

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :

Florence HERMAL

soutenue le : **06 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Sciences du Médicament et des Autres Produits de Santé**

**Recouvrement et modification de
nanoparticules afin d'optimiser leurs
propriétés physico-chimiques pour des
applications pharmaceutiques**

THÈSE dirigée par :

Mme BOUREL Line

Mme HEURTAULT Béatrice

Professeur, Université de Strasbourg

Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BESTEL Isabelle

Mme GIROD-FULLANA Sophie

Professeur, Université de Bordeaux

Professeur, Université de Toulouse

INVITÉ :

Mme BRUNNER Livia

Docteur, Vaccine Formulation Laboratory, Université de Lausanne

Remerciements

Me voilà déjà au bout de ces 3 années de doctorat et je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont soutenue, encouragée et accompagnée et sans lesquelles je n'aurais jamais pu mener à bien ces travaux de thèse...

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de soutenance, Pr. Isabelle Bestel, Pr. Sophie Girod-Fullana et Dr. Livia Brunner pour avoir accepté de juger ces travaux.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Conception et d'Application de Molécules Bioactives (UMR7199, CNRS/Université de Strasbourg) à la faculté de Pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden grâce à un financement du MRES, sous la codirection du Pr. Line Bourel et du Dr. Béatrice Heurtault. Je tiens à exprimer ma gratitude à mes deux directrices pour m'avoir donné la chance d'effectuer ces travaux de thèse et de m'épanouir dans cette voie à l'interface de la chimie thérapeutique et de la biologie. Merci à Béatrice de m'avoir transmis la fibre de la galénique en m'enseignant la formulation et la caractérisation des liposomes. Tu m'as ouvert la voie au monde des nanoparticules dans lequel je me suis sincèrement épanouie pendant ces 3 années et dans lequel je souhaiterais poursuivre mes recherches postdoctorales. Merci à Line de m'avoir entraînée (depuis Boston !) pour le concours de l'école doctorale et de m'avoir ainsi permis de rejoindre l'équipe 3Bio pour cette thèse. Je souhaitais suite à mes études en biologie me former en chimie thérapeutique et tu m'as donné cette opportunité. Merci pour ta confiance et merci de m'avoir transmis ton savoir et ta méthodologie de chimiste qui m'ont permis de mener à bien la partie chimie de ce projet de thèse. Finalement, je tiens à vous remercier toutes les deux pour votre soutien, vos encouragements et votre gentillesse. Vous m'avez appris à devenir un bon chercheur et à ne pas craindre l'échec et vous m'avez surtout donné le goût et la passion de la recherche. Je n'oublierai jamais ces 3 années passées avec vous ainsi que toutes vos petites attentions.

J'ai été accueillie au sein de l'équipe anciennement Biovec et depuis 1 an 3Bio, sous la direction du Dr. Benoît Frisch, ensuite en codirection avec le Dr. Antoine Kichler. J'aimerais

exprimer ma reconnaissance à Benoît qui a participé à toutes les réunions concernant mon projet de thèse et a largement contribué à l'avancée de tous mes projets. Merci également de m'avoir offert la possibilité d'établir une collaboration entre notre laboratoire et le Vaccine Formulation Laboratory (VFL) de l'Université de Lausanne qui a abouti à un beau projet de thèse. Merci à Antoine et à Benoît de m'avoir fourni tout le matériel dont j'avais besoin pendant ces 3 années et merci pour votre écoute et vos conseils durant les préparations aux congrès.

Merci également au Dr. Jean-Serge Rémy, directeur de l'UMR 7199 et de l'École Doctorale des Sciences Chimiques (ED222) pour son accueil au sein de l'UMR mais également pour son écoute lors des conseils de laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues du VFL et en particulier Dr. Nicolas Collin de m'avoir donné la possibilité d'effectuer une mission scientifique au sein de leur laboratoire. J'ai ainsi pu bénéficier de leur matériel de pointe pour la caractérisation et l'évaluation de nos candidats vaccins développés. Un grand merci à Céline Lemoine pour son aide précieuse lors de mon séjour et pour les expériences menées et traitées après mon départ.

Également un grand merci à Laurence Choulier de m'avoir donné la possibilité de travailler en collaboration avec son équipe sur un sujet qui me tient tout particulièrement à cœur et de m'avoir ainsi permis de renouer avec le monde de la biologie moléculaire et de la culture cellulaire. Je tiens tout particulièrement à remercier Antoine ainsi que ma collaboratrice et amie Elisabete Silva pour leur aide en culture cellulaire et en microscopie.

Je tiens également à remercier Pr. Sylvie Fournel pour ses conseils lors de mes présentations de groupe, pour son aide précieuse lors de l'interprétation des résultats d'immunologie et pour ses corrections. Un grand merci également au Dr. Alexandre Specht pour son aide lors de l'interprétation des résultats de fluorescence ainsi que pour ses corrections. Enfin, je tiens aussi à remercier le Dr. Philippe Laval pour son aide lors de l'interprétation des résultats de microbalance à quartz ainsi que pour ses conseils et corrections.

Les collègues

Je tiens à remercier chaleureusement mes anciens, actuels et nouveaux collègues de l'équipe Biovec/3Bio qui m'ont aidée, conseillée et qui m'ont redonné le sourire les jours où les expériences ne fonctionnaient pas comme je le souhaitais. Merci pour la bonne ambiance au laboratoire de galénique et le soutien psychologique SANS FAILLE suite aux nombreuses heures passées face au Zetasizer ou à préparer du tampon de dialyse. Merci également pour toutes les pauses autour d'un café et/ou (plus souvent et) d'une part de gâteau qui m'ont permis de déconnecter et de relativiser.

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes qui ont contribué à ma formation et qui m'ont aidé pour l'analyse de mes résultats. Merci à Maria Vittoria pour les cours de formulation et de vectorisation ainsi que pour tes conseils en chimie tout au long de ma thèse. Merci Cendrine pour le temps que tu as passé à me former et à t'occuper des commandes de produits qu'il me fallait en urgence (négociées contre des pâtisseries en tout genre). Merci Marcella de m'avoir formée à la chimie dès mon arrivée au sein de l'équipe, j'ai beaucoup appris grâce à toi ! Merci également pour ton aide en RMN.

Bien évidemment je remercie tous les autres membres du laboratoire de m'avoir intégrée dans l'équipe et d'avoir été disponibles pour répondre à mes questions ou pour des conseils (May, Eya, Patrick, Claire, Sylvie). Merci aux stagiaires de Master (Mathieu, Candice et Pauline) pour leur aide et leur bonne humeur. Une petite pensée pour ma stagiaire Ji-Hyung qui m'a aidée pour une période de 2 mois. J'ai été ravie de t'avoir formée et encadrée ainsi que de t'avoir guidée dans ton orientation professionnelle.

J'en viens maintenant aux remerciements des collègues qui sont devenus des amis...

Ma chère Célia J.F., j'ai été très heureuse d'apprendre à te connaître pendant mes deux premières années de thèse. Tu as également été une très belle rencontre et je regrette que tu sois partie si loin en Australie car tu étais devenue une véritable amie et confidente. Merci pour ces fous rires et pour ces soirées passées à nous reconforter mutuellement. J'espère qu'un jour nous serons à nouveau plus proches géographiquement ! Qui sait, la magie des fées nous réunira peut-être ... ;)

Merci à Alexandre, qui a été mon collègue de bureau et surtout mon acolyte de blagues pendant ces deux premières années de thèse. Je me souviens encore du jour où nous avons préparé l'album de thèse de Célia et où je n'arrivais plus à m'arrêter de rire. Nous formions une fine équipe ;) Merci pour ta joie de vivre, ta gentillesse et ton ouverture d'esprit que tu as su adapter suite à notre rencontre (et à celle de Charlotte) =p. Enfin, j'aurAIS aimÉ écrire tout mon texte en « AI » mais les mots m'aurAIENT manqué ;)

Merci à Manon, alias Inspecteur Marion Piroll, qui a été à l'initiative de nos fameuses pauses « ragots ». J'ai énormément apprécié pouvoir passer ces petits moments de coupure avec toi. Un grand merci également pour toutes ces soirées mémorables que vous avez organisées Sylvain et toi, et dont je garde de très beaux souvenirs.

Ma chère Hanadi, j'ai été ravie de pouvoir faire ta connaissance lors de ma première année de thèse et de pouvoir te retrouver par la suite durant tes missions surprises au sein de notre équipe. J'ai adoré toutes nos soirées entre filles, notamment celles où tu m'as appris les bases de la cuisine libanaise. Un grand merci pour ton écoute, tes conseils et ton réconfort en particulier lors de la dernière ligne droite de la thèse.

Merci à Romaïssa, que j'ai eu le plaisir de rencontrer et de former durant ma dernière année de thèse. J'ai énormément apprécié ton ouverture d'esprit et les discussions philosophiques sur la vie, sur la religion et les relations humaines que nous avons pu avoir durant nos nombreuses mesures au Zetasizer. Merci pour ta gentillesse, ton écoute et pour ton aide précieuse lors de mes derniers mois de manip.

Ma Charlotte, je m'abstiendrai d'écrire dans mon manuscrit de thèse le surnom que je t'ai donné (et que nous nous sommes mutuellement donné d'ailleurs) mais qui te va pourtant si bien ;) Tu as été une vraie amie pendant ces deux années que nous avons passées ensemble. Rares sont les soirs où nous ne nous sommes pas appelées pour parler de tout et de rien mais surtout de l'essentiel. Malgré ton côté « bulldozer », tu as le cœur sur la main et il est difficile de résister à tant de gentillesse. Merci donc d'avoir toujours été là, merci pour tous ces fous rires et tous ces moments improbables. Enfin, je te tire mon chapeau pour tout ce que tu as accompli. Tu as de loin surpassé le maître =p

Enfin je tiens à remercier toute l'équipe « Wagner » pour tous ces moments partagés, dont en particulier les repas de midi et les soirées Game of Thrones dans votre magnifique salle de pause. Merci pour votre bonne humeur, pour les multiples présidents (que Charlotte a fini par bannir au profit du tarot), pour les Kinder Bueno et camemberts normands (Thothor) et pour les bières partagées après les soirées de manip prolongées au labo (Tony, Charlotte, Thothor). Enfin, merci à Sasha de m'avoir appris à changer la chambre à air de mon vélo, je suis devenue une femme davantage indépendante grâce à toi ;)

La famille et les amis

La famille

Tout d'abord je tiens à remercier mes parents, qui m'ont toujours encouragée dans la poursuite de mes études et en particulier lorsque j'ai décidé de commencer une thèse. Merci pour votre soutien et vos conseils. Merci également pour tous ces moments passés en famille, dont je garde de merveilleux souvenirs et pour toutes ces fois où nous sommes partis en vacances. Vous nous avez toujours emmenés mon frère et moi dans de très beaux endroits et vous nous avez transmis le goût du voyage (enfin surtout à moi !). Enfin, je tenais à vous exprimer en quelques mots toute ma gratitude. Si j'ai réussi dans ma vie professionnelle et personnelle, j'estime que c'est en grande partie grâce à vous. Vous avez été de merveilleux parents et je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier mes grands-mères, mes cousins et cousines ainsi que ma tante Evelyne, pour leur amour et leurs conseils. Merci également pour tous ces moments passés en famille. Vous avez toujours veillé à tous nous réunir et vous avez contribué à renforcer les liens familiaux qui nous unissent. Merci à toi Evelyne pour nos soirées entre cousins (ou entre filleule et marraine) que tu as toujours su si bien organiser. J'en garde un très bon souvenir !

Enfin, pour clore ce chapitre « famille », je tiens à remercier mon (petit) frère Arnaud. Entre nous, ça n'a pas toujours été simple. Petits, on ne s'entendait pas vraiment. Au fil des ans, tu es devenu un véritable confident et ami. Le lien qui nous unit à présent est indescriptible. Tu es une personne merveilleuse et je tiens à te remercier pour tous ces

moments que nous avons passés ensemble (je pense en particulier à nos vacances aux États Unis) et pour toutes ces fois où tu as été là pour moi.

Les amis

Ma chère Manon, tu as été comme une sœur pour moi depuis que nous nous sommes rencontrées il y a maintenant 14 ans de cela ! (et oui le temps passe trop vite...). Il n'y a qu'avec toi que je ris autant et que je peux autant partager. Tu as toujours été là pour moi et ensemble nous avons fait les 400 coups. Que de beaux souvenirs... Même exilées à l'autre bout du globe nous nous sommes retrouvées. Je n'oublierai jamais les week-ends et les soirées que nous avons passés à NYC. Merci pour tous ces moments et tous ces fous rires, sans toi je ne serais pas devenue la personne que je suis aujourd'hui ;) Je tiens également à remercier tes parents, que je considère comme mes « parents d'adoption ». Merci à eux pour leur soutien et aussi pour toutes ces soirées que nous avons passés tous ensemble.

Ma chère Amélie, nos chemins se sont croisés au Lycée des Pontonniers il y a presque 10 ans et depuis nous sommes restées très proches et ce, malgré la distance qui nous sépare depuis quelques temps. Les trois ans que nous avons passés dans ce lycée à étudier (et aussi glousser) restent pour moi les plus belles années de ma vie. Je repense très souvent à ces années « d'insouciance » et je me dis que c'était la belle époque ! Merci à toi pour tous ces moments, pour ta gentillesse et ton écoute. Malgré le temps qui passe, rien ne change et ne changera entre nous. J'espère qu'un jour le destin nous rapprochera et que nous pourrons vieillir ensemble comme tu l'as toujours souhaité =)

Merci à toi ma chère Lila, que j'ai également rencontré au Lycée des Pontonniers. Avec Amélie, nous formions un sacré trio ! Malgré les années qui ont passées nous sommes toujours restées en contact et tu as toujours été là pour m'écouter et m'encourager. Un grand merci pour ta gentillesse et ta présence. Et merci pour ces week-ends à Paris, qui m'ont permis de décrocher un peu de mes recherches et de me changer les idées.

Un grand merci à toi ma chère Célia R., pour tous ces moments que nous avons partagés ensemble. J'ai été très heureuse d'apprendre à te connaître durant ma première année de thèse et à te découvrir les années qui ont suivi. Tu as toujours été là pour me

soutenir, pour m'encourager mais aussi pour les sorties =) Merci donc pour toutes ces sorties et ces soirées que nous avons passées ensemble. Je n'oublierai jamais ce week-end et cette soirée mémorable passée à Munich ;)

Mon cher voisin et ami Théo, un grand merci à toi ainsi qu'à Lucas et Hugo qui sont aussi devenus de véritables amis. Merci pour votre gentillesse, votre soutien et aussi pour tous ces moments que nous avons passés ensemble. Je repense en particulier à cette fameuse soirée où j'ai fait l'erreur de confier mes clefs à Lucas =p. J'aurais aimé partager plus de moments et de soirées avec vous pendant ces trois années, mais nous nous rattraperons après ma soutenance ;)

Aussi je souhaite remercier mes amis Régis B., Régis K., Déborah, Chloé et Elodie pour leur amitié et leur soutien tout au long de mes études. Merci d'avoir été là pour m'encourager et aussi pour me divertir à travers nos diverses sorties et soirées.

Un grand merci à mes acolytes de l'École d'ingénieur, Oriane, Adrien, Lydwine, Gaëlle, Ramona, Judith, les Camille (ma marraine, ma filleule et ma petite filleule) pour tous ces moments passés ensemble à l'ESBS, que ce soit en TP ou en soirée, et pour votre soutien pendant la thèse. Je continue à penser chaque jour à ces trois années.

This is the occasion for me to thank my former colleagues and friends from the United States, Paula, Elizabeth, Ellen, Theresa, Jenny and Katherine. I had an incredible time over there, and I think about this journey every day since I left the New England Biolabs (NEB) community. Thank you for your welcome and your kindness. You took a great care of me while I was there, and you also gave me the taste of science! It is thanks to this traineeship that I decided to start a PhD. Thank you for pushing me forward. Also, I would like to dedicate a special word to my dear colleague Shawn, who unexpectedly passed away this year. She also actively participated to my integration when I joined the NEB community and it is with a heavy heart that I learned of her passing.

Enfin, je tiens à remercier Célian, qui a été de loin la plus belle rencontre que j'ai faite durant ma thèse. Merci pour ton soutien quotidien, ton aide, ta gentillesse et tes conseils. Tu m'as donné le courage dont j'avais besoin lors de la dernière ligne droite et j'espère t'avoir

rendu fier de moi. Merci également pour ces moments de coupure et de partage. Je me réjouis à l'idée de pouvoir partager plus de moments avec toi après ma thèse.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	9
Abréviations	12
Communications, certifications et financements	15
Introduction générale	17
A. Les nanoparticules dans le domaine médical.....	19
1. Définitions.....	19
2. Les nanoparticules d'origine naturelle	19
3. Les nanoparticules synthétiques	29
4. Limites des nanoparticules	41
B. Optimisation des propriétés physico-chimiques des VLP et des liposomes pour des applications pharmaceutiques.....	44
1. Stratégies de développement de vaccins efficaces en une injection.....	44
2. Stratégies de modification de liposomes pour une meilleure stabilité en milieux biologiques	46
3. Recouvrement couche par couche (LbL)	52
Chapitre 1 : Développement et caractérisation de liposomes recouverts couche par couche afin d'augmenter leur stabilité et leur résistance en milieux biologiques	65
A. Introduction.....	67
1. Contexte et objectifs du projet.....	67
2. Stratégie.....	68
B. Résultats et discussion.....	71
1. Développement et caractérisation de layersomes de première génération	71
2. Développement et caractérisation de layersomes de deuxième génération	96
3. Évaluation de la stabilité des layersomes de deuxième génération	105

4. Conclusion.....	114
C. Materials and methods.....	115
Chapitre 2 : Développement et caractérisation d'un virus enrobé pour l'élaboration d'un vaccin à relargage différé contre les gripes pandémiques	135
A. Introduction.....	137
1. Contexte du projet et objectifs du chapitre	137
2. Choix des polyélectrolytes pour le recouvrement « LbL »	140
B. Résultats et discussion.....	142
1. Mise au point d'une procédure de recouvrement « LbL » d'un virus H5N1	142
2. Optimisation de la formulation et caractérisation des particules virales recouvertes pour l'évaluation <i>in vivo</i>	155
3. Évaluation <i>in vivo</i> de la réponse immunitaire de virus H5N1 enrobés de polymères	176
C. Conclusion.....	188
D. Materials and methods	189
Discussion générale	207
A. Recouvrement de liposomes afin d'optimiser leur stabilité	210
1. Formulation des layersomes.....	210
2. Caractérisation du recouvrement des layersomes	212
3. Évaluation de la capacité d'encapsulation des layersomes et de la stabilité du recouvrement	213
4. Évaluation de la résistance des layersomes en conditions biologiques.....	214
B. Recouvrement de particules virales pour la production d'un vaccin efficace en une injection unique	217
1. Formulation de particules virales recouvertes	217
2. Caractérisation des particules virales recouvertes.....	218
3. Évaluation de la stabilité des particules virales recouvertes.....	219

4. Évaluation du potentiel immunogène des candidats vaccins	219
Annexe : Développement de liposomes couplés à un aptamère pour le ciblage du glioblastome via le récepteur $\alpha_5\beta_1$	223
A. Introduction.....	225
1. Contexte et objectifs du projet.....	225
2. Stratégie.....	228
B. Résultats et discussion.....	235
1. Formulation et caractérisation de liposomes-5(6)-CF pour un couplage à l'aptamère H02	235
2. Évaluation <i>in vitro</i> de l'internalisation des liposomes-5(6)-CF couplés à H02 via le récepteur $\alpha_5\beta_1$	241
C. Materials and methods.....	245
Bibliographie	253

Liste des figures

Figure 1 : Biogénèse et sécrétion des exosomes chez les organismes eucaryotes.	20
Figure 2 : Structure de lipides retrouvés au niveau de la membrane des exosomes.....	21
Figure 3 : Structure d'une lipoprotéine.	22
Figure 4 : Structure de la ferritine.....	24
Figure 5 : Clichés de microscopie électronique à transmission de deux bactéries magnétotactiques de type sauvage.	25
Figure 6 : Exemples de morphologie de particules virales.	27
Figure 7 : Exemples de nanoparticules inorganiques.	30
Figure 8 : Structures des polymères classiquement employés pour la formulation des nanoparticules polymériques.....	31
Figure 9 : Les nanoparticules à base de polymères.	32
Figure 10 : Les nanoparticules lipidiques.....	33
Figure 11 : Structure d'un liposome unilamellaire et de sa bicouche lipidique.	34
Figure 12 : Structure des phospholipides naturels classiquement utilisés pour la formulation des liposomes.....	35
Figure 13 : Procédure de formulation de liposomes par hydratation d'un film lipidique.....	36
Figure 14 : Structure des différentes formes de liposomes.	37
Figure 15 : Possibilités d'association de molécules de propriétés physicochimiques différentes aux liposomes.	39
Figure 16 : Structure de l'acide polyglycolique.....	44

Figure 17 : Structure de polyanhydrides classiquement utilisés pour la formulation de microparticules vaccinales efficaces en une injection.	45
Figure 18 : Composition des lipopolymères employés pour la formulation de liposomes furtifs.....	47
Figure 19 : Structure des polymères furtifs classiquement utilisés pour la synthèse de lipopolymères.....	47
Figure 20 : Structure de matériaux employés pour augmenter la stabilité et la résistance des liposomes administrés par voie orale.	50
Figure 21 : Illustration du recouvrement couche par couche (LbL) d'un substrat.	52
Figure 22 : Stratégies de recouvrement couche par couche de substrats.	53
Figure 23 : Procédure de recouvrement couche par couche de colloïdes.	54
Figure 24 : Structure de la poly(éthylène imine) (PEI).	59
Figure 25 : Structures de polymères utilisés pour le recouvrement LbL de liposomes destinés à une administration par voie intraveineuse.....	60
Figure 26 : Structures de polymères employés pour le recouvrement LbL de liposomes destinés à une administration par voie orale.	61
Figure 27 : Recouvrement couche par couche (LbL) de liposomes à l'aide d'espèces polymériques de charge opposée.	68
Figure 28 : Structures chimiques sélectionnées pour le recouvrement des liposomes.....	69
Figure 29 : Représentation schématique du recouvrement couche par couche (LbL) des liposomes unilamellaires.	70
Figure 30 : Évolution du diamètre moyen et du potentiel zêta moyen de liposomes unilamellaires suite à leur recouvrement avec de la PLL et du PGA.....	71

Figure 31 : Procédure de formulation des liposomes recouverts de 2 couches de polyélectrolytes ou layersomes.	72
Figure 32 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL et Lp-PLL-PGA).	73
Figure 33 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp), de liposomes-PLL (Lp-PLL) et de liposomes-PLL-PGA (Lp-PLL-PGA) en fonction des concentrations de PLL et de PGA utilisées.	77
Figure 34 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp), de liposomes-PLL (Lp-PLL) et de liposomes-PLL-PGA (Lp-PLL-PGA) en fonction des concentrations de PLL et de PGA utilisées.	78
Figure 35 : Distribution des diamètres de quelques formulations de Lp-PLL-PGA préparées avec différentes concentrations en PLL et en PGA.	79
Figure 36 : Principe du transfert d'énergie entre un chromophore donneur et accepteur.	82
Figure 37 : Principe du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes respectivement greffées à la PLL (PLL*) et au PGA (PGA*) adsorbées à la surface d'un liposome.	83
Figure 38 : Représentation du transfert d'énergie entre la fluorescéine et la rhodamine.	84
Figure 39 : Synthèse du PGA-fluorescéine 64 kD à partir de sodium de PGA 64 kD, d'EDC, de sulfo-NHS et de 5-aminofluorescéine.	85
Figure 40 : Synthèse de la PLL-rhodamine 21 kD à partir de bromhydrate de PLL 21 kD, de rhodamine B isothiocyanate (RBITC) et de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA).	86

Figure 41 : Formulation de Lp-PLL*-PGA*, de Lp-PLL-PGA* préparées pour une analyse de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes à la surface des liposomes.	87
Figure 42 : Spectres d'émission des formulations de layersomes fluorescents aux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescéine (488 nm) et de la rhodamine (543 nm).	88
Figure 43 : Cristal de quartz piézoélectrique et représentation du changement de fréquence après dépôt sur un cristal de quartz.	90
Figure 44 : Variation de la fréquence d'oscillation normalisée $\Delta f_v/v$ (Hz ; avec $v = 3$) et de la dissipation d'énergie (ΔD) d'un cristal de quartz-Au après ajout d'une solution de PGA (contrôle) et après ajout d'une suspension de Lp-PLL ainsi que d'une solution de PGA.	93
Figure 45 : Profil de variation la fréquence d'oscillation normalisée $\Delta f_v/v$ (Hz) et de la dissipation ΔD obtenu suite au dépôt de vésicules lipidiques à la surface d'un cristal de quartz et suite à leur rupture.	95
Figure 46 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL et Lp-PLL-PGA).	97
Figure 47 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL _a -PGA _b).	98
Figure 48 : Structures chimiques des agents de couplage ainsi que de la forme réactive du PGA employés pour la réticulation des lysosomes.	99
Figure 49 : Synthèse du PGA-sulfo-NHS à partir de la forme acide du PGA, d'EDC et de sulfo-NHS.	101
Figure 50 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes recouverts d'une couche de PLL (Lp-PLL) et d'une couche deuxième couche de PGA-sulfo-NHS (Lp-PLL-PGA R).	102

Figure 51 : Structure de l'éther de polyéthylène glycol octylphényle (Triton™ X-100).	106
Figure 52 : Pourcentage de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) libérée des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de concentrations croissantes de Triton™ X-100.....	106
Figure 53 : Structure du taurocholate de sodium.....	108
Figure 54 : Pourcentage de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) libérée des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de concentrations croissantes de taurocholate de sodium.....	109
Figure 55 : Site de clivage des phospholipases de type A1, A2, C et D.....	110
Figure 56 : Cinétique de libération de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de phospholipase de type A2 (sPLA2) et de phospholipase de type C (PLC).....	111
Figure 57 : Cinétique de libération de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de plasma humain.....	113
Figure 58 : PGA-sulfo-NHS structure.....	118
Figure 59 : PGA-fluorescein structure.....	119
Figure 60 : PLL 21 kD-rhodamine structure.	120
Figure 61 : Structure des virus de la grippe de types A et B.	137
Figure 62 : Exemple de profil d'immunisation attendu pour un vaccin antigrippal entier inactivé avec rappel vaccinal.	138
Figure 63 : Profil d'immunisation attendu lors de la coadministration du virus nu et de la forme à relargage différé.	140
Figure 64 : Recouvrement couche par couche (LbL) de la particule virale.....	141

Figure 65 : Stratégie du recouvrement couche par couche (LbL) des particules virales.....	142
Figure 66 : Illustration de la procédure de formulation des particules d’H5N1-PLL.	143
Figure 67 : Structure chimique de la poly(epsilon-L-lysine), (PεLL).	145
Figure 68 : Formulations de particules d’H5N1-PLL.....	149
Figure 69 : Illustration de la procédure de formulation des particules d’H5N1-PLL recouvertes d’une couche de PGA.....	150
Figure 70 : Caractérisation des suspensions de virus nu, de virus-PLL et de virus-PLL-PGA.	154
Figure 71 : Bilan de la procédure de formulation des particules de virus H5N1 recouvertes de 2 couches de polymères.	155
Figure 72 : Profils de taille des formulations de particules virales recouvertes d’une et de deux couches obtenus par diffraction laser.....	157
Figure 73 : Profil de taille obtenu par diffraction laser pour la formulation d’H5N1-PLL-PGA-PLL.	159
Figure 74 : Profil de taille obtenu par diffraction laser pour la formulation d’H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS.....	164
Figure 75 : Clichés de microscopie électronique à transmission des formulations de virus.	165
Figure 76 : PLL-rhodamine 52 kD obtenue.	167
Figure 77 : Synthèse de la PLL-rhodamine 52 kD à partir de bromhydrate de PLL 52 kD, de RBITC et de DIEA.	167
Figure 78 : Formulations préparées pour l’analyse par microscopie confocale.....	168
Figure 79 : Profils de taille obtenus par diffraction laser pour les formulations de virus utilisées pour une analyse par microscopie confocale.	170

Figure 80 : Clichés de microscopie confocale des formulations de virus.	172
Figure 81 : Mesures de fluorescence des formulations préparées pour l'étude de l'élimination des polymères durant le processus de dialyse.	174
Figure 82 : Réponse immunitaire suite à une infection par le virus influenza.	178
Figure 83 : Titres d'anticorps anti-HA produits aux jours 14, 28, 42 et 56.	179
Figure 84 : Titres d'anticorps anti-HA produits aux jours 14, 35 et 56.	181
Figure 85 : Pourcentage de splénocytes T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ	183
Figure 86 : Pourcentage de splénocytes T CD4 ⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ	185
Figure 87 : Pourcentage de splénocytes T CD8 ⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ	186
Figure 88 : PLL 52 kD-rhodamine structure.	193
Figure 89 : Intégrine $\alpha_5\beta_1$ sous sa forme inactive et sous sa forme active (liée à un ligand).	226
Figure 90 : Structure secondaire prédictive de l'aptamère H02 (68 ribonucléotides).	227
Figure 91 : Structure chimique d'un ribonucléotide non modifié et modifié par ajout d'un groupement fluor en position 2' du ribose.	228
Figure 92 : Structures chimiques des fluorophores sélectionnés pour une analyse par microscopie confocale.	229
Figure 93 : Structure de deux formes de la 5(6)-carboxyfluorescéine neutre (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 518 nm).	231
Figure 94 : Devenir intracellulaire supposé des liposomes-5(6)-CF couplés à l'aptamère H02 suite à la fixation au récepteur $\alpha_5\beta_1$	232
Figure 95 : Structure de l'ancre dipalmitoylglycérol-maléimide.	233

Figure 96 : Mécanisme de l'addition de Michael d'une espèce thiolée à une fonction maléimide.....	234
Figure 97 : Structure de l'ancre dipalmitoylglycérol-maléimide couplée à l'aptamère H02-cyanine 5 (Aptamère-Cy5) en 3' par la réaction de Michael.....	234
Figure 98 : Mécanisme de réduction d'un pont disulfure formé entre deux molécules d'aptamère par le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP).....	237
Figure 99 : Séparations possibles en CES pour une suspension de liposomes-5(6)-CF et d'aptamère H02 non couplés et pour une suspension constituée d'un mélange de liposomes-5(6)-CF couplés à H02 et de liposomes-5(6)-CF non couplés.....	239
Figure 100 : Fractions 1 à 8 obtenues après filtration sur une colonne de Sephadex™ G75 de la suspension de liposomes couplés à l'aptamère H02.....	240
Figure 101 : Évaluation de l'internalisation du complexe liposomes-H02 par les cellules U-87 MG.....	242
Figure 102 : Évaluation de l'Internalisation des liposomes-5(6)-CF non couplés (contrôles) et des molécules aptamériques H02 non couplées (contrôles) par les cellules U-87 MG.....	244

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physiques et composition des lipoprotéines.	23
Tableau 2 : Exemples de microparticules vaccinales développées pour une administration en injection unique et comparaison aux formulations vaccinales de référence.	46
Tableau 3 : Exemples de matériaux utilisés pour la formulation de liposomes furtifs administrables par voie intraveineuse et résultats de leur évaluation <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i>	48
Tableau 4 : Exemples de stratégies d'optimisation de la stabilité des liposomes pour une administration par voie orale et résultats de leur évaluation.	51
Tableau 5 : Exemples de formulations de liposomes recouverts et résultats de leur évaluation <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i>	62
Tableau 6 : Diamètre moyen, indice de polydispersité (PDI) et potentiel zêta moyen des liposomes PC:PG:Chol (54:13:33) utilisés pour la formulation des layersomes.	70
Tableau 7 : Concentrations de PLL et de PGA testées pour la formulation de Lp-PLL et de Lp-PLL-PGA.	76
Tableau 8 : Évolution dans le temps des caractéristiques physico-chimiques d'une formulation de Lp-PLL après filtration par pression.	81
Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes fluorescents préparées pour l'analyse de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes.	87
Tableau 10 : Équivalents d'agents de couplage ajoutés aux formulations de layersomes-5(6)-CF recouverts de 2 (Lp-PLL-PGA) et de 4 couches (Lp-(PLL-PGA) ₂) de polyélectrolytes pour 1 équivalent de PGA.	100

Tableau 11 : Ratios moyens de libération de 5(6)-CF calculés pour les formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-(PLL-PGA) _a) de deuxième génération.....	104
Table 12 : Phospholipids concentration of the layersome formulations adjusted for the addition of a supplementary polyelectrolyte layer.	125
Table 13 : Equivalents and solutions of EDC and sulfo-NHS used for crosslinking of 2-(Lp-PLL-PGA) and 4-layers coated layersome suspensions (Lp-(PLL-PGA) ₂).....	126
Table 14 : Triton™ X-100 concentrations (p/v) prepared for the evaluation of second generation layersomes.....	131
Table 15 : Sodium taurocholate concentrations (M) prepared for the evaluation of second generation layersomes.	132
Tableau 16 : Diamètre moyen, indice de polydispersité (PDI) et potentiel zêta moyen du virus H5N1 entier inactivé.....	141
Tableau 17 : Caractérisation physico-chimique des formulations virales après contact avec une solution de PLL (21 kD) en fonction des conditions tamponnées.	144
Tableau 18 : Caractérisation physico-chimique des formulations virales après contact avec des solutions de polylysine (PLL et PεLL) de concentrations différentes.	146
Tableau 19 : Caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues avant et après dialyse des suspensions préparées avec des solutions de polylysine à 1 mg/mL (PLL et PεLL).....	147
Tableau 20 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées avec 1 et 2 mg/mL de PGA 64 kD avant et après dialyse.	151
Tableau 21 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées avec 1,0 mg/mL de PLL 4,2 et 21 kD puis avec 1,0 mg/mL de PGA 64 kD, avant et après ajout du polyanion.	151
Tableau 22 : Caractérisation physico-chimique de suspensions avant et après ultracentrifugation et dialyse.....	152

Tableau 23 : Caractérisation physico-chimique des particules virales recouvertes de 3 et 4 couches de polymère préparées avec 1,0 ou 2,0 mg/mL de PLL et de PGA.....	158
Tableau 24 : Caractérisation physico-chimique des suspensions réticulées après ajout de la couche de PLL et de PGA, suite à la réticulation et 48 h post-réticulation.	161
Tableau 25 : Caractérisation physico-chimique des suspensions réticulées à l'aide de PGA-sulfo-NHS suite aux différentes étapes de formulation.	162
Tableau 26 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées pour l'analyse par microscopie confocale.	169
Table 27 : Buffering conditions tested for LbL coating of the virus.....	195
Tableau 28 : Suspensions de liposomes en cours d'essais cliniques pour le traitement de tumeurs cérébrales.	231
Tableau 29 : Caractéristiques physico-chimiques des liposomes-5(6)-CF préparés avec une solution tamponnée de pH 6,5.	235
Tableau 30 : Caractéristiques physico-chimiques des liposomes-5(6)-CF avant et après couplage à l'aptamère H02.	238

Abréviations

5(6)-CF	5(6)-carboxyfluorescéine
ADCC	Antibody-dependent cell toxicity, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analysis of variance, analyse de la variance
APC	Antigen presenting cell, cellule présentatrice de l'antigène (CPA)
ARN	Acide ribonucléique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Bovine serum albumin, albumine de sérum bovin
CBB	Coomassie brilliant blue, bleu de Coomassie
CD4	Cluster de différenciation 4
CD8	Cluster de différenciation 8
Chol	Cholestérol
CI	Confidence interval, intervalle de confiance
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaleine A
COST	European Cooperation in Science and Technology
CPMV	Cowpea mosaic virus, virus de la mosaïque du niébé
CTL	Cytotoxic T lymphocyte, lymphocyte T cytotoxique
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DC	Dendritic cell, cellule dendritique
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DLS	Dynamic light scattering, diffusion dynamique de la lumière
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPG-mal	Ancre thiol-réactive dipalmitoylglycérol-maléimide
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ENOVA	European Network of Vaccine Adjuvants
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, cytométrie en flux
FBS	Fetal bovine serum, sérum fœtal bovin
FDA	Food and Drug Administration,
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GBM	Glioblastome
GUV	Giant unilamellar vesicle, vésicule unilamellaire géante
HA	Hémagglutinine
HAI	Hemagglutination assay, test d'inhibition de l'hémagglutination
HDL	High density lipoprotein, lipoprotéine de haute densité
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HI	Hemagglutination inhibition, inhibition de l'hémagglutination
IFN-γ	Interféron gamma
IFN-I	Interféron I

IgG	Immunoglobuline G
IL-2	Interleukine 2
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LbL	Layer-by-Layer, couche par couche
LD	Laser diffraction, diffraction laser
LDL	Low density lipoprotein, lipoprotéine de faible densité
LUV	Large unilamellar vesicle, vésicule unilamellaire large
MAMPS	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
MEM	Minimum essential medium, milieu minimum essentiel
miRNA	MicroRNA, micro-ARN
MLV	Multilamellar vesicle, vésicule multilamellaire
MRES	Bourse ministérielle de recherche et d'enseignement supérieur
mRNA	Messenger RNA, ARN messenger
MVB	Multivesicular bodies, corps multivésiculaires
NA	Neuraminidase
NIH	National Institute of Health
NK	Natural killer lymphocyte, lymphocyte natural killer
NMR	Nuclear magnetic resonance, résonance magnétique nucléaire (RMN)
OD	Optical density, densité optique (DO)
PAH	Poly(allylamine hydrochloride), poly(hydrochlorure d'allylamine)
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay, test de perméabilité sur membrane artificielle
PBS	Phosphate buffer saline, tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PDB	Protein Data Bank, Banque de données structurales de protéines
PDI	Polydispersity index, indice de polydispersité
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEG-b-PLD	Copolymère de poly(éthylène glycol) et d'acide poly(L-aspartique)
PEG-DMA	Poly(éthylène glycol)-diméthacrylate
PEI	Poly(éthylène imine)
PεLL	Poly(epsilon-L-lysine)
PEOZ	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)
PES	Poly(éther sulfone)
PET	Positron emission tomography, tomographie par émission de positrons
PG	Phosphatidylglycérol
PGA	Poly(L-glutamic acid), acide poly(L-glutamique)
PL	Phospholipides
PLD	Poly(L-aspartic acid), acide poly(L-aspartique)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic-acid), copolymère lactoglycolique
PLL	Poly(L-lysine)
PLR	Poly(L-arginine)
PMOZ	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
ppm	Partie par million
PRR	Pattern recognition receptor, récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PSS	poly(styrène sulfonate)
PVA	Poly(vinyl alcohol), poly(alcool vinylique)

PVP	Poly(vinyl pyrrolidone)
PVX	Potato virus X, virus X de la pomme de terre
QD	Quantum dot
RBC	Red blood cell, globule rouge
RBITC	Rhodamine B isothiocyanate
RES	Reticuloendothelial system, système réticulo-endothélial
rHDL	Reconstituted high density lipoprotein, lipoprotéine de haute densité reconstituée
RNase	Ribonucléase
rpm	Revolution per minute, tour par minute
SARS	Severe acute respiratory syndrome, syndrome respiratoire aigu sévère
SD	Substitution degree, degré de substitution
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience acquise
SNC	Système nerveux central
SRID	Single radial immunodiffusion, immunodiffusion radiale simple
STCT	Signalisation Tumorale et Cibles Thérapeutiques
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
SUV	Small unilamellar vesicle, vésicule unilamellaire de petite taille
TA	Température ambiante
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TCR	T cell receptor, récepteur des cellules T
TEM	Transmission electron microscopy, microscopie électronique à transmission
Th	T helper, lymphocyte T auxiliaire
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TMV	Tobacco mosaic virus, virus de la mosaïque du tabac
UV	Ultra-violet
UNIL	Université de Lausanne
VFL	Vaccine Formulation Laboratory
VLDL	Very low density lipoprotein, lipoprotéine de très faible densité
VLP	Virus like particle, pseudo-particule virale
WHO	World Health Organization, Organisation Mondiale de la Santé (OMS)
WIV	Whole inactivated virus, virus entier inactivé

Communications, certifications et financements

❖ Communications orales

- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Development and characterization of stable suspensions of layersomes for oral administration** », European Material and Research Society (E-MRS) International Symposium, Strasbourg, 21 mai 2018
Sélection pour une presentation orale « Young Star »
- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Development and characterization of stable suspensions of layersomes as original drug delivery systems** », Journées du Campus d'Illkirch (JCI), Strasbourg, 16 mai 2018

❖ Communications par affiche

- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Layer-by-Layer coating of liposomes to tune their physico-chemical properties toward biological applications** », Journées du Campus d'Illkirch (JCI), Strasbourg, 1^{er} avril 2019
- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Layersomes as original drug delivery systems: development and characterization** », 54th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2018), Strasbourg, 4 juillet 2018
Prix du meilleur poster
- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Development and characterization of stable suspensions of layersomes for oral administration** », European Material and Research Society (E-MRS) International Symposium, Strasbourg, 21 mai 2018
- Florence Hermal, Benoît Frisch, Line Bourel et Béatrice Heurtault, « **Development and characterization of stable suspensions of layersomes as original drug delivery systems** », Forum Biochem, Strasbourg, 4 juin 2018

❖ **Certificats obtenus**

- **Certification à la chirurgie des rongeurs**
Délivrée à Strasbourg le 20 juin 2017
- **Certification à l'expérimentation animale**
Délivrée à Strasbourg le 4 septembre 2017

❖ **Financements**

- **Bourse pour une mission scientifique (2019)**
COST (European Cooperation in Science and Technology) et ENOVA (European Network of Vaccine Adjuvants)
Financement pour une mission scientifique au VFL (Vaccine Formulation Laboratory)
- **Bourse ministérielle de doctorat (2016 – 2019)**
École Doctorale des Sciences Chimiques de Strasbourg

Introduction générale

The scientist does not study nature because it is useful to do so. He studies it because he takes pleasure in it.

Henri Poincaré

A. Les nanoparticules dans le domaine médical

1. Définitions

D'après la définition du National Institute of Health (NIH) et de la Commission Européenne, les nanoparticules (ou nanomatériaux) sont des objets d'origine naturelle ou synthétique dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm.^{1,2} Cette définition exclut donc les objets dont les tailles sont comprises entre 100 et 1000 nm (matériaux submicroniques). Néanmoins, la littérature associée aux nanoparticules notamment dans le domaine biomédical, utilise le terme nano-objets naturels ou synthétiques quand au moins une des dimensions est inférieure au micron. C'est donc cette définition moins restrictive qui sera considérée pour le reste du manuscrit.

Qu'elles soient d'origine naturelle ou synthétique, les nanoparticules ont depuis plus d'un siècle suscité l'intérêt de la communauté scientifique et ont été utilisées pour diverses applications et tout particulièrement dans le domaine biomédical. Dans la partie suivante, quelques exemples de nanoparticules d'origine naturelle ou synthétique seront cités. Ces exemples se concentreront sur les nanoparticules utilisées dans le domaine biomédical et en particulier sur les nanoparticules employées pour ces travaux de thèse, à savoir les virus et les liposomes.

2. Les nanoparticules d'origine naturelle

Les nanoparticules d'origine naturelle sont des assemblages d'atomes ou de molécules produites par un système biologique. Elles incluent des structures intracellulaires telles que les magnétosomes décrits ci-après ainsi que des structures extracellulaires telles que les complexes de protéines et les virus. Leurs fonctions sont diverses, allant du stockage de molécules à la communication intercellulaire.³ Elles ont d'autre part fait l'objet de modifications à des fins thérapeutiques et de diagnostic, et ont largement inspiré la communauté scientifique pour le développement de nombreuses nanoparticules synthétiques.

2.1. Les exosomes

Les exosomes sont des structures vésiculaires de 50 à 160 nm de diamètre constituées d'une bicouche lipidique formées par invagination de la membrane des endosomes primaires et d'un type plus tardif d'endosome : les corps multivésiculaires (multivesicular bodies, MVB).⁴ Ces MVB vont pouvoir après fusion avec la membrane plasmique des cellules, être relargués dans l'espace extracellulaire (Figure 1).⁵

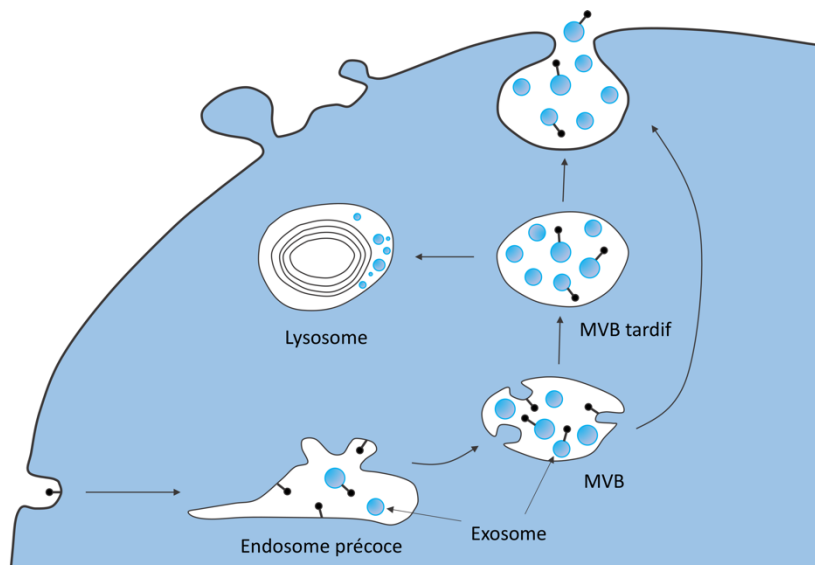


Figure 1 : Biogénèse et sécrétion des exosomes chez les organismes eucaryotes. Les exosomes sont formés par invagination de la membrane des endosomes primaires et des corps multivésiculaires (MVB). Les corps multivésiculaires peuvent soit fusionner avec les lysosomes soit avec la membrane plasmique des cellules pour relarguer leur contenu dans l'espace extracellulaire. D'après la référence 6.

Les exosomes sont sécrétés par de nombreux types cellulaires, tels que certaines cellules immunitaires,^{7,8} les neurones,⁹ les adipocytes,¹⁰ les cellules souches mésenchymateuses¹¹ ainsi que les cellules endothéliales¹² et les cellules cancéreuses.¹³ La membrane des exosomes est constituée en majeure partie de cholestérol (A) et de sphingolipides (B) associés à des rafts lipidiques, des céramides (C), des phosphoglycérides (D) et des sacharrides (Figure 2).^{14,15} Elle contient également un ensemble de protéines membranaires dont la composition dépend du tissu cellulaire d'origine, avec néanmoins certaines protéines hautement conservées que l'on retrouve dans toute membrane

exosomale.⁴ Les exosomes peuvent encapsuler des protéines ainsi que des acides nucléiques tels que les ARN messagers (mRNA) et des micro-ARN (miRNA)¹⁶ et ont de nombreux rôles biologiques. Ils permettent notamment d'éliminer (par sécrétion) des protéines membranaires ainsi que des miRNA indésirables.¹⁵ De nombreuses études ont également démontré qu'ils jouent un rôle dans la réponse immunitaire par la présentation d'antigènes¹⁷ ainsi que dans l'inflammation, l'apoptose et la coagulation.⁴

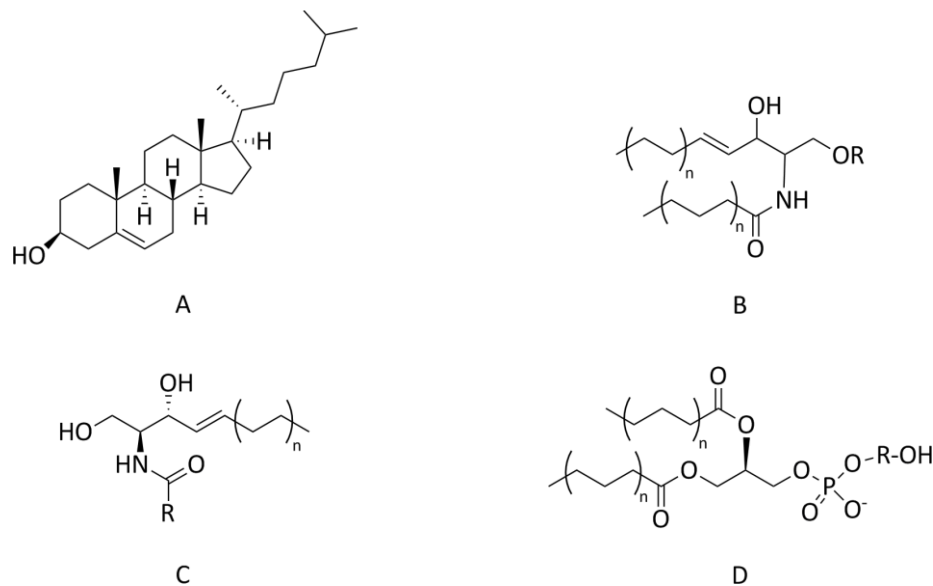


Figure 2 : Structure de lipides retrouvés au niveau de la membrane des exosomes. (A) : cholestérol ; (B) : sphingolipides ; (C) : céramides ; (D) : phosphoglycérides.

Au vu de leur fonction dans la réponse immunitaire, les exosomes ont été employés dans la composition de vaccins nanoparticulaires antitumoraux pour le traitement de mélanomes et de tumeurs pulmonaires. En effet, des essais cliniques incluant des exosomes provenant de cellules dendritiques autologues auxquels a été attaché un antigène tumoral sont en cours.¹⁸ De plus, comme beaucoup de fluides corporels contiennent des exosomes encapsulant des miRNA, les exosomes pourraient être particulièrement intéressants pour le diagnostic et le pronostic de cancers.¹⁹

2.2. Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des structures complexes formées par auto-assemblage qui sont constituées de lipides (cholestérol estérifié et non estérifié, phospholipides et

triglycérides) et de protéines amphiphiles appelées les apolipoprotéines. Les lipides et les protéines constituant ces complexes forment des nanoparticules sphériques ou discoïdales avec des tailles allant de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres (Figure 3 et Tableau 1).²⁰

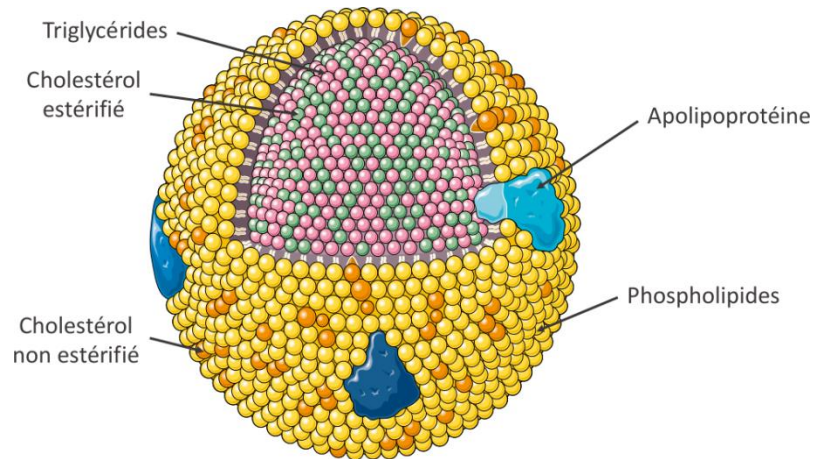


Figure 3 : Structure d'une lipoprotéine. Les lipoprotéines sont des structures nanoparticulaires de forme sphérique ou discoïdale. Elles sont formées par auto-assemblage de lipides (cholestérol estérifié et non estérifié, phospholipides et triglycérides) et d'apolipoprotéines.

Leur fonction est le transport de lipides dans le sang entre les différents tissus périphériques et le foie. Elles sont synthétisées par le foie et l'intestin et leur structure ainsi que leur composition change au fur et à mesure de leur parcours dans le sang. Les lipoprotéines se distinguent par leur taille, leur densité ainsi que leur contenu protéique et lipidique. On distingue 4 classes de lipoprotéines, à savoir les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoproteins, VLDL), les lipoprotéines de faible densité (low density lipoproteins, LDL) et les lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins, HDL), (Tableau 1).²⁰

Les capacités d'auto-assemblage des lipoprotéines, de transport de molécules hydrophobes et de ciblage de certains organes, tel que le foie, ont suscité un intérêt considérable pour ces nanoparticules naturelles.²¹ En effet, il est possible de les modifier en remplaçant les lipides les constituants par des lipides synthétiques, en utilisant des

apolipoprotéines modifiées ou encore en insérant des molécules hydrophobes.²² Il est également possible de moduler leur taille en jouant sur le ratio protéines/lipides.

Tableau 1 : Propriétés physiques et composition des lipoprotéines. La composition lipidique est exprimée en pourcentage massique (wt%). D'après la référence ²³.

Lipoprotéine	Taille (nm)	Densité (g/mL)	Composition lipidique (wt%)	Apolipoprotéines
VLDL	60	0,940 – 1,006	91	B100, C1, C2, C3
LDL	25	1,006 – 1,063	80	B100, a
HDL	7 – 12	1,063 – 1,210	44	A1, A2, A5, D, E, M

De nombreux travaux ont ainsi été effectués en particulier sur des HDL et il a été démontré que ces complexes conservent leur capacité d'auto-assemblage ainsi que leur stabilité, et ce malgré les modifications apportées. Ces complexes ont ainsi été nommés les lipoprotéines de haute densité reconstituées (rHDL).²⁴ Les rHDL ont été développées pour des applications de diagnostic et pour des applications thérapeutiques, telles que l'imagerie médicale (en intégrant du gadolinium ou des éléments radioactifs),^{25–31} la vaccination (en insérant des antigènes de pathogènes ou tumoraux),^{32,33} le ciblage actif (en modifiant les apolipoprotéines par ajout d'un élément de ciblage)^{34,35} ou encore la délivrance de substance actives lipophiles peu solubles et toxiques telle que l'amphotéricine B.³⁶

2.3. Les ferritines et les magnétosomes

Les ferritines et les magnétosomes sont des particules protéiques contenant des ions ferriques que l'on retrouve chez certains organismes primitifs ainsi que chez des organismes eucaryotes plus évolués.

2.3.1. Les ferritines

On retrouve les ferritines chez les bactéries et des *Archaea* ainsi que chez les eucaryotes. La ferritine est un complexe protéique constitué de 24 sous-unités qui s'assemblent pour former une capsule creuse presque sphérique de 12 nm de diamètre similaire à la capsid de certains virus (Figure 4). L'intérieur de la cavité peut contenir jusqu'à

Introduction

4500 atomes de fer. Chez les bactéries et les *Archaea*, on retrouve un seul type de sous-unité. En revanche, il existe 2 types de sous-unités chez les eucaryotes : la sous-unité L (pour light) qui ne présente pas d'activité enzymatique mais dont le rôle est d'induire la nucléation des ions ferrique, et la sous-unité H (pour heavy) qui catalyse la formation d'oxohydroxydes ferriques à partir d'ions ferriques. Elles s'assemblent pour former un hétéropolymère de 24 unités et leur ratio (H/L) varie d'une espèce à une autre et d'un tissu à un autre.^{37,38}

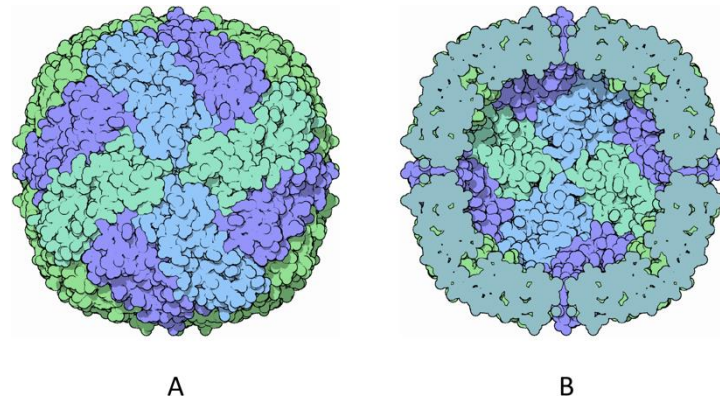


Figure 4 : Structure de la ferritine. (A) : Surface extérieure et (B) : coupe transversale de l'intérieur. Les différentes couleurs représentent les sous-unités de la ferritine. D'après la référence 39. Entrée PDB : 1FHA.

Chez les organismes primitifs, les ferritines ont pour rôle de synthétiser et de stocker des oxydes de fer ainsi que de séquestrer des ions ferriques potentiellement endommageant.^{40,41} Chez les organismes plus évolués, la ferritine a à la fois un rôle de stockage des ions ferriques ainsi qu'un rôle antioxydant puisqu'elle empêche la génération de radicaux hydroxyles produit lors de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} , ainsi que la production d'autres radicaux libres grâce à son activité ferroxidase que l'on retrouve chez les ferritines mitochondriales.⁴¹

De par leur contenu important en fer, les ferritines sont des nanoparticules qui ont généré un intérêt considérable pour des applications de diagnostic et pour des applications thérapeutiques.⁴² En effet, ces nanoparticules d'origine naturelle sont détectables par imagerie à résonance magnétique (IRM) et ont été utilisées en tant qu'agents de contraste.⁴³⁻⁴⁵ Ces particules ont également été utilisées pour le ciblage spécifique de cellules par ajout de peptides biotinylés ou couplés à la surface des ferritines ainsi que pour

la délivrance de substances antitumorales en remplaçant les oxydes de fer contenus dans leur cœur par des substances thérapeutiques.^{42,43}

2.3.2. Les magnétosomes

Les magnétosomes sont des petites organelles constituées d'une membrane lipidique contenant des minéraux ferriques tels que les magnétites ou les greigites. Ces petites vésicules sont retrouvées chez certaines bactéries dites magnétotactiques et leur permettent de s'orienter par rapport au champ magnétique terrestre afin de se diriger vers les zones pauvres en oxygène.⁴⁶ Chez les bactéries magnétotactiques, les magnétosomes sont des vésicules de 50 à 70 nm de diamètre formées par invagination de la membrane interne, organisées en une ou plusieurs chaînes de vésicules (Figure 5). Leur membrane contient un ensemble unique de 20 à 40 protéines impliquées dans la formation membranaire et dans la régulation de la taille de ces vésicules ainsi que dans la formation des chaînes de magnétosomes.⁴⁶ Ces petites organelles sont également présentes chez les abeilles,⁴⁷ chez certains mollusques marins,⁴⁸ chez certains oiseaux^{49,50} et même chez l'homme au niveau de l'hippocampe et de plaques amyloïdes impliquées dans la maladie d'Alzheimer.⁵¹ Si les magnétosomes semblent jouer un rôle d'orientation par rapport au champ magnétique terrestre pour les oiseaux,^{49,50} leur rôle n'a pas encore été identifié chez l'homme.⁵²

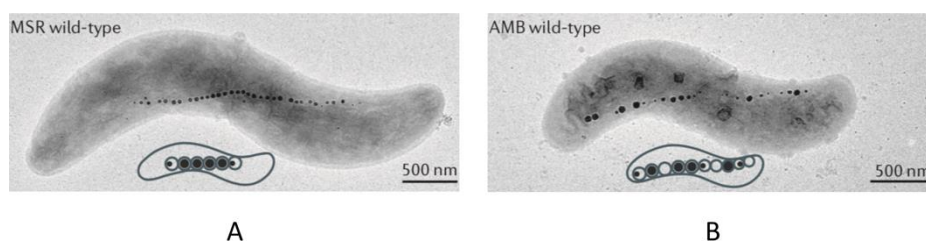


Figure 5 : Clichés de microscopie électronique à transmission de deux bactéries magnétotactiques de type sauvage. (MSR, A) : *Magnetospirillum gryphiswaldense* ; (AMB, B) : *Magnetospirillum magneticum*. Ces clichés mettent en évidence l'organisation en chaîne des magnétosomes. D'après la référence 46.

Les magnétosomes ont été employés en tant qu'agents de contraste pour les IRM,⁵³⁻⁵⁶ pour le ciblage actif de cellules tumorales,^{57,58} pour la délivrance de substances actives⁵⁹⁻⁶³ ainsi que pour l'éradication de tumeurs solides par hyperthermie^{64,65} et photothermie.⁵⁸

2.4. Les virus

2.4.1. Définition

Les virus sont des nanoparticules infectieuses qui nécessitent une cellule hôte dont ils utilisent le métabolisme et les constituants pour se répliquer. Tout organisme vivant peut être infecté par un virus. En effet, il existe des virus de bactéries (les bactériophages), d'*Archaea*, d'algues, de plantes, de mycètes, et d'animaux. Chez l'homme, les virus sont responsables de nombreuses pathologies telles que la grippe, la variole, la varicelle ou encore des infections plus sévères telles que des syndromes respiratoires aigus sévères (SARS) ou le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA).

2.4.2. Structure

Les virus sont constitués d'une coque protéique appelée capsid, qui renferme et préserve le génome viral de type ADN ou ARN. La capsid de certains virus peut être enveloppée par une membrane provenant de la cellule hôte qui est appelée l'enveloppe. Les virus recouverts de cette enveloppe sont dits « enveloppés » tandis que les virus constitués uniquement d'une capsid sont dits « nus ». Les virus présentent une diversité importante tant du point de vue de leur taille (dans la gamme nanométrique) et de leur morphologie que du point de vue de leur stratégie de réplication. La Figure 6 illustre quelques exemples de morphologies retrouvées chez les virus, à savoir les formes icosaédriques (virus de la polio et adénovirus, A), les formes hélicoïdales (virus de la mosaïque du tabac, TMV, B), les formes sphériques (virus de la grippe et le VIH, C) et d'autres formes plus atypiques (bactériophages, D).

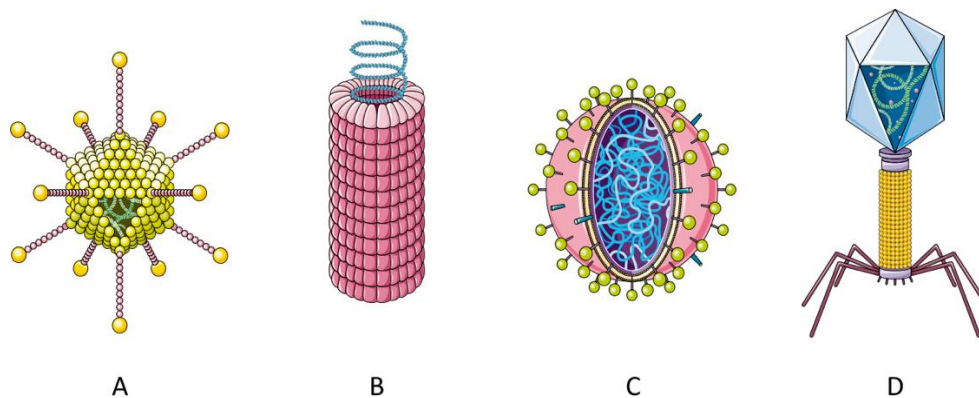


Figure 6 : Exemples de morphologie de particules virales. (A) : forme icosaédrique comme celle des adénovirus ; (B) : forme hélicoïdale comme celle du virus de la mosaïque du tabac ; (C) : forme sphérique comme celle du virus de la grippe ; (D) : forme atypique des bactériophages.

2.4.3. Avantages des nanoparticules virales

Les nanoparticules virales possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques attrayantes qui ont rapidement suscité l'intérêt de la communauté scientifique.^{23,66} Les nanoparticules virales s'auto-assemblent en des structures monodisperses de géométrie et de taille bien définies et peuvent être rapidement produites en grandes quantités.⁶⁶ Les protéines de la capsidie peuvent être dissociées puis réassemblées, permettant ainsi l'encapsulation de molécules.^{66,67} Beaucoup d'entre elles résistent à des températures de 60°C pendant plusieurs heures et restent intactes sur une large gamme de pH (2 à 10), témoignant de leur stabilité et de leur robustesse.⁶⁸ Enfin, elles peuvent être modifiées par génie génétique ou par des méthodes de bioconjugaison.⁶⁹

2.4.4. Applications

Les nanoparticules virales ont été découvertes et identifiées au début du XIX^{ème} siècle et ont depuis lors fait l'objet de diverses applications. Dans la majeure partie des cas, les nanoparticules virales utilisées sont des particules « virus-like » (virus-like particles, VLP) qui sont constituées de la capsidie virale mais dont le génome a été éliminé afin de supprimer leur potentiel infectieux.⁷⁰

a. Vaccination

Les VLP ont en premier lieu été utilisées pour la vaccination afin d'induire une immunité contre un pathogène viral. Les premiers vaccins à base de VLP ont été développés dans les années 1930 à 1960 contre des agents pathogènes tels que le virus de la grippe ou encore le virus de la poliomyélite.⁷¹ Depuis lors, de nombreux autres vaccins à base de VLP ont été fabriqués et ont ainsi permis de réduire l'impact d'un nombre considérable de pathogènes viraux.⁷² Des VLP conjuguées à des épitopes tumoraux ainsi que des VLP chimériques exprimant et présentant des épitopes de tumeurs à la surface de leur capsid ont également été employées pour la vaccination antitumorale afin d'améliorer la réponse immune spécifique des tumeurs.^{73,74}

b. Production de molécules d'intérêt thérapeutique

Au vu de leur importante capacité d'expression, les VLP ont également été exploitées en tant que vecteurs d'expression (par introduction d'un plasmide contenant un gène d'intérêt) pour la production à grande échelle de molécules d'intérêt thérapeutique, telles que les protéines et plus particulièrement les anticorps. Ce sont notamment les virus de plantes,⁷⁵ tels que TMV,^{76,77} le virus de la mosaïque du niébé (cowpea mosaic virus, CPMV)^{78,79} ou encore le virus X de la pomme de terre (potato virus X, PVX)^{80,81} qui ont été employés pour la production de ces molécules thérapeutiques.

c. Imagerie médicale

Dans le domaine de l'imagerie médicale, les VLP ont aussi été utilisées en tant qu'agents de contraste.⁸² En effet, des VLP couplées à du gadolinium ou encapsulant cet élément ainsi que des VLP greffées avec des isotopes du fluor radioactifs (¹⁸F) ont été développées et ont respectivement été utilisées en IRM⁸³⁻⁸⁵ et en tomographie par émission de positons (PET scan).^{86,87}

d. Délivrance d'agents thérapeutiques

Enfin, les VLP ont également été employées en tant que vecteurs pour la délivrance de substances thérapeutiques. En effet, des VLP encapsulant, exprimant (par génie génétique) ou couplées (par bioconjugaison) à des molécules d'intérêt thérapeutique tels

que des peptides, des protéines, des antibiotiques ou encore des molécules cytotoxiques ont été développées.⁸⁸⁻⁹⁰ Au vu de leur capacité naturelle à délivrer du matériel génétique, les VLP ont aussi été utilisées pour la thérapie génique en tant que vecteurs de délivrance de gènes d'intérêt thérapeutique.^{91,92} Enfin, afin de garantir un ciblage actif, des VLP exprimant ou couplées à des ligands spécifiques d'un récepteur ont également fait l'objet d'études et ont été employées pour la délivrance spécifique de molécules actives.^{93,94}

3. Les nanoparticules synthétiques

Les nanoparticules synthétiques sont obtenues par des assemblages de divers matériaux (polymères, lipides, métaux). Au regard de leur capacité à vectoriser des molécules, elles sont en particulier utilisées dans le domaine médical en tant qu'outils de diagnostic et/ou thérapeutiques. Il existe 3 grandes catégories de nanomatériaux synthétiques : les nanoparticules inorganiques, les nanoparticules à base de polymères, et les nanoparticules lipidiques.

3.1. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont des particules colloïdales constituées d'éléments inorganiques comme les quantum dots (QD, A), les nanotubes de carbone (B), les nanoparticules d'oxydes de fer (C), d'or (D), de silice (E) ou encore des nanoparticules plus complexes constituées d'un ensemble de terres rares (Figure 7). Diverses stratégies ont été développées pour la fabrication de ces particules telles que la méthode sol-gel (solution-gélification), la méthode de transfert de phase, la synthèse hydrothermale et solvothermale, ou encore la synthèse sous micro-onde.⁹⁵

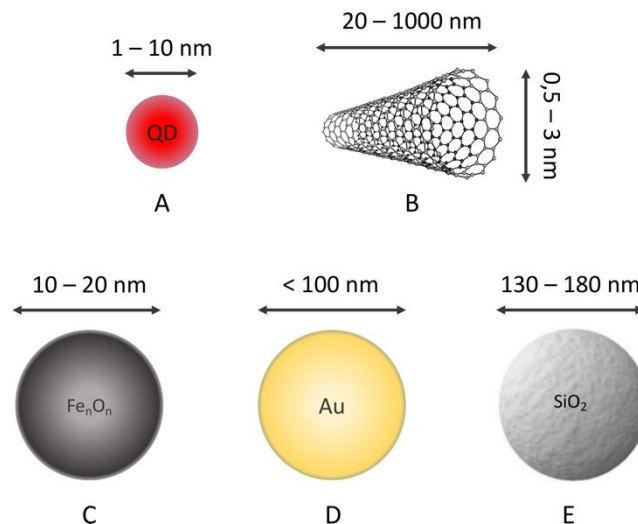


Figure 7 : Exemples de nanoparticules inorganiques. (A) : quantum dots ; **(B) :** nanotubes de carbone ; **(C) :** nanoparticules d'oxydes de fer ; **(D) :** nanoparticules d'or ; **(E) :** nanoparticules de silice. D'après les références 96 et 97.

Les nanoparticules inorganiques présentent des propriétés intrinsèques de luminescence qui sont plus intéressantes que les particules organiques, tels que des spectres d'absorption plus étroits, la possibilité de moduler leurs longueurs d'onde d'émission en jouant sur leur taille ou encore la conversion ascendante de photons qui permet de travailler à des longueurs d'onde d'absorption (proche infrarouge) pouvant pénétrer les tissus biologiques.⁹⁸ De ce fait, elles ont été largement utilisées dans le domaine de l'imagerie médicale (IRM, PET scan, tomographie aux rayons X, imagerie par fluorescence/luminescence).^{98,99} Les nanoparticules inorganiques sont également employées en tant qu'outils thérapeutiques, notamment pour le traitement de tumeurs. En effet, leur surface est aisément chimiquement modifiable ce qui permet de les fonctionnaliser avec des molécules de ciblage (peptides, protéines) et avec des substances actives (paclitaxel, doxorubicine).^{100,101} Par ailleurs, certaines particules inorganiques sont employées en tant que telles (sans substance active) pour le traitement localisé de tumeur. En effet, les nanoparticules métalliques ainsi que les nanoparticules constituées de terres rares engendrent des dégâts tissulaires irréversibles sous l'influence d'un stimulus externe (champ magnétique, photons).^{102,103} Néanmoins, la toxicité de certaines nanoparticules inorganiques, telles que les QD et certaines particules métalliques, a jusqu'à présent limité

leur application. En effet, ces nanoparticules ne sont ni biodégradables, ni éliminées par l'organisme, ce qui engendre une toxicité importante à long terme.^{96,104}

3.2. Les nanoparticules à base de polymères

Les nanoparticules à base de polymères sont des particules colloïdales avec des tailles allant de 5 à 1000 nm de diamètre. Ces particules peuvent être manufacturées en utilisant des polymères synthétiques tels que le copolymère lactoglycolique (poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA, A), le polyacrylate (B), le polycaprolactone (C) et les poly(acides aminés) (D), (Figure 8). Elles peuvent aussi être fabriquées à partir de polymères naturels tels que l'albumine, la gélatine, l'acide hyaluronique (E), l'alginate (F), le collagène et le chitosan (G), (Figure 8).¹⁰⁵ De nombreuses techniques de formulation ont jusqu'alors été développées pour la production de ces nanoparticules, telles que la méthode d'évaporation du solvant (la plus utilisée), la méthode de double émulsion et d'évaporation, la coacervation, la polymérisation ou encore la préparation de nanoparticules en utilisant la technologie des fluides supercritiques.¹⁰⁶

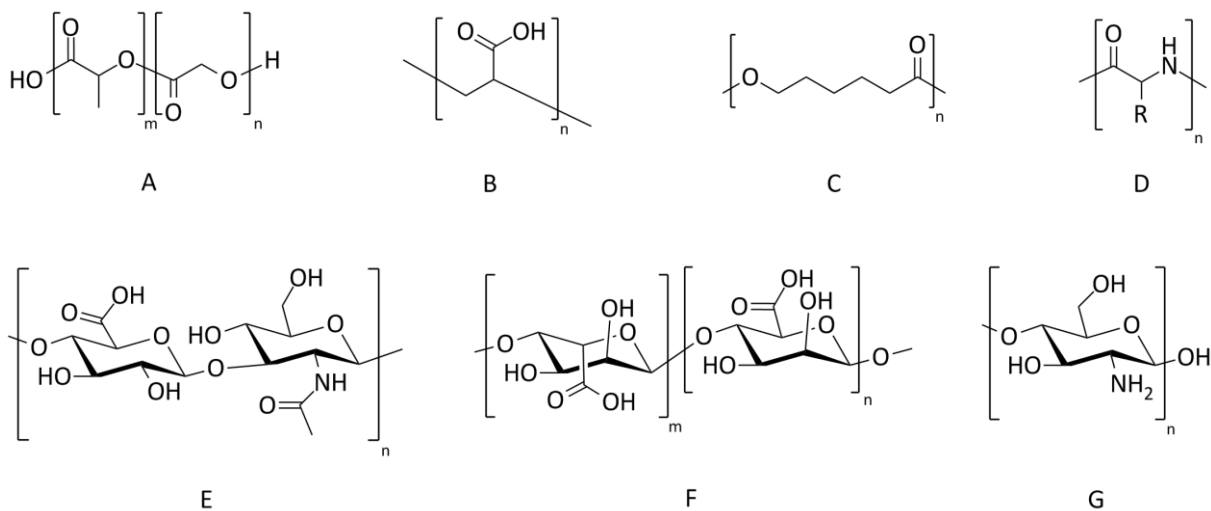


Figure 8 : Structures des polymères classiquement employés pour la formulation des nanoparticules polymériques. (A) : copolymère lactoglycolique (PLGA) ; (B) : polyacrylate ; (C) : polycaprolactone ; (D) : poly(acides aminés) ; (E) : acide hyaluronique ; (F) : alginate ; (G) : chitosan. R = chaînes latérales des poly(acides aminés).

Ces nanoparticules sont préférentiellement formulées avec des matériaux biodégradables afin d'obtenir un relargage progressif d'une substance active préalablement encapsulée.¹⁰⁷⁻¹¹¹ Selon la nature et la structure des polymères employés et selon la méthode de formulation, il est possible d'obtenir des nanoparticules de morphologies et de tailles variées¹¹² : des nanosphères (constituées d'un cœur polymérique, A), des nanocapsules (composées d'une coque de polymère qui renferme un cœur huileux ou aqueux, B), des micelles (constituées de copolymères amphiphiles, C), des polymersomes (sphères creuses constituées d'une bicouche de polymères amphiphiles, D) ou encore des dendrimères (structure en branche, E), (Figure 9).

Les nanoparticules polymériques ont été employées en imagerie médicale ainsi que pour la délivrance de diverses substances actives (protéines, peptides, antitumoraux, ARN interférents).^{113,114} L'utilisation de polymères sensibles à des conditions chimiques telles que le pH ou le potentiel d'oxydo-réduction ; à des conditions physiques telles que la température, l'intensité lumineuse, le champ magnétique ou encore à des conditions biologiques, telles que la dégradation enzymatique, permet un relargage contrôlé dans le temps et dans l'espace des substances encapsulées, greffées ou adsorbées à la surface de ces particules.¹¹⁵⁻¹¹⁷

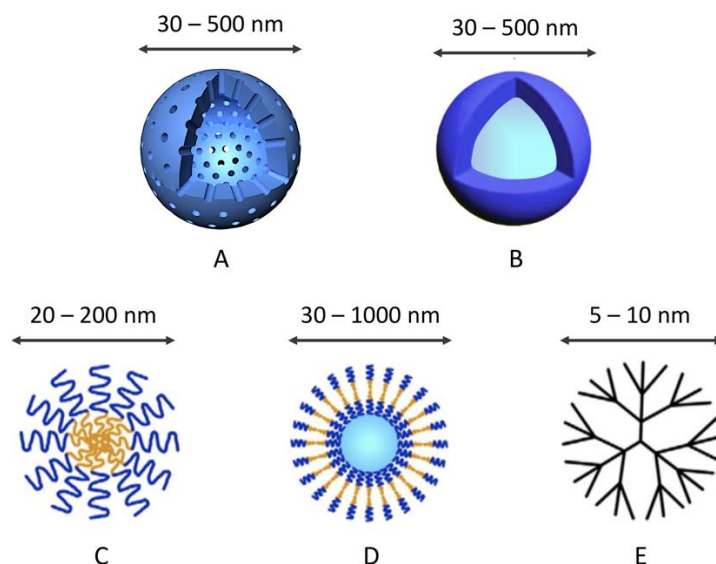


Figure 9 : Les nanoparticules à base de polymères. (A) : nanosphères ; (B) : nanocapsules ; (C) : micelles ; (D) : polymersomes ; (E) : dendrimères. D'après les références 118 et 119.

3.3. Les nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont des particules colloïdales formées par des lipides sous forme solide ou liquide avec des tailles allant de quelques nanomètres à quelques microns. Les stratégies de formulation de ces particules sont diverses mais ont toutes comme point commun la dispersion de molécules lipidiques dans une phase aqueuse. En fonction de la procédure de formulation et des lipides employés, des nanoparticules de morphologies très variées peuvent être obtenues, telles que des nanoémulsions (émulsion simple ou double, A), des micelles (agrégats lipidiques, B), des nanoparticules lipidiques solides (cœur lipidique solide stabilisé par un surfactant, C), des nanocapsules possédant un cœur huileux (nanocapsules lipidiques) ou un cœur aqueux (les liposomes) entourées dans les deux cas d'une couche de surfactant (D), (Figure 10).

Au vu de leur bonne capacité d'encapsulation, de leur facilité de fabrication et de leur biocompatibilité, les nanoparticules lipidiques et en particulier les liposomes ont été utilisés dans le domaine de l'imagerie et du diagnostic médical¹²⁰ ainsi que pour la délivrance (passive et active) de diverses substances actives (protéines, peptides, agents antitumoraux et ARN interférents) via différentes voies d'administration.¹²¹⁻¹²³

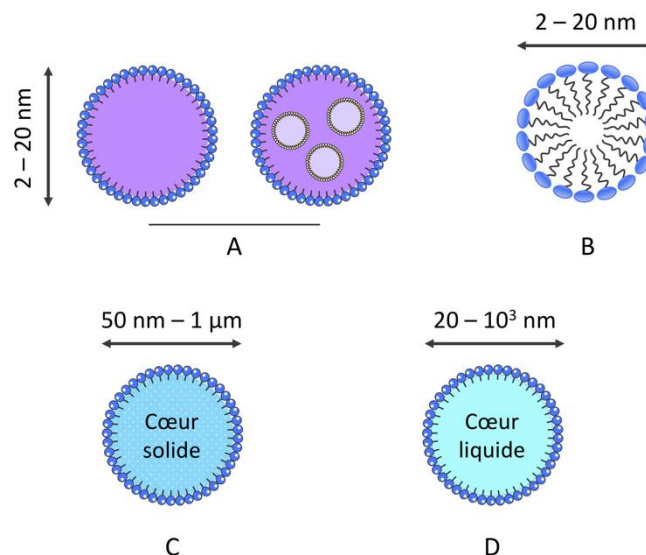


Figure 10 : Les nanoparticules lipidiques. (A) : nanoémulsions (simple et double) ; **(B) :** micelles ; **(C) :** nanoparticules lipidiques solides ; **(D) :** les nanocapsules.

3.4. Les liposomes

3.4.1. Propriétés physicochimiques

a. Généralités

Les liposomes sont des vésicules sphériques formées par une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques renfermant un ou plusieurs compartiments aqueux (Figure 11). Ils sont majoritairement constitués de phospholipides (PL) naturels ou synthétiques ainsi que de cholestérol qui permet de stabiliser la membrane lipidique, de moduler sa fluidité et de réduire sa perméabilité aux molécules hydrophiles.¹²⁴

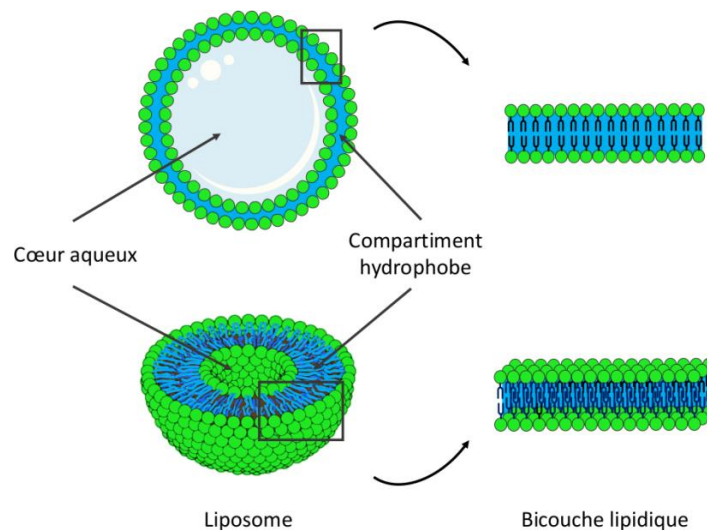


Figure 11 : Structure d'un liposome unilamellaire et de sa bicouche lipidique. Coupe verticale (haut) et horizontale (bas).

