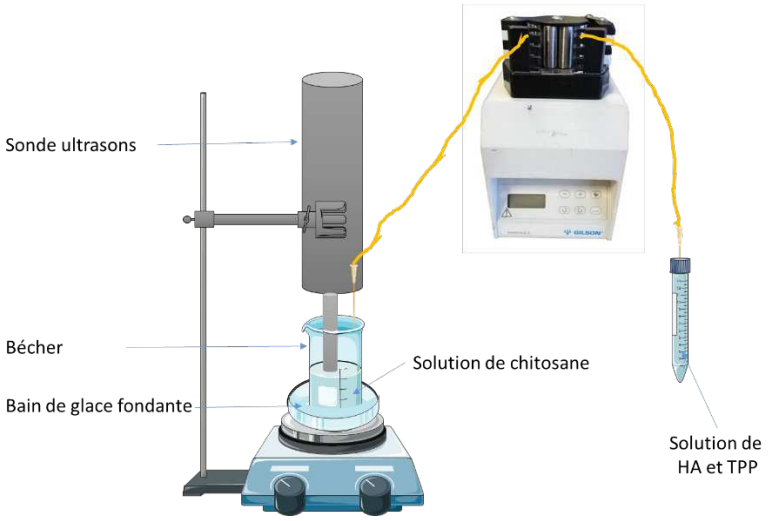

Figure 27 - Schéma représentant le montage expérimental utilisé pour la production des nanoparticules de CS/HA/TPP.

Pour retirer l'excédent d'acide, la nanosuspension peut être dialysée contre de l'eau (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h. On utilise alors un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa.

1.1.3. Caractérisation des nanoparticules de CS/HA/TPP

1.1.3.1 Caractérisation par DLS

Le diamètre hydrodynamique moyen (D_H) et l'indice de polydispersité (PdI) des nanoparticules sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière grâce à un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Chaque échantillon est analysé 3 fois à 20°C, avec un angle de 173°, après une dilution au 1/20 dans l'eau ppi, milieu qui sert également de référence.

Le potentiel zêta est déterminé par diffusion électrophorétique de la lumière, sur la même dilution de l'échantillon, avec un voltage de 150 mV. L'instrument est calibré avec un standard à -68 mV de chez Malvern avant chaque cycle d'analyse

1.2. Résultats et discussion

1.2.1. Effet de la variation des concentrations en polymères

Pour évaluer l'effet de la concentration en polymères sur la charge de surface des nanoparticules, une étude systématique est menée en faisant varier soit la concentration du polycation soit celle du polyanion, tout en gardant l'autre constante.

1.2.1.1 Variation de la concentration en chitosane

Dans la formulation initiale, les conditions expérimentales étaient les suivantes :

Phase poly(+)		Phase poly (-)		
[CS], mg/mL	V_{CS}, mL	[HA], mg/mL	[TPP], mg/mL	$V_{HA/TPP}$, mL
2,5	9	0,8	1,2	4,5

Les concentrations en HA et en TPP sont tout d'abord maintenues constantes tandis que la concentration en CS varie. Pour chaque formulation testée, la suspension obtenue est d'abord observée visuellement. Pour certaines d'entre elles, la formation d'agrégats apparait rapidement. Pour les autres, lorsqu'une opalescence est observée, une mesure par DLS est alors réalisée. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 2

Tableau 2 - Influence de la concentration en chitosane sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL.

[CS] mg/mL	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
3	228	0,19	48
2,5	**228**	**0,17**	**49**
1,2	285	0,17	36
0,6		Agrégats	
0,4		Agrégats	
0,2		Agrégats	

Une diminution de la concentration en CS est alors appliquée tout en conservant les concentrations en polyanions constantes, plus la concentration en CS diminue, plus on s'éloigne des conditions optimales de formation des nanoparticules. Pour une concentration inférieure ou égale à 0.6 mg/mL, les polymères ne forment pas de nanogels mais sédimentent. Pour une concentration de 1,2 mg/mL, une opalescence de la suspension est obtenue. La mesure par DLS confirme que des nanoparticules sont bien obtenues, avec des tailles comparables à la formulation de référence. La mesure par ELS montre une diminution du potentiel zéta de 49 mV à 36 mV, mais insuffisante par rapport à l'objectif d'inversion de la charge.

1.2.1.2 Variation de la concentration en HA et TPP

Avec le même objectif que précédemment, la concentration en polymère anionique est modulée en conservant les concentrations de CS constantes. Les résultats sont présentés dans les tableaux 3 et 4. Ils montrent qu'une augmentation de la concentration en HA provoque une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules mesuré par DLS. En effet, le diamètre moyen des objets obtenus passe d'environ 230 nm pour une concentration en HA de 0,67 mg/mL, à 330 pour une concentration de 2,5 mg/mL. Au-delà de cette valeur de concentration, la formation de nanoparticules n'est plus observée, et un gel massique apparait dans le bécher. Aucune variation significative du potentiel zêta n'est observée dans la gamme de concentrations en HA testée.

Tableau 3 - Influence de la concentration en HA sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [CS] = 2,5 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL.

[HA] mg/mL	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
0,67	226	0,19	48
0,8	**238**	**0,17**	**48**
1,67	286	0,18	48
2,5	330	0,17	46
5	Prise en masse		
10	Prise en masse		

Parallèlement, on observe qu'une augmentation de la concentration en TPP provoque une diminution des valeurs de taille des nanoparticules (Tableau 4). Dans la formulation mise au point au laboratoire, le TPP a un rôle d'agent réticulant. Grâce à ses charges négatives, cette petite molécule est connue pour interagir avec les charges positives du chitosane, renforçant le réseau de macromolécules lors de la gélification ionique (231). Ici, un réseau plus dense des nanoparticules donne lieu une diminution des tailles, comme cela pouvait être attendu. Lorsque la concentration en TPP augmente au-delà de 3 mg/mL, alors la molécule est en excès et on observe des agrégats, qui peuvent être expliqués par une réticulation entre nanoparticules.

Tableau 4 - Influence de la concentration en tripolyphosphate sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence. [CS] = 2,5 mg/mL et [HA] = 0,8 mg/mL.

[TPP] mg/mL	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
0,4	332	0,26	51
0,8	246	0,19	50
1,2	**230**	**0,19**	**50**
1,6	224	0,18	48
3	171	0,15	34
5	Agrégats		
8	Agrégats		
10	Agrégats		
14	Agrégats		

Une diminution du potentiel zêta est également observée lorsque la concentration en TPP augmente, mais il reste toujours positif.

1.2.1.3 Variations simultanées de la concentration en CS, HA et TPP

Des essais complémentaires sont réalisés en faisant varier simultanément les concentrations en CS, HA et TPP. Les résultats sont présentés dans le tableau 5. Ils indiquent qu'il est difficile de s'éloigner des conditions déterminées dans la formulation de référence. Seule une augmentation conjointe de HA et TPP permet d'obtenir une valeur de ZP proche de la neutralité, mais au prix d'une diminution de la répulsion électrostatique entre les particules formées, ce qui induit un manque de stabilité et donc une agrégation importante, représentée par la valeur du D_H de 610 nm.
Même si ces différents essais semblent infructueux par rapport à l'objectif d'inversion de charge, nous avons souhaité compiler l'ensemble de ces données pour tenter de déterminer des domaines de concentration permettant la formation de nanoparticules.

Tableau 5 - Influence de la concentration en chitosane, en acide hyaluronique et en tripolyphosphate sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. En gras, formulation de référence.

[CS] mg/mL	[HA] mg/mL	[TPP] mg/mL	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
2,5	0,67	1	225	0,18	50
2,5	**0,8**	**1,2**	**230**	**0,19**	**50**
2,5	1,67	2,5	260	0,17	41
2,5	1,6	3	260	0,14	35
2,5	2	2,5	282	0,14	38
2,5	2,5	2,5	335	0,15	39
2,5	2	3	284	0,19	33
2,5	2,5	3	444	0,29	35
2,5	2,5	3,75	610	0,26	7
2,5	3,5	5	Prise en masse		
1,6	1,6	1,6	282	0,15	38
1,6	1,6	2,5	Agrégats		
1,2	1,6	1,6	Agrégats		
1,2	1,6	2,5	Agrégats		
1,2	2	3	Agrégats		
1	1,6	1,6	Agrégats		
1	1,6	2,4	Agrégats		
1	2	3	Agrégats		

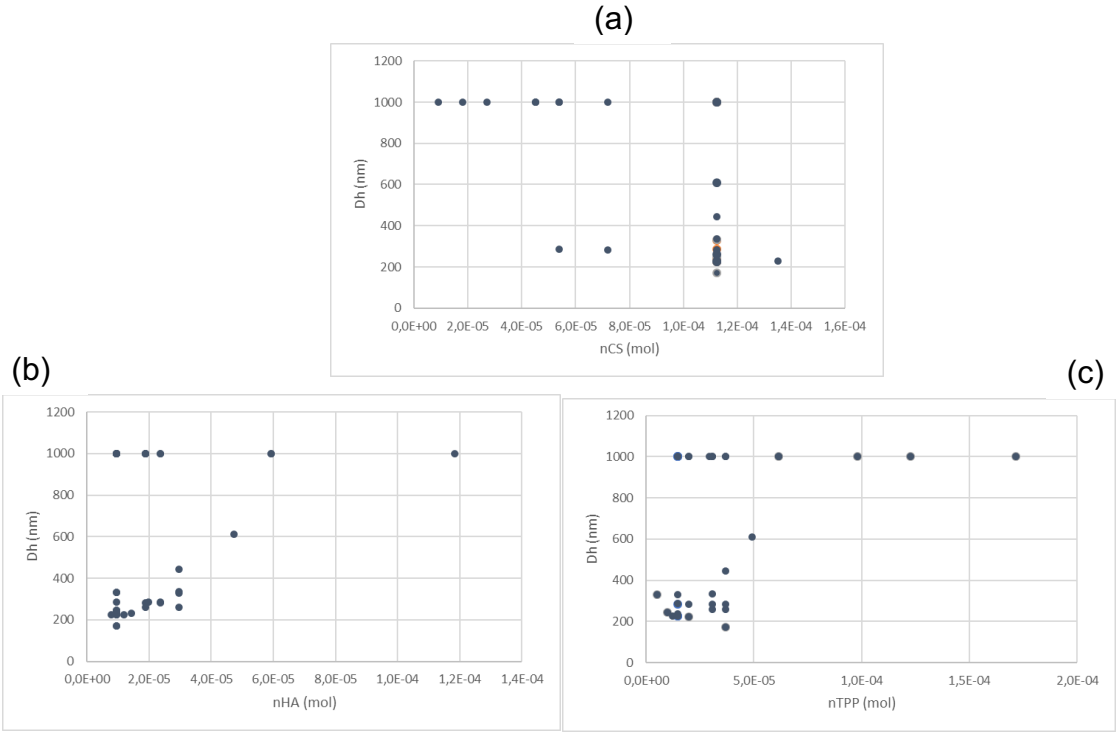

Figure 28 - Evolution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules de CS / HA / TPP en fonction du nombre de moles de CS (a), de HA (b) ou de TPP (c) dans la formulation. Les formulations qui ont sédimenté sont artificiellement considérées comme ayant des diamètres à 1000 nm pour apparaître sur les graphiques, sans signification réelle de la valeur de taille.

En portant sur un graphique les tailles des nanoparticules obtenues en fonction du nombre de moles de chaque polymère, on ne peut pas relever de tendance particulière (Figure 28). Puisque le procédé de formulation utilisé est la gélification ionique, nous avons alors tenté de relier la faisabilité de formation du réseau au nombre de charges portées sur chaque polymère, en considérant le pH final de la nanosuspension qui est d'environ 2,5. Pour cela, les quantités de charges négatives potentielles portées par le HA et le TPP (n^-), et les charges positives potentielles portées par le chitosane (n^+) sont calculées.

Pour le calcul du nombre de charges positives potentielles, on considère qu'une amine protonée est portée sur chaque unité répétitive du chitosane (masse molaire considérée : 200 g/mol, masse dans la formulation selon la concentration testée).

Concernant le TPP, les pKa des 5 fonctions déprotonables sont $pKa_1 = 1$, $pKa_2 = 2$, $pKa_3 = 2{,}79$, $pKa_4 = 6{,}47$, $pKa_5 = 9{,}24$ (232).Le pH final des nanosuspensions étant, dans le cas de ces formulations qui utilisent l'acide citrique, aux alentours de 2,5, on considérera que le TPP porte globalement 3 charges négatives. Le pKa de la fonction acide de l'HA est d'environ 3,5 (233). Ainsi, à pH 2,5, la fonction acide est majoritairement protonée (Figure 29).

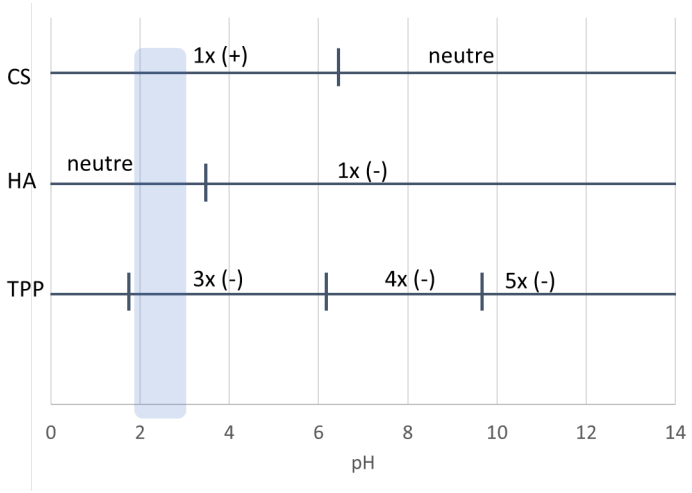

Figure 29 - Charges portées par les polymères en fonction du pH.

La figure 30 représente ainsi l'évolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules produites en fonction du rapport n^+/n^- calculé à partir des concentrations en polymères mises en jeu dans chacune des formulations.

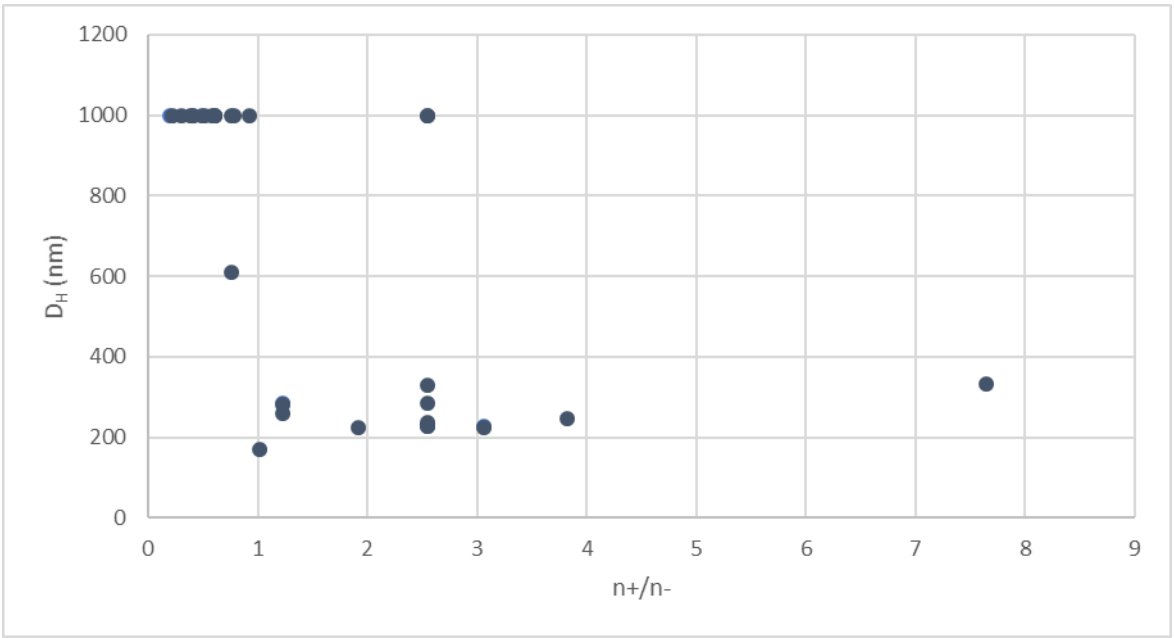

Figure 30 - Evolution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules de CS / HA / TPP en fonction du rapport des charges positives (n^+) sur les charges négatives (n^-) présentes dans la formulation à pH 2,5. Les formulations qui ont sédimenté sont artificiellement considérées comme ayant des diamètres à 1000 nm pour apparaître sur le graphique, sans signification réelle de la valeur de taille.

A partir de ces données, on peut observer que des nanoparticules à base de CS, de HA et de TPP peuvent être formées lorsque le rapport n^+/n^- est supérieur à 1. *A contrario*, une agrégation des polymères est systématiquement observée pour un rapport n^+/n^- inférieur à 1. Nous n'avons pas observé de limite maximale à ce domaine

de formation des nanoparticules, dans la gamme de concentrations testées. Cette valeur seuil n^+/n^- = 1 correspond à une équivalence entre les moles de charges positives et les moles de charges négatives. Ce lien entre le nombre de charges exprimées sur les polymères et les tailles des nanoparticules formées confirme un phénomène déjà observé dans le cas de formulations utilisant le CS et le TPP (234).

Toutefois, il apparaît de tous ces essais que le potentiel zêta des nanogels n'est pas influencé par la présence en plus grande quantité des constituants anioniques dans la formulation. En effet, même avec un rapport massique en faveur du HA ou du TPP, les charges de surface restent positives.
Le pH de la nanosuspension obtenue pourrait expliquer ce phénomène : la phase polycationique, composée de chitosane dissout dans l'acide citrique à 10% m/v, impose un pH final aux environs de 2,5. A ce pH, les fonctions amines du chitosane sont protonées, ainsi que les fonctions acides de l'acide hyaluronique. Un potentiel zéta négatif des nanoparticules est plus difficile à obtenir dans ces conditions. C'est pourquoi l'effet d'une rectification du pH de la phase cationique est évalué.

1.2.2. Effet de la variation du pH de la phase cationique

Afin de faire varier le pH de la phase polycationique, il a été choisi de modifier :

- la nature de l'acide utilisé : acide acétique et acide citrique ;
- la concentration en acide : 1 %, 5 % et 10 % v/v pour l'acide acétique (correspondant respectivement à 0,17 ; 0,85 et 1,7 mol/L), et 1%, 5% et 10 % m/V pour l'acide citrique (correspondant respectivement à 0,052 ; 0,26 et 0,52 mol/L) ;
- le pH de la solution de chitosane avant de faire le mélange des deux phases : non ajusté, ajusté à 4 et ajusté à 5 avec une solution de NaOH à 2,5 M.

Les résultats présentés dans le tableau 6 montrent que, quelles que soient les conditions testées, aucune des suspensions ayant permis l'obtention de nanoparticules n'a donné lieu à des potentiels zéta négatifs. De plus, aucune corrélation claire ne peut être établie entre la valeur du pH de la phase cationique et le potentiel zéta des nanoparticules produites dans ces conditions (Figure 31).

Tableau 6 - Influence de la nature et de la concentration en acide, et du pH de la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les PdI et les ZP des nanoparticules de CS/HA/TPP. Pour toutes les formulations [CS] = 2,5 mg/mL, [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2. En gras, formulation de référence. pH de la phase HA/TPP = 9,6.

	Phase CS		Nanosuspension		
acide	**pH phase CS**	**pH après ajustement**	**D_H (nm)**	**PdI**	**ZP (mV)**
acétique 1%	3,9	Non ajusté	416	0,523	61
	3,9	5	462	0,472	43
acétique 5%	3,2	Non ajusté	401	0,453	58
	3,2	4	458	0,482	46
	3,2	5	406	0,412	35
acétique 10%	3,1	Non ajusté	303	0,365	55
	3,1	4	465	0,416	46
	3,1	4,7	350	0,273	31
citrique 1%	3.5 CS non soluble	-	-	-	-
citrique 5%	2,8	Non ajusté	235	0,256	44
	2,8	4	357	0,242	24
	2,8	4,8→ précipité			
citrique 10%	**2,4**	**Non ajusté**	**233**	**0,142**	**44**
	2,4	4	420	0,145	26
	2,4	4,8→ précipité			

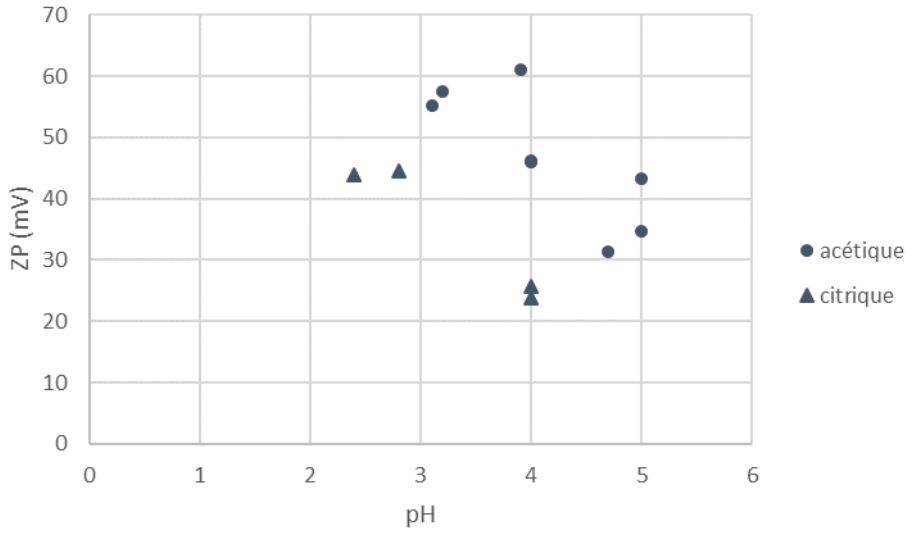

Figure 31 - Potentiel zêta des nanoparticules de CS/HA/TPP en fonction du pH de la phase cationique après dissolution du CS dans l'acide acétique (cercles) ou l'acide citrique (triangles) et ajustement avec NaOH 2.5 M. Pour toutes les formulations [CS] = 2,5 mg/mL, [HA] = 0,8 mg/mL et [TPP] = 1,2 mg/mL. pH de la phase HA/TPP = 9,6.

La modification du pH de la phase cationique n'ayant pas permis d'atteindre l'objectif d'inversion de charge de surface, une correction du pH après formulation a été entreprise.

1.2.3. Correction du pH après formulation : effet de dialyse

Afin de modifier le pH après formulation, une étape de purification a été réalisée. Elle a pour objectif d'éliminer l'acide citrique utilisé pour la solubilisation du chitosane. Parmi les méthodes de purification des nanoparticules, les plus utilisées sont la centrifugation, la filtration tangentielle et la dialyse. La dialyse a pour avantage d'être facile à mettre en œuvre et elle ne provoque pas d'agrégation des nanoparticules. Pour ces essais, un volume de la suspension de nanoparticules a été placé dans un tube de dialyse mis sous agitation dans 100 volumes d'eau ppi. L'eau est renouvelée toutes les 12h, pendant 3 cycles de purification. Le diamètre des pores de la membrane ne permettant la sortie que des molécules <25 kDa telles que les ions citrates, le pH des suspensions après dialyse est remonté jusqu'à environ 5. Cependant, une analyse DLS/ELS des nanosuspensions testées montre que le ZP n'est que peu modifié par la purification (Tableau 7). De plus, une augmentation de la taille est observée, probablement due au gonflement du nanogel dans le milieu de force ionique moindre.

Tableau 7 - Caractéristiques des nanoparticules de CS/HA/TPP non dialysées (ND) et dialysées(D) n = 3

	D_H (nm)	**PdI**	**ZP (mV)**
Avant dialyse	230 ± 18	0,17 ± 0,01	47 ± 3
Après dialyse	279 ± 35	0,25 ± 0,02	34 ± 1

1.3. Conclusion

L'augmentation de la concentration en polyanions a été envisagée pour augmenter le nombre de groupements négatifs à mettre en vis-à-vis des groupements amines du chitosane et ainsi inverser la charge de surface des nanoparticules élaborées. Cependant, le pH de la phase polycationique doit être suffisamment bas pour permettre la solubilisation du chitosane, ce qui implique une protonation partielle des groupements carboxylates de l'HA. De plus, le domaine de formation des nanoparticules avec notre formulation est limité à un rapport n+/n- strictement supérieur à 1. Ces deux limites, combinées à un équilibre très précis entre les charges des polymères lors du processus de gélification ionique, explique en partie les résultats.

Pour s'affranchir de certaines de ces limites, l'utilisation d'une autre formulation, utilisant un autre polymère ayant des propriétés similaires à l'HA a été envisagée.

2. Nanoparticules de CS et ChS

Pour obtenir des nanoparticules biocompatibles, utilisables en santé humaine et encapsulant des agents de contraste de façon efficace, il est possible d'utiliser des biopolymères de charges opposées pour créer des complexes polyélectrolytiques de type nanogels. Dans cette étude, l'objectif est de voir si l'utilisation de chitosane et de chondroïtine sulfate permet d'obtenir des formulations répondant à ces différents critères. La chondroïtine sulfate (ChS) est un polymère naturel, possédant des propriétés similaires à l'HA notamment en termes d'hygroscopie, de biocompatibilité et de biodégradabilité. C'est un polymère présent naturellement dans l'organisme, principalement au niveau des articulations où il joue le rôle de lubrifiant. Bien qu'il possède une activité thérapeutique et doive donc être utilisé avec précaution, notamment dans le cadre d'une supplémentation par voie orale (235), il reste un excellent modèle de polyanion non synthétique. La présence de groupements carboxylates sur ce polymère lui permet en outre de former des liaisons électrostatiques avec un polycation. Par ailleurs, son utilisation en association avec le chitosane pour la formation de nanoparticules est déjà bien documentée (19,236–239). Ce chapitre a ainsi pour objet d'optimiser la formulation de nanogels de chitosane et de chondroïtine sulfate par gélification ionique pour permettre l'encapsulation d'agents de contraste pour l'IRM.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Matériels

Le chitosane utilisé provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Il est extrait de carapaces de crevettes, sa masse molaire est de 56 kDa avec un degré de déacétylation de 86%, déterminé par spectrométrie NMRD 1H NMRD (224). La chondroïtine sulfate provient de chez Acros Organics (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Sa masse molaire est estimée à 543 kDa (mesure

réalisée par chromatographie d'exclusion stérique dans un milieu composé d'un mélange eau/DMSO en proportions 80/20 water/DMSO). Le HGdDOTA a été préparé au laboratoire selon la synthèse décrite dans une publication antérieure (220). L'eau utilisée pour toutes les expérimentations est de l'eau ppi (Laboratoire Aguettant, Lyon, France). Le sérum fœtal bovin et le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) proviennent de chez Gibco (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).Tous les autres réactifs sont utilisés sans purification supplémentaire.

2.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/ChS

Les nanoparticules de CS/ChS sont préparées par gélification ionique en s'inspirant des travaux de l'équipe du Dr. Rezazadeh (47). Comme dans le cas des nanoparticules de CS/HA/TPP, le procédé fait intervenir deux solutions. La phase polycationique est obtenue par dissolution du chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique (0,2 M) à la concentration de 0,5 mg/mL. Après dissolution, la solution peut être centrifugée à 4000 rpm pendant 4 minutes pour éliminer les résidus insolubles.

La phase polyanionique est obtenue par dissolution de chondroïtine sulfate à la concentration de 1 mg/mL dans de l'eau ppi.
Le procédé se déroule en deux étapes comme illustré à la figure 32.

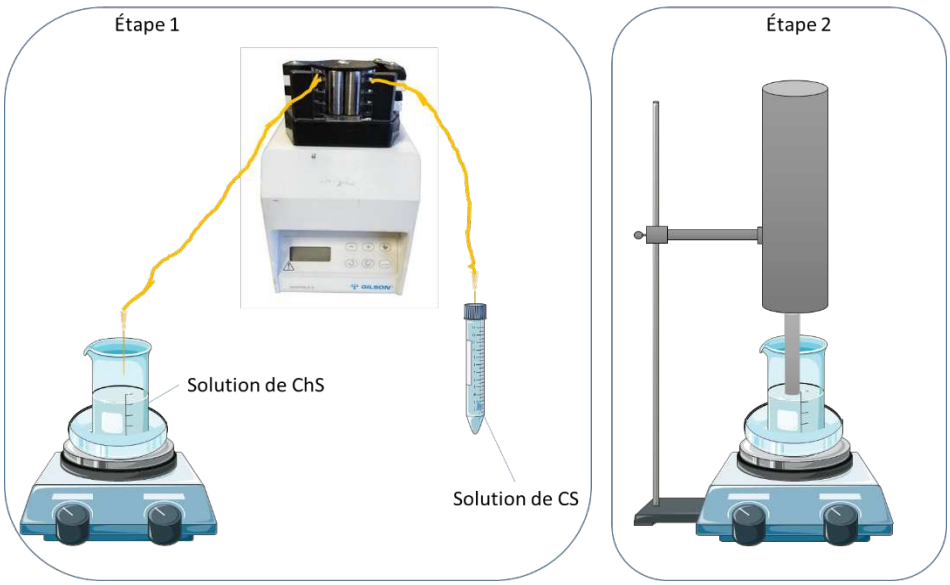

Figure 32 - Schéma représentant le montage expérimental utilisé pour la production des nanoparticules de CS/ChS.

Dans la première étape, 9 mL de la phase polycationique sont ajoutés au goutte à goutte, grâce à une pompe péristaltique (typiquement, débit à 3,6 mL/min) à 13,5 mL de la phase polyanionique sous agitation magnétique à 1200 rpm. Dans la seconde étape, la nanosuspension est soumise à des ultrasons à l'aide d'une sonde plongeante (sonicateur Vibra CellTM, Bioblock, 750 W, amplitude 40%) pendant 0, 1 ou 5 minutes, puis à une étape de stabilisation de 10 minutes sous agitation magnétique. Les deux étapes sont réalisées dans un bain de glace pour dissiper la chaleur créée par les ultrasons.

Les nanoparticules de CS/ChS encapsulant le complexe de gadolinium sont obtenues par le même protocole que précédemment, après dissolution (pendant 1h30) de HGdDOTA soit dans la phase polycationique, soit dans la phase polyanionique, pour atteindre une concentration finale de complexe de 1,3 mg/mL. Les nanoparticules obtenues sont appelées CS-HGdDOTA/ChS NPs et CS/ChS-HGdDOTA NPs, respectivement.
Pour retirer l'excédent d'acide et éliminer l'agent de contraste non encapsulé, la nanosuspension peut être dialysée contre de l'eau (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h. On utilise alors un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa.

2.1.3. Caractérisation des nanoparticules de CS/ChS par DLS/ELS

Le diamètre hydrodynamique moyen (D_H) et l'indice de polydispersité (PdI) des nanoparticules sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière grâce à un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Chaque échantillon est analysé 3 fois à 20°C, avec un angle de 173°, après une dilution au 1/20ème dans l'eau ppi, milieu qui sert également de référence.
Le potentiel zêta est déterminé par diffusion électrophorétique de la lumière, sur la même dilution de l'échantillon, avec un voltage de 150 mV. L'instrument est calibré avec un standard à -68 mV de chez Malvern avant chaque cycle d'analyse.

2.1.4. Caractérisation par AFM

Afin d'observer la morphologie des nanoparticules, les formulations les plus prometteuses sont analysées par microscopie de force atomique (Catalyst, Bruker Fast Scan) en mode PFT avec une sonde MSNL-E. Les échantillons sont préparés par dépôt d'une goutte de nanosuspension à la surface d'une feuille de mica, goutte qui est rincée à l'eau après adsorption des particules sur le support. Travailler en milieu liquide permet de conserver l'intégrité des structures gélifiées. Les images en AFM sont générées en utilisant une fréquence de balayage de 1 Hz et 512 lignes par images. Les expérimentations sont réalisées à température ambiante. Un aplanissement (flatening) est systématiquement exécuté sur les images pour réduire l'effet de pente à l'arrière-plan. Toutes les images sont traitées par le logiciel Gwyddion.

2.1.5. Détermination du rendement de production des nanoparticules

Le rendement de production est évalué de façon gravimétrique. Pour cela, un volume déterminé de la nanosuspension est centrifugé à 23200 g pendant 1h15 à 4°C (centrifugeuse Beckman AvantiTM J-E, France). Le surnageant, contenant les polymères non engagés dans le réseau et le milieu d'élaboration, est éliminé. La masse des culots est déterminée par pesée après séchage à l'air pendant au minimum 48h. Cette masse est ensuite rapportée à la masse des polymères introduits au début de la formulation pour obtenir le rendement de production grâce à l'équation suivante :

$$Rendement\ (\%) = \frac{Masse\ des\ culots}{Masse\ polymères\ introduits} \times 100$$

2.1.6. Cinétique de libération

Afin d'établir la cinétique de libération du complexe de gadolinium encapsulé dans les nanogels formés, ceux-ci sont mis en suspension, par dilution au quart de la formulation initiale, dans du tampon phosphate pH 7,4 pour simuler un milieu physiologique. Les milieux de libération sont maintenus à 37°C. A intervalles de temps

déterminés, un volume du milieu de libération est prélevé et centrifugé à 23200 g pendant 1h15 à 4°C (centrifugeuse Beckman AvantiTM J-E, France). Le culot de chaque échantillon est séparé du surnageant et la concentration en gadolinium est déterminée par dosage ICP-OES. Pour cela, les culots comme les surnageants sont incubés une nuit à 37°C dans un mélange en proportions 1:3 (v:v) de HCl (37 %) et HNO_3 (69 %) pour détruire toute matière organique présente dans l'échantillon. Des dilutions volumétriques sont ensuite effectuées pour obtenir des concentrations adaptées à la plage de travail de la méthode de l'appareil (spectromètre Thermo Scientic iCAP 6300 Duo ICP). Les résultats sont corrélés à une droite d'étallonage obtenue par mélange de $Gd(NO_3)_3$ avec des nanoparticules non chargées, dans les mêmes conditions acides.

2.1.7. Détermination de la composition chimique et de l'organisation de la surface des nanoparticules par XPS

Afin d'analyser la composition chimique de l'extrême surface des nanogels préparés, des analyses XPS sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Kratos Axis Ultra (Kratos Analytical, Royaume-Uni) équipé d'une source de rayons X monochromatique en aluminium (10 mA ; 15 kV) et d'un détecteur à huit canaux. Les photoélectrons sont collectés perpendiculairement à la surface de l'échantillon. La stabilisation de la charge est obtenue grâce à une source d'électrons (courant de filament réglé à 1,9 A, polarisation à −1,1 eV). Les échantillons sont fixés au support à l'aide de ruban adhésif double-face. La pression dans la chambre d'analyse est d'environ 10^{-6} Pa.
Deux types d'échantillons sont préparés pour chaque formulation : d'une part, la nanosuspension brute lyophilisée contenant à la fois les nanoparticules et le milieu d'élaboration (polymères libres, sels, agent de contraste non encapsulé), et d'autre part, le culot de nanoparticules obtenu après séparation et élimination du surnageant, représentant ainsi les nanoparticules dépourvues du milieu d'élaboration. Les résultats sont comparés aux spectres XPS obtenus pour les polymères purs constitutifs des nanogels et servant de référence.

2.1.8. Évaluation de la biocompatibilité des formulations

Les études *in vitro* sont réalisées sur deux lignées cellulaires obtenues à partir de l'ATCC (American Type Culture Collection) : la lignée RAW 264.7 qui est un modèle de macrophages murins et la lignée SVEC4-10 qui est une lignée de cellules endothéliales murines immortalisées (simian virus endothelial cell).
Les cellules RAW 264.7 et SVEC4-10 sont entretenues dans un milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium). Le milieu de culture est supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptmoycine, amphotéricine). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide (HR 95%) avec 5% de CO_2.
L'activité métabolique est mesurée par l'essai au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) selon les instructions du concepteur (240).
Les cellules sont d'abord incubées pendant 24 ou 48h en présence de dilutions des suspensions de nanoparticules. Après incubation, le milieu de culture est retiré et chaque puits est alors rincé avec 100 µL de PBS. Ensuite, les cellules sont incubées en présence de 150 µL de MTT (1 µg/mL) pendant 2 heures. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans de l'isopropanol et la densité optique mesurée à 595 nm à l'aide d'un TECAN GENios Multireader (241).

Afin d'évaluer la toxicité propre des nanogels, les cellules sont également exposées aux particules ne contenant pas de gadolinium. Les suspensions sans Gd sont utilisées à des dilutions équivalentes à celles contenant du Gd afin qu'il y ait la même quantité de particules vis-à-vis des celulles. Un contrôle cellulaire sans nanoparticules est aussi réalisé pour chaque lignée.

Le niveau de libération de lactate deshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture cellulaire est évalué en utilisant un test *in vitro* (TOX7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,USA) selon le protocole fourni par le fabricant. De façon succincte, un volume de 50 µL de surnageant de chaque puits est traité avec 100 µL de réactif (contenant un cofacteur, le substrat et un colorant) et incubé à température ambiante pendant 30 minutes. La réaction est stoppée par l'ajout de HCl 1M et l'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm en utilisant le lecteur de microplaques FlexStation 3 Multi-Mode (Molecular Devices LLC, San Jose, CA, États-Unis).

2.1.9. Détermination du profil NMRD des nanosuspensions

Les profils NMRD sont mesurés sur un relaxomètre RMN à cycle de champ rapide Stelar Spinmaster FFC (Stelar, Mede, Pavia, Italy) sur une gamme de champs magnétiques allant de 0,24mT à 0,7T correspondant à des fréquences des protons de Larmor de 0,01 à 30 MHz. La température est maintenue constante à 37°C. Une mesure supplémentaire à 60 MHz a pu être obtenue grâce à un spectromètre Minispec mq60 (Bruker, Karlsruhe, Germany). La contribution diamagnétique des nanoparticules non chargées en Gd est mesurée et soustraite à la vitesse de relaxation des nanoparticules chargées en gadolinium.

2.1.10. Images IRM

Les images par résonance magnétique des nanosuspensions sont réalisées sur un appareil IRM 3T (Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) avec une antenne 15 canaux pour genoux. Les images pondérées en T_1 sont obtenues avec une séquence T_1 3D fast spin-echo (TR = 700 ms, TE = 12 ms, FOV = 201 x 201 mm, matrix 256 x 256, voxel size = 0,78 x 0,78 x 2 mm). Les images pondérées en T_2 sont obtenues avec une séquence T_2 3D fast spin-echo (TR = 1000 ms, TE = 103 ms, FOV = 199 x 199 mm, matrix = 384 x 384, voxel size = 0,52 x 0,52 x 0,55 mm). Les nanosuspensions sont imagées à différentes concentrations, correspondant à 25, 50, 100 et 200 µM en Gd. Le point zéro correspond aux nanogels ne contenant pas de Gd. La même gamme de concentration en Gd est préparée à partir du Dotarem®, pour comparaison. L'eau pure sert de référence.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Optimisation de la formulation

Les travaux du Dr. Rezazadeh (49) ont permis de mettre au point une formulation de nanoparticules préparées à partir de chitosane (CS) et de chondroïtine sulfate (ChS) encapsulant de la rosuvastatine. Ces particules présentent des tailles compatibles avec une administration par voie parentérale de l'ordre de 230 nm et un potentiel zêta d'environ -25 mV. Le protocole utilisé par cette équipe a donc servi de point de départ

et, sur la base de ce qui a été observé dans la partie précédente, les paramètres clés susceptibles d'être optimisés pour obtenir une formulation correspondant à nos objectifs ont été identifiés. Parmi ces paramètres, il a été déterminé que :

- le rapport entre la masse de polymère cationique (CS) et la masse du polymère anionique (ChS),
- le pH de la phase cationique,
- le débit de la pompe contrôlant l'ajout de la phase anionique dans la phase cationique,
- la vitesse d'agitation au cours du mélange des phases,
- et la durée de sonication après le mélange des phases

pouvaient avoir un impact important sur les caractéristiques des nanoparticules formées.

De nombreuses combinaisons entre ces différents paramètres ont été réalisées. Les résultats complets sont présentés dans le tableau en annexe 1. Afin de mettre en évidence le rôle de chacun, les résultats sont regroupés par paramètre dans les paragraphes qui suivent.

2.2.1.1 Influence du rapport des masses de polymères, par variation des volumes

Dans ces essais, deux rapports $masse\ polycation/masse\ polyanion$ ont été testés en modifiant le volume de la phase polyanionique. Les paramètres utilisés sont indiqués dans le tableau 8.

Tableau 8 – Paramètres de formulation utilisés pour tester l'impact du rapport m_{CS}/m_{ChS} sur la formation de nanoparticules de CS/ChS

[CS] (mg/mL)	V_{CS} (mL)	[ChS] (mg/mL)	V_{ChS} (mL)	Rapport m_{CS}/m_{Chs}
0,5	9	1	4,5	1:1
0,5	9	1	13,5	1:3

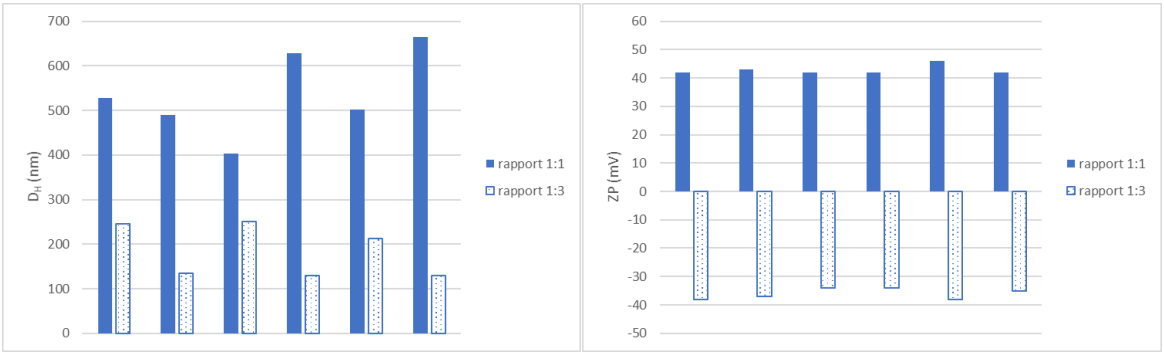

Figure 33 - Influence du rapport m_{CS}/m_{ChS} sur les diamètres hydrodynamiques moyens et les potentiels zêta des nanoparticules de CS/ChS mesurés par DLS/ELS. Les autres conditions opératoires (pH, agitation, sonication…) des différents échantillons peuvent varier (se reporter à l'annexe 1).

La figure 33 a pour but de présenter la tendance générale observée quand on passe d'un rapport de 1 à un rapport de 1 pour 3, tous échantillons confondus, quels que soient les autres paramètres utilisés pour le pH, l'agitation, etc. Le détail des conditions opératoires pour chaque lot est indiqué en annexe. En observant la figure, on note une grande influence du rapport m_{CS}/m_{ChS} sur la taille moyenne des objets créés ainsi que sur les potentiels zêta. Systématiquement, les nanoparticules produites avec m_{CS}/m_{ChS} =1/3 ont des tailles comprises entre 130 et 250 nm, alors qu'avec m_{CS}/m_{ChS} =1 elles sont toujours supérieures à 400 nm. Parallèlement, la valeur du ZP est directement corrélée à ce rapport, les nanoparticules étant toujours positives pour un rapport 1 : 1, et toujours négatives pour un rapport 1 :3. Lorsque les masses de chitosane et de chondroïtine sont équivalentes, la charge de surface des nanoparticules est de l'ordre de +45 mV. Lorsque le rapport des masses est en faveur de la chondroïtine, une inversion des charges est observée et les nanoparticules présentent alors des ZP avoisinant -35 mV. L'augmentation de la quantité de polyanion dans le mélange permet d'expliquer partiellement ce phénomène. Cependant, il a été montré dans le chapitre précédent que cette condition seule n'était pas suffisante pour obtenir des nanoparticules négatives. Une estimation de la balance entre les charges positives du chitosane et les charges négatives de la chondroïtine, en fonction du pH a donc été réalisée.

2.2.1.2 Influence du pH de la phase polycationique

Le protocole utilisé pour obtenir ces nanosuspensions fait intervenir une solution aqueuse d'acide acétique à 0,2 M pour dissoudre le chitosane. Après dissolution du

polymère à une concentration de 0,5 mg/mL, le pH de cette solution est évalué à environ 3. Pour tester l'influence du pH, certaines solutions de chitosane sont additionnées de NaOH 0,5 M jusqu'à obtenir un pH de 4. La caractérisation par DLS/ELS des nanoparticules obtenues après gélification ionique avec la chondroïtine donne les résultats présentés à la figure 34.

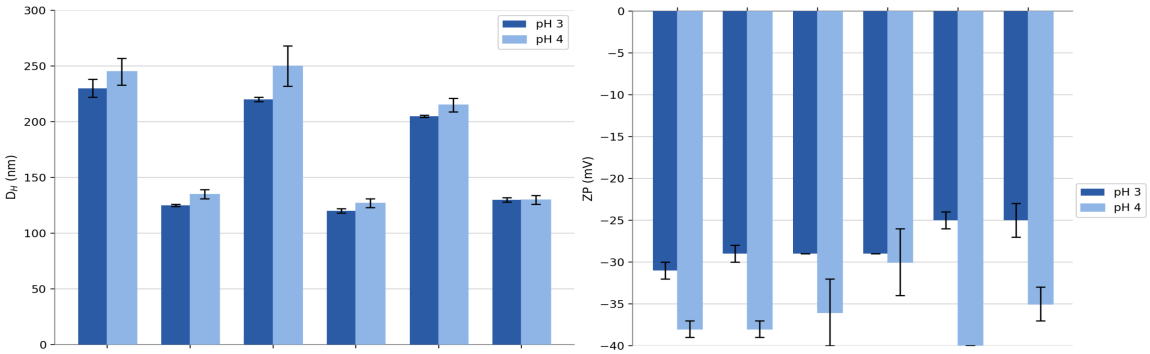

Figure 34 - Influence du pH de la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques moyens et les potentiels zêta des nanoparticules de CS/ChS mesurés par DLS/ELS. Pour tous les échantillons, le rapport m_{CS}/m_{ChS} vaut 1/3. Les autres conditions opératoires (agitation, sonication…) des différents échantillons peuvent varier (se reporter à l'annexe 1).

Les diamètres hydrodynamiques moyens ne sont que peu influencés par la valeur de pH imposée à la solution de chitosane. Par contre, on observe un effet plus important du pH sur les valeurs des potentiels zêta des nanoparticules produites. En effet, lorsque la phase polycationique est ajustée à 4, les charges de surface se situent aux environs de -35 mV alors que, lorsque la solution est à pH 3, elles sont comprises entre -25 et -30 mV. Pour comprendre ce phénomène, il faut regarder les pKa des polymères composant les nanoparticules (Figure 35). Le pKa du chitosane est considéré comme étant de 6,5 (242). A pH 3, comme à pH 4, les fonctions amines sont donc majoritairement protonées. Concernant la chondroïtine sulfate, deux fonctions sont déprotonables donnant des carboxylates (pKa ~3,5) et des sulfates (pKa~2,6)(243–245). Les valeurs des pKa et les valeurs des pH testés sont très proches et il parait impossible de calculer avec précision un nombre de charges portées par la ChS. On peut toutefois dire qu'à pH 4, il est probable qu'il y ait davantage de charges négatives qu'à pH 3. Ainsi, cela permet de comprendre pourquoi les ZP des nanoparticules sont plus électronégatifs à pH 4 qu'à pH 3.

La répulsion électrostatique induite par ces charges de surface élevées est connue pour être un facteur clé de la stabilité des nanosuspensions dans le temps, en limitant les interactions et donc les phénomènes d'agrégation entre nanoparticules.

Cependant les indices de polydispersité des nanosuspensions produites dans ces conditions opératoires sont relativement élevés (0,25-0,3). C'est pourquoi l'optimisation de la formulation a été poursuivie.

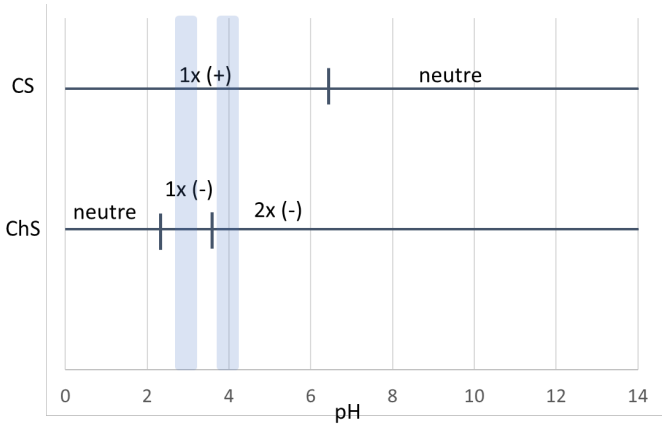

Figure 35 - Charges portées par les constituants des nanoparticules en fonction du pH.

2.2.1.3 Influence de la vitesse d'ajout de la phase ChS

L'utilisation d'une pompe péristaltique permet de standardiser l'étape d'ajout de la phase ChS dans la phase CS. Comme la formation des nanoparticules à partir des polymères peut dépendre de la cinétique de diffusion d'une phase dans une autre, l'impact du débit de pompe est étudié sur la base des paramètres décrits au tableau 9.

Tableau 9 - Paramètres de formulation utilisés pour tester l'influence du débit de la pompe péristaltique

[CS] mg/mL	**[ChS] mg/mL**	**pH**	**Rapport m_{CS}/m_{ChS}**	**Débit pompe (mL/min)**
0,5	1	4	1:3	2,6
0,5	1	4	1:3	2,8
0,5	1	4	1:3	3,6

La vitesse d'ajout de la phase ChS dans la phase CS semble jouer un rôle sur le diamètre des nanoparticules. Les diamètres moyens sont en effet de 267, 261 et 246 pour un débit de 2,6, 2,8 et 3,6 mL/min, respectivement. Il y a donc une légère

diminution de la taille des nanoparticules lorsque le débit augmente. En revanche, on n'observe aucun impact significatif sur le PdI et le potentiel zêta (Tableau 10).

Tableau 10 - Influence de la vitesse d'ajout de la phase ChS dans la phase CS sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS n = 3

Débit (mL/min)	**2,6**	**2,8**	**3,6**
D_H (nm)	267 ± 25	261 ± 19	246 ± 24
PdI	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,07	0,3 ± 0,07
ZP (mV)	-35 ± 3	-36 ± 2	-37 ± 1

Pour la suite des expérimentations, un débit de 3,6 mL/min sera systématiquement utilisé.

2.2.1.4 Influence de la vitesse d'agitation et du temps de sonication

Pour poursuivre l'optimisation de la formulation des nanoparticules de CS/ChS, la variation de deux paramètres supplémentaires est étudiée. Tout d'abord, l'effet d'une agitation magnétique durant l'ajout de la phase ChS dans la phase CS est évalué. Pour cela, un barreau aimanté est placé dans la solution de CS et une agitation à 1200 rpm est maintenue pendant la durée du mélange. Parallèlement, l'impact d'un temps de sonication après le mélange des phases est testé avec 3 condtions : 0, ce qui signifie qu'aucune sonication n'est réalisée, 1 minute ou 5 minutes. La sonication est réalisée à l'aide d'une sonde plongeante (puissance 40%). Les paramètres utilisés pour ces essais sont reportés dans le tableau 11

Tableau 11 - Paramètres de formulation utilisés pour tester l'influence du débit de l'agitation et de la sonication

Rapport m_{CS}/m_{ChS}	pH	Agitation (rpm)	Sonication (min)
1:3	4	0	0
1:3	4	0	1
1:3	4	0	5
1:3	4	1200	0
1:3	4	1200	1
1:3	4	1200	5

Les nanosuspensions obtenues sont analysées par DLS/ELS. Les résultats sont compilés dans le tableau 12. On peut noter tout d'abord que dans toutes les conditions testées, des nanoparticules ont pu être obtenues, sans floculation des polymères.

Tableau 12 - Influence du temps de sonication et de la vitesse d'agitation sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS. n = 9

	Sonication 0		Sonication 1 min		Sonication 5min	
	Agitation 0	Agitation 1200 rpm	Agitation 0	Agitation 1200 rpm	Agitation 0	Agitation 1200 rpm
D_H (nm)	246 ± 12	135 ± 4	250 ± 18	129 ± 4	213 ± 6	130 ± 2
PdI	0,3 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,3 ± 0,08	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,16 ± 0,01
ZP (mV)	-38 ± 1	-37 ± 1	-34 ± 4	-34 ± 4	-38 ± 0	-35 ± 2

On remarque également que l'agitation et la sonication ont un effet positif sur la diminution des tailles et des PdI des nanosuspensions obtenues. Les nanoparticules élaborées sans agitation possèdent un diamètre hydrodynamique compris entre 210 et 250 nm alors que les nanoparticules élaborées sous agitation à 1200 rpm présentent un diamètre d'environ 130 nm. L'agitation magnétique pendant le mélange des phases semble être un paramètre particulièrement impactant pour la diminution du diamètre des nanoparticules. Ce phénomène a déjà été observé dans d'autres études de formulation de nanogels, en particulier avec le chitosane (246). En effet, l'agitation de la suspension pendant la diffusion de la phase ChS dans la phase CS évite l'accumulation des polymères dans le milieu d'élaboration et permet au processus de gélification ionique de se dérouler de façon homogène et uniforme. En ce qui concerne

la sonication, il y a relativement peu d'impact sur les diamètres hydrodynamiques des particules. L'amélioration est cependant notable au niveau des PdI puisque la polydispersité passe d'environ 0,3 quand il n'y a pas de sonication à 0,16 quand la nanosuspension est soumise à 5 minutes d'ultrasons. L'énergie fournie par les ultrasons est connue pour provoquer, par effet de cavitation, une dispersion des particules en suspension (247). En séparant les agrégats, la sonication permet de réduire la polydispersité des particules obtenues par gélification ionique entre la ChS et le CS. Ces observations confirment celles de la formulation de CS/HA/TPP développée au laboratoire. Les nanoparticules de CS/HA/TPP, élaborées sans agitation magnétique et avec une sonication d'une minute, présentent une taille et un indice de polydispersité du même ordre de grandeur que celles des nanoparticules de CS/ChS préparées dans les mêmes conditions.

Cette similarité de paramètres structuraux entre ces deux formulations distinctes renforce l'hypothèse selon laquelle ces deux paramètres exercent une influence importante sur les caractéristiques physico-chimiques des nano-objets obtenus. L'application d'une sonication de cinq minutes, combinée à une agitation magnétique de 1200 rpm lors de l'étape de gélification ionique a permis de diviser par deux l'indice de polydispersité et de réduire d'environ 100 nm le diamètre hydrodynamique des nanoparticules de CS/ChS.

Ces expériences mettent également en évidence qu'il n'y a pas de modification notable du ZP, qui reste bien négatif et permet d'assurer la stabilité des suspensions par répulsion électrostatique entre les particules, quels que soient la méthode d'agitation et le temps de sonication employés.

2.2.1.5 Évaluation du rendement de production de la formulation

Pour évaluer le rendement de production de la formulation optimisée, 3 lots de nanoparticules sont préparés. Après séparation du surnageant par centrifugation et séchage des culots, les masses de nanoparticules sont rapportées aux masses de polymères introduites dans le milieu réactionnel. Les résultats montrent des

rendements de 54%, 60% et 65% pour chacun des 3 lots, soit une moyenne d'environ 60%.
Bien qu'indicative et sans conséquence sur les propriétés des objets créés, cette valeur permet de valider le procédé mis au point.

Ainsi, à l'issue de cette phase exploratoire, la formulation optimisée fait intervenir les paramètres suivants :

- Rapport masse CS/masse ChS : 1/3
- pH : ajusté à 4
- débit de la pompe : 3,6 mL/min
- agitation magnétique : 1200 rpm
- sonication après la synthèse : 5 min

2.2.2. Préparation et caractérisation des nanoparticules de CS/ChS encapsulant des complexes de gadolinium

L'objectif du travail est d'encapsuler un agent de contraste pour l'IRM afin d'améliorer les propriétés contrastophores de celui-ci. Le HGdDOTA, qui est la substance active du Dotarem®, le principal agent de contraste utilisé en milieu hospitalier, est utilisé avec la formulation optimisée retenue précédemment.
Il est dissout soit dans la phase polycationique, soit dans la phase polyanionique avant le mélange permettant l'élaboration des nanoparticules. Les NPs sont appelées CS+HGdDOTA/ChS lorsque l'AC est introduit *via* la solution de CS et CS/ChS+HGdDOTA lorsque l'AC est introduit *via* la solution de ChS. Sur la base d'essais antérieurs réalisés au laboratoire, une masse de HGdDOTA de 30 mg est utilisée pour ces manipulations.
Dans les deux cas, des nanoparticules sont obtenues, ce qui prouve que la présence du chélate de gadolinium n'empêche pas la formation d'un réseau entre les polymères. Cependant, la caractérisation des nanoparticules par DLS/ELS montre qu'une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules produites est systématiquement observée en présence de l'agent de contraste (Tableau 13).

Tableau 13 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP. n = 3

Nanoparticules	CS/ChS	CS+HGdDOTA/ChS	CS/ChS+HGdDOTA
D_H (nm)	132 ± 5	203 ± 10	320 ± 13
PdI	0,18 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,26 ± 0,05
ZP (mV)	-25 ± 2	-22 ± 0,8	-21 ± 0,5
$[Gd]_{NPs}$ (M)	-	$6{,}29.10^{-5}$	$6{,}09.10^{-5}$

Cette augmentation des diamètres hydrodynamiques semble être provoquée par la présence de l'agent de contraste dans la formulation. La molécule HGdDOTA étant chargée négativement, sa présence pourrait masquer une partie des charges portées par les polymères. Les interactions entre le CS et la ChS étant de nature électrostatique, cet écrantage partiel par l'agent de contraste pourrait conduire à un réseau moins dense entre les polymères, et donc à des structures de plus grandes tailles. La différence entre les nanogels obtenus après dissolution du Gd-CA dans la phase polycationique et ceux obtenus par dissolution du Gd-CA dans la phase polyanionique confirme cette hypothèse : les NPs CS-HGdDOTA/ChS présentent un diamètre d'environ 200 nm alors que les NPs CS/ChS-HGdDOTA montrent un diamètre d'environ 320 nm. La solubilisation du complexe de gadolinium, chargé négativement à ce pH, en présence des chaînes de chitosane, peut entraîner une pré-structuration du polymère cationique, qui conduit à l'obtention de nanoparticules plus petites (248–250). Lorsque le complexe de gadolinium est dissout dans la phase polyanionique, une compétition peut avoir lieu entre les charges négatives de la ChS et du HGdDOTA vis-à-vis des amines protonées du chitosane lors de l'élaboration des nanoparticules, conduisant à des réseaux plus lâches et donc des objets plus gros. La validation de cette hypothèse nécessiterait une approche permettant de caractériser la distribution et l'organisation des polymères au sein des nanoparticules. Une stratégie expérimentale pertinente consisterait à fonctionnaliser les différents biopolymères avec des marqueurs distincts (sondes fluorescentes, ou radioactives) avant leur assemblage en nanoparticules.

Il est à noter que les charges de surface des nanoparticules encapsulant le Gd ne diffèrent pas notablement de celles des nanoparticules dites « blanches », c'est-à-dire

sans substance active encapsulée. Cette observation tend à prouver que celle-ci n'est pas adsorbée en surface mais bien encapsulée à l'intérieur du réseau des gels.

En ce qui concerne les quantités de HGdDOTA encapsulées, elles sont déterminées par ICP-OES après séparation des nanoparticules de leur milieu d'élaboration par ultracentrifugation. Des concentrations de l'ordre du micromolaire sont dosées au sein des nanogels, indiquant une bonne encapsulation pour cet agent de contraste. Une concentration en agent de contraste légèrement plus importante est déterminée au sein des CS-HGdDOTA/ChS confirmant l'hypothèse établie précédemment. De plus, les résultats sont du même ordre de grandeur que ceux de la formulation de CS/HA/TPP développée au laboratoire, bien que légèrement inférieurs. En effet, la concentration en gadolinium mesurée au sein des nanoparticules de CS/ChS s'élève à 6×10^{-5} M, tandis qu'elle atteint en moyenne 8×10^{-5} M pour les nanoparticules de CS/HA/TPP. Cette différence, bien que modérée, peut s'expliquer par une réticulation plus efficace au sein des nanoparticules de CS/HA/TPP. Dans cette formulation, le tripolyphosphate de sodium (TPP) agit comme agent réticulant ionique, conférant au réseau de polymères une structure plus compacte et dense, permettant ainsi une meilleure rétention du complexe de gadolinium encapsulé.
Tenant compte de l'ensemble de ces résultats, le complexe sera donc dissout dans la phase polycationique avant élaboration des nanoparticules pour la suite des expériences.

L'influence de la masse initiale d'agent de contraste sur la concentration encapsulée est étudiée. Des nanoparticules sont donc préparées avec une masse de 30 mg ou de 40 mg de HGdDOTA, dissoute dans la phase CS avant la formation des nanoparticules. Leur caractérisation par DLS/ELS ainsi que la quantification du Gd par ICP sont données dans le tableau 14.

Tableau 14 - Influence de la masse de HGdDOTA sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP.

Masse HGdDOTA	30 mg	40 mg
D_H (nm)	204	291
PdI	0,09	0,137
ZP (mV)	-21	-22
$[Gd]_{NPs}$ (M)	$6,29.10^{-5}$	$8,11.10^{-5}$

L'augmentation de la masse de HGdDOTA modifie légèrement les caractéristiques des nanoparticules. Une augmentation respective de la taille et du PdI de 204 nm à 291 nm et de 0,09 à 0,137 est observée lorsque 40 mg de complexe de gadolinium sont introduits initialement, comparés à 30 mg. L'augmentation de la masse initiale de HGdDOTA provoque bien une augmentation de la concentration en Gd dans les nanoparticules mais cela se fait au détriment de la taille des nanoparticules et de la monodispersité de l'échantillon. C'est pourquoi, sur la base d'un compromis, il a été choisi de travailler avec une masse d'agent de contraste plus faible (30 mg par lot de NPs) afin de conserver des formulations compatibles avec l'utilisation en santé humaine.

2.2.3. Évaluation de la cinétique de relargage des complexes de gadolinium encapsulés dans les nanoparticules de CS/ChS

Pour prédire le comportement des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS *in vivo*, un essai de libération *in vitro* de la substance active est réalisé en utilisant un tampon phosphate (pH 7,4) à 37°C pour mimer le milieu physiologique. Pour cela, les nanoparticules sont incubées dans le tampon puis, à intervalle de temps défini, un prélèvement du milieu est centrifugé pour doser le gadolinium restant dans les nanoparticules. Le profil de libération est ensuite établi pour faire figurer le pourcentage de libération en fonction du temps (Figure 36).

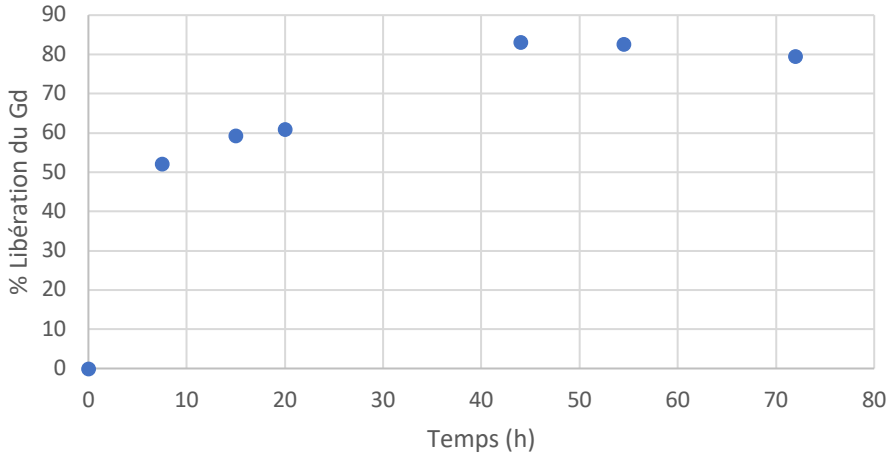

Figure 36 - Cinétique de libération du HGdDOTA à 37°C à partir des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS dans un tampon phosphate pH 7,4.

La cinétique de libération présente un profil bi-phasique. Une première phase de « burst-effect » est observée avec environ 50% de libération de l'agent de contraste au bout de 7,5 heures. Une phase de libération prolongée est ensuite observée avec 80% de l'agent de contraste libéré au bout de 44 heures. Ce profil bi-basique correspond au comportement typique d'une substance active relarguée d'une structure matricielle : en effet, dans un premier temps les molécules les plus proches de la surface sont relarguées rapidement dans le milieu de libération, puis les molécules plus au coeur des structures sont libérées progressivement soit sous l'effet d'une érosion de la matrice, soit par des mécanismes de diffusion liés à la loi de Fick (251). L'exploitation mathématique des profils n'a pas été poussée mais les résultats restent intéressants puisqu'ils montrent que la moitié du complexe de gadolinium est encore présent au sein des nanoparticules après 7,5 heures, ce qui est compatible avec la durée d'un examen en IRM. Cette cinétique bi-phasique est en accord avec les résultats obtenus avec les nanoparticules de CS/HA/TPP.

Afin de comprendre la nature des interactions entre le HGdDOTA et le réseau de polymères, cet essai est aussi réalisé dans un milieu NaCl à 0,9%. Cependant, la floculation des nanoparticules pendant l'essai a rendu impossible le dosage de l'agent de contraste. Ce point fera l'objet d'une étude complète dans la partie 3 de ce manuscrit.

2.2.4. Détermination de la composition chimique et de l'organisation de la surface des nanoparticules par XPS

Les analyses XPS ont été réalisées par le Dr. Pierre Eloy, sous la supervision du Pr. Christine Dupont-Gillain, de l'équipe Bio- and Soft Matter, Université catholique de Louvain (Belgique).