Les PL naturels classiquement employés pour la formulation de liposomes sont la phosphatidyléthanolamine (A), le phosphatidylglycérol (B), la phosphatidylcholine (C), la phosphatidylsérine (D) et le phosphatidylinositol (E), (Figure 12).¹²³

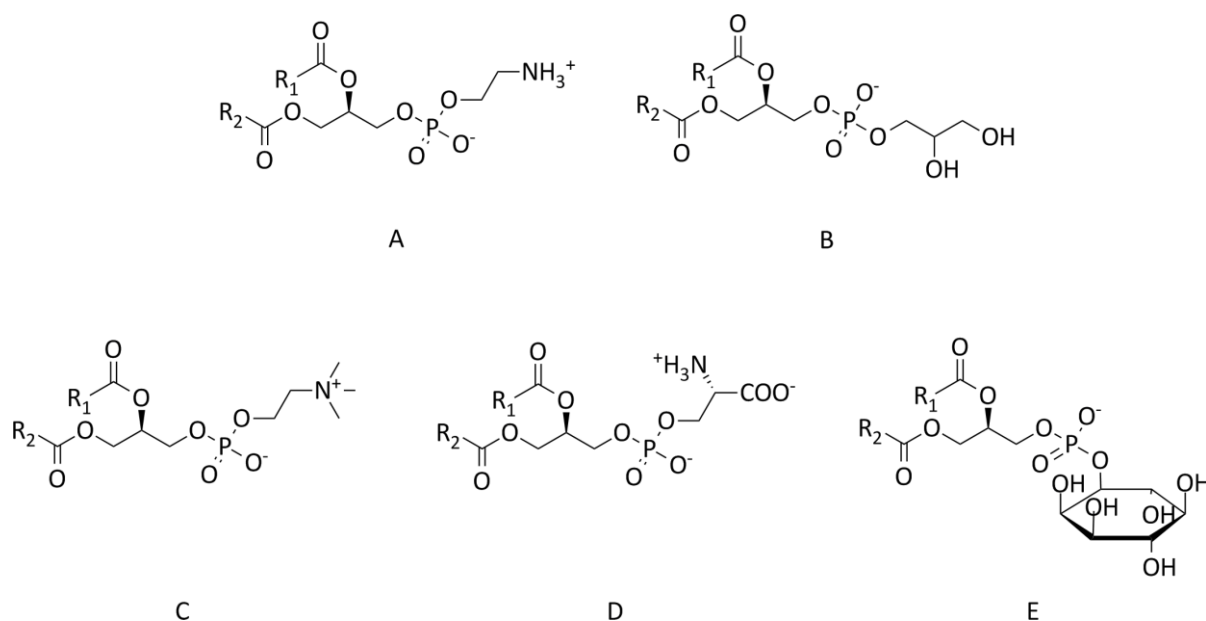


Figure 12 : Structure des phospholipides naturels classiquement utilisés pour la formulation des liposomes. (A) : phosphatidyléthanolamine ; (B) : phosphatidylglycérol, (C) : phosphatidylcholine ; (D) : phosphatidylsérine ; (E) : phosphatidylinositol. R1 et R2 : chaînes polyhydrogénéocarbonées.

Il existe plusieurs méthodes de formulation permettant d'obtenir des liposomes qui diffèrent uniquement par la stratégie de transfert des lipides d'un solvant organique à un solvant aqueux où ces derniers vont s'auto-assembler pour former la vésicule liposomique.¹²⁵ Néanmoins, c'est la technique d'hydratation d'un film lipidique, aussi appelée la méthode de Bangham, qui est la plus classiquement employée (Figure 13).¹²⁶ Cette procédure consiste à solubiliser les lipides destinés à la fabrication des liposomes dans un solvant organique puis à évaporer le solvant. Le film lipidique obtenu est ensuite hydraté avec une solution tamponnée et est brièvement agité, ce qui conduit à l'obtention de vésicules liposomiques.

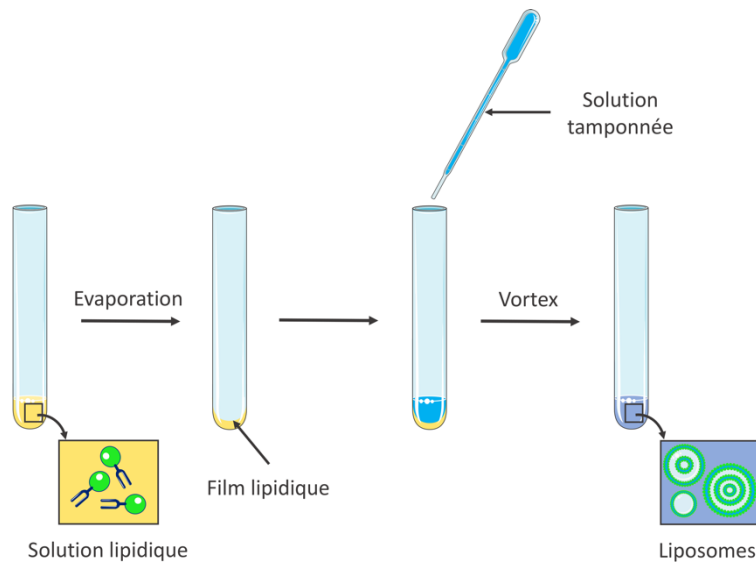


Figure 13 : Procédure de formulation de liposomes par hydratation d'un film lipidique. La solution lipidique est évaporée. Le film lipidique obtenu est hydraté avec une solution tamponnée. Afin de détacher le film et de former des liposomes, l'ensemble est agité au vortex.

L'assemblage spontané des vésicules de liposomes est dû au caractère amphiphile des phospholipides. En effet, leur tête hydrophile polaire et/ou chargée leur permet d'interagir avec la solution tamponnée, alors que leurs queues polyhydrogénéocarbonées hydrophobes vont se regrouper pour éviter tout contact énergétiquement défavorable avec la solution aqueuse. Les chaînes lipophiles forment ainsi des compartiments hydrophobes appelés bicouches lipidiques qui sont entourés d'un environnement externe et interne aqueux.¹²⁷ La formation spontanée de ces vésicules a été décrite pour la première fois par Alec Bangham en 1965.¹²⁸

b. Taille et lamellarité

En fonction de la méthode de formulation et des lipides employés pour leur fabrication, les liposomes peuvent être constitués d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques et présenter des tailles différentes (de quelques nanomètres à plusieurs microns).¹²¹ Sur la base de leur nombre de bicouches, ils sont classés en 2 catégories : les vésicules unilamellaires et les vésicules multilamellaires.¹²⁹ Les vésicules unilamellaires sont composées d'une seule bicouche lipidique qui peut piéger des volumes aqueux différents. En fonction du volume encapsulé et de leur volume total, les liposomes unilamellaires sont

répartis en 3 sous-catégories : les « small unilamellar vesicles » (SUV) ; les « large unilamellar vesicles » (LUV) et les « giant unilamellar vesicles » (GUV) (Figure 14).

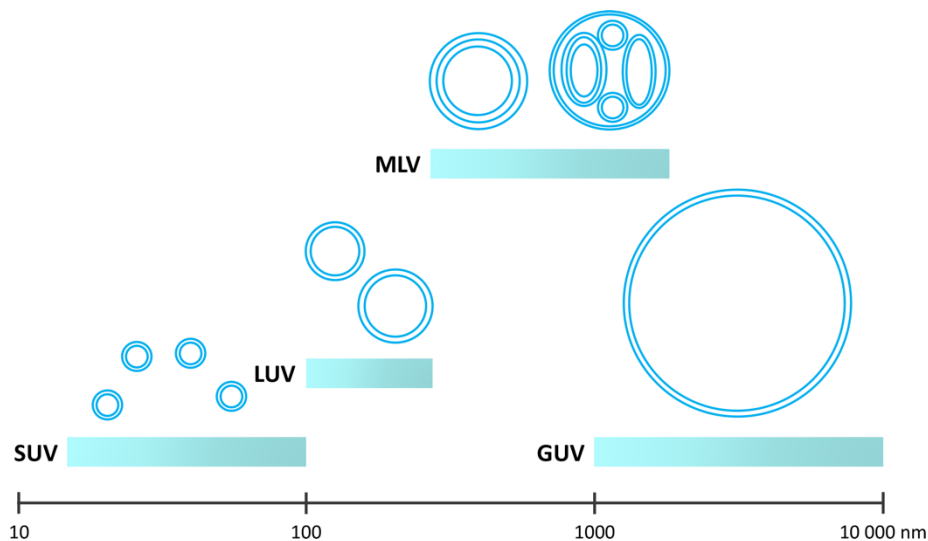


Figure 14 : Structure des différentes formes de liposomes. SUV : « small unilamellar vesicles » ; LUV : « large unilamellar vesicles » ; MLV : « multilamellar vesicles » ; GUV : « giant unilamellar vesicles ». La taille des liposomes est indiquée sur une échelle logarithmique. D'après la référence 130.

Étant classés dans la catégorie des microparticules à cause de leur taille supérieure au micron, les GUV ne seront pas discutées dans ce manuscrit. Les vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles, MLV) sont constituées de plusieurs bicouches concentriques séparées par des compartiments aqueux, dont la taille et la lamellarité sont variables. La taille et la lamellarité des liposomes sont deux paramètres importants qui vont jouer sur leur capacité d'encapsulation de molécules. En effet, les LUV contiennent un volume aqueux conséquent, leur conférant une grande capacité d'encapsulation de molécules hydrophiles.^{124,131} En raison de leur multilamellarité, les MLV sont quant à eux de très bons vecteurs pour les molécules hydrophobes qui se logent dans les bicouches.¹³² Bien que les SUV présentent une capacité d'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes moins importante que les autres catégories de liposomes, elles ont certains avantages tels qu'une petite taille (entre 20 et 100 nm) ainsi qu'une distribution de taille étroite. De plus, les méthodes d'obtention de ces vésicules sont fiables et reproductibles.¹³³ Ce sont les

raisons pour lesquelles ce vecteur liposomique a été choisi pour nos travaux de formulation ultérieurs.

c. Potentiel zêta

Le potentiel zêta dans un milieu donné est le reflet de la charge de surface des liposomes et dépend de la composition lipidique de ces derniers. Les liposomes constitués d'une majorité de phospholipides tels que le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol ou encore la phosphatidylsérine auront un potentiel zêta négatif. À l'inverse, les liposomes contenant majoritairement des lipides avec une tête hydrophile de charge positive, telle que la stéarylamine, auront un potentiel zêta positif. Il est également possible de formuler des liposomes neutres. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que les liposomes neutres sont instables et ont tendance à s'agglutiner.¹³² Contrairement aux liposomes de potentiel neutre, les liposomes chargés sont donc plus stables en raison de la répulsion électrostatique et ont une faible tendance à l'agrégation et à la floculation.¹³⁴ D'après la littérature, les liposomes cationiques ont été davantage étudiés que les liposomes anioniques.¹³² En effet, lorsqu'ils sont administrés par voie systémique, les liposomes anioniques ont comme principal inconvénient une forte interaction avec les protéines du sang et les opsonines, ce qui a pour conséquences une rapide clairance et une rapide phagocytose par le système réticulo-endothélial (reticuloendothelial system, RES).¹³⁵⁻¹³⁷ Néanmoins, des études ont soulevé des problèmes de toxicité des liposomes de potentiel zêta positif, légitimant ainsi l'utilisation de liposomes de charge négative.^{138,139}

3.4.2. *Avantages des liposomes*

L'avantage majeur des liposomes par rapport à d'autres vecteurs nanoparticulaires réside dans leur biocompatibilité et leur biodégradabilité.¹³² En effet, les liposomes conventionnels sont exclusivement constitués de lipides que l'on retrouve dans les membranes biologiques (cholestérol et phospholipides).¹⁴⁰ Après internalisation des liposomes par les cellules, les phospholipides et le cholestérol provenant des liposomes vont s'échapper des endosomes pour être incorporés aux membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ou pour être dégradés dans le cytoplasme.^{141,142} En plus de leur bonne biocompatibilité et biodégradabilité, les liposomes conventionnels sont également non-immunogènes et peu toxiques.¹⁴³ Au vu de leur structure, les liposomes ont

la capacité d'encapsuler des molécules hydrophiles (au niveau de leur cœur aqueux) comme des molécules amphiphiles et hydrophobes (au niveau de leur(s) bicouche(s)), (Figure 15).¹⁴³ L'encapsulation de molécules au sein des liposomes permet de les protéger contre la dégradation enzymatique par les lipases, contre leur neutralisation via le système immunitaire et contre leur rapide métabolisation, permettant ainsi d'augmenter leur biodisponibilité.¹³² D'autre part, il est également possible d'adsorber par interactions électrostatiques des molécules à la surface de liposomes chargés ou encore d'utiliser une ancre lipidique fonctionnalisée pour y accrocher des molécules chimiquement réactives (Figure 15).^{143,144} Enfin, comme décrit précédemment, les propriétés physico-chimiques des liposomes, telles que leur composition en lipides, leur taille ainsi que leur structure et leur charge de surface peuvent être modulées à l'infini en fonction de l'application visée et du type de molécule à encapsuler.

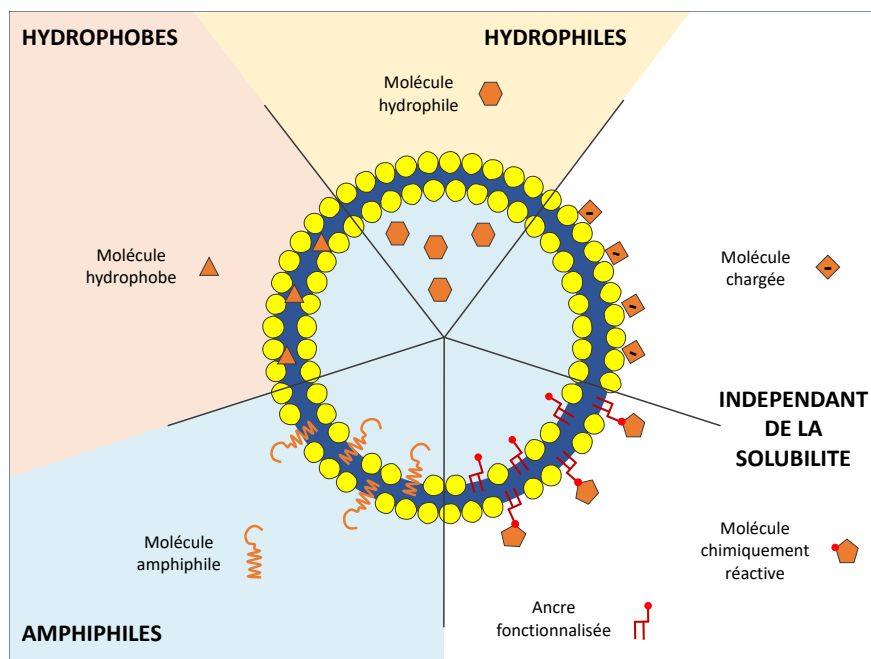


Figure 15 : Possibilités d'association de molécules de propriétés physicochimiques différentes aux liposomes. Les molécules hydrophiles peuvent être encapsulées au niveau du cœur aqueux. Les molécules chargées peuvent être adsorbées par interactions électrostatiques à la surface des liposomes. Les molécules chimiquement réactives peuvent être liées covalamment à la surface des liposomes via une ancre lipidique fonctionnalisée. Enfin, les molécules amphiphiles et hydrophobes peuvent être incorporées au niveau de la membrane des liposomes. D'après les références 130 et 145.

3.4.3. Utilisation des liposomes dans le domaine médical

a. Imagerie médicale

Au vu de leur faible toxicité et bonne biocompatibilité, les liposomes ont été utilisés en tant qu'outils de diagnostics dans le domaine de l'imagerie médicale.^{143,145,146} En effet, des liposomes encapsulant (au niveau de la bicouche ou du cœur aqueux) ou couplés à divers agents de contraste et particules fluorescentes ont été développés pour des applications d'analyse et de diagnostic par IRM,¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ par PET scan¹⁵⁰⁻¹⁵² et par fluorescence.^{153,154}

b. Vaccination

La capacité des liposomes à vectoriser des antigènes pour permettre la mise en place d'une réponse immunitaire a été démontrée pour la première fois par Gregoriadis et Allison.¹⁵⁵ Depuis lors, les liposomes ont été exploités pour le développement de formulations vaccinales contre divers agents pathogènes,^{145,156} tels que le virus de l'hépatite A, le parasite *Leishmania* ou encore le virus de la grippe.¹⁴⁷ Ils ont également été employés pour le développement de formulations en vue d'une immunisation antitumorale.¹⁵⁷⁻¹⁶¹

c. Délivrance d'agents thérapeutiques

Depuis la mise en évidence par Gregoriadis de leur potentiel en tant que vecteurs thérapeutiques,¹⁶²⁻¹⁶⁵ les liposomes ont été largement utilisés pour la délivrance de diverses molécules actives, telles que des hormones, des antidouleurs, des anesthésiques, des antibiotiques et des antitumoraux via diverses voies d'administration.¹⁴⁷ Ils sont également très utilisés pour la délivrance d'ARN (mRNA et siRNA) et d'ADN.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ De plus, leur association (par couplage, via une ancre ou par adsorption) à des ligands spécifiques de récepteurs, permet une délivrance ciblée de leur cargo.^{169,170} Enfin, des liposomes sensibles à des stimuli internes (pH, potentiel redox, dégradation enzymatique) et externes (température, lumière, ultrasons) ont été développés afin de permettre un relargage davantage contrôlé dans le temps et dans l'espace de leur contenu.¹⁷¹⁻¹⁷³

d. Théranostique

Les liposomes peuvent également être employés pour le développement de plateformes multivalentes associant un effet thérapeutique à un outil de diagnostic ; c'est ce qu'on appelle la théranostique.^{147,174} En effet, leur petite taille, leur caractère à la fois hydrophile et hydrophobe, leur biocompatibilité, biodégradabilité, faible toxicité et immunogénicité font d'eux des candidats idéaux pour la mise en place de telles plateformes.¹³² Depuis la mise en évidence de leur potentielle application en théranostique en 2007,¹⁷⁵ quelques plateformes liposomiques ont été développées et ont démontré leur efficacité.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Néanmoins, la complexité de ces systèmes pourrait être à l'origine de problèmes biologiques telles que des liaisons aspécifiques ou encore une reconnaissance plus importante par le RES occasionnant une clairance accélérée.¹³²

e. Sur le marché

Les liposomes sont exploités depuis de nombreuses années en thérapie et sont utilisés pour différents types d'indications : infection fongique (Ambisome®, Amphocil®), contrôle de la douleur (DepoDur™, Exparel®), dégénérescence maculaire liée à l'âge (Visudyne®) et cancers (Myocet®, Doxil®, Lipodox®, DaunoXome®).¹⁸⁰

4. Limites des nanoparticules

Bien que chaque catégorie de particules présente ses limites (toxicité, faible stabilité, mauvaise clairance etc.), ce sont les limitations et challenges des VLP et des liposomes qui seront présentées dans ce manuscrit. Nous décrirons en particulier les challenges des VLP en vaccination ainsi que les limites des liposomes en tant que nanovecteurs pour la délivrance de substances actives.

4.1. Challenge des VLP en vaccination

Les récentes avancées en vaccination ainsi que l'établissement de programmes d'immunisation par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont permis de réduire l'impact d'un nombre considérable de pathogènes à l'échelle mondiale.¹⁸¹ Néanmoins, des études récentes menées par l'OMS ont montré qu'une proportion non négligeable de la population mondiale était sous-immunisée, ce qui conduit fréquemment à la réémergence

d'épidémies, notamment dans les pays en voie de développement.^{182,183} Ces problèmes de couverture vaccinale sont dus au non-respect des calendriers de vaccination et touchent particulièrement la population infantile.^{183,184} En effet, les vaccins doivent être administrés à plusieurs reprises à quelques mois voire quelques années d'intervalle afin d'induire une immunisation suffisante contre le pathogène en question. Le non-respect des calendriers est expliqué par plusieurs facteurs, tels que l'accès limité aux ressources médicales et le coût de la vaccination dans les pays en voie de développement ainsi que le manque de connaissances et les attitudes négatives injustifiées concernant la vaccination dans les pays développés.¹⁸⁵ Ainsi, l'utilisation des vaccins à base de VLP et des autres types de vaccins est limitée par leur mode d'administration en doses multiples. Afin de **réduire le nombre d'administrations nécessaires à l'immunisation**, différentes stratégies ont été mises en œuvre pour le développement de vaccins efficaces en une seule injection. Les stratégies visant à développer des vaccins à base de VLP administrables en une injection sont développées dans la section B page 44.

4.2. Challenge des liposomes dans le domaine biomédical

Bien qu'étant les nanovecteurs les plus étudiés dans le domaine biomédical,^{186,187} les liposomes s'avèrent en réalité peu stables dans les milieux biologiques et sont rapidement inactivés, ce qui a pour conséquence une réduction de leur efficacité de délivrance.

Ainsi, lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse, les liposomes conventionnels interagissent avec les protéines plasmatiques environnantes telles que les HDL et les LDL.¹³² Leur interaction avec ces complexes protéiques entraîne des transferts de lipides ainsi que des réarrangements lipidiques au niveau de leur bicouche. Ces modifications ont pour conséquence une déstabilisation des liposomes, suivie d'un rapide relargage de leur contenu.¹⁸⁸ De plus, durant leur circulation dans le sang, les liposomes interagissent également avec des opsonines. Les opsonines sont des protéines plasmatiques, telles que des immunoglobulines, des fibronectines et des éléments du complément qui aident le RES à reconnaître les liposomes. L'opsonisation des liposomes induit donc une rapide élimination de ces derniers de la circulation sanguine, réduisant drastiquement leur efficacité.^{132,186}

Les liposomes administrés par voie orale sont soumis à un ensemble de conditions biochimiques (pH, acides biliaires, enzymes) qui entraîne leur rapide déstabilisation et dégradation, se soldant par un relargage prématuré de leur contenu.^{189,190} En effet, il a été démontré qu'après 120 min d'incubation dans un milieu intestinal simulé, la majorité des liposomes présentent des dommages membranaires et des structures irrégulières.¹⁹¹ Ce sont notamment les différents acides biliaires ainsi que les phospholipases et cholestérol estérases rencontrés au niveau du tractus digestif qui sont responsables de la déstabilisation et de la dégradation des liposomes.¹⁹⁰ Les acides biliaires s'adsorbent à la surface des liposomes et augmentent la fluidité et donc la perméabilité de leur bicouche. L'augmentation de perméabilité membranaire permet ainsi aux lipases de mieux accéder à leur substrat, ce qui conduit à une déstabilisation de la structure des liposomes et à leur rapide dégradation.^{190,192}

Afin de **remédier à ces problèmes de stabilité et de clairance**, plusieurs stratégies de modification de surface et de recouvrement des liposomes ont été explorées et sont développées dans la section B page 44.

B. Optimisation des propriétés physico-chimiques des VLP et des liposomes pour des applications pharmaceutiques

1. Stratégies de développement de vaccins efficaces en une injection

Depuis le lancement par l'OMS en 1988 d'une campagne de recherche visant à développer des vaccins efficaces en une seule injection,¹⁹³ plusieurs stratégies de formulation basées sur l'élaboration de systèmes à relargage retardé d'antigènes ont été explorées. La majorité des travaux de recherche destinés au développement de vaccins à dose unique s'est focalisée sur l'utilisation de microparticules polymériques lentement dégradables.^{183,184} Cette approche permet de séquestrer l'antigène/particule virale en question dans une matrice polymérique lentement érodable afin d'induire une immunisation différée dans le temps. Différents types de polymères synthétiques ou naturels ont ainsi été employés pour le développement de ces microparticules, tels que le PLGA et l'acide polyglycolique (poly(glycolic acid), PGA, Figure 16) qui ont fait l'objet d'un nombre important de recherches, ou encore le chitosan et les polyanhydrides (Figure 17).^{183,184,194}

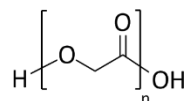


Figure 16 : Structure de l'acide polyglycolique.

L'évaluation *in vitro* et *in vivo* (sur animaux) de ces microparticules a montré pour certaines des cinétiques de relargage d'antigènes qui pourraient permettre une immunisation équivalente à celle observée lors d'injections multiples. Néanmoins, ces études ont révélé que les taux d'anticorps générés n'étaient pas toujours équivalents à ceux obtenus avec une administration en doses multiples.¹⁸⁴ En effet, la formulation de ces microparticules (par double émulsion) nécessite l'emploi de solvants organiques (tétrahydrofurane, acétate d'éthyle, chloroforme) et comprend des étapes de chauffage, d'homogénéisation ou de sonication compromettant l'intégrité des antigènes, ce qui

explique les taux d'anticorps réduits.¹⁹⁵ De plus, il a été observé que l'hydrolyse de certains polymères, notamment le PLGA, libère des acides qui induisent une dégradation progressive des antigènes encapsulés après formulation.^{196,197} Le Tableau 2 illustre quelques exemples de microparticules polymériques développées pour l'élaboration de vaccins en dose unique.

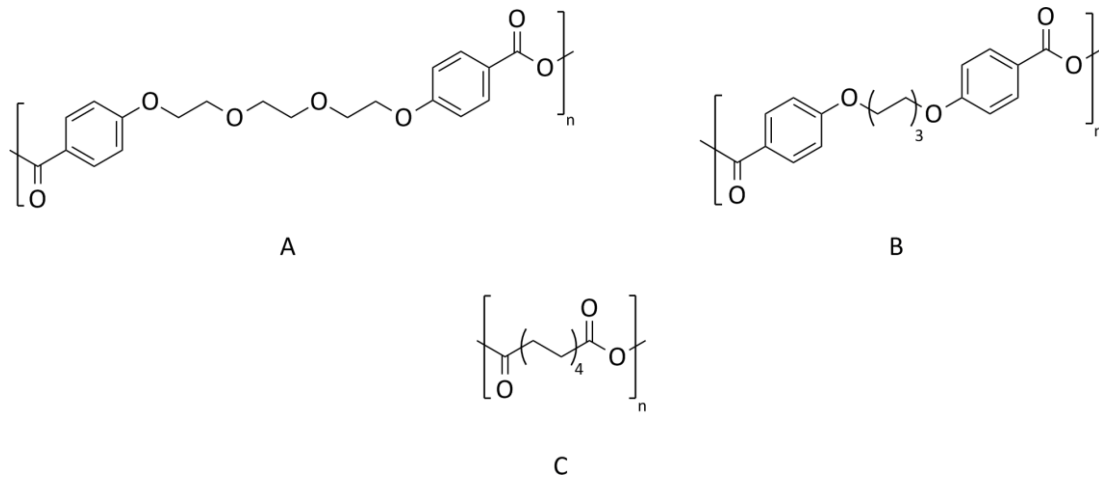


Figure 17 : Structure de polyanhydrides classiquement utilisés pour la formulation de microparticules vaccinales efficaces en une injection. (A) : poly(1,8-bis-(p-carboxyphenoxy)-3,6-dioxaoctane anhydride) ; (B) : poly(1,6-bis-(p-carboxyphenoxy) hexane anhydride) ; (C) : poly(acide sébacique anhydride).

Le développement de conditions de formulation moins rudes, l'utilisation de solvants plus hydrophobes (dichlorométhane, toluène) et de surfactants minimisant les interactions avec le solvant, ou encore l'incorporation de conservateurs (tréhalose, sorbitol)^{184,198} ont permis de réduire cette dégradation lors de la formulation des microparticules. Malgré ces efforts, aucune microparticule et aucun système à relargage retardé n'est passé au stade d'évaluation clinique pour des applications de vaccination.^{183,184} Il est donc nécessaire de continuer ces travaux d'optimisation des systèmes microparticulaires ainsi que de développer de nouveaux systèmes à relargage retardé. Dans cette optique, quelques formulations de particules virales recouvertes couche par couche ont été développées et sont présentées dans la section B.3.5 page 58.

Tableau 2 : Exemples de microparticules vaccinales développées pour une administration en injection unique et comparaison aux formulations vaccinales de référence.

Formulation	Biocompatibilité	Relargage	Substitution au vaccin contre le tétanos ^(a)	Substitution au vaccin contre l'hépatite B ^(a)
Microparticules de PLGA	Potentiellement inflammatoire ¹⁹⁹	Jusqu'à 100 jours ¹⁸⁴	Non ¹⁸⁴	Oui ²⁰⁰
Microparticules de PLA	Potentiellement inflammatoire ¹⁹⁹	Jusqu'à 120 jours ¹⁸⁴	Non ¹⁸⁴	Oui ^{(b),201}
Microparticules de chitosan	Oui ²⁰²	Jusqu'à 70 jours ²⁰³	Non ^{184,204,205}	/
Microparticules de polyanhydrides	Oui ²⁰⁶	Jusqu'à 30 jours ²⁰⁷	Non ^{207,208}	/

(a) : une primo-injection suivie de deux rappels est nécessaire pour une immunisation

(b) : efficace lorsqu'adjuvanté avec de l'alun

2. Stratégies de modification de liposomes pour une meilleure stabilité en milieux biologiques

2.1. Stratégies de modification pour une administration intraveineuse

Afin d'améliorer la stabilité des liposomes soumis à une administration intraveineuse, diverses stratégies ont été développées. Ces stratégies consistent notamment à optimiser la surface des liposomes afin de minimiser leur interaction avec les protéines plasmatiques qui les déstabilisent et les neutralisent, leur octroyant ainsi un caractère furtif. La majorité des travaux d'optimisation de surface des liposomes s'est focalisée sur l'incorporation de lipides modifiés par des polymères synthétiques hydrophiles (lipopolymères) au caractère furtif.²⁰⁹ Ces lipopolymères sont constitués d'une ancre lipidique (phospholipide, cholestérol ou acide gras), d'un bras espaceur ou linker (groupements phosphate, ester ou amide) et d'un polymère hydrophile (Figure 18). De par leur profil amphiphile, les lipopolymères incorporés s'organisent de la même façon que les PL au sein des liposomes. En effet, leurs chaînes hydrocarbonées se retrouvent au niveau de la partie hydrophobe de la bicouche lipidique alors que leur partie polymérique hydrophile se retrouve au niveau des compartiments aqueux.

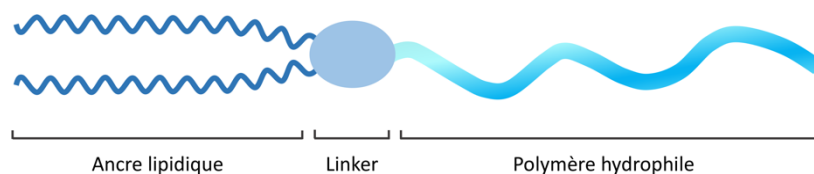


Figure 18 : Composition des lipopolymères employés pour la formulation de liposomes furtifs.
D'après la référence 209.

Les lipopolymères à base de dextrane ont été parmi les premiers employés pour la formulation de liposomes furtifs.²¹⁰ Néanmoins, des cas d'allergie graves ont été relevés suite à l'évaluation de leur potentiel furtif, ce qui a limité leur application.^{211,212} D'autres lipopolymères synthétiques ont ensuite été développés pour la formulation de liposomes furtifs, tels que des lipides pégylés (A)²⁰⁹ ; des lipopolymères à base de polyvinyles comme la poly(vinyl pyrrolidone) (PVP, B)^{213,214} et le poly(alcool vinylique) (poly(vinyl alcohol) (PVA,C)^{215,216} ou encore des lipopolymères à base de poly(oxazoline) telles que la poly(2-méthyl-2-oxazoline) (PMOZ, D) et la poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEOZ, E), (Figure 19).²¹⁷⁻²¹⁹

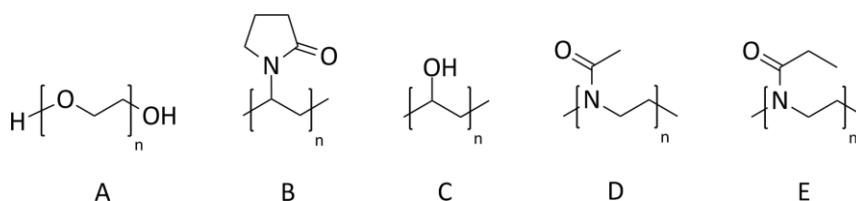


Figure 19 : Structure des polymères furtifs classiquement utilisés pour la synthèse de lipopolymères. (A) : poly(éthylène glycol) (PEG) ; (B) : poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) ; (C) : poly(vinyl alcool) (PVA) ; (D) : poly(2-méthyl-2-oxazoline) (PMOZ) ; (E) : poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEOZ).

Les lipopolymères à base de polyvinyles et de poly(oxazolines) ont fait l'objet de quelques études précliniques qui ont démontré une meilleure furtivité, mais n'ont pas été testés en clinique.^{209,220} En revanche, les lipopolymères à base de PEG se sont montrés efficaces et compatibles pour la formulation de liposomes furtifs et ont été soumis à des évaluations cliniques.²⁰⁹ Quelques exemples de polymères employés pour la fabrication de lipopolymères ainsi que les résultats de leur évaluation sont illustrés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Exemples de matériaux utilisés pour la formulation de liposomes furtifs administrables par voie intraveineuse et résultats de leur évaluation *in vitro* et/ou *in vivo*.

Matériaux furtifs	Exemples de polymères utilisés	Biocompatibilité	Stabilité <i>in vitro</i> ^(a)	Furtivité ^(b)
PEG	PEG 2000 kD PEG 5000 kD	Allergisant ²²¹	Résultats non concluants ^{222–224}	Augmentée d'un facteur 3 à 48 ^{(c),225}
Polyvinylyes	PVP PVA	PVP : oui ¹⁸⁴ PVA : oui ²²⁶	/	Augmentée d'un facteur 2 à 6 ^{(d) 213, 227}
Poly(oxazolines)	PMOZ PEOZ	A confirmer ²²⁸	/	Augmentée d'un facteur 3 à 4 ^{(e),217}

(a) : en présence de plasma et à 37°C

(b) : suite à une administration par voie intraveineuse à des muridés (rats, souris)

(c) : facteur calculé à partir du rapport des temps de demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) des molécules encapsulées dans des liposomes pégylés et non pégylés

(d) : facteur calculé à partir du rapport des taux de liposomes modifiés et non modifiés restants dans le sang à $t = 2$ h

(e) : facteur calculé à partir du rapport des taux de liposomes modifiés et non modifiés restants dans le sang à $t = 6$ h

De nombreux travaux ont ainsi prouvé que l'ajout de lipopolymères de PEG aux liposomes permet d'augmenter leur stabilité dans le sang et de réduire leur opsonisation, leur procurant un temps de demi-vie plus important une fois administrés. En effet, il a été démontré que l'ajout de lipopolymères de PEG permet d'augmenter le temps de résidence dans le sang de substances encapsulées d'un facteur allant de 3 à 48 en fonction des phospholipides employés pour la formulation des liposomes.²²⁵ Par conséquent, les liposomes pégylés ont été approuvés par la FDA depuis 1995 et ont été employés pour la délivrance de substances antitumorales.¹⁸⁰ Néanmoins, des études récentes ont démontré que la pégylation des liposomes était à l'origine de réactions allergiques et ont soulevé des questions quant à l'utilisation de polymères synthétiques.²²¹

En parallèle des lipopolymères, d'autres stratégies prometteuses de modification de surface ont été récemment explorées pour le développement de liposomes stables et furtifs tel que le recouvrement couche par couche (Layer-by-Layer, LbL) qui est développé dans la section B.3.6.1 page 59.

2.2. Stratégies de modification pour une administration par voie orale

Depuis la mise en évidence de la faible stabilité et résistance des liposomes dans le tractus digestif, différentes stratégies de modification de ces nanovecteurs ont été investiguées afin de pouvoir les utiliser pour la délivrance de substances actives par voie orale telles que la modulation de la composition de la bicouche lipidique des liposomes, l'encapsulation des liposomes dans des microsphères polymériques et dans des hydrogels, l'augmentation de la rigidité du cœur aqueux, ou encore le recouvrement LbL qui est exposé dans la section suivante.¹⁸⁹

Entre autres, il a été démontré que l'incorporation d'acides biliaires au niveau de la bicouche des liposomes permet d'augmenter leur résistance une fois administrés par voie orale.¹⁸⁹ En effet, certains travaux d'évaluation *in vitro* de ces liposomes dénommés « bilosomes » ont révélé une stabilité augmentée en milieu gastrique.²²⁹ Leur évaluation *in vivo* (sur animaux) a mis en évidence une meilleure biodisponibilité des molécules encapsulées par rapport aux liposomes dont la bicouche lipidique ne contient pas d'acides biliaires.^{230,231}

L'encapsulation des liposomes dans des microsphères et des hydrogels a également démontré son efficacité *in vitro*. En effet, Pantze et ses collègues ont développé des liposomes encapsulés dans une matrice de gélatine présentant une résistance accrue à pH 2, en présence d'acides biliaires et d'enzymes pancréatiques.²³² Un autre groupe de recherche a récemment démontré que l'encapsulation de liposomes au sein de microsphères de copolymère d'acide méthacrylique et de méthacrylate de méthyle (Eudragit® S100, Figure 20A) leur confère une résistance totale en milieu gastrique et intestinal simulé.²³³

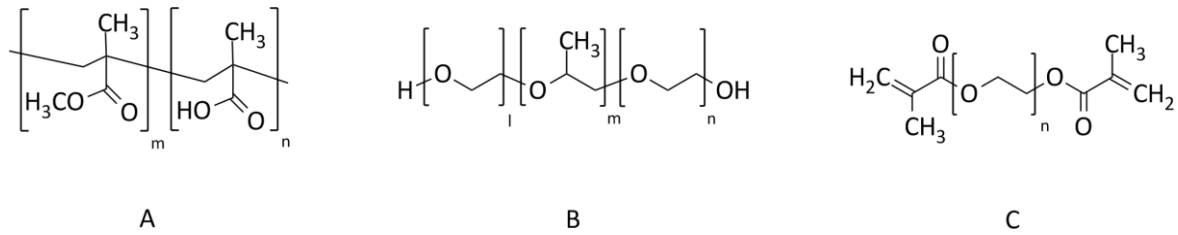


Figure 20 : Structure de matériaux employés pour augmenter la stabilité et la résistance des liposomes administrés par voie orale. (A) : copolymère d'acide méthacrylique et de méthacrylate de méthyle (Eudragit® S100) ; (B) : copolymère d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène (poloxamère) ; (C) : poly(éthylène glycol)-diméthacrylate (PEG-DMA).

Afin d'augmenter la rigidité du cœur aqueux des liposomes, plusieurs stratégies ont été explorées, dont notamment l'encapsulation de solutions polymériques (poloxamères, poly(éthylène glycol)-diméthacrylate (PEG-DMA), Figure 20B et C) capables de former des gels suite à l'application d'un stimulus externe (température, UV). Des études préliminaires ont montré que la rigidification des compartiments internes des liposomes permet d'augmenter la stabilité de la bicouche contre des détergents.^{234,235}

Le Tableau 4 illustre quelques exemples de stratégies employées pour l'optimisation de la stabilité des liposomes mentionnées dans ce paragraphe et résume les résultats de leur évaluation. Bien que ces alternatives innovantes soient prometteuses, elles ont cependant été peu étudiées et n'ont pour la plupart pas fait l'objet d'études précliniques validant leur efficacité *in vivo*.^{189,236}

Tableau 4 : Exemples de stratégies d'optimisation de la stabilité des liposomes pour une administration par voie orale et résultats de leur évaluation.

Stratégie	Exemples	Biocompatibilité	Stabilité <i>in vitro</i>	Biodisponibilité ^(a)
Insertion d'acides biliaires	Acide glycolique	Oui	Augmentée d'un facteur 1,5 en milieux gastriques Pas de différence en milieux intestinaux ^{(b),229}	Augmentée d'un facteur 2 à 10 ^{(c),230}
Encapsulation dans des microsphères	Eudragit® S100	Oui ²³⁷	Totalement stable en milieu gastrique et intestinal (intestin grêle) ^{(d),233}	/
Encapsulation dans des hydrogels	Matrice de gélatine	Oui	Augmentée d'un facteur 1,25 à pH 2 ^(e) , d'un facteur 2 en présence de taurocholate de sodium ^(f) et d'un facteur 4,5 en présence de pancréatine ^{(f),232}	/
Rigidification du cœur aqueux	Gels thermosensibles (poloxamère 407)	Oui ²³⁸	Augmentée d'un facteur 2 en présence de Triton™ X-100 ^{(g),234}	/
Rigidification du cœur aqueux	Gels photosensibles (PEG-DMA)	Oui ²³⁹	Augmentée d'un facteur 4 en présence de Triton™ X-100 ^{(h),235}	/

(a) : suite à une administration par voie orale à des muridés (souris, rats)

(b) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de calcéine relarguée par des liposomes modifiés et non modifiés en milieux simulés

(c) : facteur calculé à partir du rapport des biodisponibilités absolues (AUC) de liposomes modifiés et non modifiés

(d) : détermination de la quantité d'acide 5-aminosalicylique relarguée en milieu gastrique (2h) et intestinal simulé (intestin grêle, 6h)

(e) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de 5(6)-carboxyfluorescéine relarguée par des liposomes encapsulés et non encapsulés à t = 60 min

(f) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de 5(6)-carboxyfluorescéine relarguée par des liposomes encapsulés et non encapsulés à t = 90 min

(g) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de 5(6)-carboxyfluorescéine relarguée par des liposomes gélifiés et non gélifiés en présence de 0,15 % de Triton™ X-100

(h) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de 5(6)-carboxyfluorescéine relarguée par des liposomes gélifiés et non gélifiés en présence de 0,5 % de Triton™ X-100

3. Recouvrement couche par couche (LbL)

3.1. Définition

La méthode de recouvrement couche par couche (LbL) a été introduite pour la première fois en 1966 par Ralph K. Iler²⁴⁰ et a ensuite été étendue par Gero Decher au début des années 1990.^{241,242} Elle consistait initialement à adsorber de façon alternative des matériaux de charges opposées (notamment des polyélectrolytes) sur un substrat plat chargé par interactions électrostatiques, générant ainsi des fines couches de matériaux de quelques nanomètres d'épaisseur à la surface du support (Figure 21).²⁴³

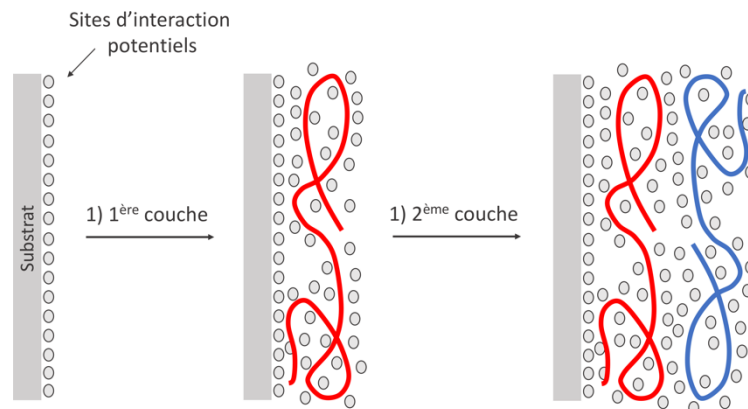


Figure 21 : Illustration du recouvrement couche par couche (LbL) d'un substrat. La première espèce complémentaire au substrat est représentée en rouge tandis que la deuxième espèce complémentaire à la première est représentée en bleu. D'après la référence 244.

Cette technologie a ensuite été appliquée pour le recouvrement d'autres types de surfaces, telles que des particules colloïdales²⁴⁵ et des particules vésiculaires, comme les liposomes.²⁴⁶ Outre l'assemblage par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, il est également possible de recouvrir des matériaux couche par couche en tirant partie d'autres types d'interactions telles que les liaisons hydrogène,²⁴⁷ les liaisons de Van der Waals,²⁴⁸ les interactions hydrophobes²⁴⁹ ou encore les interactions spécifiques entre biomolécules (biotin/avidin).²⁵⁰ Ainsi, une variété de matériaux a été explorée pour le recouvrement de surface LbL, tels que des polymères synthétiques et naturels, des biomolécules (acides nucléiques, protéines, peptides, lipides) ainsi que des nanoparticules et microparticules.²⁵¹

Néanmoins, les polyélectrolytes sont les blocs les plus utilisés pour l'assemblage couche par couche.

3.2. Méthodes d'assemblage

Les méthodes d'assemblage employées pour le recouvrement LbL de surfaces n'ont pas beaucoup changé depuis leur introduction par G. Decher dans les années 1990.²⁴³ Seules quelques modifications pour tenir compte des caractéristiques particulières des supports colloïdaux et vésiculaires ont été introduites.²⁵² La méthode d'assemblage la plus utilisée pour le recouvrement LbL est la technique d'immersion, qui consiste à immerger de façon alternative le substrat dans les solutions de matériaux complémentaires^{240,253} et à effectuer des étapes de rinçage entre l'ajout de chaque couche (Figure 22A).²⁵⁴

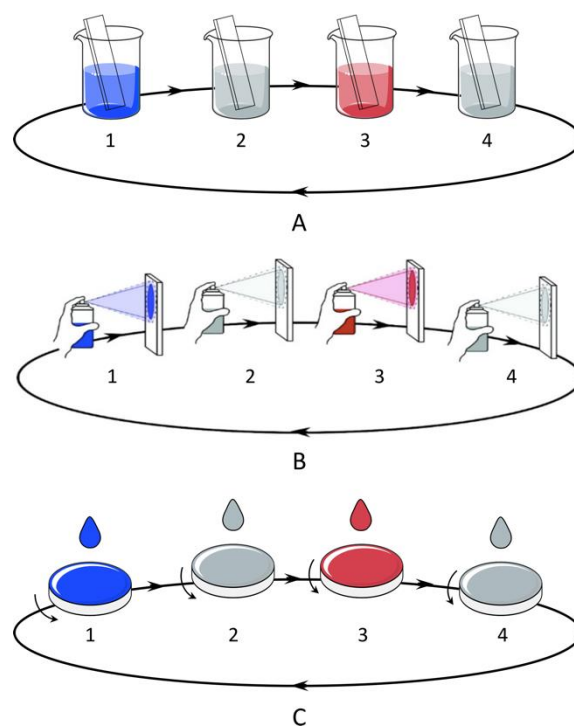


Figure 22 : Stratégies de recouvrement couche par couche de substrats. (A) : par immersion ; **(B) :** par vaporisation (« spray coating ») ; **(C) :** par rotation de support (« spin coating »). Les espèces complémentaires (rouge et bleu) sont ajoutées à l'étape 1 et 3 de chaque procédure. Les étapes 2 et 4 correspondent à des étapes de lavage. D'après la référence 255.

Ainsi, l'adsorption des matériaux au substrat est basée sur la cinétique de diffusion des matériaux en solution.²⁵⁵ Les étapes de rinçage entre l'ajout de chaque couche

permettent d'éviter la formation de complexes entre les matériaux complémentaires qui pourraient précipiter et ainsi impacter la structure et les propriétés du recouvrement, ce qui est notamment le cas pour les polyélectrolytes.²⁵² En plus du dépôt par immersion, d'autres techniques d'assemblage LbL ont été développées telles que la méthode de recouvrement par vaporisation (« spray coating », Figure 22B) ou par rotation du support (« spin coating », Figure 22C).²⁵⁶ Ces techniques alternatives sont néanmoins difficilement adaptables au recouvrement de particules sphériques et ne sont pas décrites dans ce manuscrit.²⁵⁷

Pour le recouvrement de particules colloïdales et vésiculaires, la méthode d'assemblage par immersion décrite ci-avant a dû être légèrement modifiée. En effet, après ajout du substrat particulière à la solution de matériaux complémentaires, il est nécessaire de séparer le substrat des matériaux excédentaires en solution afin de pouvoir procéder à leur lavage.^{245,258,259}

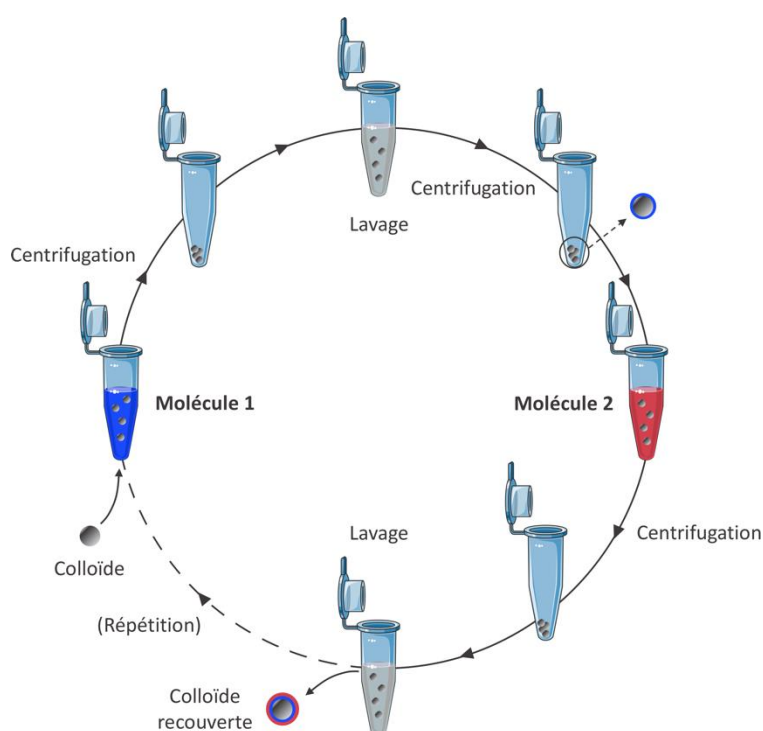


Figure 23 : Procédure de recouvrement couche par couche de colloïdes. Entre chaque dépôt d'espèces complémentaires (rouge et bleu) une étape de centrifugation suivie d'une étape de lavage est effectuée afin d'éliminer les espèces complémentaires excédentaires. D'après la référence 255.

La centrifugation est classiquement employée afin de sédimenter les particules, ce qui permet l'élimination des espèces complémentaires en solutions ainsi que le lavage subséquent des particules recouvertes (Figure 23).²⁵⁵ Cependant, pour les particules vésiculaires à coeur lipidique (émulsions, micelles, liposomes), la filtration (par dialyse, par pression ou par centrifugation) est généralement utilisée pour l'élimination des espèces.²⁵⁶

3.3. Facteurs influençant le recouvrement LbL par des polyélectrolytes

3.3.1. Nature chimique du support et des polyélectrolytes

Afin d'obtenir un recouvrement homogène et optimal d'un support, il est important de prendre en compte ses propriétés physico-chimiques, telles que sa topologie de surface et sa densité de charges de surface, et de sélectionner en conséquence des polyélectrolytes capables de s'adapter à chaque cas de figure. Ainsi, l'assemblage et l'épaisseur des couches de polyélectrolytes générées vont être fonction des propriétés physico-chimiques des couples de polyélectrolytes choisis.^{252,260} À titre d'exemple, la flexibilité des polyélectrolytes va jouer un rôle sur leur capacité à s'adapter à la répartition des charges du support et des couches supérieures en changeant de conformation.^{260,261} D'autre part, les polyélectrolytes possédant un caractère hydrophobe plus prononcé et donc une structure plus condensée génèreront des épaisseurs de couches plus importantes à la surface du support.²⁶²⁻²⁶⁵

3.3.2. Concentration en polyélectrolytes

La concentration en polyélectrolytes est également un facteur important à prendre en compte pour un assemblage couche par couche. En effet, il est nécessaire de travailler avec des concentrations suffisantes pour permettre un recouvrement homogène et stable du support ainsi qu'une inversion de charge de la surface recouverte.^{264,266,267} La concentration minimale nécessaire à la génération d'une couche stable va dépendre des propriétés intrinsèques du polyélectrolyte utilisé, à savoir sa solubilité et sa densité de charges.²⁵²

3.3.3. Temps d'adsorption

Afin d'obtenir un recouvrement homogène du support, il est nécessaire de le laisser en contact suffisamment longtemps avec la solution de polyélectrolytes.²⁶⁸⁻²⁷⁰ À l'inverse, si

le temps de contact est trop long, il est possible d'observer une perte de la structure lamellaire induisant ainsi une diffusion des polyélectrolytes d'une couche à l'autre.^{266,271–273} Néanmoins, ce phénomène va, entre autres, dépendre du couple de polyélectrolytes sélectionnés.²⁵²

3.3.4. Nature, force ionique, pH et température du solvant

La nature du solvant choisi pour l'assemblage LbL va impacter la conformation adoptée par le polymère (linéaire ou replié) et ainsi jouer sur l'épaisseur des couches obtenues.²⁵² Ainsi, les solvants aqueux auront tendance à linéariser les polyélectrolytes via des interactions de type liaison hydrogène alors que les solvants organiques vont favoriser un repliement conformationnel de ces derniers pour minimiser les interactions avec le solvant.²⁷⁴ Le même phénomène est observé avec la force ionique qui, quand elle augmente, favorise le repliement.²⁵² De ce fait, les solvants aqueux de faible force ionique (telle que l'eau pure ou faiblement concentrée en électrolytes) sont généralement préférés aux solvants organiques pour la formation de couches fines et homogènes.²⁵²

Le pH peut changer l'état d'ionisation des polyélectrolytes et ainsi impacter leur solubilité. Il est donc important de travailler à une valeur de pH pour laquelle le couple de polyélectrolytes est chargé.²⁷⁵

Enfin, la température est également un paramètre important à prendre en compte puisqu'elle influence la solubilité des polyélectrolytes.²⁷⁶

3.4. Avantages et applications dans le domaine biomédical

Le recouvrement couche par couche de surfaces présente différents avantages, tels qu'une fabrication simple et de faible coût²⁷⁷ ; un contrôle précis des propriétés du revêtement (rugosité, épaisseur, porosité)²⁷⁸ ; la fabrication de recouvrements avec des compositions hautement complexes et sur mesure²⁷⁹ ; un assemblage dans des conditions de pH et de température douces permettant de maintenir l'activité de molécules biologiques utilisées pour l'assemblage²⁷⁷ ; l'obtention de films homogènes permettant l'incorporation de molécules et leur relargage contrôlé.²⁸⁰ Ainsi, ces différents avantages ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique notamment dans le domaine biomédical. De ce fait,

l'assemblage couche par couche a été employé pour deux types d'applications médicales qui sont : l'optimisation de surface de matériaux chirurgicaux (implants) et la génération ainsi que l'optimisation de systèmes vectoriels de délivrance de substances actives.^{251,281,282}

3.4.1. Optimisation de surface de matériaux chirurgicaux

Bien que les implants actuellement utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative soient optimisés d'un point de vue de leur structure (porosité, structure en 3 dimensions) pour permettre la colonisation cellulaire, leurs propriétés de surface (bioadhésion, biocompatibilité) ne favorisent pas de façon suffisante la régénération tissulaire.²⁷⁷ D'autre part, la pose d'implants est souvent associée à un risque d'infection postopératoire qui peut engendrer des complications chez le patient.²⁸³ Afin de favoriser la colonisation cellulaire des matériaux implantés et de réduire l'apparition d'infections postopératoires, le revêtement LbL a été étudié et a permis d'optimiser les propriétés physico-chimiques de surface de différents types d'implants. Ainsi, il a été démontré que le dépôt LbL à la surface des implants de films constitués de polymères ou de protéines favorisant l'adhésion cellulaire ainsi que l'encapsulation de facteurs de croissance cellulaire au sein des films, permet une régénération plus rapide des tissus autour du matériau implanté.^{251,281} D'autre part, il a été démontré que le recouvrement LbL de matériaux chirurgicaux avec des molécules diverses (métaux lourds, antibiotiques, peptides, enzymes) aux propriétés antibactériennes permet de générer des implants avec un risque réduit d'infections postopératoires.^{283,284}

3.4.2. Génération et optimisation de systèmes de délivrance de substances actives

Plateformes de délivrance de multiples substances actives

L'assemblage LbL à la surface de nanocapsules peut être employé pour la génération de plateformes de délivrance de multiples substances actives.^{282,285} Ces plateformes de délivrance sont notamment employées pour le traitement de cancers, qui nécessitent l'administration de plusieurs agents thérapeutiques.²⁸² En effet, il est possible d'insérer une substance active dans le coeur de la nanocapsule d'une part, et de séquestrer d'autres agents thérapeutiques dans les films de polyélectrolytes d'autre part.

Plateformes de délivrance à relargage contrôlé

Des polymères sensibles au pH, à la lumière ou à la température peuvent également être employés pour le recouvrement LbL de nanoparticules afin de générer des vecteurs de délivrance à relargage contrôlé.^{282,285} Ainsi, de multiples plateformes de délivrance à relargage contrôlé de substances actives ont été développées au cours de ces 10 dernières années et ont démontré leur efficacité *in vitro* et *in vivo*.²⁸⁶⁻²⁸⁸

Optimisation de plateformes de délivrance

Enfin, l'assemblage LbL à la surface de systèmes nanoparticulaires de délivrance peut également être utilisé afin de modifier la surface des particules dans le but d'augmenter leur stabilité et furtivité en milieux biologiques.^{252,282} En effet, il a été démontré que l'adsorption de matériaux furtifs (tel que le PEG) et de multiples couches de polymères à la surface de nanoparticules permettait d'augmenter leur stabilité en présence de sérum ainsi que leur temps de circulation sanguine.²⁸⁹⁻²⁹² Ainsi, le recouvrement LbL constitue une alternative intéressante au greffage ou à l'incorporation de molécules furtives aux systèmes particulaires.

Dans la section suivante, l'utilisation du recouvrement LbL sera détaillé dans le cas des particules virales pour l'élaboration de vaccins et dans le cas des liposomes afin d'augmenter leur stabilité et résistance en milieux biologiques.

3.5. Recouvrement couche par couche de VLP

À ce jour, le recouvrement LbL de particules virales a été peu étudié pour la formulation de candidats vaccins. En effet, nous n'avons identifié que quelques publications témoignant de l'utilisation de cette technique d'assemblage pour la formulation de particules virales recouvertes destinées à des applications de vaccination. D'après ces publications, le recouvrement LbL a été employé afin d'augmenter l'antigénicité et parfois la stabilité de virus entiers inactivés. En effet, l'adsorption de couches alternatives de poly(éthylène imine) (PEI, Figure 24) et de silice à la surface du virus de l'encéphalite japonaise a été utilisée afin d'augmenter sa résistance à la température et dans le but de

favoriser son interaction avec les cellules présentatrices d'antigène (antigen presenting cell, APC).²⁹³

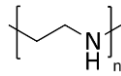


Figure 24 : Structure de la poly(éthylène imine) (PEI).

En plus d'une meilleure résistance à température ambiante, les virus recouverts ont engendré une immunisation significativement plus importante que les virus nus, traduite par l'obtention de titres d'immunoglobulines G (IgG) 2 fois supérieurs à ceux mesurés pour ces derniers. D'autre part, un vaccin contre le virus de la poliomyélite recouvert d'une couche d'alginate et d'une couche de chitosan a été développé afin d'augmenter son antigénicité pour une administration par voie intranasale.²⁹⁴ Au vu de ses propriétés mucoadhésives, le chitosan est l'un des excipients les plus utilisés pour la fabrication de formulations administrables par voie intranasale.²⁹⁵ Des études de stabilité des particules virales recouvertes conservées à 4°C ont démontré la stabilité du recouvrement sur une durée de 25 jours. Néanmoins, ce candidat vaccin n'a pour l'instant pas encore fait l'objet d'une évaluation *in vivo*.

Bien que le recouvrement LbL ait été employé pour obtenir des vaccins plus immunogènes et ait démontré son efficacité pour le relargage contrôlé de substances actives, il n'a pas encore été utilisé ou même proposé pour le développement de vaccins efficaces en une injection. En effet, à notre connaissance aucune publication mentionne son utilisation en tant que tel.

3.6. Recouvrement couche par couche de liposomes

3.6.1. Pour une administration par voie intraveineuse

A notre connaissance, l'assemblage LbL a été très peu utilisé afin d'augmenter la stabilité ainsi que la furtivité de liposomes destinés à une administration par voie intraveineuse. Nous n'avons identifié que quelques publications relatant l'utilisation du recouvrement LbL en tant que tel. À titre d'exemple, Ramasamy et ses collaborateurs ont

développé une plateforme de délivrance de substances antitumorales (mitoxantrone et doxorubicine) par ajout successif de couches poly(L-lysine) (PLL, Figure 25A) et de couches d'un copolymère de PEG et d'acide poly(L-aspartique) (PLD) à la surface de liposomes (PEG-b-PLD, Figure 25B).²⁸⁹ L'évaluation de cette plateforme en présence d'une solution tamponnée (pH = 7,4 ; 37°C) a démontré une stabilité jusqu'à 2 fois augmentée par rapport aux liposomes non recouverts.^a De plus, son évaluation *in vivo* a révélé une biodisponibilité jusqu'à 2 fois plus importante que pour les liposomes « nus », traduisant une augmentation du temps de circulation dans le sang.^b De façon similaire, Deng et ses collaborateurs ont développé une plateforme liposomique de délivrance pour le traitement de cancers du sein par ajout alternatif de couches de poly(R-arginine) (PLR, Figure 25C), d'un siRNA ciblant une protéine à l'origine de la résistance des tumeurs aux agents chimiothérapeutiques et d'acide hyaluronique.²⁹⁶

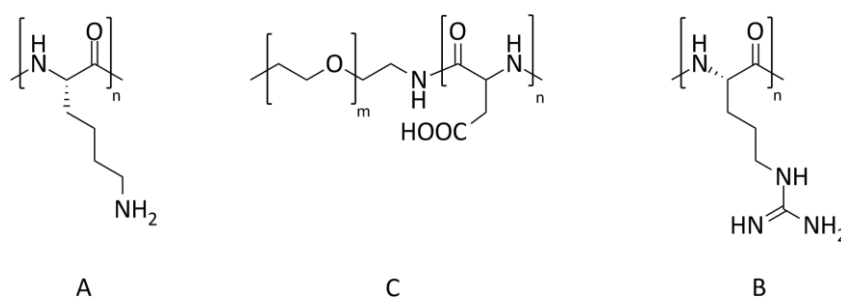


Figure 25 : Structures de polymères utilisés pour le recouvrement LbL de liposomes destinés à une administration par voie intraveineuse. (A) : poly(L-lysine) (PLL) ; (B) : copolymère de poly(éthylène glycol) et d'acide poly(L-aspartique) (PEG-b-PLD) ; (C) poly(L-arginine) (PLR).

Au regard de son caractère furtif, l'acide hyaluronique a été utilisé afin d'augmenter le temps de résidence des liposomes dans le sang.^{297,298} L'évaluation *in vivo* de cette plateforme a démontré un temps de circulation long du système nanoparticulaire ($t_{1/2\alpha} = 10$ h). Néanmoins, ces résultats n'ont pas été comparés à ceux de liposomes non recouverts.

^a facteur calculé à partir du rapport des pourcentages de doxorubicine relarguée par des liposomes recouverts et non recouverts incubés dans du PBS de pH 7,4 (37°C) à $t = 50$ h

^b facteur calculé à partir du rapport des biodisponibilités absolues (AUC) de liposomes recouverts et non recouverts

Bien qu'un nombre restreint de publications concernant la formulation de liposomes recouverts LbL pour cette application ait été produit, cette procédure de recouvrement semble prometteuse pour la génération de liposomes furtifs et stables pour une administration par voie intraveineuse.

3.6.2. Pour une administration par voie orale

Enfin, le recouvrement LbL a également été employé pour la formulation de liposomes stables et résistants pour une administration par voie orale.^{189,190,236} En effet, plusieurs formulations recouvertes d'une à 3 couches ont été développées à partir de polysaccharides tels que le chitosan, l'alginate et le dextrane (Figure 26A) de polyélectrolytes synthétiques tels que l'acide polyacrylique (poly(acrylic acid), PAA, Figure 26B), et le poly(hydrochlorure d'allylamine) (poly(allylamine hydrochloride, PAH, Figure 26C), ou encore de protéines telles que la BSA et la lactoferrine.

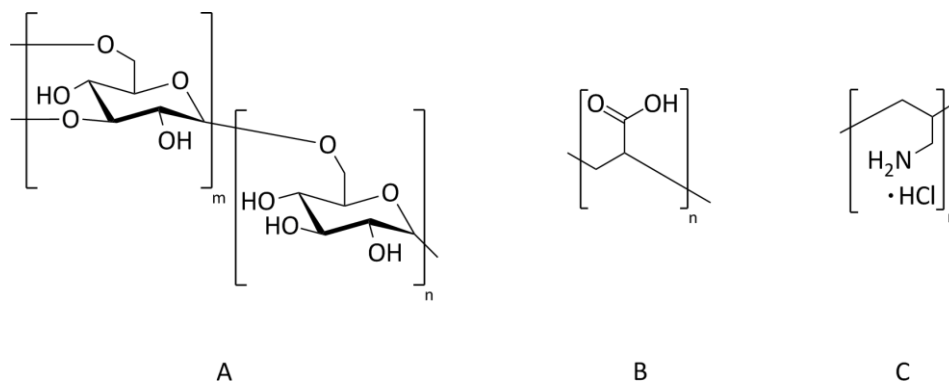


Figure 26 : Structures de polymères employés pour le recouvrement LbL de liposomes destinés à une administration par voie orale. (A) : dextrane ; (B) : acide polyacrylique (PAA) ; (C) : poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH).

Ainsi, des suspensions de liposomes recouverts contenant des chromophores²⁹⁹ ou des substances actives telles que des antioxydants,³⁰⁰ des vitamines,^{301,302} de l'insuline,³⁰³ des antibiotiques,³⁰⁴ des antigènes³⁰⁵ et des antitumoraux³⁰⁶⁻³⁰⁸ ont été formulées. Des travaux d'évaluation de ces liposomes recouverts ont montré une résistance jusqu'à 5 et 2,7 fois supérieure à celles des liposomes en présence de milieux gastriques et intestinaux simulés, respectivement. D'autre part, leur évaluation *in vivo* témoigne d'une biodisponibilité jusqu'à 5 fois plus importante que celle déterminée pour des liposomes

Introduction

« nus ». Le Tableau 5 liste quelques exemples de formulations de liposomes recouverts développés pour une administration par voie orale ainsi que les résultats de leur évaluation *in vitro* et/ou *in vivo*.

Tableau 5 : Exemples de formulations de liposomes recouverts et résultats de leur évaluation *in vitro* et/ou *in vivo*.

Recouvrement LbL	Biocompatibilité	Stabilité <i>in vitro</i>	Biodisponibilité ^(a)	Références
PAA et PAH	PAA : oui ³⁰⁹ PAH : non ³¹⁰	Augmentée d'un facteur 5,5 en milieu gastrique ^(b)	Augmentée d'un facteur 1,3 ^(c)	304
PAA et PAH	PAA : oui ³⁰⁹ PAH : non ³¹⁰	Augmentée d'un facteur 1,2 à 2,7 en milieu gastrique et d'un facteur 2 à 3 en milieu intestinal en fonction du nombre de couches ^(d)	Augmentée d'un facteur 3 à 4 ^(e)	306
Chitosan et PAA	Oui ³¹¹	Augmentée d'un facteur 2 à 2,4 en milieu gastrique et d'un facteur 1,3 à 1,5 en milieu intestinal en fonction du nombre de couches ^(d)	/	308
Chitosan et alginate	Oui ³¹²	/	Augmentée d'un facteur 5 ^(f)	305

(a) : suite à une administration par voie orale

(b) : facteur calculé à partir du rapport des pourcentages d'amoxicilline et de métronidazole relargué par des liposomes recouverts et non recouverts incubés en milieu gastrique simulé (SGF, pH 1,2) à t = 2 h

(c) : facteur calculé par rapport au pourcentage de souris guéries injectées au préalable avec des liposomes recouverts et non recouverts contenant de l'amoxicilline et du métronidazole à t = 2 h

(d) : facteur calculé par rapport au pourcentage de paclitaxel relargué par des liposomes recouverts et non recouverts (1 à 2 couches) à t = 2 h en milieu gastrique simulé (SGF, pH 1,2) et à t = 6 h en milieu intestinal simulé (SIF, pH 6,8)

(e) : facteur calculé à partir du rapport des biodisponibilités absolue (AUC) déterminées pour des liposomes recouverts et non recouverts

(f) : facteur calculé à partir du rapport des titres d'anticorps spécifiques produits au jour 14 par des liposomes recouverts et non recouverts encapsulant un antigène bactérien

Ainsi, le recouvrement LbL de liposomes constitue une alternative intéressante pour la génération de liposomes destinés à une administration par voie orale. De plus, l'emploi de diverses molécules pour le recouvrement de liposomes témoigne de la versatilité d'application de cette procédure d'assemblage.

En dépit des efforts engagés pour améliorer les propriétés physico-chimiques des liposomes ainsi que des particules virales, rares sont les stratégies d'optimisation ayant fait leur preuve et ayant fait l'objet d'évaluations cliniques. Parmi ces stratégies, le recouvrement LbL s'est récemment imposé comme méthode de modification facile et efficace pour les particules et a été appliqué pour les liposomes et pour les VLP. Bien que des résultats préliminaires prometteurs aient été obtenus pour ces deux types de nanoparticules, la technique de recouvrement LbL en est pour l'instant au stade exploratoire. Peu de travaux de recherches ont à ce jour été entrepris et se limitent à un lot de polymères restreint qui pour la plupart ne répondent pas aux exigences de biocompatibilité et de biodégradabilité de leur application.

Dans le cadre de ce projet, le recouvrement LbL avec un couple de polymères biocompatibles et biodégradables sera non seulement employé pour rendre les liposomes plus stables et résistants en conditions biologiques, mais aussi pour la formulation d'un candidat vaccin innovant efficace en une injection. Les objectifs de ces projets et le cahier des charges des formulations liposomiques et vaccinales développées sont présentés dans les chapitres suivants. Par ailleurs, ces travaux ont amené à utiliser les liposomes pour la conception d'une plateforme de ciblage utilisant un aptamère qui sera présentée dans la partie annexe.

Chapitre 1 :

Développement et caractérisation de liposomes recouverts
couche par couche afin d'augmenter leur stabilité et leur
résistance en milieux biologiques

Genius is one percent inspiration, ninety-nine percent perspiration.

Thomas Edison

A. Introduction

1. Contexte et objectifs du projet

Le défaut majeur des liposomes réside dans leur faible stabilité et leur mauvaise résistance dans les milieux biologiques, tels que dans le sang ou encore dans le tractus gastro-intestinal. En effet, ils sont rapidement déstabilisés par les lipoprotéines plasmatiques et éliminés de la circulation sanguine par métabolisation hépatique et par clairance rénale.³¹³ Administrés par voie orale, ils sont confrontés à des conditions de pH très rudes jusqu'à 1–2, et sont sujets à l'agrégation ainsi qu'à la dégradation enzymatique par les lipases.³¹⁴ Au vu de leurs propriétés attractives en tant que nanovecteurs, il est indispensable de travailler au développement de stratégies permettant d'augmenter la résistance des liposomes et leur stabilité dans ces milieux.

Afin de remédier à ce problème majeur de stabilité et de résistance, nous nous sommes intéressés au dépôt couche par couche (Layer-by-Layer, LbL) de polyélectrolytes à la surface de liposomes. Cette stratégie consiste à adsorber de façon alternative des espèces polymériques de charges opposées à la surface de liposomes chargés et d'ainsi les parer d'une « couche » protectrice leur permettant de mieux résister aux éléments déstabilisants rencontrés en milieux biologiques (Figure 27).²⁴⁴ Les nanoparticules obtenues sont désignées « layersomes ». À ce jour, quelques formulations de layersomes ont été développées. Les espèces classiquement utilisées pour le recouvrement LbL de liposomes sont le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH), l'acide polyacrylique (poly(acrylic acid), PAA) ou encore le chitosan. Bien que ces polymères présentent des propriétés physico-chimiques intrinsèques intéressantes, ils restent inappropriés en termes de biocompatibilité aux exigences de leur application pharmaceutique. En effet, le PAH et le PAA ne sont pas biodégradables.³¹⁵ D'autre part, le chitosan est seulement soluble à pH acide (5–6).

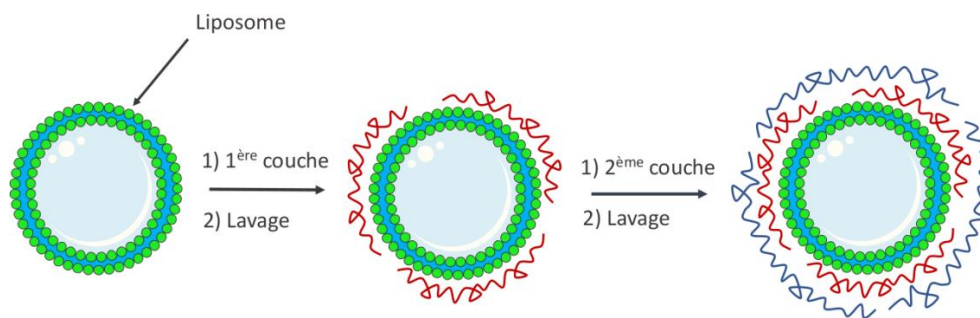


Figure 27 : Recouvrement couche par couche (LbL) de liposomes à l'aide d'espèces polymériques de charge opposée.

L'objectif de ces travaux est donc de mettre au point et d'évaluer une nouvelle formulation de layersomes présentant une résistance et une stabilité accrues en milieux biologiques en utilisant des polymères biodégradables et biocompatibles. Nous souhaitons nous focaliser en particulier sur l'amélioration de la stabilité et de la résistance des liposomes face aux éléments déstabilisants présents dans le sang et dans les fluides gastriques et intestinaux.

2. Stratégie

2.1. Liposomes

Pour la formulation des layersomes, nous avons choisi d'utiliser des liposomes de charge de surface négative constitués de 2 phospholipides naturels, la phosphatidylcholine (PC) et le phosphatidylglycérol (PG), et de cholestérol (Chol) dans les ratios molaires suivants : 54:13:33. Ces liposomes sont préparés par évaporation du ou des solvants organiques (le plus souvent un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) des solutions lipidiques puis par hydratation du film lipidique obtenu par un tampon aqueux et sonication subséquente de la suspension de vésicules multilamellaires (MLV).

2.2. Polyélectrolytes

Le couple de polymères utilisé doit être biocompatible, non immunogène et non cytotoxique. Afin d'observer un relargage progressif du contenu des liposomes, il est important que le couple choisi puisse être dégradé de façon progressive par des enzymes et les cellules présentes dans les milieux biologiques. De plus, comme la charge de surface des

liposomes sélectionnés est négative, il convient de choisir un couple d'espèces de charges opposées afin de les adsorber par interactions électrostatiques à la surface des particules liposomiques. Enfin, nous souhaitons idéalement que les polymères puissent être modifiés chimiquement (par fonctionnalisation ou par réticulation) afin de pouvoir jouer sur la rigidité et la résistance des couches et donc sur l'accessibilité du liposome enfoui dans les couches polymériques.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au couple poly(L-lysine) (PLL) et acide poly(L-glutamique) (PGA), (Figure 28) qui a déjà été utilisé pour la production de films multicouches aux propriétés antibactériennes^{316,317} ou favorisant l'adhésion ainsi que la différenciation cellulaire.^{310,318} Il a aussi été exploité pour des travaux préliminaires de formulation de suspensions de layersomes menés au sein de notre laboratoire.³¹⁹

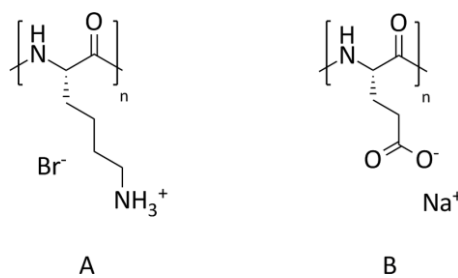


Figure 28 : Structures chimiques sélectionnées pour le recouvrement des liposomes. (A) bromhydrate de poly(L-lysine) 21 kD (PLL, n = 100) et **(B)** acide poly(L-glutamique) de sodium 64 kD (PGA, n = 426).

Aucune cytotoxicité pour ce couple de polymères n'a pu être observée jusqu'à ce jour.³²⁰ De plus, les travaux préliminaires de formulation de layersomes avec ces 2 espèces polymériques ont démontré une résistance plus importante des structures développées que pour des liposomes non recouverts en présence d'un détergent (Triton™ X-100) et d'éthanol. Il a également été démontré que des films constitués de multiples couches de PLL et de PGA peuvent résister jusqu'à 24 h en contact direct avec des monocytes avant d'être progressivement dégradés.³²¹ Enfin, ces deux polyélectrolytes synthétiques sont chimiquement modifiables et il est également possible de les réticuler.^{318,322}

Comme les liposomes choisis présentent un potentiel zêta négatif de l'ordre de -50 mV (Tableau 6), le premier polymère mis en contact avec ces derniers sera la PLL positivement chargée puis le deuxième sera le PGA chargé négativement (Figure 29). De plus, si la résistance des layersomes constitués d'une couche de PLL et de PGA en milieux biologiques s'avère insuffisante, nous envisagerons de développer des layersomes avec davantage de couches de ces 2 espèces polymériques à leur surface.

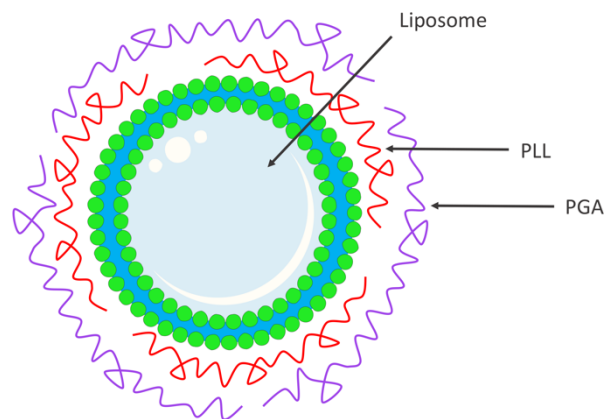


Figure 29 : Représentation schématique du recouvrement couche par couche (LbL) des liposomes unilamellaires. Avec une espèce polycationique : la PLL (rouge) puis avec une espèce polyanionique : le PGA (mauve).

Tableau 6 : Diamètre moyen, indice de polydispersité (PDI) et potentiel zêta moyen des liposomes PC:PG:Chol (54:13:33) utilisés pour la formulation des layersomes. $n = 5$.

Diamètre moyen (nm)	PDI	Potentiel zêta moyen (mV)
57 ± 9	0,231	-50 ± 10

B. Résultats et discussion

1. Développement et caractérisation de layersomes de première génération

Dans un premier temps, nous avons travaillé au développement de layersomes recouverts de 1 à 2 couches de polymères. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur des travaux préliminaires de formulation de layersomes menés au sein de notre laboratoire, que nous avons optimisés. Les layersomes ainsi développés ont été caractérisés par diverses techniques d'analyse afin de démontrer leur recouvrement et leur stabilité en condition tamponnée.

1.1. Travaux préliminaires

Comme mentionné ci-avant, des travaux préliminaires de formulation de layersomes ont déjà été menés au sein de notre laboratoire.³¹⁹ Ces travaux de formulation ont permis de développer des suspensions de layersomes recouverts d'une couche de PLL puis d'une couche de PGA (Lp-PLL-PGA) à partir de liposomes unilamellaires constitués de PC, de PG et de Chol dans les ratios molaires 54:13:33 classiquement utilisés en formulation (Figure 30).

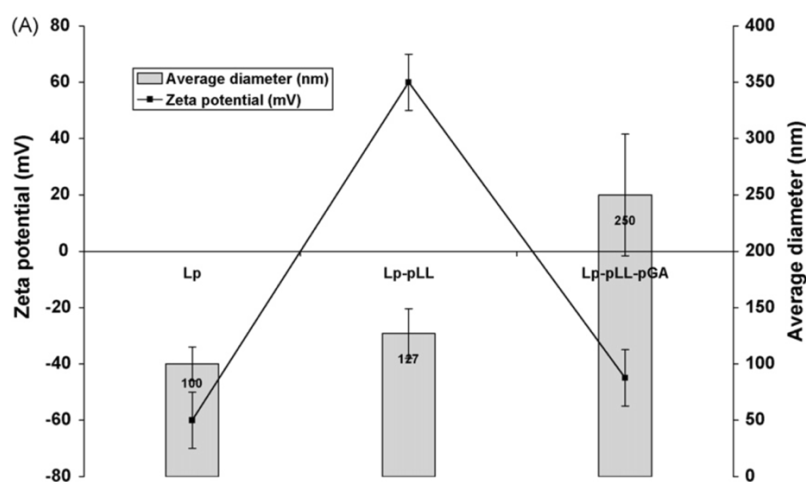


Figure 30 : Évolution du diamètre moyen et du potentiel zêta moyen de liposomes unilamellaires suite à leur recouvrement avec de la PLL et du PGA. Extrait de la référence 319.