Afin d'élucider l'organisation de la surface des nanoparticules, une analyse par spectroscopie de photoélectrons à rayons X (XPS) est réalisée. Cette technique permet de déterminer la composition élémentaire de l'extrême surface des échantillons avec une profondeur d'analyse de 5 à 10 nm.
Deux types d'échantillons sont préparés pour chaque formulation : d'une part, la nanosuspension brute lyophilisée contenant à la fois les nanoparticules et leur milieu d'élaboration (polymères libres, sels, agent de contraste non encapsulé), et d'autre part, le culot de nanoparticules obtenu après ultracentrifugation et élimination du surnageant, représentant ainsi les nanoparticules dépourvues du milieu d'élaboration. Les résultats sont comparés aux spectres XPS obtenus pour les polymères purs constitutifs des nanogels qui servent de référence. Ils sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 – Composition chimique de surface (en pourcentage molaire) des nanoparticules de CS/ChS et CS-HGdDOTA/ChS déterminée par XPS. Les compositions des polymères seuls sont données pour comparaison.

	Na	O	N	C	S	Gd	P	Si
CS/ChS								
NS lyophilisée	6,6	41,2	3,4	47,7				0,3
Culot purifié		41,9	5,5	48,8				2,8
CS-HGdDOTA/ChS								
NS lyophilisée	5,2	36,5	6,9	49,3	1	0,68		
Culot purifié		39,2	5,4	48,5	1,4			5,5
CS		37,9	7,5	54,6				
ChS	3,2	45,16	3,2	45,16	3,2			

Les pourcentages d'azote, de carbone et d'oxygène mesurés dans les culots se situent entre les valeurs du chitosane pur et de la chondroïtine sulfate pure, semblant indiquer que la surface des nanoparticules est constituée d'un mélange des

deux polyélectrolytes. Cependant, l'analyse du culot purifié ne révèle aucun pic de soufre en surface, bien que cet élément soit caractéristique de la chondroïtine sulfate (3,2% théorique dans la ChS de référence). Les groupements sulfates s'orientent peut-être à l'intérieur de la nanoparticule expliquant l'absence de soufre à la surface.
Pour les nanoparticules CS-HGdDOTA/ChS, l'analyse du culot purifié met en évidence la présence de soufre (1,4% atomique), indiquant une exposition plus importante des groupements sulfates vers l'extérieur de la nanoparticule. Cette modification de l'architecture superficielle en présence du complexe de gadolinium conforte l'hypothèse de préstructuration des chaînes de chitosane par le HGdDOTA, émise précédemment lors des études d'encapsulation. La présence du complexe de gadolinium durant le processus même de gélification ionique semble modifier l'organisation des deux polyélectrolytes au sein des nanohydrogels, conduisant à une répartition différente des polymères entre le cœur et la surface des nanoparticules.
L'analyse comparative entre les échantillons lyophilisés et les culots purifiés apporte une preuve supplémentaire de l'encapsulation du complexe de gadolinium. Dans l'échantillon lyophilisé CS-HGdDOTA/ChS, le gadolinium est détecté à hauteur de 0,68 % mol. de la surface. En revanche, aucune trace de gadolinium n'est détectée en surface du culot des nanoparticules. Cette absence totale de Gd en surface des nanoparticules, alors que la quantification par ICP-OES confirme la présence de gadolinium dans l'échantillon global, démontre que le complexe de gadolinium est encapsulé au sein du réseau polymérique tridimensionnel des nanohydrogels et non adsorbé à leur surface. Le gadolinium détecté dans l'échantillon lyophilisé correspond donc au complexe libre présent dans le milieu d'élaboration.
Cette localisation préférentielle du HGdDOTA en profondeur du réseau polymérique est particulièrement favorable pour la stabilité du système, l'encapsulation assurant une rétention du complexe supérieure à une simple adsorption superficielle. Cette observation corrobore les profils de libération obtenus précédemment, notamment la libération prolongée du gadolinium à partir des nanohydrogels.
La comparaison entre échantillons lyophilisés et culots purifiés permet également d'identifier les éléments provenant du milieu d'élaboration. Le sodium (Na), détecté à des teneurs de 5,2 à 6,6% atomique dans les échantillons lyophilisés, est totalement absent des culots purifiés, confirmant qu'il provient exclusivement des sels présents en solution dans le milieu d'élaboration et non de la composition intrinsèque des nanoparticules.

La présence de silicium (Si) est observée dans tous les échantillons à des teneurs variables (0,3 à 5,5% atomique), avec des concentrations plus élevées dans les culots. Cette contamination provient du relargage de silice par les béchers en verre utilisés lors de l'étape de sonication. L'augmentation de la teneur en silicium dans les culots suggère une adsorption de la silice à la surface des nanoparticules. Cette information devra être prise en considération pour les utilisations potentielles des nanogels en santé.

2.2.5. Mesure de la relaxivité

L'efficacité des agents de contraste pour l'IRM est mesurée par la valeur de la relaxivité r_1, représentant l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau normalisée par la concentration de cet agent. Pour évaluer l'efficacité des systèmes nanoparticulaires, deux techniques sont utilisées : l'une permettant de mesurer pour différentes fréquences de Larmor la relaxivité associée et donnant ainsi accès aux profils de relaxivité, et l'autre utilisant les IRM médicaux pour observer le contraste généré par l'agent à base de Gd dans un environnement proche de la clinique.

2.2.5.1 Profil NMRD

Les mesures NMRD ont été réalisées par le Dr. Céline Hénoumont, sous la supervision du Pr. Sophie Laurent, de l'équipe General, Organic and Biomedical Chemistry Group, Université de Mons (Belgique).

Les relaxivités r_1 des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS sont déterminées sur une gamme de fréquence de 0,03 à 60 MHz. Cette gamme permet de couvrir les fréquences des principaux IRM médicaux utilisés à l'hôpital (252,253).
Pour chaque fréquence d'excitation appliquée, le complexe de gadolinium encapsulé dans les nanoparticules présente une meilleure relaxivité que le complexe de gadolinium libre (Figure 37). De plus, la valeur de relaxivité r_1 à 60 MHz est de 20,2 $s^{-1}.mM^{-1}$ pour le complexe dans les nanoparticules, ce qui est 7 fois plus important que la valeur à la même fréquence du complexe libre. Sachant que les champs magnétiques des IRM médicales fonctionnent autour de 20 à 60 MHz, ces résultats

sont très prometteurs pour une future application médicale. Ces résultats suivent la même dynamique que ceux observés avec les nanoparticules de CS/HA/TPP (222). On observe une augmentation de la relaxivité du complexe de gadolinium encapsulé comparativement à sa forme libre, avec un pic d'exaltation aux alentours de 60 MHz. Dans les deux formulations, l'augmentation constatée de la relaxivité du complexe encapsulé s'explique par la propriété des nanoparticules. Le fait de confiner l'agent de contraste dans un environnement fortement aqueux, combiné avec une forte concentration locale au sein du réseau nanoparticulaire conduit à une exaltation du signal (254).

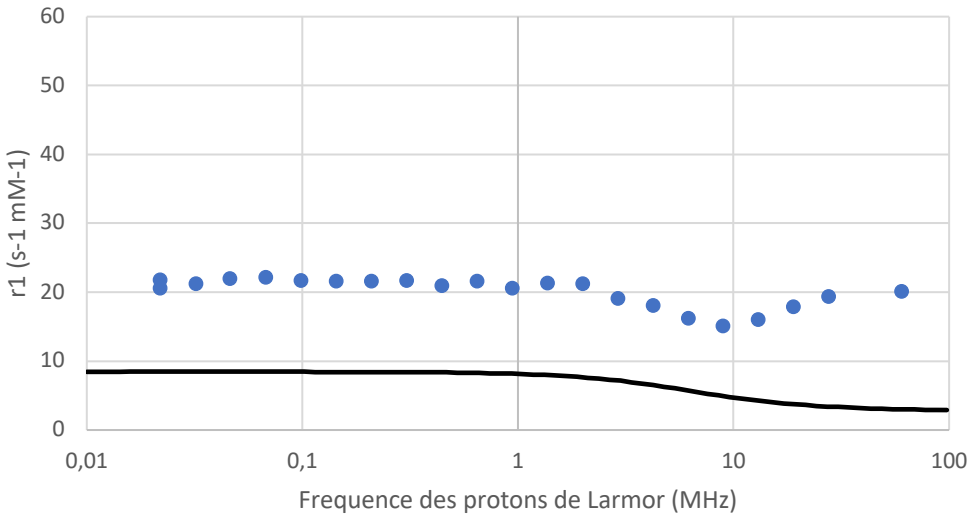

Figure 37 - Profil NMRD des nanoparticules CS+HGdDOTA/ChS (•) et du HGdDOTA libre (ligne peine)

2.2.5.2 Imagerie par résonance magnétique

Les images IRM ont été acquises par le Dr. Christophe Portefaix du Pôle d'Imagerie, au Centre Hospitalier Universitaire de Reims.

Pour confirmer cette augmentation de relaxivité de la formulation, les nanoparticules sont soumises à un champ magnétique de 3T en utilisant un appareil à IRM médical et des images pondérées en T_1 ont été acquises. De l'eau et une solution commerciale de Dotarem® sont utilisées comme contrôle. L'image présentée à la figure 38 (A) montre que, pour chaque concentration en gadolinium testée (25, 50, 100 et 200 µM), les puits contenant les nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS sont plus lumineux que

ceux contenant de l'eau. Comme attendu, l'intensité lumineuse est la même pour tous les puits contenant de l'eau. Pour quantifier plus précisément cette augmentation, les valeurs de l'intensité lumineuse des ROI (Region of Interest) sont déterminées et mises en graphique en fonction de la concentration en Gd (Figure 38 (B)). On note une augmentation d'un facteur 2 de la luminosité avec les nanoparticules CS-HGdDOTA/ChS comparée à celle du Dotarem®, confirmant que l'encapsulation de l'agent de contraste permettrait de diminuer les doses à injecter pour avoir une efficacité équivalente sur les clichés et donc pour le diagnostic. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres systèmes nanoparticulaires encapsulant des agents de contraste (220,222,223,255).

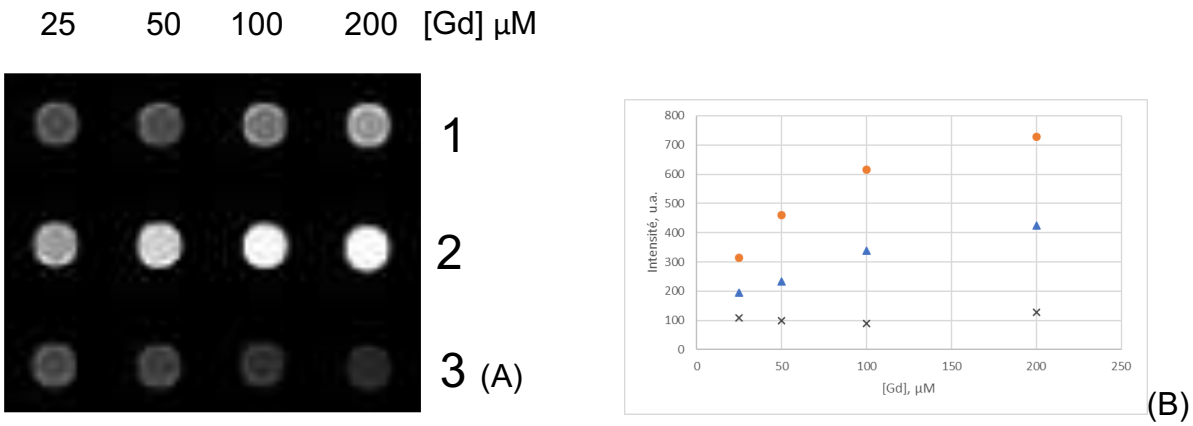

Figure 38 – (A) Images T_1 en IRM du Dotarem® (ligne 1) et des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS (ligne 2) en fonction de la concentration en Gd, et de l'eau (ligne 3). (B) Intensités lumineuses déterminées d'après les ROI de l'image T_1 du Dotarem ® (triangles) et des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS (cercles) en fonction de la concentration en Gd et valeurs de la ligne de l'eau (croix).

2.2.6. Essai de biocompatibilité

Ces expérimentations ont été initiées lors d'un séjour d'une semaine au sein du Department of Biochemistry and Molecular Biology de la Faculté de Biologie de Bucarest (Roumanie) en novembre 2021, dans le cadre d'une mobilité financée par le programme PHC Brancusi, en collaboration avec le Dr. Sorina Voicu et le Pr. Anca Dinischiotu. Par la suite, Sorina a réalisé l'ensemble des manipulations.

Avant d'envisager toute utilisation *in vivo*, des tests d'innocuité *in vitro* sur lignées cellulaires doivent être réalisés.

La biocompatibilité des nanoparticules est évaluée par un test au MTT, suivi d'un dosage de la libération de LDH, en utilisant les lignées cellulaires RAW 264.7 et SVEC4-10. Ces deux lignées sont sélectionnées car elles constituent des modèles cellulaires représentatifs permettant d'extrapoler les résultats de biocompatibilité à d'autres types tissulaires. Un échantillon est considéré comme biocompatible lorsque les expérimentations démontrent que l'activité métabolique des cellules est supérieure à 70% comparé au temoin. Néanmoins, des mécanismes adaptatifs cellulaires peuvent masquer une cytotoxicité réelle en compensant partiellement la mort cellulaire, conduisant potentiellement à une surestimation de la biocompatibilité. Afin d'identifier ces biais expérimentaux, un test complémentaire de libération de LDH a été réalisé. La LDH étant une enzyme cytoplasmique, son relargage dans le milieu de culture témoigne d'une altération de l'intégrité membranaire cellulaire, permettant ainsi de détecter une cytotoxicité que le test MTT aurait pu sous-estimer. Pour ces tests, le groupe contrôle est composé de lignées cellulaires non incubées avec les nanoparticules.

Pour les cellules SVEC 4-10, l'activité métabolique mesurée au MTT ne descend pas en dessous de 95% même après 48h d'incubation à la concentration la plus forte en nanoparticules (100 μg/mL). Ce résultat indique une bonne activité métabolique, qui est confirmée par l'essai de libération de LDH. En effet, il n'est observé aucune augmentation importante de libération de LDH même à la concentration la plus forte (Figure 39).

En ce qui concerne les cellules RAW 264.7, le test au MTT présente des résultats similaires à ceux des cellules précédentes, on observe seulement une légère diminution de l'activité métabolique à 90%, pour les concentrations en nanoparticules de 50 et 100 μg/mL (Figure 40). L'essai de libération de LDH montre seulement une petite augmentation de libération de l'ordre de 20% pour l'incubation des cellules avec 100 μg/mL de nanoparticules pendant 48h. Cette tendance peut suggérer une légère destruction cellulaire au contact des plus fortes concentrations en nanoparticules mais ne remettant pas en cause la biocompatibilité des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS. Cependant ce phénomène n'étant pas observé avec les nanoparticules de CS/HA/TPP (256), il serait alors nécessaire de rééditer ces expérimentations pour exclure un biais de manipulation.

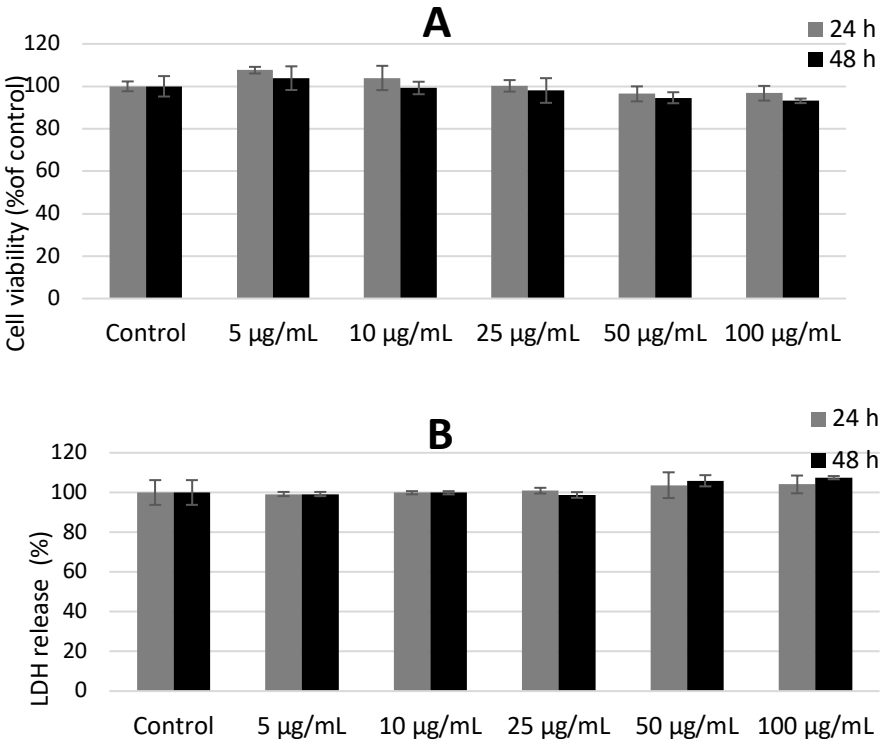

Figure 39 – Viabilité des cellules SVEC 4-10 évalué par un test au MTT (A) et un essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de CS+HGdDOTA/ChS.

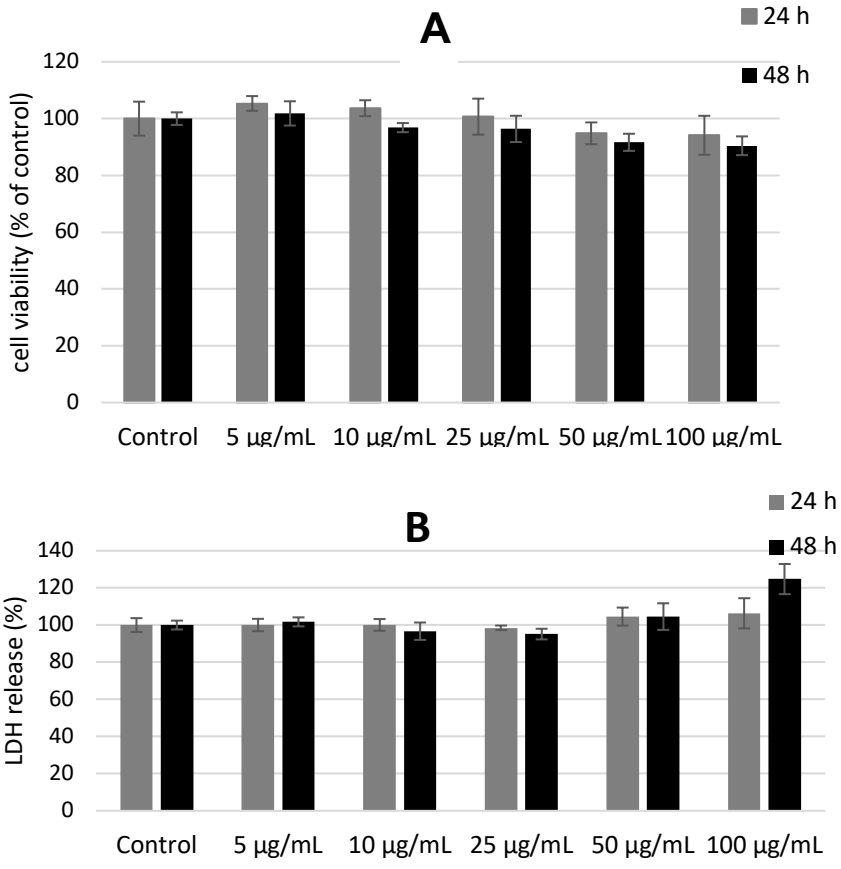

Figure 40 - Viabilité des cellules RAW 264.7 évaluée par un test au MTT (A) et un essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de CS+HGdDOTA/ChS.

2.3. Conclusion

Une nouvelle formulation de nanohydrogels a été obtenue grâce à une technique de gélification ionique entre deux polymères hydrophiles, biocompatibles et biodégradables. Les charges négatives des chaînes de chondroïtine sulfate, en interagissant avec les charges positives du chitosane, ont permis la formation de complexes polyélectrolytiques de taille nanométrique.

Le contrôle du rapport de masse et des méthodes d'agitation des solutions des deux polymères a permis d'obtenir des nanoparticules de taille inférieure à 200 nm, permettant d'envisager différentes voies d'administration (notamment parentérale). Les paramètres définis après optimisation de la formulation conduisent à l'obtention de nanoparticules avec des charges de surface négatives, ce qui permet d'envisager une bonne mobilité du site d'injection, ainsi qu'une légère furtivité des nanoparticules. Les nanogels formés ont montré une bonne capacité d'encapsulation du HGdDOTA, la substance active injectée pour améliorer la qualité des images lors des examens IRM. L'encapsulation de l'agent de contraste s'est avérée sans impact sur la formulation. Une libération lente de la substance active *in vitro* a été démontrée, ainsi qu'une bonne activité métabolique après contact avec les nanogels, démontrant leur biocompatibilité. L'efficacité de l'agent de contraste encapsulé, exprimée en termes de relaxivité, est conservée dans toutes les gammes de fréquences testées, et même augmentée d'un facteur 7 dans la zone de fréquence des IRM médicaux.
Même si cette formulation semble très prometteuse, certains paramètres peuvent néanmoins être optimisés. Bien que la concentration en HGdDOTA au sein des nanoparticules permettent une augmentation de la relaxivité et une forte exaltation du contraste en IRM, le taux d'encapsulation de la SA pourrait être amélioré, afin de réduire encore les doses à injecter. Le renforcement du réseau constitutif des nanoparticules, permettant une meilleure rétention de la SA et une meilleure stabilité dans les milieux physiologiques, fait partie des pistes à explorer. Ce point fera l'objet d'un chapitre ultérieur.

3. Nanoparticules de CS et HA

À la suite des difficultés rencontrées lors des tentatives d'inversion de charge des nanoparticules de CS/HA/TPP, l'expérience acquise avec la formulation de CS/ChS s'avère particulièrement instructive et ouvre de nouvelles perspectives de développement. L'obtention de nanoparticules de CS/ChS, caractérisées notamment par un potentiel zêta négatif, a permis d'identifier les paramètres critiques de formulation. Ainsi, il apparait pertinent d'explorer une nouvelle approche pour obtenir des nanoparticules de CS/HA à potentiel zêta négatif. Cette stratégie vise à enrichir notre panel de formulations disponibles et à établir des comparaisons permettant de d'analyser plus finement l'influence des différents facteurs de formulations ou encore des différents milieux de stabilité sur les nanoparticules, pour en améliorer la compréhension. Par ailleurs, cette approche comparative permettra d'évaluer l'impact spécifique de la nature des polymères et des stratégies de réticulation sur l'efficacité d'encapsulation des substances actives ainsi que sur les performances globales des nano-objets obtenus.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Matériels

Le chitosane utilisé provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Il est extrait de carapaces de crevettes, sa masse molaire est de 56kDa avec un degré de déacétylation de 86%, déterminé par spectrométrie NMRD ^{1}H NMRD (230).
L'acide hyaluronique de masse molaire moyenne de 1000 kDa provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Pour certaines expériences, des polymères de masses molaires inférieures sont utilisés : deux HA de masses molaires de 800 et 50 kDa de chez Lifecore (Chaska, Minnesota, USA), et deux HA de masses molaires de 200 et 35 kDa de chez Solliance (Pomacle, France). Le tripolyphosphate de sodium provient de chez Acros Organics (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Le HGdDOTA a été synthétise comme décrit dans une publication antérieure (222). L'eau utilisée pour la synthèse des nanoparticules et pour les autres expérimentations est systématiquement de l'eau ppi (Laboratoire Aguettant, Lyon,

France). Les autres produits utilisés sont de grade analytique, utilisés sans purification supplémentaire.

3.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/HA

3.1.2.1 Protocole inspiré des nanoparticules de CS/HA/TPP

Les nanoparticules sont élaborées en s'inspirant du protocole CS/HA/TPP déjà décrit précédemment, avec certaines modifications. Concrètement, la phase polycationique est obtenue par dissolution de chitosane dans une solution aqueuse d'acide citrique à 5% à la concentration de 2,5 mg/L. Pour certaines expérimentations, la concentration pourra être modifiée et sera précisée dans le texte, et de la soude à 0,5M pourra être ajoutée pour ajuster le pH. Après dissolution, il est possible d'observer la présence de résidus insolubles. Ceux-ci sont éliminés par centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes. La phase polyanionique est obtenue par dissolution d'acide hyaluronique à la concentration de 2,5 mg/mL.

Pour obtenir les nanoparticules, 4,5 mL de la phase polyanionique sont ajoutés à 9 mL de la phase polycationique au goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 3 mL/min sous sonication (750 W, amplitude 32%, Vibra Cell™, Bioblock). Afin d'empêcher un échauffement de la solution, on utilise un bain de glace fondante. A la fin de l'ajout, les ultrasons sont maintenus 30 sec, puis la suspension est agitée magnétiquement pendant 10 min pour assurer la stabilisation du système.

Pour retirer l'excédent d'acide, la nanosuspension peut être dialysée contre de l'eau (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h. On utilise alors un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa.

3.1.2.2 Protocole inspiré des nanoparticules de CS/ChS

Les nanoparticules sont élaborées en s'inspirant du protocole CS/ChS déjà décrit précédemment, avec certaines modifications. La phase polycationique est obtenue par dissolution du chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique (0,2 M) à la concentration de 0,5 mg/mL. De la soude 0,5M est utilisée pour ajuster le pH de la

phase polycationique. La solution peut être centrifugée à 4000 rpm pendant 4 minutes pour éliminer les résidus insolubles. La phase polyanionique est obtenue par dissolution d'acide hyaluronique la concentration de 1 mg/mL dans de l'eau ppi.
Dans la première étape, 9 mL de la phase polycationique sont ajoutés au goutte à goutte, grâce à une pompe péristaltique (typiquement, débit à 3,6 mL/min) à 13,5 mL de la phase polyanionique sous agitation magnétique à 1200 rpm. Dans la seconde étape, la nanosuspension est soumise à des ultrasons à l'aide d'une sonde plongeante (sonicateur Vibra CellTM, Bioblock, 750 W, amplitude 40%) 1 minute, puis à une étape de stabilisation de 10 minutes sous agitation magnétique. Les deux étapes sont réalisées dans un bain de glace pour dissiper la chaleur créée par les ultrasons.

3.1.3. Préparation des nanoparticules de CS/HA encapsulant le complexe de gadolinium

Les nanoparticules de CS/HA encapsulant le complexe de gadolinium sont obtenues par le même protocole que précédemment, après dissolution (pendant 1h30) de HGdDOTA soit dans la phase polycationique, soit dans la phase polyanionique, pour atteindre une concentration finale de complexe de 1,3 mg/mL. Les nanoparticules obtenues sont appelées CS-HGdDOTA/HA NPs et CS/HA-HGdDOTA NPs, respectivement.
Pour retirer l'excédent d'acide et éliminer l'agent de contraste non encapsulé, la nanosuspension peut être dialysée contre de l'eau (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h. On utilise alors un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa.

3.1.4. Caractérisation des nanoparticules de CS/HA par DLS/ELS

Le diamètre hydrodynamique moyen (D_H) et l'indice de polydispersité (PdI) des nanoparticules sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière grâce à un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Chaque échantillon est analysé 3 fois à 20°C, avec un angle de 173°, après une dilution au 1/20 dans l'eau ppi, milieu qui sert également de référence.

Le potentiel zêta est déterminé par diffusion électrophorétique de la lumière, sur la même dilution de l'échantillon, avec un voltage de 150 mV. L'instrument est calibré avec un standard à -68 mV de chez Malvern avant chaque cycle d'analyse

3.2. Résultats et discussion

Pour obtenir des nanoparticules composées de chitosane et d'acide hyaluronique, les deux formulations utilisées dans les chapitres précédents de ce travail ont été adaptées et un travail expérimental entrepris afin d'en optimiser les paramètres.

3.2.1. Transposition du protocole de la formulation de CS/HA/TPP

3.2.1.1 Suppression du TPP

Lors de l'étude menée sur les nanoparticules de CS/HA/TPP, une stratégie d'augmentation progressive des concentrations d'acide hyaluronique et de tripolyphosphate de sodium a été entreprise, dans le but d'obtenir une charge de surface négative. Bien que cette approche n'ait pas permis d'atteindre l'objectif fixé, la formulation présentée dans le tableau 16 révèle un potentiel zêta proche du point de bascule (Tableau 17).

Tableau 16 – Rappel de la formulation de nanoparticules de CS/HA/TPP la plus proche du point de bascule.

[CS] mg/mL	**[HA] mg/mL**	**[TPP] mg/mL**	**pH (phase chitosane)**
2,5	2,5	3,75	3

Tableau 17 - Rappel des paramètres de structure (Dh, PdI et ZP) de la formulation de CS/HA/TPP aux concentrations respectives de 2,5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 3,75 mg/mL

D_H (nm)	**PdI**	**ZP (mV)**
610	0,26	7

Cependant le TPP en forte concentration, pourrait être impliqué dans des processus de réticulation interparticulaire, ce qui pourrait déstabiliser la suspension. Cette

observation justifie la décision de supprimer le TPP de la formulation afin d'observer le comportement des nanoparticules de CS/HA et d'évaluer si cette modification permettrait d'atteindre l'inversion de charge souhaitée

Malheureusement, aucune nanoparticule n'a pu être obtenue dans les essais avec ces conditions de préparation. Le TPP, qui intervient comme agent réticulant du réseau de polymères, est indispensable dans les conditions de pH testées car il compense en partie le faible état d'ionisation de HA. C'est pourquoi l'augmentation du pH de la phase polycationique est envisagée en compensation.

3.2.1.2 Modification du pH de la phase polycationique

En modulant le pH de la phase polycationique, l'état d'ionisation des polymères dans la suspension finale va être modifié. Pour vérifier cette hypothèse, le pH a été ajusté à 3, 3,5, 4 ou 5 à l'aide de soude 0,5 M. Les résultats des analyses réalisées sur les suspensions obtenues sont donnés dans le tableau 18.

Tableau 18 - Influence du pH de la phase polycationique sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA, préparées selon le protocole des CS/HA/TPP, déterminés par DLS/ELS

pH phase polycationique	**3**	**3,5**	**4**	**5**
D_H (nm)	Agrégats	225	172	3642
PdI	Agrégats	0,25	0,29	1
ZP (mV)	Agrégats	-15	-14	-20

L'augmentation du pH de la phase polycationique de 3 à 3,5 permet d'obtenir des nanoparticules d'environ 225 nm présentant un potentiel zêta négatif de -15 mV, validant ainsi l'hypothèse de l'importance de l'état d'ionisation des polymères. En effet, en se rapprochant du pKa des fonctions acides carboxyliques (~3,5), le HA présente davantage de charges négatives, favorisant les interactions électrostatiques avec le CS. Une élévation du pH à 5 provoque une déstabilisation du système, à cause du début de déprotonation des fonctions amines du chitosane. La taille la plus favorable est atteinte à pH 4 avec des nanoparticules de 172 nm et un potentiel zêta de -14 mV, correspondant à un équilibre entre l'ionisation de l'acide hyaluronique et le maintien de la protonation des fonctions amines du chitosane. Bien que les valeurs modérées

du potentiel zêta obtenues (-14 et -15 mV) suggèrent une stabilité colloïdale limitée, cette formulation a été retenue pour la suite des expérimentations.

3.2.1.3 Encapsulation du complexe de gadolinium

L'essai d'encapsulation du complexe de gadolinium est mené en suivant les paramètres décrits dans le tableau 18.

Tableau 19 – Paramètres de formulation des nanoparticules CS/HA préparée à partir du protocole CS/HA/TPP pour l'encapsulation de HGdDOTA

[CS] mg/mL	**[HA] mg/mL**	**pH (phase chitosane)**
2,5	2,5	4

Comme pour les nanoparticules de CS/ChS, l'évaluation de l'encapsulation du complexe de HGdDOTA dans les nanoparticules de CS/HA est réalisée selon deux stratégies : soit une incorporation du complexe dans la phase polycationique (CS-HGdDOTA/HA), soit dans la phase polyanionique (CS/HA-HGdDOTA). Après formulation, les nanoparticules sont analysées par DLS/ELS. L'analyse des résultats (Tableau 20) révèle des comportements contrastés selon la phase dans laquelle le complexe de gadolinium est dissout préalablement à la synthèse des nanoparticules. Les nanoparticules de CS-HGdDOTA/HA présentent un diamètre de 172 nm, similaire aux nanoparticules blanches (172 nm), mais avec une amélioration du PdI (0,23 vs 0,3). Ce phénomène avait déjà été observé avec les nanoparticules de CS/ChS. Cette amélioration de PdI semble corroborer l'hypothèse émise précédemment d'une pré-organisation des chaînes de CS en présence de HGdDOTA.

En revanche, la formulation de CS/HA-HGdDOTA montre une augmentation significative du diamètre des nanoparticules (275 nm, +58%), accompagné d'une augmentation du PdI à 0,4, indiquant une hétérogénéité des nano-objets. Ici encore, les résultats sont semblables à ceux observés sur les nanoparticules de CS/ChS-HGdDOTA, renforçant l'hypothèse d'une compétition entre les charges négatives du polyanion et celles du complexe de gadolinium vis-à-vis des charges positives du chitosane. Cette compétition conduit à des réseaux plus lâches et donc des objets plus gros.

Tableau 20 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA non dialysées, déterminés par DLS/ELS

Nanoparticules	CS/HA	CS+HGdDOTA/HA	CS/HA+HGdDOTA
D_H (nm)	174	172	275
PdI	0,3	0,23	0,4
ZP (mV)	-9	-6	-6

Comme envisagé pour la formulation sans substance active, la stabilité colloïdale apparait cependant limitée. En effet, dans les heures qui suivent la synthèse, des agrégats macroscopiques sont observés, que ce soit pour la formulation brute ou la formulation dialysée. Cette instabilité colloïdale est liée principalement au potentiel zêta des nanoparticules dont la valeur absolue (-6 mV) ne permet pas de générer des forces de répulsion électrostatique suffisantes pour éviter la formation d'agrégats (257,258). Le pH ne pouvant plus être augmenté au-delà de 4 sous peine de perturber l'équilibre entre les charges positives et négatives, ce protocole a donc été abandonné.

3.2.2. Transposition du protocole de la formulation de CS/ChS

3.2.2.1 Premier essai de formulation

Le protocole optimisé pour la formulation des nanoparticules de CS/ChS a été adapté pour préparer des nanoparticules de CS/HA avec l'hypothèse que les résultats obtenus avec la chondroïtine sulfate soient transposables à l'acide hyaluronique.

Tableau 21 - Paramètres de formulation de la première formulation de CS/HA à partir du protocole de CS/ChS

[CS] mg/mL	[HA] mg/mL	pH	Rapport m_{CS}/m_{HA}	Vitesse pompe (mL/min)
0,5	1	4	1:3	3,6

En appliquant ces paramètres, une légère opalescence de la suspension est observée. La caractérisation des nanoparticules par DLS/ELS montre un diamètre d'environ 190 nm, un PdI de 0,08 et un potentiel zêta de -27 mV. Cependant, la valeur élevée de l'atténuateur (paramètre donnant une indication de la quantité de nanoparticules présentes dans un échantillon) ainsi que l'observation visuelle des échantillons

révélant un faible effet Tyndall, suggèrent une très faible concentration en nanoparticules dans la suspension. Ce phénomène contraste avec les résultats observés avec la ChS. Afin d'expliquer ces variations, la nature des polymères utilisés est analysée. Considérant que la masse molaire de l'acide hyaluronique utilisée (1000 kDa) est environ deux fois supérieure à celle de la chondroïtine sulfate (544 kDa), deux hypothèses principales peuvent être formulées pour expliquer la faible concentration en nanoparticules obtenue avec ce protocole. Premièrement, les chaines d'HA de haute masse molaire pourraient présenter un encombrement stérique défavorable, compromettant leur repliement et limitant ainsi les interactions électrostatiques nécessaires à la formation du réseau de polymère. Deuxièmement, la chondroïtine sulfate, portant deux charges négatives sur chaque unité constitutive, contre une seule pour l'acide hyaluronique, pourrait favoriser la formation de complexe polyélectrolytiques stables. Afin d'étudier ces hypothèses, des expérimentations utilisant des HA de masses molaires se rapprochant de celle de la ChS (544 kDa), sont réalisées.

3.2.2.2 Impact de la masse molaire de l'acide hyaluronique

L'influence de la masse moléculaire de l'acide hyaluronique sur la formulation des nanoparticules est étudiée dans l'objectif d'optimiser les paramètres de la formulation. L'hypothèse émise précédemment suggère qu'une variation de la taille des chaînes de HA pourrait influencer la taille des nanoparticules par leur capacité de repliement et d'interactions avec le CS pour former des nanoparticules.

Une gamme étendue de masses moléculaires d'acide hyaluronique est sélectionnée, couvrant un spectre de 35 à 1000 kDa (35, 50, 200, 800 et 1000 kDa), permettant ainsi d'explorer l'effet de ce paramètre sur les propriétés finales des nanoparticules de CS/HA. Les résultats sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22 - Influence de la masse molaire d'HA sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA non dialysées, déterminés par DLS/ELS. Les valeurs de l'atténuateur utilisé par l'appareil pour la mesure est un indicateur de la concentration en nanoparticules. n = 3

Masse molaire HA (kDa)	**1000**	**800**	**200**	**50**	**35**
D_H (nm)	177 ± 10	211 ± 19	250 ± 27	280 ± 30	335 ± 51
PdI	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,06
ZP (mV)	-23 ± 4	-24 ± 1,4	-25 ± 2	-16 ± 3	-11 ± 2
Atténuateur	9	7	8	11	11

L'étude montre que la diminution de la masse molaire de l'HA de 1000 à 35 kDa entraîne une augmentation progressive du diamètre des nanoparticules, passant de 177 nm pour l'HA à 1000 kDa à 335 nm pour l'HA à 35 kDa. Cette tendance s'accompagne aussi d'une dégradation du PdI qui évoluent de 0,11 à 0,12 pour les masses molaires élevées (800-1000 kDa) jusqu'à des valeurs de 0,4 à 0,5 pour les masses molaires faibles (50 – 35 kDa). Le potentiel zêta suit aussi cette tendance puisqu'il se situe aux alentours de -24 mV pour les HA supérieurs à 200 kDa, contre seulement -16 et -11 mV pour les HA inférieurs à 50 kDa. De plus, il semble y avoir un optimum de la masse molaire de HA sur la quantité de particules produites puisqu'à la fois l'observation visuelle mais aussi la valeur de l'atténuateur indique que davantage de nanoobjets sont mesurés dans le cas d'une MM de 800 kDa.

Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation inverse entre la masse molaire de HA et la taille des nanoparticules formées. Cela confirme une tendance observée dans la littérature (259). En effet, lorsque les chaînes de polymère sont courtes, la possibilité de former un réseau par interactions multiples entre les molécules est limitée. Quand la longueur des chaînes est très importante, alors il y a un encombrement stérique de ces grosses molécules qui empêche le repliement et les interactions avec le polymère partenaire. Il existe donc un optimum permettant à la fois une bonne cohésion du réseau *via* des interactions et un repliement maximal. Dans ces résultats la MM de HA optimale semble être de 800 kDa, ce qui la situe dans le même ordre de grandeur que celle de la ChS. Ce point intéressant ne peut cependant pas être généralisé puisque le pH, la présence d'autres crosslinkers, etc influent eux aussi sur ces mêmes propriétés.

3.2.2.3 Impact du pH de la phase polycationique

Comme pour les formulations précédentes, l'influence du pH de la phase polycationique sur les caractéristiques des nanoparticules est évaluée. Il est à noter que ces essais ont été faits avec le HA de 800 kDa. Les résultats figurent dans le tableau 23.

Tableau 23 - Influence du pH de la phase polycationique sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/HA, préparées selon le protocole des CS/HA/TPP, déterminés par DLS/ELS. n = 3

pH phase polycationique	3	4
D_H (nm)	Agrégats	211 ± 19
PdI	Agrégats	0,12 ± 0,02
ZP (mV)	Agrégats	-24 ± 1,4

Il n'a pas été possible de former des nanoparticules lorsque qu'un pH de 3 était imposé. Cette observation confirme que sans ajustement du pH de la phase polycationique à 4, les interactions électrostatiques entre le chitosane et l'HA sont insuffisantes pour générer un réseau de polymère stable. Au contraire, l'augmentation du pH favorise l'ionisation des groupements carboxylates de l'HA, renforçant ainsi les interactions électrostatiques avec les groupements $-NH_3^+$ du chitosane, conduisant à la formation d'une formulation stable et répondant aux critères fixés.

3.2.2.4 Essai d'encapsulation du complexe de gadolinium

L'évaluation de l'encapsulation du complexe HGdDOTA dans les nanoparticules de CS/HA est réalisée selon les deux stratégies suivantes : soit le complexe est préalablement dissout dans la phase polycationique (CS-HGdDOTA/HA), soit dans la phase polyanionique (CS/HA-HGdDOTA).

Dans les deux cas, des nanoparticules sont formées et les analyses par DLS/ELS des nanosuspensions donnent les résultats du tableau 24. Aucune différence significative n'est observée entre les deux modes d'introduction de l'agent de contraste et les caractéristiques des particules sont équivalentes à la formulation blanche en termes de D_H, de PdI ou de ZP.

Après centrifugation des nanosuspensions, les nanoparticules sont isolées et le gadolinium encapsulé dans les nanoparticules est dosé par ICP-OES. L'analyse des résultats révèle une concentration d'agent encapsulé de $1,97.10^{-5}$ M lorsqu'il est dissout au préalable dans la phase polycationique, et $3,99.10^{-5}$ M lorsqu'il est dissout au préalable dans la phase polyanionique. Ces valeurs sont inférieures à celles déterminées pour les nanoparticules de CS/ChS. Cependant, ces expériences n'ont pu être réalisées qu'une fois et mériteraient d'être confirmées.

Tableau 24 - Caractérisation des nanoparticules de CS-HGdDOTA/HA et CS/HA-HGdDOTA élaborées à partir du protocole CS/ChS

Nanoparticules	Blanches	CS+HGdDOTA/HA	CS/HA+HGdDOTA
D_H (nm)	238	210	228
PdI	0,09	0,08	0,09
ZP (mV)	-24	-22	-24
$[Gd]_{NPs}$ (M)	-	$1,97.10^{-5}$	$3,99.10^{-5}$

Conformément au protocole appliqué aux autres formulations, les nanoparticules CS/HA sont soumises à une étape de dialyse. Dès le premier cycle, la nanosuspension est déstabilisée. Il semble que les nanogels, insuffisamment réticulés, ne peuvent pas maintenir leur intégrité structurale face au changement de force ionique induit par l'afflux d'eau, conduisant à leur déstabilisation.

3.3. Conclusion

Deux stratégies distinctes ont été développées pour l'élaboration de nanoparticules de chitosane et d'acide hyaluronique à potentiel zêta négatif. La première approche, basée sur l'adaptation du protocole utilisé pour les nanoparticules CS/HA/TPP par suppression du tripolyphosphate, et la seconde, inspirée du protocole optimisé des nanoparticules CS/ChS.

La formulation à partir du premier protocole a permis d'entrevoir la possibilité d'obtenir des nanoparticules de CS/HA à charge de surface négative. L'optimisation du pH de la phase polycationique s'est révélée déterminante, définissant une fenêtre optimale pour la formation des nanoparticules (pH 4). Bien que des nanosystèmes d'environ 170 nm aient été obtenus, leur potentiel zêta (proche de 0 mV) compromet la stabilité

colloïdale. Cette voie de synthèse n'est donc pas envisageable pour répondre à notre cahier des charges.
La seconde approche s'est avérée plus prometteuse. L'adaptation du protocole utilisé pour la préparation des nanoparticules de CS/ChS a permis l'obtention de nanoparticules CS/HA d'environ 200 nm présentant un potentiel zêta d'environ -25 mV. Cette optimisation a révélé l'importance de la masse moléculaire de l'acide hyaluronique, établissant une corrélation inverse entre ce paramètre et les tailles des nanoparticules. La confirmation de l'effet du pH (échec systématique à pH 3 pour les deux formulations) a validé l'hypothèse d'un défaut de réticulation des systèmes CS/HA, empêchant la poursuite de l'étude de cette formulation.

L'objectif de ce chapitre était d'élaborer une formulation de nanoparticules à partir de CS et de HA à potentiel zêta négatif afin d'enrichir l'arsenal comparatif et d'approfondir à la fois, la compréhension du comportement des polymères des systèmes étudiés, et la capacité des polymères à former un réseau stable dans les conditions imposées par ce travail. Cette approche devait permettre d'établir des relations structure-propriétés entre les systèmes CS/HA/TPP, CS/ChS et CS/HA, offrant une vision globale des interactions chitosane-polyanion. Malgré les efforts d'optimisation déployés et les résultats encourageants obtenus en termes de caractéristiques physicochimiques, aucune formulation suffisamment stable permettant d'encapsuler le complexe de gadolinium n'a pu être développée, justifiant l'arrêt du développement de ces nanoparticules CS/HA.

Chapitre 3 : Stabilité des nanohydrogels dans les milieux physiologiques

Les travaux précédents ont permis de mettre au point deux formulations de nanoparticules prometteuses pour améliorer le diagnostic par imagerie par résonance magnétique. D'une part, une formulation à base de chitosane, d'acide hyaluronique et de tripolyphosphate de sodium (CS/HA/TPP) caractérisée par un potentiel zêta positif et des dimensions nanométriques compatibles avec une utilisation en santé humaine, développée antérieurement par notre équipe. D'autre part, une nouvelle formulation composée de chitosane et de chondroïtine sulfate (CS/ChS) présentant un potentiel zêta négatif et des propriétés dimensionnelles satisfaisantes, récemment optimisée dans le cadre de ces travaux.

Ces deux systèmes démontrent une bonne capacité d'encapsulation de complexes de gadolinium à des concentrations élevées, permettant une amélioration du contraste en IRM supérieure à celle des agents de contraste libres. Cette efficacité accrue, associée à leur biocompatibilité, confère à ces formulations un potentiel diagnostique considérable pour l'imagerie médicale.

L'approche développée pour la synthèse de ces nano-objects présente plusieurs avantages. Elle repose exclusivement sur des procédés en milieu aqueux, évitant l'utilisation de solvants organiques potentiellement toxiques. De plus, la formation des nanoparticules s'effectue uniquement par interactions électrostatiques entre les biopolymères, sans nécessiter d'agents de réticulation bifonctionnels. Cette stratégie de "chimie douce" garantit non seulement la préservation de l'intégrité des macromolécules constitutives, mais également la reproductibilité du processus de production.

Cependant, une préoccupation majeure subsiste concernant la stabilité de ces systèmes dans les milieux physiologiques. Les nanoparticules formées par interactions électrostatiques peuvent en effet voir leur intégrité compromise par les variations de pH, de force ionique et par la présence de protéines et d'autres macromolécules biologiques rencontrées *in vivo*. Cette instabilité potentielle pourrait affecter l'efficacité des formulations, ainsi que leur sécurité d'emploi.

Par conséquent, l'objectif de ce chapitre est double. Il s'agit premièrement d'évaluer le comportement de ces nano-objets dans des environnements simulant les conditions physiologiques, afin de prédire leur devenir *in vivo* et d'anticiper les mécanismes de dégradation potentiels. Les phénomènes impliqués dans la déstabilisation peuvent être liés soit à la dislocation des nanoparticules, soit à leur agrégation. Dans le premier cas, on observe une disparition des objets, alors que dans le deuxième on observe

une nette augmentation des tailles mesurées en DLS, voire une sédimentation visible à l'œil.

Deuxièmement, il convient de développer des stratégies de renforcement du réseau formé par les polymères constitutifs des nanoparticules, dans le but d'améliorer leur stabilité colloïdale, tout en préservant leurs propriétés d'encapsulation et d'efficacité en imagerie.

1. Stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologiques

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Préparation des nanoparticules

Les deux formulations utilisées pour cette étude sont celles décrites au chapitre 2 de ce manuscrit.

Pour rappel, en ce qui concerne les nanoparticules de CS/HA/TPP, la phase polycationique est réalisée par dissolution du chitosane dans une solution aqueuse d'acide citrique à 10% m/V à la concentration de 2,5 mg/mL. La phase polyanionique est obtenue par dissolution de l'acide hyaluronique et du tripolyphosphate de sodium, à la concentration respective de 0,8 mg/mL et 1,2 mg/mL dans l'eau ppi. Les nanoparticules sont obtenues après ajout de 4,5 mL de la phase polyanionique (débit de la pompe péristaltique 3 mL/min) à 9 mL de la phase polycationique sous ultrasons et dans un bain de glace fondante. Après l'arrêt des ultrasons, la nanosuspension est stabilisée par agitation magnétique pendant 10 minutes. Pour retirer l'excédent d'acide, la nanosuspension est dialysée contre de l'eau (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h grâce à un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa.

En ce qui concerne les nanoparticules de CS/ChS, pour rappel, la phase polycationique est réalisée par dissolution du chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique à 0,2 M à la concentration de 0,5 mg/mL. La phase polyanionique est obtenue par dissolution de chondroïtine sulfate à la concentration de 1 mg/mL dans

de l'eau ppi. Dans une première étape, 9 mL de la phase polycationique sont ajoutés au goutte à goutte à 13,5 mL de la phase polyanionique sous agitation magnétique à 1200 rpm. Dans la seconde étape, la nanosuspension est soumise à des ultrasons à l'aide d'une sonde plongeante pendant 5 minutes, puis à une étape de stabilisation de 10 minutes sous agitation magnétique. Les deux étapes sont réalisées dans un bain de glace pour dissiper la chaleur créée par les ultrasons.

1.1.2. Milieux utilisés pour mimés les conditions physiologiques

Pour évaluer la stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologiques, deux milieux mimant les conditions de salinité et de pH sont utilisés. Un tampon phosphate à pH 7,4 dont la composition est donnée dans le tableau 25, va permettre de mimer le pH physiologique de l'organisme.

Tableau 25 - Composition du tampon phosphate pH 7,4 utilisé pour les études de stabilité

Composant	Formule chimique	Quantité (g)
Phosphate monopotassique	KH_2PO_4	0,6
Phosphate disodique dodécahydraté	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	6,4
Chlorure de sodium	NaCl	5,85
Eau purifiée	H_2O	QSP 1L

Des solutions de NaCl de concentrations croissantes (0,4 – 0,6 – 0,9%) vont permettre d'étudier l'impact de la force ionique sur les nanoparticules. La force ionique est une mesure de la contribution totale des ions dans une solution. Elle reflète la somme des contributions de chaque ion, pondéré par le carré de leur charge. La charge ionique, *I*, d'une solution est calculée selon la formule suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i ci\ zi^2$$

ci = concentration de l'ion i (mol/L)

zi = charge de l'ion i

Pour l'expérimentation, chaque nanosuspension est diluée au demi avec des solutions salines doublement concentrées, ou avec l'eau ppi comme contrôle. Les forces ioniques appliquées aux nanoparticules sont donc les suivantes (Tableau 25) :

Tableau 26 - Valeurs des forces ioniques calculées pour les différents milieux

Milieu	Force ionique (mol/L)
Eau ppi	0
NaCl 0,4%	0,07
NaCl 0,6%	0,1
NaCl 0,9%	0,15
Tampon Phosphate	0,156

Les nanoparticules sont incubées pendant 15 min à température ambiante, sans agitation avant d'être analysées par DLS.

1.1.3. Analyse par DLS

Après 15 minutes de contact avec les milieux testés, les nanoparticules sont analysées par DLS (Nano ZS, Malvern) afin de vérifier l'évolution de leur taille et la polydispersité de la suspension. Il est à noter que les mesures de potentiel zêta ne sont possibles qu'avec des solutions peu chargées en ions. Les mesures reposent sur la mobilité électrophorétique des particules soumises à un champ électrique appliqué entre deux électrodes. Les forces ioniques élevées sont responsables d'un fort courant électrique dégageant une chaleur susceptible d'endommager les particules, et d'endommager également les électrodes de mesure (226). Ainsi, seuls les résultats des tailles et des polydispersités pourront être exploités.

1.1.4. Etude par AFM *in situ*

Dans le but de compléter les analyses par DLS par une visualisation directe de l'effet de la présence de NaCl sur les nanoparticules, une analyse par microscopie de force atomique est réalisée selon deux protocoles.
Le premier consiste à incuber les nanoparticules CS/ChS dans un milieu salin à 0,9% m/V, selon les conditions utilisées pour les tests de stabilité, puis à effectuer l'analyse

AFM après 15 minutes d'incubation afin d'observer les modifications morphologiques des nanoparticules. Le second protocole, plus dynamique, consiste à fixer les nanoparticules sur une surface de mica pour obtenir une première image qui sera utilisée comme référence. Le milieu d'observation est ensuite remplacé par une solution de NaCl à 0,9% de façon à pouvoir observer *in situ* les éventuels changements morphologiques par une nouvelle acquisition en AFM.
Les analyses sont réalisées sur un microscope Catalyst (Bruker Fast Scan) en mode PFT avec une sonde MSNL-E. Les images sont générées en utilisant une fréquence de balayage de 1 Hz et 512 lignes par images. Un aplanissement (flatening) est systématiquement exécuté sur les images pour réduire l'effet de pente à l'arrière-plan. Toutes les images sont traitées par le logiciel Gwyddion.

1.2. Résultats

1.2.1. Influence des milieux mimant les conditions physiologiques sur les paramètres par DLS

L'étude de la stabilité des nanoparticules dans des milieux mimant les conditions physiologiques permet d'évaluer leur potentiel en tant que vecteur de substance active pour des applications *in vivo.* Dans ce travail, elle est contrôlée à deux stades du protocole de fabrication des nanoparticules : après la synthèse, c'est-à-dire sur la nanosuspension brute non dialysée, et après la dialyse. La dialyse est utilisée pour éliminer l'excédent d'acide servant à la solubilisation du chitosane, et permet donc à la nanosuspension d'être à un pH compatible avec les applications en santé.

Les nanosuspensions sont mises en contact avec des solutions de concentrations croissantes en NaCl ou avec du tampon phosphate pendant 15 minutes. Elles sont ensuite analysées par DLS. Les résultats sont présentés dans le tableau 27.

Tableau 27 - Diamètres hydrodynamiques et indices de polydispersité obtenus par DLS sur les nanosuspensions de nanoparticules CS/HA/TPP non dialysées après incubation dans l'eau (contrôle), les solutions de NaCl ou le tampon phosphate.

	CS/HA/TPP				CS/ChS			
	Non dialysées		Dialysées		Non dialysées		Dialysées	
Milieu d'incubation	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI
Eau ppi	254	0,20	307	0,23	135	0,16	134	0,22
NaCl 0,4%	251	0,18	255	0,21	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats
NaCl 0,6%	269	0,18	253	0,18	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats
NaCl 0,9%	277	0,20	249	0,18	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats
Tampon phosphate	225	0,16	~ 10 000	0,6	349	0,18	~ 5700	0,70
Tampon phosphate J+3					441	0,21		

Concernant les nanoparticules de CS/HA/TPP non dialysées, les résultats montrent que les valeurs de diamètre et les indices de polydispersité des nanoparticules ne sont pas significativement différents du contrôle, quel que soit le milieu testé. Ces résultats, démontrant la stabilité des nanoparticules de CS/HA/TPP non dialysées à la fois dans les milieux salins et à pH physiologique, ne sont pas surprenants : le milieu de préparation des nanogels est très chargé en ions citrates et également très acide. La dilution au ½ dans les solutions de NaCl ou le tampon phosphate ne modifient que très peu à la fois la force ionique mais également le pH du milieu. Les nanoparticules étant stables dans leur milieu de synthèse, elles ne sont que peu affectées par le contact avec ces milieux physiologiques.

Les mesures montrent également que, quelle que soit la concentration en NaCl dans le milieu, les nanoparticules de CS/HA/TPP dialysées présentent des diamètres hydrodynamiques moyens d'environ 250 nm, ce qui correspond à ceux mesurés avant la dialyse, contre 307 nm pour les nanoparticules dialysées puis incubées dans l'eau. En présence de tampon phosphate pH 7,4 la suspension présente au contraire des agrégats macroscopiques qui sédimentent rapidement. On n'observe pas, dans les conditions testées, de disparition des nanoparticules, donc pas de dislocation.

Les nanoparticules de CS/ChS sont beaucoup moins affectées par la dialyse. Mises en présence de solutions de NaCl, une agrégation est systématiquement observée, quelle que soit la concentration utilisée. Dans le tampon phosphate à pH 7,4, une

stabilité partielle et temporaire est observée avant dialyse, mais qui n'est pas préservée après dialyse.

1.2.2. Observation *in situ* de l'instabilité des particules de CS/ChS dans le NaCl par AFM

Ce travail a été réalisé par l'équipe du Pr Michael Molinari, Institut de Chimie & Biologie des Membranes et des Nano-objets, de l'université de Bordeaux.

Afin de compléter les données concernant l'instabilité des nanoparticules de CS/ChS dans les milieux contenant du NaCl, une analyse par microscopie de force atomique (AFM) est effectuée. Deux protocoles différents sont utilisés. Le premier consiste à pré-incuber les nanoparticules pendant 15 minutes dans un milieu à 0,9% m/V de NaCl puis à effectuer une observation par AFM. Ce protocole correspond à l'expérience réalisée dans les essais de stabilité tels que décrits ci-dessus. Dans le second protocole, les nanoparticules sont d'abord imagées dans leur milieu d'élaboration après un simple contact avec la surface du mica pour obtenir une image de référence. Ensuite, le milieu d'analyse est remplacé par une solution de NaCl à 0,9% m/V et une nouvelle observation est réalisée de façon à observer *in situ* les éventuels changements morphologiques.
Les images obtenues en utilisant le premier protocole, c'est-à-dire en incubant les nanoparticules dans le NaCl avant l'analyse, montrent une surface très hétérogène avec des agrégats pouvant atteindre plusieurs micromètres de diamètre (Figure 41). Ces observations confirment ce qui avait été déterminé grâce aux analyses par DLS.

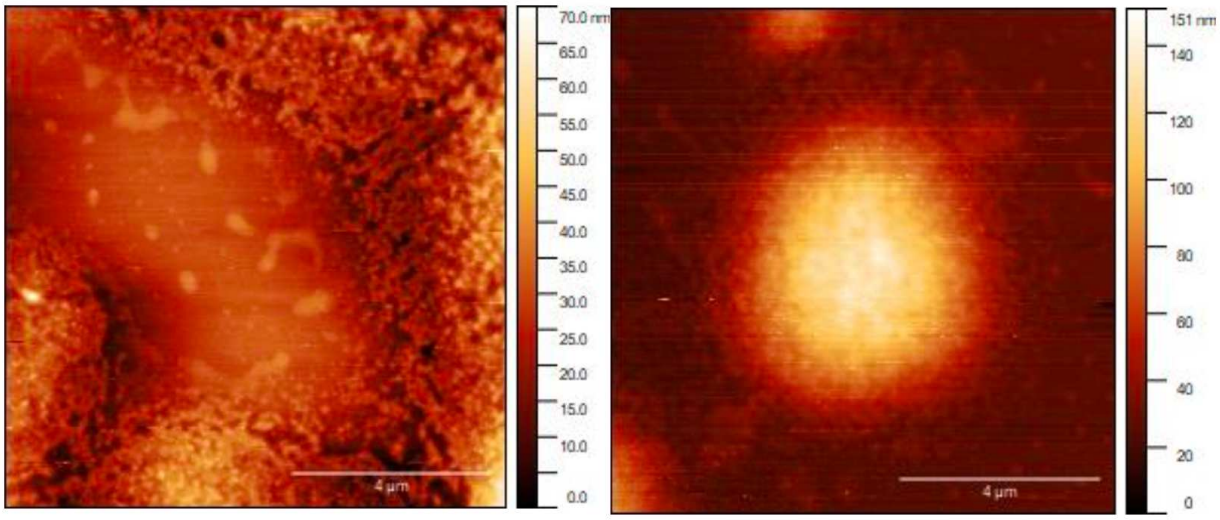

Figure 41 - Images topographiques des nanoparticules de CS/ChS incubées dans du NaCl à 0,9% m/V avant l'observation par AFM.

Lorsque les nanoparticules sont imagées dans leur milieu d'élaboration, on observe des objets sphériques, de tailles relativement homogènes et qui correspondent aux données obtenues par DLS (Figure 42). Sans changer de zone d'observation, le milieu est ensuite remplacé par du NaCl 0,9 % m/V et les nanoparticules sont à nouveau imagées. L'image obtenue après le changement de milieu est parfaitement identique à la première, indiquant que les nanoparticules ne sont individuellement pas affectées par la présence du NaCl.

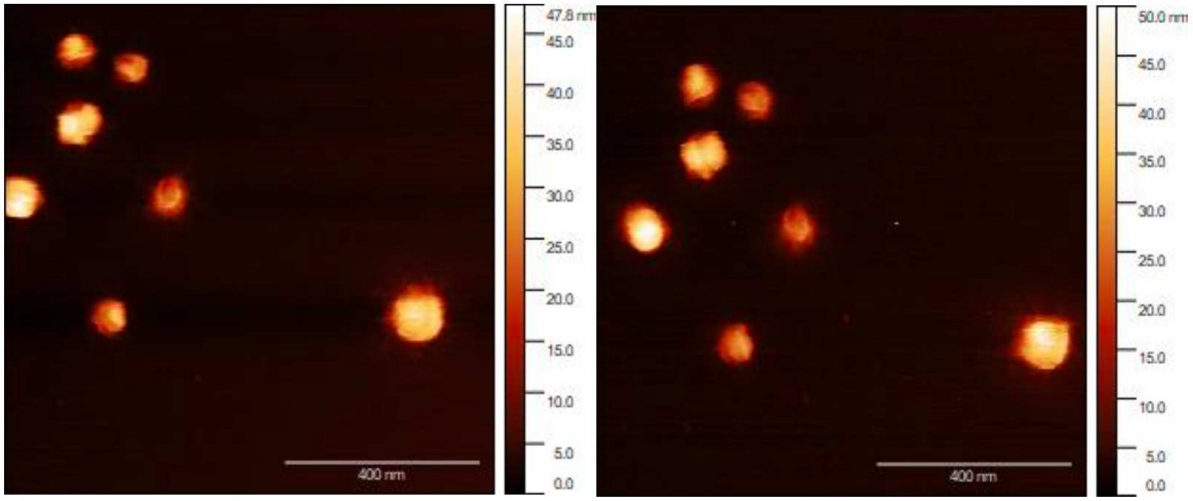

Figure 42 - Images obtenues par AFM des nanoparticules de CS/ChS dans leur milieu d'élaboration après adsorption sur le mica (image de gauche), puis après remplacement in situ du milieu par une solution de NaCl 0,9% m/V (image de droite).

Ces analyses semblent confirmer que les nanoparticules individuelles fixées sur un support conservent leur intégrité morphologique, sans dislocation, même au contact du milieu de force ionique élevée. Au contraire, lorsqu'elles sont mobiles dans le milieu liquide, les interactions avec les autres particules sont possibles et une agrégation est observée. Bien que ces observations apportent des informations importantes, on ne peut exclure que l'adsorption des particules sur les supports ne modifie leurs propriétés de rigidité ou la mobilité des chaines de polymère. C'est pourquoi d'autres expériences doivent être menées sur ces systèmes.

1.3. Comparaison des systèmes et interprétation des données

Dans le cas des nanoparticules de CS/HA/TPP, la dialyse a pour but d'éliminer les ions citrates présents dans la suspension après synthèse des nanoparticules. Lors des cycles de dialyse, les ions sortants sont remplacés par des molécules d'eau, ce qui a pour effet de diminuer la force ionique du milieu dans lequel sont dispersées les particules. Cela provoque un gonflement des nanogels, déjà observé lors d'études préalables (230). Malgré ce gonflement, les nanoparticules ne semblent pas ni s'agréger ni se disloquer dans le NaCl.

Il faut rappeler ici que les nanoparticules de CS/HA/TPP sont constituées d'un réseau de deux polymères de charges opposées renforcé par un crosslinker. Ce complexe polyélectrolytique semble suffisamment fort pour résister à une potentielle dislocation. De plus, le potentiel zêta de ces particules est d'environ +45 mV. Cette charge nette très élevée confère aux nanogels une forte répulsion électrostatique permettant de prévenir l'agrégation. Même l'écrantage des charges dû à la présence des sels n'est pas suffisant pour annuler cette répulsion. Ainsi, les particules sont stables dans les milieux de force ionique élevée.

Au cours de la dialyse, le pH de la suspension passe d'environ 1,8-2 à 3,5-4. Incuber la nanosuspension dialysée dans du tampon pH 7,4 implique de remonter le pH au-delà du pKa de la fonction amine du chitosane (environ 6,5), qui va alors se déprotoner. Dans ces conditions, l'instabilité des nanoparticules en présence de tampon phosphate peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

(i) La nanosuspension peut être déstabilisée car les molécules de chitosane qui n'ont pas réagi, mais restent présentes dans le milieu réactionnel à la fin

de la synthèse des nanoparticules, précipitent : en effet au-delà du pKa, le chitosane commence à se désolvater, passant d'une conformation en chaînes étendues à des chaînes enroulées (chain-to-coil transition) (232). Sa précipitation peut entraîner avec lui une partie des nanogels ;

(ii) Les groupements aminés présents en surface des nanoparticules perdent leurs charges positives et le potentiel zêta diminue voire s'approche alors du point isoélectrique des nanogels. La répulsion électrostatique n'est alors plus suffisante pour empêcher l'agrégation.

Les nanoparticules CS/ChS, quant à elles, présentent une forte instabilité en milieu NaCl. Celle-ci peut tout d'abord s'expliquer par l'augmentation de la force ionique et son impact sur les interactions électrostatiques de surface. Comme décrit précédemment pour les nanoparticules de CS/HA/TPP, l'élévation de la force ionique induit un écrantage progressif des charges de surface, réduisant ainsi la portée des répulsions électrostatiques. Lorsque l'écrantage devient suffisamment important, l'équilibre entre forces répulsives électrostatiques et forces attractives bascule en faveur de ces dernières, conduisant à l'agrégation des nanoparticules. Les nanoparticules de CS/ChS possèdent de plus un potentiel zêta autour de -20 à -25 mV, ce qui est plus faible en valeur absolue que celui des nanoparticules de CS/HA/TPP. L'écrantage pourrait donc être plus facile sur les NPs de CS/ChS, ce qui induirait une déstabilisation rapide dans les milieux NaCl. Par ailleurs, le chitosane est connu pour changer de conformation en présence de sels, passant d'une chaine étendue à une pelote statistique (chain-to-coil) (260,261). Ces changements peuvent perturber le réseau de polymère et provoquer une déstabilisation des nanoparticules.