Pour la formulation de ces layersomes, des liposomes à une concentration en phospholipides (PL) de 0,67 mM ont été versés goutte à goutte dans une solution de PLL de même volume à 0,5 mg/mL sous agitation magnétique et ont été dialysés contre une solution tamponnée afin d'éliminer l'excès de polymère. Après quoi, la suspension de liposomes recouverts de PLL (Lp-PLL) obtenue a été versée goutte à goutte dans une solution de PGA de même volume à 1,0 mg/mL sous agitation magnétique et a été dialysée contre une solution tamponnée (10 mM HEPES, 15 mM NaCl, pH 7,4, 100 kD) afin d'éliminer le PGA excédentaire (Figure 31). Ces travaux préliminaires ont donc constitué un point de départ pour notre projet de formulation de layersomes. Nous nous sommes basés sur cette procédure de formulation préalablement établie et nous avons dans un premier temps évalué l'influence de certains paramètres tels que la concentration en polymères et en phospholipides sur les caractéristiques physico-chimiques (taille, PDI et potentiel zêta) des particules obtenues. Le but étant d'identifier les conditions permettant d'obtenir des particules de layersomes les plus homogènes possibles avec des tailles suffisamment petites (inférieures à 200 nm). En effet, comme nous souhaitons entre autres formuler des layersomes compatibles avec une administration intraveineuse, il est nécessaire de développer des nanoparticules dont le diamètre n'excède pas 200 nm.³²³

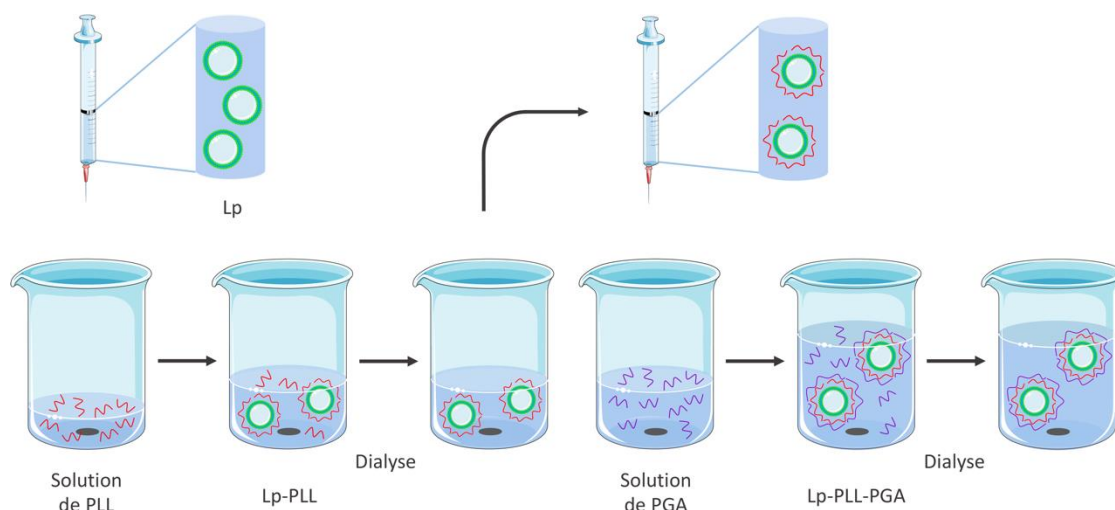


Figure 31 : Procédure de formulation des liposomes recouverts de 2 couches de polyélectrolytes ou layersomes.

1.2. Preuve de concept

En appliquant la même procédure de formulation et utilisant les mêmes concentrations en phospholipides et en polymères que celles décrites ci-avant, on parvient à formuler des particules de Lp-PLL et de Lp-PLL-PGA homogènes ($PDI < 0,3$) et stables durant 2 mois à 4°C en condition tamponnée ($pH = 7,4$). En effet, suite à l'ajout de chaque couche de polymère, on constate une augmentation du diamètre moyen des formulations ainsi qu'une inversion de leur valeur de potentiel zêta (Figure 32). Cependant, les tailles mesurées sont nettement inférieures à celles obtenues lors des travaux préliminaires de formulation. En effet, des tailles de 127 ± 22 nm et de 250 ± 54 nm avaient été respectivement mesurées pour les formulations de Lp-PLL et de Lp-PLL-PGA. Pour nos formulations, nous obtenons des particules à 71 ± 11 nm et à 99 ± 30 nm de diamètre suite à l'ajout respectif de la PLL et du PGA aux formulations de liposomes. Pour les mesures de potentiel zêta, on observe des valeurs proches de celles mesurées préalablement. En effet, les Lp-PLL ont un potentiel zêta de $+43 \pm 10$ mV (contre $+60 \pm 10$ mV préalablement) et les Lp-PLL-PGA ont une valeur de potentiel zêta identique à celle mesurée initialement, soit -45 ± 6 mV.

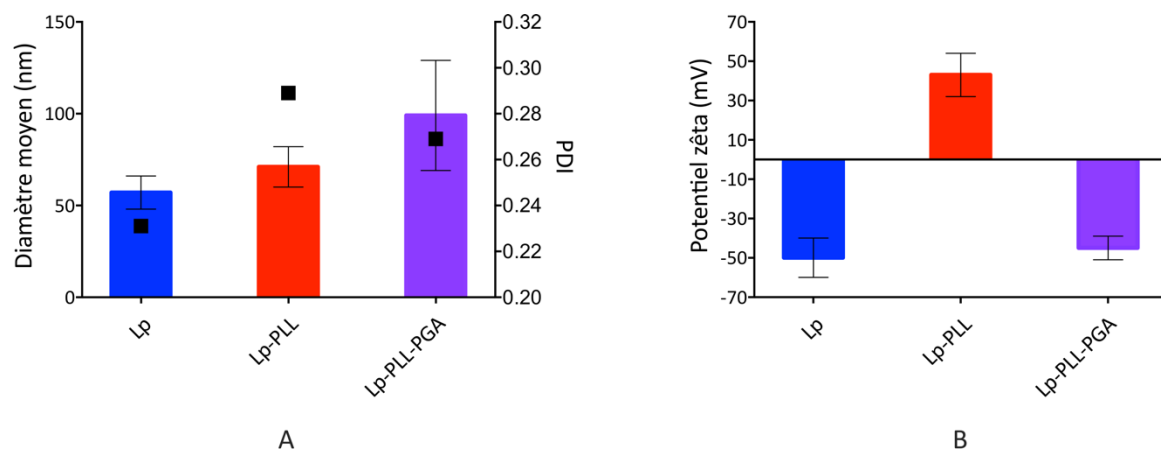


Figure 32 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL et Lp-PLL-PGA). (A) : diamètres moyens et indices de polydispersité (PDI) ; (B) : potentiels zêta. n = 5.

Malgré l'utilisation de la même procédure de formulation et de concentrations de polymères et de phospholipides identiques, on obtient des valeurs de taille 2 fois moins importantes que celles mesurées initialement. Cette différence pourrait être expliquée par

les polymères employés. En effet, les polymères que nous avons utilisés sont les mêmes que ceux employés pour les travaux préliminaires de formulation mais ont néanmoins des poids moléculaires qui varient d'un lot à un autre. Ces résultats pourraient aussi être expliqués par l'utilisation de liposomes unilamellaires destinés au recouvrement de taille moins importante que ceux utilisés pour l'étude préliminaire. En effet, des liposomes 2 fois plus petits ont été employés pour la formulation des layersomes. Néanmoins, ces tailles moins importantes s'avèrent plutôt avantageuses pour notre projet de formulation. En effet, même avec 2 couches de polyélectrolytes, des particules stables et homogènes de taille 2 fois inférieure à la limite que nous nous sommes fixée (soit 200 nm) ont été formulées.

1.3. Influence de la concentration en phospholipides

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration en phospholipides sur les caractéristiques physico-chimiques des particules formulées. Comme mentionné ci-avant, les travaux préliminaires de formulation des layersomes ont été effectués avec une concentration initiale en phospholipides de 0,67 mM. Nous avons donc souhaité évaluer l'influence de concentrations supérieures à 0,67 mM sur la taille et le potentiel zêta des particules obtenues. Il est à noter que dans le cadre de cette étude, l'influence de concentrations inférieures à 0,67 mM n'a pas été étudiée. En effet, en démarrant la formulation avec des concentrations inférieures à 0,67 mM et en raison des étapes de dilution propres au procédé, les échantillons finaux auraient été trop dilués et les volumes à produire trop importants. Au total, 3 concentrations initiales en phospholipides ont été testées pour la formulation de layersomes, soit 2, 5 et 10 mM et la même procédure de formulation que celle décrite ci-avant (section B.1.1 page 71) a été utilisée pour cet essai ($n = 2$). Pour les 3 concentrations testées, nous avons constaté une opacification des suspensions obtenues lors du dépôt goutte à goutte des liposomes dans la solution de PLL, puis une précipitation quelques heures suivant la formulation témoignant de la formation de microparticules. Malgré une sonication consécutive d'une demi-heure dans un bain de sonication, il n'a pas été possible de réduire la taille des particules afin de les resuspendre.

Au vu des résultats, il n'est donc pas possible de formuler des layersomes ayant les caractéristiques physico-chimiques souhaitées (diamètre < 200 nm et PDI < 0,3) avec de telles concentrations en phospholipides. La précipitation des suspensions pourrait être

expliquée par l'utilisation de concentrations de liposomes trop importantes favorisant ainsi l'enrobage de plusieurs particules liposomiques trop proches du fait de leur concentration. Afin d'enrober chaque entité liposomique et d'éviter ces phénomènes de précipitation, il semble impératif de démarrer la formulation avec une suspension de liposomes suffisamment diluée. Nous avons décidé de poursuivre nos essais de formulation avec la concentration définie lors des travaux préliminaires, soit 0,67 mM de phospholipides.

1.4. Influence de la concentration en polymères

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la concentration en polymères cationique et anionique sur les caractéristiques physico-chimiques des particules de layersomes formulées. Pour ce faire, des suspensions de Lp-PLL ont été préparées selon la procédure décrite ci-avant (section B.1.1 page 71) avec des concentrations allant de 0,1 à 1,5 mg/mL de PLL. Après quoi, la PLL excédentaire a été éliminée par dialyse et pour chaque suspension de Lp-PLL obtenue, 2 lots de concentrations de PGA (soit l'équivalent du double et du quadruple de la concentration en PLL utilisée) ont été testés pour la formulation de suspensions de Lp-PLL-PGA (Tableau 7). Ensuite, des mesures de taille et de potentiel zêta ont été effectuées pour chaque formulation et les caractéristiques physico-chimiques mesurées ont été comparées (Figure 33 et Figure 34).

Comme observé précédemment (section B.1.2 page 73) on constate une augmentation de la taille des formulations ainsi qu'une inversion de leurs valeurs de potentiel zêta suite à l'ajout de chaque couche de polyélectrolyte (Figure 33A et B et Figure 34A et B). Il est à noter que pour la formulation préparée avec 0,1 mg/mL de PLL puis 0,2 ou 0,4 mg/mL de PGA, aucune augmentation de taille n'est constatée suite à l'ajout du polymère anionique contrairement à toutes les autres formulations préparées (Figure 33A et Figure 34A). Il est possible que l'on observe un phénomène de compaction de la structure suite à l'ajout du PGA qui ne se produirait qu'en présence d'une faible quantité de PLL à la surface des particules, ce qui expliquerait ce résultat.

Pour les suspensions de Lp-PLL, des tailles ainsi que des valeurs de PDI différentes sont observées en fonction de la concentration en PLL employée pour leur formulation. En effet, les diamètres les plus importants et les valeurs de PDI les moins élevées sont mesurés

pour les formulations préparées avec 0,1 mg/mL (soit 116 ± 19 nm, PDI = 0,212). Pour les suspensions formulées avec des concentrations en PLL > 0,1 mg/mL, des tailles moins importantes ainsi que des valeurs de PDI de l'ordre de 0,25 sont observées. De plus, on observe une diminution progressive de leur diamètre ainsi qu'une augmentation de leurs valeurs de PDI avec des concentrations croissantes en PLL.

Tableau 7 : Concentrations de PLL et de PGA testées pour la formulation de Lp-PLL et de Lp-PLL-PGA.

Concentrations de PLL	Concentration de PGA
0,1 mg/mL	0,2 mg/mL
	0,4 mg/mL
0,2 mg/mL	0,4 mg/mL
	0,8 mg/mL
0,4 mg/mL	0,8 mg/mL
	1,6 mg/mL
0,6 mg/mL	1,2 mg/mL
	2,4 mg/mL
0,8 mg/mL	1,6 mg/mL
	3,2 mg/mL
1,0 mg/mL	2,0 mg/mL
	4,0 mg/mL
1,5 mg/mL	3,0 mg/mL
	6,0 mg/mL

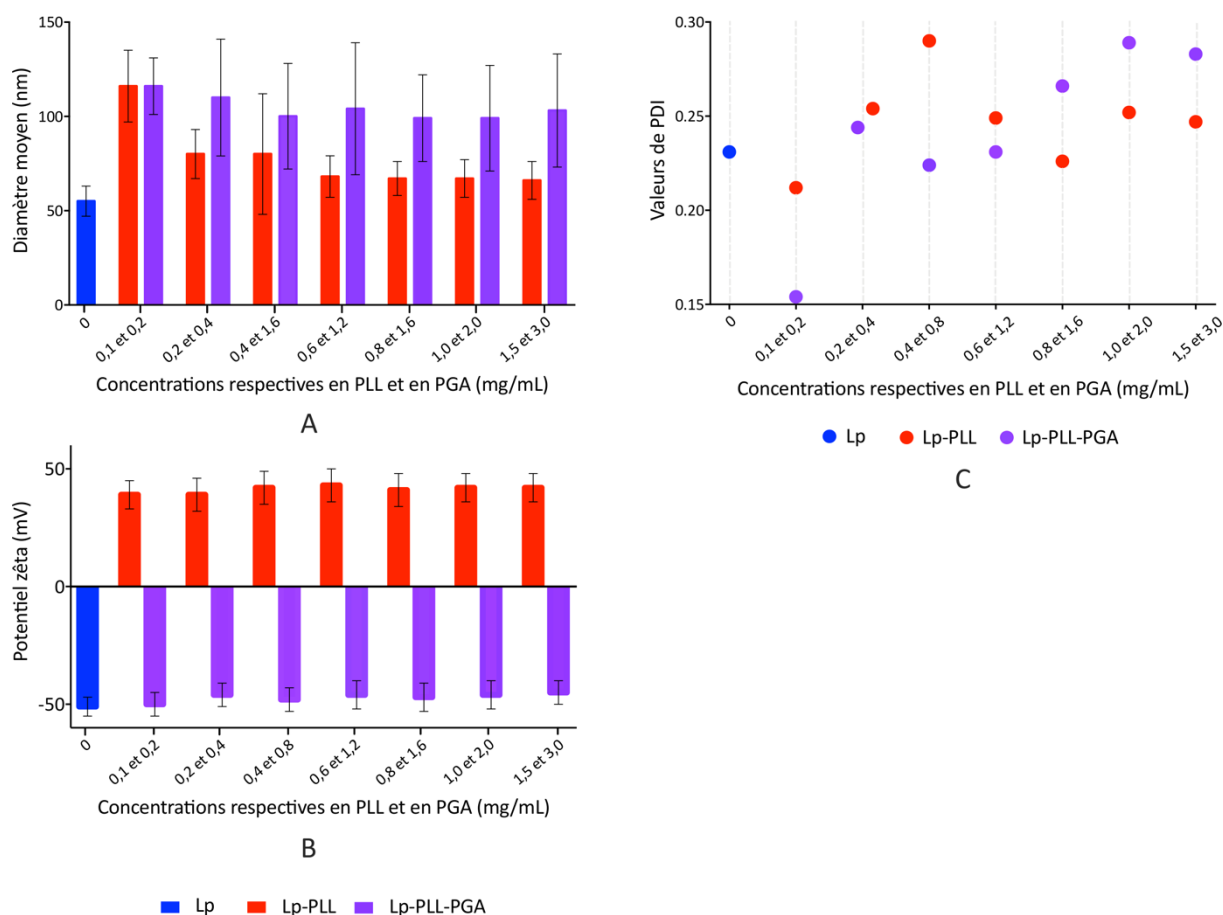


Figure 33 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp), de liposomes-PLL (Lp-PLL) et de liposomes-PLL-PGA (Lp-PLL-PGA) en fonction des concentrations de PLL et de PGA utilisées. Ici est représenté le premier lot de concentrations en PGA testé (double de la concentration en PLL), soit des concentrations allant de 0,2 à 3,0 mg/mL de PGA. **(A)** : diamètres moyens ; **(B)** : potentiels zêta ; **(C)** : indices de polydispersité (PDI). n = 3 pour chaque concentration.

Pour les suspensions de Lp-PLL-PGA et pour les 2 lots de concentrations en PGA testées, aucune différence de taille n'est constatée. En revanche, on peut constater des différences en termes d'homogénéité. En effet, les formulations préparées avec 0,2 ou 0,4 mg/mL de PGA sont les plus monodisperses avec des valeurs de PDI respectives de 0,154 et de 0,191 ainsi que des largeurs à mi-hauteur 2 fois moins importantes que celles observées pour les autres formulations. De plus, une augmentation des valeurs de PDI en fonction des concentrations en PGA est constatée pour les formulations préparées avec des concentrations de PGA > 0,2 mg/mL. Il est à noter que des valeurs de PDI > 0,3 ont été mesurées pour les formulations préparées avec 4,0 et 6,0 mg/mL de PGA, reflétant la polydispersité de ces 2 suspensions (Figure 34C).

Le potentiel zêta des particules formulées ne semble pas dépendre de la concentration en PLL et en PGA employée pour leur préparation (Figure 33B et Figure 34B). En effet, des valeurs de potentiel zêta très proches d'une suspension à un autre sont observées (soit $\approx +40$ mV pour les Lp-PLL et ≈ -50 mV pour les Lp-PLL-PGA).

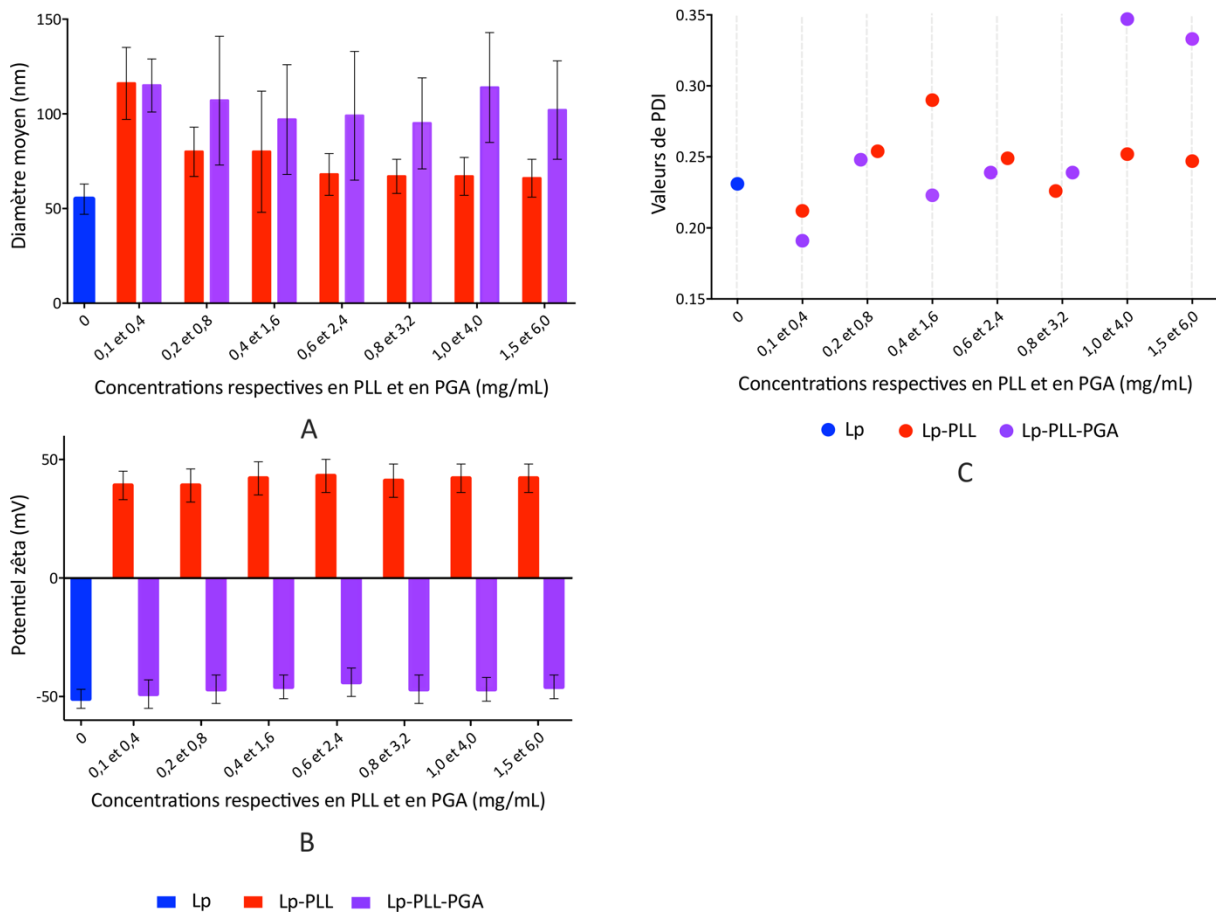


Figure 34 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp), de liposomes-PLL (Lp-PLL) et de liposomes-PLL-PGA (Lp-PLL-PGA) en fonction des concentrations de PLL et de PGA utilisées. Ici, le deuxième lot de concentrations de PGA est testé (quadruple de la concentration en PLL), soit des concentrations de 0,4 à 6,0 mg/mL de PGA. **(A)** : diamètres moyens ; **(B)** : potentiels zêta ; **(C)** : indices de polydispersité (PDI). n = 3 pour chaque concentration.

En jouant sur la concentration de PLL et de PGA, nous avons observé qu'il est possible de moduler l'homogénéité ainsi que la taille des formulations de Lp-PLL et de Lp-PLL-PGA. Néanmoins, la charge de surface des formulations de liposomes ne semble pas être affectée par les différentes concentrations en polymères que nous avons testées. De plus, nous avons identifié une condition de concentration qui pourrait s'avérer intéressante pour

la suite de nos travaux de formulation. Il s'agit de la condition pour laquelle les suspensions les plus homogènes en taille ont été formulées (soit 0,1 mg/mL de PLL et 0,2 ou 0,4 mg/mL de PGA), (Figure 35). Comme mentionné ci-avant, nous souhaitons développer des formulations de layersomes de taille inférieure à 200 nm et suffisamment homogènes pour effectuer des tests de stabilité dans des milieux biologiques simulés. Cette condition identifiée remplit donc ces 2 critères que nous nous sommes fixés et a été retenue pour la suite de nos travaux de développement.

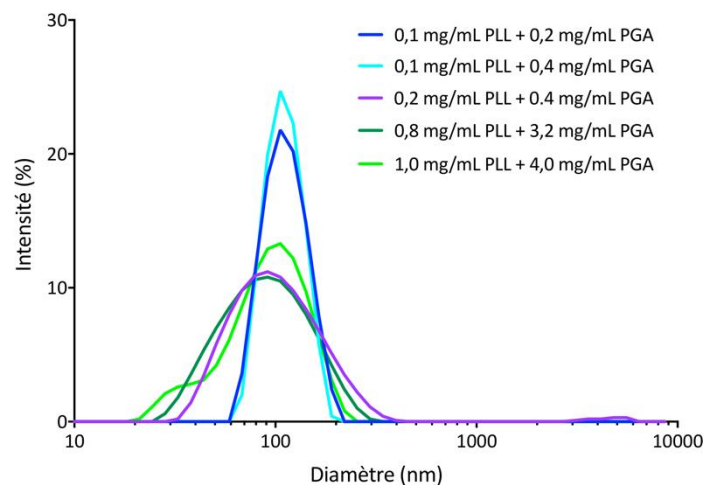


Figure 35 : Distribution des diamètres de quelques formulations de Lp-PLL-PGA préparées avec différentes concentrations en PLL et en PGA. On constate une distribution moins large pour les formulations préparées avec 0,1 mg/mL de PLL et 0,2 ou 0,4 mg/mL de PGA.

1.5. Optimisation de la procédure d'élimination des polymères

Suite à l'ajout de chaque couche de polymère, il est nécessaire de procéder à l'élimination de l'excédent de polyélectrolyte ne s'étant pas adsorbé à la surface des liposomes. Lors des travaux préliminaires de formulation, la dialyse contre du tampon avait été choisie pour l'élimination des espèces polymériques excédentaires. Néanmoins, 24 h de dialyse sont nécessaires au total et représentent un temps considérable d'attente. Nous avons donc souhaité substituer la dialyse par une autre technique de séparation à la fois plus rapide mais permettant aussi de reconcentrer nos suspensions de layersomes sans les déstabiliser. Dans ce but, nous avons testé 2 techniques alternatives de séparation en parallèle, à savoir l'ultrafiltration par pression ($n = 1$) et par centrifugation ($n = 3$). Afin

d'évaluer l'intégrité des layersomes suite à ces étapes de filtration, des mesures de taille et de potentiel zêta ont été effectuées.

Après filtration par pression (100 kD ; 1,0 bar), on constate que les valeurs de potentiel zêta des particules de Lp-PLL demeurent inchangées mais que leurs diamètres ainsi que leurs valeurs de PDI évoluent au cours du temps (Tableau 8). En effet, on constate la présence de 2 populations de 55 et de 150 nm de diamètre ainsi qu'une valeur de PDI > 0,4 directement après l'étape de filtration, témoignant d'une perte d'homogénéité ainsi que d'une déstabilisation de la formulation. 5 h et 1 jour après filtration, on constate néanmoins des valeurs de tailles plus proches de la valeur initialement mesurée (soit 90 nm). Cependant, une deuxième population est toujours détectée en taille et les valeurs de PDI mesurées sont toujours supérieures à 0,3. Au vu de l'hétérogénéité de la suspension obtenue, nous n'avons pas poursuivi la procédure de formulation pour l'ajout de la deuxième couche de PGA. Bien que cette technique de filtration soit très rapide (quelques minutes), elle occasionne une déstabilisation importante des particules et conduit à l'apparition d'une nouvelle population en taille. Une pression trop importante exercée dans la cellule de filtration est certainement à l'origine de cette déstabilisation.

Après filtration par centrifugation (100 kD ; 100 g), nous avons constaté que les caractéristiques physico-chimiques des formulations de Lp-PLL demeurent inchangées, témoignant d'une bonne stabilité des suspensions (non transmis). Des particules de Lp-PLL-PGA ont ensuite été préparées à partir des suspensions de Lp-PLL filtrées et ont à nouveau été soumises à une séparation par filtration dans les mêmes conditions que la précédente. Comme pour la filtration antérieure, aucune variation des paramètres physico-chimiques mesurés n'a été constatée et ce, même 5 jours après l'étape de filtration, reflétant une bonne stabilité des particules (non transmis). De plus, cette méthode permet de concentrer les particules et seulement 30 min ont été nécessaires pour concentrer 3 fois la suspension initiale. Enfin, un dosage au phosphate du filtrat ainsi que de la suspension filtrée a révélé une perte limitée en phospholipides de l'ordre de 14 %.

Tableau 8: Évolution dans le temps des caractéristiques physico-chimiques d'une formulation de Lp-PLL après filtration par pression. n = 1.

Mesures	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Avant filtration	73 ± 14	0,210	43 ± 6
Directement après filtration	149 ± 38 (73 %) 54 ± 13 (27 %)	0,415	45 ± 5
5 h après filtration	96 ± 17 (95 %) 28 ± 3 (5 %)	0,351	45 ± 7
24 h après filtration	87 ± 12 (68 %) 654 ± 152 (32 %)	0,402	42 ± 4

Parmi les 2 techniques de séparation évaluées, seule l'ultrafiltration par centrifugation permet d'éliminer l'espèce polymérique excédentaire et ce, sans occasionner une déstabilisation des particules. En effet, comme il est possible de formuler des particules stables de Lp-PLL-PGA, on peut considérer que suffisamment d'espèce polymérique a été éliminée. De plus, cette technique de séparation permet également de concentrer les suspensions de façon très rapide (30 min) avec des pertes raisonnables, ce qui réduit considérablement les volumes à manipuler et le temps d'attente initial (soit 12 h pour chaque étape de dialyse). En conclusion, c'est l'ultrafiltration par centrifugation qui a été retenue pour la suite de nos travaux de développement.

1.6. Évaluation de la stabilité des layersomes

La stabilité des layersomes de première génération a été évaluée en milieu tamponné sur un intervalle de 2 mois. Des mesures de taille et de potentiel zêta des formulations conservées à 4°C ont été effectuées toutes les 2 semaines et les résultats obtenus ont été comparés. Pour toutes les formulations, les mêmes caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées pendant toute la durée de l'étude (non transmis). Ces résultats témoignent de la stabilité des formulations développées en milieu tamponné lorsqu'elles sont conservées à 4°C.

1.7. Caractérisation du recouvrement couche par couche des layersomes

En plus de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, DLS), nous avons souhaité caractériser et démontrer le recouvrement LbL des liposomes par des techniques alternatives. Au total, 2 techniques de caractérisation complémentaires ont été employées, à savoir le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (fluorescence resonance energy transfer, FRET) ainsi que la microbalance à quartz.

1.7.1. Caractérisation du recouvrement par FRET

Principe du FRET

Le FRET est un phénomène physique de transfert d'énergie entre molécules luminescentes. Lorsque 2 chromophores sont suffisamment proches (entre 10 Å et 100 Å), le chromophore donneur, initialement dans son état excité, transmet une partie de son énergie à un second chromophore (souvent un chromophore accepteur), par une interaction de type dipôle-dipôle non radiative. Le chromophore accepteur ainsi excité émet ensuite une partie de son énergie sous forme de photons pour retourner à l'état fondamental. Cette émission d'énergie par le donneur de FRET est qualifiée de « signal de FRET » (Figure 36).

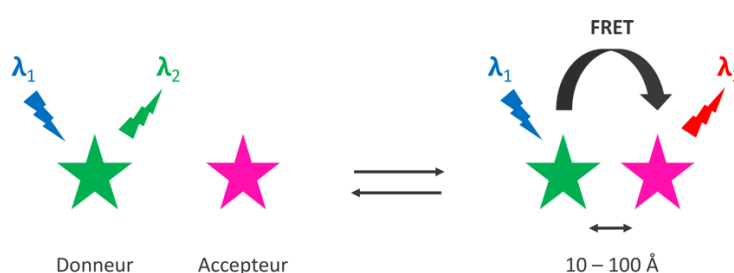


Figure 36 : Principe du transfert d'énergie entre un chromophore donneur et accepteur.

L'efficacité de ce transfert d'énergie entre un chromophore donneur et accepteur est dépendante de plusieurs facteurs, dont l'étendue du recouvrement des spectres d'émission et d'excitation des 2 chromophores, l'orientation relative des 2 dipôles transitoires et en particulier, la distance entre le donneur et l'accepteur. Le choix du couple donneur/accepteur ainsi que la distance qui les sépare sont donc déterminants pour l'obtention d'un signal de FRET.³²⁴ Les mesures de ce signal sont couramment utilisées en

biologie et en chimie pour mesurer des distances entre molécules, pour détecter des interactions moléculaires ou encore pour suivre la formation ou les interactions biologiques de nanoparticules.^{325–328}

Stratégie

Nous avons précédemment démontré par des mesures de DLS et de potentiel zêta, que la PLL et le PGA sont adsorbés à la surface des liposomes. L'adsorption de ces deux polymères est engendrée par l'établissement de liaisons électrostatiques entre les liposomes et la PLL ainsi qu'entre les deux polyélectrolytes en question. Il a été démontré que la distance séparant les 2 entités ioniques en interaction est faible, soit 2,5 à 4 Å, en fonction des ions formant la liaison.³²⁹ Les couches de polymères déposées sont donc potentiellement assez proches dans l'espace pour pouvoir détecter leur interaction par mesure d'un signal de FRET. Nous avons donc décidé d'employer des polymères greffés à un couple de fluorophores FRET compatibles afin de démontrer et de caractériser le recouvrement LbL des liposomes (Figure 37).

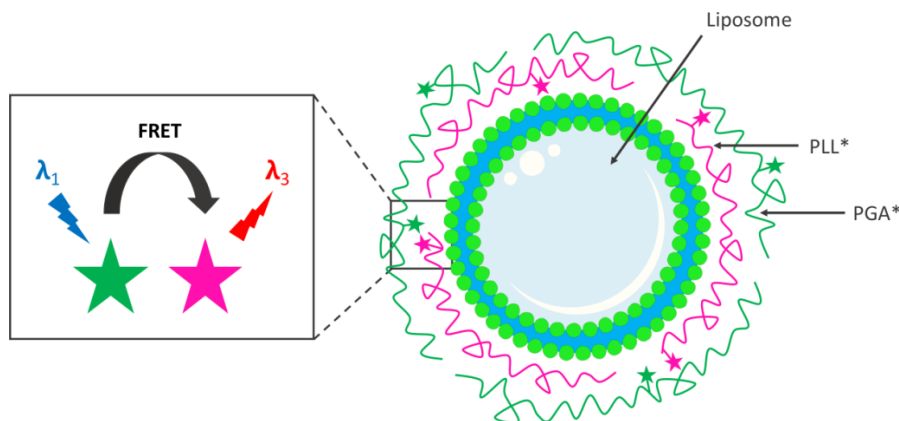


Figure 37 : Principe du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes respectivement greffées à la PLL (PLL*) et au PGA (PGA*) adsorbées à la surface d'un liposome.

Notre choix s'est arrêté sur un couple de chromophores donneur et accepteur classiquement utilisé pour la génération d'un signal de FRET, à savoir la fluorescéine (le donneur) et la rhodamine (l'accepteur). En effet, ce couple de fluorophore présente des propriétés physiques optimales, à savoir : un bon rendement quantique (0,9 pour la fluorescéine), une surface de recouvrement des spectres d'émission et d'excitation

importante, une bonne séparation des spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur ainsi qu'un rayon de Förster R_0 de 55 Å (distance entre le donneur et l'accepteur pour laquelle 50 % du fluorochrome donneur excité transmet son énergie à l'accepteur), (Figure 38).^{324,330}

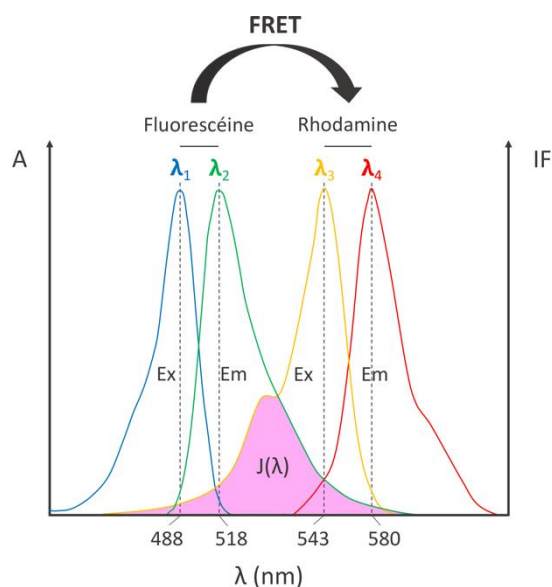


Figure 38 : Représentation du transfert d'énergie entre la fluorescéine et la rhodamine. Les spectres représentent les profils d'excitation (Ex) et d'émission (Em) du couple fluorescéine (donneur)/rhodamine (accepteur) séparés d'une distance r . Le pic d'absorption de la fluorescéine se situe à 488 nm et son pic d'émission à 518 nm. Les pics d'absorption et d'émission de la rhodamine sont respectivement situés à 543 et 580 nm. Un recouvrement du spectre d'émission de la fluorescéine et de celui d'excitation de la rhodamine, désigné $J(\lambda)$, est observé entre 500 et 600 nm. Pour quantifier un signal de FRET, la distance r entre ces 2 chromophores doit être inférieure à 55 Å. **A** : absorption normalisée ; **IF** : intensité de fluorescence. D'après la référence ³²⁴.

Synthèse des polymères fluorescents

Pour la synthèse du PGA-fluorescéine (PGA*), 0,3 équivalents d'EDC et 0,03 équivalents de sulfo-NHS solubilisés dans du tampon HEPES 10 mM (pH 6,5) ont été ajoutés à 1 équivalent de PGA solubilisé dans la même solution tamponnée. Après 15 min de réaction à température ambiante et sous argon, 0,2 équivalents de 5-aminofluorescéine solubilisés dans du DMSO anhydre pour 1 équivalent de PGA ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après purification par des lavages successifs à l'isopropanol, un PGA greffé à 0,6 % totalement hydrosoluble a été obtenu avec un rendement isolé de 72% (Figure 39).

Afin d'obtenir un taux de greffage supérieur à 0,6 %, 2 et 10 fois plus d'équivalents d'agents de couplage ont été ajoutés lors d'une tentative de synthèse du PGA-fluorescéine. Néanmoins, les produits obtenus n'étaient pas hydrosolubles. Il n'est donc pas possible de greffer ce polymère à plus de 0,6 % avec de la fluorescéine.

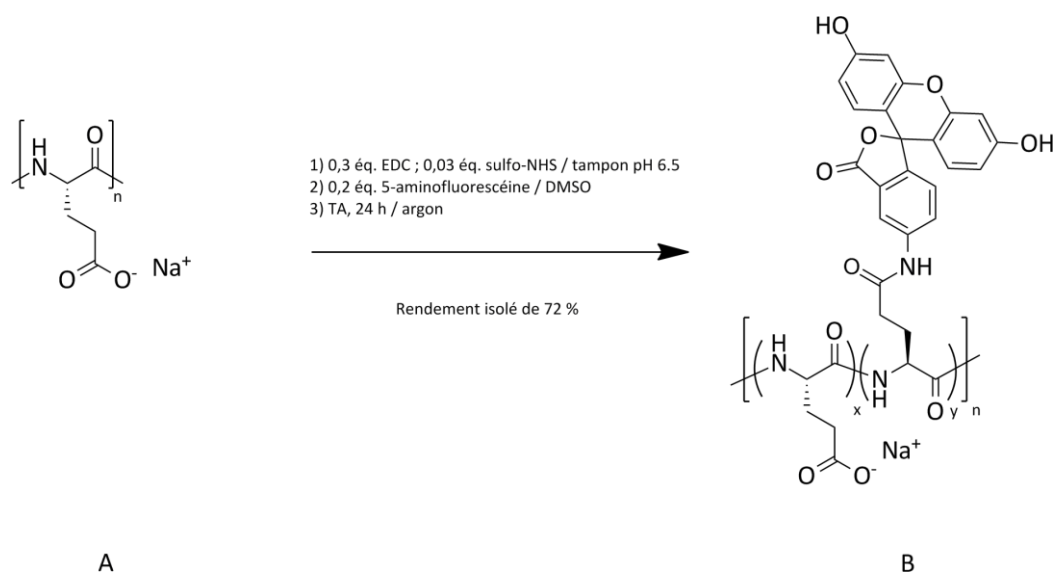


Figure 39 : Synthèse du PGA-fluorescéine 64 kD à partir de sodium de PGA 64 kD, d'EDC, de sulfo-NHS et de 5-aminofluorescéine. (A) : sodium de PGA ; (B) : PGA-fluorescéine. $n = x + y$; $n = 426$; $x = 423$; $y = 3$.

Pour la synthèse de la PLL-rhodamine (PLL*), 10 équivalents de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) ont été ajoutés à 1 équivalent de PLL solubilisée dans du DMSO anhydre. Après 15 min de réaction à température ambiante et sous argon, 0,1 équivalents de rhodamine B isothiocyanate pour 1 équivalent de PLL ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après purification par des lavages successifs à l'isopropanol, une PLL greffée à 3 % a été obtenue avec un rendement isolé de 90 % (Figure 40). Dans le but d'obtenir un taux de greffage supérieur à 3 %, 2 et 10 fois plus d'équivalents d'agents de couplage ont été ajoutés lors d'une tentative de synthèse de la PLL-rhodamine. Néanmoins, le produit obtenu n'était pas hydrosoluble. Il n'est donc pas possible de greffer ce polymère à plus de 3 % avec de la rhodamine.

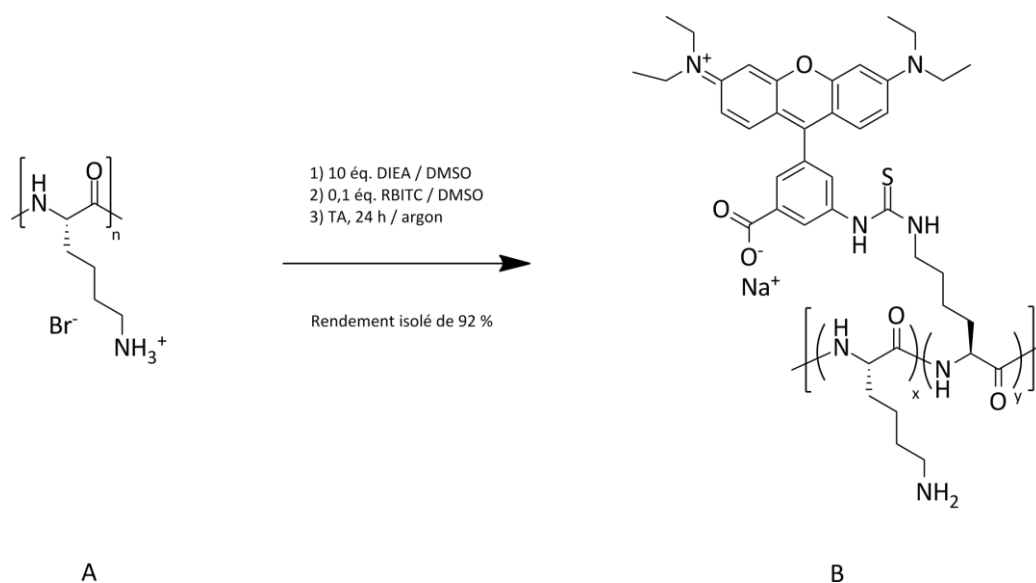


Figure 40 : Synthèse de la PLL-rhodamine 21 kD à partir de bromhydrate de PLL 21 kD, de rhodamine B isothiocyanate (RBITC) et de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA). (A) : bromhydrate de PLL ; (B) : PLL-rhodamine. $n = x + y$; $n = 100$, $x = 97$ et $y = 3$.

Formulation de layersomes fluorescents

Au total, 2 suspensions de layersomes fluorescents ont été formulées, à savoir des liposomes recouverts de PLL* et de PGA* (Lp-PLL*-PGA*), ainsi que des liposomes recouverts de PLL non greffée et de PGA* (Lp-PLL-PGA*) en guise de contrôle (Figure 41). Ces suspensions ont été formulées dans les mêmes conditions que pour les layersomes non fluorescents. Un mélange 1:1 de PLL* à 0,05 mg/mL et de PGA* à 0,1 mg/mL a également été préparé en guise de contrôle. Des mesures de taille et de potentiel zêta des suspensions ont révélé des tailles ainsi que des valeurs de potentiels zêta similaires à celles observées pour les formulations de layersomes non fluorescents. Il est à noter que 2 populations de charge négative, dont une majoritaire à -47 ± 9 mV, ont été détectées pour la formulation de Lp-PLL-PGA* (Tableau 9).

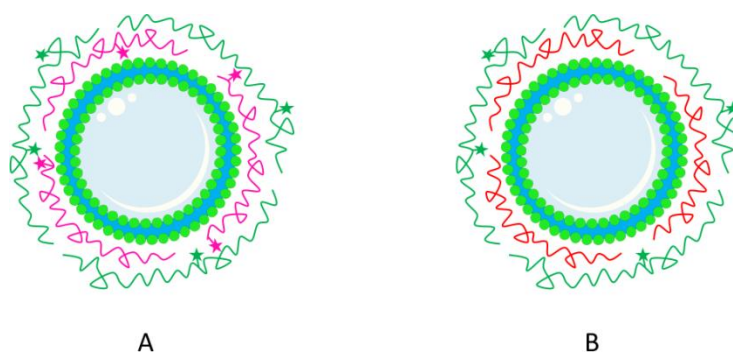


Figure 41 : Formulation de Lp-PLL*-PGA* , de Lp-PLL-PGA* préparées pour une analyse de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes à la surface des liposomes. (A) : Lp-PLL*-PGA* ; (B) : Lp-PLL-PGA* .

Les spectres d'émission aux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescéine (488 nm) ainsi que de la rhodamine (543 nm) ont ensuite été mesurés pour le mélange 1:1 de PLL* et PGA* (non transmis) et pour les formulations préparées (Figure 42). Comme aucune fluorescence n'a été détectée de 500 à 700 nm pour la formulation de Lp-PLL-PGA* à la longueur d'onde d'excitation de la rhodamine, ce résultat n'est pas représenté dans la Figure 42.

Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes fluorescents préparées pour l'analyse de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. Les valeurs de PDI sont indiquées entre parenthèses dans le premier tableau. n = 3 pour chaque formulation.

	Taille (nm) et PDI		Potentiel zêta (mV)	
	Lp-PLL*-PGA*	Lp-PLL-PGA*	Lp-PLL*-PGA*	Lp-PLL-PGA*
1ère couche	117 ± 17 (0,143)	128 ± 23 (0,141)	39 ± 8	35 ± 5
2ème couche	136 ± 23 (0,141)	151 ± 25 (0,225)	-40 ± 7	-47 ± 9 (66%) -17 ± 4 (34%)

Les spectres d'émission mesurés pour le mélange 1:1 de PLL* et de PGA* n'ont pas révélé de FRET entre la fluorescéine et la rhodamine libre. Les espèces polymériques en solution ne sont donc pas assez proches pour qu'un FRET ait lieu.

Un signal fluorescent d'intensité conséquente a été observé aux longueurs d'onde d'émission de la rhodamine pour la formulation de Lp-PLL*-PGA* excitée à 543 nm, avec un pic d'émission à 580 nm qui correspond au maximum d'émission de la rhodamine. Un signal fluorescent de plus forte intensité a également été détecté aux longueurs d'onde d'émission de la fluorescéine (entre 500 et 650 nm) pour les formulations de Lp-PLL*-PGA* et de Lp-PLL-PGA* excitées à 488 nm, avec un pic d'émission à 514 nm pour la formulation de Lp-PLL*-PGA*, et à 516 nm pour la formulation de Lp-PLL-PGA*. Ces pics correspondent au maximum d'émission de la fluorescéine qui se situe en théorie à 518 nm. D'autre part, on constate que l'intensité de ce signal mesuré est quasiment équivalente de 500 à 560 nm pour les 2 formulations, mais qu'elle est cependant significativement plus importante de 570 à 650 nm pour la formulation de Lp-PLL*-PGA*. En effet, on observe un épaulement de la courbe Lp-PLL*-PGA* pour ces longueurs d'onde, qui correspondent aux longueurs d'onde d'émission de la rhodamine.

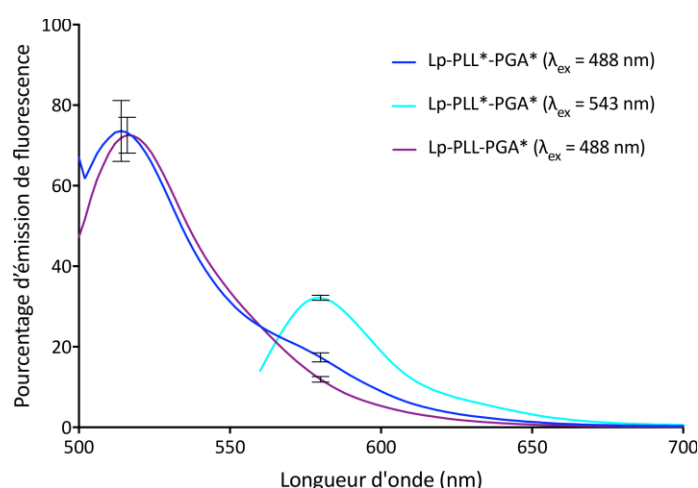


Figure 42 : Spectres d'émission des formulations de layersomes fluorescents aux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescéine (488 nm) et de la rhodamine (543 nm). Les écarts types sont uniquement représentés pour les maxima d'émission de fluorescence ($\lambda = 514 ; 516 \text{ nm}$ et 580 nm). Des intensités de fluorescence significativement différentes ont été observées entre 570 et 650 nm pour les formulations de Lp-PLL*-PGA* et de Lp-PLL-PGA* excitées à 488 nm. Les spectres d'émission ont été acquis à voltage constant (500 V) et une correction instrumentale a été effectuée. $n = 3$ pour chaque formulation.

Cet épaulement constaté reflète un transfert d'énergie entre la fluorescéine et la rhodamine des couches de polymères adsorbées à la surface des liposomes. Néanmoins, il est à noter

que cette différence observée n'est pas très importante, ce qui signifie que le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur est relativement faible.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la faible amplitude du signal obtenu. Au vu du faible greffage des polymères et de la dynamique du système nanoparticulaire en question, la probabilité de rencontre des 2 fluorophores est faible, ce qui pourrait expliquer ce faible transfert d'énergie. En effet, si on multiplie les taux de greffage respectifs de la PLL-rhodamine (3 %) et du PGA-fluorescéine (0,6 %), on note une probabilité de rencontre des 2 fluorophores de l'ordre de 180 ppm. D'autre part, il est possible que les fluorophores greffés aux polymères ne soient pas suffisamment proches pour la génération d'un transfert d'énergie conséquent. Enfin, au vu de l'environnement chimique particulier de la rhodamine, il est possible que l'émission de fluorescence de cette dernière soit perturbée. En effet, la rhodamine greffée à la PLL est localisée entre les liposomes et le PGA, lui conférant ainsi un microenvironnement tout à fait particulier avec une bicouche lipidique hydrophobe dans laquelle elle peut se loger. Cette hypothèse pourrait par ailleurs expliquer la différence d'émission de fluorescence observée pour les suspensions de Lp-PLL*-PGA* excitées à 488 et 543 nm. En effet, comme mentionné ci-avant, les intensités de fluorescence mesurées aux longueurs d'onde d'émission de la fluorescéine sont plus importantes que celles mesurées aux longueurs d'onde d'émission de la rhodamine.

D'autre part, comme un transfert d'énergie entre la fluorescéine et la rhodamine est constaté, on devrait observer pour la suspension de Lp-PLL*-PGA* des intensités de fluorescence légèrement moins importantes que pour la formulation contrôle aux longueurs d'onde proches du pic d'émission de la fluorescéine (518 nm). Néanmoins, comme les écarts types calculés à ces longueurs d'onde sont assez importants pour les formulations, il est difficile de conclure à une différence.

En conclusion, de la PLL et du PGA couplés à des fluorophores FRET-compatibles ont été synthétisés et ont été utilisés pour la formulation de layersomes fluorescents. Les spectres d'émission de fluorescence obtenus pour les formulations ont révélé un transfert d'énergie uniquement pour la formulation de Lp-PLL*-PGA*, témoignant d'une proximité suffisante entre les 2 couches de polymères pour l'établissement de ce transfert. Ce

transfert d'énergie observé (même faible) confirme donc le recouvrement LbL des liposomes.

1.7.2. Caractérisation du recouvrement par microbalance à quartz (QCM)

Principe de la QCM

La QCM est une méthode de quantification développée pour mesurer avec précision des masses de dépôt sur des surfaces de l'ordre de quelques nanogrammes à quelques microgrammes par cm^2 . Elle est basée sur l'utilisation d'une fine lame de cristal piézoélectrique (généralement du quartz). Le principe de la piézoélectricité repose sur le couplage entre un champ électrique et la déformation du matériau. Le cristal est composé de deux électrodes dont l'une d'entre elles correspond à une aire où l'échantillon à analyser est déposé (Figure 43A). La différence de potentiel entre les électrodes provoque un champ électrique dans le quartz, d'où un déplacement mécanique transversal (mouvement de cisaillement), qui engendre la propagation d'une onde acoustique. Une légère variation de masse d'une des électrodes induit une légère baisse de fréquence de résonance du quartz (Figure 43B).³³¹

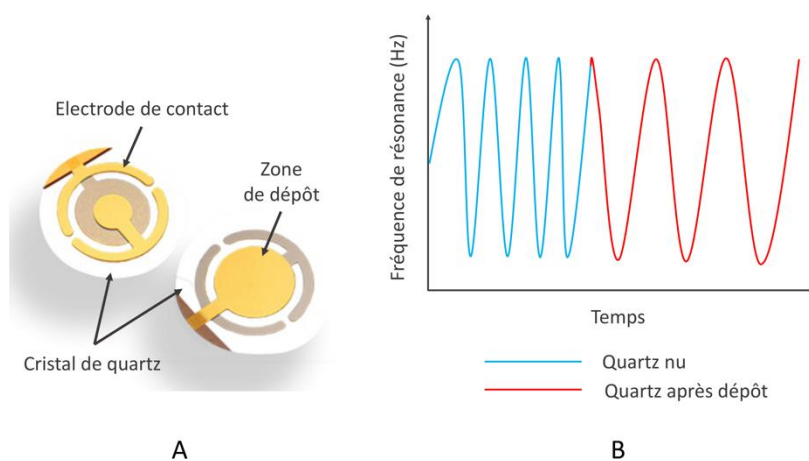


Figure 43 : Cristal de quartz piézoélectrique et représentation du changement de fréquence après dépôt sur un cristal de quartz. (A) : cristal de quartz ; (B) : Variation de la fréquence suite au dépôt.

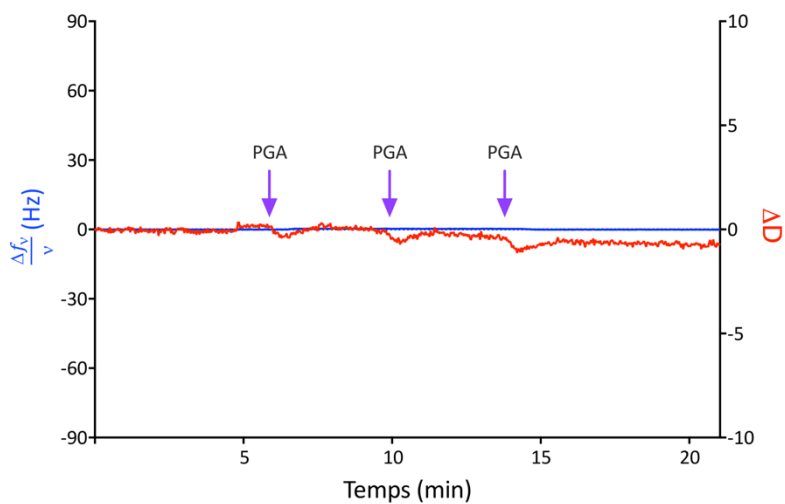
La technique de QCM a été originellement développée pour des mesures en phase gazeuse. Mais à partir des années 1980, cette technique a été étendue à la mesure des épaisseurs de films dans un environnement liquide. Aussi les propriétés viscoélastiques du

dépôt peuvent être évaluées par la mesure de l'amortissement des vibrations dû à la dissipation de l'énergie du film déposé : c'est la technique dite de "microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation" (QCM-D pour « Quartz Crystal Microbalance-Dissipation »). L'amortissement des vibrations est représenté par la mesure du facteur de dissipation D .³³² La QCM-D est couramment utilisée pour déterminer l'affinité de molécules pour un certain substrat, tel que pour les protéines, les virus ou encore des espèces polymériques. Elle est également utilisée pour suivre la fonctionnalisation de groupements chimiques des espèces déposées à la surface du cristal de quartz. C'est donc la technique la plus utilisée pour démontrer le recouvrement LbL de surfaces planes ainsi que de surfaces colloïdales.³³³ De plus, cette technique a déjà été employée pour la démonstration du recouvrement LbL de liposomes par des espèces polymériques.^{289,334,335}

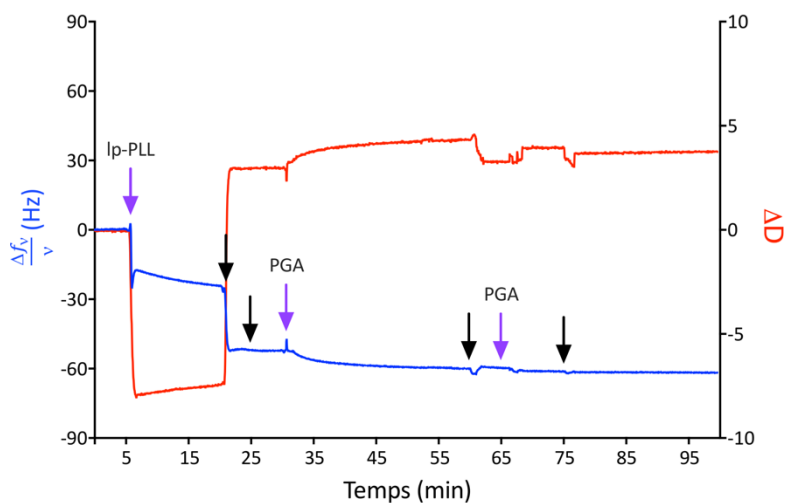
Caractérisation du recouvrement LbL de liposomes par QCM-D

Afin de caractériser le recouvrement LbL de nos liposomes, une expérience préliminaire de QCM-D a été réalisée. Pour ce faire, 400 μL de Lp-PLL à une concentration de 0,6 mM en PLL ont été injectés dans la cellule de mesure de la QCM-D contenant un cristal de quartz recouvert d'un fin film d'or (quartz-Au). Toutes les injections (Lp-PLL, PGA, tampon) sont réalisées à un débit uniforme de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après 15 min de contact avec le cristal, 2 lavages consécutifs de 5 min ont été effectués avec du tampon (HEPES 10 mM, NaCl 15 mM pH 7,4). Ensuite, 400 μL d'une solution de PGA à 0,1 mg/mL ont été injectés dans la cellule de mesure. Après 30 min de contact, un rinçage de 5 min a été effectué avec du tampon, puis 400 μL de la solution de PGA à 0,1 mg/mL ont été injectés dans la cellule. Après 10 min de contact, un lavage de 5 min a été effectué avec du tampon. En guise de contrôle, une solution de PGA à 0,1 mg/mL a été injectée à 3 reprises et à 4 min d'intervalle dans la cellule de mesure contenant un cristal de quartz-Au vierge. Les variations de la fréquence normalisée $\Delta f_\nu/\nu$ (où ν correspond à l'ordre de l'harmonique et est égal à 3) et de la dissipation mesurées pour l'échantillon de Lp-PLL ainsi que pour le contrôle (Figure 44A et B) mis en contact du cristal ont été représentées en fonction du temps d'acquisition.

Pour le contrôle (A), on constate que la fréquence d'oscillation normalisée du cristal ainsi que sa dissipation n'évoluent pas au cours du temps. Le PGA n'a donc pas été adsorbé à la surface du cristal de quartz-Au et ce, malgré l'ajout à 3 reprises de PGA. En revanche, on constate une évolution des valeurs de fréquence normalisées et de dissipation après mise en contact du cristal avec la suspension de Lp-PLL et la solution de PGA (entre 5 et 20 min), qui suggèrent un dépôt de matière à la surface du cristal (B). En effet, on note une diminution progressive de la fréquence normalisée durant la mise en contact des Lp-PLL avec le cristal, avec une fréquence normalisée de -18 Hz à $t \approx 5$ min et de -26 Hz à $t \approx 20$ min. Cette diminution de la fréquence normalisée laisse penser à une adsorption des Lp-PLL au cristal. Concernant la dissipation, on constate une diminution de 8 unités suite à la mise en contact du cristal avec les liposomes-PLL, ce qui est surprenant. En effet, dans le cas d'un dépôt de matière, on devrait observer une augmentation et non une diminution de la dissipation. De plus, on ne devrait pas observer de valeurs de dissipation inférieures à celles du cristal (inférieures à 0). Cette valeur de 8 unités est cependant faible et peut correspondre à un signal parasite dû à l'injection. Suite au premier rinçage ($t = 20$ min), on observe une nouvelle diminution de la fréquence normalisée à -52 Hz, accompagnée cette fois-ci d'une augmentation de la dissipation de 11 unités. Il semble donc que davantage de matière (potentiellement des Lp-PLL) se soit fixée au cristal suite à cette première étape de lavage, ce qui est peu commun car uniquement du tampon est injecté. En général, dans le cas du dépôt de protéines ou de polymères, une légère augmentation de la fréquence normalisée est observée suite à une étape de rinçage, traduisant l'élimination d'une partie du matériel ne s'étant pas fortement fixé au cristal.



A



B

Figure 44 : Variation de la fréquence d'oscillation normalisée $\Delta f_v/\nu$ (Hz ; avec $\nu = 3$) et de la dissipation d'énergie (ΔD) d'un cristal de quartz-Au après ajout d'une solution de PGA (contrôle) et après ajout d'une suspension de Lp-PLL ainsi que d'une solution de PGA. (A) : solution de PGA contrôle ; (B) : après ajout de la suspension de Lp-PLL et d'une solution de PGA. Les flèches mauves indiquent l'ajout de la suspension de Lp-PLL et de la solution de PGA et les flèches noires indiquent les lavages avec la solution tamponnée.

On note ensuite une diminution progressive de la fréquence normalisée durant la mise en contact de la solution de PGA avec le cristal, avec une fréquence normalisée de -55 Hz à $t \approx 30$ min et de -62 Hz à $t \approx 1$ h. Cette diminution de fréquence normalisée traduit une fixation de PGA probablement sur les Lp-PLL déjà déposés sur le cristal. En effet, nous avons montré à l'aide du contrôle que le PGA ne s'adsorbe pas directement à la surface d'un cristal nu, l'adsorption du PGA se fait donc sur la PLL portée par le liposome. Enfin, aucune variation significative de la fréquence normalisée et de la dissipation n'est constatée suite à l'étape de lavage et suite au nouvel ajout de la solution de PGA. Le PGA adsorbé au cristal y reste donc accroché malgré l'étape de lavage.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus pour cette expérience préliminaire laissent penser que les Lp-PLL ont potentiellement été adsorbés à la surface du cristal de quartz et que du PGA s'est à son tour assemblé à leur surface de façon progressive. Grâce à la constante de Sauerbrey qui est de $17,7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ pour le cristal utilisé, on peut calculer la masse de Lp-PLL et de PGA adsorbés par cm^2 , soit 460 ng de Lp-PLL/ cm^2 pour les Lp-PLL suite au premier dépôt et 177 ng de PGA/ cm^2 . Néanmoins, le rinçage lié au dépôt des Lp-PLL donne un signal difficilement interprétable. Nous avons pensé que ce signal pourrait refléter un éclatement des liposomes suite à leur adsorption au cristal. Cependant, le profil que nous obtenons ne correspond pas à celui décrit dans la littérature.^{336,337} En effet, dans le cas d'une adsorption suivie d'un éclatement des liposomes, une diminution de la fréquence normalisée accompagnée d'une augmentation de la dissipation est observée en premier lieu, reflétant la fixation de vésicules lipidiques intactes à la surface du cristal. Ensuite, une augmentation de la fréquence normalisée accompagnée d'une diminution de la dissipation est observée, témoignant de la rupture des liposomes et de la formation d'une bicouche lipidique plane à la surface du cristal (Figure 45). Il conviendra donc de réitérer cette expérience afin de pouvoir conclure de façon plus sûre quant à la fixation des liposomes-PLL à la surface d'un cristal de quartz-Au et quant à leur stabilité une fois déposés sur ce cristal.

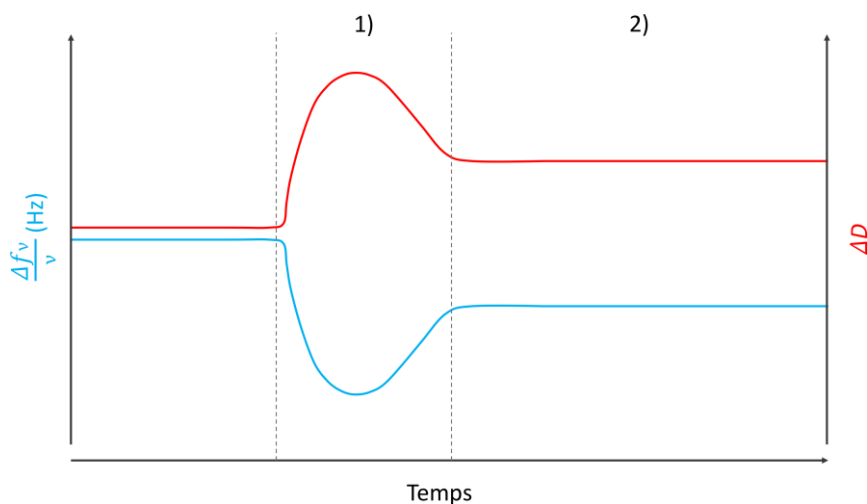


Figure 45 : Profil de variation la fréquence d'oscillation normalisée $\Delta f_v/v$ (Hz) et de la dissipation ΔD obtenu suite au dépôt de vésicules lipidiques à la surface d'un cristal de quartz et suite à leur rupture. (1) : suite au dépôt de vésicules lipidiques ; (2) : suite à leur rupture.

En conclusion sur cette première partie, une procédure de formulation a été développée et optimisée pour l'obtention de suspensions de layersomes. Des layersomes de première génération ont été développés et des études préliminaires de stabilité ont été effectuées et témoignent de leur stabilité à 4°C et en solution tamponnée (pH = 7,4) sur une échelle de 2 mois. Ces formulations de layersomes ont été caractérisées dans un premier temps par des mesures de DLS et de potentiel zêta, qui ont confirmé le recouvrement couche par couche des layersomes ainsi que leur homogénéité. En plus de cette technique, le recouvrement LbL a été démontré par une stratégie originale basée sur l'obtention d'un signal de FRET ainsi que par la microbalance à cristal de quartz, qui est une technique couramment employée pour caractériser les recouvrements de surface. Toutes ces expériences convergent vers la démonstration du recouvrement des liposomes comme attendu.

2. Développement et caractérisation de layersomes de deuxième génération

Dans le cas d'un recouvrement de surface, l'épaisseur et la réticulation des couches de polymères sont des paramètres importants qui peuvent avoir une influence sur la résistance du matériel recouvert et sa cinétique de dégradation^{290,318} Par conséquent, nous avons travaillé au développement et à la caractérisation d'une deuxième génération de layersomes recouverts de multiples couches de polyélectrolytes et de layersomes dont les couches de polymères ont été réticulées. Ces layersomes de deuxième génération par rapport à la première contiennent de la 5-(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) encapsulée dans le cœur aqueux des liposomes. Ce fluorophore hydrophile est classiquement utilisé pour l'évaluation de la perméabilité membranaire de liposomes. En effet, la 5(6)-CF est soumise à un phénomène de « quenching » lorsqu'elle est encapsulée à une concentration supérieure ou égale à 40 mM au sein des liposomes.³³⁸ En revanche, si elle est libérée suite à une déstabilisation ou une destruction de ces derniers, il n'y a plus de phénomène de « quenching » conduisant à une forte augmentation du signal de fluorescence. Pour la formulation de ces layersomes, des Lp-5(6)-CF avec une concentration en 5(6)-CF de 200 mM ont été préparés et ont été recouverts avec de la PLL et du PGA selon la même procédure de formulation que celle développée et optimisée pour l'obtention des layersomes de première génération.

2.1. Layersomes recouverts de 1 à 2 couches de polyélectrolytes

Les layersomes recouverts d'une couche (Lp-PLL) et de 2 couches de polyélectrolytes (Lp-PLL-PGA) formulés avec une concentration de 200 mM de 5(6)-CF présentent des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles mesurées pour les layersomes de première génération (Figure 33 et Figure 46). Nous avons cependant pu constater que les liposomes formulés avec 200 mM de 5(6)-CF présentent des diamètres moyens un peu plus élevés (≈ 80 nm) que ceux mesurés pour les liposomes formulés sans 5(6)-CF (≈ 60 nm). Il est donc possible de formuler des layersomes contenant jusqu'à 200 mM de 5(6)-CF et présentant des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles mesurées pour les layersomes formulés sans ce fluorochrome.

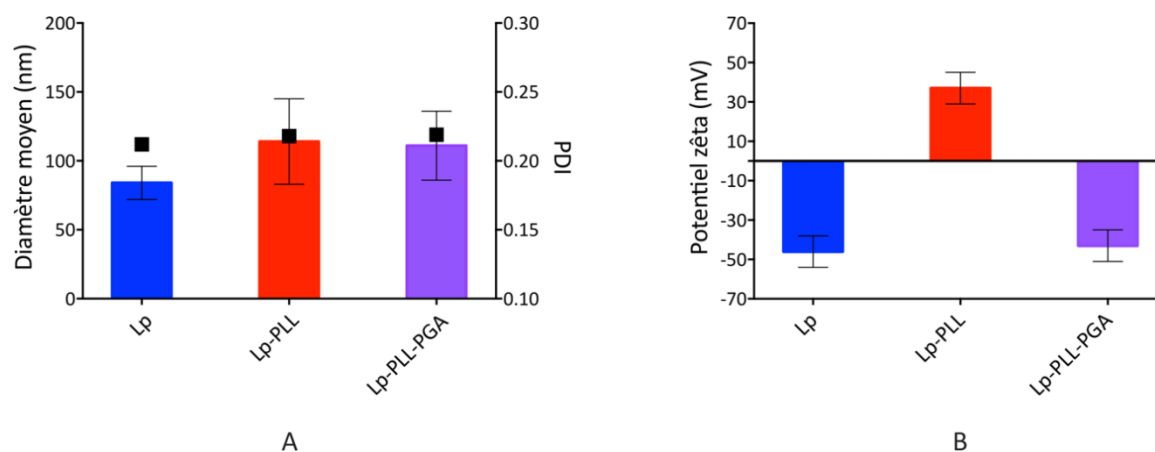


Figure 46 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL et Lp-PLL-PGA). (A) : diamètres moyens et indices de polydispersité (PDI) ; (B) : potentiels zêta. n > 5.

2.2. Layersomes recouverts de 3 à 6 couches de polyélectrolytes

Afin de formuler des layersomes recouverts de plus de 2 couches de polymères, la procédure de formulation développée et optimisée pour l'obtention des layersomes de première génération a dû être ajustée. En effet, nous avons constaté qu'il est nécessaire de procéder à une dialyse de 36 h contre du tampon entre l'ajout de chaque bicouche de PLL et de PGA pour pouvoir déposer des couches de polymères supplémentaires, sans quoi une précipitation des formulations a lieu de façon systématique. En appliquant cette étape de dialyse entre l'ajout de chaque bicouche de PLL et de PGA, nous avons pu formuler des liposomes recouverts jusqu'à 6 couches de polyélectrolytes contenant 200 mM de 5(6)-CF que nous avons caractérisé par des mesures de DLS et de potentiel zêta (Figure 47).

D'après les profils de tailles obtenus, on constate que l'ajout de chaque bicouche de PLL et de PGA se traduit pour les 2 lots de formulations par une augmentation du diamètre moyen des suspensions, avec des diamètres allant jusqu'à ≈ 300 nm de diamètre pour les suspensions de layersomes recouvertes de 6 couches de polyélectrolytes. On constate également que l'ajout des couches de PLL occasionne systématiquement une augmentation du diamètre moyen des formulations, ce qui n'est pas toujours le cas pour l'ajout de PGA. En effet, des tailles similaires ont été mesurées avant et après l'ajout de la deuxième couche de PGA. Il est possible que l'ajout de cette deuxième couche à la surface des layersomes induise

une compaction de la couche inférieure de PLL, ce qui pourrait expliquer ce résultat. Enfin, on observe que les valeurs de PDI mesurées sont inférieures à 0,3 ($\approx 0,2$) pour toutes les suspensions préparées, ce qui traduit une monodispersité des formulations. D'après les profils de potentiels zêta obtenus, on constate que l'ajout de chaque couche de polymère se traduit par une inversion des valeurs de potentiel zêta. On note cependant une légère diminution des valeurs absolues de potentiel zêta mesurées en fonction du nombre de couches de polymères déposées.

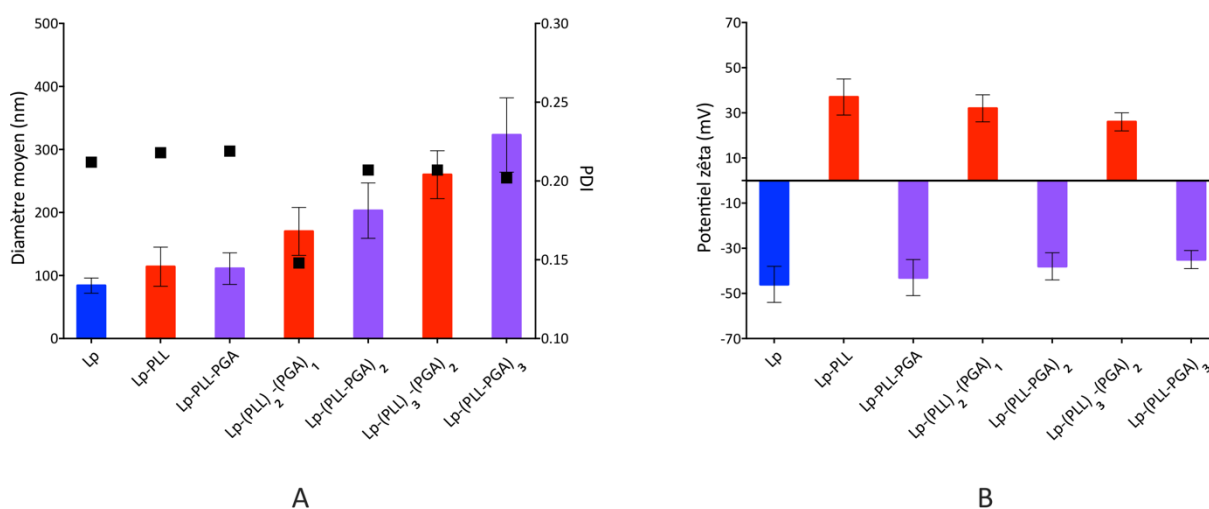


Figure 47 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-PLL_a-PGA_b). (A) : Diamètres moyens et indices de polydispersité (PDI) ; (B) : Potentiel zêta. n ≥ 3.

Les profils de tailles et de potentiels zêta ainsi obtenus traduisent bien le dépôt de 6 couches de polymères à la surface des Lp-5(6)-CF. De plus, les mesures de DLS effectuées ont montré que toutes les formulations de layersomes sont bien homogènes et présentent des tailles subnanométriques de 100 à 300 nm de diamètre.

2.3. Layersomes recouverts et réticulés

Afin de réticuler l'enveloppe polymérique adsorbée à la surface des liposomes, 2 stratégies de réticulation ont été identifiées, à savoir par ajout d'agents de couplage après la formulation, tels que le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC ; Figure 48A) et le sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS ; Figure 48B)³²²; et à l'aide d'une forme chimiquement réactive du PGA (PGA-sulfo-NHS ; Figure 48C).

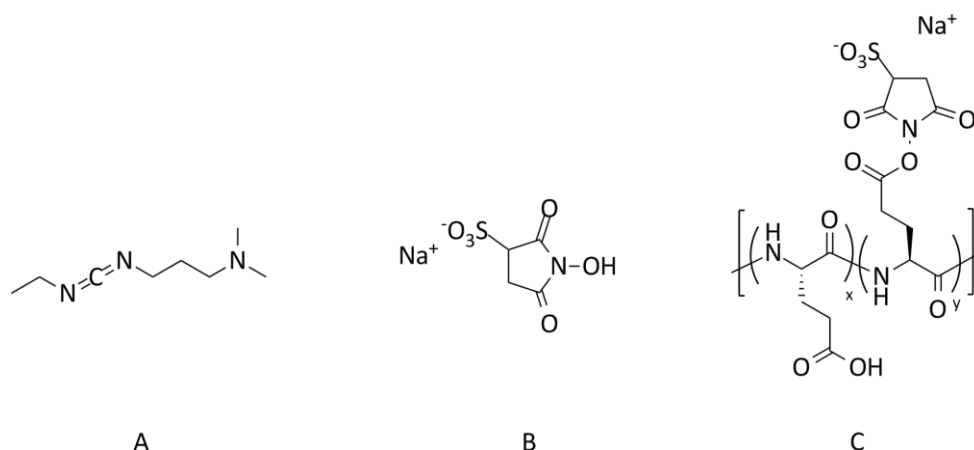


Figure 48 : Structures chimiques des agents de couplage ainsi que de la forme réactive du PGA employés pour la réticulation des lysosomes. (A) : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide ; (B) sulfo-N-hydroxysuccinimide ; (C) sulfo-succinimide d'ester d'acide poly(-L-glutamique). $n = x + y = 426$.

2.3.1. Avec des agents de couplage

Pour la réticulation à l'aide d'agents de couplage, des suspensions de layersomes recouvertes de 2 et 4 couches de polyélectrolytes contenant 200 mM de 5(6)-CF ont été formulées et des solutions d'EDC et de sulfo-NHS préparées extemporanément ont été ajoutées aux suspensions après formulation. Pour cette expérience, différents équivalents d'agents de couplage ont été explorés (Tableau 10). Ces équivalents ont été calculés par rapport à la quantité de PGA totale ajoutée lors de la formulation des layersomes. Des mesures de taille et de potentiel zêta des suspensions ont été effectuées 4 h suivant l'ajout des agents de couplage. Ces mesures ont révélé des diamètres ainsi que des valeurs de potentiel zêta identiques avant et après ajout des agents de réticulation. Trois hypothèses sont donc envisageables :

- la réticulation n'a pas eu lieu
- la réticulation n'a pas d'impact sur les caractéristiques physico-chimiques mesurées
- la technique employée n'est pas adéquate pour caractériser une réticulation

De plus, une fuite de 5(6)-CF a été constatée suite à l'ajout des agents de couplage pour la quasi-totalité des formulations de Lp-PLL-PGA ainsi que pour une des deux formulations de Lp-(PLL-PGA)₂. Au vu de la structure amphiphile de l'EDC, il est possible que ce dernier ait déstabilisé la bicouche lipidique des liposomes, ce qui pourrait expliquer la fuite de 5(6)-CF constatée. Comme l'ajout d'agents de réticulation aux suspensions de layersomes a induit pour la majeure partie des formulations une fuite de 5(6)-CF, cette stratégie de réticulation n'a pas été retenue pour la suite de nos travaux. Aucun travail de caractérisation supplémentaire ni d'optimisation n'a été entrepris pour ces suspensions.

Tableau 10 : Équivalents d'agents de couplage ajoutés aux formulations de layersomes-5(6)-CF recouverts de 2 (Lp-PLL-PGA) et de 4 couches (Lp-(PLL-PGA)₂) de polyélectrolytes pour 1 équivalent de PGA. $n \geq 2$.

Formulation	Équivalents d'agents de couplage ajoutés
Lp-PLL-PGA	0,5 éq. d'EDC et 0,03 éq. de sulfo-NHS
	1 éq. d'EDC et 0,4 éq. de sulfo-NHS
	2 éq. d'EDC et 2 éq. de sulfo-NHS
	10 éq. d'EDC et 4 éq. de sulfo-NHS
Lp-(PLL-PGA) ₂	0,5 éq. d'EDC et 0,03 éq. de sulfo-NHS

2.3.2. Avec une forme réactive du PGA

Synthèse du PGA-sulfo-NHS

Afin d'obtenir la forme chimiquement réactive du PGA, quelques ajustements ont été nécessaires. Dans un premier temps, nous avons ajouté 3 quantités différentes (0,5 ; 1 et 2 équivalents) d'EDC et de sulfo-NHS pour un équivalent de PGA. Avec 0,5 équivalent d'agents de couplage, un taux de greffage de 50 % a pu être déterminé par analyse du spectre ¹H RMN du produit obtenu (Figure 49).

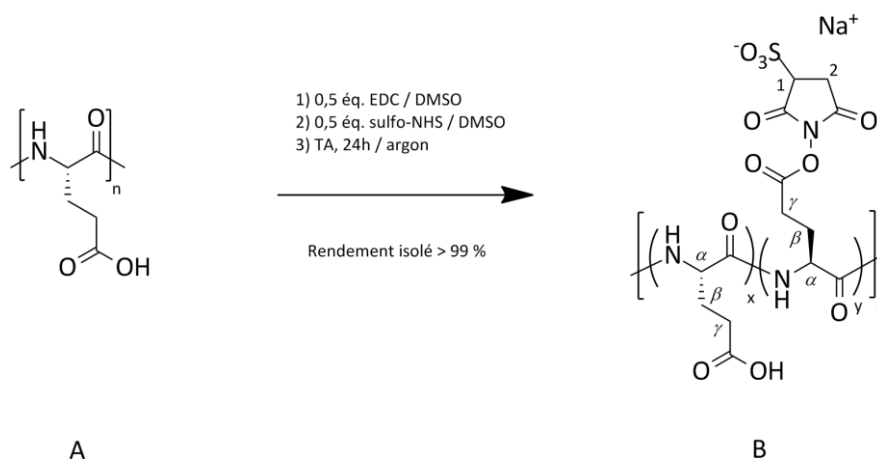


Figure 49 : Synthèse du PGA-sulfo-NHS à partir de la forme acide du PGA, d'EDC et de sulfo-NHS. (A) : PGA ; (B) : PGA-sulfo-NHS. $n = x + y$; $n = 426$, $x = y = 213$.