En revanche, on observe une stabilité partielle, mais temporaire, en milieu tampon phosphate (349 nm vs 135 nm en eau, PdI stable à 0,18). L'évolution cinétique révèle une déstabilisation progressive : la taille continue d'augmenter pour atteindre 441 nm à J+3 (PdI 0,21), accompagnée de signes visuels comme une turbidité croissante et un début de sédimentation (Tableau 27). Cette stabilité initiale en tampon phosphate peut là encore s'expliquer par l'état de charge en surface des nanogels. Dans leur milieu de synthèse (pH~3), les nanoparticules présentent un ZP négatif (~-25 mV), caractéristique de la présence en surface d'une majorité de fonctions carboxylate ou sulfate déprotonnées. L'incubation dans le tampon phosphate va renforcer l'état

d'ionisation des groupements chimiques qui s'expriment en surface, c'est-à-dire majoritairement ceux de la chondroïtine sulfate, sans modifier le signe global de la charge des nanogels, et la déstabilisation sera donc moins importante que dans le cas des nanoparticules de CS/HA/TPP qui passe d'une charge globale positive dans la formulation à une charge nulle voire négative dans le tampon phosphate.

Par ailleurs, on ne peut à ce stade exclure une dislocation partielle des objets sous l'effet de la force ionique à la fois dans le NaCl et dans le tampon phosphate. En effet, il faut distinguer deux catégories de nanoparticules fabriquées à partir de polyélectrolytes. La première catégorie regroupe les systèmes formés par l'association d'un biopolymère avec une molécule réticulante (crosslinker). Ces formulations, largement répandues dans la littérature, incluent notamment les nanoparticules de chitosane réticulées par le tripolyphosphate de sodium (CS/TPP)(262,263), ainsi que d'autres systèmes similaires tels que les formulations de chitosane/adénosine phosphate (234,264). ou chitosane/fer (CS/Fe) (234,239,265). Dans ces architectures, la cohésion structurale repose principalement sur les interactions électrostatiques entre les chargés opposés du polymère et de l'agent réticulant, majoritairement, de faible poids moléculaire. Cette approche, bien que simple à mettre en œuvre, génère des réseaux dont la stabilité peut être compromise par les variations des conditions physico-chimiques du milieu environnant.
La seconde catégorie correspond aux réseaux de polymères interpénétrant (IPN, Interpenetrating Polymer Network), où la stabilité structurale résulte de l'enchevêtrement et de l'interpénétration de deux chaînes de polymères distincts (266). Ces systèmes présentent une architecture plus complexe, dans laquelle les interactions ne se limitent pas aux simples liaisons électrostatiques, mais impliquent un réseau tridimensionnel d'interactions multiples et synergiques entre les macromolécules. Les forces de cohésion résultent de la combinaison d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogène ou de forces de Van der Waals (267), conférant à ces structures une résistance accrue aux perturbations externes.

Ainsi, les nanoparticules de CS/HA/TPP présentent une stabilité intéressante dans le NaCl grâce à la bonne cohésion du réseau IPN mais sont déstabilisées par les changements de pH qui provoquent la perte de la répulsion stérique.

De leur côté, les nanoparticules de CS/ChS ont démontré leur potentiel en termes de taille, de polydispersité, de charge de surface, de capacité d'encapsulation de complexes de gadolinium et de propriétés contrastophores, mais échouent à résister aux environnements simulant les conditions physiologiques. Pour tenter de pallier les défauts de cette formulation, des essais de renforcement du réseau sont entrepris.

2. Essais de renforcement du réseau de CS et ChS par création de liaisons supplémentaires

Deux types de réticulation sont testés : une réticulation ionique, par ajout d'une molécule ionique réticulante, et une réticulation covalente grâce à un agent de couplage.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Préparation de CS/ChS renforcées par réticulation ionique

Les nanoparticules sont élaborées selon le protocole décrit dans la section 1.1.1 de ce chapitre, après dissolution de l'agent de réticulation ionique dans la phase polyanionique. Deux agents réticulants sont étudiés : le tripolyphosphate (TPP) et l'acide phytique. Pour le TPP, l'influence de la concentration en crosslinker sur la stabilité colloïdale est étudiée en testant 4 concentrations : 0,6 - 1,0 - 1,4 - 1,8 mg/mL. Cette approche dose-réponse vise à identifier la concentration optimale permettant d'obtenir la meilleure stabilité tout en préservant l'intégrité des nanoparticules.
Pour l'acide phytique, la concentration retenue est de 1,4 mg/mL, sur la base des essais réalisés avec le TPP.
Dans les deux cas, l'agent de réticulation est incorporé dans la phase polyanionique contenant la ChS et laissé sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète avant l'ajout de la phase polycationique. Le reste du protocole de formulation est inchangé.

La stabilité colloïdale est ensuite évaluée de la même façon que dans la section précédente par incubation dans les solutions de NaCl ou tampon phosphate, puis analyse par DLS.

2.1.2. Préparation des nanoparticules de CS/ChS renforcées par réticulation covalente

Les nanoparticules sont élaborées selon le protocole décrit dans la section 1.1.1 de ce chapitre, après dissolution de l'agent de couplage (EDC) dans la phase polyanionique. Concrètement, après dissolution de la ChS, l'EDC est ajouté à une concentration de 0,5 mg/mL et laissé sous agitation pendant une heure. Cette concentration, correspondant à un équivalent molaire par rapport au polyanion, a été déterminée sur la base d'expérimentations antérieures menées au laboratoire pour le greffage covalent de groupements fonctionnels sur le chitosane (268). Les nanoparticules sont ensuite préparées selon le protocole décrit précédemment.
La stabilité des suspensions obtenues est ensuite évaluée conformément aux indications du paragraphe ci-dessus.

2.2. Réticulation ionique des nanoparticules de CS/ChS

Ce travail a fait l'objet du stage de M1 Chimie et Sciences du Vivant d'Amandine Polidore.

Pour chaque formulation de CS et de ChS en présence de TPP ou d'acide phytique, des nanoparticules sont obtenues. Les suspensions sont analysées par DLS et comparées à la formulation de référence (Tableau 28).

Tableau 28 - Influence de l'ajout de crosslinker ionique sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS.

	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
CS/ChS	132	0,15	-34
CS/ChS/$TPP_{0,6}$	123	0,12	-29
CS/ChS/TPP_1	129	0,09	-32
CS/ChS/$TPP_{1,4}$	146	0,08	-31
CS/ChS/$TPP_{1,8}$	162	0,06	-32
CS/ChS/$PA_{1,4}$	221	0,17	-26

On observe que les diamètres moyens des particules formées en présence de TPP augmentent de façon linéaire avec la concentration utilisée. Cependant, dans tous les cas, les objets restent de taille nanométrique avec un indice de polydispersité très bas et un ZP qui reste inchangé.

Lorsque l'acide phytique est utilisé, les particules obtenues sont de taille plus importante et la diminution du potentiel zêta semble indiquer une modification de l'organisation des charges de surface.

Ces différences par rapport à la formulation de référence semblent indiquer la présence du crosslinker au sein des structures formées.

Afin de tester la résistance de ces structures à un changement de milieu, elles sont, comme précédemment, incubées soit dans l'eau ppi, soit dans des solutions de NaCl, soit dans du tampon phosphate pH 7,4.

Malheureusement, les résultats obtenus avec les CS/ChS/TPP et les CS/ChS/PA sont en tout point identiques à ceux de la formulation CS/ChS. Deux explications sont possibles : soit malgré la présence des crosslinkers il n'y a pas eu de réticulation suffisante pour former un réseau stable, soit les phénomènes provoquant la déstabilisation sont indépendants du degré de réticulation des gels. Afin d'essayer de lever ce doute, un essai de réticulation par liaisons covalentes est réalisé.

2.3. Réticulation covalente des nanoparticules de CS/ChS

Pour essayer de renforcer le réseau au sein des nanoparticules, une réticulation de la matrice par formation de liaisons covalentes peut être envisagée. L'EDC (1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) est un carbodiimide couramment utilisé comme

agent de couplage. Il permet d'activer les fonctions acides carboxyliques afin qu'elles réagissent avec des amines primaires pour former des liaisons amides (269). Dans notre cas, l'objectif est de former, en complément des liaisons ioniques entre le polyanion et le polycation, des liaisons covalentes entre les acides carboxyliques de la ChS et les amines primaires du CS.

2.3.1. Influence de l'EDC sur la formulation des nanoparticules de CS et ChS

Une observation des suspensions obtenues après synthèse en présence d'EDC montre que des nanoparticules peuvent être obtenues, sans agrégation ni sédimentation. L'analyse par DLS de ces suspensions révèle que les tailles des nanoparticules obtenues avec de l'EDC présentent une taille légèrement supérieure à celles obtenues sans EDC (40 nm de plus lors de la présence d'EDC) (Tableau 29)

Tableau 29 - Influence de la présence d'EDC sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de CS/ChS, déterminés par DLS/ELS

Nanoparticules	CS/ChS	CS/ChS + EDC
D_H (nm)	131	170
PdI	0,19	0,24
ZP (mV)	-24	-26

Bien que cela ne constitue qu'une preuve indirecte, cette augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules observée en présence d'EDC peut être attribuée à plusieurs mécanismes liés à la formation de liaisons covalentes entre les biopolymères constitutifs. L'hypothèse principale repose sur la rigidification des structures induite par la formation de liaisons covalentes entre les groupements carboxyliques de l'acide hyaluronique et les groupements aminés du chitosane *via* la formation de liaisons amide. Cette réticulation covalente, contrairement aux interactions électrostatiques réversibles présentes dans les formulations de référence, pourrait figer les chaînes de polymères dans une certaine conformation, empêchant leur réarrangement spontané vers une structure plus ou moins dense. Par conséquent, les nanoparticules seraient flexibles, d'où l'augmentation du diamètre apparent mesuré par diffusion dynamique de la lumière (257). De plus, la possibilité d'une agrégation

ponctuelle ne peut être écartée, l'EDC pouvant favoriser la formation d'agrégats de particules individuelles par pontage interparticulaire, conduisant à la mesure d'un diamètre hydrodynamique correspondant à ces assemblages plutôt qu'aux particules isolées. Cette augmentation de taille, bien que non souhaitée, peut être un indicateur de l'efficacité du traitement de réticulation des nanoparticules, qui est l'objectif recherché pour améliorer leur stabilité en milieu physiologique.

2.3.2. Influence de l'EDC sur la stabilisation des nanoparticules en conditions physiologiques

Bien que sans certitude de l'existence de liaisons covalentes entre les deux polymères, il a été décidé de tester la stabilité des systèmes obtenus afin d'évaluer leur potentiel. Comme dans les essais précédents, les nanoparticules sont donc incubées, avant ou après avoir été dialysées, dans des solutions de NaCl ou dans le tampon pH 7,4, puis leurs tailles et PdI sont mesurées par DLS. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 30 où sont repris les résultats de la section 1.2. de ce chapitre, pour comparaison.

Tableau 30 - Diamètres hydrodynamiques et indices de polydispersité des nanoparticules de CS/ChS et CS/ChS + EDC après incubation dans l'eau, les solutions de NaCl ou le tampon phosphate.

	CS/ChS				**CS/ChS + EDC**			
	Non dialysées		Dialysées		Non dialysées		Dialysées	
Milieu d'incubation	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI
Eau ppi	135	0,16	134	0,22	219	0,27	189	0,19
NaCl 0,4%	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	230	0,16
NaCl 0,6%	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	395	0,28
NaCl 0,9%	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	Agrégats	1693	0,52
Tampon phosphate	349	0,18	~ 5700	0,70	205	0,13	527	0,36

Lorsque les nanoparticules obtenues en présence d'EDC ne sont pas dialysées, leur comportement dans les solutions salines est en tout point semblable à celui des nanoparticules obtenues par simples interactions ioniques entre le chitosane et la chondroïtine sulfate. Les suspensions présentent en effet des agrégats

macroscopiques, et ce quelle que soit la force ionique utilisée. Dans le tampon phosphate, alors que la stabilité était temporaire et partielle pour les nanoparticules CS/ChS, elle est cette fois-ci établie, avec des diamètres hydrodynamiques moyens qui sont équivalents aux nanoparticules incubées dans l'eau.
Les nanoparticules qui sont dialysées juste après la synthèse ont un comportement qui est différent. Elles ont en effet une stabilité améliorée, mais dépendante de la force ionique du milieu, dans les solutions de NaCl alors qu'à pH 7,4 une agrégation partielle intervient.

Là encore, les équilibres entre la densité de charges des polymères et le pH peuvent expliquer en partie ces phénomènes.
Le choix de conserver la formulation de référence comme point de départ pour les essais de renforcement par formation de liaisons covalentes implique de travailler à un pH qui n'est pas optimal pour l'agent de couplage utilisé. En effet, avec l'EDC, l'activation des groupements réactifs est maximale pour un pH aux alentours de 5 (270–273). Puisque le pH de la suspension de NPs CS/ChS est de 3, on peut supposer que la formation de liaisons covalentes, si elle a lieu, reste partielle. Ainsi les effets sur la stabilité dans les solutions de NaCl sont faibles. Par ailleurs, lorsque l'on place ces formulations qui contiennent de l'EDC en présence de tampon phosphate, on n'observe pas d'agrégation et les particules restent stables. Le pH d'une solution contenant l'acide acétique 0,2 M et le tampon pH 7,4 en proportions volumiques équivalentes est mesuré à 4,5. L'augmentation du pH dûe à la présence du tampon permet l'activation des groupements réactifs par l'EDC et certaines liaisons covalentes peuvent alors être initiées, aidant à la stabilisation des nanogels.
Lorsque l'on dialyse les suspensions juste après leur préparation, on élimine une partie de l'acide utilisé pour la solubilisation du chitosane et on remonte le pH jusqu'à environ 5. Même s'il faut tenir compte du fait que lors de la dialyse on élimine également une partie de l'EDC en excès, en se rapprochant du pH optimal de la réaction de couplage, il semblerait que la formation de liaisons covalentes soient favorisée. L'effet dose-dépendant de la force ionique sur la stabilité des particules démontre néanmoins que la réticulation n'est pas suffisante, ou que d'autres mécanismes de stabilisation sont nécessaires pour contre-balancer l'écrantage des charges par les ions des solutions de NaCl.

Il reste à expliquer l'agrégation partielle des nanogels dans le tampon phosphate quand ils sont préparés en présence d'EDC puis dialysés. Le pH d'un mélange à volumes égaux d'une solution de pH 4 et de tampon 7,4 donne une valeur mesurée à 7,4. A ce pH, il est possible que la déstabilisation ait lieu pour les raisons liées à la déprotonation des molécules de chitosane et à leur changement de conformation (transition chain-to-coil), comme évoqué précédemment.

Ces résultats démontrent que la réticulation covalente obtenue avec les paramètres actuels reste insuffisante pour conférer une stabilité robuste face aux variations combinées de pH et de force ionique. Cependant, l'amélioration notable observée en milieu salin à faible force ionique (NaCl 0,4%) suggère qu'une optimisation des conditions de réticulation (concentration d'EDC, pH, temps de contact) pourrait permettre d'atteindre la stabilité requise pour les applications visées. Par ailleurs, une preuve de la formation des liaisons covalentes devrait être établie en réalisant des analyses par RMN, DOSY ou FT-IR pour mettre en évidence les liaisons amides formées.

Même si ces résultats ne sont pour l'instant qu'en partie expliqués, il a cependant pu être démontré que l'instabilité est un phénomène complexe dont les causes sont multifactorielles, combinant à la fois l'état d'ionisation et la conformation des polymères selon le pH, l'écrantage des charges de surface en fonction de la force ionique ainsi que le degré de réticulation des nanogels.

Chapitre 4 : Nanoparticules de PLL/ChS

L'étude comparative de la stabilité des nanoparticules de CS/HA/TPP et de CS/ChS a permis de mieux comprendre le comportement des systèmes polyélectrolytiques dans les milieux mimant les conditions physiologiques. Ces investigations ont notamment permis d'identifier deux limites principales. Tout d'abord, la déstabilisation des nanoparticules incubées dans du tampon phosphate semble résulter des modifications dans la conformation des chaînes de chitosane induites par l'élévation du pH au-dessus de son pKa. Cette transition, d'une structure étendue vers une conformation repliée, compromet l'intégrité du réseau polyélectrolytique indépendamment des stratégies de réticulation employées. Ensuite, la déstabilisation des nanoparticules de CS/ChS dans les milieux de force ionique élevée, semble être liée à un enchevêtrement insuffisant des chaînes de polymères et à un manque de réticulation. Pour mieux comprendre les mécanismes de stabilisation/déstabilisation et établir de nouvelles bases de comparaison, le développement d'une formulation alternative substituant le chitosane par un autre polycation s'avère pertinent.

La poly-L-lysine (PLL) est un polymère cationique provenant de la condensation de la lysine et produit par synthèse organique ou biofermentation. A pH physiologique, les fonctions amines des résidus de lysine sont protonées, permettant d'établir des interactions électrostatiques avec d'autres polymères chargés négativement. La PLL retenue pour ces expérimentations provient de la polymérisation sur l'amine en α de la forme lévogyre de la lysine. La L-Lys est en effet l'acide aminé retrouvé naturellement dans les protéines et offre donc de meilleures perspectives de biocompatibilité. De plus, la α-poly-L-lysine présente une architecture ramifiée favorisant l'accessibilité des fonctions amines protonées pour la gélification ionique, contrairement à la ε-poly-L-lysine dont la structure linéaire limite les possibilités d'interactions. Cependant ce polymère est à utiliser avec précaution car il a un potentiel de cytotoxicité documenté qui pourrait être un frein à son développement (124,274–276). Une attention toute particulière sera donc portée sur les études de biocompatibilité.

Dans cette étude, l'objectif est de mettre au point une nouvelle formulation de nanoparticules à base de PLL et de ChS par gélification ionique présentant une bonne biocompatibilité tout en résistant efficacement aux variations de force ionique et de pH. Le but sera également d'obtenir une architecture permettant l'encapsulation de complexes de gadolinium à des concentrations suffisantes et d'améliorer son efficacité en IRM.

Pour cela, l'étude reposera sur l'optimisation des paramètres de formulation, les tests de stabilité dans les milieux mimant les conditions physiologiques et enfin les nanoparticules obtenues seront évaluées sur leurs capacités d'encapsulation et d'efficacité pour le diagnostic.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

La α-poly-L-lysine (environ 30 kDa) provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). La chondroïtine sulfate provient de chez Acros Organics (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Sa masse molaire est estimée à 543 kDa (mesure réalisée par chromatographie d'exclusion stérique dans un milieu composé d'un mélange eau/DMSO en proportions 80/20 water/DMSO). Leurs structures sont représentées sur la figure 43.

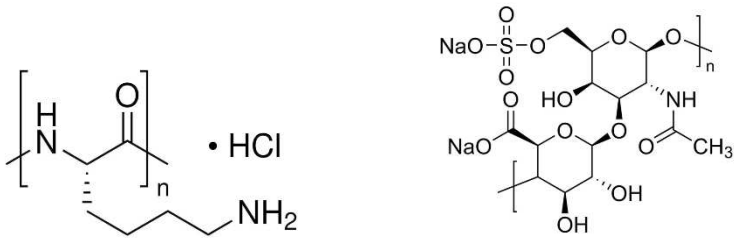

Figure 43 - Représentation schématique des sels de α-poly-L-lysine (à gauche) et de chondroïtine sulfate (à droite) utilisés

Le HGdDOTA est préparé au laboratoire selon la synthèse décrite dans une publication antérieure (220). L'eau utilisée pour toutes les expérimentations est de l'eau ppi (Laboratoire Aguettant, Lyon, France). Le sérum fœtal bovin et le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) proviennent de chez Gibco (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tous les autres réactifs sont utilisés sans purification supplémentaire.

1.2. Préparation des nanoparticules de PLL/ChS

Les nanoparticules sont élaborées à partir de la technique de gélification ionique déjà utilisée par le laboratoire (220,222,230,255) et s'inspire des travaux de l'équipe du Dr. Yuan (130). Concrètement, la phase polycationique est constitué de α-poly-L-lysine dissoute dans de l'eau ppi à la concentration de 1 mg/mL. La phase polyanionique est préparée par dissolution de la chondroïtine sulfate dans de l'eau ppi. La concentration varie selon les conditions testées. Les nanoparticules sont obtenues par ajout de 1 mL la phase polycationique à 4 mL de la phase polyanionique à l'aide d'une micropipette sous agitation magnétique.

Les nanoparticules de PLL/ChS encapsulant le complexe de gadolinium sont obtenues par le même protocole que précédemment, après dissolution pendant une heure et demie de HGdDOTA soit dans la phase polycationique, soit dans la phase polyanionique, pour atteindre une concentration finale de complexe de 1,3 mg/mL. Les nanoparticules obtenues sont appelées PLL-HGdDOTA/ChS NPs et PLL/ChS-HGdDOTA NPs, respectivement.

Le milieu d'élaboration des nanoparticules étant composé uniquement d'eau ppi, l'étape de dialyse n'est pas nécessaire pour corriger le pH et éliminer un excédent d'acide. Cependant, pour les nanoparticules chargées en gadolinium, une étape de dialyse peut être nécessaire pour éliminer l'agent de contraste non encapsulé, ainsi que pour avoir une base de comparaison cohérente entre les différentes formulations. Dans ce cas, un tube de dialyse en esters de cellulose (Spectra/por®, 28 mm) avec un cut-off de 25kDa sera utilisé, les échanges se faisant contre de l'eau ppi (rapport des volumes nanosuspension/eau ppi : 1/100), durant 3 cycles de 12h.

1.3. Caractérisation des nanoparticules de PLL/ChS par DLS/ELS

Le diamètre hydrodynamique moyen (D_H) et l'indice de polydispersité (PdI) des nanoparticules sont déterminés par diffusion dynamique de la lumière grâce à un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Chaque échantillon est analysé 3 fois à 20°C, avec un angle de 173°, après une dilution au 1/20 dans l'eau ppi, milieu qui sert également de référence.

Le potentiel zêta est déterminé par diffusion électrophorétique de la lumière, sur la même dilution de l'échantillon, avec un voltage de 150 mV. L'instrument est calibré avec un standard à -68 mV de chez Malvern avant chaque cycle d'analyse.

1.4. Caractérisation par AFM

Afin d'observer la morphologie des nanoparticules, les formulations sont analysées par microscopie de force atomique (Catalyst, Bruker Fast Scan) en mode PFT avec une sonde MSNL-E. Les échantillons sont préparés par dépôt d'une goutte de nanosuspension à la surface d'une feuille de mica. La goutte est ensuite rincée à l'eau pour éliminer l'excès de particules, et les structures sont imagées dans l'eau pour préserver leur intégrité. Dans certains cas, il peut être nécessaire de forcer le dépôt des particules sur le support. Pour cela, la goutte est séchée à l'air avant d'être imagée. Les images en AFM sont générées en utilisant une fréquence de balayage de 1 Hz et 512 lignes par images. Les expérimentations sont réalisées à température ambiante. Un aplanissement (flatening) est systématiquement exécuté sur les images pour réduire l'effet de pente à l'arrière-plan. Toutes les images sont traitées par le logiciel Gwyddion.

1.5. Détermination du rendement de production des nanoparticules

Le rendement de production est évalué de façon gravimétrique. Pour cela, un volume déterminé de la nanosuspension sera ultracentrifugé à 23200 g pendant 1h15. Le surnageant, contenant les polymères non engagés dans le réseau et le milieu d'élaboration, est éliminé. La masse des culots est déterminée par pesée après séchage à l'air pendant au minimum 48h. Cette masse est ensuite rapportée à la masse des polymères introduits au début de la réaction pour obtenir un rendement de production grâce à l'équation suivante :

$$Rendement\ (\%) = \frac{Masse\ des\ culots\ (g)}{Masse\ polymères\ introduits\ (g)}\ X\ 100$$

1.6. Évaluation de la stabilité des nanoparticules de PLL/ChS obtenues par gélification ionique

Pour évaluer la stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologiques, deux milieux mimant les conditions de salinité et de pH sont utilisés. Le tampon phosphate à pH 7,4 va permettre de mimer le pH physiologique de l'organisme. Des solutions de NaCl de concentrations croissantes (0,4 – 0,6 – 0,9%) vont permettre d'étudier l'impact de la force ionique sur les nanoparticules. La force ionique est une mesure de la contribution totale des ions dans une solution. Elle reflète la somme des contributions de chaque ion, pondéré par le carré de leur charge. La charge ionique, *I*, d'une solution est calculée selon la formule suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i ci\ zi^2$$

ci = concentration de l'ion i (mol/L)

zi = charge de l'ion i

Pour l'expérimentation, chaque nanosuspension est diluée au demi avec des solutions salines doublement concentrées, du tampon phosphate ou avec l'eau ppi comme contrôle.

1.7. Cinétique de libération

Afin d'établir la cinétique de libération du complexe de gadolinium encapsulé dans les nanogels formés, ceux-ci sont mis en suspension, par dilution au quart de la formulation initiale, dans du tampon phosphate pH 7,4 pour simuler un milieu physiologique. Les milieux de libération sont maintenus à 37°C. A intervalles de temps déterminés, un volume du milieu de libération est prélevé et centrifugé à 23200 g pendant 1h15 à 4°C (centrifugeuse Beckman AvantiTM J-E, France). Le culot de chaque échantillon est séparé du surnageant et la concentration en gadolinium est déterminée par dosage ICP-OES. Pour cela, les culots, comme les surnageants, sont incubés une nuit à 37°C dans un mélange en proportions 1:3 (v:v) de HCl (37 %) et HNO_3 (69 %) pour détruire toute matière organique présente dans l'échantillon. Des

dilutions volumétriques sont ensuite effectuées pour obtenir des concentrations adaptées à la plage de travail de la méthode de l'appareil (spectromètre Thermo Scientic iCAP 6300 Duo ICP). Les résultats sont corrélés à une droite d'étalonnage obtenue par mélange de $Gd(NO_3)_3$ avec des nanoparticules non chargées, dans les mêmes conditions acides.

1.8. Évaluation de la biocompatibilité des formulations

Les études *in vitro* sont réalisées sur deux lignées cellulaires obtenues à partir de l'ATCC (American Type Culture Collection) : la lignée RAW 264.7 qui est un modèle *in vitro* de macrophages murins et la lignée SVEC4-10 qui est une lignée de cellules endothéliales murines immortalisées.
Les cellules RAW 264.7 et SVEC4-10 sont entretenues dans un milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium). Le milieu de culture est supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptmoycine, amphotéricine). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide (HR 95%) avec 5% de CO_2.
L'activité métabolique est mesurée par l'essai au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) selon les instructions du concepteur (240).
Les cellules sont d'abord incubées pendant 24 ou 48h en présence de dilutions des suspensions de nanoparticules correspondant à des concentrations en Gd de 5 à 50 μM. Après incubation, le milieu de culture est retiré et chaque puits est rincé avec 100 μL de PBS. Ensuite les cellules sont incubées en présence de 150 μL de MTT (1 μg/mL) pendant 2 heures. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans de l'isopropanol et la densité optique mesurée à 595 nm sur un lecteur de microplaques FlexStation 3 (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA)(241).

Afin d'évaluer la toxicité des nanogels, les cellules sont également exposées aux particules ne contenant pas de gadolinium. Les suspensions sans Gd sont utilisées à des dilutions équivalentes à celles contenant du Gd afin qu'il y ait la même quantité de particules vis-à-vis des cellules. Un contrôle cellulaire sans nanoparticules est aussi réalisé pour chaque lignée.

Le niveau de libération de LDH dans le milieu de culture cellulaire a aussi été réalisé en utilisant un test en kit de toxicology *in vitro* (TOX7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pour évaluer les possibles lésions cellulaires induites par les nanoparticules en accord avec le guide d'utilisation du fabricant. Le milieu de culture des cellules, mise en contact avec les nanoparticules au concentration mentionnées ci-dessus, a été récupéré pour doser la LDH. La densité optique a ensuite été mesurée à 450 nm en utilisant un TECAN GENios Multireader.

1.9. Détermination du profil NMRD des nanosuspensions

Les profils NMRD sont mesurés sur un relaxomètre RMN à cycle de champ rapide Stelar Spinmaster FFC (Stelar, Mede, Pavia, Italy) sur une gamme de champs magnétiques allant de 0,24mT à 0,7T correspondant à des fréquences des protons de Larmor de 0,01 à 30 MHz en utilisant 0,6 mL d'échantillon. La température est maintenue constante à 37°C. Une mesure supplémentaire à 60 MHz a pu être obtenue grâce à un spectromètre Minispec mq60 (Bruker, Karlsruhe, Germany). La contribution diamagnétique des nanoparticules non chargées en Gd est mesurée et soustraite à la vitesse de relaxation des nanoparticules chargées en gadolinium.

1.10. Évaluation des propriétés de contraste des nanosuspensions par IRM

Les images par résonance magnétique des nanosuspensions sont réalisées sur un appareil IRM 3T (Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) avec une antenne 15 canaux pour genoux. Les images pondérées en T_1 sont obtenues avec une séquence T_1 3D fast spin-echo (TR = 700 ms, TE = 12 ms, FOV = 201 x 201 mm, matrix 256 x 256, voxel size = 0,78 x 0,78 x 2 mm). Les images pondérées en T_2 sont obtenues avec une séquence T_2 3D fast spin-echo (TR = 1000 ms, TE = 103 ms, FOV = 199 x 199 mm, matrix = 384 x 384, voxel size = 0,52 x 0,52 x 0,55 mm).
La gamme de concentration en complexe de gadolinium testée est comprise entre 25 μM et 200 μM. Les nanosuspensions sont imagées à différentes concentrations, correspondant à 25, 50, 100 et 200 μM en Gd. Le point zéro correspond aux nanogels

ne contenant pas de Gd. La même gamme de concentration en Gd est préparée à partir du Dotarem®, pour comparaison. L'eau pure sert de référence

2. Résultats et discussion

2.1. Optimisation de la formulation

Le protocole établi par l'équipe du Dr. Yuan (130) repose sur l'interaction électrostatique entre deux polymères hydrosolubles qui, au pH de l'eau, sont de charges opposées. Ce protocole va donc être appliqué à la PLL et à la ChS. Grâce aux connaissances acquises sur les systèmes à base de CS, HA et TPP ou de CS et ChS, deux paramètres critiques de formulation parssent importants à évaluer, à savoir le rapport entre la masse de polymère cationique (PLL) et la masse de polymère anionique (ChS), et la vitesse d'agitation au cours du mélange des phases. L'optimisation de ces paramètres vise à obtenir des nanoparticules possédant des caractéristiques adaptées à une utilisation en santé humaine.

2.1.1. Influence du rapport entre les masses de polymères

Précédemment identifié comme un paramètre clé, l'influence du rapport entre les masses des polymères est évaluée en faisant varier la concentration en chondroïtine sulfate (de 0,2 à 2,5 mg/mL) tout en maintenant constante la concentration en poly-L-lysine (1 mg/mL).

L'analyse des nanoparticules par DLS/ELS (Tableau 31) révèle que les diamètres hydrodynamiques et les indices de polydispersité ne sont que peu influencés par une augmentation de la masse de ChS pour les rapports compris entre 1:0,8 et 1:5. En effet, les tailles sont comprises entre 121 et 159 nm pour ces rapports et les PdI sont très bas, indiquant une très faible polydispersité (0,07 à 0,13). Lorsque la PLL est en large déficit par rapport à la ChS (rapport 1 :10), une augmentation non négligeable du diamètre (205 nm) et un doublement du PdI (0,24), sont observés. Dans ces conditions, il est probable que la quantité de polycation ne soit plus suffisante pour assurer des interactions électrostatiques fortes avec le polyanion, ce qui nuit à la compacité du réseau et provoque une augmentation des tailles.

Tableau 31 - Influence du rapport mPLL/mChS sur les diamètres hydrodynamiques moyens, les indices de polydispersité et les potentiels zêta des nanoparticules de PLL/ChS mesurés par DLS/ELS. L'agitation appliquée au cours du mélange des phases est fixée à 1200rpm pour ces expériences.

Rapport m_{PLL}/m_{ChS}	**D_H (nm)**	**PdI**	**ZP (mV)**
1 : 0,8	121	0,13	53
1 : 1	145	0,13	52
1 : 1,2	134	0,11	48
1 : 1,5	147	0,07	49
1 : 2	150	0,07	41
1 : 2,5	121	0,13	-37
1 : 5	159	0,13	-47
1 : 10	205	0,24	-61

Parallèlement, l'évolution du potentiel zêta présente une transition très nette : les rapports m_{PLL}/m_{ChS} de 1:0,8 à 1:2 génèrent des nanoparticules cationiques (+41 à +53 mV), tandis qu'une inversion de charge s'opère entre les rapports 1:2 et 1:2,5, passant de +41 mV à -37 mV. Cette transition brutale confirme la prédominance des charges négatives de la ChS sur les charges positives de la PLL au point de bascule. L'augmentation continue de la proportion de ChS conduit à des potentiels zêtas de plus en plus négatifs, atteignant un maximum de -61 mV pour le rapport 1:10.

2.1.2. Influence de la vitesse d'agitation pendant l'ajout de phase

La vitesse d'agitation pendant l'ajout de phase s'est révélée être un paramètre déterminant pour l'optimisation des nanoparticules de CS/ChS, justifiant une attention particulière portée à ce facteur pour les systèmes PLL/ChS Pour tester l'influence de ce paramètre, les formulations obtenues dans deux conditions d'agitation magnétique, à savoir avec une vitesse de 600 rpm ou une vitesse de 1200 rpm, sont comparées à la formulation réalisée sans agitation. En l'absence d'agitation, les nanoparticules présentent un diamètre de 202 nm avec un PdI de 0,19 tandis que l'agitation à 600 rpm et 1200 rpm réduit progressivement le diamètre à 157 et 139 nm respectivement, avec une amélioration du PdI (Tableau 32). Cette tendance confirme les observations réalisées sur les nanoparticules de CS/ChS. L'agitation favorise un mélange

homogène, permet d'éviter l'accumulation locale de polymères et donc de limiter la formation d'agrégats, lors de l'ajout goutte à goutte d'une phase dans l'autre. En conséquence, une vitesse d'agitation à 1200 rpm est retenue pour la suite des expérimentations.

Tableau 32 - Influence de la vitesse d'agitation sur les diamètres hydrodynamiques (DH), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de PLL/ChS déterminés par DLS/ELS. Le rapport m_{PLL}/m_{ChS} est de 1:5.

Vitesse agitation (rpm)	0	600	1200
D_H (nm)	202	157	139
PdI	0,19	0,12	0,14
ZP (mV)	-47	-45	-43

Ainsi, en utilisant les paramètres détaillés dans le tableau 33, des nanoparticules de PLL et de ChS sont obtenues avec des tailles de 140 nm, un PdI de 0,14 et un ZP de -43 mV. Hormis le potentiel zêta plus élevé en valeur absolue pour les nanoparticules de PLL/ChS comparativement aux nanoparticules de CS/ChS, dû à un état d'ionisation différent au pH d'élaboration, l'indice de polydispersité et la taille de ces deux formulations sont du même ordre de grandeur. Ces résultats confirment à nouveau que l'agitation constitue un paramètre crucial pour l'optimisation de la taille et de l'homogénéité des nanoparticules.

Tableau 33 - Paramètres utilisés pour la formulation optimisée des nanoparticules de PLL/ChS

[PLL] mg/mL	[ChS] mg/mL	pH	Vitesse agitation (rpm)	Rapport m_{PLL}/m_{ChS}
1	1,25	7	1200	1 : 5

2.2. Caractérisation des nanoparticules de PLL/ChS par AFM

Ce travail a été réalisé par l'équipe du Pr Michael Molinari, Institut de Chimie & Biologie des Membranes et des Nano-objets, de l'université de Bordeaux.

Pour compléter les caractérisations par DLS, les nanoparticules ont été observées en AFM. Afin de visualiser les nanoparticules dans des conditions les plus proches possibles de leur état natif, l'analyse par AFM a idéalement lieu en milieu liquide, afin

de ne pas déshydrater les structures. Pour cela, une goutte de nanosuspension est déposée sur une feuille de mica fraîchement clivée pour permettre l'adhésion des particules sur le support. Une étape de rinçage avec de l'eau permet d'éliminer les particules non adhérentes et l'excès d'objets sur la surface. Dans le cas de cette formulation, les nanoparticules de PLL/ChS mises au point présentent une charge de surface largement négative, ne permettant pas leur bonne adhésion sur le mica. L'observation par AFM a donc été réalisée à l'air, après séchage partiel de la goutte de suspension déposée.

Les images obtenues montrent la présence en grand nombre de particules sphériques et relativement monodisperses (Figure 44). Une analyse sur quelques objets isolés a permis de déterminer un diamètre moyen d'environ 300 nm pour environ 40 nm de hauteur. Ces valeurs *a priori* surprenantes s'expliquent par le protocole utilisé pour pouvoir analyser ces nanogels dont la charge de surface est négative. En effet, l'observation a dû être réalisée après dépôt et séchage partiel à l'air, laissant à ces gels l'opportunité de se déformer au contact de la surface.

Si on calcule le volume d'un cylindre de 300 nm de diamètre et de 40 nm de hauteur, on obtient $2{,}827.10^7$ nm^3. Le volume d'une sphère d'environ 150 nm de diamètre est de $1{,}77.10^7$ nm^3. En tenant compte du fait que la largeur de la pointe AFM implique une surestimation de la largeur des objets, on peut considérer que les données AFM sont cohérentes avec les données DLS. Une analyse statistique plus systématique sur un grand nombre d'objets devrait pouvoir confirmer ces hypothèses.

Ainsi, on peut dire que la caractérisation par AFM confirme que la morphologie des nanogels produits est compatible avec une utilisation dans le domaine de la santé.

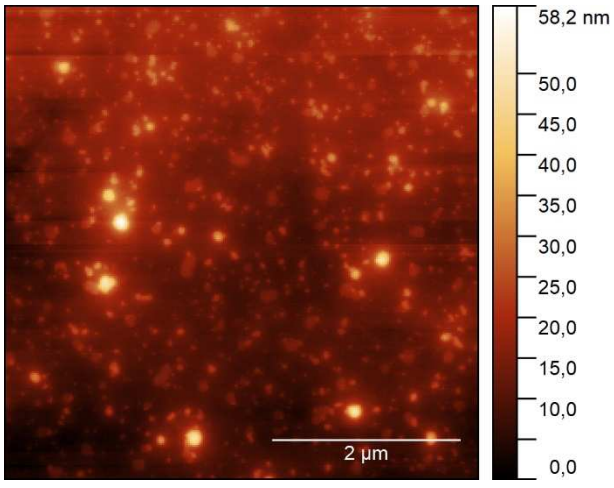

Figure 44 – Image par AFM des nanoparticules de PLL/ChS obtenues selon le protocole optimisé

2.3. Évaluation du rendement de production de la formulation

Pour évaluer le rendement de production de la formulation optimisée, 3 lots de nanoparticules sont préparés. Après séparation du surnageant par centrifugation et séchage des culots, les masses de nanoparticules sont rapportées aux masses de polymères introduits dans la réaction. Les résultats montrent des rendements de 51%, 49% et 60% pour chacun des 3 lots, soit une moyenne d'environ 53%.

Ce rendement moyen signifie alors que 53 % des polymères introduits dans le milieu réactionnel sont engagés dans le réseau de nanohydrogels. Ce résultat est du même ordre de grandeur que les nanoparticules de CS/ChS ainsi que les formulations de nanohydrogels déjà mises au point au laboratoire.

Bien qu'indicative et sans conséquence sur les propriétés des objets créés, cette valeur permet de valider le procédé mis au point.

2.4. Etude de la stabilité des nanoparticules de PLL/ChS obtenues par gélification ionique

La stabilité des nanoparticules de PLL/ChS est évaluée par dilution de la nanosuspension au demi dans les milieux contenant du NaCl en concentrations croissantes, dans le tampon phosphate à pH 7,4 et comparée à la stabilité dans l'eau. Les nanoparticules étant préparées dans l'eau, sans ajout d'acide et à un pH proche du pH physiologique, aucune étape de dialyse n'est nécessaire. Les résultats présentés dans le tableau 34 concernent donc uniquement les nanoparticules non dialysées.

Tableau 34 - Diamètres hydrodynamiques (D_H) et indices de polydispersité (PdI) des nanoparticules PLL/ChS après dilution au 1/2 dans l'eau, les solutions de concentrations croissantes en NaCl et le tampon phosphate, déterminés par DLS.

Milieu d'incubation	D_H (nm)	PdI
Eau ppi (blanc)	170	0,14
NaCl 0,4%	186	0,15
NaCl 0,6%	192	0,14
NaCl 0,9%	202	0,14
Tampon Phosphate	185	0,14

Dans les milieux contenant le NaCl, les nanoparticules résistent à l'augmentation progressive de la force ionique, avec une très légère augmentation du diamètre hydrodynamique de 170 nm (eau ppi) à 202 nm (NaCl 0,9%).
De la même façon, dans le tampon phosphate à pH 7,4, les nanoparticules de PLL/ChS maintiennent leur intégrité (185 nm et PdI 0,14) là où toutes les formulations à base de chitosane donnaient systématiquement des agrégats. Ce résultat démontre la bonne réticulation entre les deux polymères en présence. Plusieurs points permettent d'expliquer ces résultats. Tout d'abord, la structure-même de la molécule de αPLL impose une conformation en forme de peigne, avec une charge positive portée sur chaque monomère et, de surcroît, tournée vers l'extérieur de la molécule. Cette organisation spatiale permet une très bonne accessibilité des charges positives pour les charges négatives de la ChS et donc la possibilité d'obtenir un réseau serré au sein des nanogels (277).
De plus, les polymères utilisés dans cette étude, solubles dans l'eau, présentent des charges quasiment constantes, positives pour la PLL, négatives pour la ChS, aux pH testés. Enfin, une étude a montré que la conformation de la αPLL était peu affectée par les variations de pH, dans les gammes utilisées pour les applications biomédicales (277). C'est pourquoi les nanoparticules formées à partir de ces deux polymères se révèlent être également stables dans le tampon phosphate pH 7,4. Ces résultats confirment la pertinence de cette nouvelle formulation pour obtenir des nanovecteurs utilisables en santé humaine.

2.5. Encapsulation du complexe de gadolinium

L'objectif du travail est d'encapsuler un agent de contraste pour l'IRM afin d'améliorer les propriétés contrastophores de celui-ci. Le HGdDOTA, qui est la substance active du Dotarem®, le principal agent de contraste utilisé en milieu hospitalier, est utilisé avec la formulation optimisée retenue précédemment.
Il est dissout soit dans la phase polycationique, soit dans la phase polyanionique avant le mélange permettant l'élaboration des nanoparticules. Les NPs sont appelées PLL+HGdDOTA/ChS lorsque l'AC est introduit *via* la solution de PLL et PLL/ChS+HGdDOTA lorsque l'AC est introduit *via* la solution de ChS. Sur la base d'essais antérieurs réalisés au laboratoire, une masse de HGdDOTA de 30 mg a été utilisée pour ces manipulations.

Dans les deux configurations testées, la formation de nanoparticules a été observée, démontrant que la présence du chélate de gadolinium ne perturbe pas l'établissement d'un réseau entre les polymères. La caractérisation par DLS/ELS révèle toutefois une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en présence de l'agent de contraste (Tableau 35), phénomène similaire à celui déjà observé pour les nanoparticules de CS/ChS.

L'impact de ce phénomène varie significativement selon la phase d'incorporation du complexe. L'ajout de HGdDOTA dans la phase polycationique (PLL-HGdDOTA/ChS) n'entraîne qu'une augmentation modérée de la taille (149 → 160 nm) avec un PdI acceptable de 0,24. En revanche, son incorporation dans la phase polyanionique (PLL/ChS-HGdDOTA) provoque une augmentation plus marquée (149 → 211 nm) accompagnée d'une hétérogénéité plus forte des nanoparticules (PdI 0,40).

Ces observations rejoignent celles réalisées avec les nanoparticules de CS/ChS, où l'incorporation de HGdDOTA dans la phase polyanionique conduit également à des augmentations importantes de taille et de PdI. Dans ces cas, ce sont les phénomènes d'écrantage ou même de compétition entre les charges portées par le complexe de Gd et les groupements chargés négativement de la chondroïtine sulfate qui en sont responsable. À l'inverse, l'ajout dans la phase polycationique limite cette augmentation de taille et améliore même l'homogénéité des systèmes PLL/ChS. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une pré-organisation des chaînes polycationiques en présence de HGdDOTA, similaire au pré-gel observé entre les ions calcium et l'alginate (248–250).

Tableau 35 - Influence de l'encapsulation du HGdDOTA et de la phase d'introduction de celui-ci sur les diamètres hydrodynamiques (D_H), les indices de polydispersité (PdI) et les potentiels zêta (ZP) des nanoparticules de PLL/ChS déterminés par DLS/ELS, ainsi que sur la concentration en Gd dans les nanoparticules déterminée par ICP.

Nanoparticules	Blanches	PLL-HGdDOTA/ChS	PLL/ChS-HGdDOTA
D_H (nm)	149	160	211
PdI	0,15	0,24	0,4
ZP (mV)	-45	-43	-45
$[Gd]_{NP}$ (M)	-	$2{,}5.10^{-4}$	$2{,}2.10^{-4}$

2.5.1. Évaluation de la cinétique de relargage des complexes de gadolinium encapsulés dans les nanoparticules de PLL/ChS

Pour prédire le comportement des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS *in vivo*, un essai de libération *in vitro* de la substance active a été réalisé en utilisant un tampon phosphate (pH 7,4) à 37°C pour mimer le milieu physiologique. Pour cela, les nanoparticules sont incubées dans ce milieu puis, à intervalle de temps défini, un prélèvement du milieu est centrifugé pour doser le gadolinium restant dans les nanoparticules. Le profil de libération est ensuite établi pour faire figurer le pourcentage de libération en fonction du temps.

Les résultats démontrent que 100% de la concentration présente au sein des nanoparticules à t=0h est encore présente à t=72h. Cette observation est un peu surprenante au regard de la bibliographie sur les nanoparticules de PLL (278–280). Cependant, la plupart des références font intervenir de la ε-PLL : cette molécule possède une structure linéaire sur laquelle les groupements protonables sont éloignés les uns des autres alors que la α-PLL possède une structure branchée où ils sont positionnés à l'extrémité de chaque unité répétitive (277). Dans notre cas, la structure moléculaire de la α-PLL pourrait favoriser les interactions fortes avec la ChS et ainsi former un réseau capable d'assurer le confinement du complexe de gadolinium. Ces éléments sont considérés comme encourageants dans la mesure où l'efficacité d'une sonde IRM hypersensible repose essentiellement sur la capacité du complexe à demeurer encapsulé durablement dans les nano-objets.

2.5.2. Mesure de la relaxivité des agents de contraste encapsulés

Les mesures NMRD ont été réalisées par le Dr. Céline Hénoumont, sous la supervision du Pr. Sophie Laurent, de l'équipe General, Organic and Biomedical Chemistry Group, Université de Mons (Belgique).

L'efficacité des agents de contraste est déterminée par la mesure de la relaxivité r_1. En faisant varier le champ magnétique appliqué, on obtient le profil relaxométrique ou profil NMRD.

Les relaxivités r_1 des PLL-HGdDOTA/ChS NPs sont déterminées sur une gamme de fréquence de 0,03 à 60 MHz (Figure 45). Pour chaque fréquence d'excitation, les nanoparticules présentent une meilleure relaxivité que le complexe de gadolinium libre. La valeur de relaxivité r_1 à 60 MHz est de 37 $s^{-1}mM^{-1}$pour les nanoparticules, ce qui est 12 fois supérieur à la valeur de la relaxivité du complexe libre à la même fréquence. Sachant que les champs magnétiques des IRM médicales fonctionnent autour de 20 à 60 MHz, cette formulation semble être très prometteuse pour une utilisation en santé humaine. Comme observé pour les nanoparticules de CS/ChS, l'augmentation constatée de la relaxivité du complexe encapsulé s'explique par la propriété des nanoparticules. Le fait de piéger l'agent de contraste dans un environnement fortement aqueux, obtenu grâce à la présence de la ChS, combiné avec un fort échange d'eau au contact du gadolinium au sein du réseau nanoparticulaire conduit à une exaltation du signal (254).

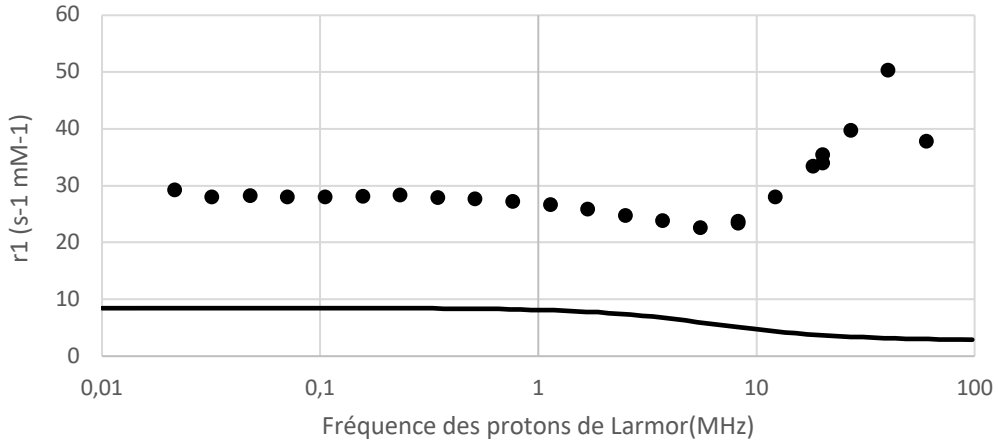

Figure 45 - Profil NMRD des nanoparticules PLL-HGdDOTA/ChS (•) et du HGdDOTA libre (ligne peine)

2.5.3. Imagerie par résonance magnétique

Les images IRM ont été acquises par le Dr. Christophe Portefaix du Pôle d'Imagerie, au Centre Hospitalier Universitaire de Reims.

Afin de confirmer l'augmentation de relaxivité observée en NMRD avec cette formulation, des images des suspensions de nanoparticules sont prises par l'IRM

médical à 3T du Centre Hospitalier Universitaire de Reims. L'acquisition d'images pondérées en T_1 est réalisée pour les nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS, en utilisant de l'eau distillée et une solution commerciale de Dotarem® comme références.

L'analyse comparative des lignes sur l'image révèle que, pour chaque concentration en gadolinium évaluée (25, 50, 100 et 200 µM), les emplacements contenant l'agent de contraste commercial ou les nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS présentent un hypersignal marqué par rapport à la ligne d'eau attestant de la présence du complexe de Gd (Figure 46 (A)). Conformément aux attentes, l'intensité du signal demeure constante pour les échantillons d'eau, tandis qu'une corrélation directe entre la concentration en gadolinium et l'intensité du signal est observée tant pour les nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS que pour le Dotarem®.

Plus intéressant encore, les nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS génèrent une exaltation du signal plus importante que le Dotarem®, proche d'un facteur 2 voire 3, à concentration équivalentes (Figure 46 (B)). Ces observations en IRM corroborent parfaitement les données obtenues par l'étude des profils NMRD, confirmant ainsi l'amplification majeure du contraste lorsque le HGdDOTA est encapsulé dans les nanohydrogels.

Bien que ces résultats soient limités au cadre *in vitro,* ils suggèrent néanmoins un très fort potentiel de cette formulation pour la vectorisation de substance active pour le diagnostic.

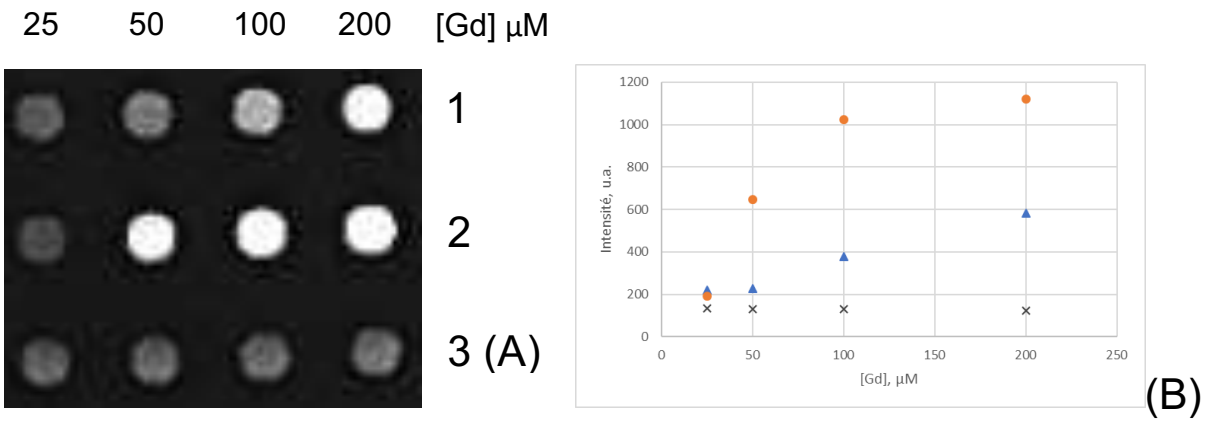

Figure 46 – (A) Images T_1 en IRM du Dotarem® (ligne 1) et des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS (ligne 2) en fonction de la concentration en Gd, et de l'eau (ligne 3). (B) Intensités lumineuses déterminées d'après les ROI de l'image T_1 du Dotarem ® (triangles) et des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS (cercles) en fonction de la concentration en Gd et valeurs de la ligne de l'eau (croix)

2.5.4. Tests de biocompatibilité

Les tests biologiques ont été réalisés par le Dr. Sorina Voicu, sous la supervision du Pr. Anca Dinischiotu, du Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculté de Biologie de Bucarest (Roumanie).

L'évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS a été réalisée sur la lignée macrophagique RAW 264.7 par les tests au MTT et de libération de LDH sur une gamme de concentrations de 2,5 à 50 μg/ml à 24h et 48h. Les résultats du test MTT révèlent une excellente activité métabolique entre 100 et 108% pour toutes les concentrations testées, sans différence significative entre 24 et 48h d'exposition (Figure 47). Ces résultats doivent cependant être contrôlés par un deuxième test pour s'assurer que les cultures cellulaires ne mettent pas en place des processus de prolifération pour compenser un stress ou de mort cellulaire induite par les échantillons. Le test LDH confirme l'absence de cytotoxicité avec une libération enzymatique maintenue entre 100% et 107% par rapport au contrôle, prouvant l'intégrité des membranes cellulaire et l'absence de lyse. L'absence de toxicité valide alors l'innocuité de cette formulation sur les cellules du système immunitaire représentées par les macrophages. Ces résultats sur la lignée de macrophages RAW 264.7 ne sont pas tout à fait identiques à ceux obtenus avec la formulation de CS-HGdDOTA/ChS, bien qu'étant aussi biocompatible. En effet, il est à noter une légère diminution de l'activité métabolique à partir de 50 μg/ml en nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS, déjà discuté précédemment, qui n'est pas observé avec les nanoparticules de PLL/ChS et de CS/HA/TPP

L'évaluation de la biocomptabilité des nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS sur la lignée endothéliale SVEC 4-10 confirme l'excellente innocuité observée précédemment. Le test au MTT révèle une activité métabolique maintenue à 100% à 24h pour toutes les concentrations testées (2,5 à 50 μg/ml), avec une légère évolution à 48h montrant une augmentation de la viabilité atteignant 110-115%, suggérant un léger effet prolifératif des nanoparticules sur les cellules endothéliales (Figure 48). Pour s'assurer que ce phénomène n'est pas une conséquence d'un stress cellulaire ou d'un effet compensatoire à la dégradation membranaire des cellules en cultures, le test LDH a été effectué. Ce test met en évidence une libération enzymatique stable

autour de 100% du contrôle à tous les temps et toutes les concentrations testées, confirmant l'absence de dommages cellulaires. Les nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS présentent une très bonne biocompatibilité sur les lignées de cellules endothéliales, très fortement similaire à celle des nanoparticules de CS-HGdDOTA/ChS et de CS/HA/TPP.

Alors que la αPLL est parfois présentée comme ayant un effet cytotoxique (274–276), ces résultats démontrent que la formulation mise au point dans le cadre de ce travail préserve l'intégrité de cellules ubiquitaires comme les macrophages (RAW 264.7) ou encore les cellules endothéliales (SVEC 4-10).

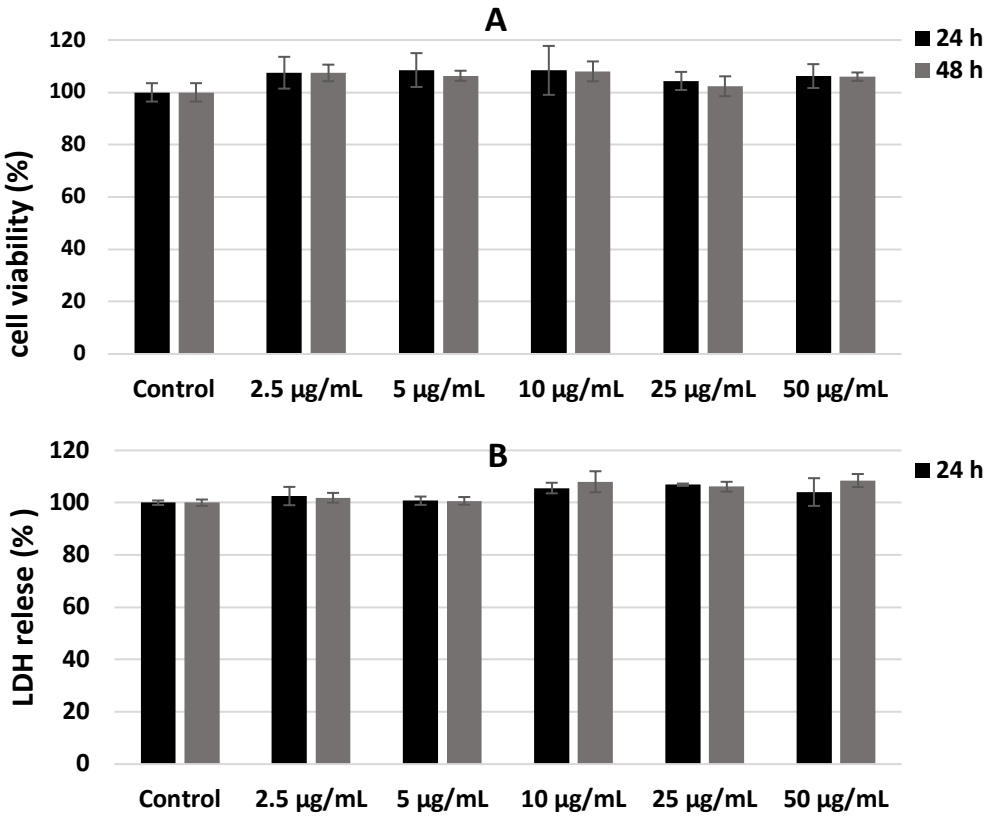

Figure 47 - Viabilité des cellules RAW 264.7 par test au MTT (A) et essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS

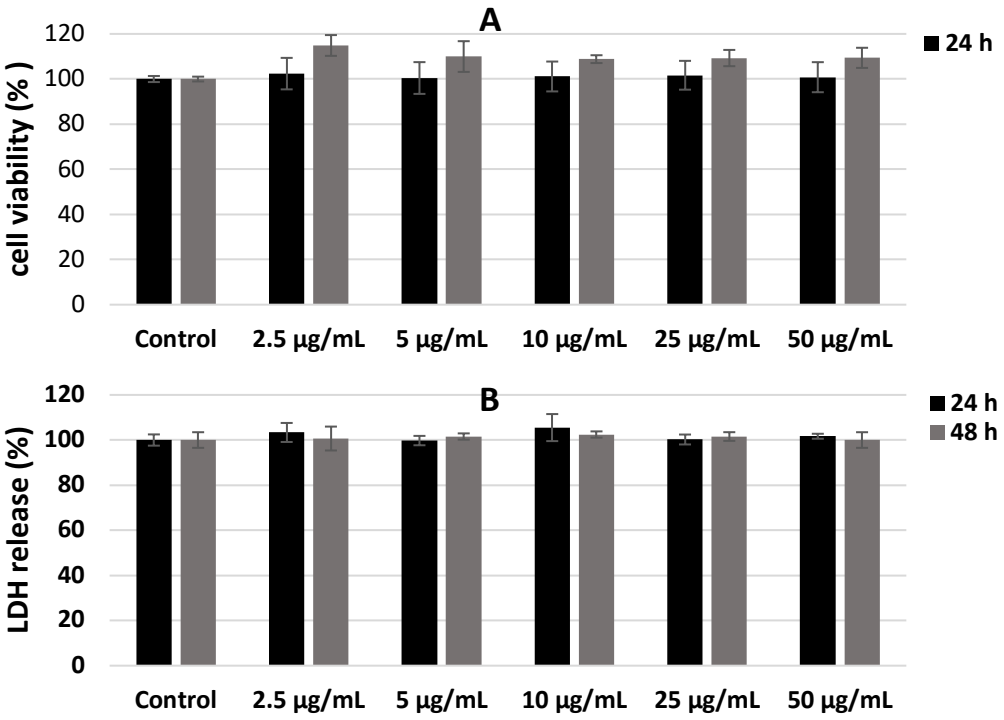

Figure 48 - Viabilité des cellules SVEC4-10 par test au MTT (A) et essai de libération de LDH (B), après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations en nanoparticules de PLL-HGdDOTA/ChS.

2.6. Conclusion

Le développement d'une nouvelle formulation de nanoparticules à base de poly-L-lysine et de chondroïtine sulfate s'inscrit dans une démarche d'amélioration des systèmes de nanoparticules destinés à la vectorisation d'agents de contraste pour l'IRM. Cette approche est motivée par les limitations identifiées des systèmes à base de chitosane, notamment leur instabilité prononcée dans les milieux mimant les conditions physiologiques. L'utilisation de la αPLL comme polymère cationique constitue une alternative permettant de s'affranchir des contraintes liées au pH du chitosane, tout en conservant les avantages d'une mise en forme par chimie douce grâce à la gélification ionique.

Lors de l'étude, le rapport des masses entre les polymères et la vitesse d'agitation lors du mélange ont été identifiés comme déterminants pour obtenir des nanoparticules d'environ 140 nm avec un indice de polydispersité de 0,13, et une charge de surface suffisamment négative (-43 mV) pour prévenir l'agrégation.

Les tests de stabilité réalisés sur cette formulation optimisée constituent l'un des apports majeurs de ce travail, car ils démontrent les avantages de la formulation PLL/ChS par rapport aux systèmes à base de chitosane. Les nanoparticules de PLL/ChS résistent aux variations de force ionique, avec une augmentation modérée du diamètre (de 170 à 202 nm dans le NaCl 0,9 % m/V), attestant de la bonne réticulation du réseau polymérique formé. De plus, la stabilité dans le tampon phosphate à pH 7,4 (185 nm, PdI 0,14) est confirmée : l'état d'ionisation des deux polymères étant stable dans les conditions testées, il permet d'établir un réseau d'interactions électrostatiques denses et stables à pH physiologique. Malgré l'écrantage d'une partie des charges de surface quand la force ionique augmente, le potentiel zêta négatif élevé (-43 mV) permet de maintenir la stabilité colloïdale par répulsions électrostatiques.

La concentration en gadolinium déterminée dans les nanoparticules ($2{,}5\times10^{-4}$ M pour la formulation PLL-HGdDOTA/ChS) démontre la capacité de la formulation à encapsuler le complexe de gadolinium. De plus, l'absence totale de libération après 72 heures d'incubation en tampon phosphate à 37°C témoigne d'une séquestration efficace du complexe au sein du réseau de nanoparticules. Cette rétention prolongée, bien que nécessitant une confirmation est intéressante car elle garantit que l'ensemble du gadolinium encapsulé contribuera effectivement au signal IRM tout au long de l'examen d'imagerie. D'ailleurs, l'étude de la relaxivité de cette formulation démontre une forte exaltation du signal par NMRD ainsi qu'une intensité de signal en IRM nettement supérieure à celle du Dotarem® à concentrations équivalentes en gadolinium.

Ce travail présentant le développement réussi d'une formulation de nanoparticules associant PLL et ChS permet d'envisager leur utilisation pour la vectorisation d'agents de contraste IRM. Les nanoparticules obtenues répondent aux critères requis pour une application en santé humaine : des dimensions comprises entre 100 et 300 nm de façon à pouvoir envisager différentes voies d'administration, une monodispersité satisfaisante, une stabilité en conditions physiologiques, une capacité d'encapsulation efficace du HGdDOTA avec rétention prolongée, une excellente biocompatibilité et des performances contrastophores amplifiées. Cette dernière propriété permet d'envisager une diminution des doses de Gd à injecter lors des examens médicaux, réduisant de

fait les risques d'effets secondaires indésirables. Au-delà de ces résultats, ce travail apporte également des éléments de compréhension sur les mécanismes de formation et de stabilisation des nanohydrogels obtenus par gélification ionique. L'étape suivante consistera à évaluer le comportement *in vivo* de ces nanoparticules. Des études de pharmacocinétique et d'efficacité diagnostique sur modèles animaux devront être menées pour confirmer le potentiel clinique de cette formulation.

Conclusions et perspectives

Ce travail doctoral avait pour ambition de développer de nouveaux outils diagnostiques pour l'imagerie par résonance magnétique, en réponse à une problématique clinique majeure : améliorer l'efficacité des agents de contraste à base de gadolinium tout en réduisant les doses administrées aux patients. La stratégie adoptée reposait sur l'encapsulation d'un complexe de gadolinium (HGdDOTA) au sein de nanohydrogels de biopolymères, élaborés par gélification ionique selon une approche de chimie verte.

Trois objectifs principaux structuraient ce projet : (i) maîtriser la formulation de nanoparticules présentant des propriétés compatibles avec une utilisation en santé humaine, (ii) comprendre leur comportement dans des conditions mimant le milieu physiologique, et (iii) évaluer l'efficacité du complexe de gadolinium une fois encapsulé.