En effet, les signaux distinctifs du PGA (H_{α} : 4,43 – 4,58 ppm ; NH_{α} : 8,00 – 8,76 ppm) et du sulfo-NHS (H_1 : 4,33 – 4,38 ppm ; H_2 : 3,03 – 3,09 ppm) ont été observés et intégrés. En revanche, avec davantage d'équivalents d'agents de couplage, une disparition des signaux du PGA a été constatée. Il est possible qu'avec plus de 0,5 équivalents d'agents de réticulation, le produit ait été modifié à un taux > 50 % et que ces modifications aient changé son profil de solubilité dans l'eau. En effet, le produit trop greffé a pu être éliminé durant sa trituration dans l'acétone, ce qui pourrait expliquer la disparition de ses signaux du spectre RMN. L'analyse du spectre RMN du produit a également révélé la présence d'EDC résiduel (1,87 – 1,95 ppm et 3,10 – 3,19 ppm). Afin d'éliminer les traces d'EDC restantes, une purification rapide d'une partie du produit obtenu sur résine de chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée. Cependant, cette séparation sur colonne n'a pas permis d'éliminer l'EDC résiduel. En effet, les signaux de l'EDC étaient toujours détectables par 1H RMN suite à cette étape de purification. Le reste du produit n'a donc pas été purifié et a été conservé à $-20^{\circ}C$, sous argon et protégé de l'humidité avant utilisation.

Formulation des layersomes recouverts et réticulés avec du PGA-sulfo-NHS

Pour cette deuxième stratégie de réticulation, des suspensions de Lp-PLL contenant de la 5(6)-CF à 200 mM ont été préparées à une concentration de 0,6 mM en PL et ont été versées goutte à goutte dans une solution de PGA-sulfo-NHS de quantité molaire équivalente à celle du PGA classiquement utilisé. Des mesures de DLS et de potentiel zêta

ont été effectuées 4 h après l'ajout du PGA-sulfo-NHS. Des profils de taille et de potentiel zêta similaires à ceux des formulations de Lp-PLL-PGA non réticulés ont été obtenus, avec des tailles un peu plus importantes que celles mesurées pour les Lp-PLL-PGA suite à l'ajout de PGA-sulfo-NHS (Figure 50). Ces profils confirment l'adsorption du PGA-sulfo-NHS à la surface des Lp-PLL. Contrairement aux layersomes réticulés avec des agents de couplage, aucune fuite de 5(6)-CF n'a été détectée pour ces formulations. Leur résistance pourra ainsi être évaluée. C'est donc la stratégie de réticulation à l'aide de la forme chimiquement réactive du PGA (PGA-sulfo-NHS) qui a été retenue pour la suite de nos travaux.

Nous avons ensuite tenté de formuler des layersomes-5(6)-CF recouverts de plusieurs couches de polyélectrolytes (> 2 couches) avec la PLL et le PGA-sulfo-NHS. Pour ce faire, la même procédure de formulation que celle développée pour les layersomes multicouches a été mise en œuvre. Cependant, une opacification suivie d'une précipitation des suspensions a été observée suite à l'ajout de la troisième couche de PLL aux Lp-PLL-PGA-sulfo-NHS. De plus, des mesures de taille et de potentiel zêta de ces suspensions ont révélé des tailles proches du micron ainsi que des potentiels zêta négatifs. Il n'est donc pas possible de réticuler des layersomes multicouches avec du PGA-sulfo-NHS en employant la procédure de formulation développée et optimisée pour l'obtention de layersomes recouverts de plusieurs couches de polymères.

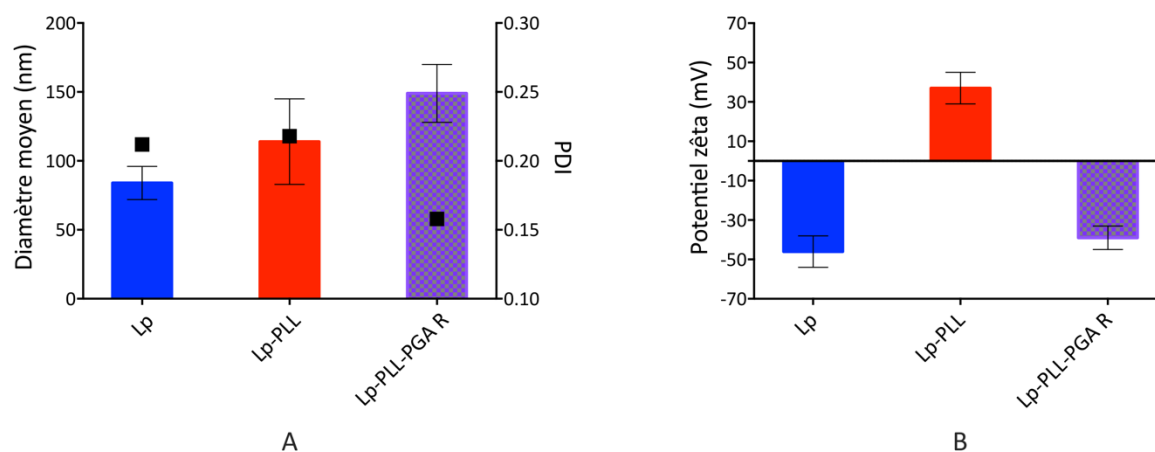


Figure 50 : Caractéristiques physico-chimiques des formulations de liposomes (Lp) et de layersomes recouverts d'une couche de PLL (Lp-PLL) et d'une deuxième couche de PGA-sulfo-NHS (Lp-PLL-PGA R). (A) : Diamètres moyen et indices de polydispersité (PDI) ; (B) : potentiels zêta. n > 5.

2.4. Évaluation de la stabilité en milieu tamponné des layersomes de deuxième génération

La stabilité des layersomes de deuxième génération a été évaluée en milieu tamponné sur un intervalle de 2 mois. Pour ce faire, des mesures de taille et de potentiel zêta des formulations conservées à 4°C ont été effectuées toutes les 2 semaines et les résultats obtenus ont été comparés. Des mesures de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission de la fluorescéine (518 nm) et à voltage constant ont également été effectuées afin de confirmer l'étanchéité membranaire des suspensions. Pour toutes les formulations, les mêmes caractéristiques physico-chimiques (taille et potentiel zêta) ont été mesurées pendant toute la durée de l'étude (non transmis). Les mesures de fluorescence ont révélé des profils de stabilité similaires à celui des liposomes. En effet, un signal fluorescent de même intensité a été mesuré pendant toute la durée de l'étude pour les layersomes recouverts de 2 couches réticulées et non réticulées ainsi que pour les layersomes recouverts de 4 couches de polymères, témoignant de la stabilité et de l'étanchéité membranaire sur une échelle de 2 mois. Au-delà de 2 mois de conservation, une augmentation progressive du signal fluorescent a été constatée pour ces formulations de layersomes comme pour les liposomes, indiquant une libération progressive de 5(6)-CF. En revanche, pour les formulations de layersomes recouvertes de 6 couches de polymères, une augmentation progressive de l'intensité du signal fluorescent a été constatée à partir d'un mois, témoignant de la libération de 5(6)-CF. Il est possible qu'à partir de 6 couches déposées à la surface des liposomes, ces derniers soient déformés et déstabilisés, ce qui pourrait expliquer cette fuite anticipée de 5(6)-CF pour ces formulations.

À l'exception de la formulation de layersomes recouverte de 6 couches de polymères, toutes les suspensions de layersomes développées sont tout autant stables que les liposomes sur une échelle de 2 mois.

2.5. Évaluation de la capacité d'encapsulation de 5(6)-carboxy-fluorescéine des layersomes de deuxième génération

Afin de pouvoir évaluer la capacité d'encapsulation de 5(6)-CF des différentes formulations développées, des mesures de fluorescence ont été effectuées à voltage constant avant et après leur destruction. Pour la destruction des liposomes et des layersomes, 5 μ L de Triton™ X-100 ont été ajoutés à 600 μ L de chaque suspension (à 0,008 mM de PL) et leur dégradation a ensuite été confirmée par des mesures de DLS. La libération de 5(6)-CF est exprimée par un ratio R d'après la formule :

$$R = \frac{F_{max} - F_0}{F_{max}}$$

où F_{max} correspond au signal fluorescent maximum mesuré après destruction totale et F_0 au signal fluorescent initial mesuré avant destruction (Tableau 11).³¹⁹ Plus les valeurs R calculées sont élevées, plus la quantité de 5(6)-CF encapsulée est importante.

Tableau 11 : Ratios moyens de libération de 5(6)-CF calculés pour les formulations de liposomes (Lp) et de layersomes (Lp-(PLL-PGA)_a) de deuxième génération. Lp-PLL-PGA R : layersomes réticulés. n = 3.

Formulation	Ratio moyen
Lp	0,91 \pm 0,01
Lp-PLL-PGA	0,86 \pm 0,01
Lp-PLL-PGA R	0,92 \pm 0,01
Lp-(PLL-PGA) ₂	0,85 \pm 0,002
Lp-(PLL-PGA) ₃	0,80 \pm 0,05

On peut constater que le ratio calculé pour les formulations de layersomes recouverts de 2 couches réticulées est équivalent à celui des formulations de liposomes. Les ratios calculés pour les autres formulations de layersomes sont cependant légèrement inférieurs à ceux des liposomes. Moins de 5(6)-CF a donc été encapsulée dans ces formulations. Il est possible que l'ajout des couches de polyélectrolytes à la surface des

liposomes ait déstabilisé la bicouche au moment de la formulation, ce qui pourrait expliquer cette petite différence.

En conclusion sur cette deuxième partie, des layersomes de deuxième génération ont été développés et caractérisés. Ces layersomes diffèrent de ceux de première génération par l'ajout de couches de polymères supplémentaires et par la réticulation de certaines de leur couches ainsi que par l'encapsulation d'une molécule fluorescente, la 5(6)-CF. En effet, ces formulations ont été développées dans l'objectif de mener des études de résistance et de stabilité en milieux simulés, d'où l'encapsulation de ce fluorophore. Comme pour les layersomes de première génération, ces suspensions ont été caractérisées par des mesures de DLS et de potentiel zêta qui témoignent de l'ajout de couches supplémentaires ainsi que d'une bonne homogénéité, même pour les formulations les plus complexes. Les taux d'encapsulation de 5(6)-CF ont pu être comparés entre les différentes formulations et témoignent d'une bonne capacité d'encapsulation. Enfin, des études de stabilité en conditions tamponnées témoignent d'une bonne conservation des suspensions lorsqu'elles sont placées à 4°C (1 mois au minimum).

3. Évaluation de la stabilité des layersomes de deuxième génération

Une fois nos layersomes de deuxième génération développés et caractérisés, nous avons procédé à une évaluation préliminaire de leur stabilité en présence d'éléments déstabilisants. Dans un premier temps, nous avons étudié la résistance des layersomes en présence d'un détergent, le Triton™ X-100. Ensuite, leur résistance a été étudiée en présence d'éléments déstabilisants que l'on retrouve dans le système digestif, puis en présence de plasma humain.

3.1. Évaluation de la résistance des layersomes en présence d'un détergent

Dans un premier temps, nous avons comparé la résistance des layersomes développés à celle des liposomes en présence d'un détergent non-ionique, l'éther de polyéthylèneglycol octylphényle (Triton™ X-100), (Figure 51). Ce détergent synthétique est

classiquement utilisé pour perméabiliser les membranes biologiques et induit une déstabilisation rapide des liposomes à de faibles concentrations.

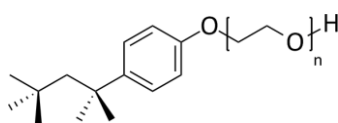


Figure 51 : Structure de l'éther de polyéthylène glycol octylphényle (Triton™ X-100). $n = 9 - 10$.

Pour cette étude, des concentrations croissantes de Triton™ X-100 ont été rajoutées à 600 μL des suspensions de liposomes et de layersomes chargés en 5(6)-CF à une concentration de 0,008 mM en PL. Des mesures de fluorescence ont été effectuées à voltage constant avant et après mise en contact du détergent afin d'évaluer le pourcentage de 5(6)-CF libérée (Figure 52).

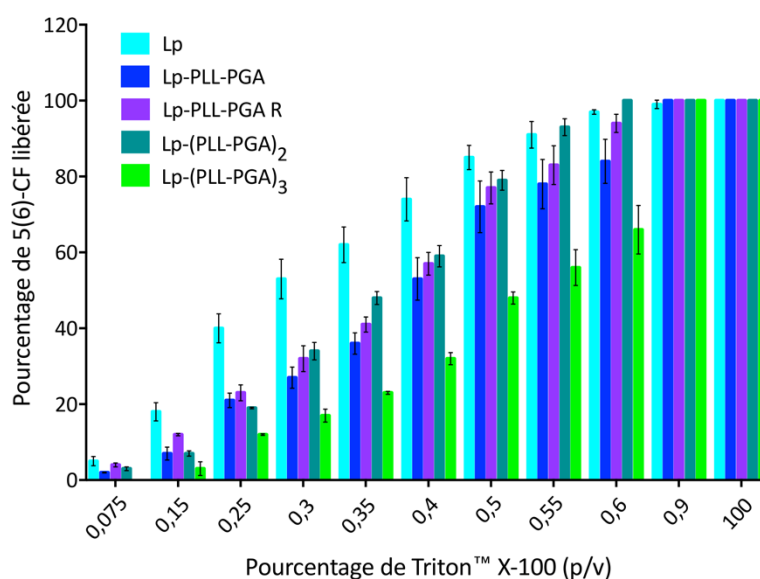


Figure 52 : Pourcentage de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) libérée des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de concentrations croissantes de Triton™ X-100. Lp : liposomes ; Lp-PLL-PGA : layersomes ; Lp-PLL-PGA R : layersomes 2 couches réticulés. Les concentrations de Triton™ X-100 sont exprimées en pourcentage (p/v). $n = 3$.

D'après la Figure 52, on peut constater que les Lp-PLL-PGA réticulés et non réticulés ainsi que les Lp-(PLL-PGA)₂ relarguent significativement moins de 5(6)-CF que les liposomes à des concentrations en Triton™ X-100 allant de 0,075 % à 0,5 % (p/v). Au-delà de ces

concentrations, le pourcentage de 5(6)-CF libéré est équivalent à celui mesuré pour les liposomes. Ces formulations de layersomes sont donc plus résistantes à de faibles concentrations de Triton™ X-100. Pour la formulation de Lp-(PLL-PGA)₃, on constate que les pourcentages de 5(6)-CF libérée sont encore moins importants que pour les autres formulations de layersomes à des concentrations en Triton™ X-100 allant de 0,075 à 0,6 %. Néanmoins, cette formulation relargue l'intégralité de la 5(6)-CF encapsulée à des concentration de 0,9 % de Triton X-100. Les formulations de layersomes recouvertes de 6 couches de polyélectrolytes résistent donc mieux que les liposomes et les autres formulations de layersomes à de faibles concentrations de ce détergent.

En conclusion, l'ajout de couches de polymères à la surface des liposomes permet d'augmenter leur résistance en présence de faibles concentrations de Triton™ X-100 par rapport aux liposomes conventionnels. En effet, une résistance accrue est constatée dès l'ajout de 2 couches de polymères et est renforcée par l'ajout de 4 couches complémentaires. Il est néanmoins surprenant d'observer les mêmes profils de relargage pour les formulations de layersomes réticulés et recouverts de 4 couches de polymères que pour les layersomes recouverts de 2 couches non réticulées. En effet, on s'attendait à observer une meilleure résistance pour ces 2 formulations que pour la formulation de Lp-PLL-PGA. Il semble donc que la réticulation des structures (50 % de réticulation théorique) ainsi que l'épaisseur gagnée suite à l'ajout de la troisième et de la 4^{ème} couche de PLL et de PGA ne soient pas suffisantes pour induire une meilleure résistance au Triton™ X-100 que pour les layersomes recouverts de 2 couches. De plus, il est à noter que ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus lors des travaux préliminaires de formulation.³¹⁹ En effet, une résistance totale ($R = 0$) a été observée pour les formulations de Lp-PLL-PGA suite à l'ajout de Triton™ X-100 à des concentrations équivalentes à celles que nous avons employées pour cette étude.

3.2. Évaluation de la résistance des layersomes en présence d'éléments déstabilisants du système digestif

Ensuite, nous avons procédé à l'évaluation de la résistance des formulations de layersomes développées en présence d'éléments déstabilisants que l'on retrouve en

proportions non négligeables dans le système digestif, à savoir : les phospholipases et les acides biliaires.

3.3. En présence d'acide taurocholique

Les acides biliaires sont formés à partir de dérivés du cholestérol et de stéroïdes acides et se trouvent principalement dans la bile des mammifères. Ces acides permettent la fragmentation de grosses unités lipidiques provenant de l'alimentation en microgouttelettes par émulsification, facilitant ainsi la digestion des lipides par les lipases. L'acide taurocholique est un des acides biliaires les plus couramment retrouvés dans la bile humaine.^{339–341} De plus, cet acide biliaire est classiquement retrouvé à de faibles concentrations dans les milieux digestifs simulés employés pour l'évaluation de la stabilité de formulations médicamenteuses.³⁴² C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité évaluer la stabilité et la résistance de nos layersomes en présence de cet acide biliaire utilisé sous forme de sel sodique (Figure 53).

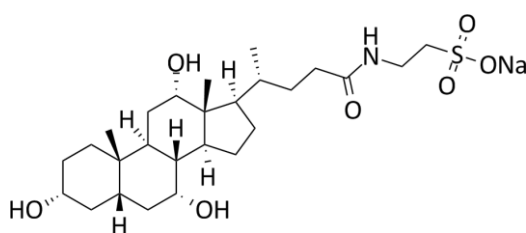


Figure 53 : Structure du taurocholate de sodium.

Pour ce faire, des concentrations croissantes de taurocholate de sodium ont été rajoutées à 600 μ L des suspensions de liposomes et de layersomes à une concentration de 0,008 mM en PL. Des mesures de fluorescence ont été effectuées à voltage constant avant et après mise en contact du sel biliaire afin d'évaluer le pourcentage de 5(6)-CF libérée (Figure 54). Il est à noter que les formulations de Lp-(PLL-PGA)₃ n'ont pas été évaluées pour cette étude.

D'après la Figure 54, on peut constater que toutes les formulations de layersomes évaluées présentent un profil de libération de 5(6)-CF équivalent à celui des liposomes nus. Les layersomes 2 couches réticulés et non réticulés ainsi que les layersomes 4 couches ne

sont donc pas plus résistants que des liposomes en présence de ce sel biliaire. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où une résistance a été observée pour le Triton™ X-100. Il est possible qu'au vu de sa charge négative et de la présence de groupements hydroxyles donneurs de liaisons hydrogènes, le taurocholate pénètre mieux les couches de polymères adsorbées à la surface des liposomes que le Triton™ X-100 (qui est un détergent non-ionique), ce qui pourrait expliquer ce résultat.

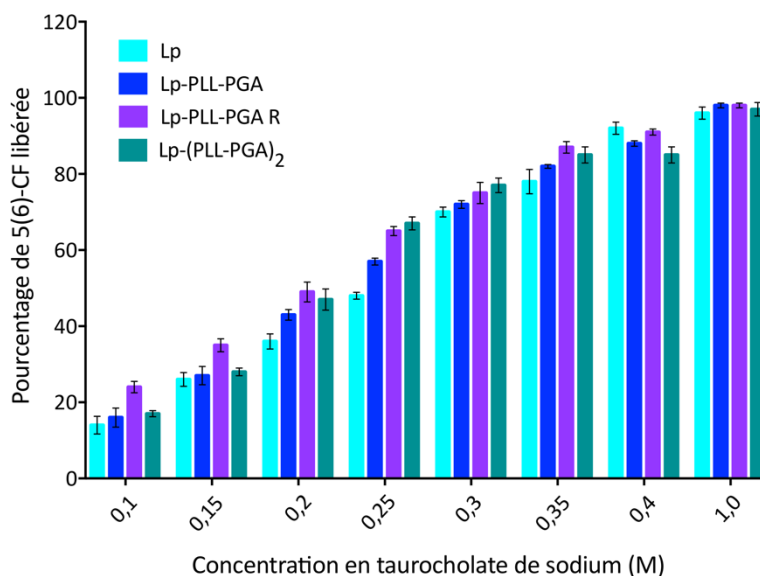


Figure 54 : Pourcentage de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) libérée des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de concentrations croissantes de taurocholate de sodium. Lp : liposomes ; Lp-PLL-PGA : layersomes ; Lp-PLL-PGA R : layersomes 2 couches réticulés. Les concentrations de taurocholate de sodium sont exprimées en pourcentage (p/v). n = 3.

3.3.1. En présence de phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides en acides gras et en d'autres substances lipophiles. Ces enzymes sont réparties en 4 catégories en fonction du type de réaction qu'elles catalysent. Les phospholipases de type A clivent la chaîne acyle qui estérifie la fonction alcool primaire (A₂) ou la fonction alcool secondaire (A₁) du résidu glycérol. Les phospholipases B présentent l'activité enzymatique des phospholipases de type A₁ et A₂. Les phospholipases C hydrolysent la liaison ester entre le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphate d'alcool. Enfin, les phospholipases D hydrolysent la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et de

l'alcool, libérant un acide phosphatidique et un alcool (Figure 55). Ces enzymes sont présentes dans les milieux biologiques et notamment au niveau de l'intestin où elles participent à la digestion des lipides. En présence de ces enzymes, les liposomes sont rapidement déstabilisés et relarguent leur contenu. C'est la raison pour laquelle nous avons procédé à l'évaluation de la résistance de nos layersomes en présence de 2 types de phospholipases, à savoir une phospholipase de type A₂ issue de venin d'abeille (sPLA₂) et de type C (PLC) issue de la bactérie *Clostridium perfringens*. Pour cette étude, quelques microlitres d'enzymes ont été ajoutés à 1 mL des suspensions de liposomes et de layersomes à une concentration de 0,008 mM en PL. Des mesures de fluorescence ont été effectuées à voltage constant et à intervalles de temps réguliers pendant l'incubation avec les enzymes afin d'évaluer le pourcentage de 5(6)-CF libérée (Figure 56). Il est à noter que la formulation de Lp-(PLL-PGA)₃ a seulement été évaluée en présence de sPLA₂.

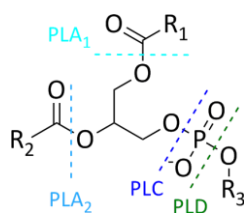
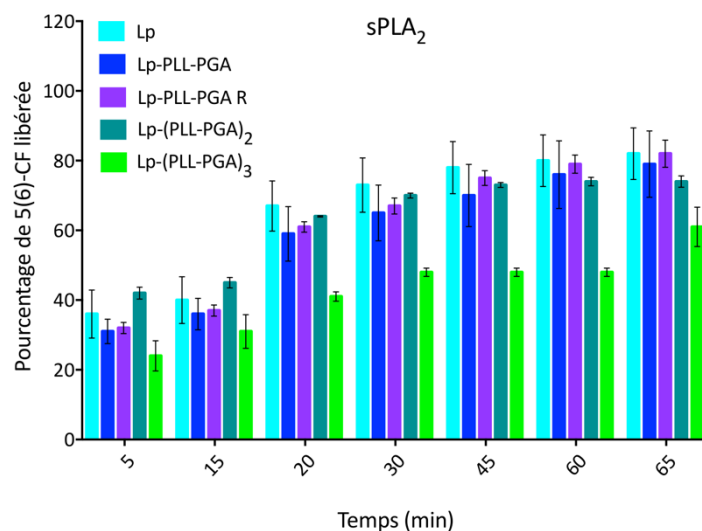
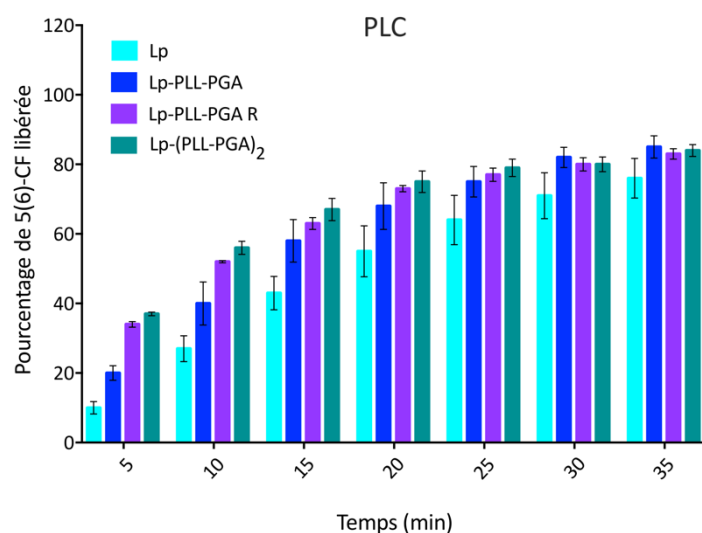


Figure 55 : Site de clivage des phospholipases de type A1, A2, C et D. Les phospholipases B présentent l'activité enzymatique des phospholipases de type A1 et A2.

D'après la Figure 56A, on constate que les layersomes recouverts de couches de polyélectrolytes réticulées et non réticulées ainsi que les layersomes recouverts de 4 couches de polymères présentent une cinétique de libération de 5(6)-CF similaire à celle des liposomes. Ces formulations de layersomes ne sont donc pas plus résistantes que les liposomes en présence de cette phospholipase de type A. Néanmoins, on constate que les layersomes recouverts de 6 couches relarguent significativement moins de 5(6)-CF que les autres formulations. Ces suspensions de layersomes sont donc un peu plus résistantes que les liposomes en présence de cette enzyme. D'après la Figure 56B, on constate que toutes les formulations de layersomes évaluées relarguent un peu plus de 5(6)-CF au cours du temps que les liposomes. Ces formulations sont donc un peu moins résistantes que les liposomes en présence de phospholipase C.



A



B

Figure 56 : Cinétique de libération de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de phospholipase de type A2 (sPLA₂) et de phospholipase de type C (PLC). (A) : en présence de sPLA₂ ; (B) : en présence de PLC. Lp : liposomes ; Lp-PLL-PGA : layersomes ; Lp-PLL-PGA R : layersomes 2 couches réticulés. 1 μL de sPLA₂ (0,021 U/mL) a été ajouté à 1 mL de suspension (0,008 mM de phospholipides) à t = 0 min et t = 15 min. 1 μL de PLC (10–50 U/mg) a été ajouté à 1 mL de suspension (0,008 mM de phospholipides) à t = 0. n = 3.

En conclusion, l'ajout de 2 couches réticulées et non réticulées ainsi que l'ajout de 4 couches de polyélectrolytes à la surface des liposomes n'ont pas permis d'augmenter la stabilité de ces derniers en présence des phospholipases A₂ et C. Les enzymes parviennent

donc à traverser les couches de polyélectrolytes pour hydrolyser leur substrat. Néanmoins, les formulations de layersomes recouvertes de 6 couches de polymères ont montré une meilleure résistance que les liposomes en présence de sPLA₂. Il semble donc qu'une épaisseur de polymères conséquente soit nécessaire pour ralentir l'enzyme.

3.3.2. En présence de plasma

Le plasma correspond à la partie liquide du sang dans lequel les globules rouges et les plaquettes sont en suspension et constitue 55 % du volume sanguin total. L'extraction du plasma est effectuée par centrifugation du sang total. Il est composé à 91 % d'eau et contient une grande variété de solutés, dont des oligo-éléments, des ions, des acides aminés, des lipides, des glucides ainsi que des protéines plasmatiques. Les protéines plasmatiques les plus représentées sont l'albumine (> 50 %), les immunoglobulines (≈ 20 %) les lipoprotéines de basse (LDL) et de haute densité (HDL), (8 %), le fibrinogène (5 %), l'alpha 1-antitrypsine (4 %), l'alpha-2 macroglobuline (4 %) ainsi que la transferrine (3%). Il a été démontré que certaines de ces protéines plasmatiques telles que l'albumine et les lipoprotéines (LDL et HDL), s'adsorbent à la surface des liposomes et les déstabilisent très rapidement.¹⁸⁶ Nous avons donc souhaité évaluer la résistance de nos formulations de layersomes en présence de ces protéines plasmatiques. Pour cette étude, les différentes suspensions (0,05 mM de PL) ont été diluées au tiers dans du plasma humain et ont été incubées pendant 2 h à 37°C et sous agitation. Des mesures de fluorescence ont été effectuées à une concentration de 0,008 mM en PL, à voltage constant et à intervalles de temps régulier afin d'évaluer le pourcentage de 5(6)-CF libérée (Figure 57). Il est à noter que les formulations de Lp-(PLL-PGA)₃ n'ont pas été évaluées pour cette étude.

D'après la Figure 57, on constate que toutes les formulations de layersomes évaluées libèrent moins de 5(6)-CF que les formulations de liposomes et ce, sur toute la durée de l'étude. Les layersomes sont donc plus résistants que les liposomes nus en présence de plasma. Néanmoins, on peut constater que les pourcentages de 5(6)-CF libérée diffèrent d'une formulation de layersomes à une autre. En effet, on constate que les layersomes 4 couches sont les formulations les plus résistantes libérant le moins de 5(6)-CF dans le temps, alors que les layersomes recouverts de 2 couches réticulées sont les moins résistants. L'épaisseur des couches de polymères adsorbées semble être à l'origine de cette résistance

accrue. Il est assez surprenant d'observer que la réticulation n'a pas augmenté la résistance des structures. Il est possible que le taux de réticulation (50 %) ne soit pas assez important pour empêcher les protéines plasmatiques de passer au travers des couches de polymères, ce qui pourrait expliquer ce résultat.

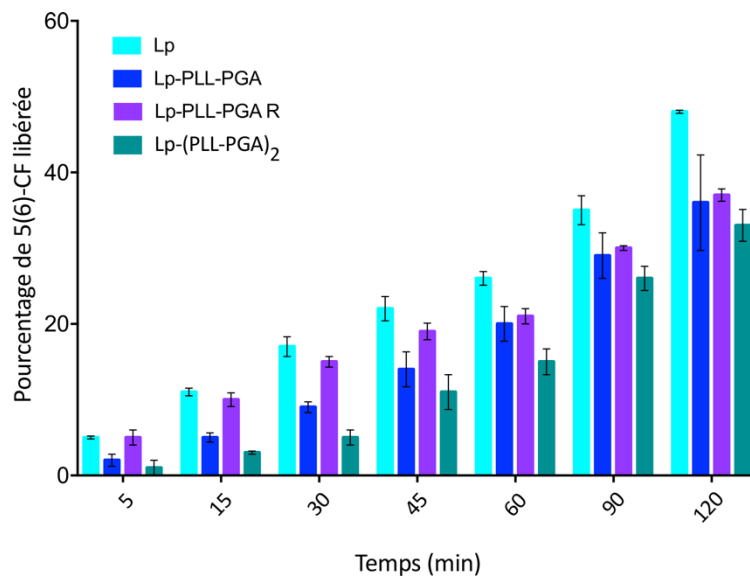


Figure 57 : Cinétique de libération de 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) des formulations de liposomes-5(6)-CF et de layersomes-5(6)-CF en présence de plasma humain. Lp : liposomes ; Lp-PLL-PGA : layersomes ; Lp-PLL-PGA R : layersomes 2 couches réticulés. n = 3.

En conclusion, les layersomes de deuxième génération ont pu être évalués en présence d'éléments déstabilisants auxquels sont confrontés les substances actives après une administration par voie orale ou systémique. Les layersomes développés ne sont pas plus résistants que les liposomes en présence de phospholipases et en présence de taurocholate de sodium. En revanche, ils ont montré une résistance accrue en présence de Triton™ X-100 et en présence de plasma.

4. Conclusion

En conclusion, une procédure de formulation de recouvrement LbL de liposomes utilisant deux espèces polymériques biocompatibles et biodégradables, la PLL (21 kD) et le PGA (64 kD), a été mise au point et optimisée. Cette procédure a permis de développer des layersomes de première génération recouverts de 2 couches de polymères ainsi que des layersomes de deuxième génération plus complexes (3 à 6 couches/réticulés) et optimisés pour l'évaluation de leur stabilité membranaire. Les layersomes de première génération ont été caractérisés par 3 techniques différentes (DLS, FRET et QCM) qui ont permis de confirmer le recouvrement LbL des liposomes. Les layersomes de deuxième génération ont quant à eux été caractérisés par des mesures de DLS, de potentiel zêta et de fluorescence, ce qui a permis de confirmer leur stabilité en condition tamponnée et de déterminer leur capacité d'encapsulation d'une molécule hydrophile. Enfin, les layersomes de deuxième génération ont été soumis à une évaluation préliminaire de leur stabilité et de leur résistance en présence d'éléments déstabilisants que l'on retrouve dans les milieux biologiques. Ces résultats préliminaires démontrent une résistance de certaines formulations de layersomes en présence de plasma ainsi qu'en présence d'un détergent non-ionique (Triton™ X-100). Néanmoins, les couches de polymères présentes à la surface des liposomes n'ont pas permis de d'augmenter la résistance de ces derniers en présence de phospholipases (A2 et C) et d'un sel biliaire (taurocholate de sodium).

Pour la suite de ces travaux, il serait intéressant dans un premier temps d'optimiser la procédure de formulation de layersomes réticulés afin d'atteindre des taux de réticulation plus conséquents et d'ainsi potentiellement augmenter la résistance des layersomes. L'utilisation de PGA-sulfo-NHS avec un taux de greffage supérieur à 50 % constitue une piste potentielle. D'autre part, il conviendra de confirmer la tendance observée pour le Triton™ X-100 avec d'autres détergents non-ioniques, tels que des polysorbates (Tween® 20) ou d'autres dérivés de poly(éthylène glycol) (Brij® 35). Enfin, il serait intéressant d'étudier la stabilité des layersomes en présence de milieux biologiques plus complexes, tel qu'en milieu gastrique et intestinal simulés.

C. Materials and methods

1. Materials

1.1. Chemicals

Solvents

Absolute anhydrous ethanol (EtOH; 524125) was purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Methanol $\geq 99.8\%$ (MeOH; 20864.320) and chloroform $\geq 99.8\%$ (CHCl₃; ACRO423550010) were purchased from VWR International (Radnor, USA). Anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) $\geq 99.9\%$ (276855) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). 2-propanol $\geq 99.5\%$ (GC) (33539) was purchased from Honeywell (Charlotte, USA).

Acids

Perchloric acid 70 % solution in water (223310010) was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA). Hydrochloric acid (HCl) $\geq 95\%$ (30721) and L-ascorbic acid crystalline $> 99\%$ (A5960) were purchased from Sigma-Aldrich.

Salts

Sodium chloride (NaCl) 98.5 – 100.5 % (27810-295) and sodium hydroxide (NaOH) 98.5 – 100.5 % (28244-295) were purchased from VWR International. Molybdic acid ammonium salt 81 – 83 % MoO₃ (M0878) and sodium taurocholate hydrate $\geq 97\%$ (86339) were purchased from Sigma-Aldrich.

Polymers

Poly(-L glutamic acid) sodium salt 64 kD (PGA; P4886) was purchased from Sigma-Aldrich. Poly(L-lysine) hydrobromide 21 kD (PLL 21 kD; PLKB100) was purchased from Alamanda Polymers Inc (Huntsville, USA).

Fluorescent dyes

Rhodamine B isothiocyanate mixed isomers (RBITC; R1755) was purchased from Sigma-Aldrich. 5-aminofluorescein (07980) was purchased from Honeywell. 5(6)-carboxy-fluorescein (5(6)-CF; 9953) was purchased from Eastman Chemical Company (Kingsport, USA).

Coupling agents

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC; E6383) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS; 56485) were purchased from Sigma-Aldrich and their purity exceeded 98 %. N-ethyl-diisopropylamine (DIEA; A11801) was purchased from Alfa Aesar (Wardhill, USA) and its purity exceeded 99 %.

Others

Potassium phosphate monobasic 99 % (KH_2PO_4 ; 424205000) was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA) and potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4 ; 26930-293) was purchased from VWR International. Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; TD303182) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid pufferan ≥ 99.5 % (HEPES; HN77.5) was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Polyethylene glycol octylphenyl ether (Triton™ X-100; X-100) was purchased from Sigma-Aldrich.

1.2. Lipids

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC; P3556) and cholesterol (Chol; recrystallized in MeOH; C8667) were purchased from Sigma-Aldrich. Egg yolk L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG; 841138P) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Lipid purities exceeded 99%. Lipids were stored under argon atmosphere at -20°C in a powder form or dissolved in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1 v/v) at a concentration of $\approx 25 \mu\text{mol/mL}$. Concentrations of phospholipid (PL) solutions were determined by molybdenum blue method for phosphate titration.

1.3. Buffers and solutions

Ultrapure water (18 mΩ) was obtained by an ELGA Labwater device from Veolia (Aubervilliers, France). The following buffers and solutions were prepared in our laboratory:

- 10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4, 0.22 μm filtered
- 10 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ 0.22 μm filtered
- 0.075 to 0.9 % Triton™ X-100 solutions
- 0.1 to 1.0 M sodium taurocholate solutions
- 1 M HCl
- 1 M NaOH

1.4. Dialysis and filtration

Millex-GP 0.22 μm poly(ethersulfone) (PES) sterile syringe filters (SLGP033NS) were purchased from Merck Millipore (Burlington, USA). Sephadex® G-75 GE Healthcare (GE17-0050-01) was purchased from Sigma-Aldrich. Spectra/Por™ 3 dialysis membranes of 3.5 kD (132725) and 5 mL Float-a-Lyzer® G2 dialysis devices of 100 kD (G235059) were purchased from Spectrum Labs Inc. (Phoenix, USA). 10 mL 8003 Amicon™ pressure concentrator (5125) and 25 mm diameter ultrafiltration discs of 100 kD (Ultracel regenerated cellulose, PLHK02510) were purchased from Merck. 15 mL Vivaspin Turbo protein concentrators of 100 kD (PES) were purchased from Sartorius (VS15T).

1.5. Enzymes and plasma

Secretory phospholipase A2 type III originating from bee venom (sPLA₂; 60500) was obtained from Bertin Bioreagent (Montigny le Bretonneux, France). Phospholipase C type I originating from *Clostridium perfringens* (P7633) was obtained from Sigma-Aldrich. A positive human plasma was provided by the Établissement Français du Sang (EFS).

2. Methods

2.1. Chemical syntheses

2.1.1. Synthesis and purification of PGA-sulfo-NHS

300 mg (2.0 mmol) of PGA sodium salt 64 kD were dissolved in 20 mL of ultrapure water and dialyzed overnight against 1.5 L of 0.1 M HCl using a 3.5 kD dialysis membrane (Spectra/Por 3, 132725, Spectrum Labs Inc., Phoenix, USA). After dialysis, 128 mg (1.0 mmol) of obtained solid were dried for 24 h. 30 mg (0.2 mmol) of dried PGA were dissolved in 0.6 mL of anhydrous DMSO. Either 22 and 23 mg (0.1 mmol), or 44 and 46 mg (0.2 mmol), or 88 and 92 mg (0.4 mmol) of EDC and sulfo-NHS respectively, were dissolved in 1.2 mL of anhydrous DMSO and added to the PGA solution. The reaction was left overnight under stirring and argon at room temperature. Then, the crude was washed in 40 reaction volumes (80 mL) of acetone to remove free EDC and sulfo-NHS and it was centrifuged for 10 min at 10 000 g (QIAGEN™ 4K15 centrifuge, 127173-6, Sigma-Aldrich). The supernatant was discarded. This washing process was repeated 4 times. The obtained product was dried overnight under vacuum. 40 mg of product were obtained and stored under argon atmosphere and protected from water at -20°C (Figure 58). An isolated yield $> 99\%$ was determined. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired using an Advance DPX 400 spectrometer (Bruker, Billerica, USA) and were analyzed using the MestReNova software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

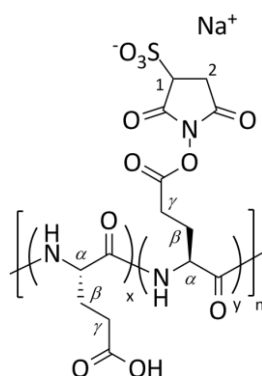


Figure 58 : PGA-sulfo-NHS structure. $n = x + y$. ^1H NMR, D_2O : $\delta(\text{ppm}) = 8.00 - 8.76$ (m, $\approx 1\text{H}$, NH), 4.43 – 4.58 (m, 1H, H_α), 4.33 – 4.38 (m, 1H, H_1), 3.03 – 3.09 (sd, 2H, H_2).

2.1.2. Synthesis and purification of PGA-fluorescein

105 mg (0.7 mmol) of PGA sodium salt were solubilized in 3 mL of 10 mM HEPES pH 6.5. 29 mg (0.15 mmol) of EDC and 3 mg (0.014 mmol) of sulfo-NHS solubilized in 150 and 50 μ L of 10 mM HEPES pH 6.5, respectively, were added to the PGA solution. The reaction was left under stirring at room temperature for 20 min. Then, 36 mg (0.1 mmol) 5-aminofluorescein were solubilized in 1.5 mL of anhydrous DMSO and added to the reaction. The reaction was left overnight under stirring and argon atmosphere, protected from light, and at room temperature. Afterwards, the obtained grafted PGA was precipitated in 20 mL of isopropanol and consequently centrifuged at 10 000 g for 10 min (QIAGEN™ 4K15 centrifuge, 127173-6, Sigma-Aldrich). The supernatant was discarded. This washing process was repeated 5 times. Then, PGA-fluorescein was solubilized in 10 mL of ultrapure water and dialyzed against 1.5 L of 150 mM NaCl overnight using a 3.5 kD dialysis membrane (Spectra/Por 3, 132725, Spectrum Labs Inc.). A second overnight dialysis against 1.5 L of ultrapure water was subsequently performed. The obtained product was lyophilized overnight. 76 mg of product were obtained and stored under argon atmosphere and protected from light and water at -20°C (Figure 59). An isolated yield of 72 % was determined.

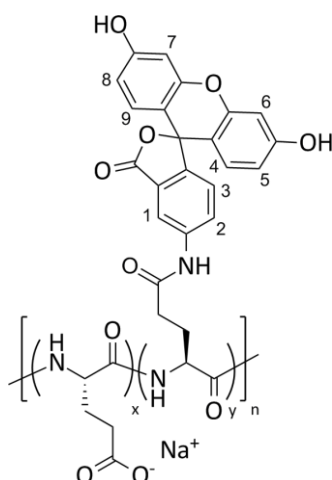


Figure 59 : PGA-fluorescein structure. $n = x + y$. The chemical functions are randomly distributed. ^1H NMR, D_2O : $\delta(\text{ppm}) = 2.21 - 2.58$ (m, 4H, H_β and H_γ), $4.18 - 4.43$ (s, 1H, H_α), $6.79 - 6.93$ (m, 4H, H_5 , H_6 , H_7 and H_8), $7.30 - 7.38$ (m, 3H, H_3 , H_4 and H_9), $7.76 - 7.80$ (s, 1H, H_2), $7.97 - 8.3$ (s, 1H, H_1).

2.1.3. Synthesis and purification of PLL 21 kD-rhodamine

42 mg (0.2 mmol) of PLL 21 kD were solubilized in 2 mL of anhydrous DMSO and 270 μ L (2 mmol) of DIEA were added to it. The reaction was placed under stirring at room temperature for 15 min. Then, 11 mg (0.02 mmol) of rhodamine B isothiocyanate (RBITC) were solubilized in 0.4 mL of anhydrous DMSO and added to the reaction. The reaction was left overnight under stirring and argon atmosphere, protected from light, and at room temperature. Afterwards, grafted PLL was precipitated in 20 mL isopropanol and consequently centrifuged at 10 000 g for 10 min (QIAGEN™ 4K15 centrifuge, 127173-6, Sigma-Aldrich). The supernatant was discarded. This washing process was repeated 5 times. Then, PLL-rhodamine was solubilized in 10 mL ultrapure water and dialyzed against 1.5 L of 150 mM NaCl overnight (3.5 kD dialysis membrane, 132725, Spectrum Labs Inc.). A second overnight dialysis against 1.5 L of ultrapure water was subsequently performed. The obtained product was lyophilized overnight. 32 mg of product were obtained and stored under argon atmosphere and protected from light and water at -20°C (Figure 60). An isolated yield of 90 % was determined.

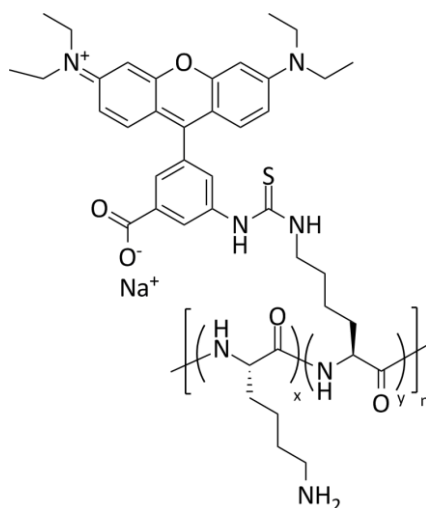


Figure 60 : PLL 21 kD-rhodamine structure. $n = x + y$. The chemical functions are randomly distributed.

2.1.4. Determination of grafting percentages

PGA-NHS

^1H NMR spectroscopy was used to assess the substitution degree (SD) of sulfo-NHS-ester-labeled PGA. For ^1H NMR spectroscopy, 5 mg of product were dissolved in 700 μL of deuterated water. The integration value of the H_α proton of PGA signal at $\delta = 4.43 - 4.58$ ppm was compared to that of sulfo-NHS H_2 proton at $\delta = 3.03 - 3.09$ ppm by the following equation:

$$SD(\%) = \frac{H_2 \text{ NHS}}{H_\alpha \text{ PGA}}$$

A grafting percentage of 50 % was determined for PGA-NHS synthesized with 0.5 eq. of EDC/sulfo-NHS. Fewer grafting percentages were obtained for PGA-NHS synthesized with either 1 or 2 eq. of EDC/sulfo-NHS.

PGA-fluorescein

^1H NMR spectroscopy was used to assess the grafting percentage of fluorescein-labeled PGA. For ^1H NMR spectroscopy, 5 mg of product were dissolved in 700 μL of deuterated water. The integration value of PGA H_α signal at $\delta = 4.18 - 4.43$ ppm was compared to that of 5-aminofluorescein H_2 at $\delta = 7.76 - 7.80$ ppm by the following equation:

$$SD(\%) = \frac{H_2 \text{ Amino-fluorescein}}{H_\alpha \text{ PGA}}$$

A grafting percentage of 0.6 % was determined for PGA-fluorescein.

PLL-rhodamine B

The grafting percentage of rhodamine-labeled PLLs were determined by absorbance using a standard curve and the Beer-Lambert law. ≈ 5 mg of rhodamine B were dissolved in 25 mL of MeOH and were diluted at 1/20, 1/25, 1/40, 1/100 and 1/200 in 0.1 M phosphate buffer pH 8. The absorbance values of all diluted solutions were recorded at 580 nm and plotted to determine the slope coefficient, which corresponds to rhodamine B extinction

coefficient (ϵ). At that wavelength, extinction coefficients of $\approx 40\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ were calculated. $\approx 3\text{ mg}$ of labeled PLL were then dissolved in either 3 or 6 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 8 and were diluted at 1/10 and 1/20 in the same buffer. Absorbance measurements were performed at 580 nm for both dilutions. Their rhodamine B concentration was calculated using their absorbance values and rhodamine B extinction coefficient. Grating percentages of $\approx 3\%$ were determined using the following equation:

$$SD(\%) = \frac{n_{\text{rhodamine B}}}{n_{\text{PLL}}}$$

2.2. Formulation of liposomal and layersomal suspensions

2.2.1. Liposomes formulation

Multilamellar vesicles (MLV) composed of PC, PG, Chol and DPG-mal anchor with the following molar ratios 54:13:33 were prepared by hydration of a lipidic film. The PL solubilized in a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ mixture (9/1 v/v) were deposited in round-bottom Pyrex[®] tubes and their solvents were evaporated. The lipid film was hydrated with 1.5 mL of 0.22 μm filtered buffered solution of pH 7.4 with or without 5(6)-CF at 200 mM (10 mM HEPES, 15 mM NaCl) and subsequently vortexed for 10 min. The prepared MLV were sonicated using a stepped 1/8" microtip (0001508, Delta Labo, Avignon, France) and a Vibra Cell ultrasonicator (75041, 750 W, 20 kHz, Fisher Scientific) under argon atmosphere for 1 h and protected from light to obtain small unilamellar vesicles (SUV). The obtained SUV were then centrifuged 10 min at 10 000 g to pellet and remove titanium residues originating from the sonication probe. For liposomal suspensions containing 5(6)-CF (Lp-5(6)-CF), the free dye was eliminated by filtration on a 20 mL Sephadex[®] G75 size exclusion column preliminarily equilibrated with 100 mL of buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4). Filtered SUV were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm[®].

2.2.2. Formulation of first generation layersomes

Proof of concept

3 mL of plain liposomal suspension at a concentration of 0.67 mM of phospholipids (PL) were slowly dropped (30 drops/min) using a 0.45×12 mm 26G×1/2" needle

(4710004512, VWR International) in a 3 mL PLL solution at 0.5 mg/mL placed under stirring at 4°C. After 20 min stirring, Lp-PLL suspensions were placed in 5 mL dialysis devices and were dialyzed for 12 h at 4°C against buffer (2 × 2 L of 10 mM HEPES, 15 mM NaCl) to remove polymer excesses. The dialysis buffer was changed after 6 h. After dialysis, the suspensions were carefully collected and slowly dropped in a PGA solution of the same volume at 1.0 mg/mL placed under stirring at 4°C. After 20 min stirring, the Lp-PLL-PGA suspensions were split and inserted in 5 mL dialysis devices. They were dialyzed under the same conditions as described previously and were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

Influence of lipids and polymers concentration

To study the influence of lipids concentration, plain layersomes were prepared with either 2, 5 or 10 mM of PL following the same formulation procedure as the one described above. A precipitation was observed during the dropping procedure for all suspensions. After 20 min stirring, suspensions were sonicated in a sonication bath for 30 min and were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

To evaluate the incidence of polymers concentration, the same formulation procedure as described previously was employed. 1-layered coated plain liposomes (Lp-PLL) were formulated with increasing concentrations of PLL (0.1 to 1.5 mg/mL). For each Lp-PLL suspension prepared, 2 PGA concentrations (twice and fourth the PLL concentration in question) were investigated for the formulation of 2-layers coated liposomes (Lp-PLL-PGA). The obtained suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

Tuning of the polymer elimination procedure

For this study, plain Lp-PLL suspensions were prepared with 0.1 mg/mL of a PLL solution following the same procedure as described previously. The excess of PLL was removed by filtration using either a pressure concentrator or a centrifugal concentrator with 100 kD cut-offs. For this purpose, 6 mL of Lp-PLL were placed in the concentrators pre-rinsed with ultrapure water and were 3 times concentrated at 4°C. A pressure of 1.0 bar was applied for filtration with the pressure concentrator and the concentrated suspensions were

obtained in a few minutes. The Lp-PLL filtered with the centrifugal concentrator were centrifuged at 100 g for 30 min. Suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®. Phospholipids losses were determined by measuring the inorganic phosphate in the filtrate (molybdenum blue method).

Formulation of fluorescent layersomes for a FRET

For the formulation of fluorescent layersomes, plain liposomes were coated with 3 % grafted PLL-rhodamine and 0.6 % grafted PGA-fluorescein at a concentration of 0.1 mg/mL. As a control, plain liposomes were coated with non-fluorescent PLL and 0.6 % grafted PGA-fluorescein at a concentration of 0.1 mg/mL. LbL coating of liposomes was performed following the same procedure as described previously. Polymers excesses were removed by dialysis (36 h at 4°C) to avoid a destabilization of the samples (3 × 2 L of HEPES 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7.4). The dialysis buffer was changed every 12 h. All suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®. In addition, a control constituted of free polyelectrolytes was prepared by mixing 3 mL of a PLL solution at 0.05 mg/mL and 3 mL of a PGA solution at 0.1 mg/mL. A clear orange solution was obtained and stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

Formulation of layersomes for a QCM analysis

For this experiment, plain Lp-PLL suspensions were prepared with 0.1 mg/mL of a PLL solution following the same procedure as described previously. Suspensions were 3 times concentrated using a centrifugal concentrator pre-rinsed with ultrapure water (30 min at 4°C, 100 g) to remove PLL excess and were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

2.2.3. Formulation of second generation layersomes

2-layers coated layersomes

3 mL of 5(6)-CF-liposomes at a concentration of 0.67 mM PL were slowly dropped in a PLL solution at 0.1 mg/mL of the same volume placed under stirring at 4°C. After 20 min stirring, Lp-5(6)-CF-PLL suspensions were 3 times concentrated using a centrifugal concentrator pre-rinsed with ultrapure water (30 min at 4°C, 100 g). After filtration, their PL

concentration was determined by PC titration and adjusted to 0.5 mM of PL. Then, 3 mL of Lp-5(6)-CF-PLL suspensions were slowly dropped in a PGA solution at 0.1 mg/mL of the same volume placed under stirring at 4°C. After 20 min stirring, the suspensions were 3 times concentrated under the same conditions as described previously and were dialyzed against buffer (3 × 2 L of 10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4) for 36 h and at 4°C using a 5 mL dialysis device of 100 kD to remove remaining polymers excesses. The dialysis buffer was changed every 12 h. All suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

3- to 6-layers coated layersomes

3- to 6-layers coated liposomes were formulated following the same procedure as described for 2-layers coated second generation layersomes. To avoid the formation of particle aggregates, the PL concentrations of layersomal suspensions were gradually reduced according to the number of polyelectrolyte layers added onto liposomes (Table 12). Additional dialysis steps were performed between the addition of each PLL and PGA bilayer to avoid precipitation (3 × 2 L of 10 mM HEPES, 15 mM NaCl, pH 7.4 ; 36 h at 4°C ; 5 mL dialysis devices of 100 kD). The obtained suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

Table 12 : Phospholipids concentration of the layersome formulations adjusted for the addition of a supplementary polyelectrolyte layer.

Formulation	Phospholipids concentration (mM)
Lp-PLL-PGA	0.40
Lp-(PLL)₂-PGA	0.30
Lp-(PLL-PGA)₂	0.20
Lp-(PLL)₃-(PGA)₂	0.10

Reticulated layersomes

For the formulation of reticulated layersomes, 2 strategies were employed. The first strategy consists in preparing layersomes and crosslinking the polymeric coat by adding

coupling agents post formulation. The second strategy consists in formulating layersomes with PLL and the ester-activated PGA-sulfo-NHS.

For the reticulation with coupling agents, 2- and 4-layers coated layersomes were prepared following the same procedure as described for 2 layers coated second generation layersomes. Then, 10 µL of freshly prepared EDC and sulfo-NHS solutions were added to the layersome formulations. Different equivalents of EDC and sulfo-NHS were added to the suspensions. These equivalents were calculated according to the PGA amount added during the formulation of layersomes (0.3 mg for 2-layers coated layersomes and 0.6 mg for 4-layers coated layersomes) and are summarized in Table 13. After addition of the coupling agents, suspensions were placed for 4 h at 4°C under stirring and subsequently filtered on a 20 mL Sephadex® G75 size exclusion column preliminarily equilibrated with 100 mL of buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4). A 5(6)-CF leakage was noticed after filtration for almost all reticulated formulations. All suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

Table 13 : Equivalents and solutions of EDC and sulfo-NHS used for crosslinking of 2- (Lp-PLL-PGA) and 4-layers coated layersome suspensions (Lp-(PLL-PGA)₂).

Formulation	Equivalents of coupling agents added	EDC and sulfo-NHS solutions prepared
Lp-PLL-PGA	0.5 eq. of EDC and 0.03 eq. of sulfo-NHS	EDC: 20 mg/mL; sulfo-NHS: 1.3 mg/mL
	1 eq. of EDC and 0.4 eq. of sulfo-NHS	EDC: 100 mg/mL; sulfo-NHS: 40 mg/mL
	10 eq. of EDC and 4 eq. of sulfo-NHS	EDC: 1 g/mL; sulfo-NHS: 400 mg/mL
Lp-(PLL-PGA) ₄	0.5 eq. of EDC and 0.03 eq. of sulfo-NHS	EDC: 40 mg/mL; sulfo-NHS: 2.6 mg/mL

The same procedure as the one described for 2 layers coated second generation layersomes was employed for the formulation of layersomes with PLL and PGA-sulfo-NHS. Instead of using 64 kD PGA at 0.1 mg/mL, 50 % grafted PGA-NHS was used at a concentration of 0.16 mg/mL. No precipitation was observed for 2-layers coated layersomes prepared with PGA-sulfo-NHS (Lp-PLL-PGA-sulfo-NHS). However, a precipitation was noticed

by the addition of Lp-PLL-PGA-sulfo-NHS to the PLL solution. All suspensions were stored at 4°C under argon atmosphere sealed with Parafilm®.

2.3. Characterization of liposomal and layersomal suspensions

2.3.1. Inorganic phosphate assay

To determine the phosphate content of the lipid solutions, the molybdenum blue method was used. Prior to titration, all glassware was thoroughly washed with detergent to remove potential lipid traces and was subsequently rinsed with ultrapure water and absolute ethanol. 500 µL aliquots of PC and PG were prepared at a concentration of 1 µmol/mL by diluting stock solutions in CHCl₃/MeOH (9/1 v/v). 25 and 50 µL of 1 µmol/ml PC and PG were deposited in triplicates in test tubes. In parallel, a calibration standard was prepared by diluting 10 times a 0.1 mM KH₂PO₄ stock solution of which 25, 75 and 100 µL were deposited in triplicates in test tubes. In addition, 3 tubes were filled with 100 µL of ultrapure water as a control. All tubes were heated 2 h at 110°C to evaporate water and organic solvents. Then, a 1.25 % molybdic acid and 5 % ascorbic acid solutions were extemporaneously prepared and protected from light. The 1.25 % molybdic acid solution was prepared by dissolving 250 mg (0.20 mmol) of molybdic acid in 20 mL of ultrapure water and the 5 % ascorbic acid solution was obtained by solubilizing 1.0 g (5.68 mmol) of ascorbic acid in ultrapure water. Once solvents were evaporated, 300 µL of 70 % perchloric acid were added to each sample and glass beads were placed on the top of each tube. Samples were briefly vortexed and subsequently heated for 20 min at 190°C. The glass beads were used to prevent solvent evaporation. Afterwards, 1 mL of ultrapure water and 500 µL of 1.25 % molybdic acid and 5 % ascorbic acid solutions were added to each tube. Tubes were briefly vortexed and heated in a water bath at 100°C for 5 min. To stop the reaction, tubes were transferred in a cold-water bath for 5 min. Finally, samples were briefly vortexed and their optical density (OD) was determined at 820 nm (slot: 2 nm). For OD measurements, a SAFAS SP2000 spectrometer (Xenius 5801, SAFAS, Monaco) was used.

2.3.2. Phosphatidylcholine assay

To determine PC and PL content of liposomal and layersomal formulations, PC titrations were performed using the LABASSAY™ phospholipid kit (W1W296-63801, SOBIODA

Laboratories, Montbonnot-Saint-Martin, France). For this purpose, a calibration standard of choline was prepared by depositing in a 96-well flat bottom plate (Greiner Bio-one plates, 655101, Dominique Dutscher) 1, 2, 3, 4, 5 and 7.5 μL (corresponding to 3.87, 7.74, 11.61, 15.48, 19.35 and 29.03 nmol, respectively) in triplicate of the choline stock solution provided in the kit. 2 and 4 μL of liposomal formulations were deposited in triplicate. Depending on the formulation, varying volumes (in the microliter range) were also deposited in triplicate. 200 μL of the provided reagent solution were subsequently added to each well using a distripette. 3 additional wells were filed with the reagent as a control. Afterwards, the plate was incubated 10 min at 37°C. Phospholipases from the reagent solution hydrolyze their PC substrate at this temperature. Finally, the OD of the samples was recorded at 590 nm (slot: 2 nm).

2.3.3. Size and zeta potential measurements

Size measurements

The average diameter of liposomal and layersomal suspensions was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK) with the following specifications: material refractive index: 1.43; buffer refractive index: 1.33; viscosity: 0.9 cP; scattering angle: 173°; temperature: 25°C. Liposomal and layersomal suspensions were diluted at a concentration of 0.1 mM in 10 mM HEPES, 15 mM NaCl buffer pH 7.4. Size measurements were performed in BRAND® UV cuvettes (Z637092, Sigma-Aldrich) before and after each filtration and dialysis step during formulation. Data were analyzed using the multiple narrow mode included in the Malvern software. Particle size is expressed in intensity. Formulations are considered monodisperse when the polydispersity index (PDI) is < 0.3.

Zeta potential measurements

The average zeta potential of liposomal and layersomal suspensions was determined using a Zetasizer Nano-ZS with the same specifications as the ones used for DLS measurements. Liposomal and layersomal suspensions were diluted at a concentration of 0.2 mM in 10 mM HEPES, 15 mM NaCl buffer pH 7.4. Measurements were performed in folded capillary cells (DTS1070, Malvern Panalytical) before and after each filtration and

dialysis step during the formulation. The results presented are the average of 3 consecutive measurements. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation.

2.3.4. QCM-D analysis

QCM-D analysis was carried out using the QSense E1 system (QSense, Västra Frölunda, Sweden), equipped with a QFM 401 QSense flow module (Stockholm, Sweden). All injections were performed at a uniform flow rate of 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a peristaltic pump. A pre-cleaned (plasma cleaner) quartz crystal coated with a thin gold layer (quartz-Au, QSense) was employed. The Qsoft 401 2017 analysis software (Doha, Qatar) was used to model the results.

Sample

400 μL of 1-layer coated liposomes (Lp-PLL) at a concentration of 0.6 mM of PL were passed into the measurement cell for 15 min. Then, 2 rinsing steps of 5 min were performed with 400 μL of buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4) and 400 μL of a PGA solution (0.1 mg/mL) were passed into the cell for 30 min. Afterwards, a 5 min rinsing step with 400 μL of buffer was performed and another 400 μL of PGA solution (0.1 mg/mL) were passed into the cell for 10 min. A final rinsing step of 5 min was performed with 400 μL of buffer.

Control

As a control, 400 μL of a PGA solution at a concentration of 0.1 mg/mL were passed into the measurement cell for 5 min. Then, another 400 μL of PGA solution (0.1 mg/mL) were passed into the cell for 5 min. A final rinsing step of 5 min was performed with 400 μL of buffer.

2.3.5. FRET analysis

A SAFAS SP2000 spectrometer (Xenius 5801, SAFAS) was used for fluorescence measurements. 500 μL of layersomal suspensions at a concentration of 0.03 mM of PL were inserted in a 1 mL Suprasil quartz cell (flx cell qz F semi-micro, SAFAS). Emission spectra of

fluorescein and rhodamine B were respectively recorded from 500 to 700 nm and from 560 to 700 nm by exciting samples at the emission wavelength of fluorescein ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) and rhodamine B ($\lambda_{\text{ex}} = 518 \text{ nm}$) and with the following settings: emission and excitation bandwidth: 10 nm; step: 2 nm; voltage: 500 V. Baselines were recorded with buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4) from 500 to 700 nm and from 560 to 700 nm under the same conditions as for samples. Emission spectra were instrumentally corrected by the correction algorithm displayed in the SAFAS software (SP2000 version 7, SAFAS).

2.3.6. Entrapment efficiency of liposomal and layersomal suspensions

5(6)-CF entrapment efficiency was determined by measuring the fluorescent signal of 5(6)-CF while embed into the liposomes/layersomes and once released from the particles using the following ratio:

$$R = \frac{F_{\text{max}} - F_0}{F_{\text{max}}}$$

in which F_0 represents the initial fluorescence of the liposome suspensions and F_{max} the fluorescence of released 5(6)-CF. For release of entrapped 5(6)-CF, 10 μL of 100 % Triton™ X-100 were added to 600 μL of liposomes/layersomes at a concentration of 0.006 mM of PL. Their disruption was verified by DLS. For fluorescence measurements, 600 μL of intact/disrupted liposomes/layersomes (0,006 mM pf PL) were inserted in a 1 mL Suprasil quartz cell. All measurements were performed at constant voltage (410 V) with the following specifications: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$; bandwidth: 10 nm.

2.4. Stability and resistance evaluation of second generation layersomes

2.4.1. With increasing concentrations of Triton™ X-100

All second generation layersomes developed were evaluated, which are 2-, 4- and 6-layers coated layersomes as well as 2-layers coated and reticulated layersomes (with PGA-sulfo-NHS). For this purpose, 600 μL of liposomal and layersomal suspensions were prepared at a concentration of 0.006 mM of PL. 10 μL of an aqueous solution of Triton™ X-100 were added to the 600 μL of suspensions. The concentrations of

Triton™ X-100 prepared for the evaluation are listed in Table 14. To release all 5(6)-CF entrapped, 10 µL of 100 % (p/v) Triton™ X-100 were added to the suspension. Fluorescence measurements of the suspensions were performed before and after addition of the detergent in a 1 mL Suprasil quartz cell. All measurements were performed at constant voltage (410 V) with the following specifications: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$; bandwidth: 10 nm.

Table 14 : Triton™ X-100 concentrations (p/v) prepared for the evaluation of second generation layersomes.

Triton™ X-100 concentrations (p/v)
0.075 %
0.15 %
0.25 %
0.30 %
0.35 %
0.40 %
0.50 %
0.55 %
0.60 %
0.90 %

2.4.2. With increasing concentrations of sodium taurocholate

For this study, all second generation layersomes, except 6-layers coated layersomes, were evaluated. For this purpose, 600 µL of liposomal and layersomal suspensions were prepared at a concentration of 0.006 mM of PL. 20 µL of an aqueous solution of sodium taurocholate were added to the 600 µL of suspension. The concentrations of sodium taurocholate prepared for the evaluation are listed in Table 15. To release all 5(6)-CF entrapped, 10 µL of 100 % (p/v) Triton™ X-100 were added to the suspensions. Fluorescence measurements of the suspensions were performed before and after addition of the bile salt

in a 1 mL Suprasil quartz cell. All measurements were performed at constant voltage (410 V) with the following specifications: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$; bandwidth: 10 nm.

Table 15 : Sodium taurocholate concentrations (M) prepared for the evaluation of second generation layersomes.

Sodium taurocholate concentrations (M)
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
0.35
0.40

2.4.3. With phospholipases A₂ and C

2- and 4-layers coated layersomes as well as 2-layers coated and reticulated layersomes (with PGA-sulfo-NHS) were evaluated in the presence of sPLA₂ (from bee venom) and PLC (from *Clostridium perfringens*). 6-layers coated layersomes were only evaluated in the presence of sPLA₂. For this purpose, 1 mL of liposomal and layersomal suspensions were prepared at a concentration of 0.006 mM of PL with 10 mM HEPES, 15 mM NaCl and 5 mM CaCl₂ buffer. For the evaluation with sPLA₂, 1 μL of enzyme (0.021 U/mL) was added at $t = 0$ and $t = 15 \text{ min}$ to the 1 mL of suspension, and the mixture was placed in a water bath set at 25°C for 75 min. For the evaluation with PLC, 1 μL of enzyme (10 – 50 U/mL) was added at $t = 0$ to the 1 mL of suspension, and the mixture was placed in a water bath set at 37°C for 35 min. To release all 5(6)-CF entrapped, 10 μL of 100 % (p/v) Triton™ X-100 were added to the suspensions. Fluorescence measurements of the suspensions were performed before addition of the enzymes and at regular time intervals after the addition of enzymes with 600 μL of suspension in a 1 mL Suprasil quartz cell. All measurements were performed at constant voltage (410 V) with the following specifications: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$; bandwidth: 10 nm.

2.4.4. With human plasma

Except 6-layers coated liposomes, all second generation layersomes were evaluated. For this purpose, 267 μL of liposomal and layersomal suspensions at 0.05 mM of PL were diluted in 533 μL of human plasma and were incubated for 2 h at 37°C. To release all 5(6)-CF entrapped, 10 μL of 100 % (p/v) Triton™ X-100 were added to the suspensions. Fluorescence measurements of the suspensions were performed before and after the addition of human plasma at regular time intervals in a 1 mL Suprasil quartz cell. Measurements were performed with 90 μL of sample diluted in 510 μL of buffer (10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4), (0.006 mM of PL) to which 60 μL of 20 % SDS were added (to denature plasmatic BSA). All measurements were performed at constant voltage (410 V) with the following specifications: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$; bandwidth: 10 nm.

Chapitre 2 :

Développement et caractérisation d'un virus enrobé pour
l'élaboration d'un vaccin à relargage différé contre les
grippes pandémiques

Have no fear of perfection; you'll never reach it.

Marie Curie

A. Introduction

1. Contexte du projet et objectifs du chapitre

La grippe est une maladie infectieuse et contagieuse qui touche les oiseaux et les mammifères dont le porc, le phoque et l'homme. Elle sévit sur un mode épidémique saisonnier et se traduit chez ce dernier par un ensemble de symptômes tels que fièvre, céphalées, toux, courbatures et asthénie. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elle engendre chaque année 3 à 5 millions d'infections sévères et environ 500 000 décès à l'échelle mondiale.³⁴³ Elle est induite par 4 types de virus : A, B, C et D. Il s'agit de virus à ARN constitués d'une membrane lipidique ainsi que d'une enveloppe protéique (dite capside) protégeant le matériel génétique. La membrane lipidique est hérissée de spicules formés par des glycoprotéines de surface. Les types A et B possèdent au total 8 segments d'ARN simple brin. Deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), ainsi que la protéine membranaire M2 sont logées dans la membrane lipidique de ces virus (Figure 61).

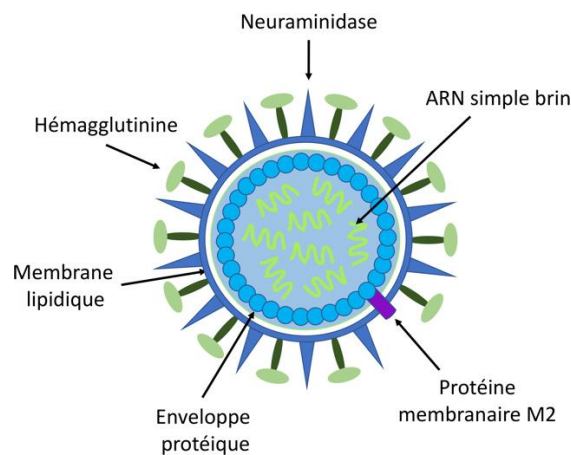


Figure 61 : Structure des virus de la grippe de types A et B.

Les virus de la grippe de type A sont classés en sous-types en fonction des combinaisons de HA et de NA retrouvées à la surface de leur membrane.³⁴⁴ Chez l'homme, les épidémies grippales saisonnières sont engendrées par les types A et B mais seul le type A est capable d'induire des pandémies grippales. L'émergence de nouveaux virus de type A

très différents, capables d'infecter les hommes et d'induire une transmission interhumaine durable est à l'origine de ce risque pandémique.

A ce jour, quelques formulations de vaccins adjuvantés (constituées de virus entiers inactivés), efficaces contre les différentes souches de virus de la grippe, ont été développées et ont permis de réduire l'impact humain et économique des dernières épidémies et pandémies grippales.³⁴⁵ Cependant, il est toujours nécessaire, dans le cas d'une pandémie, de procéder à 2 immunisations distinctes dans le temps. En effet, au vu de l'agressivité des virus responsables de pandémies notamment chez les personnes naïves, une seule injection n'est pas suffisante pour immuniser et protéger la population. Le rappel de vaccin se fait généralement dans les 2 à 3 semaines suivant la primo-injection et permet de renforcer l'immunisation subséquemment induite (Figure 62).

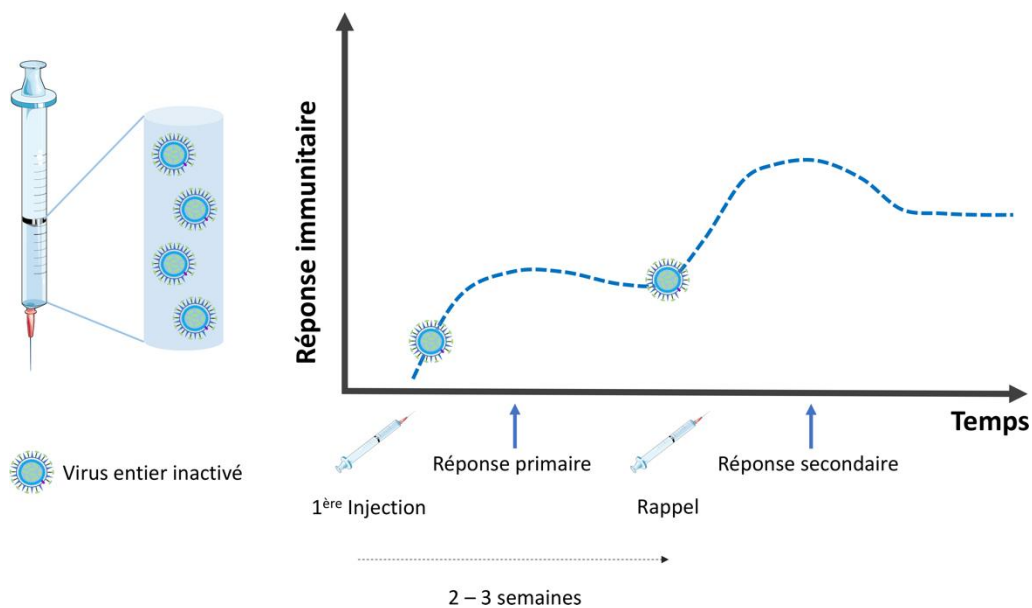


Figure 62 : Exemple de profil d'immunisation attendu pour un vaccin antigrippal entier inactivé avec rappel vaccinal. D'après le Vaccine Formulation Laboratory (VFL).

Dans le contexte économique actuel et en considérant le nombre de personnes à vacciner lors d'une pandémie grippale, il est primordial de développer une nouvelle génération de vaccin qui soit efficace en une seule injection.

L'objectif de ces travaux initiés en collaboration avec le Vaccine Formulation Laboratory de Lausanne (VFL), est donc de développer, caractériser et évaluer *in vivo* un vaccin contre les gripes pandémiques, efficace en une seule injection. Afin de répondre aux critères fixés par l'OMS, nous devons développer un vaccin peu coûteux et dont la fabrication soit simple tout en maintenant une immunogénicité suffisante. Pour la formulation des candidats vaccins, le VFL a décidé d'utiliser un virus H5N1 entier inactivé (par traitement au β -propiolactone). Il s'agit d'un virus de la grippe aviaire hautement pathogène capable d'infecter l'homme et d'engendrer chez ce dernier un syndrome respiratoire pouvant conduire à des complications sévères voire à la mort des personnes infectées. D'après l'OMS, ce virus constitue une menace non négligeable pour la sécurité sanitaire mondiale avec un taux de mortalité de 60 % chez l'homme et est susceptible d'engendrer une pandémie.^{346,347} Ainsi, en utilisant le virus entier plutôt que des sous-unités classiquement utilisées, les coûts de production et de purification sont réduits et de meilleurs rendements sont obtenus. De plus, les virus entiers ont tendance à induire une meilleure immunité chez des sujets naïfs que l'administration de sous-unités virales.³⁴⁸⁻³⁵¹

En vue d'une activité en une seule injection, notre stratégie vise à développer un candidat vaccin constitué de deux formes du virus, à savoir : une forme « nue » capable d'induire immédiatement une immunité, ainsi qu'une forme à relargage différé qui constituera le « pseudo rappel » vaccinal (Figure 63). Cette dernière est celle que nous devons développer. Afin d'obtenir un relargage retardé de la particule virale, nous avons décidé d'employer une stratégie qui consiste à recouvrir la particule couche par couche à l'aide de polymères lentement dégradables.^{241,242} L'objectif de ces travaux est donc de mettre au point et d'évaluer une forme à relargage retardé du virus en utilisant le recouvrement couche par couche (Layer-by-layer, LbL) par un couple de polymères peptidiques biodégradables.

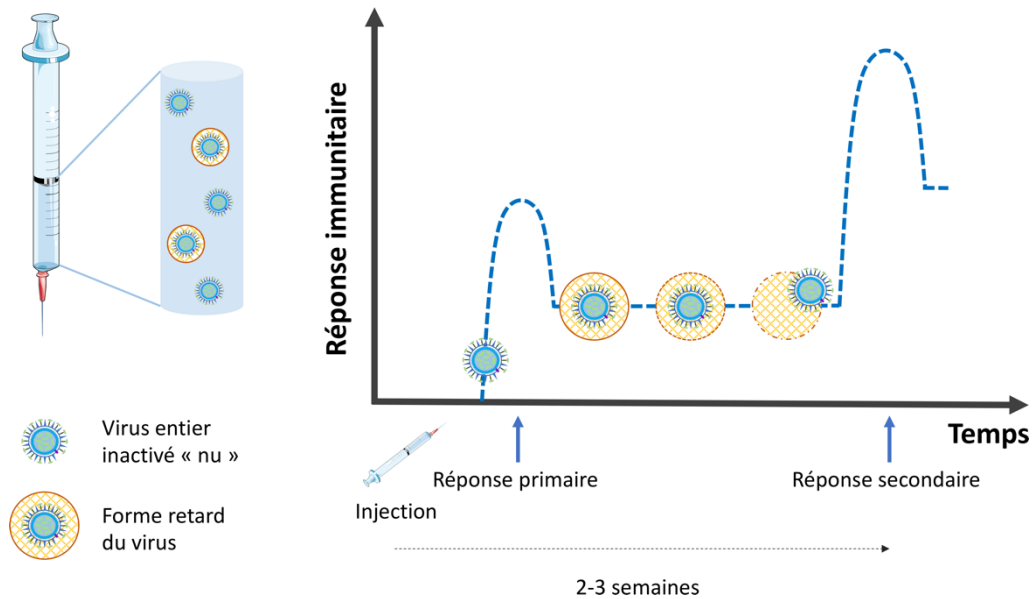


Figure 63 : Profil d'immunisation attendu lors de la coadministration du virus nu et de la forme à relargage différé. D'après le Vaccine Formulation Laboratory (VFL).

2. Choix des polyélectrolytes pour le recouvrement « LbL »

En vue de l'application *in vivo* de notre candidat vaccin, le couple de polymères utilisé doit être biocompatible, non immunogène et non cytotoxique. Afin d'observer un relargage progressif de la particule virale, il est important que le couple puisse être dégradé de façon progressive par des enzymes et les cellules immunitaires telles que les cellules présentatrices d'antigène (CPA). De plus, comme la charge de surface du virus est négative (Tableau 16), il faut choisir un couple d'espèces de charges opposées afin de les adsorber par interactions électrostatiques à la surface de la particule virale. Enfin, nous souhaitons idéalement que les polymères puissent être modifiés chimiquement (par fonctionnalisation ou par réticulation) afin de pouvoir jouer sur la rigidité et la résistance des couches et donc sur la libération de la particule virale. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au même couple que celui utilisé dans le chapitre précédent dédié à la conception de layersomes, à savoir la poly(L-lysine) (PLL) et l'acide poly(L-glutamique) (PGA). Comme pour les layersomes, le premier polymère mis en contact avec la particule virale sera donc la PLL chargée positivement puis le deuxième sera le PGA chargé négativement, et ainsi de suite comme mis au point précédemment (Figure 64).

Tableau 16 : Diamètre moyen, indice de polydispersité (PDI) et potentiel zêta moyen du virus H5N1 entier inactivé.

Diamètre moyen (nm)	PDI	Potentiel zêta moyen (mV)
165 ± 30	0,167	-23 ± 7

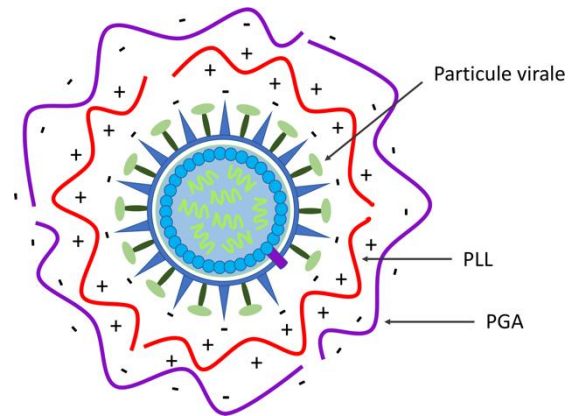


Figure 64 : Recouvrement couche par couche (LbL) de la particule virale. Avec une espèce polycationique : la PLL (rouge) puis avec une espèce polyanionique : le PGA (mauve).

B. Résultats et discussion

1. Mise au point d'une procédure de recouvrement « LbL » d'un virus H5N1

1.1. Stratégie

Afin d'obtenir des particules virales enrobées de 2 couches de polyelectrolytes, il convient d'adsorber la première couche de polycation à la surface du virus puis d'éliminer l'excès de polymère qui ne s'est pas adsorbé à la particule. Ensuite, la deuxième couche de polyanion est adsorbée à son tour à la surface de la particule virale recouverte de polycation et le polymère excédentaire est éliminé (Figure 65). Comme nous avons souhaité mettre à profit l'expérience acquise avec les layersomes, la même procédure de formulation que celle développée pour le recouvrement des liposomes a été choisie pour la formulation de ces particules virales recouvertes de PLL et de PGA. Pour le choix de la concentration en particules virales, nous nous sommes basés sur des travaux préliminaires de recouvrement de surface du virus menés par le VFL et nous avons effectué nos essais de recouvrement à cette même concentration (soit 30 μg HA/mL).

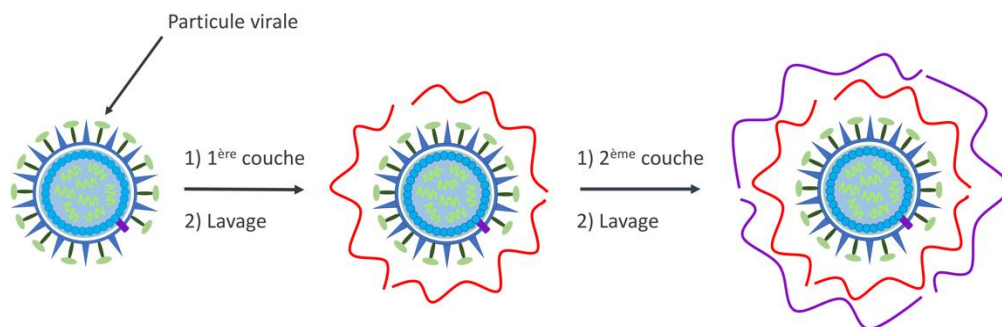


Figure 65 : Stratégie du recouvrement couche par couche (LbL) des particules virales. Avec la PLL (rouge) puis le PGA (mauve).

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la mise au point des paramètres clés pour un recouvrement de surface des particules virales. Nous nous sommes intéressés à 3 paramètres primordiaux pour ce recouvrement, à savoir les conditions de tampon, la longueur ainsi que les concentrations des polymères.^{241,242} Afin d'évaluer le recouvrement

des particules virales, des mesures de DLS et de potentiel zêta ont été effectuées sur les particules virales obtenues.

1.2. Conditions de tampon

Afin d'évaluer l'impact de la solution tampon sur le recouvrement des particules virales, nous avons testé au total 3 conditions tamponnées de pH 7,4 (Tableau 17). Il s'agit de solutions physiologiques dont les caractéristiques physico-chimiques se rapprochent des conditions cellulaires et qui sont donc adéquates pour une application *in vivo*. Pour cette étude, nous avons évalué l'impact de ces conditions tamponnées sur le recouvrement des particules virales avec la PLL de même poids moléculaire (PLL 21 kD) que celle utilisée pour la formulation de nos layersomes recouverts d'une couche de polyelectrolyte. Comme mentionné ci-avant, la même procédure de formulation a été appliquée pour l'obtention de particules virales recouvertes de PLL (H5N1-PLL, Figure 66).

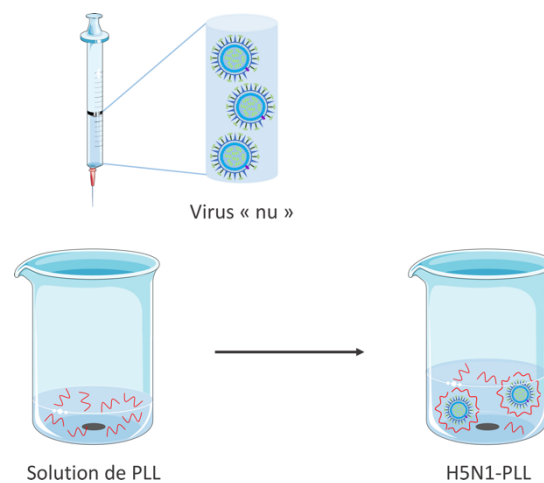


Figure 66 : Illustration de la procédure de formulation des particules d'H5N1-PLL.

Pour les 3 conditions tampon testées, on constate une augmentation considérable de la taille des particules. En effet, on passe de 165 ± 30 nm de diamètre (virus nu) à des tailles proches du micron après contact avec la solution de PLL. On observe également une augmentation de la valeur du potentiel zêta avec inversion de la charge : on passe de -23 ± 7 mV (virus nu) à des valeurs positives comprises entre +8 et +20 mV (virus en contact avec la solution de PLL). Cette augmentation du diamètre moyen et de la valeur du potentiel

zêta des particules semblent indiquer un recouvrement du virus. Au vu des valeurs de PDI ($> 0,3$), des suspensions polydisperses sont obtenues dans tous les cas.

Tableau 17 : Caractérisation physico-chimique des formulations virales après contact avec une solution de PLL (21 kD) en fonction des conditions tamponnées. n = 1.

Conditions tampon	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
10 mM HEPES, 15 mM NaCl, pH 7,4	1251 ± 40*	0,606	+8 ± 4
1X PBS (avec CaCl ₂ et MgCl ₂) pH 7,4	718 ± 36	0,386	+9 ± 3
1X PBS (sans CaCl ₂ ni MgCl ₂) pH 7,4	860 ± 43	0,650	+20 ± 3

* Pour des particules de diamètre $> 1 \mu\text{m}$, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

Les 2 conditions de tampon PBS (avec et sans ions Ca²⁺ et Mg²⁺) ont permis d'obtenir des particules de taille inférieure au micron, à l'inverse du tampon HEPES pour lequel on atteint une taille de 1,2 μm . Il faut noter que les tailles des particules supérieures à 1 μm ne sont pas précises en raison des limites du Zetasizer utilisé pour les mesurer. Elles reflètent cependant le fait que des particules micrométriques sont présentes. Pour les suspensions préparées dans le tampon HEPES et pour celles préparées dans le PBS avec CaCl₂ et MgCl₂, on observe une valeur de potentiel zêta proche de 10 mV. Dans le PBS sans CaCl₂ ni MgCl₂, on observe une valeur 2 fois plus grande.

Pour la suite de l'étude, il a été décidé de formuler les particules recouvertes dans du PBS 1X sans CaCl₂ ni MgCl₂. En effet, c'est avec cette condition tampon qu'on observe la valeur de potentiel zêta la plus positive et donc probablement un meilleur recouvrement de la particule virale qu'avec les 2 autres conditions.

1.3. Longueur et concentration du polymère cationique

Afin d'évaluer l'impact du poids moléculaire et de la concentration en polymère sur le recouvrement des particules virales, nous avons testé 3 PLL de poids moléculaires différents à des concentrations allant du μg au mg. De plus, un autre polymère structurellement proche de la PLL et aux propriétés physico-chimiques comparables à cette dernière a également été testé à 2 concentrations : il s'agit de la poly(epsilon-L-lysine) (PεLL ;

Figure 67). La même procédure de formulation que pour les liposomes recouverts de PLL classique (poly(alpha-L-lysine)) a été appliquée pour formuler les particules virales recouvertes (Tableau 18).

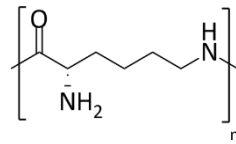


Figure 67 : Structure chimique de la poly(epsilon-L-lysine), (PELL). n = 28 – 35.

1.3.1. Essais de recouvrement avec différentes polylysines

Avec la PLL de plus faible poids moléculaire et à une concentration de 0,1 mg/mL, on ne constate pas d'augmentation de la taille des particules mais on observe cependant une augmentation de la valeur du potentiel zêta qui devient positive mais proche de la neutralité ($+3 \pm 2$ mV). Avec une concentration de PLL 10 fois plus importante, on observe la formation d'une nouvelle population de particules proches du micron ainsi qu'une valeur de potentiel zêta équivalente à celle mesurée avec 10 fois moins de PLL. Au vu de la valeur de potentiel zêta proche de la neutralité, ces résultats orientent vers un recouvrement partiel de la particule virale.

Pour la PLL de poids moléculaire intermédiaire (21 kD), davantage de concentrations ont été testées pour le recouvrement de la particule virale. En effet, il s'agit de la PLL utilisée pour la formulation des layersomes et pour laquelle nous avons obtenu un recouvrement stable dans le temps des particules liposomiques. Nous avons donc souhaité explorer le plus de concentrations possibles avec ce polymère en particulier. Avec des concentrations ≤ 10 $\mu\text{g/mL}$, on n'observe pas d'augmentation du diamètre moyen des particules mais une légère augmentation de la valeur du potentiel zêta, qui reste néanmoins négative. Il n'y a donc pas de recouvrement du virus à ces concentrations. Avec des concentrations ≥ 50 $\mu\text{g/mL}$, on constate la formation d'une population polydisperse à $\approx 700 - 1000$ nm de diamètre et une augmentation de la valeur du potentiel zêta avec des valeurs allant de +5 à +20 mV. Pour des concentrations en PLL $\geq 0,1$ mg/mL, on observe des valeurs de potentiel

zêta ≥ 10 mV. Ces résultats semblent indiquer un bon recouvrement des virus pour les 3 plus fortes concentrations en PLL, accompagné d'une augmentation de la polydispersité.

Tableau 18 : Caractérisation physico-chimique des formulations virales après contact avec des solutions de polylysine (PLL et P ϵ LL) de concentrations différentes. n = 1.

Polylysine	Concentrations en polymère	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
PLL 4,2 kD	0,1 mg/mL	168 \pm 12	0,262	+3 \pm 2
	1,0 mg/mL	714 \pm 77 (69 %) 126 \pm 10 (31 %)	0,809	+4 \pm 3
PLL 21 kD	1,0 μ g/mL	166 \pm 11	0,160	-15 \pm 7
	10 μ g/mL	170 \pm 11	0,177	-13 \pm 6
	50 μ g/mL	665 \pm 37 (89 %) 80 \pm 3 nm (11 %)	0,495	+5 \pm 4
	0,1 mg/mL	860 \pm 43	0,650	+20 \pm 3
	1,0 mg/mL	853 \pm 44 (90 %) 84 \pm 4 (10 %)	0,806	+10 \pm 4
PLL 52 kD	2,0 mg/mL	984 \pm 38	0,314	+22 \pm 4
	50 μ g/mL	653 \pm 22	0,712	+8 \pm 2
	1,0 mg/mL	726 \pm 38	0,851	+14 \pm 4
PϵLL 3,5 – 4,5 kD	50 μ g/mL	187 \pm 25	0,201	-2 \pm 2
	1,0 mg/mL	179 \pm 43 (87 %) 3527 \pm 337 (13 %)*	0,240	-4 \pm 2

* Pour des particules de diamètre $> 1 \mu$ m, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

Avec la PLL de plus haut poids moléculaire et à une concentration de 50 μ g/mL, une population polydisperse à ≈ 700 nm de diamètre et de potentiel zêta positif ($\approx +8 \pm 2$ mV) se forme. Avec une concentration de 1 mg/mL, une population à ≈ 700 nm de diamètre et de potentiel zêta 2 fois plus important qu'avec 50 μ g/mL est mesurée. Les valeurs de taille et de potentiel zêta traduisent un recouvrement des particules virales avec cette PLL.

Enfin, même avec des concentrations importantes de P ϵ LL (1 mg/mL), on n’observe pas d’augmentation du diamètre moyen des particules (ou seulement à un faible pourcentage), mais on constate une légère augmentation des valeurs de potentiel zêta, qui restent néanmoins négatives. Il n’y a donc pas de recouvrement des virus avec cette polylysine.

1.3.2. Stabilité du recouvrement

Nous avons ensuite vérifié que les polycations restent adsorbés à la particule virale suite à l’étape d’élimination du polymère excédentaire. Afin d’éliminer le polymère excédentaire, une dialyse contre du tampon (PBS sans CaCl₂ et MgCl₂) a été réalisée. En effet, il s’agit d’une technique de séparation dite « douce » qui ne devrait pas conduire à la déstabilisation des particules recouvertes formulées. Afin d’éliminer la totalité du polycation ne s’étant pas fixé à la particule virale, les échantillons formulés ont été dialysés pendant 36 h. Seules les particules formulées avec 1 mg/mL de polycation ont été soumises à l’étape de dialyse. Suite à cette dernière, des mesures de DLS et de potentiel zêta ont été effectuées afin de vérifier l’intégrité des constructions développées (Tableau 19).

Tableau 19 : Caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues avant et après dialyse des suspensions préparées avec des solutions de polylysine à 1 mg/mL (PLL et P ϵ LL). n = 1.

Polylysine	Première dialyse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
PLL 4,2 kD	Avant	714 ± 77 (69 %) 126 ± 10 (31 %)	0,809	+4 ± 3
	Après	177 ± 10	0,159	-24 ± 6
PLL 21 kD	Avant	853 ± 44 (90 %) 84 ± 4 (10 %)	0,806	+10 ± 4
	Après	168 ± 10	0,216	-31 ± 5
PLL 52 kD	Avant	726 ± 38	0,851	+14 ± 4
	Après	1025 ± 37*	0,476	+13 ± 4
P ϵ LL 3,5 – 4,5 kD	Avant	179 ± 43 (87 %) 3527 ± 337 (13 %)*	0,240	-4 ± 2
	Après	419 ± 33	0,564	-7 ± 2

* Pour des particules de diamètre > 1 μ m, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

Les 2 PLL de poids moléculaires faible (4,2 kD) et intermédiaire (21 kD) ne restent pas adsorbées à la surface des particules virales suite à l'étape de dialyse. En effet, des valeurs de taille, de PDI ainsi que des potentiels zêta équivalents à ceux du virus nu sont retrouvées après dialyse.

Pour la P ϵ LL, on constate suite à l'étape de dialyse, la formation d'une population hétérogène à \approx 400 nm de diamètre mais dont la valeur de potentiel zêta reste toujours négative et équivalente à celle mesurée avant dialyse. Cette polylysine ne permet donc pas de recouvrir les particules virales mais il est possible qu'elle forme un complexe avec ces dernières.

En revanche pour la PLL de plus haut poids moléculaire (52 kD) on observe un diamètre moyen proche de celui mesuré avant dialyse, une valeur de PDI 2 fois moins importante et une valeur de potentiel zêta identique à celle mesurée avant l'étape de dialyse. La PLL de plus haut poids moléculaire reste donc adsorbée à la surface des particules virales et ce même après une dialyse ayant été prolongée de 30 h (soit 66 h de dialyse au total). Le recouvrement avec cette PLL de plus haut poids moléculaire est certainement favorisé par sa densité de charge plus importante. La légère augmentation de taille observée après la dialyse pourrait être expliquée par une déstabilisation de la particule au cours du processus de dialyse. Il faut noter que les diamètres mesurés sont proches du micron c'est-à-dire proche de la limite de mesure du Zetasizer ce qui pourrait expliquer cette différence avant/après dialyse. Après quelques jours de conservation à 4°C, la formation d'un fin précipité a été constatée dans cette formulation. Ce précipité se remet facilement en suspension suite à une agitation (Figure 68).

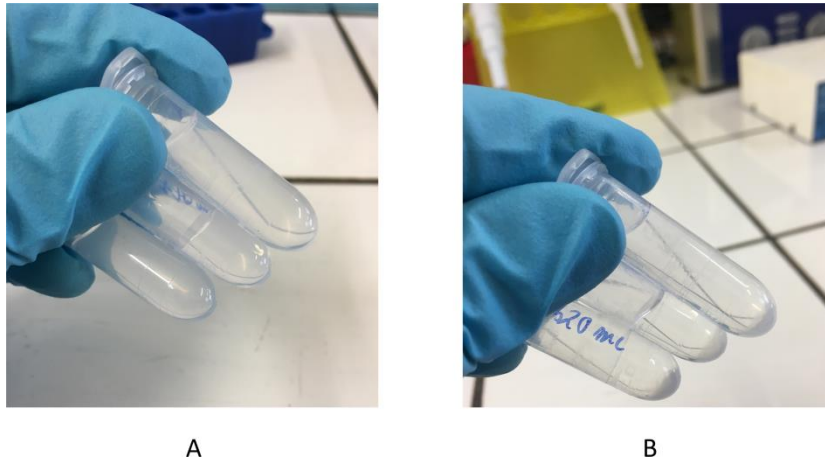


Figure 68 : Formulations de particules d'H5N1-PLL. Avant (A) et après (B) quelques jours de conservation à 4°C.

En conclusion, c'est donc la PLL de plus haut poids moléculaire (52 kD) à une concentration de 1,0 mg/mL qui sera utilisée pour la formulation de nos particules virales recouvertes d'une première couche de polycation.

1.4. Longueur et concentration du polymère anionique

Pour le recouvrement des particules d'H5N1-PLL par le polymère anionique, nous avons choisi d'utiliser du PGA de même poids moléculaire (64 kD) que celui employé pour la formulation des layersomes. En effet, comme un recouvrement des liposomes-PLL (Lp-PLL) a été observé avec ce polymère, nous avons décidé de l'utiliser pour ce projet. Au total, 2 concentrations de PGA 64 kD ont été testées pour le recouvrement des virus déjà recouverts de la première couche de PLL 52 kD à 1,0 mg/mL (Tableau 20). La même procédure de formulation que celle utilisée pour le recouvrement des liposomes avec le polyanion a été appliquée (Figure 69).

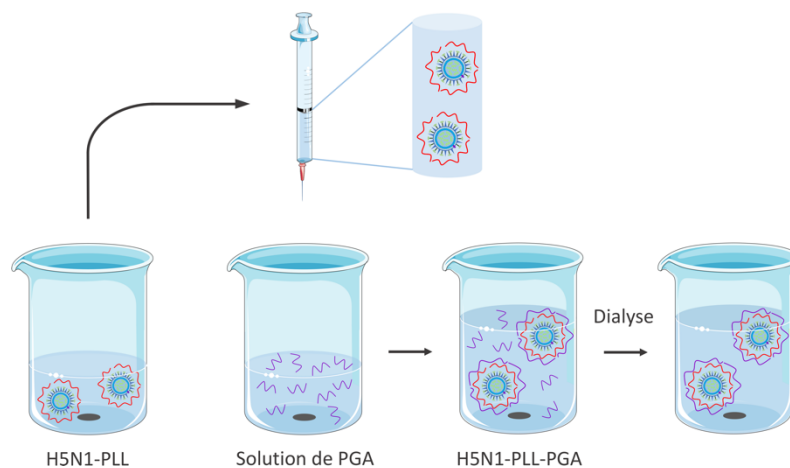


Figure 69 : Illustration de la procédure de formulation des particules d’H5N1-PLL recouvertes d’une couche de PGA.

Pour les 2 concentrations testées, avant dialyse, on constate la présence de 2 populations en taille suite à l’ajout du PGA : une dont le diamètre est $\geq 1 \mu\text{m}$ (à $\approx 80 \%$) et une autre dont la taille mesurée est moins importante. À une concentration en PGA de 2 mg/mL, on constate la présence de 2 populations en potentiel zêta. Suite à l’étape de dialyse et pour les 2 concentrations de PGA explorées, seule 1 population de diamètre proche de $1 \mu\text{m}$ et dont le potentiel zêta est négatif (entre -40 et -50 mV à $\approx 90 \%$) est détectée. Comme pour les formulations d’H5N1-PLL 52 kD, la formation d’un précipité a été observée après quelques jours de conservation des formulations à 4°C . Ce précipité se solubilise suite à l’homogénéisation de la suspension. Ces résultats semblent donc indiquer un recouvrement stable dans le temps de la particule avec le PGA 64 kD, et ce pour les 2 concentrations testées. Aucune différence majeure entre les 2 formulations préparées n’a été observée.

Tableau 20 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées avec 1 et 2 mg/mL de PGA 64 kD avant et après dialyse. n = 1.

Concentration en PGA 64 kD	Deuxième dialyse	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
1,0 mg/mL	Avant	1318 ± 136 (82 %)* 470 ± 53 (18 %)	0,446	-40 ± 4
	Après	1110 ± 81*	0,430	-41 ± 5 (88 %) -32 ± 2 (12 %)
2,0 mg/mL	Avant	1115 ± 83 (85 %)* 171 ± 11 (15 %)	0,680	-52 ± 3 (46 %) -38 ± 3 (54 %)
	Après	972 ± 99	0,521	-42 ± 5 (92 %) -27 ± 2 (8 %)

* Pour des particules de diamètre > 1 µm, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

En guise de contrôle négatif, du PGA 64 à 1,0 mg/mL a été ajouté de la même manière aux 2 formulations préparées avec de la PLL 4,2 et 21 kD. Le PGA n'a pas permis de recouvrir les particules virales. En effet, des valeurs d'intensité, de PDI et de potentiel zêta similaires à celles du virus nu ont été observées suite à l'addition du polymère aux suspensions (Tableau 21). Ces résultats confirment bien que l'adsorption du PGA dépend de l'adsorption préalable de la PLL aux particules virales. C'est donc le PGA 64 kD à une concentration de 1,0 mg/mL qui sera utilisé pour la formulation de nos particules virales recouvertes de la deuxième couche de polyanion.

Tableau 21 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées avec 1,0 mg/mL de PLL 4,2 et 21 kD puis avec 1,0 mg/mL de PGA 64 kD, avant et après ajout du polyanion. n = 1.

Polylysine	Ajout de PGA 64 kD	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
PLL 4,2 kD	Avant	177 ± 10	0,159	-24 ± 6
	Après	150 ± 13 (82 %) 1112 ± 222 (18 %)*	0,266	-26 ± 4
PLL 21 kD	Avant	168 ± 10	0,216	-31 ± 5
	Après	158 ± 17 (87 %) 548 ± 57 (13 %)	0,218	-31 ± 5

* Pour des particules de diamètre > 1 µm, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

Enfin, un mélange physique des 2 espèces polymériques sélectionnées pour la formulation de particules virales recouvertes (PLL 52 kD et PGA 64 kD) a été préparé. Suite au mélange de la PLL (1 mL à 0,5 mg/mL) au PGA (1 mL à 1 mg/mL), une opacification suivie d'une sédimentation quelques jours après la préparation de l'échantillon a été constatée. Comme pour les particules virales, des mesures de DLS et de potentiel zêta ont été effectuées et ont révélé la présence de particules de tailles micrométrique (1015 ± 47 nm) et de potentiel zêta négatif (-47 ± 4 mV). Au vu des résultats, il semblerait que les polymères forment un complexe de taille conséquente, et ce, même en l'absence de particules virales. Pour la suite de nos travaux, il conviendra donc de vérifier que les particules virales sont bien présentes au sein des couches de polymères formées.

1.5. Détermination de la méthode optimale de séparation des polymères excédentaires

Afin d'éliminer les espèces polymériques excédentaires, nous avons identifié 3 stratégies possibles : l'ultrafiltration, l'ultracentrifugation et la dialyse. Des essais préliminaires d'ultrafiltration de particules virales recouvertes de polymères de sucres ont été effectués par le VFL et il s'est avéré que les particules adhèrent aux membranes du tube d'ultrafiltration. Cette technique de séparation n'a donc pas été explorée par notre laboratoire pour l'élimination des polymères excédentaires. Du virus-PLL 52kD a été formulé et les caractéristiques physico-chimiques de la suspension finale ont été comparées avant et après ultracentrifugation ou dialyse (Tableau 22).

Tableau 22 : Caractérisation physico-chimique de suspensions avant et après ultracentrifugation et dialyse. n = 1.

Séparation	Étape	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Ultracentrifugation	Avant centrifugation	984 ± 38	0,314	$+22 \pm 4$
	Après centrifugation	171 ± 17	0,249	$+10 \pm 5$
Dialyse	Avant dialyse	726 ± 38	0,851	$+14 \pm 4$
	Après dialyse	$1025 \pm 37^*$	0,476	$+13 \pm 4$

* Pour des particules de diamètre $> 1 \mu\text{m}$, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

On constate que l'ultracentrifugation des particules virales conduit probablement à une désolidarisation de la couche de PLL 52 kD et de la particule virale. En effet, on mesure après centrifugation des valeurs de taille et de PDI similaires à celles du virus nu et une valeur de potentiel zêta toujours positive mais 2 fois moins importante qu'avant centrifugation. Cette technique de séparation n'est donc pas la plus adaptée pour l'élimination des espèces polymériques excédentaires. En revanche, l'étape de dialyse n'impacte pas la stabilité des particules puisqu'on retrouve les mêmes valeurs qu'avant dialyse. La dialyse a donc été sélectionnée pour la suite de nos travaux.

1.6. Comparaison de 2 stratégies de formulation

Tandis que pour la procédure utilisée jusqu'à présent la suspension virale est additionnée dans la solution de polymère (Figure 66 et Figure 69), dans cette étude nous avons inversé l'ordre en additionnant la solution de polymère dans la suspension virale. Comme pour la procédure classique de formulation, la solution de polymère est ajoutée à la suspension virale à volumes équivalents. En comparant les caractéristiques physico-chimiques des formulations obtenues, aucune différence significative n'a été observée. Les 2 stratégies de formulation permettent donc d'obtenir des particules de diamètre et de charge de surface équivalents suite à l'ajout de PLL et de PGA.

1.7. Reproductibilité et robustesse

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus pour le recouvrement des particules virales d'une première couche de PLL et d'une deuxième couche de PGA, de nouvelles particules recouvertes ont été formulées ($n = 4$), (Figure 70). Des résultats très similaires en termes de taille et de potentiel zêta ont été obtenus et ont ainsi pu confirmer la reproductibilité et la robustesse de la procédure de formulation développée.

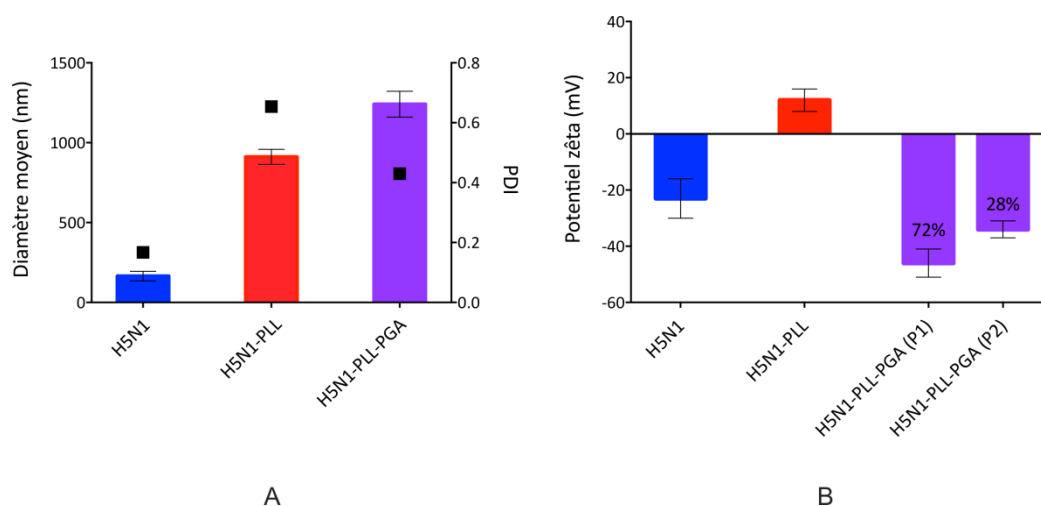


Figure 70 : Caractérisation des suspensions de virus nu, de virus-PLL et de virus-PLL-PGA. (A) Diamètre moyen (histogramme) et indice de polydispersité (PDI, carré noir) ; **(B)** potentiel zêta moyen. Formulations préparées avec 1,0 mg/mL de PLL 52 kD et de PGA 64 kD. **(P1)** : population 1 ; **(P2)** : population 2. n = 4.

Pour conclure sur cette première partie, nous avons identifié les conditions nécessaires à la formulation de particules virales H5N1 recouvertes de 2 couches de polymères, à savoir :

- l'utilisation d'une solution tampon de type PBS (sans $MgCl_2$ ni $CaCl_2$) pour la solubilisation des polymères et pour la dilution de la particule virale
- l'emploi d'une PLL de haut poids moléculaire (soit 52 kD) à une concentration de 1,0 mg/mL
- l'utilisation d'un PGA de poids moléculaire proche de celui de la PLL sélectionnée (soit 64 kD) à une concentration de 1,0 mg/mL
- et enfin, l'emploi de la dialyse pour l'élimination des polymères excédentaires.

Ainsi, 2 stratégies de formulation de particules virales H5N1 recouvertes ont été évaluées et comparées. D'après les paramètres physico-chimiques mesurés, aucune différence n'a pu être observée entre les suspensions obtenues via l'une ou l'autre méthode de formulation. La stratégie de formulation qui consiste à ajouter la particule virale H5N1 à la solution de polymère placée sous agitation a été retenue pour la suite de nos travaux (Figure 71). Cette stratégie s'est avérée reproductible et robuste.

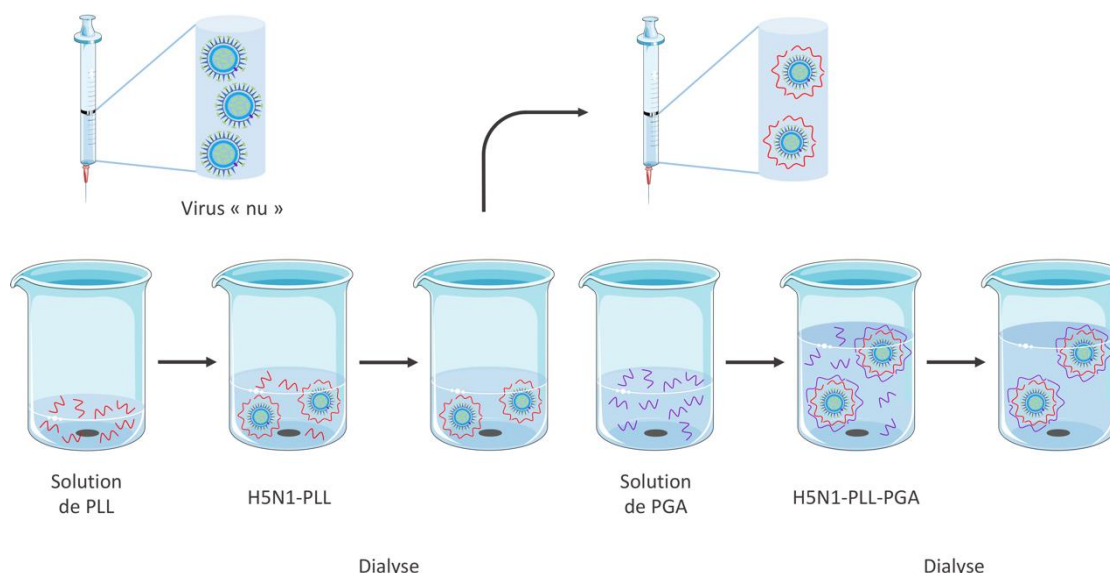


Figure 71 : Bilan de la procédure de formulation des particules de virus H5N1 recouvertes de 2 couches de polymères.

Il est à noter que des particules de taille micrométrique ont été obtenues de façon reproductible suite à l'ajout des particules virales d'environ 150 nm de diamètre dans les solutions de polymères. L'administration du vaccin antigrippal par voies sous-cutanée ou intramusculaire permet d'envisager des tailles de particules vaccinales de l'ordre du micromètre, dans la mesure où elles sont parfaitement maîtrisées.

2. Optimisation de la formulation et caractérisation des particules virales recouvertes pour l'évaluation *in vivo*

Dans la plupart des cas, l'épaisseur des couches de polymères et la réticulation s'avèrent être des paramètres importants pour le recouvrement de surface. En effet, quelques exemples référencés dans la littérature témoignent d'une dégradation retardée et d'une résistance accrue de matériaux suite à l'ajout de plusieurs bicouches de polyélectrolytes à leur surface et à leur réticulation.^{290,318} C'est la raison pour laquelle, dans la partie qui suit, nous avons développé et caractérisé des particules virales recouvertes jusqu'à 4 couches de polymères et des particules virales recouvertes de 2 couches de polymères qui ont été réticulées. La procédure de formulation développée pour l'ajout de 2 couches de polymères a été mise en œuvre et adaptée pour la formulation de ces particules. Certaines formulations ont été sélectionnées pour une évaluation *in vivo*.

2.1. Particules recouvertes de 1 à 4 couches de polymères

2.1.1. Particules recouvertes de 1 à 2 couches de polyélectrolytes

Afin d'induire une immunisation suffisante, les vaccins développés à partir de virus H5N1 entiers inactivés sont généralement administrés à des doses allant de 0,3 à 5 µg de HA chez la souris.^{352,353} D'après les standards de vaccination établis par le VFL (non publié), les vaccins sont administrés par voie sous-cutanée à une concentration en particules virales de 7,5 µg HA/mL pour une dose de 200 µL (soit 1,5 µg de HA). Pour obtenir des formulations avec une concentration finale > 7,5 µg HA/mL, il est nécessaire de les préparer avec des concentrations de départ plus importantes que celle utilisées lors de la mise au point. C'est pourquoi, en vue d'une évaluation *in vivo*, des formulations de particules virales recouvertes d'une (H5N1-PLL) et de 2 couches de polymères (H5N1-PLL-PGA) ont été préparées avec une concentration initiale en particules virales de 40 µg HA/mL (n = 3) au lieu des 30 µg HA/mL comme vu plus haut. Des valeurs de taille et de potentiel zêta similaires à celles mesurées au Zetasizer pour les formulations préparées avec 30 µg HA/mL ont été obtenues. Il est donc possible d'obtenir des particules de mêmes caractéristiques physico-chimiques avec une concentration initiale plus importante en particules virales. Ces formulations ont donc été sélectionnées pour une évaluation *in vivo* de leur potentiel immunogène.

Comme les tailles de ces 2 candidats vaccins sont proches voire au-dessus de la limite de mesure du Zetasizer, elles ont été mesurées à l'aide d'un granulomètre laser (Figure 72A et B). En effet, cet appareil de mesure est conçu pour la mesure d'objets microparticulaires. Des mesures au granulomètre laser ont également été effectuées pour le mélange physique de PLL et de PGA (Figure 72C). Un profil de taille similaire avec 2 populations principales dont une à ≈ 600 nm et une autre à ≈ 2,5 µm ainsi que quelques populations de 10 à 300 µm de diamètre a été obtenu pour ces 2 formulations. Pour le mélange physique, un profil de taille proche de celui des formulations recouvertes d'une et de 2 couches de polymères a également été obtenu. En effet, une population principale d'environ 600 nm de diamètre ainsi que d'autres populations de tailles plus importantes (entre 10 et 1200 µm) ont été mesurées. Comme supposé dans la section précédente, les polymères seuls se complexent pour former des particules de tailles micrométriques.

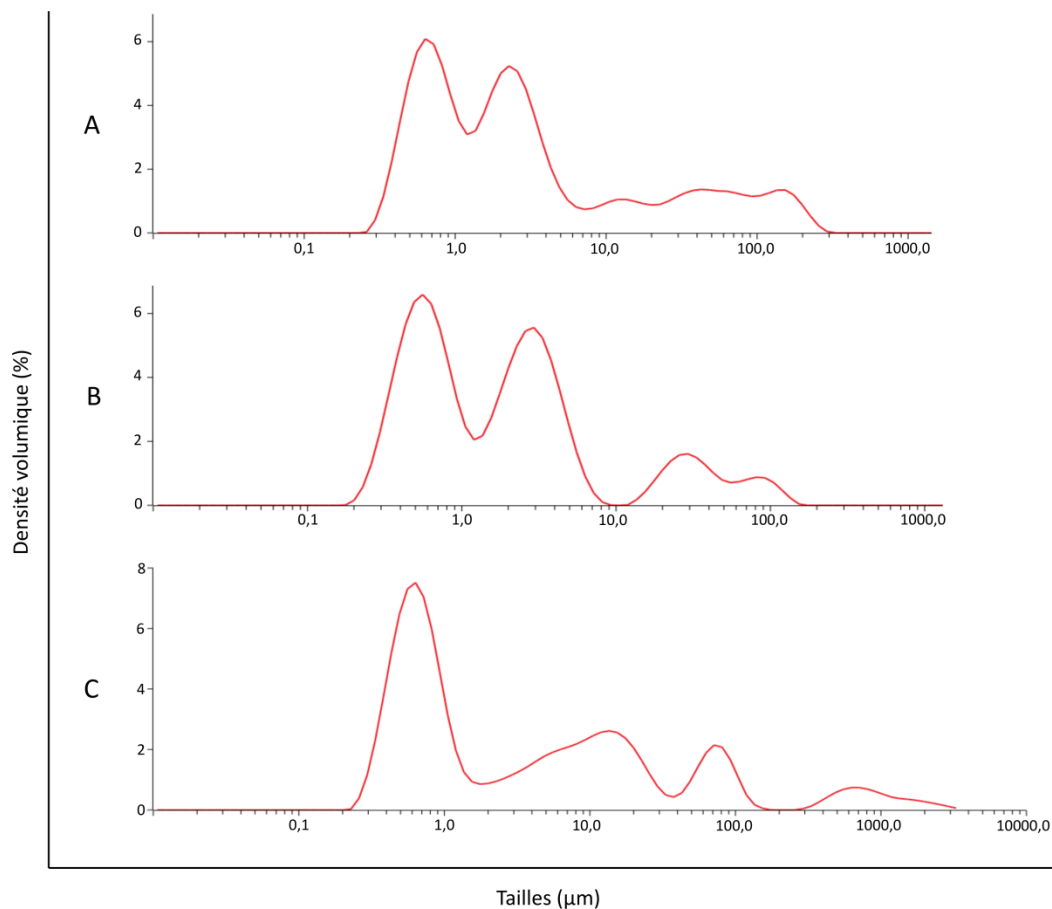


Figure 72 : Profils de taille des formulations de particules virales recouvertes d'une et de deux couches obtenus par diffraction laser. (A) : formulation d'H5N1-PLL ; (B) : formulation d'H5N1-PLL-PGA ; (C) : mélange physique (contrôle). L'axe des x est représenté par une échelle logarithmique. Pour chaque formule, un profil représentatif des 3 mesures a été retenu. n = 1.

2.1.2. Particules recouvertes de 3 à 4 couches de polyélectrolytes

Pour la formulation de particules recouvertes de 3 (H5N1-PLL-PGA-PLL) et 4 couches de polymères (H5N1-(PLL-PGA)₂), une concentration initiale en particules virales de 60 µg HA/mL a été utilisée. En effet, sachant que l'ajout de 2 couches supplémentaires de polymères dilue d'un facteur 4 nos échantillons et qu'il n'est pas envisageable de les concentrer, il était alors primordial de démarrer la formulation avec une concentration plus importante que celle définie précédemment (soit 30 µg HA/mL). Pour l'ajout de la troisième et quatrième couche de polyélectrolytes, la même procédure que celle développée pour l'ajout des 2 premières couches a été mise en œuvre. Au total, 2 formulations ont été

préparées avec des concentrations de 1,0 et 2,0 mg/mL de chacun des polymères. Au moment de l'ajout de la troisième et de la quatrième couche de polymère, une précipitation des échantillons a été observée, traduisant la formation de microparticules visibles à l'œil nu. Une quantité plus importante de particules précipitées s'est formée pour la suspension préparée avec des concentrations en polymères de 2,0 mg/mL. La formation d'une quantité plus importante de particules précipitées est certainement due à l'utilisation d'une concentration 2 fois plus importante de PLL et de PGA pour l'ajout de la troisième et quatrième couche de polymère.

Des valeurs de taille et de PDI similaires à celles obtenues pour les formulations de virus recouvertes de 2 couches de polymères (H5N1-PLL-PGA) ont été obtenues (Tableau 23). Des mesures de potentiel zêta ont également été effectuées pour les 2 formulations suite à l'ajout de la troisième et quatrième couche de polymère (Tableau 23). L'ajout de ces 2 couches supplémentaires a occasionné une inversion des valeurs de potentiel zêta pour les 2 suspensions préparées et des valeurs très proches ont été mesurées. La formation de particules visibles à l'œil nu ainsi que l'inversion de leurs valeurs de potentiel zêta laissent penser que ces 2 couches supplémentaires se sont bien adsorbées à la surface des particules virales et que des virus recouverts de 4 couches de polymères ont donc très certainement été formulés.

Tableau 23 : Caractérisation physico-chimique des particules virales recouvertes de 3 et 4 couches de polymère préparées avec 1,0 ou 2,0 mg/mL de PLL et de PGA. La formation d'un précipité a été constatée lors de l'ajout de la troisième et de la quatrième couche de polymère pour les 2 formulations préparées. n = 1.

Formulations	Concentration en polymères (mg/mL)	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
H5N1-PLL-PGA-PLL	1,0	778 ± 19	0,718	+19 ± 4
	2,0	786 ± 7	0,701	+16 ± 4
H5N1-(PLL-PGA) ₂	1,0	664 ± 16	0,725	-25 ± 4
	2,0	717 ± 13	0,183	-26 ± 5

Afin d'augmenter la concentration finale en vaccin, nous avons tenté de formuler des suspensions virales recouvertes de 3 et 4 couches de polymères à partir d'une concentration initiale de 80 µg HA/mL et d'une concentration en polymère de 1,0 mg/mL (n = 2). Des résultats de taille et de potentiel zêta similaires à ceux obtenus à partir de 60 µg HA/mL ont été obtenus. Une précipitation des échantillons a également été constatée suite à l'ajout de ces couches supplémentaires. La concentration en virus n'influence donc pas les caractéristiques physico-chimiques des particules virales recouvertes obtenues. Cependant, ces concentrations en virus ont été limitantes dans nos travaux et seules les particules recouvertes de 3 couches de polymères (H5N1-PLL-PGA-PLL) ont été retenues pour une évaluation *in vivo*. Au vu de la taille des objets formulés, des mesures de taille de cette suspension vaccinale ont été effectuées à l'aide d'un granulomètre laser. Des tailles importantes entre 10 et 60 µm ont été mesurées (Figure 73).

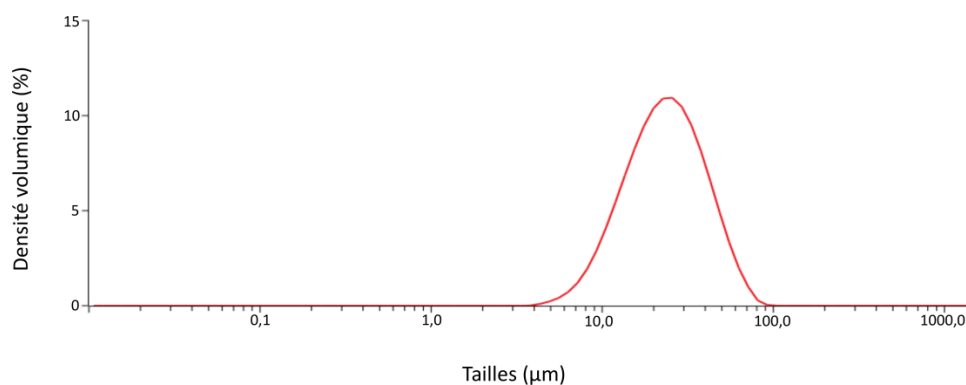


Figure 73 : Profil de taille obtenu par diffraction laser pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL. L'axe des x est représenté par une échelle logarithmique. Un profil représentatif des 3 mesurés a été retenu pour cette figure. n = 1.

2.2. Réticulation des couches de polymères sur les particules virales

Pour la réticulation des couches de polymères adsorbées à la surface des particules virales, nous avons souhaité procéder de la même manière que pour les layersomes, à savoir par ajout d'agents de couplage après la formulation, tels que le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS), et à l'aide d'une forme chimiquement réactive du PGA (PGA-sulfo-NHS) décrite dans le Chapitre 1 : sections B 2.3.1 page 99 et B.2.3.2 page 100.

2.2.1. Avec des agents de réticulation

Pour la réticulation des particules virales à l'aide d'agents de couplage, 2 formulations identiques de virus recouvert de 2 couches de polymères (H5N1-PLL-PGA) ont été préparées avec une concentration initiale de 40 µg HA/mL. Le pH d'une des suspensions a été ajusté à 6,0 avant l'ajout des agents de réticulation. En effet, il est avéré que l'EDC est plus réactif et que les rendements de couplage sont meilleurs à un pH proche de 6.³⁵⁴ Ensuite, des solutions d'EDC et de sulfo-NHS ont été ajoutées aux 2 formulations d'H5N1-PLL-PGA. Deux suspensions de particules virales nues de même concentration que les formulations et auxquelles ont été ajoutées les mêmes quantités d'agents de couplage ont été préparées et ont servi de contrôles. Le pH d'un des contrôles a été ajusté à 6,0 avant l'ajout des agents. Des mesures de taille et de potentiel zêta ont été effectuées après 4 h d'agitation des suspensions et 48 h post-réticulation (Tableau 24).

Comme lors du recouvrement classique du virus, on constate une augmentation du diamètre des formulations ainsi qu'une inversion des valeurs de potentiel zêta suite à l'ajout de la couche de PLL et de PGA. L'ajout des agents de couplage n'a occasionné aucun changement des caractéristiques physico-chimiques mesurées pour la suspension dont le pH n'a pas été ajusté (pH 7,4) et pour les 2 contrôles, et ce même 48 h post-réticulation. En revanche, un diamètre deux fois moins important ainsi qu'une valeur de PDI beaucoup plus grande ont été mesurés pour la suspension dont le pH a été ajusté à 6,0 directement après ajout des agents. Des valeurs de taille similaires à celles obtenues avant l'ajout ont ensuite été mesurées à 48 h post-réticulation.

Tableau 24 : Caractérisation physico-chimique des suspensions réticulées après ajout de la couche de PLL et de PGA, suite à la réticulation et 48 h post-réticulation. n = 1.

Étapes de formulation	Formulation	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Après ajout de PLL	pH 7,4	275 ± 10	0,787	+24 ± 5
	pH 6,0	260 ± 8	0,904	+17 ± 5
Après ajout de PGA	pH 7,4	1050 ± 35*	0,473	-27 ± 5
	pH 6,0	1151 ± 38*	0,176	-25 ± 5
Après réticulation	pH 7,4	1024 ± 34*	0,325	-25 ± 5
	pH 6,0	553 ± 11	0,674	-26 ± 4
48 h après réticulation	pH 7,4	1240 ± 53*	0,249	-27 ± 4
	pH 6,0	931 ± 37	0,633	-27 ± 4

* Pour des particules de diamètre > 1 µm, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

Au vu des résultats, 3 hypothèses sont envisageables :

- la réticulation des polymères n'a pas eu lieu
- la réticulation n'a pas d'impact sur les caractéristiques physico-chimiques mesurées
- la méthode utilisée pour la caractérisation de la réticulation n'est pas adéquate.

Aucun travail d'optimisation n'a été entrepris pour ces formulations développées. En effet, comme nous n'avons pas pu démontrer la réticulation et comme l'EDC présente un potentiel allergisant non négligeable,³⁵⁵ cette suspension n'a pas été retenue pour l'évaluation *in vivo*.

2.2.2. Avec une forme réactive du PGA

Pour cette deuxième stratégie de réticulation, 2 suspensions distinctes d'H5N1-PLL ont été préparées avec une concentration initiale de 40 µg HA/mL et ont été versées goutte à goutte dans une solution de PGA-sulfo-NHS de quantité molaire équivalente à celle du PGA classiquement utilisé. Le pH d'une des suspensions a ensuite été ajusté à 9,0. En effet, nous avons souhaité nous placer à la valeur de pK_a théorique de la PLL (pK_a = 9,0) afin de favoriser la réticulation de la PLL et du PGA. Des mesures de taille et de potentiel zêta ont été

effectuées suite à l'ajout du PGA-sulfo-NHS, 4 h après ajustement du pH d'une des suspensions et 48 h après l'ajout du PGA-sulfo-NHS (Tableau 25).

Comme lors du recouvrement classique du virus, l'ajout de PLL aux particules virales se traduit par une augmentation de leur diamètre et de leurs valeurs de PDI (> 0,3) ainsi que par une inversion de leurs valeurs de potentiel zêta. Suite à l'ajout du PGA-sulfo-NHS aux particules d'H5N1-PLL, une diminution de leur diamètre et de leurs valeurs de PDI (< 0,3), ainsi qu'une inversion de leurs valeurs de potentiel zêta sont constatées. Après ajustement du pH à 9,0 et 48 h après ajout du PGA-sulfo-NHS, aucune variation majeure de ces critères physico-chimiques n'est observée. Bien qu'on observe après ajout du PGA-sulfo-NHS des valeurs de taille moins importantes que celles obtenues suite au dépôt de la PLL, ces valeurs sont significativement supérieures à celles mesurées pour le virus nu (165 ± 30 nm). De plus, l'ajout du PGA-sulfo-NHS aux particules d'H5N1-PLL se traduit par une inversion de leurs valeurs de potentiel zêta. Ces résultats traduisent un recouvrement des particules d'H5N1-PLL avec un résultat cependant très différent en termes de taille et de PDI de celui obtenu avec du PGA non modifié.

Tableau 25 : Caractérisation physico-chimique des suspensions réticulées à l'aide de PGA-sulfo-NHS suite aux différentes étapes de formulation. n = 1.

Étapes de formulation	Formulation	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Après ajout de PLL	pH 7,4	258 ± 8	0,864	$+27 \pm 5$
	pH 9,0	308 ± 9	0,893	$+19 \pm 4$
Après ajout de PGA-sulfo-NHS	pH 7,4	242 ± 15	0,098	-31 ± 6
	pH 9,0	231 ± 17	0,119	-29 ± 5
4 h après ajustement du pH	/	/	/	/
	pH 9,0	222 ± 25	0,147	-27 ± 6
48 h après ajout de PGA-sulfo-NHS	pH 7,4	237 ± 15	0,116	-29 ± 6
	pH 9,0	227 ± 18	0,142	-28 ± 5

En effet, tandis que l'ajout de PGA conduit à la formation d'une population de particules très hétérogènes et $> 1 \mu\text{m}$, l'ajout de la forme réactive de ce dernier permet de former une population homogène de plus faible diamètre ($\approx 250 \text{ nm}$). Cette différence pourrait être expliquée par la réticulation du PLL et du PGA. En effet, la réticulation chimique induit certainement un changement de structure qui pourrait se traduire par une diminution de l'épaisseur des deux polymères réticulés par rapport aux mêmes polymères en l'absence de réticulation. Elle pourrait aussi être due à la structure différente du PGA utilisé. En effet, il est possible que le PGA-sulfo-NHS forme un complexe avec la PLL plus compact qu'avec le PGA non activé, le pK_a de la fonction acide sulfonique ($\approx -2,5$) étant bien plus faible que celui de la fonction acide carboxylique ($\approx 4,5$). Enfin, l'ajustement du pH ne semble pas avoir eu d'impact sur les critères physico-chimiques mesurés, puisqu'aucune différence n'a pu être détectée. Les travaux de caractérisation n'ont donc pas été poursuivis pour cette formulation dont le pH a été ajusté.

La suspension dont le pH n'a pas été ajusté a également été analysée par diffraction laser (LD). Trois populations ont été détectées dont 2 minoritaires d'environ 400 nm et $20 \mu\text{m}$ de diamètre et une majoritaire d'environ $115 \mu\text{m}$ de diamètre (Figure 74). Au vu des résultats, les tailles détectées par DLS ne sont pas représentatives de l'intégralité de l'échantillon. En effet, seule la population de 400 nm a été détectée par DLS et correspond seulement à $\approx 25 \%$ de la population totale mesurée par LD. Cette formulation a également été retenue pour une évaluation *in vivo* de son potentiel immunogène.

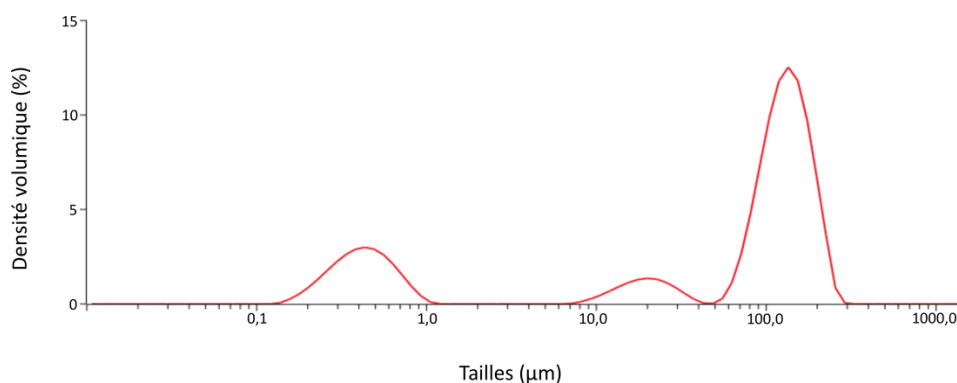


Figure 74 : Profil de taille obtenu par diffraction laser pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. L'axe des x est représenté par une échelle logarithmique. Un profil représentatif des 3 mesures a été retenu pour cette figure. $n = 1$.

2.3. Évaluation de la stabilité des candidats vaccins

La stabilité des particules virales recouvertes sélectionnées pour des tests *in vivo* a été évaluée en milieu tamponné sur un intervalle de 2 mois. Pour ce faire, des mesures de taille et de potentiel zêta des formulations conservées à 4°C ont été effectuées toutes les 2 semaines et les résultats obtenus ont été comparés. Pour toutes les formulations, les mêmes caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées pendant toute la durée de l'étude. Ces résultats témoignent de la stabilité des formulations développées en milieu tamponné lorsqu'elles sont conservées à 4°C.

2.4. Caractérisation microscopique des particules recouvertes

Afin de visualiser leur structure et de confirmer leur recouvrement, les formulations préparées pour l'évaluation *in vivo* ont été analysées par microscopie électronique à transmission (TEM). En plus de l'analyse par TEM, des particules virales recouvertes ont été formulées à l'aide de polymères greffés à des fluorophores et ont été analysées par microscopie confocale.

2.4.1. Caractérisation par microscopie électronique à transmission (TEM)

L'analyse par TEM nous a permis dans un premier temps d'estimer les tailles de nos constructions (Figure 75) :

- des particules de ≈ 150 nm de diamètre pour le virus nu
- des particules de $\approx 200 - 600$ nm de diamètre pour la formulation d'H5N1-PLL
- des particules de $\approx 400 - 600$ nm de diamètre et des agrégats de plusieurs microns pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA
- des particules de $\approx 250 - 500$ nm de diamètre et des agrégats de l'ordre du micron pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS
- et des particules de $\approx 100 - 200$ nm de diamètre et des agrégats de l'ordre du micron pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL

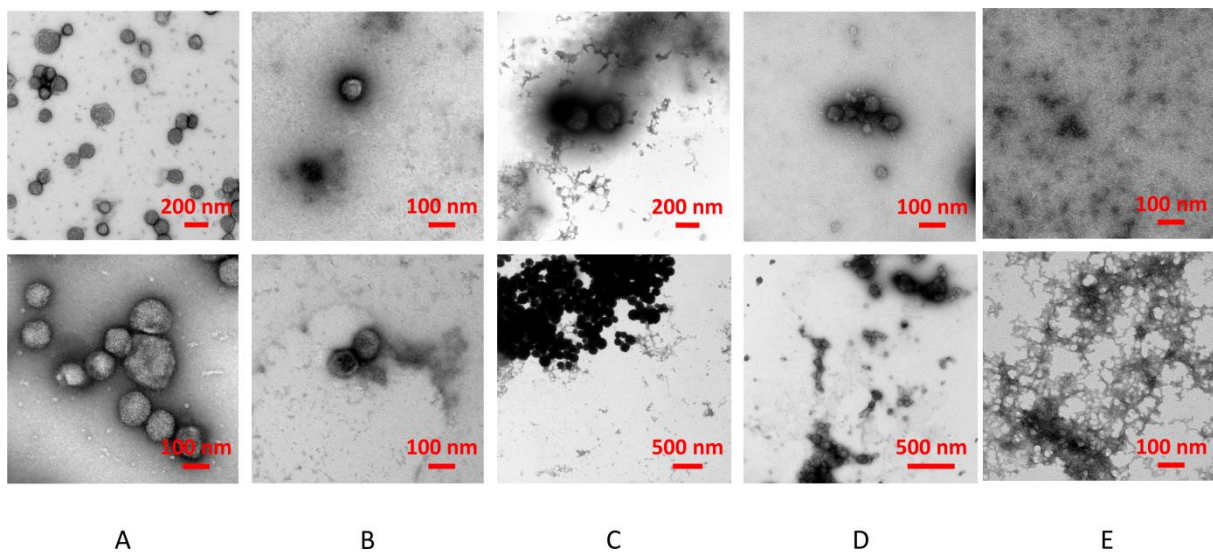


Figure 75 : Clichés de microscopie électronique à transmission des formulations de virus. (A) : Virus nu ; (B) : H5N1-PLL ; (C) : H5N1-PLL-PGA ; (D) : H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS (E) : H5N1-PLL-PGA-PLL.

Il est à noter que l'analyse TEM effectuée n'est pas représentative de toutes les tailles mesurées par LD pour certaines des formulations analysées. Par exemple, seule la population d'environ 200 à 600 nm de diamètre a été observée pour la suspension d'H5N1-PLL alors que son profil de taille a révélé une autre population à 2,5 μm en proportions importantes. Ce constat n'est pas étonnant dans la mesure où l'analyse microscopique ne permet pas toujours une analyse globale de l'échantillon. Il est également possible que lors de la préparation des échantillons à analyser, seulement une partie de ces derniers ait été déposée, ce qui expliquerait ces résultats. L'analyse par TEM nous a également permis de visualiser l'organisation structurale de nos formulations et du virus. Les

particules virales ont une surface bien nette et semblent former quelques agrégats. On peut même deviner les spicules formés par la HA (60 kD) à la surface de ces dernières. Pour la formulation d'H5N1-PLL, on note la présence d'une tache grise autour des particules virales : il s'agit de la PLL. Pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA, on constate la présence d'agrégats > 1 µm. Ces agrégats semblent très opaques : on a des particules sphériques agglomérées et de couleur noire. On note également la présence d'agrégats pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. Ces agrégats semblent contenir plusieurs particules virales très compactées dont la taille est inférieure à celle du virus nu. Pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL, un réseau polymérique dense formant des agrégats est observé. Néanmoins, on ne distingue plus les particules virales enfouies dans le réseau.

En conclusion, l'analyse par TEM a permis de visualiser la structure de nos candidats vaccin et d'observer un recouvrement des particules virales, à l'exception de la formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL dont le réseau polymérique observé est trop dense pour distinguer les entités virales. Pour chaque formulation préparée, une organisation bien particulière est constatée. Comme supposé précédemment, nos particules ont une tendance à l'agrégation.

2.4.2. Caractérisation par microscopie confocale

Afin de visualiser l'organisation des 2 polymères autour des particules virales et d'ainsi confirmer le recouvrement de ces dernières, nous avons formulé des virus recouverts de 2 polymères fluorescents en vue d'une analyse par microscopie confocale.

a. Synthèse des polymères fluorescents (notés ultérieurement PLL* et PGA*)

Quelques ajustements ont été nécessaires pour la synthèse de la PLL-rhodamine 52 kD. Dans un premier temps, les mêmes équivalents de fluorophore (rhodamine B isothiocyanate, RBITC) et de base organique (N,N-diisopropyléthylamine, DIEA) que ceux utilisées pour le marquage de la PLL 21 kD ont été appliquées pour le marquage fluorescent de la PLL 52 kD. Tandis qu'avec ces équivalents la PLL 21 kD a été greffée à 3 % sans impacter sa solubilité, un marquage de la PLL 52 kD a également été constaté mais sa solubilité a été modifiée. En effet, le polymère obtenu n'était pas hydrosoluble et avait l'aspect d'un gel (Figure 76A). L'obtention d'un gel était certainement dû à un greffage trop important du polymère. Afin d'obtenir une PLL moins greffée et plus hydrosoluble, 2 fois moins

d'équivalents de RBITC et 4 fois moins d'équivalents de DIEA ont été utilisés. Une PLL greffée à 3 % totalement hydrosoluble a été obtenue (Figure 76B et Figure 77). Le PGA-fluorescéine utilisé dans cette section a été obtenu par la même voie de synthèse que celle décrite dans le Chapitre 1 : B.1.7.1 page 82.

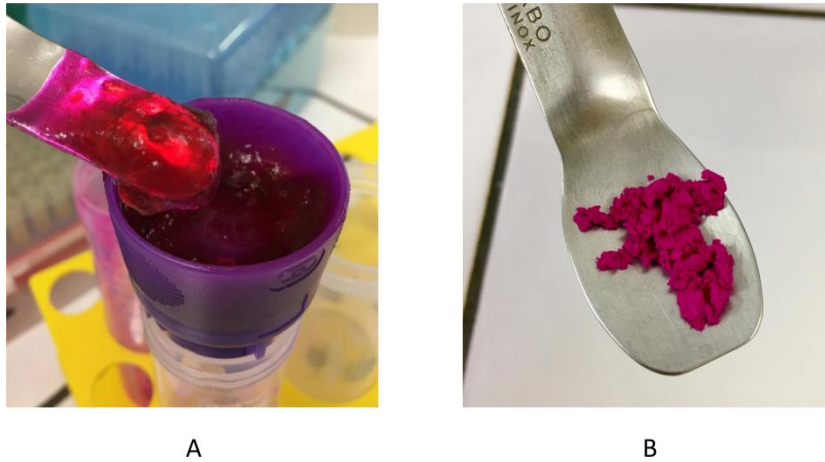


Figure 76 : PLL-rhodamine 52 kD obtenue. (A) après ajout de 10 éq. de DIEA et 0,1 éq. de RBITC pour 1 éq. de PLL **(B)** après ajout de 2,5 éq. de DIEA et 0,05 éq. de RBITC pour 1 éq. de PLL.

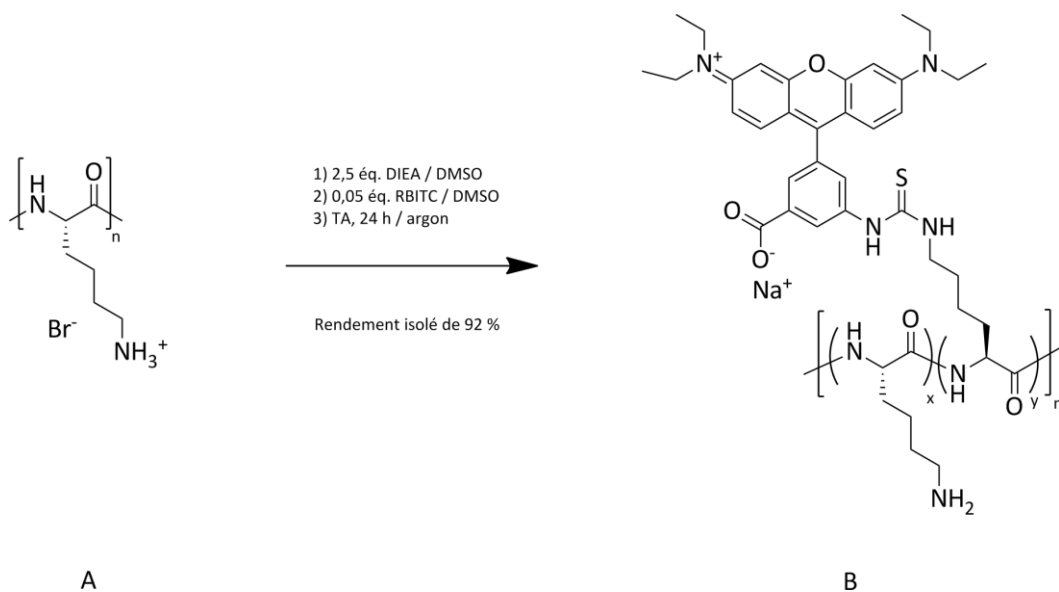


Figure 77 : Synthèse de la PLL-rhodamine 52 kD à partir de bromhydrate de PLL 52 kD, de RBITC et de DIEA. (A) : bromhydrate de PLL ; **(B) :** PLL-rhodamine. $n = x + y$; $n = 250$, $x \approx 243$ et $y \approx 7$, fonctions situées de manière randomisée les unes par rapport aux autres.

b. Formulation des particules virales fluorescentes

Deux suspensions de particules virales fluorescentes ont été préparées selon la même procédure de formulation que celle employée pour nos candidats vaccins (Figure 78), à savoir : une formulation recouverte de PLL* et de PGA*, désignée « H5N1-PLL*-PGA* » et une formulation recouverte de PLL non fluorescent et de PGA-fluorescéine, désignée « H5N1-PLL-PGA* » en guise de contrôle. En plus de ces formulations, une formulation d'H5N1-PLL-PGA non fluorescente ainsi qu'un mélange physique de PLL* et de PGA* (avec des proportions de polymères équivalentes à celles des formulations fluorescentes) ont été préparés en guise de contrôles. Les trois formulations ainsi que le mélange de polymères ont ensuite été caractérisés par des mesures de DLS et de potentiel zêta (Tableau 26) ainsi que par LD (Figure 79).

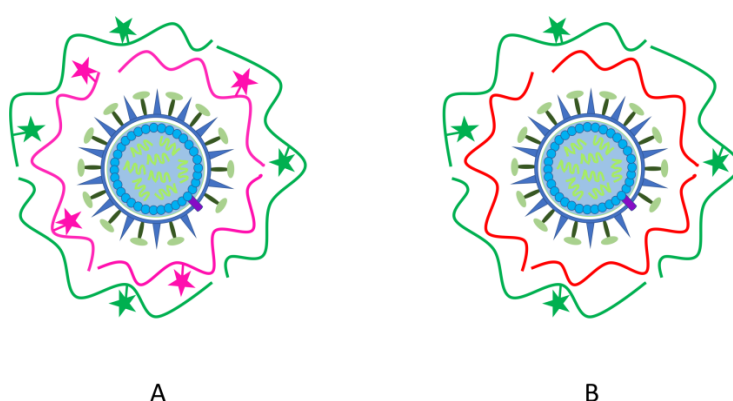


Figure 78 : Formulations préparées pour l'analyse par microscopie confocale. (A) : H5N1-PLL*-PGA* ; (B) : H5N1-PLL-PGA*.

c. Caractérisation physico-chimique des particules virales fluorescentes

La suspension d'H5N1-PLL*-PGA* présente des valeurs de DLS et de potentiel zêta équivalentes à celle de la suspension d'H5N1-PLL-PGA. En revanche, on constate une valeur de potentiel zêta 2 fois plus grande pour les particules d'H5N1-PLL* par rapport aux particules d'H5N1-PLL. Pour la suspension contrôle (H5N1-PLL-PGA*), des valeurs de taille et de potentiel zêta équivalentes à celles de la suspension d'H5N1-PLL-PGA sont mesurées, à l'exception d'une seule. En effet, l'ajout de la deuxième couche de PGA* à la surface des particules d'H5N1-PLL n'a pas engendré d'augmentation de taille comme pour les autres formulations. Pour le mélange physique de PLL* et de PGA*, on constate également la

formation de particules de diamètre ≈ 600 nm avec un potentiel zêta équivalent à celui des autres formulations recouvertes de 2 couches de polymères. Comme observé pour les polyélectrolytes non fluorescents, les 2 polymères greffés forment des particules de potentiel zêta négatif une fois mélangés.

Tableau 26 : Caractérisation physico-chimique des suspensions préparées pour l'analyse par microscopie confocale. n = 1.

Formulation	Nombre de couches	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
H5N1-PLL*-PGA*	H5N1-PLL*	416 \pm 19 (77 %) 92 \pm 5 (23 %)	0,585	+33 \pm 2
	H5N1-PLL*-PGA*	1199 \pm 25*	0,129	-36 \pm 3
H5N1-PLL-PGA*	H5N1-PLL	853 \pm 22	0,267	+16 \pm 2
	H5N1-PLL-PGA*	750 \pm 54	0,157	-38 \pm 3
H5N1-PLL-PGA	H5N1-PLL	781 \pm 13	0,250	+14 \pm 2
	H5N1-PLL-PGA	1435 \pm 66*	0,188	-40 \pm 4
Mélange de PLL* et de PGA*	/	586 \pm 51	0,072	-41 \pm 4

* Pour des particules de diamètre $> 1 \mu\text{m}$, le Zetasizer ne donne plus de résultats fiables.

L'analyse par LD des particules d'H5N1-PLL*-PGA* a révélé la présence de 4 populations de taille importante, à savoir : une majoritaire dont le diamètre moyen est de $\approx 10 \mu\text{m}$ et 3 autres minoritaires dont les tailles moyennes sont de ≈ 650 nm, $\approx 250 \mu\text{m}$ et $\approx 1050 \mu\text{m}$. Ces tailles mesurées sont bien plus importantes que celles détectées pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA (soit 2 populations majoritaires à ≈ 600 nm et $\approx 2,5 \mu\text{m}$). Pour les formulations d'H5N1-PLL-PGA, d'H5N1-PLL-PGA* ainsi que pour le mélange physique, un profil de taille très similaire est obtenu avec 2 populations, dont une majoritaire à ≈ 500 nm et une minoritaire à $\approx 2 \mu\text{m}$.

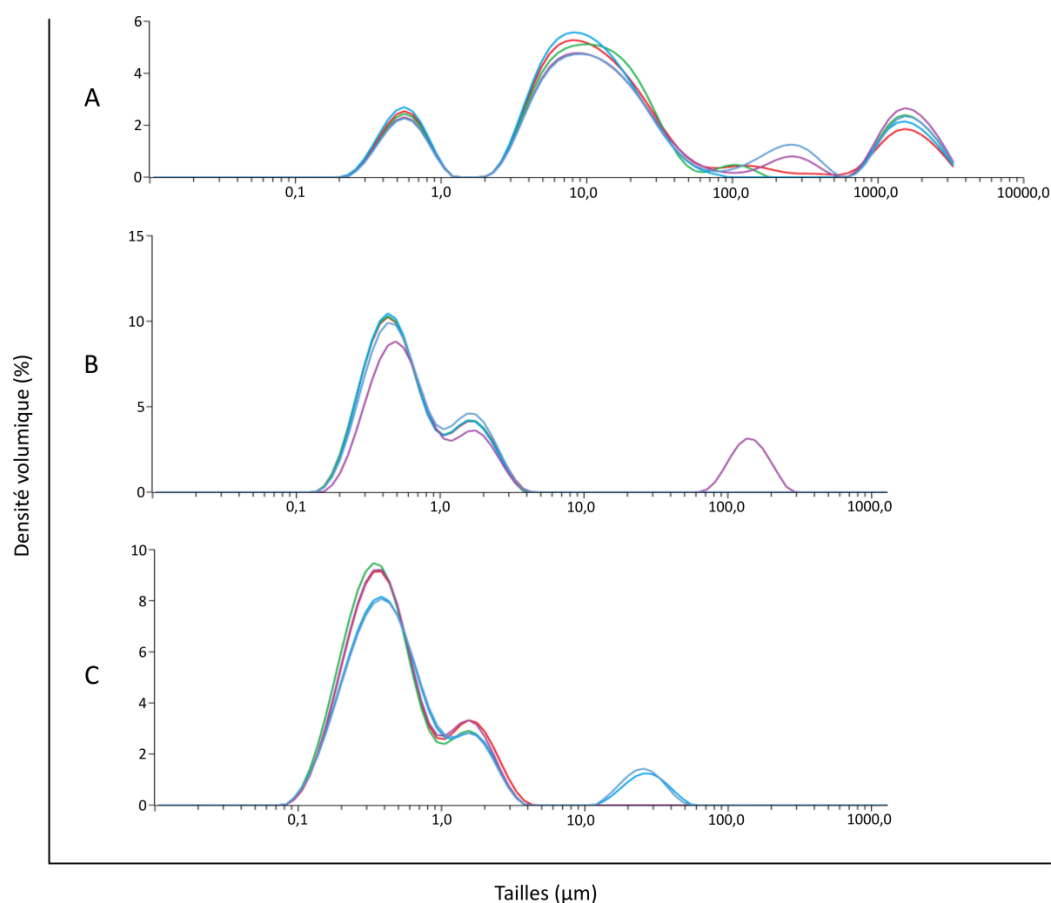


Figure 79 : Profils de taille obtenus par diffraction laser pour les formulations de virus utilisées pour une analyse par microscopie confocale. (A) : H5N1-PLL*-PGA* ; (B) : H5N1-PLL-PGA* ; (C) : mélange de PLL* et de PGA*. L'axe des x est représenté par une échelle logarithmique. Les profils représentés correspondent à la superposition de 5 mesures pour un même échantillon. n = 1

Des différences de taille ainsi que de potentiel zêta ont pu être observées entre la formulation d'H5N1-PLL*-PGA* et les formulations d'H5N1-PLL-PGA* et d'H5N1-PLL-PGA, qui présentent toutes deux un profil de taille proche de celui du mélange physique. Ces différences peuvent être expliquées par le greffage des polymères avec des molécules plus hydrophobes. En effet, même si les pourcentages de greffage sont faibles (3 % pour la PLL* et 0,6 % pour le PGA*), la présence de fluorophores semble avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques des polymères et donc sur la formulation des particules. Néanmoins, il semblerait que seule la PLL greffée soit responsable de ces différences. En effet, la formulation d'H5N1-PLL-PGA* présente un profil de taille et des valeurs de potentiel zêta similaires à celles de la formulation d'H5N1-PLL-PGA qui ne contient pas de polymères greffés. Au vu de ces différences, il est donc envisageable que ces particules fluorescentes ne

soient pas entièrement représentatives des particules non fluorescentes. Enfin, nous avons pu constater que le mélange physique de PLL* et de PGA* conduit à la formation de particules de 600 nm de diamètre en moyenne et une charge de surface négative, comme pour le mélange physique des polymères non fluorescents (PLL et PGA). Comme mentionné précédemment, ces deux polymères semblent former un complexe et ce, même en l'absence de particules virales.

d. Caractérisation microscopique des particules fluorescentes

Les 2 suspensions fluorescentes ainsi que le mélange physique de PLL* et de PGA* ont été analysés par microscopie confocale (Figure 80).

Pour la formulation d'H5N1-PLL*-PGA* et pour le mélange physique, les clichés de microscopie confocale révèlent une colocalisation évidente des 2 espèces polymériques. On constate des tailles différentes pour ces 2 échantillons ainsi que pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA*. En effet, on observe des particules avec des tailles allant de 5 à 10 μm pour la formulation d'H5N1-PLL*-PGA*. Pour la formulation contrôle d'H5N1-PLL-PGA*, on observe seulement à 488 nm des particules plus petites que pour la suspension d'H5N1-PLL*-PGA* (entre 500 nm et 2 μm de diamètre). Enfin, on constate pour le mélange physique la présence de particules de taille équivalente voire un peu inférieure à celles observées pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA*.

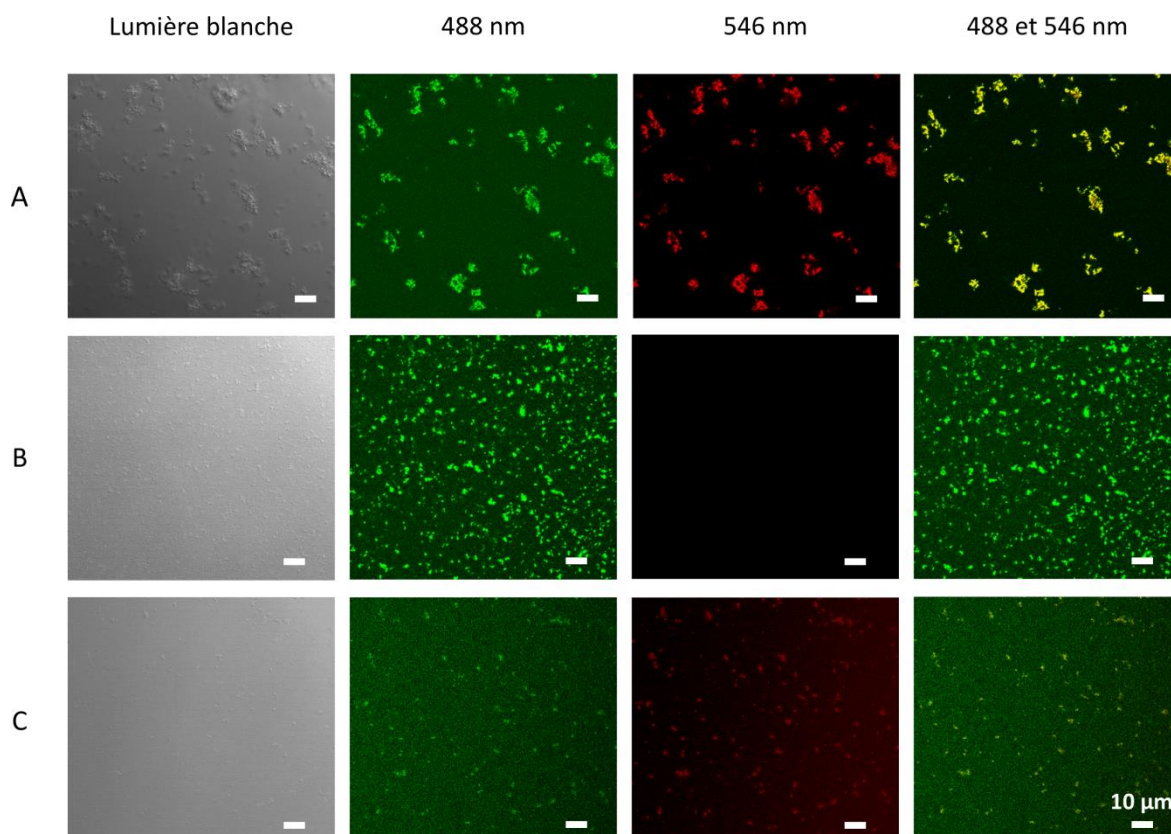


Figure 80 : Clichés de microscopie confocale des formulations de virus. (A) : H5N1-PLL*-PGA* ; (B) ; H5N1-PLL-PGA* ; (C) : mélange de PLL* et de PGA*.

En conclusion, une colocalisation des 2 espèces polymériques ainsi que la formation de particules est observée pour la formulation d'H5N1-PLL*-PGA* et pour le mélange physique. Il y a donc une complexation des espèces polymériques aussi bien pour la formulation vaccinale que pour le mélange simple des polymères. Cependant, les particules formées diffèrent en taille pour ces 2 échantillons, tandis que les tailles mesurées pour le mélange physique sont similaires à celles observées pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA*. Comme énoncé précédemment, cette différence de taille pourrait être due au greffage de la PLL qui influence son adsorption à la particule virale modifiant ainsi l'organisation structurale de la particule recouverte. De plus, il est à noter que les tailles mesurées par microscopie coïncident pour ces 3 échantillons avec celles déterminées par LD. Ces résultats sont donc en corrélation avec les mesures effectuées par granulométrie. Ils confirment le recouvrement des particules virales par les deux polymères.

2.5. Travaux additionnels sur l'élimination des espèces polymériques

Stratégie

Afin de caractériser davantage nos formulations, nous avons souhaité estimer la quantité de polymères restant à la surface des particules virales suite à l'étape de dialyse. Comme les particules virales sont constituées en partie de protéines et de polypeptides, il n'était pas envisageable de déterminer la quantité de polymères adsorbée aux particules par des techniques de dosage des protéines classiquement utilisés, tels que la lecture par absorbance à 280 nm ou encore la méthode de Bradford. Nous avons donc effectué des mesures de fluorescence des formulations préparées avec les polymères greffés (PLL* et PGA*) avant et après chaque étape de dialyse afin de déterminer les quantités de polymères restant adsorbées aux virus.

Résultats

Des mesures de fluorescence ont été effectuées pour les 3 formulations préparées pour l'analyse par microscopie confocale (H5N1-PLL*-PGA*, H5N1-PLL-PGA* et H5N1-PLL-PGA). Les mesures ont été réalisées au NanoDrop aux longueurs d'ondes d'émission de la rhodamine B (546 nm) et de la fluorescéine (488 nm), et ce, après chaque ajout de polymère et après dialyse (Figure 81).

Pour la formulation préparée avec des polymères non marqués (H5N1-PLL-PGA), un faible signal de fluorescence est détecté aux 2 longueurs d'onde d'émission suite à l'ajout de chaque espèce polymérique et après leur dialyse respective. Il est possible que les 2 polymères non couplés auto-fluorescent, ce qui expliquerait la détection de ce faible signal. De plus, pour ce contrôle, le signal de fluorescence est diminué suite à la première étape de dialyse alors qu'il est équivalent avant et après la deuxième. Ces résultats semblent indiquer qu'une bonne partie de la PLL est éliminée par dialyse alors que le PGA ne l'est pas.