L'exploration de quatre systèmes de gélification ionique a permis d'identifier les paramètres clés gouvernant les propriétés des nanohydrogels : le rapport de masse des polymères de charges opposées, le pH de la formulation et les conditions d'agitation. La compréhension fine de ces paramètres a conduit à l'obtention de deux formulations répondant aux spécifications fixées initialement (taille nanométrique comprise entre 100 et 300 nm, polydispersité réduite et charge de surface négative).

L'étude du comportement de ces nanoparticules en milieu physiologique a révélé des différences de stabilité selon la nature des polymères utilisés. Si les systèmes à base de chitosane présentent des limites en termes de stabilité à pH physiologique, à cause de sa très faible solubilité à ce pH, la formulation de PLL/ChS s'est distinguée par une stabilité remarquable dans l'ensemble des conditions testées, y compris après dialyse. Cette supériorité s'explique par le maintien à pH physiologique de la solubilité, et de la charge, des deux polymères engagés dans le réseau et par des interactions électrostatiques efficaces entre les deux polymères.

Concernant l'efficacité en tant qu'agent de contraste, ce travail a démontré que la nanoencapsulation du HGdDOTA dans les deux formulations optimisées, permet effectivement d'amplifier significativement les propriétés relaxométriques du complexe. L'augmentation de la relaxivité atteint un facteur 12 à 1,5 T pour la formulation PLL-HGdDOTA/ChS en NMRD, se traduisant par une amélioration d'un

facteur 3 du signal IRM à 3 T comparativement à la forme commerciale libre. Cette amélioration s'accompagne d'une bonne rétention du complexe dans les nanohydrogels et d'une biocompatibilité excellente.

Au-delà des résultats obtenus, ce travail apporte une contribution méthodologique à la conception des nanovecteurs par gélification ionique. La démarche développée, fondée sur la compréhension des interactions électrostatiques et de leur modulation par les paramètres physico-chimiques, constitue un cadre transposable à d'autres systèmes nanoparticulaires à base de biopolymères.

Cependant certaines parties de ce travail nécessitent d'être approfondies. La réticulation des formulations de CS/ChS et de CS/HA mérite d'être renforcée pour permettre d'obtenir une meilleure stabilité colloïdale. Les premiers résultats obtenus avec l'EDC suggèrent qu'une optimisation des conditions de réticulation covalente pourrait conduire à une stabilisation efficace du réseau en milieu physiologique et face à des milieux de force ionique croissante. En quantifiant la formation de ces liaisons covalentes entre les polymères par RMN, ou IR-FT par exemple, les conditions pourraient être plus finement ajustées. Cette piste, qui n'a pu être pleinement explorée dans le cadre de ce travail, mérite d'être approfondie.
De plus, bien que la spectroscopie photoélectronique X (XPS) ait fourni des indications précieuses sur l'architecture de surface des nanoparticules, une étude plus approfondie apparaît nécessaire pour consolider ces observations. Des analyses complémentaires par d'autres techniques pourraient permettre d'apprécier l'organisation spatiale des polymères au sein du réseau. Parmi celles-ci, une mesure de l'effet FRET (Förster Resonance Energy Transfer) pourrait apporter des informations intéressantes. Cet effet repose sur la mesure de l'énergie transférée d'un composé donneur vers un composé accepteur si les deux molécules sont suffisamment proches spatialement. En utilisant une paire donneur/accepteur de molécules fluorescentes telles que la Rhodamine et la Fluorescéine, greffées séparément sur chacun des deux polymères, l'évaluation du transfert d'énergie devrait apporter une meilleure compréhension de la structure tridimensionnelle des nanohydrogels et de la distribution des différents polyélectrolytes.

Au-delà de l'optimisation des formulations existantes, une investigation plus poussée de certains paramètres influençant la stabilité colloïdale enrichirait significativement la compréhension des phénomènes interfaciaux. L'étude de l'influence de la masse moléculaire des polyanions, pourrait être étudiée, notamment en testant des chondroïtines sulfates de plus haute et plus faible masses molaires, ce qui permettrait de mieux appréhender le rôle de ce paramètre sur la cohésion du réseau de polymères et sa résistance aux contraintes physiologiques. Dans cette même logique, l'exploration d'autres polyanions apporterait des éléments de compréhension supplémentaires sur l'impact de la nature et de la structure des polymères, tant sur la stabilité des nanohydrogels que sur l'efficacité de l'agent de contraste encapsulé.

D’un point de vue plus applicatif, la voie d’administration qui sera retenue pour l’utilisation de ces structures nanogels va également contribuer au cahier des charges de la formulation. Dans le cas où l’objectif est la détection précoce des cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques, une administration par voie sous-cutanée peut être envisagée. Les particules destinées à être injectées dans ce tissu devront avoir une mobilité suffisante pour quitter le point d’injection et être captées par le système lymphatique qui les mènera jusqu’aux ganglions sentinels. La charge de surface négative de nos nanogels devrait permettre de réduire les interactions électrostatiques avec les GAG majoritairement chargées négativement et présents en grandes quantités dans les matrices extra-cellulaires. Pour améliorer encore davantage la mobilité des nanoparticules, un greffage par des PEG pourrait être envisagé.
Dans le cas d’une formulation à visée systémique, la voie intra-veineuse serait privilégiée. Plusieurs paramètres sont alors à prendre en compte : tout d’abord une injection dans le système circulatoire impose un flux diluant et circulant, dont les effets sur les nanoparticules ne sont pour l’heure pas connus. De plus, la présence des protéines plasmatiques et des éléments figurés du sang aura inéluctablement des répercussions sur la stabilité des nanogels, dont on ignore l’étendue. Pour pouvoir décortiquer et comprendre les phénomènes, il nous a fallu passer par des modèles d’étude simplifiés, ce qui a forcément eu pour conséquence de négliger l’influence d’autres paramètres. C’est pourquoi le devenir de nos formulations *in vivo* devrait faire l’objet d’un travail ultérieur.

Pour conclure, la formulation de PLL-HGdDOTA/ChS, qui conjugue stabilité colloïdale, biocompatibilité et efficacité diagnostique, représente une avancée concrète vers le développement d'agents de contraste de nouvelle génération pour l'IRM. Ses performances permettent d'envisager le passage aux évaluations *in vivo* dans un avenir proche, ouvrant ainsi la voie à une possible réduction des doses de gadolinium administrées aux patients tout en améliorant la qualité diagnostique des examens IRM.

Annexe

Annexe 1 : Tableau complet des modifications des différents paramètres de formulation des nanoparticules de CS/ChS

PARAMÈTRES DE FORMULATION								RÉSULTATS		
[CS] (mg/mL)	[ChS] (mg/mL)	pH	Ratio masse (CS:ChS)	Débit pompe (mL/min)	Sonication (min)	Agitation (rpm)	Temps de repos (h)	D_H (nm)	PdI	ZP (mV)
0,5	1	3	1:1	Pipette graduée	1	0	0	508 ± 87	0,42 ± 0,07	42,6 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	Pipette graduée	1	0	0	901 ± 152	0,39 ± 0,07	43,9 ± 6
0,5	1	3	1:3	Pipette graduée	1	0	0	234 ± 32	0,39 ± 0,04	-18 ± 4
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	Pipette graduée	1	0	0	264 ± 27	0,41 ± 0,06	-29 ± 3
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	1	0	0	246 ± 24	0,30 ± 0,07	-37 ± 1
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	2,8	1	0	0	261 ± 19	0,31 ± 0,07	-36 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	2,6	1	0	0	267 ± 25	0,32 ± 0,03	-35 ± 3
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	0	0	0	527 ± 39	0,50 ± 0,02	42 ± 3
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	0	1200	0	489 ± 48	0,36 ± 0,05	43 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	1	0	0	403 ± 91	0,30 ± 0,10	42 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	1	1200	0	628 ± 61	0,60 ± 0,10	42 ± 1
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	5	0	0	502 ± 111	0,30 ± 0,01	46 ± 11
0,5	1	Ajusté à 4	1:1	3,6	5	1200	0	665 ± 61	0,55 ± 0,04	42 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	0	0	246 ± 12	0,30 ± 0,02	-38 ± 1
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	1200	0	135 ± 4	0,28 ± 0,02	-37 ± 1
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	1	0	0	250 ± 18	0,30 ± 0,08	-34 ± 4
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	1	1200	0	129 ± 4	0,23 ± 0,01	-34 ± 4
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	5	0	0	213 ± 6	0,26 ± 0,01	-38 ± 0
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	5	1200	0	130 ± 2	0,16 ± 0,01	-35 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	0	0	246 ± 24	0,30 ± 0,07	-37 ± 1
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	0	3	220 ± 17	0,27 ± 0,07	-37 ± 2
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	0	6	231 ± 13	0,27 ± 0,04	-34 ± 3
0,5	1	Ajusté à 4	1:3	3,6	0	0	15	260 ± 32	0,30 ± 0,05	-34 ± 2
0,5	1	3	1:3	3,6	0	0	0	230 ± 8	0,38 ± 0,01	-30 ± 1
0,5	1	3	1:3	3,6	0	1200	0	126 ± 1	0,22 ± 0	-28 ± 1
0,5	1	3	1:3	3,6	1	0	0	218 ± 2	0,29 ± 0,03	-27 ± 0
0,5	1	3	1:3	3,6	1	1200	0	119 ± 2	0,17 ± 0,01	-28 ± 0
0,5	1	3	1:3	3,6	5	0	0	202 ± 1	0,25 ± 0,02	-25 ± 1
0,5	1	3	1:3	3,6	5	1200	0	127 ± 1	0,16 ± 0,02	-24 ± 2

Bibliographie

1. Cheung C, Al-Jamal WT. Liposomes-Based Nanoparticles for Cancer Therapy and Bioimaging. In: Gonçalves G, Tobias G, éditeurs. Nanooncology. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 51-87. (Nanomedicine and Nanotoxicology).
2. Duan Y, Dhar A, Patel C, Khimani M, Neogi S, Sharma P, et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. RSC Adv. juill 2020;10(45):26777-91.
3. Carvalho MR, Reis RL, Oliveira JM. Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications. J Mater Chem B. janv 2020;8(6):1128-38.
4. Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. Front Pharmacol. févr 2021;12:601626.
5. Liu J. Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. Front Bioeng Biotechnol. août 2020;8:990.
6. Sangaiya P, Jayaprakash R. A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. J Supercond Nov Magn. nov 2018;31(11):3397-413.
7. Morfin JF, Beloeil JC, Tóth É. Agents de contraste pour l'IRM [Internet]. Vol. base documentaire : TIP597WEB., Techniques de l'ingénieur Technologies pour la santé. Editions T.I.; 2014. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/imagerie-medicale-therapies-par-ondes-42607210/agents-de-contraste-pour-l-irm-af6818/
8. Malytskyi V, Moreau J, Callewaert M, Rigaux G, Cadiou C, Laurent S, et al. Organic nanoparticles and gadolinium chelates: seeking hypersensitive probes for T1 magnetic resonance imaging. In: Materials for Biomedical Engineering. Elsevier; 2019. p. 425-76.
9. Andrieux K, Couvreur P. Nanoparticules pour la délivrance cérébrale de principes actifs ou d'agents de contraste. Application à la maladie d'Alzheimer. Biol Aujourdhui. 2012;206(3):185-90.
10. Tang W, Wang J, Hou H, Li Y, Wang J, Fu J, et al. Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. Int J Biol Macromol. juin 2023;240:124398.
11. Yuan N, Shao K, Huang S, Chen C. Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. Int J Biol Macromol. juin 2023;240:124321.

12. Andrade Del Olmo J, Pérez-Álvarez L, Sáez Martínez V, Benito Cid S, Ruiz-Rubio L, Pérez González R, et al. Multifunctional antibacterial chitosan-based hydrogel coatings on Ti6Al4V biomaterial for biomedical implant applications. Int J Biol Macromol. mars 2023;231:123328.
13. Del Olmo JA, Pérez-Álvarez L, Pacha-Olivenza MÁ, Ruiz-Rubio L, Gartziandia O, Vilas-Vilela JL, et al. Antibacterial catechol-based hyaluronic acid, chitosan and poly (N-vinyl pyrrolidone) coatings onto Ti6Al4V surfaces for application as biomedical implant. Int J Biol Macromol. juill 2021;183:1222-35.
14. Da Silva MC, Da Silva HN, Alves Leal Cruz RDC, Sagoe Amoah SK, De Lima Silva SM, Lia Fook MV. N-Acetyl-D-Glucosamine-Loaded Chitosan Filaments Biodegradable and Biocompatible for Use as Absorbable Surgical Suture Materials. Materials. 4 juin 2019;12(11):1807.
15. Deng X, Gould M, Ali MA. Fabrication and characterisation of melt-extruded chitosan/keratin/PCL/PEG drug-eluting sutures designed for wound healing. Mater Sci Eng C. janv 2021;120:111696.
16. Giacalone G, Bochot A, Fattal E, Hillaireau H. Drug-Induced Nanocarrier Assembly as a Strategy for the Cellular Delivery of Nucleotides and Nucleotide Analogues. Biomacromolecules. 11 mars 2013;14(3):737-42.
17. Intracytoplasmic Trafficking of Nanoparticles based on Hyaluronic Acid and Chitosan for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. Biointerface Res Appl Chem. 11 sept 2022;13(4):344.
18. Kim DH, Jeong EW, Baek Y, Lee HG. Development of propolis extract-loaded nanoparticles with chitosan and hyaluronic acid for improving solubility and stability. LWT. mai 2023;181:114738.
19. Siddiqui B, Ur Rehman A, Gul R, Chaudhery I, Shah KU, Ahmed N. Folate decorated chitosan-chondroitin sulfate nanoparticles loaded hydrogel for targeting macrophages against rheumatoid arthritis. Carbohydr Polym. mars 2024;327:121683.
20. Moghadam NA, Bagheri F, Eslaminejad MB. Chondroitin sulfate modified chitosan nanoparticles as an efficient and targeted gene delivery vehicle to chondrocytes. Colloids Surf B Biointerfaces. nov 2022;219:112786.
21. Manjusha V, Rajeev MR, Anirudhan TS. Magnetic nanoparticle embedded chitosan-based polymeric network for the hydrophobic drug delivery of paclitaxel. Int J Biol Macromol. avr 2023;235:123900.

22. Ashrafizadeh M, Hushmandi K, Mirzaei S, Bokaie S, Bigham A, Makvandi P, et al. Chitosan-based nanoscale systems for doxorubicin delivery: Exploring biomedical application in cancer therapy. Bioeng Transl Med [Internet]. janv 2023 [cité 11 août 2023];8(1). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btm2.10325
23. Albarqi HA, Garg A, Ahmad MZ, Alqahtani AA, Walbi IA, Ahmad J. Recent Progress in Chitosan-Based Nanomedicine for Its Ocular Application in Glaucoma. Pharmaceutics. 17 févr 2023;15(2):681.
24. Yu C, Wang S, Lai WF, Zhang D. The Progress of Chitosan-Based Nanoparticles for Intravesical Bladder Cancer Treatment. Pharmaceutics. 7 janv 2023;15(1):211.
25. Seyam S, Nordin NA, Alfatama M. Recent Progress of Chitosan and Chitosan Derivatives-Based Nanoparticles: Pharmaceutical Perspectives of Oral Insulin Delivery. Pharmaceuticals. 14 oct 2020;13(10):307.
26. Mikušová V, Mikuš P. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. Int J Mol Sci. 6 sept 2021;22(17):9652.
27. Ho YC, Liao ZX, Panda N, Tang DW, Yu SH, Mi FL, et al. Self-organized nanoparticles prepared by guanidine- and disulfide-modified chitosan as a gene delivery carrier. J Mater Chem. 2011;21(42):16918.
28. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. Carbohydr Polym. nov 2018;199:445-60.
29. Huynh A, Priefer R. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. Carbohydr Res. mars 2020;489:107950.
30. Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. Front Vet Sci. 25 juin 2019;6:192.
31. Yasin A, Ren Y, Li J, Sheng Y, Cao C, Zhang K. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. Front Bioeng Biotechnol. 4 juill 2022;10:910290.
32. F M. Hyaluronic Acid and Derivatives for Tissue Engineering. J Biotechnol Biomater [Internet]. 2013 [cité 15 août 2023];s3. Disponible sur: https://www.omicsonline.org/hyaluronic-acid-and-derivatives-for-tissue-engineering-2155-952X.1000S3-001.php?aid=2518

33. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. Int J Biol Macromol. mai 2020;151:1012-29.
34. Dong Y, An IS, Ma L, An S. Welcome to a new era of Biomedical Dermatology. Biomed Dermatol. déc 2017;1(1):3, s41702-017-0001-8.
35. Li X, Cui T, Zhang W, Zhai Z, Wu F, Zhang Y, et al. Dopamine-functionalized hyaluronic acid microspheres for effective capture of CD44-overexpressing circulating tumor cells. Colloids Surf B Biointerfaces. déc 2020;196:111281.
36. Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD. A Hyaluronic Acid−Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells. Biomacromolecules. 1 juin 2000;1(2):208-18.
37. Husseini GA, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. juin 2008;60(10):1137-52.
38. Zhao L, Liu M, Wang J, Zhai G. Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery. Carbohydr Polym. nov 2015;133:391-9.
39. Ji Y, Zhang S, Qiao M, Jiao R, Li J, Song P, et al. Synthesis of structurally defined chondroitin sulfate: Paving the way to the structure-activity relationship studies. Carbohydr Polym. nov 2020;248:116796.
40. HAS (Haute autorité de sante) Avis du 9 janvier 2013 de la commission de la transparence [Internet]. [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-02/chondrosulf_ri2012_avis2modifie17jan2013_ct9852.pdf
41. Wang K, Bai F, Zhou X, Wang J, Li Y, Xu H, et al. Characterization of chondroitin sulfates isolated from large hybrid sturgeon cartilage and their gastroprotective activity against ethanol-induced gastric ulcers. Food Chem. nov 2021;363:130436.
42. Bačić G, Pavićević A, Peyrot F. In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques. Redox Biol. août 2016;8:226-42.
43. Jain A, Mishra SK, Vuddanda PR, Singh SK, Singh R, Singh S. Targeting of diacerein loaded lipid nanoparticles to intra-articular cartilage using chondroitin sulfate as homing carrier for treatment of osteoarthritis in rats. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. juill 2014;10(5):e1031-40.

44. Cho HJ, Oh J, Choo MK, Ha JI, Park Y, Maeng HJ. Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin. Int J Biol Macromol. févr 2014;63:15-20.
45. Amhare AF, Lei J, Deng H, Lv Y, Han J, Zhang L. Biomedical application of chondroitin sulfate with nanoparticles in drug delivery systems: systematic review. J Drug Target. 16 mars 2021;29(3):259-68.
46. Hu CS, Tang SL, Chiang CH, Hosseinkhani H, Hong PD, Yeh MK. Characterization and anti-tumor effects of chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles delivery system. J Nanoparticle Res. nov 2014;16(11):2672.
47. Abdullah T, Ibrahim N, Warsi M. Chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles for ocular delivery of bromfenac sodium: Improved permeation, retention, and penetration. Int J Pharm Investig. 2016;6(2):96.
48. Yeh M kung, Cheng K ming, Hu C shen, Huang Y chuan, Young J jong. Novel protein-loaded chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. Acta Biomater. oct 2011;7(10):3804-12.
49. Rezazadeh M, Parandeh M, Akbari V, Ebrahimi Z, Taheri A. Incorporation of rosuvastatin-loaded chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles into a thermosensitive hydrogel for bone tissue engineering: preparation, characterization, and cellular behavior. Pharm Dev Technol. mars 2019;24(3):357-67.
50. Sanchez-Ballester NM, Bataille B, Soulairol I. Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. Carbohydr Polym. oct 2021;270:118399.
51. Peteiro C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: Rehm BHA, Moradali MF, éditeurs. Alginates and Their Biomedical Applications [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [cité 16 août 2023]. p. 27-66. (Springer Series in Biomaterials Science and Engineering; vol. 11). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-6910-9_2
52. Abasalizadeh F, Moghaddam SV, Alizadeh E, Akbari E, Kashani E, Fazljou SMB, et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. J Biol Eng. déc 2020;14(1):8.
53. Kontominas MG. Use of Alginates as Food Packaging Materials. Foods. 12 oct 2020;9(10):1440.

54. Ruocco N, Costantini S, Guariniello S, Costantini M. Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. Molecules. 27 avr 2016;21(5):551.
55. Fu S, Thacker A, Sperger DM, Boni RL, Buckner IS, Velankar S, et al. Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties. AAPS PharmSciTech. juin 2011;12(2):453-60.
56. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. Prog Polym Sci. avr 2008;33(4):448-77.
57. Shen H, Li F, Wang D, Yang Z, Yao C, Ye Y, et al. Chitosan–alginate BSA-gel-capsules for local chemotherapy against drug-resistant breast cancer. Drug Des Devel Ther. avr 2018;Volume 12:921-34.
58. Liu M, Song X, Wen Y, Zhu JL, Li J. Injectable Thermoresponsive Hydrogel Formed by Alginate- *g* -Poly(*N* -isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin-Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. ACS Appl Mater Interfaces. 18 oct 2017;9(41):35673-82.
59. Song W, Su X, Gregory D, Li W, Cai Z, Zhao X. Magnetic Alginate/Chitosan Nanoparticles for Targeted Delivery of Curcumin into Human Breast Cancer Cells. Nanomaterials. 5 nov 2018;8(11):907.
60. Shad PM, Karizi SZ, Javan RS, Mirzaie A, Noorbazargan H, Akbarzadeh I, et al. Folate conjugated hyaluronic acid coated alginate nanogels encapsulated oxaliplatin enhance antitumor and apoptosis efficacy on colorectal cancer cells (HT29 cell line). Toxicol In Vitro. juin 2020;65:104756.
61. Sun Z, Yi Z, Zhang H, Ma X, Su W, Sun X, et al. Bio-responsive alginate-keratin composite nanogels with enhanced drug loading efficiency for cancer therapy. Carbohydr Polym. nov 2017;175:159-69.
62. Szekalska M, Puciłowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. Int J Polym Sci. 2016;2016:1-17.
63. Summa M, Russo D, Penna I, Margaroli N, Bayer IS, Bandiera T, et al. A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing. Eur J Pharm Biopharm. janv 2018;122:17-24.

64. López BL, Palacio- Betancort J. Poly(lactic acid): Synthesis, modification and applications in controlled drug delivery. Rev Acad Colomb Cienc Exactas Físicas Nat [Internet]. 31 juill 2023 [cité 16 août 2023]; Disponible sur: https://raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1770
65. Petinakis E, Yu L, Simon G, De K. Natural Fibre Bio-Composites Incorporating Poly(Lactic Acid). In: Masuelli M, éditeur. Fiber Reinforced Polymers - The Technology Applied for Concrete Repair [Internet]. InTech; 2013 [cité 16 août 2023]. Disponible sur: http://www.intechopen.com/books/fiber-reinforced-polymers-the-technology-applied-for-concrete-repair/natural-fibre-bio-composites-incorporating-poly-lactic-acid-
66. Li X, Lin Y, Liu M, Meng L, Li C. A review of research and application of polylactic acid composites. J Appl Polym Sci [Internet]. 15 févr 2023 [cité 16 août 2023];140(7). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.53477
67. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev. déc 2016;107:163-75.
68. DeStefano V, Khan S, Tabada A. Applications of PLA in modern medicine. Eng Regen. 2020;1:76-87.
69. Casalini T, Rossi F, Castrovinci A, Perale G. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. Front Bioeng Biotechnol. 11 oct 2019;7:259.
70. El-Say KM, El-Sawy HS. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. Int J Pharm. août 2017;528(1-2):675-91.
71. Göktürk E, Pemba AG, Miller SA. Polyglycolic acid from the direct polymerization of renewable C1 feedstocks. Polym Chem. 2015;6(21):3918-25.
72. Yamane K, Sato H, Ichikawa Y, Sunagawa K, Shigaki Y. Development of an industrial production technology for high-molecular-weight polyglycolic acid. Polym J. nov 2014;46(11):769-75.
73. Song R, Murphy M, Li C, Ting K, Soo C, Zheng Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. Drug Des Devel Ther. sept 2018;Volume 12:3117-45.
74. Schmitt E, Albert R, Chester P. Surgical sutures. 3297033, 1967.
75. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, et al. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. Polymers. 29 mars 2016;8(4):115.

76. Ueda H, Tabata Y. Polyhydroxyalkanonate derivatives in current clinical applications and trials. Adv Drug Deliv Rev. avr 2003;55(4):501-18.
77. Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering. Bone. févr 2010;46(2):386-95.
78. Toosi S, Naderi-Meshkin H, Kalalinia F, Peivandi MT, HosseinKhani H, Bahrami AR, et al. PGA-incorporated collagen: Toward a biodegradable composite scaffold for bone-tissue engineering: PGA-COLLAGEN COMPOSITE SCAFFOLD. J Biomed Mater Res A. août 2016;104(8):2020-8.
79. Semwal R, Semwal RB, Semwal DK. Drug Delivery Systems: Selection Criteria and Use. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials [Internet]. Taylor & Francis; 2015 [cité 23 août 2023]. p. 2938-49. Disponible sur: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/E-EBPP-120050409
80. Budak K, Sogut O, Aydemir Sezer U. A review on synthesis and biomedical applications of polyglycolic acid. J Polym Res. août 2020;27(8):208.
81. Felix Lanao R, Jonker A, Wolke J, Jansen J, van Hest J, Leeuwenburgh S. Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. 09/2013. 19(4):380-90.
82. Koerner J, Horvath D, Groettrup M. Harnessing Dendritic Cells for Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres (PLGA MS)—Mediated Anti-tumor Therapy. Front Immunol. 5 avr 2019;10:707.
83. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers. 26 août 2011;3(3):1377-97.
84. Allison SD. Effect Of Structural Relaxation On The Preparation And Drug Release Behavior Of Poly(lactic-co-glycolic)acid Microparticle Drug Delivery Systems. J Pharm Sci. juin 2008;97(6):2022-35.
85. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Controlled Release. févr 2008;125(3):193-209.
86. Mohamed F, Van Der Walle CF. Engineering Biodegradable Polyester Particles With Specific Drug Targeting and Drug Release Properties. J Pharm Sci. janv 2008;97(1):71-87.
87. Godin B, Sakamoto JH, Serda RE, Grattoni A, Bouamrani A, Ferrari M. Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases. Trends Pharmacol Sci. mai 2010;31(5):199-205.

88. Arafa MG, Girgis GN, El-Dahan MS. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles for Enhanced Ocular Anti-Inflammatory Efficacy of Atorvastatin Calcium. Int J Nanomedicine. févr 2020;Volume 15:1335-47.
89. Pardeshi SR, Nikam A, Chandak P, Mandale V, Naik JB, Giram PS. Recent advances in PLGA based nanocarriers for drug delivery system: a state of the art review. Int J Polym Mater Polym Biomater. 2 janv 2023;72(1):49-78.
90. Liu P, Chen N, Yan L, Gao F, Ji D, Zhang S, et al. Preparation, characterisation and in vitro and in vivo evaluation of CD44-targeted chondroitin sulphate-conjugated doxorubicin PLGA nanoparticles. Carbohydr Polym. juin 2019;213:17-26.
91. Huey R, O'Hagan B, McCarron P, Hawthorne S. Targeted drug delivery system to neural cells utilizes the nicotinic acetylcholine receptor. Int J Pharm. juin 2017;525(1):12-20.
92. Luiz MT, Abriata JP, Raspantini GL, Tofani LB, Fumagalli F, De Melo SMG, et al. In vitro evaluation of folate-modified PLGA nanoparticles containing paclitaxel for ovarian cancer therapy. Mater Sci Eng C. déc 2019;105:110038.
93. Callewaert M, Dukic S, Van Gulick L, Vittier M, Gafa V, Andry MC, et al. Etoposide encapsulation in surface-modified poly(lactide- *co* -glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency. J Biomed Mater Res A. mai 2013;101A(5):1319-27.
94. Kuo YC, Chen YC. Targeting delivery of etoposide to inhibit the growth of human glioblastoma multiforme using lactoferrin- and folic acid-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. Int J Pharm. févr 2015;479(1):138-49.
95. Shi W, Fuad ARM, Li Y, Wang Y, Huang J, Du R, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles increase risk of cardiovascular diseases by inducing endothelium dysfunction and inflammation. J Nanobiotechnology. 24 févr 2023;21(1):65.
96. Pawar R, Pathan A, Nagaraj S, Kapare H, Giram P, Wavhale R. Polycaprolactone and its derivatives for drug delivery. Polym Adv Technol. 14 juill 2023;pat.6140.
97. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. J Oral Biol Craniofacial Res. janv 2020;10(1):381-8.

98. Bartnikowski M, Dargaville TR, Ivanovski S, Hutmacher DW. Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. Prog Polym Sci. sept 2019;96:1-20.
99. Martín Giménez VM, Díaz-Rodríguez P, Sanz RL, Vivero-Lopez M, Concheiro A, Diez E, et al. Anandamide-nanoformulation obtained by electrospraying for cardiovascular therapy. Int J Pharm. juill 2019;566:1-10.
100. Gao X, Gou, Huang M, Huang N, Qian, Wei, et al. Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. Int J Nanomedicine. mars 2013;971.
101. Kolluru LP, Chandran T, Shastri PN, Rizvi SAA, D'Souza MJ. Development and evaluation of polycaprolactone based docetaxel nanoparticle formulation for targeted breast cancer therapy. J Nanoparticle Res. déc 2020;22(12):372.
102. Pan Q, Tian J, Zhu H, Hong L, Mao Z, Oliveira JM, et al. Tumor-Targeting Polycaprolactone Nanoparticles with Codelivery of Paclitaxel and IR780 for Combinational Therapy of Drug-Resistant Ovarian Cancer. ACS Biomater Sci Eng. 13 avr 2020;6(4):2175-85.
103. Jin J, Sui B, Gou J, Liu J, Tang X, Xu H, et al. PSMA Ligand Conjugated PCL-PEG Polymeric Micelles Targeted to Prostate Cancer Cells. Munirathinam G, éditeur. PLoS ONE. 11 nov 2014;9(11):e112200.
104. Bayer IS. Nanostructured Cyanoacrylates: Biomedical Applications. In: Smart Nanoparticles for Biomedicine [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 28 août 2023]. p. 65-81. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128141564000057
105. D'Amore A, Anoldo P, Manigrasso M, Aprea G, De Palma GD, Milone M. Cyanoacrylate in Colorectal Surgery: Is It Safe? J Clin Med. 7 août 2023;12(15):5152.
106. Lenaerts V, Couvreur P, Christiaens-Leyh D, Joiris E, Roland M, Rollman B, et al. Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. Biomaterials. mars 1984;5(2):65-8.
107. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev. avr 2003;55(4):519-48.
108. Nuswantoro NF, Lubis MAR, Juliadmi D, Mardawati E, Antov P, Kristak L, et al. Bio-Based Adhesives for Orthopedic Applications: Sources, Preparation, Characterization, Challenges, and Future Perspectives. Designs. 14 oct 2022;6(5):96.

109. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. J Pharm Pharmacol. 12 avr 2011;31(1):331-2.
110. Damge C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P. New Approach for Oral Administration of Insulin With Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier. 1988;37.
111. Lambert G, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Couvreur P. Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules Containing an Aqueous Core as a Novel Colloidal Carrier for the Delivery of Oligonucleotides. mars 2000;
112. Vauthier C. A journey through the emergence of nanomedicines with poly(alkylcyanoacrylate) based nanoparticles. J Drug Target. 3 juill 2019;27(5-6):502-24.
113. Cheng H, Zhang X, Qin L, Huo Y, Cui Z, Liu C, et al. Design of self-polymerized insulin loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles for tunable oral delivery. J Controlled Release. mai 2020;321:641-53.
114. Yordanov G. Poly(alkyl cyanoacrylate) Nanoparticles as Promising Tools in Cancer Therapeutics. In: Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 28 août 2023]. p. 59-79. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128169636000042
115. Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. Nanoscale. 2021;13(24):10748-64.
116. Shi D, Beasock D, Fessler A, Szebeni J, Ljubimova JY, Afonin KA, et al. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. Adv Drug Deliv Rev. janv 2022;180:114079.
117. Padín-González E, Lancaster P, Bottini M, Gasco P, Tran L, Fadeel B, et al. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines. Front Bioeng Biotechnol. 7 juin 2022;10:882363.
118. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. Expert Opin Drug Deliv. 1 sept 2016;13(9):1257-75.