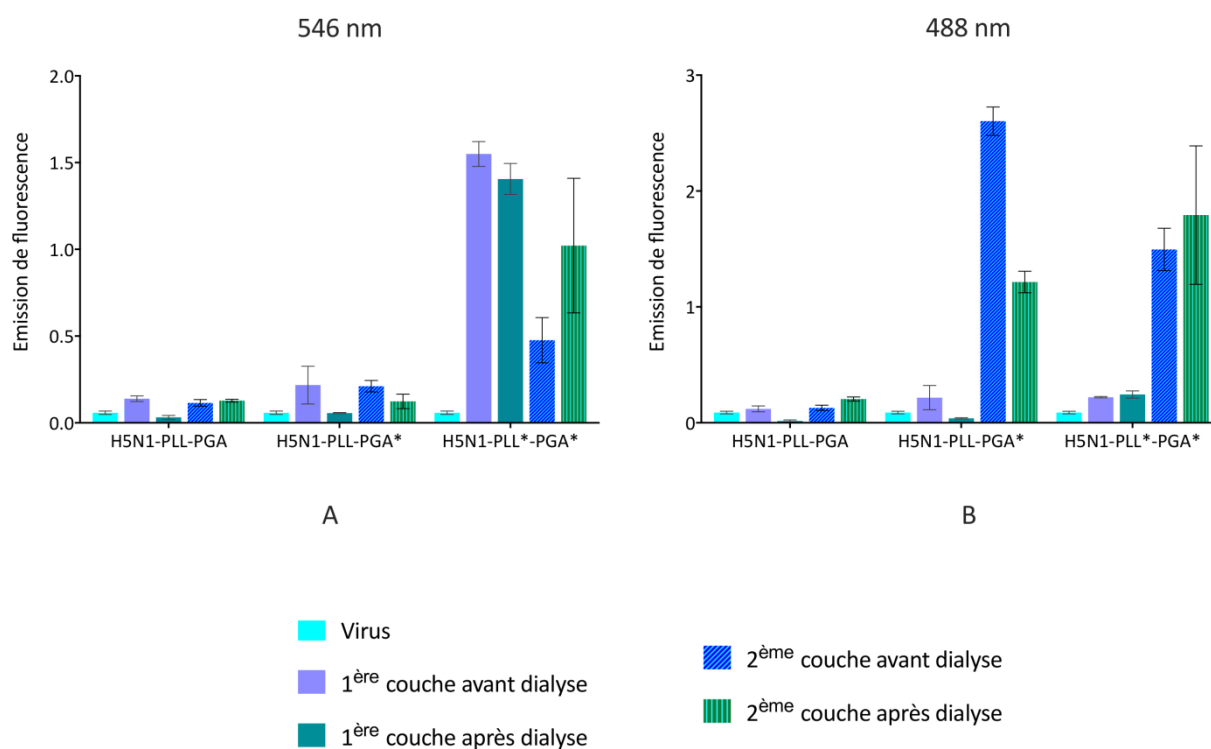


Figure 81 : Mesures de fluorescence des formulations préparées pour l'étude de l'élimination des polymères durant le processus de dialyse. (A) : 546 nm ; (B) : 488 nm. Première couche : PLL/PLL* et deuxième couche : PGA/PGA*. n = 1.

Pour la formulation d'H5N1-PLL-PGA*, une faible émission de fluorescence est mesurée à 546 nm avant ajout de chaque polymère et après leur dialyse respective. Ces résultats sont cohérents dans la mesure où aucun des 2 polymères utilisés n'est capable de fluorescer à cette longueur d'onde. Comme pour le contrôle négatif, ce signal de faible intensité est certainement dû à l'autofluorescence des polymères. De plus, des valeurs d'émission de fluorescence similaires à celles du contrôle négatif sont constatées à cette longueur d'onde avant et après dialyse des polymères. Par ailleurs, des intensités de fluorescence équivalentes à celles mesurées à 546 nm sont détectées à 488 nm avant ajout de la PLL et après sa dialyse. En effet, la PLL non marquée ne peut pas fluorescer. En revanche, on constate pour cette longueur d'onde un signal de fluorescence bien plus conséquent suite à l'ajout et après dialyse du PGA*. En effet, le PGA* fluoresce à cette longueur d'onde, d'où l'obtention d'un signal bien plus intense. On constate cependant une différence significative avant et après dialyse. En effet, une intensité 2 fois moins importante est mesurée après dialyse, ce qui semble indiquer que du PGA non lié est éliminé après cette étape.

Pour la formulation préparée avec les 2 polymères fluorescents, une forte émission de fluorescence est détectée à 546 nm suite à l'ajout de PLL* et de PGA* et après leur dialyse respective. En effet, la PLL* fluoresce à cette longueur d'onde, d'où l'obtention d'un signal conséquent qui est d'ailleurs légèrement réduit suite à la dialyse. Le signal fluorescent mesuré à 546 nm avant et après dialyse du PGA* provient de la PLL*. Néanmoins, on constate que l'intensité de ce signal est moins conséquente suite à l'ajout du PGA. Il est possible que l'ajout du PGA* ait modifié l'environnement physico-chimique de la PLL* changeant ainsi ses propriétés de fluorescence, d'où l'obtention d'un signal réduit. Comme attendu, un signal de fluorescence de faible intensité est mesuré à 488 nm suite à l'ajout de PLL et à sa dialyse. Cette fois-ci le signal fluorescent mesuré après l'ajout de la PLL est équivalent à celui après dialyse. Enfin, des intensités de fluorescence plus importantes sont mesurées à cette même longueur d'onde suite à l'ajout et à la dialyse du PGA*. Il est cependant difficile de conclure quant à l'élimination du PGA* après dialyse puisque la barre d'erreur de cette mesure est très importante.

Il est difficile de conclure quant à l'élimination de la PLL durant le processus de dialyse. Tout d'abord, des barres d'erreur importantes sont obtenues pour la formulation d'H5N1-PLL*-PGA*. Ensuite, des résultats contradictoires sont observés pour les 2 contrôles. Tandis que le PGA semble être éliminé par dialyse pour le contrôle d'H5N1-PLL-PGA*, il ne l'est pas vraiment pour le contrôle négatif. Cette différence de résultats est certainement due au greffage de nos polymères. En effet, comme déjà discuté précédemment, le greffage de polymères hydrosolubles à des molécules plus hydrophobes modifie leurs propriétés physico-chimiques. Ces faibles modifications peuvent renforcer leur interaction avec les particules virales qui sont constituées d'une enveloppe lipidique et ainsi réduire leur élimination par dialyse.

Pour conclure sur cette partie, la procédure de formulation mise point a été adaptée pour la préparation de particules virales recouvertes jusqu'à 4 couches de polyélectrolytes et de particules dont les couches de polymères ont été réticulées. Les formulations pertinentes et satisfaisant les critères de concentration en particules virales fixés par l'OMS ont été retenues pour une évaluation *in vivo* de leur potentiel immunogène, à savoir :

- le virus recouvert d'une seule couche de PLL
- le virus recouvert de PLL et de PGA
- le virus recouvert de 3 couches de polyélectrolytes
- le virus recouvert de PLL et de PGA réticulés

En plus d'une caractérisation par des mesures de DLS et de potentiel zêta, ces candidats vaccins ont été analysés par LD et par TEM. Différents profils de tailles ont été observés par LD pour chaque candidat avec des diamètres mesurés proches voire supérieurs au micron. La microscopie électronique a permis de visualiser le recouvrement des particules virales par les espèces polymériques ainsi que d'observer une organisation structurale propre à chaque formulation vaccinale avec pour certaines, une nette tendance à l'agrégation.

De plus, des formulations de particules virales recouvertes de polymères fluorescents ont été préparées pour une analyse par microscopie confocale. L'analyse microscopique de ces formulations a révélé une colocalisation des 2 polymères, témoignant d'une complexation des 2 polyélectrolytes. Les formulations recouvertes de polymères fluorescents n'ont pas permis de conclure quant à l'élimination des polymères après dialyse. En effet, leur greffage semble avoir altéré leurs propriétés physico-chimiques et ainsi modifié leurs propriétés d'adsorption aux particules virales.

3. Évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire de virus H5N1 enrobés de polymères

Dans le cadre de notre étude, nous avons procédé à l'évaluation de la réponse immunitaire induite par nos candidats vaccins. Une fois nos suspensions vaccinales caractérisées, ces dernières ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris C57Bl/6 âgées de 7 semaines. Différents tests immunologiques ont ensuite été réalisés afin d'évaluer la réponse humorale dirigée contre l'hémagglutinine des virus enrobés ainsi que la production de certaines molécules (les cytokines) témoignant de la réponse cellulaire potentiellement mise en place.

3.1. Description générale de la réponse immunitaire suite à une infection par le virus de la grippe

Dans le cas d'une infection par le virus de la grippe, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMP) viraux sont reconnus par les cellules infectées via des récepteurs membranaires appelés les pattern recognition receptor (PRR) (Figure 82). La stimulation de ces PRR conduit à la sécrétion d'interférons I (IFN-I) et de cytokines pro-inflammatoires. Les IFN-I favorisent l'activation des cellules de l'immunité innée comme les cellules natural killer (NK) qui vont d'une part lyser les cellules infectées et d'autre part produire de l'interféron γ (IFN- γ). La sécrétion d'IFN- γ et d'IFN-I va permettre l'activation de la réponse immunitaire adaptative. En effet, ces cytokines vont induire la maturation des cellules dendritiques (DC), les MAMP participent aussi à cette maturation. Après leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate...), les DC matures, qui ont appréhendé des peptides issus de la dégradation du virus et les ont associés aux molécules membranaires du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), vont activer la différenciation des lymphocytes T de type T CD4⁺ ou T CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ qui ont reconnu des peptides associés au CMH de classe II vont se différencier en lymphocytes T-helper de type 1 (Th1) producteurs d'IFN- γ . Cette réponse Th1 favorise la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL), eux aussi producteurs d'IFN- γ et d'IL-2. Pour cela, les lymphocytes T CD8⁺ doivent avoir reconnu un peptide viral associé au CMH de classe I présenté par la DC mature. Les CTL quittent alors les organes lymphoïdes secondaires pour se diriger vers le lieu de l'infection. Ils vont induire la mort des cellules infectées en reconnaissant, via le T Cell Receptor (TCR), le peptide viral associé au CMH1. La réponse Th1 favorise également la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant d'anticorps d'isotypes particuliers (IgG2). Les anticorps sécrétés vont conduire à la neutralisation des particules virales ou vont favoriser la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC) des cellules NK, permettant ainsi de limiter l'infection et d'éliminer les cellules infectées.

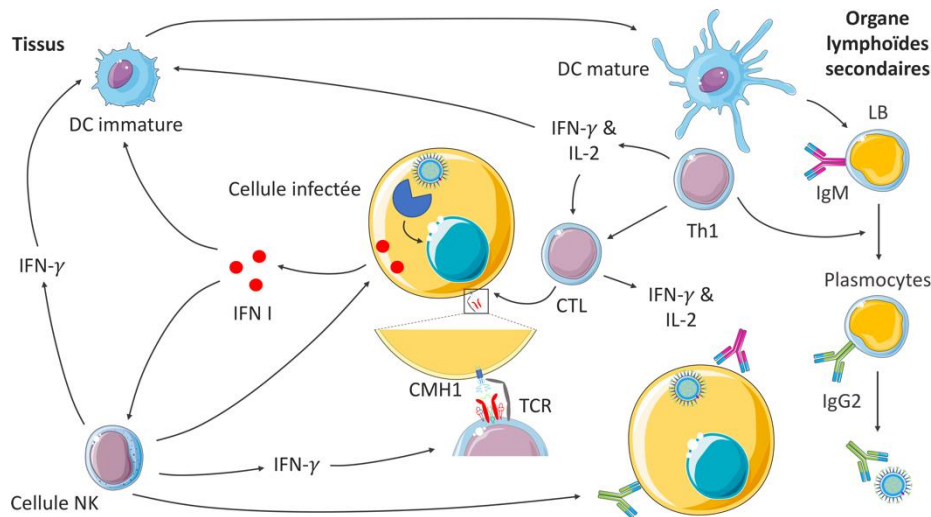


Figure 82 : Réponse immunitaire suite à une infection par le virus influenza. Une cellule infectée reconnaît les MAMP viraux et sécrète des IFN-I ainsi que des cytokines pro-inflammatoires favorisant l’activation des cellules NK qui vont lyser les cellules infectées et produire de l’IFN-γ. Ce contexte cytokinique va permettre la maturation des DC qui peuvent alors induire une réponse Th1 au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les Th1 vont permettre la différenciation des CTL qui vont alors lyser les cellules infectées suite à la reconnaissance par le TCR d’un peptide viral associé au CMH1. Les Th1 vont également permettre l’activation des lymphocytes B qui vont sécréter certains isotypes d’anticorps permettant soit une neutralisation des particules virales, soit une réponse ADCC. D’après la référence ³⁵⁶.

3.2. Évaluation de la réponse humorale dirigée contre l’hémagglutinine des virus enrobés

Dans un premier temps, la réponse humorale spécifique du virus H5N1 a été évaluée en déterminant le titre en anticorps par un test d’inhibition de l’hémagglutination. Il s’agit d’une procédure de laboratoire classiquement utilisée pour la détection et la classification des virus de la grippe ainsi que pour la quantification d’anticorps produits contre ces virus.³⁵⁷ Elle est basée sur le principe de l’hémagglutination. L’hémagglutination fait référence à la protéine HA des virus de la grippe qui est capable de se lier aux hématies et ainsi entraîner leur sédimentation. Ce phénomène d’agglutination permet de rapidement quantifier les particules de virus influenza présentes dans un échantillon. Cependant, en présence d’anticorps spécifiques au virus (anti-hémagglutinine), ces derniers empêchent la fixation des globules rouges aux particules virales et le phénomène d’hémagglutination est ainsi inhibé. De ce fait, ce test est classiquement utilisé pour déterminer le taux d’anticorps

sériques produits suite à une immunisation. Dans notre cas, nous souhaitons quantifier à intervalles de temps réguliers les titres d'anticorps produits (c'est-à-dire la dernière dilution des sérums qui inhibe l'agglutination) suite à l'injection de nos formulations afin de vérifier si la présence de polymères à la surface des particules virales a permis de différer (par rapport aux contrôles) la production de ces anticorps. 200 µl de chaque candidat vaccin ont été injectés aux souris par voie sous-cutanée à une concentration de 1,5 µg HA/dose. Des prélèvements sanguins ont donc été effectués aux jours 14, 35, 56 et 70 et des tests d'inhibition de l'hémagglutination ont été réalisés avec le sérum des souris (**Erreur !**

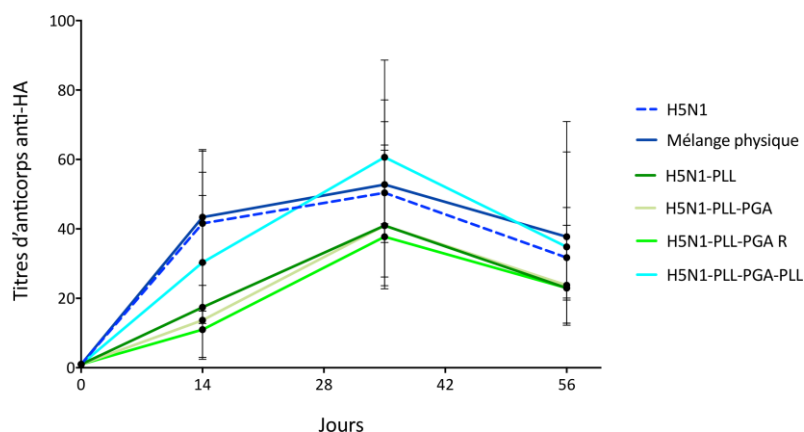


Figure 83 : Titres d'anticorps anti-HA produits aux jours 14, 28, 42 et 56. H5N1-PLL-PGA R : formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. Les candidats vaccins et les contrôles (virus H5N1 nu et mélange physique) ont été administrés à des souris puis des prélèvements sanguins ont été effectués à intervalles de temps réguliers. Les titres d'anticorps ont été obtenus par un test d'inhibition de l'hémagglutination et correspondent à la dernière dilution des sérums qui inhibe l'agglutination. Les résultats sont représentés sous forme de points et correspondent à la moyenne obtenue au sein d'un même groupe de souris \pm l'écart type. n = 5.

Référence non valide pour un signet.).

L'addition des polymères aux virus par simple mélange ne semble pas augmenter la production d'anticorps spécifiques du virus. Il faut noter que les polymères ne semblent pas réduire l'antigénicité des particules virales. En effet, les courbes obtenues avec le virus nu et le mélange physique sont similaires. De plus, on constate que les 4 formulations induisent une production d'anticorps démontrant que le recouvrement LbL n'a pas empêché la

reconnaissance et l'apprêtement du virus par le système immunitaire. Cependant, sur toute la durée de l'expérience, la production d'anticorps apparait moins importante que pour les contrôles, à l'exception de la formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL qui semble avoir induit une sécrétion d'anticorps un peu plus importante au jour 35.

De plus, il semblerait que la production d'anticorps soit plus progressive pour ces 4 formulations que pour les contrôles. En effet, on constate au 35^{ème} jour une production 2 à 2,5 fois plus importante (un titre de 60 pour H5N1-PLL-PGA-PLL et un titre de 40 pour les autres) qu'au 14^{ème} jour (un titre de 30 pour H5N1-PLL-PGA-PLL et un titre de 15 pour les autres) alors qu'une réponse seulement 1,25 fois plus importante au jour 35 (un titre de 50) qu'au jour 14 (un titre de 40) est observée pour le virus nu et le mélange physique. Si cette tendance est confirmée, il est possible que le recouvrement LbL des particules virales ait légèrement différé la production d'anticorps entre les jours 14 et 35. Néanmoins, il semblerait que, comme pour les contrôles, les titres d'anticorps produits diminuent entre le jour 35 et 56. Si cette tendance est elle aussi validée, le recouvrement couche par couche des particules virales n'aura pas produit le résultat escompté, à savoir prolonger la production des anticorps. Cependant, au vu des écarts types importants et d'après l'analyse ANOVA à un facteur (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.** et Figure 84), les tendances observées ne sont pas significatives.

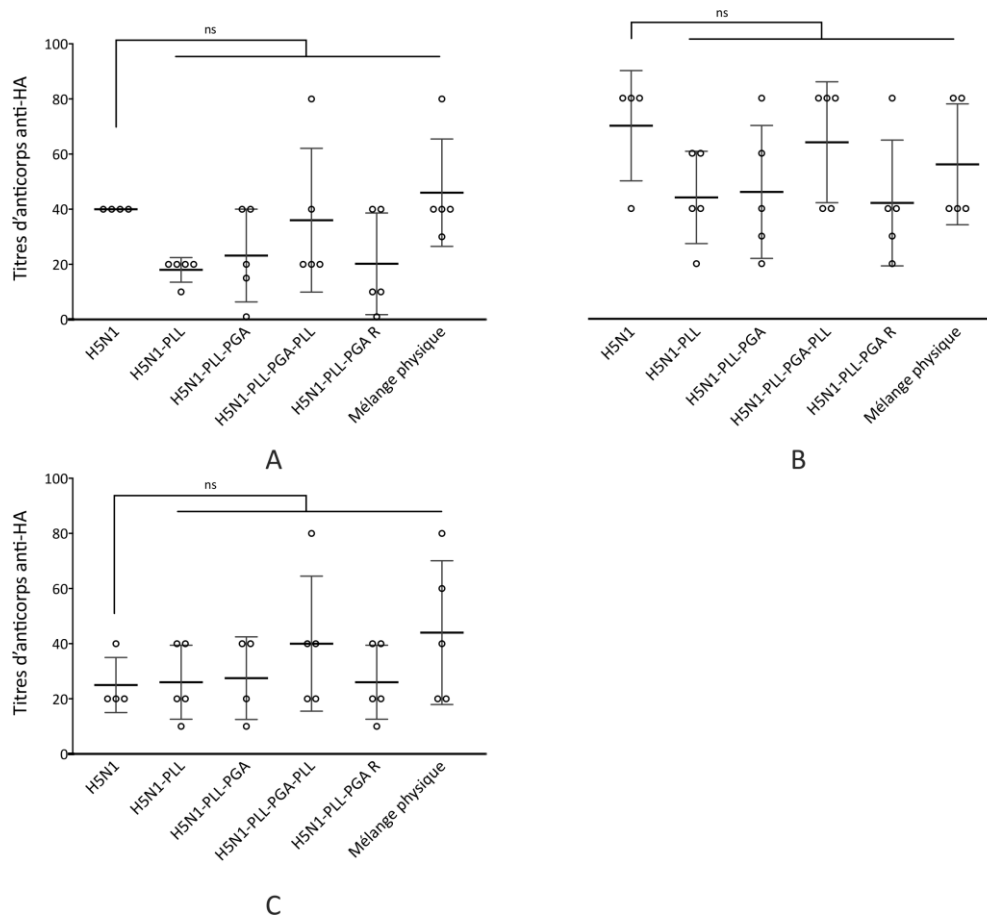


Figure 84 : Titres d'anticorps anti-HA produits aux jours 14, 35 et 56. (A) : jour 14 ; (B) : jour 35 ; (C) : jour 56. H5N1-PLL-PGA R : formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. Nos candidats vaccins et les contrôles (virus H5N1 nu et mélange physique) ont été administrés à des souris puis des prélèvements sanguins ont été effectués à intervalles de temps régulier. Les titres d'anticorps ont été obtenus par un test d'inhibition de l'hémagglutination et correspondent à la dernière dilution des sérums qui inhibe l'agglutination. Les résultats sont représentés sous forme de points et les moyennes et déviations standard sous forme de lignes pleines. Les résultats de l'analyse ANOVA à un facteur sont également représentés dans la partie supérieure du graphique. Pour chaque formulation, les différences observées par rapport au contrôle (virus nu) ne sont pas significatives. $n = 5$.

Ces écarts-types importants sont expliqués par un nombre de souris restreint ($n = 5$) ainsi que par des variations importantes de la réponse des souris pour chaque formulation testée. Afin de valider les tendances observées, il conviendra de reproduire cette expérience avec un nombre de souris plus conséquent.

En conclusion, des tendances ont été observées et devront être confirmées en répétant cette expérience. Nous avons constaté que le recouvrement des particules virales par une ou plusieurs couches de polymères n'a pas empêché la production d'anticorps. En effet, une production d'anticorps suite à l'injection de chaque formulation vaccinale a été observée. Ces résultats sont encourageants dans la mesure où on aurait pu s'attendre à une potentielle modification de la particule virale suite à l'adsorption de polymères à sa surface qui aurait pu empêcher la reconnaissance et l'apprêtement de la particule virale par les cellules immunitaires.

3.3. Évaluation de la production de cytokines spécifiques de nos candidats vaccins

Dans le cas d'infections virales, la coexpression de certaines cytokines, telles que l'INF- γ et l'IL-2, traduit la mise en place d'une immunité cellulaire à dominante LT CD8⁺ dirigée contre le virus en question.³⁵⁸ Afin d'évaluer la réponse cellulaire dirigée contre le virus H5N1, nous avons administré aux souris une dose de 1,5 μ g de virus entier inactivé (200 μ L) 70 jours après l'injection de nos candidats vaccins. Le but de ce rappel vaccinal est d'imiter une infection grippale et de stimuler une activité lymphocytaire spécifiquement dirigée contre le virus H5N1, traduite par la production de ces cytokines. Une semaine après l'administration de ce rappel, les souris ont été euthanasiées. Les splénocytes ont été collectés puis mis en culture pendant une nuit avec le virus H5N1 entier inactivé et en présence d'un inhibiteur de la sécrétion des cytokines. Un marquage intracellulaire de l'INF- γ et de l'IL-2 a alors été effectué afin de pouvoir analyser la présence de ces cytokines dans les cellules par cytométrie en flux. Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ont été analysées séparément (Figure 85, Figure 86 et Figure 87).

Pour toutes les formulations vaccinales ainsi que pour les contrôles, un faible pourcentage de splénocytes CD4⁺ (entre 2 et 6%) et un pourcentage encore plus faible de splénocytes CD8⁺ (entre 0 et 2 %) exprime les cytokines en question (Figure 85). Il n'est pas étonnant d'observer de faibles pourcentages pour ce type d'évaluation immunologique. En effet, ces pourcentages représentent les quelques splénocytes positifs pour la production de ces cytokines dirigées contre le virus parmi tous les autres splénocytes isolés de la rate. Les résultats de cette expérience suggèrent que seules les cellules T CD4⁺ ont été activées.

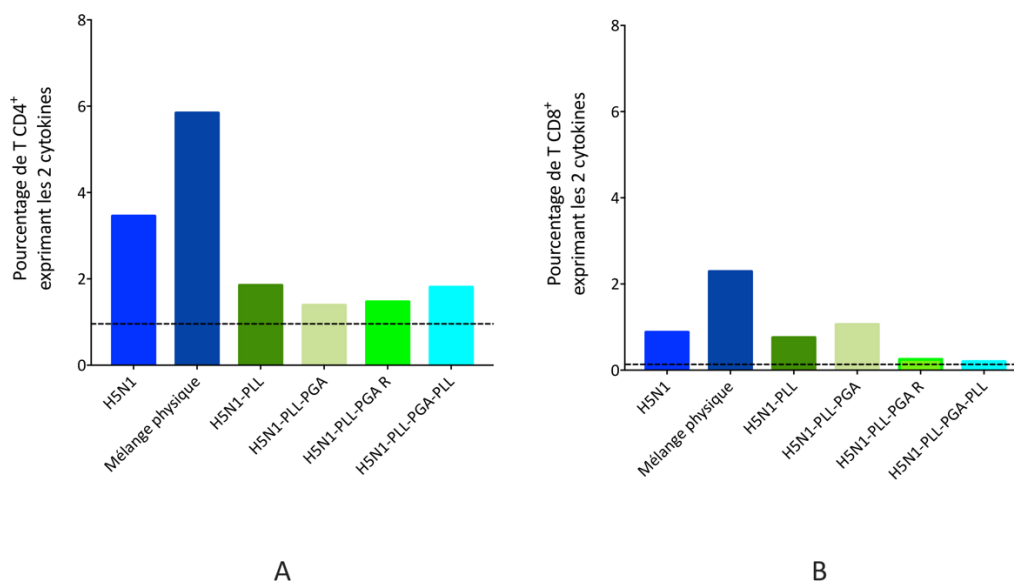


Figure 85 : Pourcentage de splénocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ . (A) : splénocytes T CD4⁺ ; (B) : T CD8⁺. H5N1-PLL-PGA R : formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. 70 jours après l'administration de nos candidats vaccins et des contrôles (virus H5N1 nu et mélange physique) à des souris, un rappel vaccinal a été effectué. Les splénocytes ont été collectés 7 jours après le rappel vaccinal et ont été mis en contact avec les virus H5N1 entiers inactivés afin de stimuler une production des cytokines. Un marquage intracellulaire de l'IFN- γ et de l'IL-2 a été effectué. Pour chaque groupe, les splénocytes de 4 souris ont été rassemblés deux par deux et ont été analysés par cytométrie en flux. Comme le groupe de souris injectées au PBS était constitué de 3 animaux, les splénocytes de seulement 2 souris ont été rassemblés et ont été analysés. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour 2 pools de splénocytes. La ligne en pointillés correspond au résultat obtenu pour le groupe de souris injectées avec du PBS. n = 2.

Si l'on regarde plus en détail le pourcentage total de cellules T CD4⁺ exprimant ces cytokines (Figure 85), on constate qu'il est légèrement inférieur pour les candidats vaccins que pour le contrôle (soit 2 % contre presque 4 % pour le virus nu). En d'autres termes, les formulations recouvertes semblent avoir stimulé un peu moins de splénocytes CD4⁺ produisant ces 2 cytokines que le virus nu. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'enrobage du virus limite ou retarde la réponse T CD4⁺ contre le virus. On constate aussi pour le mélange physique un pourcentage un peu plus important de splénocytes CD4⁺ exprimant ces cytokines que pour le contrôle virus nu (soit en moyenne 6%). Il est possible que l'excès de polymère présent dans ce contrôle ait stimulé une réponse CD4⁺ suite à réponse inflammatoire des cellules de l'immunité innée. En effet, contrairement aux candidats vaccins, ce contrôle n'a pas été soumis à une étape de dialyse et contient donc

plus de polymères que les autres formulations. De plus, ce mélange physique contient certainement des polymères non complexés qui sont, comme référencés dans la littérature,^{359,360} plus toxiques et pro-inflammatoires que des polymères sous forme particulaire.

Le pourcentage de cellules produisant uniquement l'une ou l'autre cytokine pour chaque type cellulaire a été plus finement analysé (Figure 86 et Figure 87). Au vu des résultats, il semble que les cellules T CD4⁺ détectées expriment surtout de l'IL-2. En effet, le pourcentage de cellules exprimant de l'IFN- γ est très faible (proche de 0 %) pour tous les candidats vaccins ainsi que pour les contrôles, à l'exception d'une seule formulation. La formulation d'H5N1-PLL-PGA-PLL semble avoir induit l'activation d'un peu plus de cellules productrices d'IFN- γ (1 % contre 0 % pour les autres échantillons). Ces résultats obtenus sont en accord avec la littérature. En effet, de nombreux travaux ont récemment mis en évidence l'importance de la production d'IL-2 par les cellules T CD4⁺ mémoires pour mise en place d'une inflammation et pour l'expansion clonale des lymphocytes B producteurs d'antigènes spécifiques dans le cas d'une infection.³⁶¹⁻³⁶⁵ Afin de valider cette tendance, il conviendra de répéter l'expérience.

Si on regarde en détails le pourcentage de cellules CD4⁺ exprimant l'IL-2, on peut constater que ces pourcentages sont plus faibles pour les formulations que pour le virus nu (soit 1% pour les candidats et 2 % pour le virus nu). Comme mentionné précédemment, cette différence pourrait être expliquée par l'enrobage du virus qui a soit limité soit retardé la réponse T CD4⁺ contre le virus. Enfin, il semble que le mélange physique ait conduit à l'activation d'un peu plus de cellules CD4⁺ exprimant de l'IL-2. Comme mentionné ci-avant, ces résultats pourraient être expliqués par une inflammation induite par la présence de polymères libres et d'une concentration plus importante que pour les contrôles.^{359,360} Afin de valider cette tendance pour cet échantillon, cette expérience devra être reproduite. Comme mentionné ci-avant (Figure 85B), les pourcentages de cellules CD8⁺ exprimant l'une ou l'autre cytokines sont trop faibles pour conclure à une réponse CD8⁺.

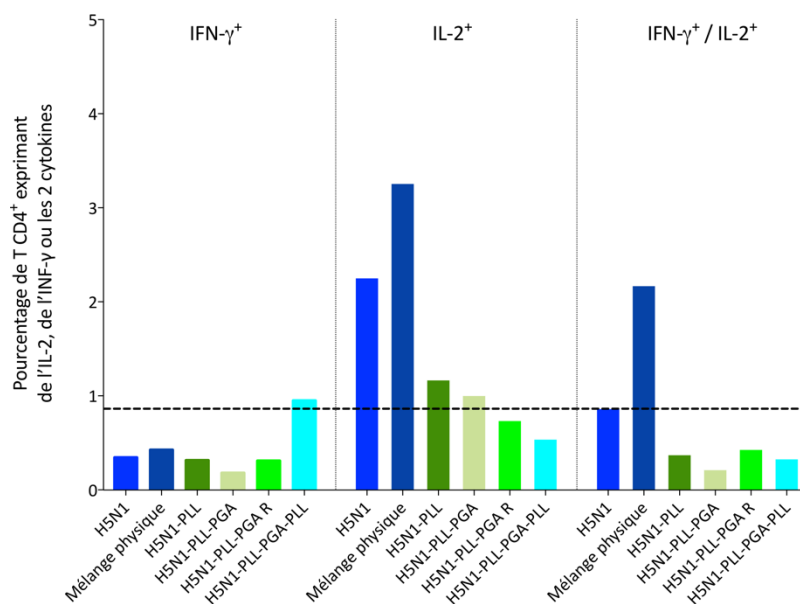


Figure 86 : Pourcentage de splénocytes T CD4⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ . H5N1-PLL-PGA R : formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. 70 jours après l'administration de nos candidats vaccins et des contrôles (virus H5N1 nu et mélange physique) à des souris, un rappel vaccinal a été effectué. Les splénocytes ont été collectés 7 jours après le rappel vaccinal et ont été mis en contact avec les virus H5N1 entiers inactivés afin de stimuler une production des cytokines. Un marquage intracellulaire de l'IFN- γ et de l'IL-2 a été effectué. Pour chaque groupe, les splénocytes de 4 souris ont été rassemblés deux par deux et ont été analysés par cytométrie en flux. Comme le groupe de souris injectées au PBS était constitué de 3 animaux, les splénocytes de seulement 2 souris ont été rassemblés et ont été analysés. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour 2 pools de splénocytes. La ligne en pointillés correspond au résultat obtenu pour le groupe de souris injectées avec du PBS. n = 2.

En conclusion, des tendances sont observées et semblent indiquer que la réponse immunitaire mise en place contre le virus nu et les virus enrobés soit à dominante T CD4⁺, avec une réponse un peu moins importante pour les candidats vaccins. Cette réponse moins importante pourrait être due à l'enrobage du virus qui limite ou retarde la réponse T CD4⁺ contre le virus. Parmi ces cellules CD4⁺, la quasi-totalité est productrice d'IL-2. En effet, très peu de cellules produisant de l'IFN- γ ont été détectés. Comme très peu de splénocytes CD4⁺ produisant de l'IFN- γ ont été détectés, il est difficile de conclure quant à la mise en place d'une réponse de type Th1. Il est à noter qu'il s'agit là d'un premier essai et qu'il est possible que ces faibles pourcentages soient dus à un faible pouvoir adjuvant de notre stratégie ou à un calendrier de vaccination mal adapté (dans notre cas trop long).

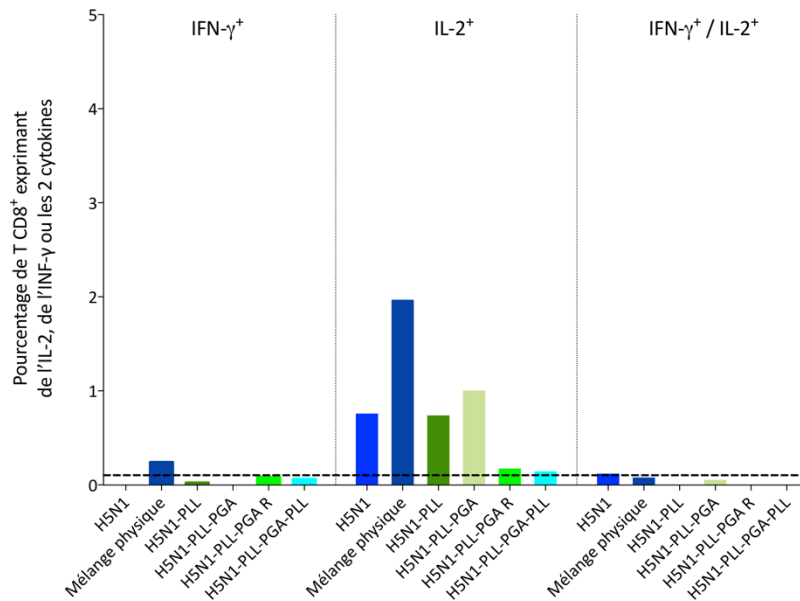


Figure 87 : Pourcentage de splénocytes T CD8⁺ exprimant de l'IL-2 et de l'IFN- γ . H5N1-PLL-PGA R : formulation d'H5N1-PLL-PGA-sulfo-NHS. 70 jours après l'administration de nos candidats vaccins et des contrôles (virus H5N1 nu et mélange physique) à des souris, un rappel vaccinal a été effectué. Les splénocytes ont été collectés 7 jours après le rappel vaccinal et ont été mis en contact avec les virus H5N1 entiers inactivés afin de stimuler une production des cytokines. Un marquage intracellulaire de l'IFN- γ et de l'IL-2 a été effectué. Pour chaque groupe, les splénocytes de 4 souris ont été rassemblés deux par deux et ont été analysés par cytométrie en flux. Comme le groupe de souris injectées au PBS était constitué de 3 animaux, les splénocytes de seulement 2 souris ont été rassemblés et ont été analysés. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour 2 pools de splénocytes. La ligne en pointillés correspond au résultat obtenu pour le groupe de souris injectées avec du PBS. n = 2.

Enfin, il est surprenant d'observer l'absence d'une réponse CD8⁺ en particulier pour le contrôle virus nu. En effet, les virus influenza induisent classiquement une réponse cellulaire à dominante CD8⁺. Ces faibles pourcentages mesurés aussi bien pour le virus nu que pour les autres formulations pourraient provenir du nombre limité d'animaux vaccinés pour chaque condition, de l'absence d'adjuvant (émulsion, saponines...), d'un calendrier de vaccination mal adapté ou encore d'une réponse T CD4⁺ insuffisante (puisqu'elle favorise l'activation des CD8⁺ sécréteurs d'IFN- γ et d'IL-2).

Pour conclure sur cette partie, des tests immunologiques ont été réalisés afin d'évaluer la mise en place de la réponse humorale ainsi que de la réponse cellulaire adaptative spécifique du virus H5N1 de nos formulations. Comme pour le virus nu, une réponse humorale quasi équivalente ou légèrement réduite a été observée pour tous nos candidats vaccins. Ces résultats sont encourageants dans la mesure où l'enrobage des virus H5N1 aurait pu modifier la structure des particules virales (en arrachant des parties ou en compactant leur structure) et ainsi empêcher la reconnaissance et l'apprêtement de la particule virale par les cellules immunitaires. De plus, une tendance, à confirmer par des expériences supplémentaires, semble indiquer un relargage différé des virus de leurs couches de polymères durant les 35 premiers jours suivants la vaccination. Néanmoins, cette tendance n'est plus observée par la suite.

Les résultats de l'évaluation de la réponse cellulaire adaptative spécifique de nos candidats vaccins ne sont pas autant encourageants. En effet, il est difficile de conclure quant à la mise en place pour nos candidats vaccins d'une réponse de type Th1 et T CD8⁺, classiquement observée pour les virus influenza. Néanmoins, comme l'absence des réponses Th1 et CD8⁺ est également observée pour le contrôle de virus nu, il est très probable que ces résultats soient dus à un calendrier vaccinal non optimal. En effet, nous cherchions à étudier la réponse immunitaire à long terme, et nous avons adapté le calendrier dans ce sens. De plus, l'induction par nos candidats vaccins d'une réponse humorale conséquente renforce cette hypothèse. En effet, il est probable qu'une partie des anticorps que nous avons détectés soient des IgG ayant été générés par une réponse Th1. Afin de valider cette hypothèse, nous aurions dû effectuer un test ELISA afin de rechercher ces isotypes d'anticorps. Il conviendra donc de répéter cette expérience afin de pouvoir conclure sur la réponse cellulaire adaptative mise en place pour nos suspensions vaccinales et de pouvoir la comparer à celle des contrôles.

C. Conclusion

La procédure de recouvrement LbL avec de la PLL et du PGA originellement développée pour la formulation de layersomes, a été adaptée pour le recouvrement de particules virales de type H5N1 dans le but de développer une forme « retard » du virus. Ainsi, des particules virales recouvertes jusqu'à 4 couches de polymères et des particules recouvertes et réticulées ont pu être formulées. Des études de stabilité en condition tamponnée ont démontré la stabilité du recouvrement LbL de toutes les particules conservées à 4°C, sur une échelle de 2 mois. Certaines des formulations développées ont été sélectionnées et optimisées pour une évaluation de leur potentiel immunogène sur modèle murin (C57BL/6), à savoir les suspensions recouvertes d'une, deux et trois couches de polyélectrolytes ainsi que les suspensions recouvertes de deux couches de polymères réticulés. Le recouvrement LbL de ces particules virales a été caractérisé par diverses techniques d'analyse spectroscopiques (DLS, LD) et microscopiques (TEM, microscopie confocale). Ces analyses ont non seulement permis de confirmer le recouvrement des particules mais aussi de déterminer la taille des objets développés et de visualiser leur structure ainsi que leur organisation. Enfin, des tests immunologiques préliminaires sur souris ont été réalisés afin d'évaluer la mise en place de la réponse humorale et de la réponse cellulaire adaptative spécifique du virus H5N1 de nos candidats vaccins. Ces évaluations préliminaires ont montré que les virus recouverts/réticulés conservent leur antigénicité puisqu'ils présentent un potentiel immunogène quasiment équivalent à celui du virus nu. De plus, les formulations vaccinales semblent induire une réponse immunitaire décalée par rapport à celle du virus nu. Ces expériences devront être reproduites et complétées par d'autres études (test ELISA) afin de confirmer ces tendances.

Pour la première fois, un virus a été enrobé par plusieurs couches de polymères et conserve son immunogénicité. Cette procédure de formulation innovante pourra être appliquée à d'autres virus et à d'autres processus d'immunisation nécessitant un effet retard et/ou un effet adjuvant qui pourrait être obtenu en utilisant d'autres polymères fonctionnels.

D. Materials and methods

1. Materials

1.1. Chemicals

Solvents

Anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) $\geq 99.9\%$ (276855) and acetone $\geq 99.5\%$ (32201) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Methanol $\geq 99.8\%$ (MeOH; 20864.320) was purchased from VWR International (Radnor, USA). 2-propanol $\geq 99.5\%$ (GC) (33539) was purchased from Honeywell (Charlotte, USA).

Acids

Hydrochloric acid (HCl) $\geq 95\%$ (30721) was purchased from Sigma-Aldrich. Fluka™ Acetic acid $\geq 99.7\%$ was purchased from Honeywell (695092).

Salts

Sodium chloride (NaCl) 98.5 – 100.5 % (27810-295) and sodium hydroxide (NaOH) 98.5 – 100.5% (28244-295) were purchased from VWR International. Sodium citrate (25116) was purchased from Sigma-Aldrich. Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $\geq 98.5\%$ (30435) and sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 30435) were purchased from Sigma-Aldrich.

Polymers

Poly(-L glutamic acid) sodium salt 64 kD (PGA; P4886) was purchased from Sigma-Aldrich. Poly(L-lysine) hydrobromide 4.2 kD (PLL 4.2 kD; PLKB20), 21 kD (PLL 21 kD; PLKB100) and 52 kD (PLL 52 kD; PLKB250) were purchased from Alamanda polymers Inc (Huntsville, USA). Poly(-epsilon-L-lysine) hydrochloride 3.5 – 4.5 kD (PεLL; FP14985) was purchased from Carbosynth (Compton, England).

Fluorescent dyes

Rhodamine B isothiocyanate mixed isomers (RBITC; R1755) was purchased from Sigma-Aldrich. 5-aminofluorescein (07980) was purchased from Honeywell.

Coupling agents

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC; E6383) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS; 56485) were purchased from Sigma-Aldrich and their purity exceeded 98 %. N-ethyl-diisopropylamine (DIEA; A11801) was purchased from Alfa Aesar (Wardhill, USA) and its purity exceeded 99 %.

Other chemicals

Potassium phosphate monobasic 99 % (KH_2PO_4 ; 424205000) was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA) and potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4 ; 26930-293) was purchased from VWR International. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid pufferan $\geq 99.5\%$ (HEPES; HN77.5) was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Agarose (23023-021; Indubiose A37) was purchased from Chemie Brunschwig AG (Basel, Switzerland). Zwittergent 3-14 detergent (693017) was purchased from Calbiochem (San Diego, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB; staining solution; A1092-0025) was purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany).

1.2. Buffers and solutions

1X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) without CaCl_2 and MgCl_2 (14190-094), 1X PBS with CaCl_2 and MgCl_2 (14040-091) and complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (21875091) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). 5 M Sodium chloride (NaCl) solution and Bovine Serum Albumin (BSA; A7030) (59222C) were obtained from Sigma-Aldrich. Sterile and pyrogen-free Aqua ad iniectabilia (52107040) was obtained from Bichsel (Interlaken, Switzerland). Ultrapure water (18 m Ω) was obtained by an ELGA Labwater device from Veolia (Aubervilliers, France) and was used for the preparation of the following buffers and solutions:

- 100 mM phosphate buffer, pH 8
- 10 mM HEPES, pH 6.5
- 10 mM HEPES, 15 mM NaCl pH 7.4, 0.22 µm filtered
- 1 mM NaCl pH 7.4, 0.22 µm filtered
- 150 mM NaCl
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- 1.5 % sodium citrate
- 10 % (w/v) Zwittergent
- 10 % glacial acetic acid and 40 % EtOH (destaining solution)
- 0.75 % Coomassie Brilliant Blue (CBB) in 10 % glacial acetic acid and 40 % EtOH (staining solution)

1.3. Virus strain

H5N1 Whole Inactivated Virus (H5N1 WIV, whole A/turkey/Turkey/1/2005 A) was kindly provided by the VFL in 3 mL aliquots at a concentration of 200–220 µg/mL total proteins and 83 µg hemagglutinin (HA)/mL. Before use and after opening, aliquots were stored at 4°C sealed with Parafilm®.

1.4. Mouse model for *in vivo* study

C57BL/6J0laHsd female inbred mice were obtained from ENVIGO (Huntingdon, UK) and were hosted and handled for the *in vivo* study at the VFL. All animal work was conducted in accordance to protocols approved by the Swiss federal law on the protection of animals (VD3262).

1.5. Cells, antibodies, kits and others

Cells and antigens

Chicken red blood cells (RBC) were purchased from ENVIGO. Influenza Antigen A/turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) NIBRG-23 (whole H5N1 antigen; 07-112) was purchased

from NIBSC (London, UK). Cholera filtrate lyophilized powder (Receptor-destroying enzyme; C8772) and Concanavalin A (ConA; C5275) were purchased from Sigma-Aldrich.

Antibodies

Influenza antiserum A/turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) (06/192) was purchased from NIBSC. APC rat anti-mouse IL-2 (clone JES6-5H; 4554429), PE rat anti-mouse IFN- γ (clone XMG1.2; 554412) and GolgiPlugTM protein transport inhibitor (555029) were purchased from BD Biosciences (Allschwil, Switzerland). Anti-mouse CD3 FITC monoclonal antibody (clone 17A2; 11-0032-82) was purchased from Thermo Fischer Scientific. Anti-mouse CD4 Pacific blueTM (clone GK1.5) and anti-mouse CD8a (clone GK.53.6.7) Alexa Fluor[®] 680 were kindly provided by the flow cytometry facility of the University of Lausanne (UNIL).

Kits and others

ArcTM Amine Reactive Compensation Bead Kit (A10346) and LIVE/DEADTM Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit for 405 nm excitation (L34965) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, USA). Sterile Lympholyte[®]-M cell separation medium (CL5030) was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, Canada).

2. Methods

2.1. Chemical syntheses

2.1.1. Synthesis and purification of PGA-sulfo-NHS

The same procedure as the one described in the previous Material and Methods section page 118 was used for the synthesis and purification of sulfo-NHS.

2.1.2. Synthesis and purification of PGA-fluorescein

PGA fluorescein was synthesized following the same procedure as the one described in the previous Material and Methods section page 119.

2.1.3. Synthesis and purification of PLL 52 kD-rhodamine

84 mg (0.4 mmol) of PLL 52 kD were solubilized in 4 mL of anhydrous DMSO and either 135 μ L (1 mmol) or 540 μ L (4 mmol) of DIEA were added to it. The reaction was placed under stirring at room temperature for 15 min. Then, either 11 mg (0.02 mmol) or 22 mg (0.04 mmol) of RBITC solubilized in 0.8 mL of anhydrous DMSO were added to the reaction. The reaction was left overnight under stirring and argon atmosphere, protected from light, and at room temperature. Afterwards, grafted PLL was precipitated in 20 mL isopropanol and consequently centrifuged at 10 000 g for 10 min. The supernatant was discarded. This washing process was repeated 5 times. Only PLL-rhodamine prepared with 2.5 and 0.05 equivalent to PLL of DIEA and RBITC, respectively, was water soluble. Indeed, a gel-like material was obtained with twice more equivalents to PLL of the organic base and the fluorescent dye. The water soluble PLL-rhodamine was dissolved in 10 mL of ultrapure water and was dialyzed overnight against 1.5 L of 150 mM NaCl using a 3.5 kD dialysis membrane (Spectra/Por 3, 132725, Spectrum Labs Inc.). A second overnight dialysis against 1.5 L of ultrapure water was subsequently performed. The obtained product was lyophilized overnight. 63 mg of obtained product were stored under argon atmosphere and protected from light and water at -20°C (Figure 88). An isolated yield of 92 % was determined.

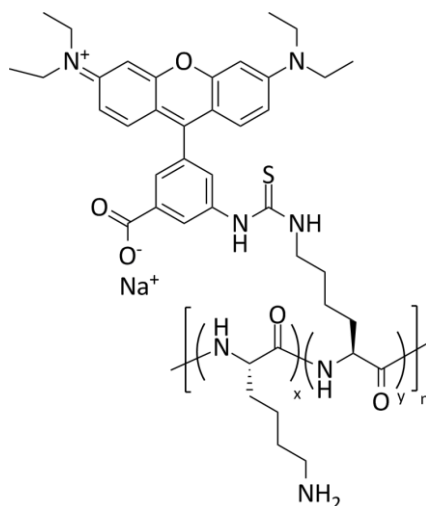


Figure 88 : PLL 52 kD-rhodamine structure. $n = x + y$, with $x = 242$ and $y = 8$. The chemical functions are randomly distributed.

2.1.4. Determination of grafting percentages

PGA-NHS

As described in the previous Material and Methods section page 121, ^1H NMR spectroscopy was used to assess the substitution degree (SD) of sulfo-NHS-ester-labeled PGA.

PGA-fluorescein

As explained in the previous Material and Methods section page 121, ^1H NMR spectroscopy was used to assess the grafting percentage of fluorescein-labeled PGA.

PLL-rhodamine B

The substitution degrees of rhodamine-labeled PLLs were determined by absorbance using a standard curve and the Beer-Lambert law. ≈ 5 mg of rhodamine B were dissolved in 25 mL of MeOH and were diluted at 1/20, 1/25, 1/40, 1/100 and 1/200 in 0.1 M phosphate buffer pH 8. The absorbance values of all diluted solutions were recorded at 580 nm and plotted to determine the slope coefficient, which corresponds to rhodamine B extinction coefficient (ϵ). At that wavelength, extinction coefficients of $\approx 40\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ were calculated. ≈ 3 mg of labeled PLLs were then dissolved in either 3 or 6 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 8 and were diluted at 1/10 and 1/20 in the same buffer. Absorbance measurements were performed at 580 nm for both dilutions. Their rhodamine B concentration was calculated using their absorbance values and rhodamine B extinction coefficient. Substitution degrees of $\approx 3\%$ were determined using the following equation:

$$SD(\%) = \frac{n_{\text{rhodamine}}}{n_{\text{PLL}}}$$

2.2. Formulation

2.2.1. Development of a LbL coating procedure of a H5N1 virus

Buffering condition

3 buffering conditions were evaluated for the LbL coating of H5N1 particles with 21 kD PLL (Table 27). These buffers were used to dilute the viral suspension and to solubilize

PLL. Virus suspensions and PLL solutions were respectively prepared at a concentration of 30 µg HA/mL and 0.1 mg/mL. For LbL coating, 500 µL of virus were slowly dropped (30 drops/min) using a 0.45×12 mm 26G×1/2" needle (4710004512, VWR International) into the same volume of 21 kD PLL, placed under stirring. The dropping procedure was performed at 4°C to prevent virus destabilization observed at higher temperatures. After 1 h stirring, suspensions were stored at 4°C sealed with Parafilm® to prevent evaporation upon storage.

Table 27 : Buffering conditions tested for LbL coating of the virus.

Buffering conditions investigated
10 mM HEPES, 15 mM NaCl, pH 7.4
1X PBS pH 7.4 (with CaCl ₂ and MgCl ₂)
1X PBS 7.4 (without CaCl ₂ and MgCl ₂)

Polymers length and concentration

For LbL coating, virus suspensions were diluted at a concentration of 30 µg HA/mL. PLL listed above (Table 27) were prepared at concentrations ranging from 1 µg to 2 mg per mL and 64 kD PGA was prepared at 1 and 2 mg/mL. 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) was used to dilute the viral suspension and to solubilize polymers. First, 500 µL of virus (or PLL) were slowly dropped into the same volume of PLL (or virus), placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, 1-layer coated suspensions (≈ 1 mL) were placed in 1 mL dialysis devices and were dialyzed for 36 h against 3 × 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) to remove polymer excesses. Dialysis buffer was changed every 12 h. After dialysis, ≈ 1 mL of each suspension was collected and stored at 4°C sealed with Parafilm®. Then, only suspensions prepared with 52 kD PLL at a concentration of 1 mg/mL, were selected for LbL coating with PGA. For this purpose, ≈ 1 mL of 1-layer coated viruses (or PGA) were slowly dropped into the same volume of PGA (or 1-layered coated virus), placed under stirring at 4°C. As mentioned previously, 2 PGA concentrations were explored for this study. After 1 h stirring, each suspension (≈ 2 mL) was split and inserted in two 1 mL dialysis devices. Samples were

dialyzed under the same conditions as the ones described previously. After dialysis, ≈ 2 mL were collected and stored at 4°C sealed with Parafilm®.

Removal of polymer excesses

To remove excesses of polyelectrolytes, ultracentrifugation and dialysis were tested and compared. 1-layer coated virus suspensions were therefore prepared by slowly dropping 500 μ L of 30 μ g HA/mL H5N1 WIV in a 52 kD PLL solution of the same volume at 1 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, the suspensions were either centrifuged or dialyzed. For ultracentrifugation of particles, an Optima™ L-90 K ultracentrifuge (DS-9339A, Beckman Coulter, Brea, USA) was used. 800 μ L of sample were placed in adapted ultracentrifuge tubes and in pre-cooled rotor (4°C). Samples were centrifuged at 113 000 g for 3 h. Afterwards, the supernatant was carefully collected, and the pellet was resuspended in buffer by carefully vortexing for 2 min. For dialysis, 800 μ L of sample were placed in 1 mL dialysis devices and dialyzed against 3 \times 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) for 36 h. Dialysis buffer was changed every 12 h.

Reproducibility and robustness evaluation

500 μ L of 30 μ g HA/mL H5N1 WIV were slowly dropped in a 52 kD PLL solution of the same volume at 1 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, 1-layer coated viruses (≈ 1 mL) were inserted in a 1 mL dialysis device and dialyzed for 36 h against 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). The dialysis buffer was changed every 12 h. ≈ 1 mL was collected after dialysis and stored at 4°C sealed with Parafilm®. For the addition of a second layer, ≈ 1 mL of PLL-coated viruses were slowly dropped in a 64 kD PGA solution of the same volume at 1 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, the suspensions were split and inserted in two 1 mL dialysis devices and were dialyzed under the same conditions as the ones described previously. After dialysis, ≈ 2 mL were collected and stored at 4°C sealed with Parafilm®.

2.2.2. Optimization of the LbL procedure for the development of coated viruses suitable for an *in vivo* evaluation

Formulation conditions of vaccine candidates

The formulation of suspensions selected for an *in vivo* evaluation was carried out in a sterile and non-pyrogenic way necessary for the assessment of their immunogenic potential. All the laboratory glassware, the bar magnets and further utensils used for the preparation of our formulations were pyrogen-free. All buffers and polymer solutions were prepared using ultrapure water and were filtered on Millex-GP 0.22 µm polyethersulfone (PES) sterile syringe filters (SLGP033NS, Burlington, USA).

1- and 2-layers coated viruses

500 µL of 40 µg HA/mL H5N1 WIV were slowly dropped in a 52 kD PLL solution of the same volume at 1 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, 1-layer coated viruses (≈ 1 mL) were inserted in a 1 mL dialysis device and dialyzed for 36 h against 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). The dialysis buffer was changed every 12 h. ≈ 1 mL was collected after dialysis and stored at 4°C sealed with Parafilm®. For the addition of a second layer, ≈ 1 mL of PLL-coated viruses were slowly dropped in a 64 kD PGA solution of the same volume at 1 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, the suspensions were split and inserted in two 1 mL dialysis devices and were dialyzed under the same conditions as the ones described previously. After dialysis, ≈ 2 mL were collected and stored at 4°C sealed with Parafilm®. The pH of the suspensions selected for the *in vivo* evaluation was measured prior subcutaneous administration.

3- and 4-layers coated viruses

400 µL of 60 µg HA/mL H5N1 WIV were slowly dropped in a 52 kD PLL solution of the same volume at either 1 or 2 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, 1-layer coated viruses (≈ 800 µL) were inserted in a 1 mL dialysis device and dialyzed for 36 h against 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). The dialysis buffer was changed every 12 h. ≈ 800 µL were collected after dialysis and slowly dropped in a 64 kD PGA solution of the same volume at either 1 or 2 mg/mL, placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, the suspensions were split and inserted in two 1 mL dialysis devices and were dialyzed under the

same conditions as the ones described previously. $\approx 1,6$ mL were collected after dialysis and the same procedure was repeated for the addition of 2 supplementary layers of PLL and PGA. Since the addition of the supplementary layers generated important volumes, 5 mL dialysis devices (Float-A-Lyzer[®] G2 100 kD, G235059, Spectrum Labs Inc.) were used to remove excesses of polymers. The obtained viral suspensions were stored at 4°C sealed with Parafilm[®].

3-layered coated viruses were also prepared with a higher virus concentration of 80 μg HA/mL and polymers concentrations of 1 mg/mL. For this purpose, the same formulation procedure as the one just described was employed. The obtained viral suspensions were stored at 4°C sealed with Parafilm[®].

The pH of the formulations selected for the *in vivo* evaluation was measured prior subcutaneous administration.

2-layers coated and reticulated viruses

For the formulation of reticulated viruses, 2 strategies were employed. The first strategy consists in formulating 2-layers coated viruses and crosslinking the polymeric coat by adding coupling agents post formulation. The second strategy consist in formulating 2-layers coated viruses with PLL and with the ester-activated PGA-sulfo-NHS.

For the reticulation with crosslinking agents, 2-layered coated viruses were prepared with a virus concentration of 40 μg HA/mL following the same procedure as the one described above. 10 μL (13.2 μmol) of a 250 mg/mL EDC solution as well as 10 μL (1.32 μmol) of a 29 mg/mL sulfo-NHS solution freshly prepared were added to 2 mL of the prepared formulations. For some suspensions, the pH was adjusted to 6.0 with 14 μL of 1 M HCl. After addition of the crosslinking agents, the suspensions were placed under stirring at 4°C for 4 h and were subsequently dialyzed for 36 h against 500 mL of 1X PBS (without CaCl_2 and MgCl_2) using a 1 mL dialysis device. Afterwards, samples were stored at 4°C sealed with Parafilm[®].

The same procedure as the one described above was employed for the production of 2-layers coated and reticulated viruses. Instead of using 64 kD PGA, 50 % grafted PGA-NHS

was used at a concentration of 1.1 mg/mL (4.8 μ mol). Following formulation, the pH of some suspensions was adjusted to 9.0 with 13 μ L of 1 M NaOH. After pH adjustment, the formulations were placed under stirring at 4°C for 4 h. All suspensions were stored at 4°C and sealed with Parafilm®.

The pH of the formulations selected for the *in vivo* evaluation was measured prior subcutaneous administration.

2.2.3. Formulation of fluorescent coated viruses

Virus suspensions were diluted at a concentration of 40 μ g HA/mL. Fluorescently labeled 52 kD PLL (PLL*), 64 kD PGA (PGA*) as well as non-labeled 52 kD PLL (PLL), were prepared at a concentration of 1 mg/mL. 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) was used to dilute the virus and to solubilize polymers. H5N1-PLL*-PGA* and H5N1-PLL-PGA* samples were obtained by slowly dropping 350 μ L H5N1 WIV in a labeled and non-labeled PLL solution, respectively, of the same volume placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, H5N1-PLL* and H5N1-PLL suspensions (\approx 700 μ L) were inserted in a 1 mL dialysis device and dialyzed for 36 h against 500 mL of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). The dialysis buffer was changed every 12 h. After dialysis, the suspensions were collected (\approx 700 μ L) and were slowly dropped in a PGA* solution of the same volume placed under stirring at 4°C. After 1 h stirring, H5N1-PLL*-PGA* and H5N1-PLL-PGA* suspensions (\approx 1,4 mL) were inserted in a new 1 mL dialysis device and dialyzed under the same conditions as the ones described previously. After dialysis, the suspensions were collected and stored at 4°C sealed with Parafilm® and protected from light. The control was prepared by mixing 700 μ L of 0.5 mg/mL PLL* with the same volume of 1.0 mg/mL PGA* and was stored under the same conditions as for the formulations.

2.3. Characterization of coated viruses

2.3.1. Size and zeta potential characterization of vaccine formulations

Size measurements

The average diameter of formulated vaccine candidates was measured by DLS using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK) with the following specifications:

material refractive index: 1.45 (similar to proteins); water refractive index: 1.33; viscosity: 0.8872 cP; scattering angle: 90°; temperature: 25°C. Vaccine candidates were diluted at a concentration of 1.5 µg HA/mL in 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). Size measurements were performed in BRAND® UV cuvettes (Z637092, Sigma-Aldrich) after each layer addition and after polymer removal. Data were analyzed using the multiple narrow mode included in the Malvern software. Particle size is expressed in intensity. Formulations are considered monodisperse when the polydispersity index (PDI) is < 0.3.

Since sizes measured with the Zetasizer were close to 1 µm or above it, the average diameter of the formulations intended for *in vivo* evaluation was measured before subcutaneous administration using a Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical) with the following specifications: material refractive index: 1.45 (similar to proteins); water refractive index: 1.33; viscosity: 0.8872 cP; particle density: 1.0 g/cm³; stirrer speed: 900 rpm. Vaccine candidates were diluted at a concentration of ≈ 10 µg HA/mL in 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂). Data were analyzed using the general mode included in the Malvern software.

Zeta potential measurements

The average zeta potential of coated and non-coated viruses was determined using a Zetasizer Nano-ZS with the same specifications as the ones used for DLS measurements. The dielectric constant was set to 78.5 for each measurement. Measurements were performed in folded capillary cells (DTS1070, Malvern Panalytical) after each layer addition and after polymer removal. Vaccine candidates were diluted at a concentration of 2 µg HA/mL in 1 mM NaCl. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation.

2.3.2. Characterization of fluorescent coated viruses

Fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra of grafted fluorescein (488 nm) and/or rhodamine B (543 nm) were recorded before and after each dialysis step of H5N1-PLL*-PGA* and H5N1-PLL-PGA* suspensions to follow polymers elimination. Spectra were recorded using a

NanoDrop 2000 (K473, Thermo Fisher Scientific). For each measurement, 3 × 2 µL sample were used and 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) was set as reference.

Confocal microscopy analysis

For confocal analysis, 15 µL of H5N1-PLL*-PGA*, H5N1-PLL-PGA* and the physical mixture were deposited in 1 µm 8 well slides (80826, Ibidi, Gräfelfing, Germany), and were analyzed by confocal microscopy. In addition, a microscope slide coated with H5N1-PLL*-PGA* was prepared. For this purpose, 100 µL of 1.0 mg/mL PLL were deposited on a 26×76×1 mm StarFrost® microscope slide (KNITVS11175076FKB, VWR International) and dried for 10 min. Afterwards, the slide was rinsed with distilled H₂O and 15 µL of F1 were added and dried for another 10 min. Then, a sufficient amount of 1X PBS (without CaCl₂ and MgCl₂) was deposited on the slide and a 24×50×1.5 mm Menzel Gläser™ cover glass (631-9430, VWR International) was mounted on it. Edges of the cover glass were sealed with clear nail polish and dried for 5 min. Once dried, the slide was analyzed by confocal microscopy using a ZEISS LSM 880 confocal microscope with Airyscan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.3.3. TEM characterization of the vaccine candidates

Only formulations intended for *in vivo* evaluation were characterized by TEM. For this purpose, 15 µL of each vaccine candidate were deposited on carbon coated 400 mesh (CF400-CU, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) and were analyzed using a Tecnai™ Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

2.3.4. Determination of vaccine candidate's concentration

For *in vivo* evaluation of our vaccine candidates, the HA concentration of each sample had to be determined prior administration. Sample concentration was determined using 2 different strategies.

By SRID

This procedure was developed and optimized by the VFL. A 1 % agarose gel was prepared by solubilizing 500 mg of agarose in 50 mL of 1X PBS at high heat using a

microwave and by subsequently heating the agarose solution for 20 min at 56°C. Afterwards, 700 µL of influenza antiserum were added to it and 20 mL of complemented gel were poured in a mold with a hydrophilic bottom (Atelier de Microtechnique CHUV). The gel was left for 30 min at room temperature. Then, a cutting template (Atelier de Microtechnique CHUV) was placed on the top of it and 4 mm holes were cut using a puncher connected to a vacuum pump (N145AT.18, KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau, Germany). The standard antigen (lyophilized WIV H5N1 containing 80 µg HA) used for the calibration curve was reconstituted by adding 1 mL of ultrapure water, was left at room temperature for 10 min and was slowly vortexed. The vaccine candidates and the standard antigen were treated by adding 10 % (v/v) Zwittergent® 3-14 detergent and were gently vortexed. The reconstituted standard was diluted in 1X PBS at concentrations of 30, 22.5, 15 and 7.5 µg HA/mL for a final volume of 200 µL and the vaccine candidates were diluted in 1X PBS at a concentration of 10 µg HA/mL. 20 µL of standards and samples were distributed in duplicates in the agarose gel. To allow a complete diffusion of samples into the gel, this last was left for 30 min at room temperature. After incubation, the gel was transferred into a plastic box and wet paper towels were added on the top of it to maintain humidity. It was incubated for 18 h at 25°C. Afterwards, the gel was removed from the mold and was washed for 30 min in PBS placed on a plate shaker (GyroTwister). PBS was discarded and the gel was washed for another 30 min into demineralized water. Then, the gel was placed on a thin support and covered with one blotting paper. The blotting paper was further wet and air bubbles were removed. A second blotting paper and a plexiglass plate were added on top of the gel. The gel was pressed and left for 15 min at room temperature. Then, the second blotting paper was removed, and the gel still covered with the first blotting paper was incubated at 60°C until it was dry (3 – 4 h). Once dry, the blotting paper was carefully removed, and the gel was put for 15 min at room temperature in a staining solution placed under stirring. The staining solution was discarded, and the gel was rinsed by soaking it into demineralized water for 1 min at room temperature and under stirring. Water was discarded and the gel was put for 5 min at room temperature in a destaining solution placed under stirring. Half of a dry blotting paper was added to the destaining solution to absorb remaining staining solution. Then, the destaining solution was removed, and the gel was finally rinsed for 1 min at room temperature with demineralized water placed under stirring. The gel was dried with a paper towel and lint free tissues. Scans of the gel were taken with a 1 cm scale and the

precipitation ring diameters corresponding to the precipitation zones were calculated using ImageJ. The concentrations of the standards, the correlation values between the precipitation ring diameters and the HA concentration as well as the confidence interval (CI) for each calculated value were determined using the CombiStats software. Results with a CI > 20 % were considered as uncertain. Afterwards, the calibration curve was plotted, and the concentrations of the vaccine candidates were determined.

By calculations

The formulation volumes were carefully recorded after each dialysis step and the HA concentration of each sample was estimated from the volumes obtained at the end of the formulation procedure.

2.4. *In vivo* evaluation of H5N1 vaccine candidates

All the following procedures were developed and optimized by the VFL.

2.4.1. In vivo study design

Female C57BL/6J01aHsd mice, 7 weeks of age, were immunized subcutaneously in the neck with $\approx 200 \mu\text{l}$ of each vaccine formulation and controls at a concentration of $1.5 \mu\text{g}$ HA/dose using 0.33×12.7 mm BD Micro-Fine™ 29G syringes (324824, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Each sample was prepared only once and was administered to one mice group ($n = 5$). Samples included one negative control (1X PBS without CaCl_2 and MgCl_2), 2 positive controls (naked H5N1 WIV and a physical mixture of H5N1 WIV and both polymers) and the 4 vaccine candidates. Blood collection by tail-bleeding ($\approx 100 - 200 \mu\text{l}$ of blood) was performed on days 14, 35, 56 and 70 post prime vaccination. After clotting, the blood was centrifuged at $10\,000 \text{ g}$ for 5 minutes to separate the serum. Serum was stored at -20°C until further analysis.

2.4.2. Immunogenicity evaluation by hemagglutination inhibition assay

Serum antibody titers against HA were determined using hemagglutination inhibition assay (HAI), performed according to the WHO manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. All serum samples ($20 \mu\text{L}$) were pre-treated overnight at

37°C with 80 µL of receptor-destroying enzyme at 1:5 volume ratio and further diluted in 96-well round-bottom plates (92097, TPP, Trasadingen, Switzerland) with 100 µL sodium citrate 1.5 % (w/v) to a final serum dilution of 1/10. Individual sera were serially 2-fold diluted in V-bottom microtiter plates (CLS3894, Sigma) in PBS (with CaCl₂ and MgCl₂), for a final volume of 25 µL. Whole H5N1 WIV concentration was adjusted to 4 HA units per 25 µL, as verified by back-titration, and 25 µL standardized antigen were added to each well. After 30 min incubation at room temperature, 50 µL 0.75 % chicken RBCs were added. Once control RBCs were settled (30–40 min), the plate was titted, and the assay imaged for further analysis. HAI titers were calculated as the reciprocal of the last serum dilution that contained non-agglutinated RBCs (tearing). Samples with a result below the lowest dilution were assigned HI titer of 1. Antibody titers were compared by one-way ANOVA (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

2.4.3. Cytokine profiling by intra-cellular straining and FACS

Two mice spleens were pooled per group and splenocytes were crushed using a 70 µm cell strainer (352350; BD Biosciences), then washed with complete RPMI medium. The cells were further isolated using the Lympholyte[®]-M cell separation medium, added through a glass Pasteur pipette, then centrifuged 20 min at 1500 rpm without breaks. Cells were suspended in complete RPMI medium and counted. After counting, cells were centrifuged for 12 min at 800 rpm and resuspended in complete RPMI medium at a concentration of 10⁷ cells/mL. Then, 100 µL of cells were deposited in a 96-well round bottom plate. Cells were stimulated by adding 50 µL/well of either H5N1 WIV (30 µg HA/mL), ConA (5 µg HA/mL) or complete RPMI medium, and were incubated for 2 h at 37°C. Cytokine secretion was blocked using BD GolgiPlug[™] protein transport inhibitor (50 µL/well; 1:1000 dilution) and cells were further incubated overnight at 37°C with 5 % CO₂. Cells were put on ice and transferred to V-bottom 96-well plates. They were stained for 15 min at 4°C using the LIVE/DEAD[™] Kit. Afterwards, cells were incubating for 15 min on ice with anti-mouse CD3 FITC monoclonal antibody (50 µL/well; 1:100 dilution), anti-mouse CD4 Pacific blue[™] (50 µL/well; 1:200 dilution) and anti-mouse CD8a Alexa Fluor[®] 680 (50 µL/well; 1:100 dilution) to perform cell surface staining. After washing, fixation and permeabilization, cells were incubated 30 min at 4°C with APC rat anti-mouse IL-2 (50 µL/well; 1:100 dilution) and

PE rat anti-mouse IFN- γ (50 μ L/well; 1:200 dilution) for intracellular staining. Cells were washed 3 times with Perm/Wash buffer and were finally suspended in 150 μ L PBS and filtered prior acquisition on a Gallios Flow Cytometer (FACS; Beckman Coulter). Compensation was performed using the ArcTM Amine Reactive Compensation Bead Kit and compensation matrices were calculated with the BD FACSdivaTM software (BD Biosciences). FACS data were analyzed using FlowJo software version 9 (FlowJo LLC, Ashland, USA). All data were reported as mean \pm standard deviation.

Discussion générale

Intelligence is the ability to adapt to change.

Stephen Hawking

La formulation de nanomatériaux ainsi que l'optimisation de leurs propriétés physico-chimiques ont fait l'objet de nombreuses études au cours de ces 20 dernières années, notamment pour le développement de matériaux innovants et intelligents dans le domaine biomédical. Parmi les stratégies d'optimisation disponibles, la technique du recouvrement couche par couche (« Layer-by-Layer », LbL) a été identifiée en tant que méthode simple et efficace pour la modification et la fonctionnalisation de tous types de matériaux, dont les nanoparticules.

L'objectif de ce projet de thèse a été de développer et d'optimiser une procédure de formulation couche par couche de particules liposomales et virales en employant des espèces polymériques biocompatibles et biodégradables (poly(-L-lysine), PLL ; et acide poly(-L-glutamique), PGA). Le but de nos travaux est de répondre aux problèmes de stabilité des liposomes et de proposer une formulation vaccinale innovante à relargage différé. Ces travaux de recherche nous ont permis de : i) mettre au point une procédure de recouvrement applicable aux particules liposomiques et virales ; ii) caractériser le recouvrement des particules développées ; iii) évaluer la stabilité des suspensions particulières formulées en condition tamponnée et iv) commencer à évaluer l'efficacité des vecteurs particuliers développés par des études *in vitro/in vivo*.

A. Recouvrement de liposomes afin d'optimiser leur stabilité

1. Formulation des layersomes

Les polyélectrolytes sélectionnés pour le recouvrement LbL des liposomes (PLL et PGA) ont pour avantage majeur leur bonne biocompatibilité, biodégradabilité et non-immunogénicité. Bien que beaucoup de travaux de formulation de liposomes recouverts (layersomes) soient basés sur l'utilisation de polymères non biodégradables (PAH et PAA), cette caractéristique est essentielle pour l'élaboration d'un vecteur de délivrance. D'autre part, la PLL et le PGA présentent une bonne solubilité sur une large gamme de pH (4 à 9) et notamment à pH physiologique (7,4), ce qui n'est par exemple pas le cas pour le chitosan qui est également un polymère de choix pour la formulation de layersomes. Comme mentionné précédemment, les polymères choisis ici, ont déjà été utilisés pour l'assemblage de films multicouches et ont montré une résistance de 24 h en contact direct avec des monocytes, ce qui a également motivé notre choix. Enfin, leur potentielle modification chimique est également un atout majeur de ce couple de polyélectrolytes, puisqu'elle offre la possibilité de jouer sur la rigidité du recouvrement par simple réticulation.

Pour la formulation de layersomes, un cahier des charges définissant les propriétés générales de nos suspensions a été établi. Une bonne homogénéité ainsi qu'une taille inférieure à 200 nm étaient des prérequis pour ce projet. En effet, une homogénéité suffisante était nécessaire pour l'évaluation de la stabilité du recouvrement. D'autre part, il était important de formuler des particules de taille inférieure à 200 nm, qui correspond à la limite supérieure pour une administration par voie intraveineuse. En nous basant sur des travaux préliminaires de formulation établis pour la production de layersomes recouverts de deux couches de polyélectrolytes, une procédure de recouvrement LbL a été mise au point et optimisée. Cette procédure nous a permis de formuler des layersomes recouverts jusqu'à 6 couches de polyélectrolytes ainsi que des layersomes recouverts de 2 couches de polymères réticulées. Les formulations de layersomes produites ont pour la quasi-totalité respecté le cahier des charges défini. En effet, les formulations de layersomes recouvertes de 1 à 4 couches ainsi que les layersomes réticulés étaient toutes homogènes avec des

valeurs de PDI inférieures à 0,3 et des tailles inférieures ou égales à 200 nm. Seules les formulations recouvertes de 5 et 6 couches de polymères présentaient des tailles supérieures à 200 nm mais étaient cependant très homogènes. Bien que des tailles supérieures à 200 nm soient limitantes pour une potentielle application par voie intraveineuse, elles ne le sont néanmoins pas pour une utilisation par voie orale et certaines autres voies parentérales. D'autre part, nous avons pu constater que la réticulation des couches de polyélectrolytes déposées à la surface des liposomes (par ajout d'agents de couplage ou à l'aide d'une forme chimiquement réactive du PGA) n'a pas induit d'importantes variations de taille ou de potentiel zêta.

L'uniformité observée entre nos différents lots de constructions layersomiques prouve que notre méthode de formulation est reproductible et robuste, et ce malgré la complexité des structures développées. La procédure de formulation mise au point a cependant comme désavantage la perte de matériel durant l'étape d'élimination des polymères excédentaires (14 % de perte), ce qui nécessite l'utilisation de quantités de départ en liposomes importantes. Bien que la stratégie de filtration employée (ultrafiltration par centrifugation) soit génératrice de pertes, elle a été sélectionnée car elle permet de maintenir l'homogénéité des suspensions préparées, ce qui n'était pas le cas par exemple pour la filtration par pression que nous avons explorée. Afin de minimiser ces pertes, **la filtration à flux tangentiel pourrait à l'avenir être envisagée**. En effet, cette technique de filtration occasionne peu de pertes et n'est pas dommageable pour l'échantillon à filtrer. De plus, elle peut fonctionner en continu puisque les colmatages de la membrane de filtration sont moins fréquents.³⁶⁶ Ainsi, son emploi pourrait également permettre un gain de temps considérable. D'autre part, **l'incorporation de molécules magnétiques** dans le cœur aqueux des liposomes pourrait aussi constituer une stratégie de séparation alternative.²⁵⁵ En effet, cette technique permet de purifier de façon simple et efficace des particules par application d'un champ magnétique et ce, avec des pertes négligeables.³⁶⁷ Néanmoins, en vue de l'emploi futur des layersomes en tant qu'outils thérapeutiques, l'encapsulation de molécules magnétiques n'est pas souhaitable. Il s'agirait de les utiliser uniquement lors de la mise au point.

2. Caractérisation du recouvrement des layersomes

Trois techniques différentes ont été employées pour la caractérisation du recouvrement des liposomes : la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la méthode de microbalance à cristal de quartz (QCM) ainsi qu'une technique originale basée sur l'obtention d'un signal de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET).

La diffusion dynamique de la lumière est une technique classiquement utilisée pour la caractérisation des nanoparticules. Son utilisation nous a permis de déterminer les tailles moyennes de chaque suspension de layersomes formulées, leur dispersité ainsi que leur potentiel zêta. Ainsi, nous avons pu constater que l'ajout de couches successives de PLL et de PGA se traduisait par une augmentation du diamètre moyen des particules avec un profil de croissance linéaire à partir de deux couches ajoutées. Ces résultats ne sont pas en accord avec la littérature. En effet, de nombreux travaux de caractérisation de films constitués de PLL et de PGA ont démontré que l'augmentation de l'épaisseur de ces films présente un profil de croissance exponentiel.^{318,368,369} Cette différence pourrait être expliquée par l'emploi de conditions de formulation différentes (concentration ionique, concentration en polymère, solution tampon) ainsi que par l'utilisation d'un support de forme particulière au lieu d'un support plat. En effet, les travaux de caractérisation de ces films ont été réalisés avec des concentrations en polyélectrolytes 5 à 50 fois plus importantes ainsi que des concentrations en ions (NaCl) 6 fois plus importantes que celles que nous avons employées. Or, il a été démontré que ces paramètres, et plus particulièrement la force ionique, influencent le profil de croissance des films de polyélectrolytes générés.³⁷⁰ D'autre part, dans nos travaux une inversion des valeurs de potentiel zêta a été constatée suite à l'ajout de chaque couche de polyélectrolytes de charge opposée à la surface des liposomes, témoignant du recouvrement de ces derniers. Néanmoins, nous avons pu constater une légère diminution des valeurs absolues de potentiel zêta en fonction du nombre de couches de polymères déposées. Cette observation pourrait être expliquée par l'insertion d'ions dans les couches engageant des liaisons ioniques avec les polyélectrolytes et réduisant ainsi le nombre de charges disponibles pour des interactions avec les charges de la couche polymérique suivante.

La QCM est la technique de référence employée pour la caractérisation de films LbL. Bien que cette méthode soit très employée pour la caractérisation de films générés sur un support plat, cette méthode a été à ce jour très peu utilisée pour la caractérisation de layersomes. Les résultats de cette caractérisation préliminaire suggèrent un dépôt d'une fine couche de PGA à la surface des liposomes recouverts de PLL. Il conviendra à l'avenir de répéter cette procédure afin de confirmer cette tendance. Par ailleurs, il serait pertinent **d'employer cette technique pour la caractérisation du recouvrement des liposomes avec davantage de couches de polyélectrolytes afin de comparer les profils de croissance obtenus à ceux acquis par DLS.**

Enfin, le FRET est une méthode largement utilisée en biologie pour caractériser notamment des interactions entre des protéines. Nous avons choisi d'employer cette technique pour confirmer le recouvrement des liposomes ainsi que pour corroborer les résultats obtenus avec les deux méthodes d'analyse précédentes. Ainsi, un signal de FRET a pu être observé suite au recouvrement des liposomes avec de la PLL et du PGA greffés à des fluorophores FRET compatibles (rhodamine B et fluorescéine). Du fait des faibles taux de greffage et de la probabilité de rencontre des deux chromophores très limitée, un signal de faible amplitude a été obtenu. **Afin d'obtenir un signal de FRET plus conséquent, il serait intéressant de procéder au recouvrement LbL des liposomes avec davantage de couches de polymères.**

3. Évaluation de la capacité d'encapsulation des layersomes et de la stabilité du recouvrement

Afin d'évaluer la capacité d'encapsulation ainsi que la stabilité des layersomes, ces derniers ont été préparés à partir de liposomes encapsulant de la 5(6)-CF. Ce fluorophore est une molécule de choix pour l'évaluation de la résistance des liposomes. En effet, son utilisation permet de détecter par simple mesure de fluorescence une déstabilisation éventuelle de la bicouche des liposomes et de s'affranchir d'une procédure de dosage.

Ainsi, des taux d'encapsulation similaires à ceux des liposomes non recouverts ont été déterminés pour toutes les formulations développées. Ces résultats sont encourageants

dans la mesure où des taux d'encapsulation inférieurs aux nôtres ont été rapportés lors de la formulation de layersomes.^{306–308}

La stabilité de toutes les formulations de layersomes conservées à 4°C a été évaluée par des mesures de fluorescence ainsi que par des mesures de taille et de potentiel zêta. À l'exception de la formulation de layersomes recouvertes de 6 couches de polymères (Lp-(PLL-PGA)₃), toutes les autres suspensions de layersomes ainsi que les suspensions de liposomes étaient stables sur une échelle de 2 mois. En effet, les différentes mesures effectuées ont montré une déstabilisation après 1 mois de conservation de la formulation de Lp-(PLL-PGA)₃. Cette déstabilisation prématurée pourrait être due aux forces exercées par les multiples couches de polymères adsorbées à la surface des liposomes. Du fait du nombre restreint de publications témoignant du développement de formulation de layersomes, il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature. Néanmoins, nous avons pu identifier deux publications qui témoignent d'une évaluation de la stabilité des layersomes à 4°C. Ces travaux ont démontré une stabilité jusqu'à 3 fois augmentée des liposomes recouverts par rapport aux liposomes nus conservés à 4°C.^{289,371} Dans notre cas, le recouvrement LbL des liposomes n'a pas permis d'augmenter leur stabilité lors de leur conservation. À l'avenir, il serait pertinent **d'évaluer si le recouvrement permet de mieux préserver la structure des liposomes dans le cas par exemple d'une conservation par congélation ou par lyophilisation.**

4. Évaluation de la résistance des layersomes en conditions biologiques

La résistance des layersomes a été évaluée en présence de Triton™ X-100, de taurocholate de sodium, de deux phospholipases (A₂ et C) ainsi qu'en présence de plasma humain. Bien qu'aucune résistance n'ait été observée en présence de phospholipases et de taurocholate de sodium, une stabilité accrue a été constatée en présence de Triton™ X-100 et de plasma, en particulier pour les liposomes recouverts de 4 et de 6 couches de polyélectrolytes. Il est assez surprenant d'observer que la réticulation n'a pas permis d'augmenter davantage la résistance des structures. Il est possible que le taux de réticulation ne soit pas assez important. Ainsi, il serait pertinent pour la suite de ces travaux **d'augmenter le taux de réticulation des couches ainsi que le nombre de couches réticulées**

afin d'augmenter leur rigidité. L'utilisation de PGA-sulfo-NHS avec un taux de greffage supérieur à 50 % constitue une piste éventuelle.

D'autres part, ces résultats préliminaires ne sont pas en accord avec ceux publiés antérieurement par notre laboratoire. En effet, une stabilité totale des liposomes recouverts de 2 couches avait été observée en présence de concentrations équivalentes de ce détergent. Aucune autre étude ne fait part d'une évaluation de la stabilité des layersomes en présence de concentrations variables de Triton™ X-100.³¹⁹ Cependant, en comparant nos résultats à ceux obtenus pour une formulation de liposomes dont le cœur aqueux a été gélifié, la stabilité observée en présence de faibles concentrations de ce détergent est moindre mais équivalente à des concentrations plus élevées.²³⁴ En effet, le recouvrement LbL a permis d'augmenter la stabilité des liposomes d'un facteur 6 aux concentrations de Triton™ X-100 les plus faibles (0,15 %) à un facteur 1,6 aux concentrations les plus fortes (0,6 %). En comparaison, la gélification du cœur aqueux des liposomes a permis d'augmenter leur résistance en présence de ce détergent d'un facteur 3 aux concentrations les plus faibles (0,04 %) à un facteur 1,6 aux concentrations les plus fortes (0,15 %). De la même manière, il est difficile de comparer les résultats obtenus en présence de plasma puisque qu'aucune étude de stabilité de layersomes n'a été réalisée à notre connaissance dans ce milieu biologique. De plus, la quasi-totalité des études comparant la stabilité des liposomes pégylés à celle de liposomes nus en présence de plasma n'ont pas révélé d'augmentation de stabilité.²²²⁻²²⁴

Pour la suite de ces travaux, il conviendra de **confirmer la tendance observée en présence de Triton™ X-100 avec d'autres types de détergents non-ioniques**, tels que **des polysorbates (Tween® 20) ou d'autres dérivés de poly(éthylène glycol) (Brij® 35)**. D'autre part, il serait intéressant **d'étudier la stabilité des layersomes en présence de milieux biologiques plus complexes, tel qu'en milieu gastrique et intestinal simulé.**

Ainsi, une plateforme de délivrance biocompatible et biodégradable à base de liposomes recouverts et réticulés a été développée, caractérisée et a fait l'objet d'une évaluation préliminaire de stabilité. Des résultats préliminaires *in vitro* encourageants ont été obtenus mais devront être confirmés par des études complémentaires. Enfin, à notre connaissance seulement trois autres équipes de recherche ont mis au point des layersomes recouverts de multiples couches de polyélectrolytes.^{289,334,335} Ces travaux novateurs confirment ainsi la versatilité du recouvrement LbL et ouvrent la voie à de nouvelles pistes de modification et d'optimisation des liposomes pour leur application pharmaceutique.

B. Recouvrement de particules virales pour la production d'un vaccin efficace en une injection unique

1. Formulation de particules virales recouvertes

Pour la fabrication de particules virales recouvertes, nous avons souhaité tirer parti des travaux de formulation des layersomes. Au vu des exigences du projet en termes de biocompatibilité, les mêmes espèces polymériques ont été employées pour le revêtement des virus (PLL et PGA).

En comparaison au projet de formulation de layersomes, moins de prérequis étaient nécessaires pour l'élaboration de nos candidats vaccins. En effet, leur injection par voie sous-cutanée a posteriori n'impose pas de limite de taille. Il était cependant nécessaire de préparer des particules virales suffisamment concentrées afin d'induire une fois administrées une immunisation suffisante chez la souris. Ainsi, en adaptant la procédure de formulation préalablement établie, des particules virales recouvertes jusqu'à 4 couches de polyélectrolytes et des particules virales recouvertes de 2 couches de polymères réticulées ont été développées. La quasi-totalité des particules formulées étaient suffisamment concentrées pour une évaluation de leur potentiel immunogène. En effet, seules les particules virales recouvertes de 4 couches de polymères n'ont pas répondu à ce prérequis. Pour la réticulation des particules virales, les mêmes stratégies que celles employées pour les layersomes ont été appliquées.

L'obtention de suspensions aux caractéristiques physico-chimiques équivalentes d'un lot à l'autre, témoigne de la robustesse de la procédure de formulation. Néanmoins, le désavantage de cette procédure de formulation est le temps de dialyse appliqué pour l'élimination des espèces polymériques excédentaires (36 h) suite à l'ajout de chaque couche. En effet, la dialyse a été retenue car elle permettait d'éliminer l'excédent de polymères sans pour autant déstabiliser le recouvrement des particules, contrairement à l'ultracentrifugation que nous avons testée. **Afin de réduire le temps de formulation de ces particules, il serait intéressant d'envisager d'autres stratégies de filtration, telle que**

l'ultrafiltration par centrifugation qui a été employée pour la fabrication des layersomes, ou encore la filtration à flux tangentiel mentionnée ci-avant.

2. Caractérisation des particules virales recouvertes

Les particules virales formulées ont été caractérisées par des mesures de taille, de potentiel zêta ainsi que par microscopie électronique (TEM) et confocale.

Les mesures de DLS et de LD ont révélé des particules de tailles proches voire supérieures au micron en fonction du nombre de couches déposées à la surface des virus. L'ajout de PLL et de PGA n'a donc pas permis d'obtenir des films fins de polyélectrolytes à la surface des particules virales, comme observé pour les layersomes. Cette différence pourrait être expliquée par la topologie de surface bien particulière du virus H5N1. En effet, comme observé par microscopie confocale, l'enveloppe du virus de la grippe est hérissée de spicules protéiques (hémagglutinine et neuraminidase). D'autre part, il est possible que la répartition des charges de surface soit moins homogène que celles des liposomes. Ces critères de topologie et de charge sont donc certainement à l'origine de ce recouvrement moins homogène qui conduit à la formation de particules de tailles micrométriques. Par ailleurs, des résultats similaires en taille ont été obtenus pour le recouvrement avec de la PLL du virus Sendai.³⁷² Comme les virus Influenza, il s'agit d'un virus enveloppé dont l'enveloppe est également hérissée d'hémagglutinine et de neuraminidase. Les mesures de potentiel zêta effectuées ont révélé une inversion de la charge de surface des particules virales suite à l'ajout de chaque couche de polymère, témoignant du dépôt LbL. Néanmoins, nous avons pu constater que les valeurs absolues de potentiel zêta obtenues suite à l'ajout des polyélectrolytes étaient moins importantes que celles mesurées pour les layersomes. Cette différence pourrait être expliquée par le potentiel zêta du virus nu (-20 mV), qui est deux fois plus grand que celui mesurés pour les liposomes.

Afin de visualiser l'organisation des particules virales au sein des complexes de polymères formés, les formulations vaccinales ont été analysées par microscopies électronique à transmission et confocale. Les clichés de TEM ont révélé une organisation bien particulière pour chaque suspension vaccinale et ont permis de confirmer le recouvrement des virus. La microscopie confocale a quant à elle permis de confirmer la

colocalisation des deux polymères. Afin de compléter cette étude, il aurait été pertinent **d'employer en plus des deux polymères fluorescents, une particule virale greffée ou encapsulant un fluorophore dont les longueurs d'onde d'émission sont distinctes de celles des deux autres chromophores** (rhodamine et fluorescéine). De cette façon, nous aurions pu confirmer la colocalisation des signaux et peut être estimer le nombre de particules virales présentes au sein des complexes de polymères.

3. Évaluation de la stabilité des particules virales recouvertes

La stabilité des particules virales en condition tamponnée et à 4°C a été évaluée par des mesures de tailles et de potentiel zêta sur une échelle de 2 mois. Ces mesures ont permis de confirmer une bonne stabilité du recouvrement sur toute la durée de l'étude. La bonne conservation des particules recouvertes est un critère très important pour l'élaboration de vaccins. **Au vu de la taille micrométrique des suspensions vaccinales, il serait intéressant d'effectuer en plus des mesures de DLS, des mesures de taille par LD afin d'obtenir des informations plus précises quant à l'évolution des tailles au cours du temps.**

4. Évaluation du potentiel immunogène des candidats vaccins

Pour l'évaluation du potentiel immunogène de nos suspensions vaccinales phares, ces dernières ont été administrées à des souris et les titres d'anticorps produits sur une échelle de 2 mois ont été mesurés de façon régulière. D'autre part, la mise en place d'une réponse cellulaire adaptative a été recherchée en quantifiant les cytokines produites par les lymphocytes.

Les résultats préliminaires obtenus ont révélé des titres d'anticorps légèrement inférieurs pour les suspensions vaccinales par rapport au virus nu pendant le premier mois d'évaluation. Des titres d'anticorps similaires à ceux du virus non recouvert ont ensuite été obtenus. Ces résultats suggèrent un relargage différé du virus sur les 35 premiers jours et sont encourageants, dans la mesure où le recouvrement LbL n'a pas modifié leur immunogénicité. En effet, l'encapsulation ou même le greffage de molécules à des particules virales sont souvent à l'origine d'une perte conséquente de l'immunogénicité des virus entiers inactivés, ce qui limite leur potentiel immunogène et réduit ainsi l'efficacité des

vaccins. Le recouvrement LbL constitue donc une approche non dommageable pour « l'enrobage » de particules virales. Néanmoins, on aurait pu s'attendre à des titres d'anticorps un peu plus élevés que pour les particules virales nues sur les 30 derniers jours de l'évaluation. Ces résultats pourraient être expliqués par le faible nombre de souris employées pour cette étude (n = 5) ainsi que par des variations importantes de la réponse des souris pour chaque formulation testée. **Il conviendra donc de reproduire cette expérience avec un nombre plus important de souris afin de réduire la variabilité d'erreur et de pouvoir conclure.**

Pour l'évaluation de la réponse cellulaire adaptative, il est difficile de conclure à la mise en place d'une réponse immunitaire puisque de faibles pourcentages de cellules sécrétant des cytokines ont été obtenus aussi bien pour les formulations que pour le virus nu. Il conviendra donc de refaire cette expérience avec plus d'animaux et la compléter par d'autres tests immunologiques supplémentaires qui permettront de mieux conclure quant à la mise en place d'une réponse cellulaire spécifique. **En effet, il serait pertinent de déterminer par exemple le pourcentage d'isotypes particuliers d'anticorps par un test ELISA pour mettre en évidence la mise en place d'une réponse de type Th1.**

D'un point de vue de la formulation, **des adjuvants ou même du virus nu pourraient être ajoutés à la formulation de virus recouverts dans le but d'augmenter la réponse immunitaire générée.** En effet, plusieurs publications témoignent d'une meilleure couverture vaccinale suite à l'ajout de l'un et/ou l'autre élément.^{200,373,374}

Ainsi, un virus recouvert de multiples couches et dont les couches ont été réticulées a été développé, caractérisé et a fait l'objet d'une première évaluation de son potentiel immunogène qui a révélé des résultats encourageants. À notre connaissance, aucun virus n'a fait l'objet d'un recouvrement avec autant de couches pour une telle application. Cette procédure de formulation développée pourrait être appliquée pour le recouvrement d'autres types de virus, avec d'autres polymères fonctionnels et pour d'autres applications.

Le recouvrement LbL a été appliqué afin de recouvrir deux types de nanoparticules différentes et pour deux applications distinctes. Ces travaux témoignent de la versatilité du recouvrement LbL et prouvent que cette stratégie de modification est une alternative intéressante, simple et dans certain cas plus « douce » que les techniques d'optimisation traditionnellement utilisées (encapsulation, fonctionnalisation).

Annexe :

Développement de liposomes couplés à un aptamère pour le ciblage du glioblastome via le récepteur $\alpha_5\beta_1$

À mon grand-père

Be steady and well-ordered in your life so that you can be fierce and original in your work.

Gustave Flaubert

A. Introduction

1. Contexte et objectifs du projet

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale de haut grade malin (de grade IV d'après l'Organisation Mondiale de la Santé³⁷⁵) causée par la prolifération anormale des cellules de la glie du système nerveux central (SNC). Ce type de tumeur se développe de façon quasi-exclusive au niveau de l'encéphale mais peut aussi apparaître, dans de très rares cas, au niveau du cervelet, du tronc cérébral ou encore au niveau de la moelle épinière.^{376,377} Les symptômes vont être dépendants de la localisation de la tumeur et sont la conséquence de l'augmentation de la pression intracrânienne et de l'inflammation péri-tumorale due à la croissance rapide de cette dernière. Les signes évocateurs de ce type de tumeur sont des maux de tête, des nausées et vomissements, des faiblesses d'un membre, des troubles de la parole, de la vision, du comportement, de la mémoire, de l'humeur ou encore des crises épileptiques dans des stades tumoraux plus avancés.³⁷⁶

Le GBM présente une résistance accrue à de nombreux agents chimiothérapeutiques ainsi qu'une hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur, ce qui le rend extrêmement agressif. De plus, la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) réduit considérablement les possibilités de traitements car les substances couramment utilisées ne la traversent pas ou font l'objet d'efflux.³⁷⁸ A ce jour, aucun traitement curatif n'a donc pu être établi. Les seuls traitements proposés sont des soins palliatifs non spécifiques de la tumeur, tels que le l'administration post-résection de témozolomide classiquement associé à de la radiothérapie,³⁷⁹ visant à prolonger le temps de survie des patients et à améliorer leur qualité de vie détériorée par le cancer. Le pronostic de ce type de tumeur après traitement reste très faible avec un temps de survie médian de 15 mois et 27 % de survie après 2 ans.³⁸⁰

Au vu de l'hétérogénéité et de la résistance des GBM,³⁸¹ il est primordial d'envisager l'utilisation de plusieurs molécules et stratégies thérapeutiques pour l'éradication de ce type tumoral. Des traitements combinant à la fois chimiothérapie, radiothérapie et immunothérapie ont été développés et sont en cours d'essais cliniques. Malgré ces efforts, de nombreuses molécules et stratégies thérapeutiques développées ces 15 dernières années ont été récemment abandonnées lors des dernières phases d'essais cliniques,

essentiellement pour des raisons de toxicité ou de manque d'efficacité.³⁸² Il est donc nécessaire de continuer à rechercher et développer de nouvelles stratégies de traitement en se focalisant sur des substances actives plus spécifiques de la tumeur afin de limiter les effets secondaires, d'améliorer la qualité de vie des patients et de proposer un traitement plus efficace.

L'équipe de Signalisation Tumorale et Cibles Thérapeutiques (STCT ; UMR 7021, CNRS/Université de Strasbourg) travaille sur l'identification de molécules spécifiques des GBM afin de développer de nouveaux outils de diagnostic et de traitement. Elle s'est intéressée en particulier à l'identification de molécules spécifiques au récepteur transmembranaire $\alpha_5\beta_1$ (Figure 89) surexprimé par les néo-vaisseaux tumoraux et les tumeurs solides,³⁸³ dont le GBM.

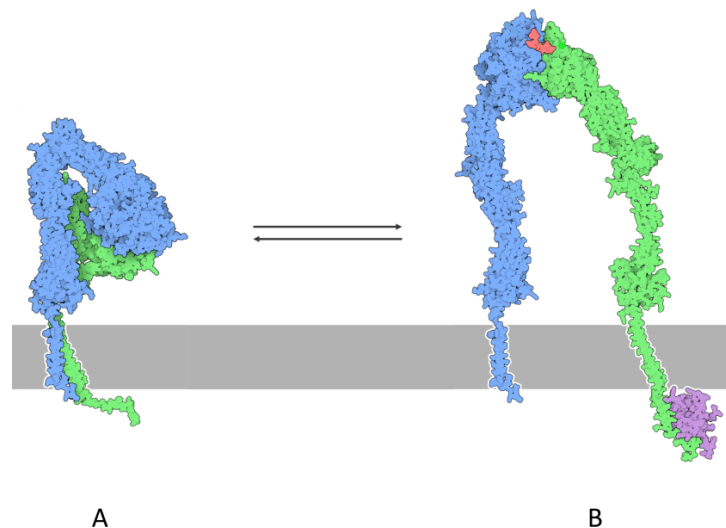


Figure 89 : Intégrine $\alpha_5\beta_1$ sous sa forme inactive et sous sa forme active (liée à un ligand). (A) : forme inactive ; (B) : forme active. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α (bleu) et d'une sous-unité β (vert). En présence d'un ligand (rouge), on passe d'une forme inactive (repliée) à une forme active (ouverte) dont le site de liaison est accessible. Sous sa forme active, la sous-unité β est liée au niveau de son domaine intracellulaire à une petite protéine (mauve), la taline, qui permet de connecter l'intégrine au cytosquelette d'actine. D'après les références 384 et 385. Entrée PDB : 1JV2.

L'équipe STCT a récemment identifié un aptamère en tant que nouveau ligand de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, par SELEX.³⁸⁶⁻³⁸⁸ Le SELEX est une stratégie de sélection itérative permettant

d'identifier des acides nucléiques ARN ou ADN simples brins, nommés les aptamères,^{389,390} avec une structure secondaire stable et qui se lie de façon spécifique et avec une forte affinité à des molécules cibles. Les aptamères possèdent de nombreux avantages par rapport aux anticorps, tels qu'une bonne stabilité à la température, une capacité à retrouver sa conformation d'origine après dénaturation, une pénétration plus efficace dans les compartiments cellulaires, l'absence de toxicité et d'immunogénicité, l'induction de moins d'effets secondaires et enfin, ils sont synthétisés et aisément modifiables chimiquement, ce qui les rend particulièrement attractifs.³⁹¹⁻³⁹⁴

Parmi les 6 molécules aptamériques identifiées par le STCT, une se lie de façon plus spécifique et avec plus d'affinité à α_5 .^{389,390} Cet aptamère est dénommé H02. Sa structure secondaire est présentée ci-après en Figure 90. Il constitue donc un nouvel outil potentiel pour le diagnostic et la thérapie de GBM. De plus, la stabilité et la résistance de cet aptamère face aux RNases ont été optimisées par ajout d'un atome de fluor en position 2' du ribose de chaque ribonucléotide C et U (Figure 91).

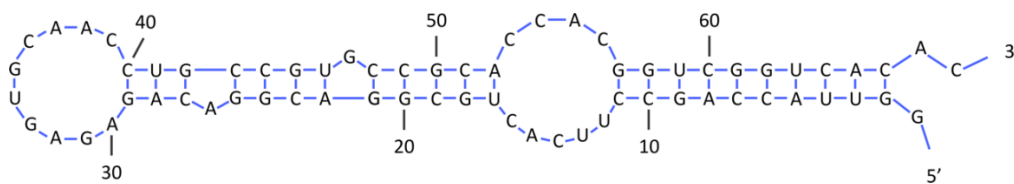


Figure 90 : Structure secondaire prédictive de l'aptamère H02 (68 ribonucléotides).

Ces modifications lui confèrent ainsi une stabilité à 37°C d'au moins 24 h au contact des cellules et en présence de solutions complexes, telles que les milieux de cultures complémentés en sérum de veau foetal, classiquement utilisés pour la culture cellulaire.

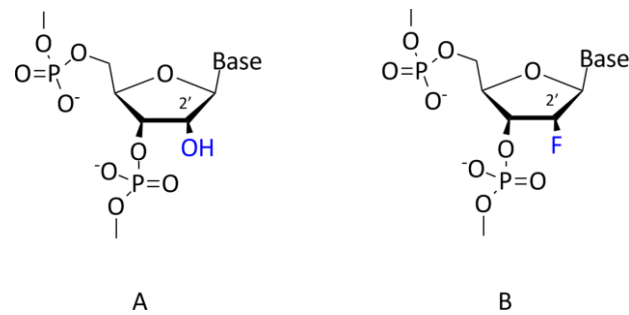


Figure 91 : Structure chimique d'un ribonucléotide non modifié et modifié par ajout d'un groupement fluor en position 2' du ribose. (A) : non modifié ; (B) : modifié.

En collaboration avec cette équipe de recherche, nous avons souhaité utiliser l'aptamère H02 pour le développement d'une plateforme nanoparticulaire qui permettrait de délivrer des substances thérapeutiques antitumorales en utilisant la spécificité d'H02 pour le récepteur $\alpha_5\beta_1$ et donc pour les GBM. L'objectif de ces travaux de recherche est donc de développer et caractériser un vecteur nanoparticulaire covalentement lié à l'aptamère H02 ainsi que d'évaluer son internalisation par les cellules de GBM via le récepteur $\alpha_5\beta_1$.

2. Stratégie

2.1. Modèle *in vitro*

Pour l'évaluation de l'internalisation du vecteur nanoparticulaire développé, l'équipe de STCT met à disposition son système *in vitro* mis au point pour la caractérisation de la spécificité de l'aptamère H02 au récepteur $\alpha_5\beta_1$. Il s'agit de lignées immortelles de glioblastomes (U87-MG) modifiées pour la surexpression (U87-MG α_5+ , désignées F8) et la sous-expression (U87-MG α_5- , désignées D4) du gène α_5 .³⁹⁵ L'internalisation de notre système nanoparticulaire par les cellules F8 et D4 a été analysée par microscopie confocale. Ceci implique d'utiliser des marqueurs cellulaires adéquats à notre étude ainsi qu'une nanoparticule et un aptamère eux-mêmes fluorescents.

2.2. Marqueurs fluorescents pour une analyse en microscopie confocale

Suite à la fixation de l'aptamère H02 aux cellules exprimant le récepteur α_5 , ce dernier est rapidement internalisé par endocytose et acheminé vers les endosomes.^{389,390}

Afin de visualiser l'internalisation potentielle du nanovecteur dans les endosomes, il convient d'utiliser un marqueur fluorescent spécifique de ces derniers. Nous avons donc choisi d'effectuer un immunomarquage des endosomes primaires à l'aide d'un anticorps primaire anti-EEA1 dirigé contre ces derniers et d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorophore Alexa Fluor™ 568 (Figure 92A).

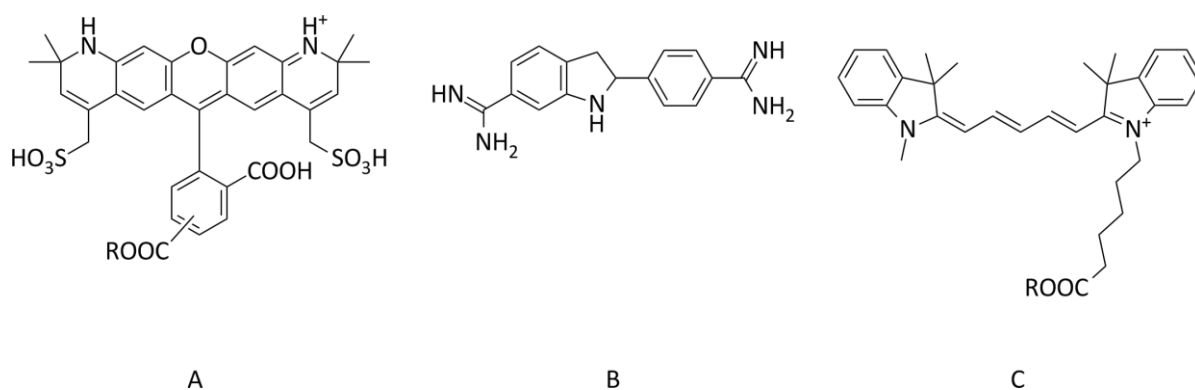


Figure 92 : Structures chimiques des fluorophores sélectionnés pour une analyse par microscopie confocale. (A) : Alexa Fluor™ 568 (λ_{ex} : 578 nm, λ_{em} : 603 nm) ; **(B) :** 4',6-diamidino-2-phenylindole (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 450 nm) ; **(C) :** cyanine 5 (λ_{ex} : 649 nm, λ_{em} : 666 nm).

Nous avons également réalisé un marquage du noyau avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Figure 92B) qui est une molécule fluorescente de forte affinité pour les régions de l'ADN riches en couple adénine-thymine. Afin de visualiser l'aptamère H02, nous avons décidé d'utiliser une version de ce dernier modifiée en 5' avec un fluorophore cyanine 5 (Cy5, Figure 92C). Cet aptamère modifié a déjà été employé par le STCT pour l'évaluation de son internalisation par des cellules U87-MG α_5+ et il a été démontré que ses propriétés biologiques sont maintenues malgré sa modification en 5'. Enfin, pour le marquage de la nanoparticule, il convient d'utiliser un fluorophore dont les longueurs d'onde d'émission et d'excitation n'empiètent pas sur celles des autres chromophores. Le choix du fluorophore étant dépendant du système nanoparticulaire sélectionné, il est justifié dans le paragraphe suivant.

2.3. Nanoparticule

Pour la conception de notre plateforme nanoparticulaire de délivrance de substances thérapeutiques spécifiques du récepteur $\alpha_5\beta_1$, notre choix s'est arrêté sur les liposomes. En effet, au vu de leur bonne biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur capacité à encapsuler des molécules à la fois hydrophobes et hydrophiles, les liposomes conventionnels constituent des candidats idéaux pour la délivrance de substances actives. De plus, ces nanovecteurs ont déjà été appliqués pour le traitement spécifique de tumeurs, dont les tumeurs cérébrales de type gliomes et il a été démontré qu'ils sont capables de passer la BHE.^{396,397} En effet, plusieurs formulations de liposomes couplés à des molécules de ciblage et contenant des substances anti-cancéreuses (telles que l'irinotécan³⁹⁸ et la doxorubicine³⁹⁹) ou encore des gènes codant pour des éléments régulateurs de la transcription cellulaire (tels que le gène p53⁴⁰⁰ et RB94⁴⁰¹) sont en cours d'essais cliniques (Tableau 28). D'autre part, des formulations stables de liposomes fluorescents couplés à des ligands du récepteur au mannose ont été développées au sein de notre laboratoire et ont déjà été utilisées avec succès pour la démonstration *in vitro* par microscopie confocale d'une internalisation spécifique via ce récepteur.⁴⁰² Des résultats *in vivo* dans le domaine de la vaccination ont également été obtenus.⁴⁰³ Ces formulations liposomales contenaient une molécule fluorescente dans leur cœur aqueux, la 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF, Figure 93). Ce fluorochrome est soumis à un phénomène de « quenching » lorsqu'il est encapsulé à une concentration de 40 mM au sein des liposomes. En revanche, s'il est libéré suite à une déstabilisation ou une destruction de ces derniers, il n'y a plus de phénomène de « quenching » mais une forte augmentation du signal de fluorescence.³³⁸

Tableau 28 : Suspensions de liposomes en cours d'essais cliniques pour le traitement de tumeurs cérébrales. D'après la référence ³⁹⁶.

Nom du traitement	Molécule de ciblage	Agent thérapeutique	Cancer ciblé	Statut
NL CPT-11	/	Irinotécan	Gliomes de haut grade	Phase I
SGT-53	Transferrine	Gène p53	GBM	Phase II
SGT-94	Transferrine	Gène RB94	Gliomes malins et GBM	Phase I
2B3-101	Glutathion	Doxorubicine	Gliomes malins et métastases cérébrales	Phase I/IIa

Cette astuce a été utilisée pour démontrer l'internalisation spécifique de ces formulations. En effet, une fois internalisés via le récepteur au mannose, les liposomes sont acheminés vers les endosomes où ils sont soumis à un pH plus acide (pH 4–6) qui les déstabilise. Leur déstabilisation conduit au relargage de leur contenu en fluorophore, ce qui se traduit par une nette augmentation du signal de fluorescence et confirme bien leur internalisation spécifique. Comme pour le récepteur au mannose, le récepteur $\alpha_5\beta_1$ est lui aussi acheminé vers les endosomes une fois lié à son ligand. En utilisant des liposomes couplés à H02 et contenant ce fluorophore, on pourrait donc visualiser l'internalisation du récepteur $\alpha_5\beta_1$ de la même façon que pour le récepteur au mannose (Figure 94).

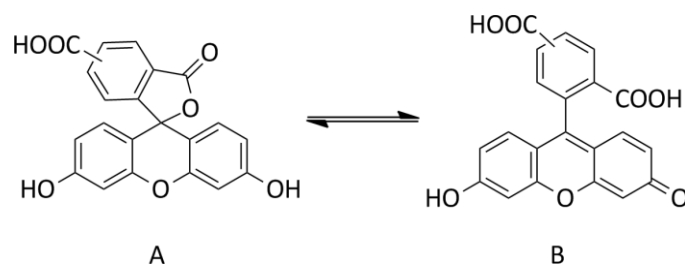


Figure 93 : Structure de deux formes de la 5(6)-carboxyfluorescéine neutre (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 518 nm).

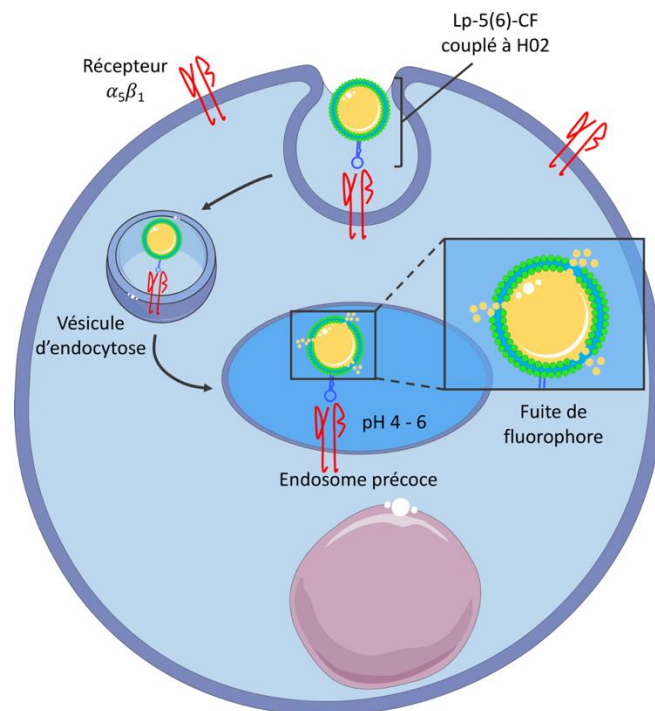


Figure 94 : Devenir intracellulaire supposé des liposomes-5(6)-CF couplés à l'aptamère H02 suite à la fixation au récepteur $\alpha_5\beta_1$. La reconnaissance par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (rouge) de l'aptamère H02 (bleu) couplé à un liposome-5(6)-CF conduit à l'endocytose du complexe ligand-récepteur. La vésicule d'endocytose formée est acheminée vers les endosomes primaires. Le pH acide (entre 4 et 6) de ces derniers conduit à la déstabilisation des liposomes qui relarguent leur contenu en molécule fluorescente.

Enfin, il s'avère que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la 5(6)-CF ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$) sont bien distinctes des autres longueurs d'onde des divers fluorophores utilisés dans le cadre de notre étude. Comme ces formulations de liposomes fluorescents semblent parfaitement adaptées aux attentes du projet, nous avons choisi de les utiliser pour le développement et l'évaluation de notre plateforme de délivrance spécifique au récepteur $\alpha_5\beta_1$.

2.4. Couplage

Une fois les liposomes sélectionnés, nous avons dû établir une stratégie de couplage de l'aptamère H02 à ces derniers. Dans un premier temps, nous avons pensé à adsorber l'aptamère à la surface des nanoparticules. Celui-ci étant chargé négativement par la présence de groupements phosphates, il aurait été envisageable de l'adsorber à la surface

de nos liposomes recouverts de PLL (layersomes) en employant la même procédure de formulation couche par couche (LbL) que celle décrite dans les chapitres précédents. Cependant, comme la liaison de l'aptamère H02 à son récepteur est dépendante de sa conformation tridimensionnelle, son adsorption aurait pu empêcher sa fixation au récepteur. Nous avons donc abandonné cette idée. Nous avons ensuite pensé coupler de façon covalente l'aptamère aux liposomes par le biais d'une molécule « ancre » afin de générer des aptasomes. Pour ce faire, nous disposons au laboratoire de plusieurs ancres lipidiques avec des fonctions réactives à leur extrémité.^{403,404} Notre choix s'est arrêté sur l'ancre dipalmitoylglycérol-maléimide (DPG-mal) qui a déjà été utilisée par notre laboratoire pour la conception de vaccins liposomiques contre le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* notamment.⁴⁰³ Nous l'avons choisie parce qu'il s'agit d'une ancre totalement amphiphile constituée à la fois d'une double chaîne grasse (le dipalmitoylglycérol, Figure 95 partie A), d'un bras espaceur (un petit poly(éthylène glycol), PEG, Figure 95 partie B) et d'une fonction maléimide (Figure 95 partie C) qui peut réagir rapidement (4h) et de manière très douce (pH 6,5 – 7,5) avec un groupement thiol (-SH) selon une addition de Michael (Figure 96).

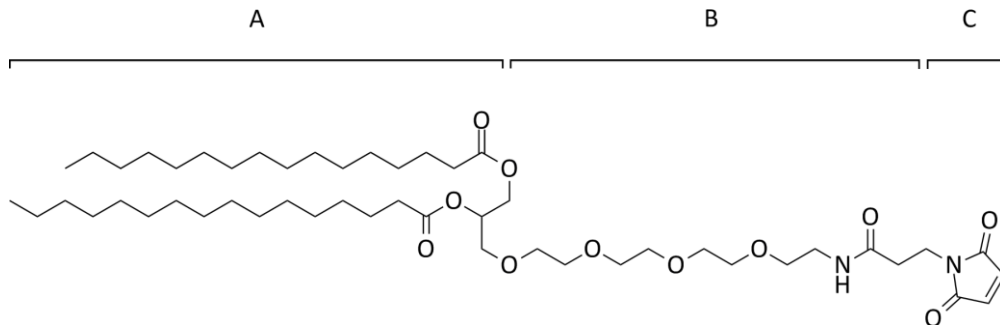


Figure 95 : Structure de l'ancre dipalmitoylglycérol-maléimide. L'ancre est constituée d'une double chaîne grasse (le dipalmitoylglycérol, **A**), d'un bras espaceur (un petit polyéthylène glycol, **B**) et d'une fonction maléimide (**C**).

Cette ancre est ajoutée à un très faible ratio molaire (généralement 2 %) au mélange de lipides classiquement préparé pour l'obtention du film lipidique (phosphatidylcholine (PC) :phosphatidylglycérol (PG):cholestérol (Chol) ; 52:13:33), qui constitue la première étape de la formulation des liposomes.

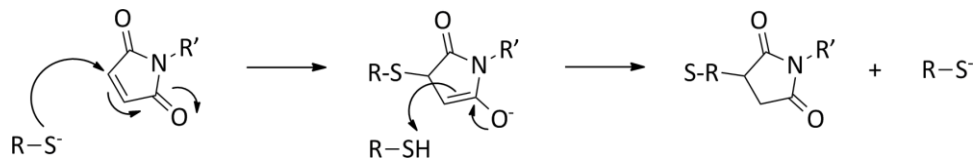


Figure 96 : Mécanisme de l'addition de Michael d'une espèce thiolée à une fonction maléimide.

Comme indiqué plus haut, les liposomes sont obtenus par réhydratation du film lipidique avec une solution aqueuse de carboxyfluorescéine (5(6)-CF) suivie d'une sonication pour casser les vésicules multilamellaires (MLV) et obtenir des vésicules unilamellaires (SUV). En parallèle et afin de pouvoir coupler H02 aux liposomes-5(6)-CF, nous avons fait synthétiser par la société Iba Lifesciences cet aptamère avec un groupement thiol (-SH) en 3' en plus du fluorophore Cy5 en 5'. Le couplage entre les nanoparticules et l'aptamère thiolé est effectué après obtention des liposomes unilamellaires et est possible parce que ceux-ci « exposent » la fonction maléimide de l'ancre à leur surface (Figure 97).

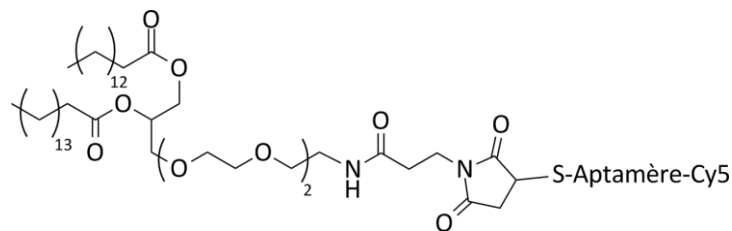


Figure 97 : Structure de l'ancre dipalmitoylglycérol-maléimide couplée à l'aptamère H02-cyanine 5 (Aptamère-Cy5) en 3' par la réaction de Michael.

B. Résultats et discussion

1. Formulation et caractérisation de liposomes-5(6)-CF pour un couplage à l'aptamère H02

1.1. Formulation et caractérisation de liposomes-5(6)-CF contenant l'ancre DPG-mal

Comme l'addition de Michael présente un meilleur rendement à un pH de 6,5, 2 formulations de SUV PC:PG:Cho:DPG-mal (52:13:33:2) ont été préparées de façon indépendante avec une solution tamponnée de 5(6)-CF de pH 6,5. Des mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, DLS) et de potentiel zêta ont ensuite été effectuées ($n = 2$) et des valeurs similaires à celles observées pour les formulations de liposomes-5(6)-CF préparées ultérieurement ont été obtenues (Tableau 29). Cependant, un signal de fluorescence anormalement élevé a été mesuré 3 h après la formulation des 2 suspensions de SUV, indiquant une fuite de la 5(6)-CF. Des mesures de taille et de potentiel zêta ont, à nouveau, été effectuées et des valeurs similaires à celles obtenues 3 h plus tôt ont été mesurées. Une déstabilisation des liposomes ne semble donc pas être à l'origine de la fuite de 5(6)-CF. Cette fuite observée à 2 reprises pourrait être due à la présence, en proportion suffisante, de 5(6)-CF entièrement protonée (donc neutre et plus hydrophobe que la forme mono ou dicarboxylate) qui est donc susceptible de traverser la bicouche lipidique des liposomes.

Tableau 29 : Caractéristiques physico-chimiques des liposomes-5(6)-CF préparés avec une solution tamponnée de pH 6,5.

Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
81 ± 16	0,238	-48 ± 7

Bien que l'addition de Michael donne de meilleurs rendements à pH 6,5, elle est aussi possible à des valeurs de pH un peu plus élevées. Afin de limiter ce phénomène de reprotonation de la 5(6)-CF, une autre formulation de SUV PC:PG:Chol:DPG-mal (52:13:33:2) a été préparée avec une solution tamponnée de 5(6)-CF de pH plus élevé que la précédente

(pH 7,4). Des mesures de taille et de potentiel zêta de la suspension ont ensuite été effectuées et des valeurs similaires à celles obtenues pour les 2 autres formulations préparées à pH 6,5 ont été obtenues. Cette fois-ci, aucune fuite de 5(6)-CF n'a été constatée, et ce, même après 3 semaines de conservation des suspensions à 4°C et sous argon. À un pH de 7,4, les espèces protonées (donc carboxyliques) présentes sont donc en proportions insuffisantes pour traverser la bicouche.

1.2. Couplage des liposomes-5(6)-CF à l'aptamère H02 et mesure de la taille et de la charge des aptasomes obtenus

Avant de pouvoir coupler l'aptamère H02 à l'ancre DPG-mal des liposomes, ce dernier a été linéarisé en le chauffant 5 min à 95°C puis a été réduit par l'ajout d'un équivalent de TCEP pour 1 équivalent d'aptamère (Figure 98). En effet, il est nécessaire de linéariser la structure de l'aptamère ainsi que de réduire les ponts disulfures potentiellement formés entre 2 molécules aptamériques pour pouvoir procéder au couplage. Ensuite, 1 équivalent d'H02 linéarisé et réduit pour 10 équivalents d'ancre DPG-mal a été ajouté à la suspension de SUV à pH 7,4 directement après formulation. Une suspension limpide de couleur verte a été obtenue suite au mélange de l'aptamère de couleur bleue aux liposomes-5(6)-CF de couleur jaune, et a été placée 4 h sur glace. Aucune précipitation n'a été constatée et ce, même après 4 h de réaction. Des mesures de taille et de potentiel zêta ont ensuite été effectuées (Tableau 30). Une augmentation d'environ 35 nm du diamètre moyen des liposomes ainsi que de leur valeur de PDI a été constatée suite à l'ajout de molécules d'aptamères aux suspensions de SUV. Les valeurs de potentiel zêta mesurées ne diffèrent pas des valeurs obtenues avant ajout de l'aptamère.

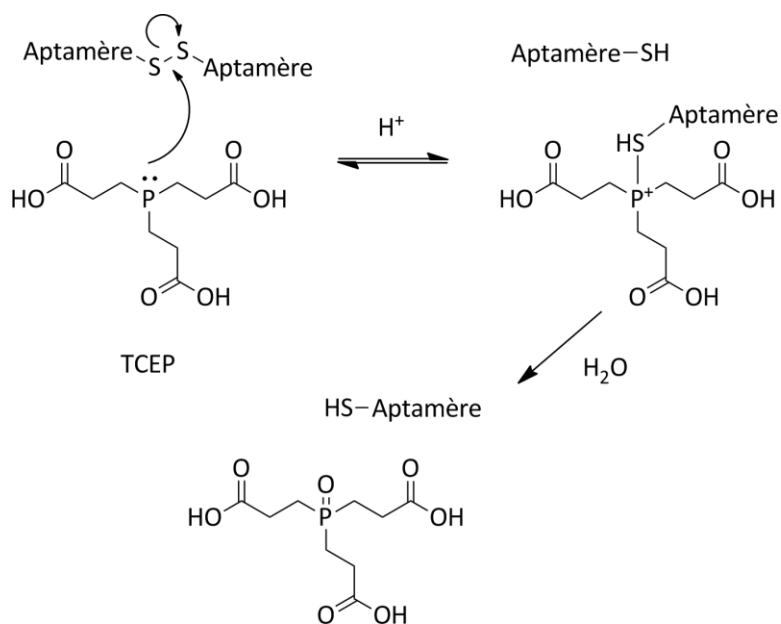


Figure 98 : Mécanisme de réduction d'un pont disulfure formé entre deux molécules d'aptamère par le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP).

L'augmentation du diamètre moyen des liposomes observée après ajout des aptamères peut difficilement être corrélée au greffage de ces derniers à la surface des liposomes. En effet, compte tenu de leur petite taille (environ 10 nm), le couplage potentiel des aptamères aux SUV n'a pas pu engendrer une telle augmentation de diamètre (soit presque 4 fois la longueur théorique d'H₂O₂). De plus, au-delà de la topologie des boucles et des hélices formées par des paires de nucléotides, les molécules d'ARN peuvent adopter une structure tridimensionnelle compacte comme les protéines. Leur longueur théorique estimée n'est donc certainement pas représentative de leur longueur réelle. Il est possible que le couplage de l'aptamère à la suspension de SUV ait engendré une modification de l'organisation des liposomes, ce qui pourrait expliquer ce résultat de DLS. D'autre part, comme la suspension mesurée contient une quantité non négligeable de Cy5, il est présumable que la présence de ce fluorophore ait pu perturber les mesures de taille effectuées. En effet, il a été démontré que l'émission de fluorescence peut modifier le signal détecté et ainsi biaiser l'analyse par DLS.⁴⁰⁵ La fluorescence émise lors de la mesure de DLS a donc pu perturber l'analyse des suspensions.

Tableau 30 : Caractéristiques physico-chimiques des liposomes-5(6)-CF avant et après couplage à l'aptamère H02.

Étape	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Avant couplage	79 ± 11	0,231	-47 ± 8
Après couplage	113 ± 17	0,344	-47 ± 7

Comme les valeurs de potentiel zêta mesurées sont identiques avant et après l'ajout d'aptamères aux liposomes, deux hypothèses sont envisageables. Il est possible qu'au vu du faible nombre de molécules aptamériques potentiellement greffées sur chaque particule (1 molécule d'H02 pour 10 ancres DPG-mal), le potentiel zêta mesuré ne soit pas impacté. Il est également envisageable que l'aptamère ne soit pas couplé aux liposomes, ce qui expliquerait que les valeurs de potentiel zêta sont identiques avant et après ajout de ce dernier à la suspension de SUV. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris la vérification du couplage de l'aptamère à la surface des liposomes.

1.3. Vérification du couplage des liposomes-5(6)-CF à H02

Afin de vérifier le couplage de l'aptamère H02 aux liposomes-5(6)-CF, nous avons procédé à une filtration par chromatographie d'exclusion stérique (CES) de la suspension de SUV développée. Cette technique de filtration est classiquement utilisée pour rapidement séparer des molécules hydrosolubles de tailles distinctes. Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire constituée de billes poreuses dont le diamètre des pores est défini. Les molécules de taille supérieure au diamètre des pores passent entre les billes et sont rapidement éluées. En revanche, les molécules de taille inférieure au diamètre des pores passent dans les billes et sont éluées plus tardivement. Comme les aptamères et les liposomes diffèrent par leur taille, la filtration par exclusion stérique devrait permettre de rapidement les séparer dans le cas où ils ne seraient pas greffés. En effet, en cas de non-couplage, les liposomes devraient être rapidement élués tandis que les aptamères de taille plus petite devraient l'être plus tardivement. De plus, au vu de leur couleur distincte, leur séparation devrait se traduire par l'obtention de fractions de couleur différentes, à savoir une fraction jaune pour les liposomes-5(6)-CF et une fraction bleue pour les aptamères-Cy5

(Figure 99A). En revanche, si les aptamères ont été couplés, une seule fraction de couleur verte contenant à la fois des liposomes couplés et non couplés devrait être obtenue (Figure 99B).

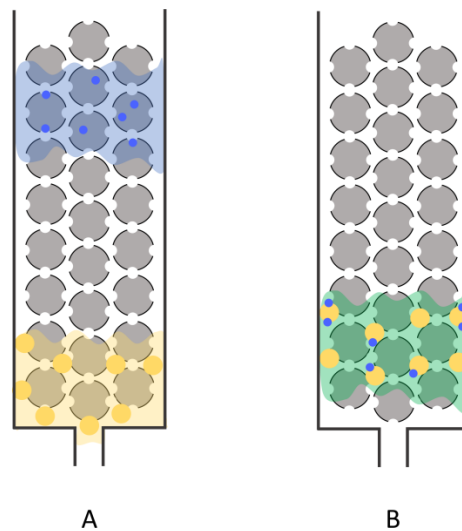


Figure 99 : Séparations possibles en CES pour une suspension de liposomes-5(6)-CF et d'aptamère H02 non couplés et pour une suspension constituée d'un mélange de liposomes-5(6)-CF couplés à H02 et de liposomes-5(6)-CF non couplés. (A) : non couplés ; (B) : couplés.

Au vu du faible volume de suspension à filtrer (150 μL), une petite colonne contenant 8 mL de SephadexTM G75 a été fabriquée. Au total, 8 fractions de $\approx 250 \mu\text{L}$ ont été obtenues (Figure 100). La première fraction prélevée était incolore et a été éliminée. Les fractions 2 à 4 étaient de couleur verte intense et ont été rassemblées ($\approx 750 \mu\text{L}$). Les 4 autres fractions (5 à 8) étaient de couleur verte mais moins intense avec des reflets bleus. Au vu de leur couleur un peu plus bleutée, il est possible que ces fractions contiennent soit l'aptamère H02 seul, soit des liposomes-5(6)-CF couplés à l'aptamère mais très dilués. Ces fractions ont été rassemblées ($\approx 1 \text{ mL}$).



Figure 100 : Fractions 1 à 8 obtenues après filtration sur une colonne de Sephadex™ G75 de la suspension de liposomes couplés à l'aptamère H02.

Afin de confirmer le couplage présumé de l'aptamère aux liposomes, les fractions rassemblées ont ensuite été soumises à une étape de dialyse de 36 h à 4°C contre 3 × 500 mL de tampon à l'aide d'une membrane de 50 kD. Comme pour la filtration, la dialyse permet de séparer des molécules de taille différente. Elle est basée sur l'utilisation d'une membrane semi-perméable. Seules les molécules de tailles inférieures aux pores qu'elle contient peuvent la traverser et ce, selon le gradient de concentration et jusqu'à atteindre l'équilibre. S'il s'avère que le couplage n'a pas fonctionné, seuls les aptamères seront en mesure de traverser la membrane de dialyse et seront ainsi éliminés dans le dialysat. En effet, au vu de leur taille plus conséquente, les liposomes ne peuvent en aucun cas franchir les pores de la membrane de dialyse utilisée (50 kD). Comme pour la filtration, si une suspension de couleur jaune est obtenue, cela signifiera que l'aptamère non couplé a été éliminé par dialyse. À l'inverse, l'obtention d'une suspension de couleur verte signifiera que l'aptamère est bien couplé aux liposomes. Après 36 h de dialyse, des suspensions de couleur verte ont été obtenues, avec pour le deuxième lot de fractions rassemblées (fractions 5 à 8) la présence de reflets bleus. Comme leur couleur n'a pas évolué au cours de la dialyse, on peut en déduire que ces 2 fractions rassemblées contiennent bien les liposomes couplés à l'aptamère. La couleur légèrement bleutée des fractions 5 à 8 est donc certainement due à la présence de liposomes couplés très dilués.

En conclusion, ces résultats confirment de façon indirecte que l'aptamère est bien couplé aux liposomes. En effet, l'étape de filtration et l'étape de dialyse n'ont pas permis de séparer l'aptamère des liposomes, ce qui atteste de leur greffage.

2. Évaluation *in vitro* de l'internalisation des liposomes-5(6)-CF couplés à H02 via le récepteur $\alpha_5\beta_1$

L'objectif de ces travaux est d'évaluer l'internalisation spécifique des liposomes-5(6)-CF couplés à H02 via le récepteur $\alpha_5\beta_1$. Pour ce faire, la formulation de liposomes-H02 développée a fait l'objet d'une évaluation préliminaire pour son internalisation par des cellules U-87 MG surexprimant le récepteur α_5 (F8) et par les cellules U-87 MG n'exprimant pas ou très peu ce même récepteur (D4), ($n = 1$). 62,5 nmol (48 μ L) en phospholipides (PL) des constructions liposomiques ont été mises en contact des cellules. La quantité de PL à déposer sur les cellules a été calculée par rapport à la quantité d'H02 supposée greffée aux liposomes pour 100 % de couplage, à savoir 0,01 μ mol d'H02 pour 10 μ mol de PL. En guise de contrôles, 125,0 nmol (96 μ L) en PL de liposomes-5(6)-CF non couplés, 0,0625 nmol (48 μ L) d'aptamères non couplés et 100 μ L de PBS 1X ont également été mis en contact des cellules. Les cellules ont ensuite été incubées 1 h à 37°C, ce qui correspond au temps nécessaire à l'internalisation du récepteur α_5 et à son acheminement aux endosomes. Après 1 h d'incubation, les cellules ont été fixées, perméabilisées et un marquage fluorescent des endosomes et du noyau a été effectué. Ensuite, les cellules ont été montées sur une lame de microscope et ont été analysées par microscopie confocale aux différentes longueurs d'ondes des marqueurs fluorescents utilisés. Des clichés tridimensionnels ont été obtenus pour chaque échantillon (Figure 101 et Figure 102).

Les clichés de microscopie confocale ont révélé une internalisation des liposomes-5(6)-CF et de l'aptamère par les cellules F8 incubées en présence du complexe liposomes-H02 (Figure 101). En effet, un signal fluorescent a été observé au niveau de l'endosome des cellules à la longueur d'onde d'émission de la 5(6)-CF (518 nm) et de l'aptamère (666 nm). La colocalisation de ces deux signaux indique donc que le complexe liposomes-H02 a bien été internalisé au niveau des endosomes des cellules F8. Néanmoins, il est à noter qu'une partie non négligeable du signal censé correspondre aux endosomes est également localisé au niveau de la membrane des cellules. Il est possible que cette localisation au niveau des membranes soit due à la fixation de complexes liposomes-H02 au récepteur α_5 qui n'ont pas été internalisés. De plus, l'analyse des cellules D4 incubées en présence de liposomes-H02 a également montré une internalisation des liposomes ainsi que

de l'aptamère au niveau des endosomes (Figure 101). Les aptasomes sont donc internalisés de façon aspécifique. Néanmoins, le signal fluorescent mesuré semble être de plus faible intensité que pour les cellules F8. Il est donc possible qu'un peu moins de complexe ait été

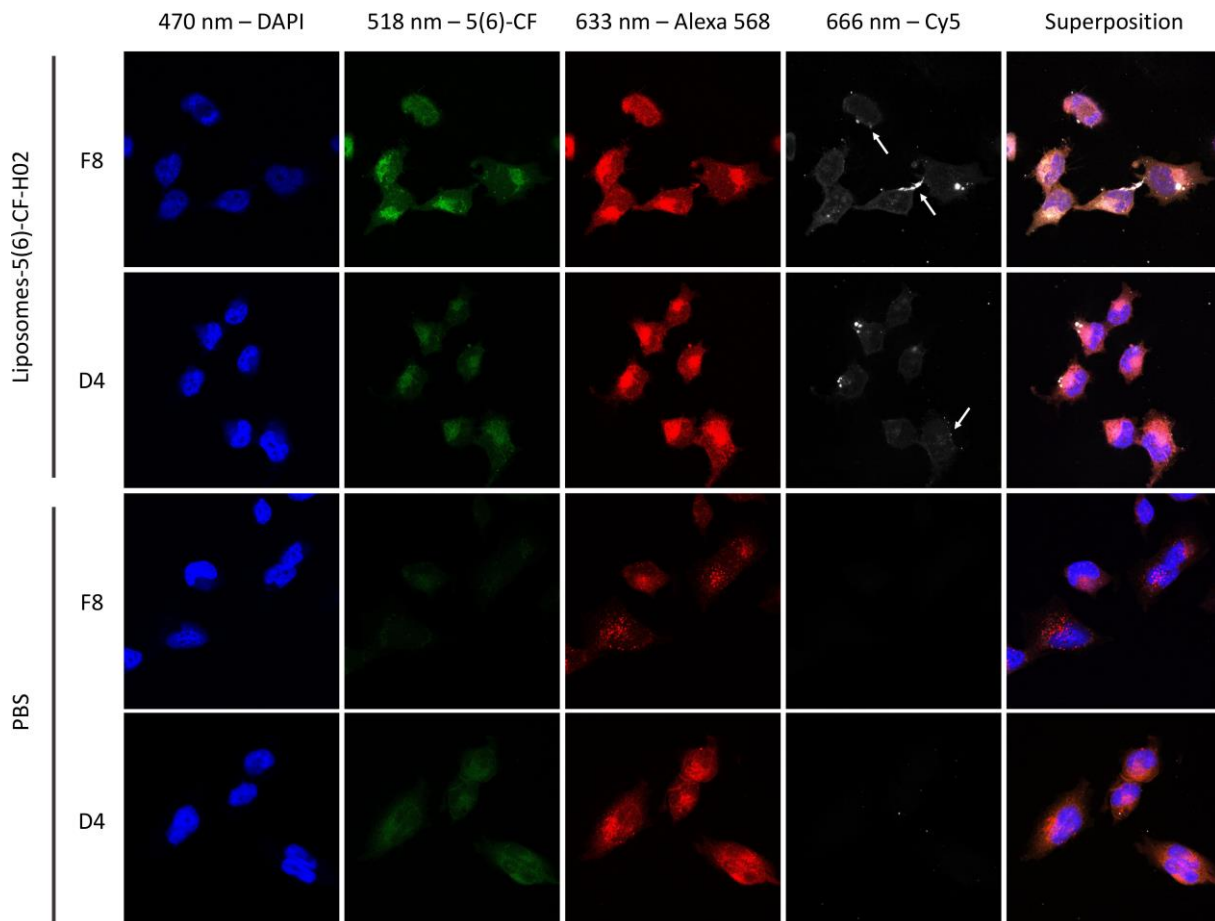


Figure 101 : Évaluation de l'internalisation du complexe liposomes-H02 par les cellules U-87 MG. Évaluation par microscopie confocale de l'internalisation des liposomes-5(6)-CF couplés à l'aptamère H02-Cy5 (62,5 nmol en phospholipides) par des cellules U-87 MG α_5^+ (F8) et α_5^- (D4), à 37°C. Les noyaux des cellules ont été révélés avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et sont représentés en bleu. Les endosomes primaires ont été révélés avec un anticorps anti-souris couplé à de l'Alexa Fluor™568 (anti-souris-Alexa 568) et sont représentés en rouge. Les liposomes contenant de la 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) sont représentés en vert. Les aptamères H02 ont été couplés à de la cyanine 5 (Cy5) et sont représentés en blanc. Des cellules F8 et D4 ont été incubées en présence de PBS 1X en guise de contrôle. Une localisation de l'aptamère au niveau de la membrane des cellules F8 et D4 incubées avec le complexe liposomes-H02 a été observée et est désignée par des flèches. Les images ont été acquises avec les mêmes paramètres permettant ainsi une comparaison des marquages fluorescents.

internalisé par les cellules D4 par rapport aux cellules F8. Il faut noter, qu'en comparant les cellules F8 et D4 à celles mises en présence de PBS, nous avons relevé un aspect différent des endosomes (Figure 101). En effet, les endosomes des cellules F8 et D4 incubées avec la suspension de liposome-HO2 ne présentent pas de structure vésiculaire et semblent occuper un volume cellulaire plus important que ceux des cellules contrôles, comme s'ils avaient éclaté. À contrario, on distingue bien les différentes vésicules endosomales pour les cellules F8 contrôles. Il est possible que l'internalisation du complexe par les cellules F8 et D4 dans les endosomes ait conduit à un éclatement de ces derniers.

Pour les cellules F8 et D4 contrôles mises en contact de l'aptamère non couplé, une internalisation au niveau des endosomes ainsi qu'une localisation au niveau de la membrane de ce dernier ont été observées (Figure 102). L'aptamère non couplé aux liposomes est donc aussi internalisé de façon aspécifique. De plus, un signal fluorescent d'intensité conséquente a été constaté pour ces cellules contrôles ainsi que pour celles mises en contact des liposomes non couplés à la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine (Figure 102). Il est possible que ces signaux mesurés soient dus à l'autofluorescence des cellules. En effet, dans le cas de mort ou de dommages cellulaires, une autofluorescence des cellules est classiquement mesurée à cette longueur d'onde. On peut constater également de façon évidente que ces cellules contrôles semblent avoir été endommagées, ce qui expliquerait donc ces résultats (Figure 102). Enfin, il est aussi envisageable que les liposomes non couplés mis en contact des cellules D4 et F8 aient été internalisés de façon aspécifique, ce qui expliquerait la détection d'un signal fluorescent à cette longueur d'onde.

En conclusion, nous avons pu démontrer une internalisation des complexes liposomes-aptamères par les cellules F8. Néanmoins, nous n'avons pas pu démontrer que cette internalisation est spécifique du récepteur α_5 et donc l'intérêt du couplage des aptamères aux liposomes. Comme les cellules semblent dans la globalité avoir subi des dommages, il conviendra de réitérer cette première expérience exploratoire afin de valider ou d'invalidier les conclusions préliminaires établies. Pour les prochaines évaluations du complexe, nous envisageons d'employer davantage de marqueurs cellulaires, tels qu'un marqueur de la membrane cellulaire ainsi qu'un marqueur du récepteur α_5 , ce qui permettrait une meilleure analyse des cellules et de l'internalisation via ce récepteur. Enfin,

nous souhaitons pour les évaluations futures procéder à une analyse cellule par cellule et tester davantage de concentrations de notre complexe ainsi que des contrôles afin d'évaluer si la réponse est dose-dépendante.

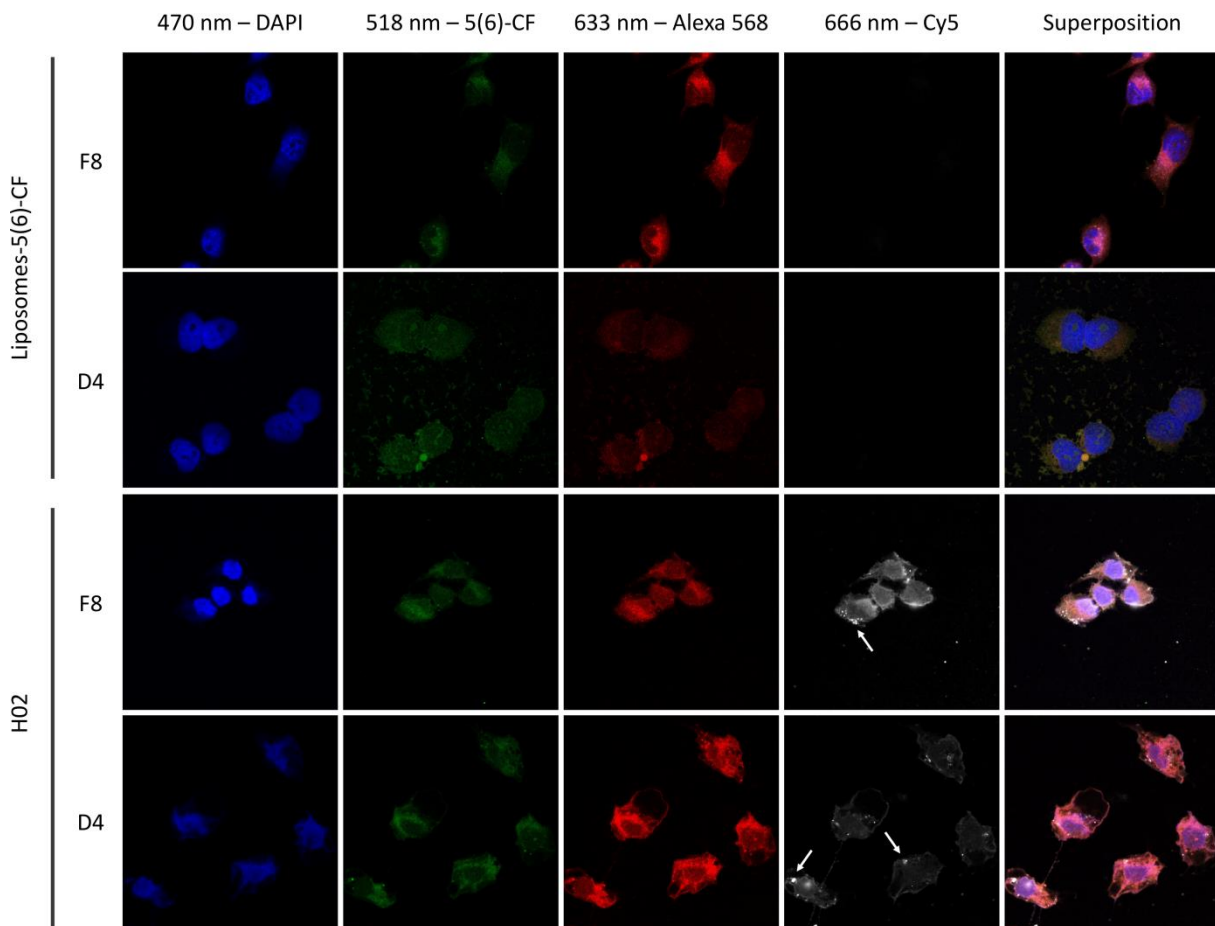


Figure 102 : Évaluation de l'Internalisation des liposomes-5(6)-CF non couplés (contrôles) et des molécules aptamériques H02 non couplées (contrôles) par les cellules U-87 MG. Évaluation par microscopie confocale de l'internalisation des liposomes-5(6)-CF non couplés (125 nmol en phospholipides) et de l'aptamère H02 non couplés (62,5 nmol) par des cellules U-87 MG α_5^+ (F8) et α_5^- (D4), à 37°C. Les noyaux des cellules ont été révélés avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et sont représentés en bleu. Les endosomes primaires ont été révélés avec un anticorps anti-souris couplé à de l'Alexa Fluor™568 (anti-souris-Alexa 568) et sont représentés en rouge. Les liposomes contenant de la 5(6)-carboxyfluorescéine (5(6)-CF) sont représentés en vert. Les aptamères H02 ont été couplés à de la cyanine 5 (Cy5) et sont représentés en blanc. Les clichés superposés sont montrés. Une localisation de l'aptamère au niveau de la membrane des cellules F8 et D4 incubées avec l'aptamère H02 non couplé a été observée et est désignée par des flèches. Les images ont été acquises avec les mêmes paramètres permettant ainsi une comparaison des marquages fluorescents.

C. Materials and methods

1. Materials

1.1. Chemicals

Absolute anhydrous ethanol (EtOH; 524125) was purchased from Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Methanol $\geq 99.8\%$ (MeOH; 20864.320) and chloroform $\geq 99.8\%$ (CHCl₃; ACRO423550010) were purchased from VWR International (Radnor, USA). Perchloric acid 70 % solution in water (223310010) was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA). Hydrochloric acid (HCl) $\geq 95\%$ (30721) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid pufferan $\geq 99.5\%$ (HEPES; HN77.5) was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Sodium chloride (NaCl) 98.5 – 100.5 % (27810-295) and sodium hydroxide (NaOH) 98.5 – 100.5 % (28244-295) were purchased from VWR International. 16 % paraformaldehyde (15710) was purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, UK). Molybdic acid ammonium salt 81 – 83 % MoO₃ (M0878), L-ascorbic acid crystalline $> 99\%$ (A5960), tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP; C4706), Triton™ X-100 (T8787) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542) were all purchased from Sigma-Aldrich. 5(6)-carboxyfluorescein (5(6)-CF; 9953) was purchased from Eastman Chemical Company (Kingsport, USA).

1.2. Lipids

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC; P3556) and cholesterol (Chol; recrystallized in MeOH; C8667) were purchased from Sigma-Aldrich. Egg yolk L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG; 841138P) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Lipid purities exceeded 99%. Lipids were stored under argon atmosphere at -20°C in a powder form or dissolved in CHCl₃/MeOH (9/1 v/v) at a concentration of $\approx 25\ \mu\text{mol/mL}$. Concentrations of phospholipid (PL) solutions were determined by molybdenum blue method for phosphate titration. The thiol-reactive dipalmitoylglycerol-maleimide anchor (DPG-mal) was synthesized in our laboratory.⁴⁰³

1.3. Buffers and solutions

Bioproducts™ RNase AWAY™ surface decontaminant (RNase free solution; 11952385) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). 1 × Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without CaCl₂ and MgCl₂ (1X DPBS; P04-36500) was obtained from PAN-Biotech (Aidenbach, Germany). Bovine Serum Albumin (BSA; 04-100-812-E) was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Fetal Bovine Serum (FBS; 51810-500) was obtained from Dominique Dutscher (Brumath, France). Eagle Minimum Essential Medium (MEM; 31095-029) was obtained from Thermo Fisher Scientific. 10X trypsin/ethylenediaminetetraacetic EDTA (BE02-007E) was purchased from Lonza (Basel, Switzerland). Ultrapure water (18 mΩ) was obtained by an ELGA Labwater device from Veolia (Aubervilliers, France). The following solutions and buffers were prepared in our laboratory:

- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 6.5, 0.22 μm filtered
- 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.22 μm filtered
- 10 mM HEPES, 110 mM NaCl, 40 mM 5(6)-CF pH 6.5, 0.22 μm filtered
- 10 mM HEPES, 110 mM NaCl, 40 mM 5(6)-CF pH 7.4, 0.22 μm filtered

1.4. Dialysis and filtration

Sephadex® G-75 GE Healthcare (GE17-0050-01) was purchased from Sigma-Aldrich. Spectra/Por 6 dialysis membranes of 50 kD (132542) were purchased from Spectrum Labs Inc. (Phoenix, USA). 1 mL micro dialysis capsules QuixSep® (H449.1) were purchased from Carl Roth. Millex-GP 0.22 μm poly(ethersulfone) sterile syringe filters (SLGP033NS) were purchased from Merck Millipore (Burlington, USA).

1.5. Aptamer

A 3'- and 5'-modified aptamer, designated as "H02", was synthesized by IBA Lifesciences (Göttingen, Germany). Its 3' end was modified with a cyanine 5 dye (Cy5) while its 5' end was modified with a thiol group (SH). To avoid its degradation by RNases, the 3'

and 5'-modified H02 was additionally modified by adding a fluorine molecule at the 2' ribose position of each C and U nucleotide.

1.6. In vitro model

U-87 MG human glioblastoma cells (ATCC® HTB-14) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). They were stably transfected to respectively overexpress (U-87 MG α_5^+) and repress (U-87 MG α_5^-) the human α_5 gene.³⁹⁵ U-87 MG α_5^+ and α_5^- , respectively designated as F8 and D4, were kindly provided by the Tumor Signaling and Therapeutic Targets Laboratory (UMR 7021, CNRS, Faculty of Pharmacy, Strasbourg, France).

1.7. Immunofluorescent staining

Purified mouse Anti-EEA1 (610457, clone 14/EEA1 (RUO)) was purchased from BD Biosciences (Allschwill, Switzerland). Goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody with Alexa Fluor™ 568 labeling (anti-mouse secondary antibody; A-11004) was purchased from Thermo Fisher Scientific. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI staining, D9542) was obtained from Sigma-Aldrich.

2. Methods

2.1. Inorganic phosphate assay

To determine the phosphate content of the lipid solutions, the molybdenum blue method was used. Prior to titration, all glassware was thoroughly washed with detergent to remove potential lipid traces and was subsequently rinsed with ultrapure water and absolute ethanol. 500 μ L aliquots of PC and PG were prepared at a concentration of 1 μ mol/mL by diluting stock solutions in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1 v/v). 25 and 50 μ L of 1 μ mol/mL PC and PG were deposited in triplicates in test tubes. In parallel, a calibration standard was prepared by diluting 10 times a 0.1 mM KH_2PO_4 stock solution of which 25, 75 and 100 μ L were deposited in triplicates in test tubes. In addition, 3 tubes were filled with 100 μ L of ultrapure water as a control. All tubes were heated 2 h at 110°C to evaporate water and organic solvents. Then, a 1.25 % molybdic acid and 5 % ascorbic acid solutions were

extemporaneously prepared and protected from light. The 1.25 % molybdic acid solution was prepared by dissolving 250 mg (0.20 mmol) of molybdic acid in 20 mL of ultrapure water and the 5 % ascorbic acid solution was obtained by solubilizing 1.0 g (5.68 mmol) of ascorbic acid in ultrapure water. Once solvents were evaporated, 300 μ L of 70 % perchloric acid were added to each sample and glass beads were placed on the top of each tube. Samples were briefly vortexed and subsequently heated for 20 min at 190°C. The glass beads were used to prevent solvent evaporation. Afterwards, 1 mL of ultrapure water and 500 μ L of 1.25 % molybdic acid and 5 % ascorbic acid solutions were added to each tube. Tubes were briefly vortexed and heated in a water bath at 100°C for 5 min. To stop the reaction, tubes were transferred in a cold-water bath for 5 min. Finally, samples were briefly vortexed and their optical density (OD) was determined at 820 nm (slot: 2 nm). For OD measurements, a SAFAS SP2000 spectrometer (Xenius 5801, SAFAS, Monaco) was used.

2.2. Phosphatidylcholine assay

To determine PC and PL content of liposomal formulations, PC titrations were performed using the LABASSAY™ phospholipid kit (W1W296-63801, SOBIODA Laboratories, Montbonnot-Saint-Martin, France). For this purpose, a calibration standard of choline was prepared by depositing in a 96-well flat bottom plate (Greiner Bio-one plates, 655101, Dominique Dutscher) 1, 2, 3, 4, 5 and 7.5 μ L (corresponding to 3.87, 7.74, 11.61, 15.48, 19.35 and 29.03 nmol, respectively) in triplicate of the choline stock solution provided in the kit. 2 and 4 μ L of liposomal formulations were also deposited in triplicate. 200 μ L of the provided reagent solution were subsequently added to each well using a dispipette. 3 additional wells were filled with the reagent as a control. Afterwards, the plate was incubated 10 min at 37°C. Phospholipases from the reagent solution hydrolyze their PC substrate at this temperature. Finally, the OD of the samples was recorded at 590 nm (slot: 2 nm).

2.3. Formulation of 5(6)-CF-liposomes for coupling to the H02 aptamer

5(6)-CF-liposomes formulation

The formulation of our liposomal constructs was performed with RNase-free material. For this purpose, all glassware and instruments used for the preparation of

liposomal suspensions were soaked overnight in a RNase-free solution and were subsequently thoroughly rinsed with ultrapure water and EtOH. Afterwards, the RNase-free material was dried in an incubator set at 80°C and cooled at room temperature prior use. MLV composed of PC, PG, Chol and DPG-mal anchor with the following molar ratios 52:13:33:2 were prepared by hydration of a lipidic film. The PL solubilized in a CHCl₃/MeOH mixture (9/1 v/v) were deposited in round-bottom Pyrex® tubes and their solvents were evaporated. The lipid film was hydrated with 1.5 mL of 0.22 µm filtered 5(6)-CF buffered solution of either pH 6.5 or pH 7.4 (10 mM HEPES, 110 mM NaCl, 40 mM 5(6)-CF) and subsequently vortexed for 10 min. The prepared MLV were sonicated using a stepped 1/8" microtip (0001508, Delta Labo, Avignon, France) and a Vibra Cell ultrasonicator (75041, 750 W, 20 kHz, Fisher Scientific) under argon atmosphere for 1 h and protected from light to obtain Small Unilamellar Vesicles (SUV). The obtained SUV were then centrifuged 10 min at 10 000 g to pellet and remove titanium residues originating from the sonication probe. Once titanium residues were removed, free 5(6)-CF was eliminated by filtration on a 20 mL Sephadex® G75 size exclusion column preliminarily equilibrated with 100 mL of buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 6.5 or 7.4). The PL concentrations of the 5(6)-CF-liposomes suspensions were determined by PC titration.

Coupling of 5(6)-CF-liposomes to H02

Prior coupling to 5(6)-CF-liposomes, H02 was first dissolved in sterile ultrapure water at a concentration of 1.0 mM. To linearize its structure, H02 stock solution was heated for 5 min at 95°C and was subsequently placed on ice. Then, 1 µL of a 1.0 mM TCEP solution (1 nmol) was added to 1 µL of H02 stock solution (1 nmol) to reduce disulfide bridges possibly formed between two aptameric molecules. The reaction was left on ice for 15 min. Then, 150 µL of 5(6)-CF-liposomes containing 10 eq. of the DPG-mal anchor (10 nmol) were added to 1 eq. of the linearized and reduced H02. A clear greenish suspension was obtained. The reaction was placed on ice for 4 h and homogenized every 30 min by up and down pipetting.

Purification of H02-coupled 5(6)-CF-liposomes

150 µL of H02-coupled liposomes were first purified on a handmade size exclusion chromatography column filed with 8 mL Sephadex® G75 medium preliminarily equilibrated

with 50 mL of buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4). In total, 8 fractions of $\approx 250 \mu\text{L}$ were collected. Fraction 1 was colorless. Fractions 2 to 4 displayed an intense green color and were pooled. Fractions 5 to 8 displayed a green color with blue glints and were pooled. Pooled fractions were subsequently dialyzed for 36 h against $3 \times 500 \text{ mL}$ of 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4 using a 50 kD dialysis membrane mounted on a 1 mL dialysis capsule. Their PL concentration was determined after dialysis by PC titration.

2.4. Characterization of the liposomal constructs

Size measurements

The average diameter of coupled and non-coupled 5(6)-CF-liposomes was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK) with the following specifications: material refractive index: 1.43; buffer refractive index: 1.34; viscosity: 1.1 cP; scattering angle: 173° ; temperature: 25°C . Liposomal suspensions were diluted at a concentration of 0.1 mM in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl buffer (pH 6.5 or 7.4). Size measurements were performed in BRAND[®] UV cuvettes (Z637092, Sigma-Aldrich) before and after each filtration and dialysis step and before and after coupling to the H02 aptamer. Data were analyzed using the multiple narrow mode included in the Malvern software. Particle size is expressed in intensity. Formulations are considered monodisperse when the polydispersity index (PDI) is < 0.3 .

Zeta potential measurements

The average zeta potential of coupled and non-coupled 5(6)-CF-liposomes was determined using a Zetasizer Nano-ZS with the same specifications as the ones used for DLS measurements. Liposomal suspensions were diluted at a concentration of 0.2 mM in 10 mM HEPES, 15 mM NaCl buffer (pH 6.5 or 7.4). Measurements were performed in folded capillary cells (DTS1070, Malvern Panalytical) before and after coupling to the H02 aptamer. The results presented are the average of 3 consecutive measurements. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation.

2.5. U-87 MG culture and preparation for *in vitro* evaluation

U-87 MG F8 and D4 cells were thawed then transferred to a flask containing MEM medium complemented with 10% FBS. Cells were grown in a humid environment at 37°C and 5% CO₂. Once confluence was reached, the supernatant was discarded, and cells were washed with 5 mL of 1X DPBS to remove cellular debris. Afterwards, 2 mL of 1X trypsin were added, and the flasks were incubated for 5 min at 37°C. Cells were pulled off the flasks by gently tapping and their detachment was confirmed by microscopic observation using an EVOS™ XL core imaging system (AMEX1000, Thermo Fisher Scientific). 2 mL of MEM complemented with 10 % FBS were added to inhibit trypsin action. 1 mL of suspended cells were collected and were transferred to a new flask to which 10 mL of freshly made MEM complemented with 10 % FBS were added. The new flasks were placed for 2 days at 37°C. Once confluence was reached again, cells were detached from the flasks in the same way as described above. Cell concentration was determined using a TC20® automated cell counter (Bio-Rad, Hercules, USA). Cells were centrifuged for 5 min at 1500 rpm. The supernatant was discarded, and cells were resuspended in MEM complemented with 10 % FBS at a concentration of 10⁶ cells/mL. Afterwards, 25 and 35 µL of resuspended cells were deposited on previously cleaned glass coverslips (12 mm Menzel™ microscope coverslips, 11708701, Fisher Scientific) placed in a 24-well plate (TPP® flat-bottom plates, 92024, TPP, Trasadingen, Switzerland) and were left overnight at 37°C. The day after, coverslips were transferred into a Petri dish Thermo Scientific™ Nunc™ Petri dishes, 168381, Fisher Scientific) covered with Parafilm®. Two humidified papers were placed around the samples to keep a humid atmosphere inside the Petri dish. Before deposition of the liposomal formulations on the coverslips, cells were washed with ≈ 100 µL of 1 × DPBS.