119. Sharma D, Sharma N, Pathak M, Agrawala PK, Basu M, Ojha H. Nanotechnology-based drug delivery systems. In: Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 29 août 2023]. p. 39-79. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128136898000021
120. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. J Controlled Release. juin 2012;160(2):117-34.
121. de Vrieze J. Suspicions grow that nanoparticles in P zer's COVID-19 vaccine trigger rare allergic reactions. déc 2020;
122. Bigini P, Gobbi, N, Bonati M, Clavenna A, Zucchetti M, Garattini S, et al. The role and impact of polyethylene glycol on anaphylactic reactions to COVID-19 nano-vaccines. Nat Nanotechnol. nov 2021;16(11):1164-75.
123. Hegde N, Velingkar V, Prabhakar B. An Update on Design and Pharmacology of Dendritic Poly(l-lysine). Int J Pept Res Ther. déc 2019;25(4):1539-62.
124. Patil NA, Kandasubramanian B. Functionalized polylysine biomaterials for advanced medical applications: A review. Eur Polym J. mars 2021;146:110248.
125. Du X, Yin S, Xu L, Ma J, Yu H, Wang G, et al. Polylysine and cysteine functionalized chitosan nanoparticle as an efficient platform for oral delivery of paclitaxel. Carbohydr Polym. févr 2020;229:115484.
126. Yang DH, Kim HJ, Park K, Kim JK, Chun HJ. Preparation of poly- L -lysine-based nanoparticles with pH-sensitive release of curcumin for targeted imaging and therapy of liver cancer *in vitro* and *in vivo*. Drug Deliv. 1 janv 2018;25(1):950-60.
127. Zhu X, Ma X, Gao C, Mu Y, Pei Y, Liu C, et al. Fabrication of CuO nanoparticles composite ε-polylysine-alginate nanogel for high-efficiency management of Alternaria alternate. Int J Biol Macromol. déc 2022;223:1208-22.
128. Zhou X, Guan C, Ma Q, Lan T, Lin Q, Zhou W, et al. Elaboration and characterization of ε-polylysine-sodium alginate nanoparticles for sustained antimicrobial activity. Int J Biol Macromol. nov 2023;251:126329.
129. Zhang J, Qu F, Liang T, Lv S, Li W, You Q, et al. Novel ε-polylysine/polyethyleneimine -coated Ag nanoparticles for in vitro treatment of Pseudomonas aeruginosa. Biochem Eng J. avr 2021;168:107937.
130. Yuan J, Guo L, Wang S, Liu D, Qin X, Zheng L, et al. Preparation of self-assembled nanoparticles of ε-polylysine-sodium alginate: A sustained-release carrier for antigen delivery. Colloids Surf B Biointerfaces. nov 2018;171:406-12.

131. Lima AL, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. Methods. mars 2022;199:54-66.
132. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. Pharm Res. mai 2009;26(5):1025-58.
133. Harrisson S, Nicolas J, Maksimenko A, Bui DT, Mougin J, Couvreur P. Nanoparticles with In Vivo Anticancer Activity from Polymer Prodrug Amphiphiles Prepared by Living Radical Polymerization. Angew Chem Int Ed. févr 2013;52(6):1678-82.
134. Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. Biomaterials. nov 2011;32(33):8593-604.
135. Vanderhoff JW. Polymer emulsification process. U S Pat. avr 1979;4:20.
136. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Prog Polym Sci. juill 2011;36(7):887-913.
137. Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D, L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. J Microencapsul. janv 1998;15(1):107-19.
138. Wang Y, Li P, Truong-Dinh Tran T, Zhang J, Kong L. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. Nanomaterials. 1 févr 2016;6(2):26.
139. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules. 15 août 2020;25(16):3731.
140. Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. Int J Pharm. déc 2015;496(2):173-90.
141. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int J Pharm. oct 1989;55(1):R1-4.
142. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. janv 2010;385(1-2):113-42.
143. Pedroso-Santana S, Fleitas-Salazar N. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. Polym Int. mai 2020;69(5):443-7.

144. Sang Z, Qian J, Han J, Deng X, Shen J, Li G, et al. Comparison of three water-soluble polyphosphate tripolyphosphate, phytic acid, and sodium hexametaphosphate as crosslinking agents in chitosan nanoparticle formulation. Carbohydr Polym. févr 2020;230:115577.
145. Almajidi YQ, Gupta J, Sheri FS, Zabibah RS, Faisal A, Ruzibayev A, et al. Advances in chitosan-based hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications: A comprehensive review. Int J Biol Macromol. déc 2023;253:127278.
146. Evans WJ, McCourtney EJ, Shrager RI. Titration studies of phytic acid. J Am Oil Chem Soc. avr 1982;59(4):189-91.
147. Ravishankar K, Dhamodharan R. Advances in chitosan-based hydrogels: Evolution from covalently crosslinked systems to ionotropically crosslinked superabsorbents. React Funct Polym. avr 2020;149:104517.
148. Zanetti-Ramos BG, Fritzen-Garcia MB, De Oliveira CS, Pasa AA, Soldi V, Borsali R, et al. Dynamic light scattering and atomic force microscopy techniques for size determination of polyurethane nanoparticles. Mater Sci Eng C. mars 2009;29(2):638-40.
149. Li M, Yu M. Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes. J Food Sci. déc 2020;85(12):4108-17.
150. Bellotti R, Picotto GB, Ribotta L. AFM Measurements and Tip Characterization of Nanoparticles with Different Shapes. Nanomanufacturing Metrol. juin 2022;5(2):127-38.
151. Mikheenko P, Abell JS, Sarkar A, Dang VS, Kechik MMA, Tanner JL, et al. Self-assembled artificial pinning centres in thick YBCO superconducting films. J Phys Conf Ser. 1 juin 2010;234(2):022022.
152. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. Phys Rev. 1 janv 1946;69(1-2):37-8.
153. Bloch F, Hansen WW, Packard M. Nuclear Induction. Phys Rev. 1 févr 1946;69(3-4):127-127.
154. Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science. mars 1971;171(3976):1151-3.
155. Lauterbur P. Image formation by induced local interactions: examples of employing nuclear magnetic resonance. Nature. mars 1973;242(5394):190-1.
156. Edelman RR. The History of MR Imaging as Seen through the Pages of *Radiology*. Radiology. nov 2014;273(2S):S181-200.

157. Pan D, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM. Manganese-based MRI contrast agents: past, present, and future. Tetrahedron. nov 2011;67(44):8431-44.
158. Chen C, Ge J, Gao Y, Chen L, Cui J, Zeng J, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A next generation contrast agent for magnetic resonance imaging. WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology. janv 2022;14(1):e1740.
159. Lee N, Yoo D, Ling D, Cho MH, Hyeon T, Cheon J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponsive Therapy. Chem Rev. 14 oct 2015;115(19):10637-89.
160. Daldrup-Link HE. Ten Things You Might Not Know about Iron Oxide Nanoparticles. Radiology. sept 2017;284(3):616-29.
161. Xiao YD, Paudel R, Liu J, Ma C, Zhang ZS, Zhou SK. MRI contrast agents: Classification and application (Review). Int J Mol Med. nov 2016;38(5):1319-26.
162. Tsapis N. Agents de contraste pour l'imagerie médicale: Les exemples de l'IRM et de l'ultrasonographie. médecine/sciences. janv 2017;33(1):18-24.
163. Idée JM, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. Fundam Clin Pharmacol. déc 2006;20(6):563-76.
164. Bellin MF. MR contrast agents, the old and the new. Eur J Radiol. déc 2006;60(3):314-23.
165. Geraldes CFGC, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. Contrast Media Mol Imaging. janv 2009;4(1):1-23.
166. Reichert DE, Lewis JS, Anderson CJ. Metal complexes as diagnostic tools. Coord Chem Rev. avr 1999;184(1):3-66.
167. Morcos SK. Extracellular gadolinium contrast agents: Differences in stability. Eur J Radiol. mai 2008;66(2):175-9.
168. Maravilla KR, Smith MP, Vymazal J, Goyal M, Herman M, Baima JJ, et al. Are There Differences between Macrocyclic Gadolinium Contrast Agents for Brain Tumor Imaging? Results of a Multicenter Intraindividual Crossover Comparison of Gadobutrol with Gadoteridol (the TRUTH Study). Am J Neuroradiol. 1 janv 2015;36(1):14-23.

169. Kuhn MJ, Patriarche JW, Patriarche D, Kirchin MA, Bona M, Pirovano G. The TRUTH confirmed: validation of an intraindividual comparison of gadobutrol and gadoteridol for imaging of glioblastoma using quantitative enhancement analysis. Eur Radiol Exp. déc 2021;5(1):46.
170. Iyad N, S.Ahmad M, Alkhatib SG, Hjouj M. Gadolinium contrast agents-challenges and opportunities of a multidisciplinary approach: Literature review. Eur J Radiol Open. déc 2023;11:100503.
171. Loevner LA, Kolumban B, Hutóczki G, Dziadziuszko K, Bereczki D, Bago A, et al. Efficacy and Safety of Gadopiclenol for Contrast-Enhanced MRI of the Central Nervous System: The PICTURE Randomized Clinical Trial. Invest Radiol. mai 2023;58(5):307-13.
172. Funck-Brentano C, Felices M, Le Fur N, Dubourdieu C, Desché P, Vanhoutte F, et al. Randomized study of the effect of gadopiclenol, a new gadolinium-based contrast agent, on the QTc interval in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol. nov 2020;86(11):2174-81.
173. Hao J, Bourrinet P, Desché P. Assessment of Pharmacokinetic, Pharmacodynamic Profile, and Tolerance of Gadopiclenol, A New High Relaxivity GBCA, in Healthy Subjects and Patients With Brain Lesions (Phase I/IIa Study): Invest Radiol. juill 2019;54(7):396-402.
174. Robic C, Port M, Rousseaux O, Louguet S, Fretellier N, Catoen S, et al. Physicochemical and Pharmacokinetic Profiles of Gadopiclenol: A New Macrocyclic Gadolinium Chelate With High T1 Relaxivity. Invest Radiol. août 2019;54(8):475-84.
175. Goyen M. MR angiography with Vasovist®. Radiography. déc 2007;13:e85-9.
176. Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. J Magn Reson Imaging. nov 2007;26(5):1190-7.
177. Mathur M, Jones JR, Weinreb JC. Gadolinium Deposition and Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Radiologist's Primer. RadioGraphics. janv 2020;40(1):153-62.
178. Produits de contraste à base de gadolinium et rétention de gadolinium dans le cerveau et dans d'autres tissus : suspension des AMM de l'acide gadopentétique et du gadodiamide utilisés en intraveineux, restriction de l'AMM de l'acide gadobénique à l'imagerie du foie et modification de l'information des autres spécialités maintenues. ANSM; 2018 janv.
179. Gregoriadis D, Ryman B. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. Biochem J. oct 1971;5(124):58P.

180. Vauthier C, Couvreur P. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. Technol Bioméd. oct 2008;1-20.
181. Halwani AA. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. Pharmaceutics. 3 janv 2022;14(1):106.
182. Deroure B, Charpentier B, Saliba F, Dürrbach A. Néphrotoxicité de l'amphotéricine B : mise au point. J Mycol Médicale. juin 2006;16(2):82-6.
183. Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de la littérature. Rev Médecine Interne. févr 2001;22(2):141-50.
184. Demongeot J, Fougère C. mRNA COVID-19 Vaccines—Facts and Hypotheses on Fragmentation and Encapsulation. Vaccines. 24 déc 2022;11(1):40.
185. Dumas G, Canet E. Effets cardiovasculaires graves des chimiothérapies, thérapies ciblées et des traitements immunosuppresseurs. Réanimation. juill 2016;25(S3):123-36.
186. Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, et al. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 1 mai 2019;25(9):2685-90.
187. EMA (Rapport sur le Vyxeos®) [Internet]. 2019 nov [cité 11 mai 2023]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vyxeos-liposomal
188. Franco Y, Vaidya T, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. Breast Cancer Targets Ther. sept 2018;Volume 10:131-41.
189. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. Exp Hematol Oncol. déc 2012;1(1):10.
190. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. avr 2016;99:28-51.
191. Couvreur P. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères. In: La chimie et la santé : Au service de l'homme. Les Ulis: EDP Sciences; 2010. p. 106-24.
192. Couvreur P. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères. :21.

193. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. Bioeng Transl Med. sept 2019;4(3):e10143.
194. Perez M. Les nanomédicaments en oncologie: nouvelles perspectives de traitement et limitations toxicologiques [Thèse pharmacie]. [Rouen]: Université de Rouen Normandie. Faculté de Pharmacie; 2020.
195. Autio K, Dreicer R, Anderson J, Garcia J, Alva A, Hart L, et al. Safety and Efficacy of BIND-014, a Docetaxel Nanoparticle Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate CancerA Phase 2 Clinical Trial. JAMA Oncol. juill 2018;4(10):1344-51.
196. Soe ZC, Poudel BK, Nguyen HT, Thapa RK, Ou W, Gautam M, et al. Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to colorectal cancer cells. Asian J Pharm Sci. janv 2019;14(1):40-51.
197. Alotaibi BS, Buabeid M, Ibrahim NA, Kharaba ZJ, Ijaz M, Noreen S, et al. Potential of Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Brain Targeting: A Current Review of Literature. Int J Nanomedicine. nov 2021;16:7517-33.
198. Sakhi M, Khan A, Iqbal Z, Khan I, Raza A, Ullah A, et al. Design and Characterization of Paclitaxel-Loaded Polymeric Nanoparticles Decorated With Trastuzumab for the Effective Treatment of Breast Cancer. Front Pharmacol. mars 2022;13:855294.
199. Fujiwara Y, Mukai H, Saeki T, Ro J, Lin YC, Nagai SE, et al. A multi-national, randomised, open-label, parallel, phase III non-inferiority study comparing NK105 and paclitaxel in metastatic or recurrent breast cancer patients. Br J Cancer. mars 2019;120(5):475-80.
200. Chatelut É. Pharmacologie des dérivés du platine : différences entre les trois composés et les facteurs de variabilité entre patients. Bull Cancer (Paris). nov 2011;98(11):1253-61.
201. Uchino H, Matsumura Y, Negishi T, Koizumi F, Hayashi T, Honda T, et al. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. Br J Cancer. sept 2005;93(6):678-87.
202. Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, et al. A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. Br J Cancer. févr 2011;104(4):593-8.

203. Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, et al. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. J Controlled Release. janv 2012;157(1):112-7.
204. Osada A. NC-6004, a novel cisplatin nanoparticle, in combination with pembrolizumab for head and neck cancer. Integr Clin Med [Internet]. 2019 [cité 11 mai 2023];3(2). Disponible sur: https://www.oatext.com/nc-6004-a-novel-cisplatin-nanoparticle-in-combination-with-pembrolizumab-for-head-and-neck-cancer.php
205. Endo K, Ueno T, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Ito M, et al. Tumor-targeted chemotherapy with the nanopolymer-based drug NC-6004 for oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci. mars 2013;104(3):369-74.
206. Kudo M, Yamamoto Y, Koga Y, Hamaguchi T, Akimoto T, Yasunaga M, et al. Effect of combined treatment with micelle-incorporated cisplatin (NC-6004) and S-1 on human gastric cancer xenografts. Mol Clin Oncol. déc 2016;5(6):817-22.
207. Subbiah V, Grilley-Olson JE, Combest AJ, Sharma N, Tran RH, Bobe I, et al. Phase Ib/II Trial of NC-6004 (Nanoparticle Cisplatin) Plus Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res. 1 janv 2018;24(1):43-51.
208. Volovat SR, Ciuleanu TE, Koralewski P, Olson JEG, Croitoru A, Koynov K, et al. A multicenter, single-arm, basket design, phase II study of NC-6004 plus gemcitabine in patients with advanced unresectable lung, biliary tract, or bladder cancer. Oncotarget. 18 août 2020;11(33):3105-17.
209. Combination Therapy With NC-6004 and Gemcitabine Versus Gemcitabine Alone in Pancreatic Cancer [Internet]. [cité 11 mai 2023]. Disponible sur: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02043288
210. Gregoriadis G. Liposomes in Drug Delivery: How It All Happened. Pharmaceutics. 24 mai 2016;8(2):19.
211. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid Nanoparticles─From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. ACS Nano. 23 nov 2021;15(11):16982-7015.
212. Ayyagari AL, Zhang X, Ghaghada KB, Annapragada A, Hu X, Bellamkonda RV. Long-circulating liposomal contrast agents for magnetic resonance imaging. Magn Reson Med. mai 2006;55(5):1023-9.
213. Cheng Z, Al Zaki A, Jones IW, Hall HK, Aspinwall CA, Tsourkas A. Stabilized porous liposomes with encapsulated Gd-labeled dextran as a highly efficient MRI contrast agent. Chem Commun. 2014;50(19):2502.

214. Muhandiramlage TP, Cheng Z, Roberts DL, Keogh JP, Hall HK, Aspinwall CA. Determination of Pore Sizes and Relative Porosity in Porous Nanoshell Architectures Using Dextran Retention with Single Monomer Resolution and Proton Permeation. Anal Chem. 20 nov 2012;84(22):9754-61.
215. Pitchaimani A, Thanh Nguyen TD, Wang H, Bossmann SH, Aryal S. Design and characterization of gadolinium infused theranostic liposomes. RSC Adv. 2016;6(43):36898-905.
216. Zhang W, Liu L, Chen H, Hu K, Delahunty I, Gao S, et al. Surface impact on nanoparticle-based magnetic resonance imaging contrast agents. Theranostics. 2018;8(9):2521-48.
217. Aryal S, Key J, Stigliano C, Ananta JS, Zhong M, Decuzzi P. Engineered magnetic hybrid nanoparticles with enhanced relaxivity for tumor imaging. Biomaterials. oct 2013;34(31):7725-32.
218. Debroye E, Parac-Vogt TN. Towards polymetallic lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. Chem Soc Rev. 2014;43(23):8178-92.
219. Ratzinger G, Agrawal P, Körner W, Lonkai J, Sanders HMHF, Terreno E, et al. Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. Biomaterials. nov 2010;31(33):8716-23.
220. Courant T, Roullin GV, Cadiou C, Callewaert M, Andry MC, Portefaix C, et al. Biocompatible nanoparticles and gadolinium complexes for MRI applications. Comptes Rendus Chim. juin 2013;16(6):531-9.
221. Rigaux G, Roullin VG, Cadiou C, Portefaix C, Van Gulick L, Bœuf G, et al. A new magnetic resonance imaging contrast agent loaded into poly(lacide-co-glycolide) nanoparticles for long-term detection of tumors. Nanotechnology. nov 2014;25(44):445103.
222. Courant T, Roullin VG, Cadiou C, Callewaert M, Andry MC, Portefaix C, et al. Hydrogels Incorporating GdDOTA: Towards Highly Efficient Dual T1/T2 MRI Contrast Agents. Angew Chem Int Ed. sept 2012;51(36):9119-22.
223. Callewaert M, Roullin VG, Cadiou C, Millart E, Van Gulik L, Andry MC, et al. Tuning the composition of biocompatible Gd nanohydrogels to achieve hypersensitive dual T_1 /T_2 MRI contrast agents. J Mater Chem B. juin 2014;2(37):6397-405.

224. Zhuang Y, Ma Y, Wang C, Hai L, Yan C, Zhang Y, et al. PEGylated cationic liposomes robustly augment vaccine-induced immune responses: Role of lymphatic trafficking and biodistribution. J Controlled Release. avr 2012;159(1):135-42.
225. Jiang H, Wang Q, Sun X. Lymph node targeting strategies to improve vaccination efficacy. J Controlled Release. déc 2017;267:47-56.
226. Balog S, De Almeida MS, Taladriz-Blanco P, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Does the surface charge of the nanoparticles drive nanoparticle–cell membrane interactions? Curr Opin Biotechnol. juin 2024;87:103128.
227. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. Nano Today. août 2015;10(4):487-510.
228. Stack T, Liu Y, Frey M, Bobbala S, Vincent M, Scott E. Enhancing subcutaneous injection and target tissue accumulation of nanoparticles *via* co-administration with macropinocytosis inhibitory nanoparticles (MiNP). Nanoscale Horiz. 2021;6(5):393-400.
229. Xia Y, Fu S, Ma Q, Liu Y, Zhang N. Application of Nano-Delivery Systems in Lymph Nodes for Tumor Immunotherapy. Nano-Micro Lett. déc 2023;15(1):145.
230. Moreau J, Callewaert M, Malytskyi V, Henoumont C, Voicu SN, Stan MS, et al. Fluorescent chitosan-based nanohydrogels and encapsulation of gadolinium MRI contrast agent for magneto-optical imaging. Carbohydr Polym Technol Appl. déc 2021;2:100104.
231. Calvo P, Remu□□n-L□pez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Polym Sci. 3 janv 1997;63(1):125-32.
232. Mazancová P, Némethová V, Treľová D, Kleščíková L, Lacík I, Rázga F. Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. Carbohydr Polym. juill 2018;192:104-10.
233. Zheng X, Wang B, Tang X, Mao B, Zhang Q, Zhang T, et al. Absorption, metabolism, and functions of hyaluronic acid and its therapeutic prospects in combination with microorganisms: A review. Carbohydr Polym. janv 2023;299:120153.
234. Giacalone G, Hillaireau H, Capiau P, Chacun H, Reynaud F, Fattal E. Stabilization and cellular delivery of chitosan–polyphosphate nanoparticles by incorporation of iron. J Controlled Release. nov 2014;194:211-9.

235. Lin R, Xia S, Shan C, Chen D, Liu Y, Gao X, et al. The Dietary Supplement Chondroitin-4-Sulfate Exhibits Oncogene-Specific Pro-tumor Effects on BRAF V600E Melanoma Cells. Mol Cell. mars 2018;69(6):923-937.e8.
236. Elmowafy E. Exploiting Ascorbyl Palmitate Assisted-Chondroitin Sulfate /Chitosan Nanoparticles for Intra-articular Delivery of Lipoic Acid. 2024;
237. Talib S, Ahmed N, Khan D, Khan GM, Rehman AU. Chitosan-chondroitin based artemether loaded nanoparticles for transdermal drug delivery system. J Drug Deliv Sci Technol. févr 2021;61:102281.
238. Fahad M, Shah SU, Saeed MD, Shah KU, Nazir U, Khan NR, et al. Fabrication and evaluation of chondroitin sulfate based hydrogels loaded with chitosan nanoparticles for oral delivery of vildagliptin. Int J Biol Macromol. févr 2025;290:139011.
239. Lin J, Jiao G, Scott AJ, Xu CC, Gagnon G, Kermanshahi-pour A. Green synthesis of self-assembly, self-healing, and injectable polyelectrolyte complex hydrogels using chitosan, sulphated polysaccharides, hydrolyzed collagen and nanocellulose. Int J Biol Macromol. févr 2025;288:138566.
240. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. déc 1983;65(1-2):55-63.
241. Voicu SN, Mernea M, Moreau J, Carteret CE, Callewaert M, Chuburu F, et al. Unlocking the potential of biocompatible chitosan-hyaluronic acid nanogels labeled with fluorochromes: A promising step toward enhanced FRET bioimaging. Int J Biol Macromol. déc 2024;282:137063.
242. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, et al. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. Polymers. 24 sept 2021;13(19):3256.
243. Nunes CS, Rufato KB, Souza PR, De Almeida EAMS, Da Silva MJV, Scariot DB, et al. Chitosan/chondroitin sulfate hydrogels prepared in [Hmim][HSO4] ionic liquid. Carbohydr Polym. août 2017;170:99-106.
244. Jardim KV, Joanitti GA, Azevedo RB, Parize AL. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. Mater Sci Eng C. nov 2015;56:294-304.
245. Piai JF, Lopes LC, Fajardo AR, Rubira AF, Muniz EC. Kinetic study of Chondroitin Sulphate release from Chondroitin Sulphate/Chitosan complex hydrogel. J Mol Liq. sept 2010;156(1):28-32.

246. Thandapani G, P. SP, P.N. S, Sukumaran A. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. Int J Biol Macromol. nov 2017;104:1794-806.
247. Tang ESK, Huang M, Lim LY. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. Int J Pharm. oct 2003;265(1-2):103-14.
248. Hu C, Lu W, Mata A, Nishinari K, Fang Y. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. Int J Biol Macromol. avr 2021;177:578-88.
249. Li P, Dai YN, Zhang JP, Wang AQ, Wei Q. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. sept 2008;4(3):221-8.
250. De S. Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-l-lysine–alginate nanospheres. J Controlled Release. avr 2003;89(1):101-12.
251. Zhu W, Long J, Shi M. Release Kinetics Model Fitting of Drugs with Different Structures from Viscose Fabric. Materials. 21 avr 2023;16(8):3282.
252. Arnold TC, Freeman CW, Litt B, Stein JM. Low-field MRI: Clinical promise and challenges. J Magn Reson Imaging. janv 2023;57(1):25-44.
253. Crook N, Robinson L. A review of the safety implications of magnetic resonance imaging at field strengths of 3Tesla and above. Radiography. nov 2009;15(4):351-6.
254. Caravan P, Zhang Z. Structure–Relaxivity Relationships among Targeted MR Contrast Agents. Eur J Inorg Chem. avr 2012;2012(12):1916-23.
255. Rigaux G, Gheran CV, Callewaert M, Cadiou C, Voicu SN, Dinischiotu A, et al. Characterization of Gd loaded chitosan-TPP nanohydrogels by a multi-technique approach combining dynamic light scattering (DLS), asymetrical flow-field-flow-fractionation (AF4) and atomic force microscopy (AFM) and design of positive contrast agents for molecular resonance imaging (MRI). Nanotechnology. févr 2017;28(5):055705.
256. Gheran CV, Voicu SN, Galateanu B, Callewaert M, Moreau J, Cadiou C, et al. In Vitro Studies Regarding the Safety of Chitosan and Hyaluronic Acid-Based Nanohydrogels Containing Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. Int J Mol Sci. 17 mars 2022;23(6):3258.
257. Agmo Hernández V. An overview of surface forces and the DLVO theory. ChemTexts. 22 juill 2023;9(4):10.
258. El-Naggar NEA, Dalal SR, Zweil AM, Eltarahony M. Artificial intelligence-based optimization for chitosan nanoparticles biosynthesis, characterization and in-vitro assessment of its anti-biofilm potentiality. Sci Rep. 16 mars 2023;13(1):4401.

259. Duceppe N, Tabrizian M. Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. Biomaterials. mai 2009;30(13):2625-31.
260. Jonassen H, Kjøniksen AL, Hiorth M. Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. Colloid Polym Sci. juill 2012;290(10):919-29.
261. Kayitmazer AB, Koksal AF, Kilic Iyilik E. Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio. Soft Matter. 2015;11(44):8605-12.
262. Des Bouillons-Gamboa RE, Montes De Oca G, Baudrit JRV, Ríos Duarte LC, Lopretti M, Rentería Urquiza M, et al. Synthesis of chitosan nanoparticles (CSNP): effect of CH-CH-TPP ratio on size and stability of NPs. Front Chem. 15 nov 2024;12:1469271.
263. Jonassen H, Kjøniksen AL, Hiorth M. Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate. Biomacromolecules. 12 nov 2012;13(11):3747-56.
264. C.S.N A, C. Sipoli CV, G. de la Torre L. Effects of Diffusion and Mixing pattern on Microfluidic-Assisted Synthesis of Chitosan/ATP Nanoparticles. Lab Chip. juin 2017;17:2281-93.
265. Soares PIP, Machado D, Laia C, Pereira LCJ, Coutinho JT, Ferreira IMM, et al. Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles. Carbohydr Polym. sept 2016;149:382-90.
266. Jana S, Jana S, éditeurs. Interpenetrating Polymer Network: Biomedical Applications [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020 [cité 4 août 2025]. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-0283-5
267. Hou X, Lin L, Li K, Jiang F, Qiao D, Zhang B, et al. Towards superior biopolymer gels by enabling interpenetrating network structures: A review on types, applications, and gelation strategies. Adv Colloid Interface Sci. mars 2024;325:103113.
268. Jeong YI, Kim DG, Jang MK, Nah JW. Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble chitosan. Carbohydr Res. févr 2008;343(2):282-9.
269. Agudo-Álvarez S, Díaz-Mínguez SS, Benito-Arenas R. The amide group and its preparation methods by acid-amine coupling reactions: an overview. Pure Appl Chem. 27 mai 2024;96(5):691-707.

270. Kuo CH, Liu YC, Chang CMJ, Chen JH, Chang C, Shieh CJ. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe3O4 nanoparticles. Carbohydr Polym. mars 2012;87(4):2538-45.
271. Gratzer PF, Lee JM. Control of pH alters the type of cross-linking produced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) treatment of acellular matrix vascular grafts. J Biomed Mater Res. 2001;58(2):172-9.
272. Deng Y, Liu D, Du G, Li X, Chen J. Preparation and characterization of hyaluronan/chitosan scaffold cross- linked by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. Polym Int. juin 2007;56(6):738-45.
273. Christ HA, Bourgat Y, Menzel H. Optimization of Critical Parameters for Carbodiimide Mediated Production of Highly Modified Chitosan. Polymers. 13 août 2021;13(16):2702.
274. Paul A, Eun CJ, Song JM. Cytotoxicity mechanism of non-viral carriers polyethylenimine and poly-l-lysine using real time high-content cellular assay. Polymer. sept 2014;55(20):5178-88.
275. Isaksson K, Åkerberg D, Said K, Tingstedt B. Cationic polypeptides in a concept of oppositely charged polypeptides as prevention of postsurgical intraabdominal adhesions. J Biomed Sci Eng. 2011;04(03):200-6.
276. Lee KW, An YJ, Lee J, Lee JH, Yim HS. α-Poly-l-lysine functions as an adipogenic inducer in 3T3-L1 preadipocytes. Amino Acids. avr 2021;53(4):587-96.
277. Batys P, Morga M, Bonarek P, Sammalkorpi M. pH-Induced Changes in Polypeptide Conformation: Force-Field Comparison with Experimental Validation. J Phys Chem B. 9 avr 2020;124(14):2961-72.
278. Zhao P, Cui R, Li W, Zhang F, Meng X, Liu B. Self-assembly metal phenolic network coating improves the controlled release and bacteriostatic properties of Litsea cubeba essential oil-loaded ε-polylysine-pectin nanoparticles. Food Biosci. oct 2024;61:104756.
279. Liu Y, Wu Y, Deng H, Li W, Cui L, Rong J, et al. A polylysine/hyaluronan-based core-shell nanoparticle triggers drug delivery by ATP/hyaluronidase dual stimuli for inducing apoptosis of breast cancer cells. Int J Biol Macromol. oct 2024;277:134188.
280. Yu B, Lang X, Wang X, Ding L, Han M, Guo Y, et al. Effects of different conformations of polylysine on the anti-tumor efficacy of methotrexate nanoparticles. Biomed Pharmacother. juin 2023;162:114662.

Mise au point de nouvelles formulations de nanohydrogels pour la vectorisation de substances actives à visée diagnostic

L'objectif de ce travail est de développer de nouveaux outils pour améliorer l'efficacité des agents de contraste à base de gadolinium utilisés pour les examens IRM. La stratégie envisagée repose sur l'encapsulation d'un complexe de gadolinium (HGdDOTA) au sein de nanohydrogels, élaborés par gélification ionique entre deux polyélectrolytes. Trois objectifs principaux ont ainsi structuré ce projet : (i) maîtriser la formulation de nanoparticules présentant des propriétés compatibles avec une utilisation en santé humaine, (ii) comprendre leur comportement dans des conditions mimant le milieu physiologique, et (iii) évaluer l'efficacité des objets créés pour l'amélioration du diagnostic. Le rapport de masse entre les polymères engagés, le pH de la formulation et les conditions d'agitation ont pu être identifiés comme déterminants pour maitriser les caractéristiques des nanoparticules. La compréhension fine de ces paramètres a conduit à l'obtention de deux formulations de CS et ChS, et de PLL et ChS, répondant aux spécifications fixées initialement (tailles comprises entre 100 et 300 nm, polydispersité réduite et charges de surface négatives). L'étude de leur comportement en milieu physiologique a montré que les systèmes à base de chitosane sont peu stables à pH physiologique contrairement à la formulation de PLL/ChS qui résiste mieux grâce aux interactions électrostatiques importantes entre les deux polymères. La nanoencapsulation du HGdDOTA dans les deux formulations optimisées permet d'amplifier significativement les propriétés relaxométriques et contrastophores du complexe, confirmant leur intérêt pour le diagnostic par IRM.

Biopolymères, gélification ionique, nanoparticules, vectorisation, agents de contraste

New nanohydrogel formulations for diagnostic contrast agents encapsulation

The objective of this work is to develop new tools to improve the effectiveness of gadolinium-based contrast agents used for MRI examinations. The proposed strategy is based on the encapsulation of a gadolinium complex (HGdDOTA) within nanohydrogels, elaborated by ionic gelation between two polyelectrolytes. Three main objectives have thus structured this project: (i) mastering the formulation of nanoparticles with properties compatible with use in human health, (ii) understanding their behavior under conditions mimicking the physiological environment, and (iii) evaluate the effectiveness of the these objects for improving diagnosis. The mass ratio between the polymers, the pH of the formulation and the agitation conditions were identified as determinants to control the characteristics of nanoparticles. The precise understanding of these parameters led to obtain two formulations of CS and ChS, and PLL and ChS, meeting the specifications initially set (sizes between 100 and 300 nm, reduced polydispersity and negative surface charges). The study of their behavior in a physiological medium has shown that chitosan-based systems are not very stable at physiological pH, unlike the PLL/ChS formulation which resists better thanks to the significant electrostatic interactions between the two polymers. The nanoencapsulation of HGdDOTA in the two optimized formulations allows to significantly amplify the relaxometric and contrast properties of the complex, confirming their interest for MRI diagnosis.

Biopolymers, ionic gelation, nanoparticles, vectorization, contrast agents

Discipline : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacotechnie

Université de Reims Champagne-Ardenne

ICMR - UMR 7312

Laboratoire de pharmacotechnie, UFR Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay, 51095 Reims Cedex

UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, 51687 Reims Cedex 2