2.6. Incubation of liposomal formulations and controls with U-87 MG cells

H02-coupled 5(6)-CF-liposomes as well as 2 controls (non-coupled 5(6)-CF-liposomes and free H02) were evaluated on α₅⁺ and α₅⁻ U-87 MG cells. For H02-coupled formulation, 62.5 nmol (48 µL) of PL (corresponding to 0.0625 nmol of coupled H02) were deposited on cells. The quantity of PL was calculated regarding the amount of grafted H02. Indeed, 5(6)-CF-liposomes were formulated with 2 % of DPG-mal, 65 % pf PL and 33 % of Chol. As

50 % of maleimide groups are located inside liposomes, only half of it remains available at the liposome surface for coupling (1%), which corresponds to 0.1 μmol for a 1 mL suspension at a concentration of 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ of PL. As 10 times less equivalents of H02 were added to 1 equivalent of DGP-Mal, there are 0.01 μmol of H02 for 10 μmol of PL. For non-coupled 5(6)-CF-liposomes, 125.0 nmol of PL (96 μL) were incubated with the cells. For the H02 control, 0.0625 (48 μL) nmol of aptamer were deposited on cells. Afterwards, cells were incubated for 1 h at 37°C. After incubation, cells were washed twice with 1X DPBS and fixed for 12 min at 37°C with 250 μL of a 4 % paraformaldehyde solution. Paraformaldehyde was removed by washing cells 3 times with 1X DPBS and ≈ 100 μL of 0.1 % Triton™ X-100 were added to disrupt cell membrane. After a brief incubation of 1 min, Triton™ X-100 was removed by washing cells twice with 1X DPBS. Then, ≈ 100 μL of freshly made 3 % BSA were deposited on cells and were left at RT for 1 h. Afterwards, cells were washed twice with 1X DPBS and ≈ 100 μL of 1/1000 diluted anti-EEA1 primary mouse antibody was deposited on them. Cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody. After overnight incubation, cells were washed twice with 1X DPBS and ≈ 100 μL of 1/2000 diluted secondary anti-mouse antibody with Alexa Fluor™ 568 labeling were added on cells. Cells were incubated with the secondary antibody for 45 min at room temperature and subsequently washed twice with ≈ 100 μL of 1X DPBS. Then, coverslips (12 mm Menzel™ microscope coverslips, 11708701, Fisher Scientific) were carefully detached from the Petri dish, rinsed with fresh ultrapure water, dried and mounted on a microscope slide (Thermo Scientific™ SuperFrost™ Plus adhesion microscope slides, J1800AMNZ, Fisher Scientific) using 8 μL of mounting medium (Fluoromount-G™, 00-4958-02, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Microscope slides were dried in the dark for several hours. Once dry, they were analyzed using an inverted semi-automated Leica TCS SPE-II Scanner confocal microscope (DM14 000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and associated LAS-AF interface (HCS basic module, Leica Microsystems). Z-stacks pictures of the samples were recorded at 4 emission wavelengths: 470 nm, 518 nm, 603 nm and 666 nm using the 20X objective lens (11506513, Leica Microsystems). Images were captured at the same setting to allow direct comparison of staining patterns. Z-stacks were analyzed using the ImageJ software (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, USA).

Bibliographie

I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work.

Thomas Edison

- (1) The National Institute of Health. Nanomaterials <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/index.cfm> (accessed Aug 23, 2019).
- (2) The European Commission. Definition of a nanomaterial https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm (accessed Aug 23, 2019).
- (3) Stanley, S. Biological Nanoparticles and Their Influence on Organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 69–74.
- (4) Vlassov, A. V.; Magdaleno, S.; Setterquist, R.; Conrad, R. Exosomes: Current Knowledge of Their Composition, Biological Functions, and Diagnostic and Therapeutic Potentials. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820* (7), 940–948.
- (5) Simons, M.; Raposo, G. Exosomes - Vesicular Carriers for Intercellular Communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21* (4), 575–581.
- (6) Kowal, J.; Tkach, M.; Théry, C. Biogenesis and Secretion of Exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *29* (1), 116–125.
- (7) Escola, J. M.; Kleijmeer, M. J.; Stoorvogel, W.; Griffith, J. M.; Yoshie, O.; Geuze, H. J. Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (32), 20121–20127.
- (8) Théry, C.; Boussac, M.; Véron, P.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Garin, J.; Amigorena, S. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* **2001**, *166* (12), 7309–7318.
- (9) Von Bartheld, C. S.; Altick, A. L. Multivesicular Bodies in Neurons: Distribution, Protein Content, and Trafficking Functions. *Prog. Neurobiol.* **2011**, *93*, 313–340.
- (10) Müller, G.; Jung, C.; Straub, J.; Wied, S.; Kramer, W. Induced Release of Membrane Vesicles from Rat Adipocytes Containing Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Microdomain and Lipid Droplet Signalling Proteins. *Cell. Signal.* **2009**, *21* (2), 324–338.
- (11) Lai, R. C.; Yeo, R. W. Y.; Lim, S. K. Mesenchymal Stem Cell Exosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *40*, 82–88.
- (12) Davidson, S. M.; Riquelme, J. A.; Zheng, Y.; Vicencio, J. M.; Lavandero, S.; Yellon, D. M. Endothelial Cells Release Cardioprotective Exosomes That May Contribute to Ischaemic Preconditioning. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–9.
- (13) Suntres, Z. E.; Smith, M. G.; Momen-Heravi, F.; Hu, J.; Zhang, X.; Wu, Y.; Zhu, H.; Wang, J.; Zhou, J.; Kuo, W. P. Therapeutic Uses of Exosomes. *J. Circ. Biomarkers* **2013**, *1*, 1–9.
- (14) Subra, C.; Laulagnier, K.; Perret, B.; Record, M. Exosome Lipidomics Unravels Lipid Sorting at the Level of Multivesicular Bodies. *Biochimie* **2007**, *89* (2), 205–212.

- (15) Batista, B. S.; Eng, W. S.; Pilobello, K. T.; Hendricks-Muñoz, K. D.; Mahal, L. K. Identification of a Conserved Glycan Signature for Microvesicles. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (10), 4624–4633.
- (16) Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J. J.; Lötvall, J. O. Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9* (6), 654–659.
- (17) Raposo, G.; Nijman, H. W.; Stoorvogel, W.; Leijendekker, R.; Harding, C. V.; Melief, C. J. M.; Geuze, H. J. B Lymphocytes Secrete Antigen-Presenting Vesicles. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1161–1172.
- (18) Pitt, J. M.; Kroemer, G.; Zitvogel, L.; Pitt, J. M.; André, F.; Amigorena, S.; Soria, J.; Eggermont, A. Dendritic Cell – Derived Exosomes for Cancer Therapy. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126* (4), 1224–1232.
- (19) Javeed, N.; Mukhopadhyay, D. Exosomes and Their Role in the Micro-/Macro-Environment: A Comprehensive Review. *J. Biomed. Res.* **2017**, *31* (5), 386–394.
- (20) Jonas, A.; Philips, M. *Lipoprotein Structure*, Biochemist.; Vance, J. E., Vance, D. E., Eds.; New Comprehensive Biochemistry; Elsevier Science, **2008**.
- (21) Raut, S.; Dasseux, J. L.; Sabnis, N. A.; Mooberry, L.; Lacko, A. Lipoproteins for Therapeutic Delivery: Recent Advances and Future Opportunities. *Ther. Deliv.* **2018**, *9* (4), 257–268.
- (22) Thaxton, C. S.; Rink, J. S.; Naha, P. C.; Cormode, D. P. Lipoproteins and Lipoprotein Mimetics for Imaging and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 116–131.
- (23) Stanley, S. Biological Nanoparticles and Their Influence on Organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 69–74.
- (24) Tsujita, M.; Wolska, A.; Gutmann, D. A. P.; Remaley, A. T. Reconstituted Discoidal High-Density Lipoproteins: Bioinspired Nanodiscs with Many Unexpected Applications. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2018**, *20* (12).
- (25) Shaish, A.; Keren, G.; Chouraqui, P.; Levkovitz, H.; Harats, D. Imaging of Aortic Atherosclerotic Lesions by ¹²⁵I-LDL, ¹²⁵I-Oxidized-LDL, ¹²⁵I-HDL and ¹²⁵I-BSA. *Pathobiology* **2001**, *69*, 225–229.
- (26) Frias, J. C.; Ma, Y.; Williams, K. J.; Fayad, Z. A.; Fisher, E. A. Properties of a Versatile Nanoparticle Platform Contrast Agent to Image and Characterize Atherosclerotic Plaques by Magnetic Resonance Imaging. *Nano Lett.* **2006**, *6* (10), 2220–2224.
- (27) Cormode, D. P.; Skajaa, T.; Van Schooneveld, M. M.; Koole, R.; Jarzyna, P.; Lobatto, M. E.; Calcagno, C.; Barazza, A.; Gordon, R. E.; Zanzonico, P.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. M. Nanocrystal Core High-Density Lipoproteins: A Multimodality Contrast Agent Platform. *Nano Lett.* **2008**, *8* (11), 3715–3723.

- (28) Skajaa, T.; Zhao, Y.; Van Den Heuvel, D. J.; Gerritsen, H. C.; Cormode, D. P.; Koole, R.; Van Schooneveld, M. M.; Post, J. A.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; De Mello Donega, C.; Meijerink, A.; Mulder, W. J. M. Quantum Dot and Cy5.5 Labeled Nanoparticles to Investigate Lipoprotein Biointeractions via Förster Resonance Energy Transfer. *Nano Lett.* **2010**, *10* (12), 5131–5138.
- (29) Cormode, D. P.; Gordon, R. E.; Fisher, E. A.; Mulder, W. J. M.; Proksa, R. Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles. *Radiology* **2010**, *256* (3), 774–782.
- (30) Skajaa, T.; Cormode, D. P.; Jarzyna, P. A.; Delshad, A.; Blachford, C.; Barazza, A.; Fisher, E. A.; Gordon, R. E.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. M. The Biological Properties of Iron Oxide Core High-Density Lipoprotein in Experimental Atherosclerosis. *Biomaterials* **2011**, *32* (1), 206–213.
- (31) Pérez-Medina, C.; Tang, J.; Abdel-Atti, D.; Hogstad, B.; Merad, M.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; Lewis, J. S.; Mulder, W. J. M.; Reiner, T. PET Imaging of Tumor-Associated Macrophages with ⁸⁹Zr-Labeled High-Density Lipoprotein Nanoparticles. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (8), 1272–1277.
- (32) Kuai, R.; Ochyl, L. J.; Bahjat, K. S.; Schwendeman, A.; Moon, J. J. Designer Vaccine Nanodiscs for Personalized Cancer Immunotherapy. *Nat. Mater.* **2017**, *16* (4), 489–498.
- (33) Kuai, R.; Sun, X.; Yuan, W.; Xu, Y.; Schwendeman, A.; Moon, J. J. Subcutaneous Nanodisc Vaccination with Neoantigens for Combination Cancer Immunotherapy. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (3), 771–775.
- (34) Kim, S. H.; Adhikari, B. B.; Cruz, S.; Schramm, M. P.; Vinson, J. A.; Narayanaswami, V. Targeted Intracellular Delivery of Resveratrol to Glioblastoma Cells Using Apolipoprotein E-Containing Reconstituted HDL as a Nanovehicle. *PLoS One* **2015**, *10* (8), 1–17.
- (35) Wang, Y.; Wang, C.; Ding, Y.; Li, J.; Li, M.; Liang, X.; Zhou, J.; Wang, W. Biomimetic HDL Nanoparticle Mediated Tumor Targeted Delivery of Indocyanine Green for Enhanced Photodynamic Therapy. *Colloids Surf., B* **2016**, *148*, 533–540.
- (36) Oda, M. N.; Hargreaves, P. L.; Beckstead, J. A.; Redmond, K. A.; Van Antwerpen, R.; Ryan, R. O. Reconstituted High Density Lipoprotein Enriched with the Polyene Antibiotic Amphotericin B. *J. Lipid Res.* **2006**, *47* (2), 260–267.
- (37) Levi, S.; Santambrogio, P.; Cozzi, A.; Rovida, E.; Corsi, B.; Tamborini, E.; Spada, S.; Albertini, A.; Arosio, P. The Role of the L-Chain in Ferritin Iron Incorporation. Studies of Homo and Heteropolymers. *J. Mol. Biol.* **1994**, *238* (5), 649–654.
- (38) Harrison, P. M.; Arosio, P. The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1996**, *1275* (3), 161–203.

- (39) Goodsell, D. S. Ferritin and Transferrin <https://pdb101.rcsb.org/motm/35> (accessed Aug 23, 2019).
- (40) Honarmand Ebrahimi, K.; Hagedoorn, P. L.; Hagen, W. R. Unity in the Biochemistry of the Iron-Storage Proteins Ferritin and Bacterioferritin. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (1), 295–326.
- (41) Arosio, P.; Elia, L.; Poli, M. Ferritin, Cellular Iron Storage and Regulation. *Int. Union Biochem. Mol. Biol. Vol.* **2017**, *69* (6), 414–422.
- (42) Truffi, M.; Fiandra, L.; Sorrentino, L.; Monieri, M.; Corsi, F.; Mazzucchelli, S. Ferritin Nanocages: A Biological Platform for Drug Delivery, Imaging and Theranostics in Cancer. *Pharmacol. Res.* **2016**, *107*, 57–65.
- (43) Crich, S. G.; Bussolati, B.; Tei, L.; Grange, C.; Esposito, G.; Lanzardo, S.; Camussi, G.; Aime, S. Magnetic Resonance Visualization of Tumor Angiogenesis by Targeting Neural Cell Adhesion Molecules with the Highly Sensitive Gadolinium-Loaded Apoferritin Probe. *Cancer Res.* **2006**, *66* (18), 9196–9201.
- (44) Sánchez, P.; Valero, E.; Gálvez, N.; Domínguez-Vera, J. M.; Marinone, M.; Poletti, G.; Corti, M.; Lascialfari, A. MRI Relaxation Properties of Water-Soluble Apoferritin-Encapsulated Gadolinium Oxide-Hydroxide Nanoparticles. *R. Soc. Chem.* **2008**, No. 5, 800–804.
- (45) Kálmán, F. K.; Geninatti-Crich, S.; Aime, S. Reduction/Dissolution of a β -MnOOH Nanophase in the Ferritin Cavity to Yield a Highly Sensitive, Biologically Compatible Magnetic Resonance Imaging Agent. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (3), 612–615.
- (46) Uebe, R.; Schüler, D. Magnetosome Biogenesis in Magnetotactic Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (10), 621–637.
- (47) Wajnberg, E.; Acosta-Avalos, D.; Alves, O. C.; De Oliveira, J. F.; Srygley, R. B.; Esquivel, D. M. S. Magnetoreception in Eusocial Insects: An Update. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7* (SUPPL. 2), 207–225.
- (48) Saunders, M.; Kong, C.; Shaw, J. A.; Macey, D. J.; Clode, P. L. Characterization of Biominerals in the Radula Teeth of the Chiton, *Acanthopleura Hirtosa*. *J. Struct. Biol.* **2009**, *167* (1), 55–61.
- (49) Wiltschko, W.; Wiltschko, R. Magnetic Orientation in Birds. *J. Exp. Biol.* **1996**, *199* (1), 29–38.
- (50) Beason, R. C.; Dussourd, N.; Deutschlander, M. E. Behavioural Evidence for the Use of Magnetic Material in Magnetoreception by a Migratory Bird. *J. Exp. Biol.* **1995**, *198* (1), 141–146.
- (51) Dobson, J. Nanoscale Biogenic Iron Oxides and Neurodegenerative Disease. *FEBS Lett.* **2001**, *496* (1), 1–5.

- (52) Gilder, S. A.; Wack, M.; Kaub, L.; Roud, S. C.; Petersen, N.; Heinsen, H.; Hillenbrand, P.; Milz, S.; Schmitz, C. Distribution of Magnetic Remanence Carriers in the Human Brain. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–9.
- (53) Lee, N.; Kim, H.; Choi, S. H.; Park, M.; Kim, D.; Kim, H. C.; Choi, Y.; Lin, S.; Kim, B. H.; Jung, H. S.; Kim, H.; Park, K. S.; Moon, W. K.; Hyeon, T. Magnetosome-like Ferrimagnetic Iron Oxide Nanocubes for Highly Sensitive MRI of Single Cells and Transplanted Pancreatic Islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (7), 2662–2667.
- (54) Orlando, T.; Mannucci, S.; Fantechi, E.; Conti, G.; Tambalo, S.; Busato, A.; Innocenti, C.; Ghin, L.; Bassi, R.; Arosio, P.; Orsini, F.; Sangregorio, C.; Corti, M.; Casula, M. F.; Marzola, P.; Lascialfari, A.; Sbarbati, A. Characterization of Magnetic Nanoparticles from *Magnetospirillum Gryphiswaldense* as Potential Theranostics Tools. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11* (2), 139–145.
- (55) Boucher, M.; Geffroy, F.; Prévéral, S.; Bellanger, L.; Selingue, E.; Adryanczyk-Perrier, G.; Péan, M.; Lefèvre, C. T.; Pignol, D.; Ginet, N.; Mériaux, S. Genetically Tailored Magnetosomes Used as MRI Probe for Molecular Imaging of Brain Tumor. *Biomaterials* **2017**, *121*, 167–178.
- (56) Goldhawk, D. E.; Gelman, N.; Thompson, R. T.; Prato, F. S. Forming Magnetosome-Like Nanoparticles in Mammalian Cells for Molecular MRI BT - Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging. In *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging*; Bulte, J. W. M., Modo, M. M. J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2017**; pp 187–203.
- (57) Guan, F.; Li, X.; Guo, J.; Yang, G.; Li, X. Ganglioside-Magnetosome Complex Formation Enhances Uptake of Gangliosides by Cells. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 6919–6930.
- (58) Plan Sangnier, A.; Preveral, S.; Curcio, A.; K. A. Silva, A.; Lefèvre, C. T.; Pignol, D.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Targeted Thermal Therapy with Genetically Engineered Magnetite Magnetosomes@RGD: Photothermia Is Far More Efficient than Magnetic Hyperthermia. *J. Control. Release* **2018**, *279*, 271–281.
- (59) Sun, J. B.; Duan, J. H.; Dai, S. L.; Ren, J.; Guo, L.; Jiang, W.; Li, Y. Preparation and Anti-Tumor Efficiency Evaluation of Doxorubicin-Loaded Bacterial Magnetosomes: Magnetic Nanoparticles as Drug Carriers Isolated from *Magnetospirillum Gryphiswaldense*. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101* (6), 1313–1320.
- (60) Felfoul, O.; Mohammadi, M.; Taherkhani, S.; De Lanauze, D.; Zhong Xu, Y.; Loghin, D.; Essa, S.; Jancik, S.; Houle, D.; Lafleur, M.; Gaboury, L.; Tabrizian, M.; Kaou, N.; Atkin, M.; Vuong, T.; Batist, G.; Beauchemin, N.; Radzioch, D.; Martel, S. Magneto-Aerotactic Bacteria Deliver Drug-Containing Nanoliposomes to Tumour Hypoxic Regions. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11* (11), 941–947.
- (61) Long, R.; Liu, Y.; Dai, Q.; Wang, S.; Deng, Q.; Zhou, X. A Natural Bacterium-Produced Membrane-Bound Nanocarrier for Drug Combination Therapy. *Materials* **2016**, *9* (11), 1–10.

- (62) Cheng, L.; Ke, Y.; Yu, S.; Jing, J. Co-Delivery of Doxorubicin and Recombinant Plasmid PHSP70-Plk1-ShRNA by Bacterial Magnetosomes for Osteosarcoma Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5277–5286.
- (63) Wang, X.; Wang, J.; Geng, Y.; Wang, J.; Zhang, X.; Yang, S.; Jiang, W.; Liu, W. An Enhanced Anti-Tumor Effect of Apoptin-Cecropin B on Human Hepatoma Cells by Using Bacterial Magnetic Particle Gene Delivery System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *496* (2), 719–725.
- (64) Molcan, M.; Petrenko, V. I.; Avdeev, M. V.; Ivankov, O. I.; Garamus, V. M.; Skumiel, A.; Jozefczak, A.; Kubovcikova, M.; Kopcansky, P.; Timko, M. Structure Characterization of the Magnetosome Solutions for Hyperthermia Study. *J. Mol. Liq.* **2017**, *235*, 11–16.
- (65) Le Fèvre, R.; Durand-Dubief, M.; Chebbi, I.; Mandawala, C.; Lagroix, F.; Valet, J. P.; Idbaih, A.; Adam, C.; Delattre, J. Y.; Schmitt, C.; Maake, C.; Guyot, F.; Alphandéry, E. Enhanced Antitumor Efficacy of Biocompatible Magnetosomes for the Magnetic Hyperthermia Treatment of Glioblastoma. *Theranostics* **2017**, *7* (18), 4618–4631.
- (66) Wen, A. M.; Steinmetz, N. F. Design of Virus-Based Nanomaterials for Medicine, Biotechnology, and Energy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (15), 4074–4126.
- (67) Mueller, A.; Kadri, A.; Jeske, H.; Wege, C. In Vitro Assembly of Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Variants Derived from Fission Yeast Expression Clones or Plants. *J. Virol. Methods* **2010**, *166* (1–2), 77–85.
- (68) Steinmetz, N. F.; Manchester, M. An Introduction To VNPs and Nanotechnology Viruses. In *Viral Nanoparticles, Tools for Material Science and Biomedicine*; Pan Stanford Publishing, **2011**; pp 1–11.
- (69) Rohovie, M. J.; Nagasawa, M.; Swartz, J. R. Virus-like Particles: Next-Generation Nanoparticles for Targeted Therapeutic Delivery. *Bioeng. Transl. Med.* **2017**, *2* (1), 43–57.
- (70) Zeltins, A. Construction and Characterization of Virus-like Particles: A Review. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *53* (1), 92–107.
- (71) Plotkin, S. History of Vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (34), 12283–12287.
- (72) Plummer, E. M.; Manchester, M. Viral Nanoparticles and Virus-like Particles: Platforms for Contemporary Vaccine Design. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2011**, *3* (2), 174–196.
- (73) Lee, K. L.; Twyman, R. M.; Fiering, S.; Steinmetz, N. F. Virus-Based Nanoparticles as Platform Technologies for Modern Vaccines. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8* (4), 554–578.
- (74) Frieze, K. M.; Peabody, D. S.; Chackerian, B. Engineering Virus-like Particles as Vaccine Platforms. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *18*, 44–49.

- (75) Hefferon, K. Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines* **2017**, *5* (44), 1–11.
- (76) Huang, Z.; Phoolcharoen, W.; Lai, H.; Piensook, K.; Cardineau, G.; Zeitlin, L.; Whaley, K. J.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S.; Chen, Q. High-Level Rapid Production of Full-Size Monoclonal Antibodies in Plants by a Single-Vector DNA Replicon System. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *106* (1), 9–17.
- (77) Noris, E.; Poli, A.; Cojoca, R.; Rittà, M.; Cavallo, F.; Vaglio, S.; Matic, S.; Landolfo, S. A Human Papillomavirus 8 E7 Protein Produced in Plants Is Able to Trigger the Mouse Immune System and Delay the Development of Skin Lesions. *Arch. Virol.* **2011**, *156* (4), 587–595.
- (78) Sainsbury, F.; Sack, M.; Stadlmann, J.; Quendler, H.; Fischer, R.; Lomonosoff, G. P. Rapid Transient Production in Plants by Replicating and Non-Replicating Vectors Yields High Quality Functional Anti-HIV Antibody. *PLoS One* **2010**, *5* (11), 1–9.
- (79) Vardakou, M.; Sainsbury, F.; Rigby, N.; Mulholland, F.; Lomonosoff, G. P. Expression of Active Recombinant Human Gastric Lipase in *Nicotiana Benthamiana* Using the CPMV-HT Transient Expression System. *Protein Expr. Purif.* **2012**, *81* (1), 69–74.
- (80) Uhde-Holzem, K.; Schlösser, V.; Viazov, S.; Fischer, R.; Commandeur, U. Immunogenic Properties of Chimeric Potato Virus X Particles Displaying the Hepatitis C Virus Hypervariable Region I Peptide R9. *J. Virol. Methods* **2010**, *166* (1–2), 12–20.
- (81) Mardanova, E. S.; Kotlyarov, R. Y.; Kuprianov, V. V.; Stepanova, L. A.; Tsybalova, L. M.; Lomonosoff, G. P.; Ravin, N. V. Rapid High-Yield Expression of a Candidate Influenza Vaccine Based on the Ectodomain of M2 Protein Linked to Flagellin in Plants Using Viral Vectors. *BMC Biotechnol.* **2015**, *15* (42), 1–10.
- (82) Shukla, S.; Steinmetz, N. F. Virus-Based Nanomaterials as PET and MR Contrast Agents: From Technology Development to Translational Medicine. *Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, *7* (5), 708–721.
- (83) Liepold, L.; Anderson, S.; Willits, D.; Oltrogge, L.; Frank, J. A.; Douglas, T.; Young, M. Viral Capsids as MRI Contrast Agents. *Magn. Reson. Med.* **2007**, *58* (5), 871–879.
- (84) Datta, A.; Hooker, J. M.; Botta, M.; Francis, M. B.; Aime, S.; Raymond, K. N. High Relaxivity Gadolinium Hydroxypyridonate-Viral Capsid Conjugates: Nanosized MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (8), 2546–2552.
- (85) Qazi, S.; Liepold, L. O.; Abedin, M. J.; Johnson, B.; Prevelige, P.; Frank, J. A.; Douglas, T. P22 Viral Capsids as Nanocomposite High-Relaxivity MRI Contrast Agents. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (1), 11–17.
- (86) Li, Z.; Jin, Q.; Huang, C.; Dasa, S.; Chen, L.; Yap, L.; Liu, S.; Cai, H.; Park, R.; Conti, P. S. Trackable and Targeted Phage as Positron Emission Tomography (PET) Agent for Cancer Imaging. *Theranostics* **2011**, *1*, 371–380.

- (87) Ms, B.; Farkas, M. E.; Aanei, I. L.; Behrens, C. R.; Tong, G. J.; Murphy, S. T.; Neil, J. P. O.; Francis, M. B. PET Imaging and Biodistribution of Chemically Modified Bacteriophage MS2. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 69–76.
- (88) Yacoby, I.; Shamis, M.; Bar, H.; Shabat, D.; Benhar, I. Targeting Antibacterial Agents by Using Drug-Carrying Filamentous Bacteriophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (6), 2087–2097.
- (89) Patel, J. M.; Vartabedian, V. F.; Kim, M. C.; He, S.; Kang, S. M.; Selvaraj, P. Influenza Virus-like Particles Engineered by Protein Transfer with Tumor-Associated Antigens Induces Protective Antitumor Immunity. *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112* (6), 1102–1110.
- (90) Shan, W.; Zhang, D.; Wu, Y.; Lv, X.; Hu, B.; Zhou, X.; Ye, S.; Bi, S.; Ren, L.; Zhang, X. Modularized Peptides Modified HBc Virus-like Particles for Encapsulation and Tumor-Targeted Delivery of Doxorubicin. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14* (3), 725–734.
- (91) Huang, S.; Kamihira, M. Development of Hybrid Viral Vectors for Gene Therapy. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (2), 208–223.
- (92) Strods, A.; Ose, V.; Bogans, J.; Cielens, I.; Kalnins, G.; Radovica, I.; Kazaks, A.; Pumpens, P.; Renhofa, R. Preparation by Alkaline Treatment and Detailed Characterisation of Empty Hepatitis B Virus Core Particles for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–16.
- (93) Hovlid, M. L.; Steinmetz, N. F.; Laufer, B.; Lau, J. L.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Hyypiä, T.; Nemerow, G. R.; Kessler, H.; Manchester, M.; Finn, M. G. Guiding Plant Virus Particles to Integrin-Displaying Cells. *Nanoscale* **2012**, *4* (12), 3698–3705.
- (94) Galaway, F. A.; Stockley, P. G. MS2 Viruslike Particles: A Robust, Semisynthetic Targeted Drug Delivery Platform. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (1), 59–68.
- (95) Rao, C. N. R.; Ramakrishna Matte, H. S. S.; Voggu, R.; Govindaraj, A. Recent Progress in the Synthesis of Inorganic Nanoparticles. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (17), 5089–5120.
- (96) Ehlerding, E. B.; Chen, F.; Cai, W. Biodegradable and Renal Clearable Inorganic Nanoparticles. *Adv. Sci.* **2015**, *3* (2), 1–8.
- (97) Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. Surface Engineering of Inorganic Nanoparticles for Imaging and Therapy. *Adv. Drug Deliv.* **2013**, *65*, 622–648.
- (98) Kim, C. S.; Tonga, G. Y.; Solfiell, D.; Rotello, V. M. Inorganic Nanosystems for Therapeutic Delivery: Status and Prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 93–99.
- (99) Kim, D.; Kim, J.; Park, Y. II; Lee, N.; Hyeon, T. Recent Development of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Imaging. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 324–336.

- (100) Wang, F.; Li, C.; Cheng, J.; Yuan, Z. Recent Advances on Inorganic Nanoparticle-Based Cancer Therapeutic Agents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13* (12), 3–15.
- (101) Pugazhendhi, A.; Edison, T. N. J. I.; Karuppusamy, I.; Kathirvel, B. Inorganic Nanoparticles: A Potential Cancer Therapy for Human Welfare. *Int. J. Pharm.* **2018**, *539* (1–2), 104–111.
- (102) Mohamed M., S.; Veerananarayanan, S.; Maekawa, T.; Sakthi, K. D. External Stimulus Responsive Inorganic Nanomaterials for Cancer Theranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 18–40.
- (103) Yu, J.; Chu, X.; Hou, Y. Stimuli-Responsive Cancer Therapy Based on Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (79), 11614–11630.
- (104) Li, J.; Chang, X.; Chen, X.; Gu, Z.; Zhao, F.; Chai, Z.; Zhao, Y. Toxicity of Inorganic Nanomaterials in Biomedical Imaging. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32* (4), 727–743.
- (105) Zhao, H.; Lin, Z. Y.; Yildirimer, L.; Dhinakar, A.; Zhao, X.; Wu, J. Polymer-Based Nanoparticles for Protein Delivery: Design, Strategies and Applications. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (23), 4060–4071.
- (106) Bhatia, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*; **2016**; pp 33–93.
- (107) Deng, C.; Jiang, Y.; Cheng, R.; Meng, F.; Zhong, Z. Biodegradable Polymeric Micelles for Targeted and Controlled Anticancer Drug Delivery: Promises, Progress and Prospects. *Nano Today* **2012**, *7* (5), 467–480.
- (108) Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2602–2663.
- (109) Pereira dos Santos, P.; Flôres Hickmann, S.; de Oliveira Rios, A.; Chisté, C. R. Biodegradable Polymers as Wall Materials to the Synthesis of Bioactive Compound Nanocapsules. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 23–33.
- (110) Mohammadi, M.; Ramezani, M.; Abnous, K.; Alibolandi, M. Biocompatible Polymersomes-Based Cancer Theranostics: Towards Multifunctional Nanomedicine. *Int. J. Pharm.* **2017**, *519* (1–2), 287–303.
- (111) Huang, D.; Wu, D. Biodegradable Dendrimers for Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *90*, 713–727.
- (112) Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Kubeil, M.; Graham, B.; Stephan, H.; Spiccia, L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (12), 18–40.
- (113) Elsabahy, M.; Heo, G. S.; Lim, S. M.; Sun, G.; Wooley, K. L. Polymeric Nanostructures for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10967–11011.

- (114) El-Say, K. M.; El-Sawy, H. S. Polymeric Nanoparticles: Promising Platform for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *528* (1–2), 675–691.
- (115) Crucho, C. I. C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *ChemMedChem* **2015**, *10* (1), 1–16.
- (116) Reineke, T. M. Stimuli-Responsive Polymers for Biological Detection and Delivery. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5* (1), 14–18.
- (117) Cao, Z. Q.; Wang, G. J. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Materials: Particles, Films, and Bulk Gels. *Chem. Rec.* **2016**, 1398–1435.
- (118) Nunes, R.; Machado, A.; Sarmiento, B. Polymer-Based Nanocarriers for Vaginal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 53–70.
- (119) Cao, Z.; Li, Q.; Wang, G. Photodegradable Polymer Nanocapsules Fabricated from Dimethyldiethoxysilane Emulsion Templates for Controlled Release. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 6817–6823.
- (120) Mirahadi, M.; Ghanbarzadeh, S.; Ghorbani, M.; Gholizadeh, A.; Hamishehkar, H. A Review on the Role of Lipid-Based Nanoparticles in Medical Diagnosis and Imaging. *Ther. Deliv.* **2018**, *9* (8), 557–569.
- (121) Niu, Z.; Conejos-Sánchez, I.; Griffin, B. T.; O'Driscoll, C. M.; Alonso, M. J. Lipid-Based Nanocarriers for Oral Peptide Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 337–354.
- (122) Shegokar, R.; Athawale, R.; Kurup, N.; Yang, R.; Chougule, M. B. Lipid-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery of Anticancer Drug. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*; Mishra, V., Kesharwani, P., Iqbal Cairul, M., Lyer, A., Eds.; Elsevier Inc., **2017**; pp 287–321.
- (123) Kumar, R. Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems. In *Nanocarriers for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*; Mohapatra, S. S., Ranjan, S., Dasgupta, N., Kumar Mishra, R., Thomas, S., Eds.; Elsevier Inc., **2019**; pp 249–284.
- (124) Vemuri, S.; Rhodes, C. T. Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review. *Pharm. Acta Helv.* **1995**, *70* (2), 95–111.
- (125) Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 147–168.
- (126) Bangham, A. D.; Hill, M. W.; Miller, N. G. A. Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes. In *Methods in Membrane Biology*; Korn, E. D., Ed.; Plenum Press, **1974**; Vol. 1, pp 1–68.
- (127) Akbarzadeh, A.; Rezaei-sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N. Liposome : Classification , Preparation , and Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (102), 1–9.

- (128) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Weissmann, G. The Action of Steroids and Streptolysin S on the Permeability of Phospholipid Structures to Cations. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 253–259.
- (129) Yingchoncharoen, P.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is yet to Come. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68* (3), 701–787.
- (130) Jacobberger--Foissac, C. Développement de Constructions Liposomiques Personnalisables Pour Une Thérapie Ciblée Du Cancer : La Vaccination Antitumorale, Strasbourg, **2018**.
- (131) Hauser, H. Methods of Preparation of Lipid Vesicles: Assessment of Their Suitability for Drug Encapsulation. *Trends Pharmacol. Sci.* **1984**, *3*, 274–277.
- (132) Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as Nanomedical Devices. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 975–999.
- (133) Brandl, M. Liposomes as Drug Carriers: A Technological Approach. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2001**, *7*, 59–85.
- (134) Pattri, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10938–10966.
- (135) Harashima, H.; Matsuo, H.; Kiwada, H. Identification of Proteins Mediating Clearance of Liposomes Using a Liver Perfusion System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *32* (1–2), 61–79.
- (136) Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R. Interactions of Liposomes and Lipid-Based Carrier Systems with Blood Proteins: Relation to Clearance Behaviour in Vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *32* (1–2), 3–17.
- (137) Miller, C. R.; Bondurant, B.; McLean, S. D.; McGovern, K. A.; O'Brien, D. F. Liposome-Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12875–12883.
- (138) Knudsen, K. B.; Northeved, H.; Pramod Kumar, E. K.; Permin, A.; Gjetting, T.; Andresen, T. L.; Larsen, S.; Wegener, K. M.; Lykkesfeldt, J.; Jantzen, K.; Loft, S.; Møller, P.; Roursgaard, M. In Vivo Toxicity of Cationic Micelles and Liposomes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11* (2), 467–477.
- (139) Roursgaard, M.; Knudsen, K. B.; Northeved, H.; Persson, M.; Christensen, T.; Kumar, P. E. K.; Permin, A.; Andresen, T. L.; Gjetting, T.; Lykkesfeldt, J.; Vesterdal, L. K.; Loft, S.; Møller, P. In Vitro Toxicity of Cationic Micelles and Liposomes in Cultured Human Hepatocyte (HepG2) and Lung Epithelial (A549) Cell Lines. *Toxicol. Vitr.* **2016**, *36*, 164–171.

- (140) Gregory, A. E.; Titball, R.; Williamson, D. Vaccine Delivery Using Nanoparticles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3* (13), 1–13.
- (141) Un, K.; Sakai-Kato, K.; Oshima, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H. Intracellular Trafficking Mechanism, from Intracellular Uptake to Extracellular Efflux, for Phospholipid/Cholesterol Liposomes. *Biomaterials* **2012**, *33* (32), 8131–8141.
- (142) Van Weering, J. R. T.; Cullen, P. J. Membrane-Associated Cargo Recycling by Tubule-Based Endosomal Sorting. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *31*, 40–47.
- (143) Lamichhane, N.; Udayakumar, T. S.; D’Souza, W. D.; Simone, C. B.; Raghavan, S. R.; Polf, J.; Mahmood, J. Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. *Molecules* **2018**, *23* (288), 1–17.
- (144) ElBayoumi, T. A.; Torchilin, V. P. Current Trends in Liposome Research. In *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*; Weissig, V., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**; pp 1–27.
- (145) Schmidt Tandrup, S.; Foged, C.; Smith Korsholm, K.; Rades, T.; Christensen, D. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics* **2016**, *8* (7), 1–22.
- (146) Petersen, A. L.; Hansen, A. E.; Gabizon, A.; Andresen, T. L. Liposome Imaging Agents in Personalized Medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (13), 1417–1435.
- (147) Xing, H.; Hwang, K.; Lu, Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics* **2016**, *6* (9), 1336–1352.
- (148) Langereis, S.; Geelen, T.; Grüll, H.; Strijkers, G. J.; Nicolay, K. Paramagnetic Liposomes for Molecular MRI and MRI-Guided Drug Delivery. *NMR Biomed.* **2013**, *26* (7), 728–744.
- (149) Martínez-González, R.; Estelrich, J.; Busquets, M. A. Liposomes Loaded with Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles: Suitable T2 Contrast Agents for MRI. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (1209), 1–14.
- (150) Silindir, M.; Özer, A. Y.; Erdogãan, S. The Use and Importance of Liposomes in Positron Emission Tomography. *Drug Deliv.* **2012**, *19* (1), 68–80.
- (151) Lee, H.; Zheng, J.; Gaddy, D.; Orcutt, K. D.; Leonard, S.; Geretti, E.; Hesterman, J.; Harwell, C.; Hoppin, J.; Jaffray, D. A.; Wickham, T.; Hendriks, B. S.; Kirpotin, D. A Gradient-Loadable ⁶⁴Cu-Chelator for Quantifying Tumor Deposition Kinetics of Nanoliposomal Therapeutics by Positron Emission Tomography. *Nanomedicine* **2015**, *11* (1), 155–165.
- (152) Woong Seo, J.; Mahakian, L. M.; Tam, S.; Qin, S.; Ingham, E. S.; Meares, C. F.; Ferrara, K. W. The Pharmacokinetics of Zr-89 Labeled Liposomes over Extended Periods in a Murine Tumor Model. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (2), 155–163.

- (153) Al-Jamal, W. T.; Al-Jamal, K. T.; Bomans, P. H.; Frederik, P. M.; Kostarelos, K. Functionalized-Quantum-Dot-Liposome Hybrids as Multimodal Nanoparticles for Cancer. *Small* **2008**, *4* (9), 1406–1415.
- (154) Soga, K.; Tokuzen, K.; Tsuji, K.; Yamano, T.; Hyodo, H.; Kishimoto, H. NIR Bioimaging: Development of Liposome-Encapsulated, Rare-Earth-Doped Y2O3 Nanoparticles as Fluorescent Probes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2673–2677.
- (155) Allison, A. C.; Gregoriadis, G. Liposomes as Immunological Adjuvants. *Nature* **1974**, *252* (5480), 252.
- (156) Marasini, N.; Ghaffar, K. A.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Chapter Twelve - Liposomes as a Vaccine Delivery System. In *Micro and Nano Technologies*; Skwarczynski, M., Toth, I. B. T.-M. and N. in V. D., Eds.; William Andrew Publishing, **2017**; pp 221–239.
- (157) Fontana, F.; Liu, D.; Hirvonen, J.; Santos, H. A. Delivery of Therapeutics with Nanoparticles: What's New in Cancer Immunotherapy? *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (1), 1–26.
- (158) Bookstaver, M. L.; Tsai, S. J.; Bromberg, J. S.; Jewell, C. M. Improving Vaccine and Immunotherapy Design Using Biomaterials. *Trends Immunol.* **2018**, *39* (2), 135–150.
- (159) Kakhi, Z.; Frisch, B.; Bourel-Bonnet, L.; Hemmerlé, J.; Pons, F.; Heurtault, B. Airway Administration of a Highly Versatile Peptide-Based Liposomal Construct for Local and Distant Antitumoral Vaccination. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 1047–1056.
- (160) Kakhi, Z.; Frisch, B.; Heurtault, B.; Pons, F. Liposomal Constructs for Antitumoral Vaccination by the Nasal Route. *Biochimie* **2016**, *130*, 14–22.
- (161) Jacobberger--Foissac, C.; Saliba, H.; Seguin, C.; Brion, A.; Kakhi, Z.; Frisch, B.; Fournel, S.; Heurtault, B. Optimization of Peptide-Based Cancer Vaccine Compositions, by Sequential Screening, Using Versatile Liposomal Platform. *Int. J. Pharm.* **2019**, *562* (January), 342–350.
- (162) Gregoriadis, G.; Ryman, B. E. Liposomes as Carriers of Enzymes or Drugs: A New Approach to the Treatment of Storage Diseases. *Biochem. J.* **1971**, *124* (5), 58.
- (163) Gregoriadis, G. Drug Entrapment in Liposomes. *FEBS Lett.* **1973**, *36* (3), 292–296.
- (164) Gregoriadis, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine Part 1. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295* (13), 704–710.
- (165) Gregoriadis, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine Part 2. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295* (14), 765–770.
- (166) Islam, M. A.; Reesor, E. K. G.; Xu, Y.; Zope, H. R.; Zetter, B. R.; Shi, J. Biomaterials for mRNA Delivery. *Biomater. Sci.* **2015**, *3* (12), 1519–1533.
- (167) Sarisozen, C.; Salzano, G.; Torchilin, V. P. Recent Advances in siRNA Delivery. *Biomol. Concepts* **2015**, *6* (5–6), 321–341.

- (168) Rezaee, M.; Oskuee, R. K.; Nassirli, H.; Malaekheh-Nikouei, B. Progress in the Development of Lipopolyplexes as Efficient Non-Viral Gene Delivery Systems. *J. Control. Release* **2016**, *236*, 1–14.
- (169) Xu, X.; Ho, W.; Zhang, X.; Bertrand, N.; Farokhzad, O. Cancer Nanomedicine: From Targeted Delivery to Combination Therapy. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21* (4), 223–232.
- (170) Dehaini, D.; Fang, R. H.; Zhang, L. Biomimetic Strategies for Targeted Nanoparticle Delivery. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *1* (1), 30–46.
- (171) Lee, Y.; Thompson, D. H. Stimuli-Responsive Liposomes for Drug Delivery. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (5).
- (172) Zangabad, P. S.; Mirkiani, S.; Shahsavari, S.; Masoudi, B.; Masroor, M.; Hamed, H.; Jafari, Z.; Taghipour, Y. D.; Hashemi, H.; Karimi, M.; Hamblin, M. R. Stimulus-Responsive Liposomes as Smart Nanoplatfoms for Drug Delivery Applications. *Nanotechnol. Rev.* **2018**, *7* (1), 95–122.
- (173) Kauscher, U.; Holme, M. N.; Björnmalm, M.; Stevens, M. M. Physical Stimuli-Responsive Vesicles in Drug Delivery: Beyond Liposomes and Polymersomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 259–275.
- (174) Muthu, M. S.; Feng, S. S. Theranostic Liposomes for Cancer Diagnosis and Treatment: Current Development and Pre-Clinical Success. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10* (2), 151–155.
- (175) Al-Jamal, W. T.; Kostarelos, K. Liposome-Nanoparticle Hybrids for Multimodal Diagnostic and Therapeutic Applications. *Nanomedicine* **2007**, *2* (1), 85–98.
- (176) Li, S.; Goins, B.; Zhang, L.; Bao, A. Novel Multifunctional Theranostic Liposome Drug Delivery System: Construction, Characterization, and Multimodality MR, near-Infrared Fluorescent, and Nuclear Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (6), 1322–1332.
- (177) Beztsinna, N.; Tsvetkova, Y.; Jose, J.; Rhourri-Frih, B.; Rawashdeh, W. Al; Lammers, T.; Kiessling, F.; Bestel, I. Photoacoustic Imaging of Tumor Targeting with Riboflavin-Functionalized Theranostic Nanocarriers. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 3813–3825.
- (178) Saesoo, S.; Sathornsumetee, S.; Anekwiang, P.; Treetidnipa, C.; Thuwajit, P.; Bunthot, S.; Maneepprakorn, W.; Maurizi, L.; Hofmann, H.; Rungsardthong, R. U.; Saengkrit, N. Characterization of Liposome-Containing SPIONs Conjugated with Anti-CD20 Developed as a Novel Theranostic Agent for Central Nervous System Lymphoma. *Colloids Surf., B* **2018**, *161*, 497–507.
- (179) Wang, M.; Li, L.; Zhang, X.; Liu, Y.; Zhu, R.; Liu, L.; Fang, Y.; Gao, Z.; Gao, D. Magnetic Resveratrol Liposomes as a New Theranostic Platform for Magnetic Resonance Imaging Guided Parkinson's Disease Targeting Therapy. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (12), 17124–17133.

- (180) Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (2), 1–33.
- (181) The World Health Organization. The Expanded Programme on Immunization https://www.who.int/immunization/programmes_systems/supply_chain/benefits_of_immunization/en/ (accessed Aug 30, 2019).
- (182) The World Health Organization. Immunization Coverage <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage> (accessed Aug 30, 2019).
- (183) Walters, A. A.; Krastev, C.; Hill, A. V. S.; Milicic, A. Next Generation Vaccines: Single-Dose Encapsulated Vaccines for Improved Global Immunisation Coverage and Efficacy. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67* (3), 400–408.
- (184) McHugh, K. J.; Guarecuco, R.; Langer, R.; Jaklenec, A. Single-Injection Vaccines: Progress, Challenges, and Opportunities. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 596–609.
- (185) Tauil, M. de C.; Sato, A. P. S.; Waldman, E. A. Factors Associated with Incomplete or Delayed Vaccination across Countries: A Systematic Review. *Vaccine* **2016**, *34* (24), 2635–2643.
- (186) Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S. Y.; Sood, A. K.; Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 1–13.
- (187) Lila, A. S. A.; Ishida, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40* (1), 1–10.
- (188) Fanciullino, R.; Ciccolini, J. Liposome-Encapsulated Anticancer Drugs: Still Waiting for the Magic Bullet? *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (33), 4361–4373.
- (189) He, H.; Lu, Y.; Qi, J.; Zhu, Q.; Chen, Z.; Wu, W. Adapting Liposomes for Oral Drug Delivery. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9* (1), 36–48.
- (190) Liu, W.; Ye, A.; Han, F.; Han, J. Advances and Challenges in Liposome Digestion: Surface Interaction, Biological Fate, and GIT Modeling. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *263*, 52–67.
- (191) Liu, W.; Ye, A.; Liu, W.; Liu, C.; Han, J.; Singh, H. Behaviour of Liposomes Loaded with Bovine Serum Albumin during in Vitro Digestion. *Food Chem.* **2015**, *175*, 16–24.
- (192) Klinkesorn, U.; McClements, D. J. Impact of Lipase, Bile Salts, and Polysaccharides on Properties and Digestibility of Tuna Oil Multilayer Emulsions Stabilized by Lecithin-Chitosan. *Food Biophys.* **2010**, *5* (2), 73–81.
- (193) Aguado, M. T. Future Approaches to Vaccine Development: Single-Dose Vaccines Using Controlled-Release Delivery Systems. *Vaccine* **1993**, *11* (5), 596–597.
- (194) Bose, R. J.; Kim, M.; Chang, J. H.; Paulmurugan, R.; Moon, J. J.; Koh, W. G.; Lee, S. H.; Park, H. Biodegradable Polymers for Modern Vaccine Development. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, *77*, 12–24.

- (195) Kapoor, D. N.; Bhatia, A.; Kaur, R.; Sharma, R.; Kaur, G.; Dhawan, S. PLGA: A Unique Polymer for Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (1), 41–58.
- (196) Kersten, G. F. A.; Donders, D.; Akkermans, A.; Beuvery, E. C. Single Shot with Tetanus Toxoid in Biodegradable Microspheres Protects Mice despite Acid-Induced Denaturation of the Antigen. *Vaccine* **1996**, *14* (17–18), 1627–1632.
- (197) Jain, A.; Jain, A.; Gulbake, A.; Shilpi, S.; Hurkat, P.; Jain, S. K. Peptide and Protein Delivery Using New Drug Delivery Systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2013**, *30* (4), 293–329.
- (198) Teekamp, N.; Duque, L. F.; Frijlink, H. W.; Hinrichs, W. L.; Olinga, P. Production Methods and Stabilization Strategies for Polymer-Based Nanoparticles and Microparticles for Parenteral Delivery of Peptides and Proteins. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12* (8), 1311–1331.
- (199) Ramot, Y.; Haim-Zada, M.; Domb, A. J.; Nyska, A. Biocompatibility and Safety of PLA and Its Copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 153–162.
- (200) Feng, L.; Qi, X. R.; Zhou, X. J.; Maitani, Y.; Cong Wang, S.; Jiang, Y.; Nagai, T. Pharmaceutical and Immunological Evaluation of a Single-Dose Hepatitis B Vaccine Using PLGA Microspheres. *J. Control. Release* **2006**, *112* (1), 35–42.
- (201) Singh, M.; Li, X. M.; McGee, J. P.; Zamb, T.; Koff, W.; Wang, C. Y.; O'Hagan, D. T. Controlled Release Microparticles as a Single Dose Hepatitis B Vaccine: Evaluation of Immunogenicity in Mice. *Vaccine* **1997**, *15* (5), 475–481.
- (202) Huang, G.; Liu, Y.; Chen, L. Chitosan and Its Derivatives as Vehicles for Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2017**, *24* (2), 108–113.
- (203) Arthanari, S.; Renukadevi, P.; Mani, K. R. Preparation and Evaluation of Sucrose Stabilized Tetanus Toxoid Encapsulated into Chitosan Microspheres. *Genomic Med. Biomarkers, Heal. Sci.* **2011**, *3* (3–4), 91–97.
- (204) Arthanari, S.; Renukadevi, P.; Mani, K. R. Preparation and Evaluation of Sucrose Stabilized Tetanus Toxoid Encapsulated into Chitosan Microspheres. *Genomic Med. Biomarkers, Heal. Sci.* **2011**, *3* (3–4), 91–97.
- (205) Walke, S.; Srivastava, G.; Nikalje, M.; Doshi, J.; Kumar, R.; Ravetkar, S.; Doshi, P. Fabrication of Chitosan Microspheres Using Vanillin/TPP Dual Crosslinkers for Protein Antigens Encapsulation. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *128*, 188–198.
- (206) Dhakal, S.; Goodman, J.; Bondra, K.; Lakshmanappa, Y. S.; Hiremath, J.; Shyu, D. L.; Ouyang, K.; Kang, K. il; Krakowka, S.; Wannemuehler, M. J.; Won Lee, C.; Narasimhan, B.; Renukaradhya, G. J. Poly(hydroxy)acrylate Nanovaccine against Swine Influenza Virus in Pigs. *Vaccine* **2017**, *35* (8), 1124–1131.

- (207) Determan, A. S.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S. Y.; Nilsen-Hamilton, M.; Narasimhan, B. Encapsulation, Stabilization, and Release of BSA-FITC from Polyanhydride Microspheres. *J. Control. Release* **2004**, *100* (1), 97–109.
- (208) Kipper, M. J.; Wilson, J. H.; Wannemuehler, M. J.; Narasimhan, B. Single Dose Vaccine Based on Biodegradable Polyanhydride Microspheres Can Modulate Immune Response Mechanism. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2006**, *76* (4), 798–810.
- (209) Nag, O. K.; Awasthi, V. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics* **2013**, *5* (4), 542–569.
- (210) Woodle, M. C. Controlling Liposome Blood Clearance by Surface-Grafted Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *32* (1–2), 139–152.
- (211) Shiratori, T.; Sato, A.; Fukuzawa, M.; Kondo, N.; Tanno, S. Severe Dextran-Induced Anaphylactic Shock during Induction of Hypertension-Hypervolemia-Hemodilution Therapy Following Subarachnoid Hemorrhage. *Case Reports Crit. Care* **2015**, *2015*, 1–5.
- (212) Ebo, D. G.; Clarke, R. C.; Mertes, P. M.; Platt, P. R.; Sabato, V.; Sadleir, P. H. M. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Perioperative Hypersensitivity and Anaphylaxis: A Narrative Review. *Br. J. Anaesth.* **2019**, *123* (1), e38–e49.
- (213) Torchilin, V. P.; Shtilman, M. I.; Trubetsky, V. S.; Whiteman, K.; Milstein, A. M. Amphiphilic Vinyl Polymers Effectively Prolong Liposome Circulation Time in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1195* (1), 181–184.
- (214) Torchilin, V. P.; Levchenko, T. S.; Whiteman, K. R.; Yaroslavov, A. A.; Tsatsakis, A. M.; Rizos, A. K.; Michailova, E. V.; Shtilman, M. I. Amphiphilic Poly-N-Vinylpyrrolidones: Synthesis, Properties and Liposome Surface Modification. *Biomaterials* **2001**, *22* (22), 3035–3044.
- (215) Takeuchi, H.; Kojima, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Polymer Coating of Liposomes with a Modified Polyvinyl Alcohol and Their Systemic Circulation and RES Uptake in Rats. *J. Control. Release* **2000**, *68* (2), 195–205.
- (216) Nakano, K.; Tozuka, Y.; Takeuchi, H. Effect of Surface Properties of Liposomes Coated with a Modified Polyvinyl Alcohol (PVA-R) on the Interaction with Macrophage Cells. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354* (1–2), 174–179.
- (217) Zalipsky, S.; Hansen, C. B.; Oaks, J. M.; Allen, T. M. Evaluation of Blood Clearance Rates and Biodistribution of Poly(2-Oxazoline)-Grafted Liposomes. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (2), 133–137.
- (218) Xu, H.; Zhang, W.; Li, Y.; Ye, F. F.; Yin, P. P.; Yu, X.; Hu, M. N.; Fu, Y. S.; Wang, C.; Shang, D. J. The Bifunctional Liposomes Constructed by Poly(2-Ethyl-Oxazoline)-Cholesteryl Methyl Carbonate: An Effectual Approach to Enhance Liposomal Circulation Time, PH-Sensitivity and Endosomal Escape. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (11), 3038–3050.

- (219) Xu, H.; Hu, M.; Yu, X.; Li, Y.; Fu, Y.; Zhou, X.; Zhang, D.; Li, J. Design and Evaluation of PH-Sensitive Liposomes Constructed by Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Cholesterol Hemisuccinate for Doxorubicin Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *91* (3), 66–74.
- (220) Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential. *Int. J. Nanomed.* **2006**, *1* (3), 297–315.
- (221) Zhang, P.; Sun, F.; Liu, S.; Jiang, S. Anti-PEG Antibodies in the Clinic: Current Issues and beyond PEGylation. *J. Control. Release* **2016**, *244*, 184–193.
- (222) Crosasso, P.; Ceruti, M.; Brusa, P.; Arpicco, S.; Dosio, F.; Cattel, L. Preparation, Characterization and Properties of Sterically Stabilized Paclitaxel-Containing Liposomes. *J. Control. Release* **2000**, *63* (1–2), 19–30.
- (223) Vali, A. M.; Toliyat, T.; Shafaghi, B.; Dadashzadeh, S. Preparation, Optimization, and Characterization of Topotecan Loaded PEGylated Liposomes Using Factorial Design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2008**, *34* (1), 10–23.
- (224) Panwar, P.; Pandey, B.; Lakhera, P. C.; Singh, K. P. Preparation, Characterization, and in Vitro Release Study of Albendazole-Encapsulated Nanosize Liposomes. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5* (1), 101–108.
- (225) Mohapatra, A.; Morshed, B. I.; O. Haggard, W.; Smith, R. A. Stealth Engineering for In Vivo Drug Delivery Systems. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, *43* (5–6), 347–369.
- (226) Gaaz, T. S.; Sulong, A. B.; Akhtar, M. N.; Kadhum, A. A. H.; Mohamad, A. B.; Al-Amiery, A. A.; McPhee, D. J. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules* **2015**, *20* (12), 22833–22847.
- (227) Takeuchi, H.; Kojima, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Evaluation of Circulation Profiles of Liposomes Coated with Hydrophilic Polymers Having Different Molecular Weights in Rats. *J. Control. Release* **2001**, *75* (1–2), 83–91.
- (228) Konradi, R.; Acikgoz, C.; Textor, M. Polyoxazolines for Nonfouling Surface Coatings - A Direct Comparison to the Gold Standard PEG. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (19), 1663–1676.
- (229) Hu, S.; Niu, M.; Hu, F.; Lu, Y.; Qi, J.; Yin, Z.; Wu, W. Integrity and Stability of Oral Liposomes Containing Bile Salts Studied in Simulated and Ex Vivo Gastrointestinal Media. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441* (1–2), 693–700.
- (230) Aburahma, M. H. Bile Salts-Containing Vesicles: Promising Pharmaceutical Carriers for Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs and Peptide/Protein-Based Therapeutics or Vaccines. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (6), 1847–1867.

- (231) Ahmad, J.; Singhal, M.; Amin, S.; Rizwanullah, M.; Akhter, S.; Kamal, M. A.; Haider, N.; Midoux, P.; Pichon, C. Bile Salt Stabilized Vesicles (Bilosomes): A Novel Nano-Pharmaceutical Design for Oral Delivery of Proteins and Peptides. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (11), 1575–1588.
- (232) Pantze, S. F.; Parmentier, J.; Hofhaus, G.; Fricker, G. Matrix Liposomes: A Solid Liposomal Formulation for Oral Administration. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116* (9), 1145–1154.
- (233) Barea, M. J.; Jenkins, M. J.; Lee, Y. S.; Johnson, P.; Bridson, R. H. Encapsulation of Liposomes within PH Responsive Microspheres for Oral Colonic Drug Delivery. *Int. J. Biomater.* **2012**, *2012*, 1–9.
- (234) Zhang, B.; Chen, J.; Lu, Y.; Qi, J.; Wu, W. Liposomes Interiorly Thickened with Thermosensitive Nanogels as Novel Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2013**, *455* (1–2), 276–284.
- (235) Petralito, S.; Spera, R.; Pacelli, S.; Relucenti, M.; Familiari, G.; Vitalone, A.; Paolicelli, P.; Casadei, M. A. Design and Development of PEG-DMA Gel-in-Liposomes as a New Tool for Drug Delivery. *React. Funct. Polym.* **2014**, *77* (1), 30–38.
- (236) Nguyen, T. X.; Huang, L.; Gauthier, M.; Yang, G.; Wang, Q. Recent Advances in Liposome Surface Modification for Oral Drug Delivery. *Nanomedicine* **2016**, *11* (9), 1169–1185.
- (237) Chawla, A.; Sharma, P.; Pawar, P. Eudragit S-100 Coated Sodium Alginate Microspheres of Naproxen Sodium: Formulation, Optimization and in Vitro Evaluation. *Acta Pharm.* **2012**, *62* (4), 529–545.
- (238) Patel, H. R.; Patel, R. P.; Patel, M. M. Poloxamers: A Pharmaceutical Excipients with Therapeutic Behaviors. *Int. J. PharmTech Res.* **2009**, *1* (2), 299–303.
- (239) Ma, G.; Yang, D.; Li, Q.; Wang, K.; Chen, B.; Kennedy, J. F.; Nie, J. Injectable Hydrogels Based on Chitosan Derivative/Polyethylene Glycol Dimethacrylate/N,N-Dimethylacrylamide as Bone Tissue Engineering Matrix. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (3), 620–627.
- (240) R. K. Iler. Multilayers of Colloidal Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *21*, 569–594.
- (241) Decher, G.; Hong, J.-D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: I. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles on Charged Surfaces. *Makromol. Chemie. Macromol. Symp.* **1991**, *46* (1), 321–327.
- (242) Decher, G.; Hong, J.-D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1991**, *95* (11), 1430–1434.

- (243) Decher, G.; Schmitt, J. Fine-Tuning of the Film Thickness of Ultrathin Multilayer Films Composed of Consecutively Alternating Layers of Anionic and Cationic Polyelectrolytes. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1992**, *89*, 160–164.
- (244) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277* (5330), 1232–1237.
- (245) Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Möhwald, H. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *37* (16), 2202–2205.
- (246) Cuomo, F.; Lopez, F.; Miguel, M. G.; Lindman, B. Vesicle-Templated Layer-by-Layer Assembly for the Production of Nanocapsules. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 10555–10560.
- (247) Quinn, J. F.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K.; Zelikin, A. N.; Caruso, F. Next Generation, Sequentially Assembled Ultrathin Films: Beyond Electrostatics. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (5), 707–718.
- (248) Matsusaki, M.; Ajiro, H.; Kida, T.; Serizawa, T.; Akashi, M. Layer-by-Layer Assembly through Weak Interactions and Their Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (4), 454–474.
- (249) Kotov, N. A. Layer-by-Layer Self-Assembly: The Contribution of Hydrophobic Interactions. *Nanostructured Mater.* **1999**, *12* (5), 789–796.
- (250) Borges, J.; Mano, J. F. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (18), 8883–8942.
- (251) Gentile, P.; Carmagnola, I.; Nardo, T.; Chiono, V. Layer-by-Layer Assembly for Biomedical Applications in the Last Decade. *Nanotechnology* **2015**, *26* (42).
- (252) Guzmán, E.; Mateos-Maroto, A.; Ruano, M.; Francisco, O.; Rubio, R. G. Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assemblies for Encapsulation and Release of Active Compounds. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 290–307.
- (253) Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: III. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210–211*, 831–835.
- (254) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules* **1999**, *32* (24), 8153–8160.
- (255) Richardson, J. J.; Cui, J.; Bj, M.; Braunger, J. A.; Ejima, H.; Caruso, F. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14828–14867.
- (256) Richardson, J. J.; Björnmalm, M.; Caruso, F. Technology-Driven Layer-by-Layer Assembly of Nanofilms. *Science* **2015**, *348* (6233), 1–33.
- (257) Li, Y.; Wang, X.; Sun, J. Layer-by-Layer Assembly for Rapid Fabrication of Thick Polymeric Films. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 5998–6009.

- (258) Donath, E.; Walther, D.; Shilov, V. N.; Knippel, E.; Budde, A.; Lowack, K.; Helm, C. A.; Möhwald, H. Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles. *Langmuir* **1997**, *13* (20), 5294–5305.
- (259) Caruso, F.; Caruso, R. A.; Möhwald, H. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating. *Science* **1998**, *282* (5391), 1111–1114.
- (260) V. Klitzing, R. Internal Structure of Polyelectrolyte Multilayer Assemblies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (43), 5012–5033.
- (261) Guzmán, E.; San Miguel, V.; Peinado, C.; Ortega, F.; Rubio, R. G. Polyelectrolyte Multilayers Containing Triblock Copolymers of Different Charge Ratio. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 11494–11502.
- (262) Guzmán, E.; Ortega, F.; Baghdadli, N.; Luengo, G. S.; Rubio, R. G. Effect of the Molecular Structure on the Adsorption of Conditioning Polyelectrolytes on Solid Substrates. *Colloids Surf., A* **2011**, *375* (1–3), 209–218.
- (263) Linse, P.; Källrot, N. Polymer Adsorption from Bulk Solution onto Planar Surfaces: Effect of Polymer Flexibility and Surface Attraction in Good Solvent. *Macromolecules* **2010**, *43* (4), 2054–2068.
- (264) Guzmán, E.; Ritacco, H.; Ortega, F.; Rubio, R. G. Evidence of the Influence of Adsorption Kinetics on the Internal Reorganization of Polyelectrolyte Multilayers. *Colloids Surf., A* **2011**, *384* (1–3), 274–281.
- (265) Kayitmazer, A. B.; Koksal, A. F.; Kilic Iyilik, E. Complex Coacervation of Hyaluronic Acid and Chitosan: Effect of PH, Ionic Strength, Charge Density, Chain Length and Charge Ratio A. *Soft Matter* **2015**, *11*, 8605–8612.
- (266) Guzmán, E.; Ritacco, H. A.; Ortega, F.; Rubio, R. G. Growth of Polyelectrolyte Layers Formed by Poly(4-Styrenesulfonate Sodium Salt) and Two Different Polycations: New Insights from Study of Adsorption Kinetics. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (29), 15474–15483.
- (267) Tang, K.; Besseling, N. A. M. Formation of Polyelectrolyte Multilayers: Ionic Strengths and Growth Regimes. *Soft Matter* **2016**, *12* (4), 1032–1040.
- (268) Panchagnula, V.; Jeon, J.; Dobrynin, A. V. Molecular Dynamics Simulations of Electrostatic Layer-by-Layer Self-Assembly. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93* (3), 1–4.
- (269) Kharlampieva, E.; Kozlovskaya, V.; Chan, J.; Ankner, J. F.; Tsukruk, V. V. Spin-Assisted Layer-by-Layer Assembly: Variation of Stratification as Studied with Neutron Reflectivity. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 14017–14024.
- (270) Félix, O.; Zheng, Z.; Cousin, F.; Decher, G. Are Sprayed LbL-Films Stratified? A First Assessment of the Nanostructure of Spray-Assembled Multilayers by Neutron Reflectometry. *Comptes Rendus Chim.* **2009**, *12* (1–2), 225–234.

- (271) Schmitt, J.; Grünewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K.; Lösche, M. Internal Structure of Layer-by-Layer Adsorbed Polyelectrolyte Films: A Neutron and X-Ray Reflectivity Study. *Macromolecules* **1993**, *26* (25), 7058–7063.
- (272) Lösche, M.; Schmitt, J.; Decher, G.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K. Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry. *Macromolecules* **1998**, *31* (25), 8893–8906.
- (273) Guzmán, E.; Ritacco, H.; Rubio, J. E. F.; Rubio, R. G.; Ortega, F. Salt-Induced Changes in the Growth of Polyelectrolyte Layers of Poly(Diallyl-Dimethylammonium Chloride) and Poly(4-Styrene Sulfonate of Sodium). *Soft Matter* **2009**, *5* (10), 2130–2142.
- (274) Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*; Wiley, **2012**.
- (275) Guzmán, E.; Cavallo, J. A.; Chuliá-Jordán, R.; Gómez, C.; Strumia, M. C.; Ortega, F.; Rubio, R. G. PH-Induced Changes in the Fabrication of Multilayers of Poly(Acrylic Acid) and Chitosan: Fabrication, Properties, and Tests as a Drug Storage and Delivery System. *Langmuir* **2011**, *27* (11), 6836–6845.
- (276) Salomäki, M.; Vinokurov, I. A.; Kankare, J. Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2005**, *21* (24), 11232–11240.
- (277) Gentile, P.; Carmagnola, I.; Nardo, T.; Chiono, V. Layer-by-Layer Assembly for Biomedical Applications in the Last Decade. *Nanotechnology* **2015**, *26* (42).
- (278) Ai, H.; Jones, S. A.; Lvov, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles Hua. *Cell Biochem. Biophysics* **2005**, *39*, 23–42.
- (279) Hammond, P. T. Engineering Materials Layer-by-Layer: Challenges and Opportunities in Multilayer Assembly. *AIChE J.* **2011**, *57* (11), 2928–2940.
- (280) Hammond, P. T. Building Biomedical Materials Layer-by-Layer. *Mater. Today* **2012**, *15* (5), 196–206.
- (281) Keeney, M.; Jiang, X. Y.; Yamane, M.; Lee, M.; Goodman, S.; Yang, F. Nanocoating for Biomolecule Delivery Using Layer-by-Layer Self-Assembly M. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (45), 8757–8770.
- (282) Liu, X. Q.; Picart, C. Layer-by-Layer Assemblies for Cancer Treatment and Diagnosis. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (6), 1295–1301.
- (283) Zhu, X.; Jun Loh, X. Layer-by-Layer Assemblies for Antibacterial Applications. *Biomater. Sci.* **2015**, *3* (12), 1505–1518.
- (284) Séon, L.; Lavallo, P.; Schaaf, P.; Boulmedais, F. Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir* **2015**, *31* (47), 12856–12872.

- (285) Correa, S.; Dreaden, E. C.; Gu, L.; Hammond, P. T. Engineering Nanolayered Particles for Modular Drug Delivery. *J. Control. Release* **2016**, *240*, 364–386.
- (286) Poon, Z.; Chang, D.; Zhao, X.; Hammond, P. T. Layer-by-Layer Nanoparticles with a PH-Sheddable Layer for in Vivo Targeting of Tumor Hypoxia. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4284–4292.
- (287) Yang, X. Z.; Du, J. Z.; Dou, S.; Mao, C. Q.; Long, H. Y.; Wang, J. Sheddable Ternary Nanoparticles for Tumor Acidity-Targeted siRNA Delivery. *ACS Nano* **2012**, *6* (1), 771–781.
- (288) Zhu, Z.; Gao, N.; Wang, H.; Sukhishvili, S. A. Temperature-Triggered on-Demand Drug Release Enabled by Hydrogen-Bonded Multilayers of Block Copolymer Micelles. *J. Control. Release* **2013**, *171* (1), 73–80.
- (289) Ramasamy, T.; Haidar, Z. S.; Tran, T. H.; Choi, J. Y.; Jeong, J. H.; Shin, B. S.; Choi, H. G.; Yong, C. S.; Kim, J. O. Layer-by-Layer Assembly of Liposomal Nanoparticles with PEGylated Polyelectrolytes Enhances Systemic Delivery of Multiple Anticancer Drugs. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (12), 5116–5127.
- (290) Poon, Z.; Lee, J. B.; Morton, S. W.; Hammond, P. T. Controlling in Vivo Stability and Biodistribution in Electrostatically Assembled Nanoparticles for Systemic Delivery. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 2096–2103.
- (291) Shutava, T. G.; Pattekari, P. P.; Arapov, K. A.; Torchilin, V. P.; Lvov, Y. M. Architectural Layer-by-Layer Assembly of Drug Nanocapsules with PEGylated Polyelectrolytes. *Soft Matter* **2012**, *8* (36), 9418–9427.
- (292) Cheng, L.; Yang, K.; Chen, Q.; Liu, Z. Organic Stealth Nanoparticles for Highly Effective in Vivo Near-Infrared Photothermal Therapy of Cancer. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 5605–5613.
- (293) Wang, G.; Zhou, H.; Nian, Q. G.; Yang, Y.; Qin, C. F.; Tang, R. Robust Vaccine Formulation Produced by Assembling a Hybrid Coating of Polyethyleneimine-Silica. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (3), 1753–1759.
- (294) Tafaghodi, M.; Kersten, G.; Jiskoot, W. Nano-Adjuvanted Polio Vaccine: Preparation and Characterization of Chitosan and Trimethylchitosan (TMC) Nanoparticles Loaded with Inactivated Polio Virus and Coated with Sodium Alginate Nanoadjuvanted Polio Vaccine. *Nanomed. J.* **2014**, *1* (4), 220–228.
- (295) Rassu, G.; Soddu, E.; Cossu, M.; Gavini, E.; Giunchedi, P.; Dalpiaz, A. Particulate Formulations Based on Chitosan for Nose-to-Brain Delivery of Drugs. A Review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *32*, 77–87.
- (296) Deng, Z. J.; Morton, S. W.; Ben-Akiva, E.; Dreaden, E. C.; Shopsowitz, K. E.; Hammond, P. T. Layer-by-Layer Nanoparticles for Systemic Codelivery of an Anticancer Drug and siRNA for Potential Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9571–9584.

- (297) Lee, J. Y.; Spicer, A. P. Hyaluronan: A Multifunctional, MegaDalton, Stealth Molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 581–586.
- (298) Poon, Z.; Lee, J. B.; Morton, S. W.; Hammond, P. T. Controlling in Vivo Stability and Biodistribution in Electrostatically Assembled Nanoparticles for Systemic Delivery. *Nano Lett.* **2011**, *11* (5), 2096–2103.
- (299) Huang, G.; Liu, Y.; Chen, L. Chitosan and Its Derivatives as Vehicles for Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2017**, *24* (2), 108–113.
- (300) Madrigal-Carballo, S.; Lim, S.; Rodriguez, G.; Vila, A. O.; Krueger, C. G.; Gunasekaran, S.; Reed, J. D. Biopolymer Coating of Soybean Lecithin Liposomes via Layer-by-Layer Self-Assembly as Novel Delivery System for Ellagic Acid. *J. Funct. Foods* **2010**, *2* (2), 99–106.
- (301) Liu, W.; Liu, J.; Liu, W.; Li, T.; Liu, C. Improved Physical and in Vitro Digestion Stability of a Polyelectrolyte Delivery System Based on Layer-by-Layer Self-Assembly Alginate–Chitosan-Coated Nanoliposomes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (17), 4133–4144.
- (302) Liu, W.; Liu, W.; Ye, A.; Peng, S.; Wei, F.; Liu, C.; Han, J. Environmental Stress Stability of Microencapsules Based on Liposomes Decorated with Chitosan and Sodium Alginate. *Food Chem.* **2016**, *196*, 396–404.
- (303) Agrawal, A. K.; Harde, H.; Thanki, K.; Jain, S. Improved Stability and Antidiabetic Potential of Insulin Containing Folic Acid Functionalized Polymer Stabilized Multilayered Liposomes Following Oral Administration. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (1), 350–360.
- (304) Jain, P.; Jain, S.; Prasad, K. N.; Jain, S. K.; Vyas, S. P. Polyelectrolyte Coated Multilayered Liposomes (Nanocapsules) for the Treatment of Helicobacter Pylori Infection. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (2), 593–603.
- (305) Marasini, N.; Giddam, A. K.; Ghaffar, K. A.; Batzloff, M. R.; Good, M. F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Multilayer Engineered Nanoliposomes as a Novel Tool for Oral Delivery of Lipopeptide-Based Vaccines against Group A Streptococcus. *Nanomedicine* **2016**, *11* (10), 1223–1236.
- (306) Jain, S.; Kumar, D.; Swarnakar, N. K.; Thanki, K. Polyelectrolyte Stabilized Multilayered Liposomes for Oral Delivery of Paclitaxel. *Biomaterials* **2012**, *33* (28), 6758–6768.
- (307) Jain, S.; Patil, S. R.; Swarnakar, N. K.; Agrawal, A. K. Oral Delivery of Doxorubicin Using Novel Polyelectrolyte-Stabilized Liposomes (Layersomes). *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (9), 2626–2635.
- (308) Chen, M. X.; Li, B. K.; Yin, D. K.; Liang, J.; Li, S. S.; Peng, D. Y. Layer-by-Layer Assembly of Chitosan Stabilized Multilayered Liposomes for Paclitaxel Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 298–304.

- (309) De Giglio, E.; Cafagna, D.; Ricci, M. A.; Sabbatini, L.; Cometa, S.; Ferretti, C.; Mattioli-Belmonte, M. Biocompatibility of Poly(Acrylic Acid) Thin Coatings Electro-Synthesized onto TiAlV-Based Implants. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2010**, *25* (4), 374–391.
- (310) Picart, C.; Elkaim, R.; Richert, L.; Audoin, F.; Arntz, Y.; Cardoso, M. D. S.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Frisch, B. Primary Cell Adhesion on RGD-Functionalized and Covalently Crosslinked Thin Polyelectrolyte Multilayer Films. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15* (1), 83–94.
- (311) Peniche, C.; Argüelles-Monal, W.; Peniche, H.; Acosta, N. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3* (10), 511–520.
- (312) Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Manivasagan, P.; Kang, K. H.; Kim, S. K. Alginate Composites for Bone Tissue Engineering: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 269–281.
- (313) Lombardo, D.; Calandra, P.; Caccamo, M. T.; Magazù, S.; Kiselev, M. A. Colloidal Stability of Liposomes. *AIMS Mater. Sci.* **2019**, *6* (2), 200–213.
- (314) Nguyen, T. X.; Huang, L.; Gauthier, M.; Yang, G.; Wang, Q. Recent Advances in Liposome Surface Modification for Oral Drug Delivery. *Nanomedicine* **2016**, *11* (9), 1169–1185.
- (315) Ai, H.; Jones, S. A.; Lvov, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. *Cell Biochem. Biophys.* **2003**, *39* (1), 23–43.
- (316) Etienne, O.; Picart, C.; Taddei, C.; Haikel, Y.; Dimarcq, J. L.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J.; Egles, C. Multilayer Polyelectrolyte Films Functionalized by Insertion of Defensin: A New Approach to Protection of Implants from Bacterial Colonization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (10), 3662–3669.
- (317) Boulmedais, F.; Frisch, B.; Etienne, O.; Lavalley, P.; Picart, C.; Ogier, J.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Egles, C. Polyelectrolyte Multilayer Films with Pegylated Polypeptides as a New Type of Anti-Microbial Protection for Biomaterials. *Biomaterials* **2004**, *25* (11), 2003–2011.
- (318) Gribova, V.; Gauthier-Rouvière, C.; Albigès-Rizo, C.; Auzely-Velty, R.; Picart, C. Effect of RGD Functionalization and Stiffness Modulation of Polyelectrolyte Multilayer Films on Muscle Cell Differentiation. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (5), 6468–6480.
- (319) Ciobanu, M.; Heurtault, B.; Schultz, P.; Ruhlmann, C.; Muller, C. D.; Frisch, B. Layersome: Development and Optimization of Stable Liposomes as Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344* (1–2), 154–157.
- (320) Tryoen-Tóth, P.; Vautier, D.; Haikel, Y.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Chluba, J.; Ogier, J. Viability, Adhesion, and Bone Phenotype of Osteoblast-like Cells on Polyelectrolyte Multilayer Films. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60* (4), 657–667.

- (321) Leguen, E.; Chassepot, A.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Jessel, N. Bioactive Coatings Based on Polyelectrolyte Multilayer Architectures Functionalized by Embedded Proteins, Peptides or Drugs. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 33–41.
- (322) Schneider, A.; Bolcato-Bellemin, A. L.; Francius, G.; Jedrzejwska, J.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Frisch, B.; Picart, C. Glycated Polyelectrolyte Multilayer Films: Differential Adhesion of Primary Vesicular Tumor Cells. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2882–2889.
- (323) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951.
- (324) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4588.
- (325) Shi, J.; Tian, F.; Lyu, J.; Yang, M. Nanoparticle Based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) for Biosensing Applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 6989–7005.
- (326) Su, Q.; Feng, W.; Yang, D.; Li, F. Resonance Energy Transfer in Upconversion Nanoplatforms for Selective Biodetection. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 32–40.
- (327) Okamoto, K.; Sako, Y. Recent Advances in FRET for the Study of Protein Interactions and Dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *46*, 16–23.
- (328) Teunissen, A. J. P.; Pérez-Medina, C.; Meijerink, A.; Mulder, W. J. M. Investigating Supramolecular Systems Using Förster Resonance Energy Transfer. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7027–7044.
- (329) Kumar, S.; Nussinov, R. Relationship between Ion Pair Geometries and Electrostatic Strengths in Proteins. *Biophys. J.* **2002**, *83* (3), 1595–1612.
- (330) Sun, Y.; Rombola, C.; Jyothikumar, V.; Periasamy, A. Förster Resonance Energy Transfer Microscopy and Spectroscopy for Localizing Protein-Protein Interactions in Living Cells. *Cytom. Part A* **2013**, *83* (9), 780–793.
- (331) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wägung Dünner Schichten Und Zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155*, 206–222.
- (332) Nomura, T.; Okuhara, M. Frequency Shifts of Piezoelectric Quartz Crystals Immersed in Organic Liquids. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *14*, 281–284.
- (333) Lu, C.; Czanderna, A. W. *Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances; Methods and Phenomena*; Elsevier Science, **2012**.
- (334) Kaminski, G. A. T.; Sierakowski, M. R.; Pontarolo, R.; Santos, L. A. Dos; Freitas, R. A. De. Layer-by-Layer Polysaccharide-Coated Liposomes for Sustained Delivery of Epidermal Growth Factor. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *140*, 129–135.

- (335) Nayef, L.; Castiello, R.; Tabrizian, M. Washless Method Enables Multilayer Coating of an Aggregation-Prone Nanoparticulate Drug Delivery System with Enhanced Yields, Colloidal Stability, and Scalability. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1–12.
- (336) Lind, T. K.; Cárdenas, M. Understanding the Formation of Supported Lipid Bilayers via Vesicle Fusion—A Case That Exemplifies the Need for the Complementary Method Approach. *Biointerphases* **2016**, *11* (2), 1–12.
- (337) Biolin Scientific. Characterization of lipid-based systems with QSense QCM-D <https://content.biolinscientific.com/overview-characterization-of-lipid-based-systems-with-qsense-qcmd?hsCtaTracking=835d0dc5-b0ce-4085-99f5-3719ba00963e%7Cb061b4a8-a2f8-4189-a26b-6503725a2cb4> (accessed May 20, 2019).
- (338) N. Weinstein, J.; Ralston, E.; D. Leserman, L.; D. Klausner, R.; Dragsten, P.; Henkart, P.; Blumenthal, R. Self-Quenching Of Carboxyfluorescein Fluorescence: Uses In Studying Liposome Stability And Liposome-Cell Interaction. In *Liposome technology*; **2018**; pp 183–204.
- (339) Hofmann, A. F.; Small, D. M. Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physiological Function. *Annu. Rev. Med.* **1967**, *18*, 333–376.
- (340) Carey, M. C.; Small, D. M. Micelle Formation by Bile Salts: Physical-Chemical and Thermodynamic Considerations. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506–527.
- (341) Redinger, R. N.; Small, D. M. Bile Composition, Bile Salt Metabolism and Gallstones. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 618–630.
- (342) Klein, S. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the in Vivo Performance of a Drug. *AAPS J.* **2010**, *12* (3), 397–406.
- (343) World Health Organization. Influenza (Seasonal) [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed May 20, 2019).
- (344) Arbeitskreis Blut; Untergruppe Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger. Influenza Virus. *Transfus. Med. Hemotherapy* **2009**, *36*, 32–39.
- (345) Del Giudice, G.; Rappuoli, R. Inactivated and Adjuvanted Influenza Vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2014**, *386*, 151–180.
- (346) World Health Organization. Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) initiative https://www.who.int/influenza/patient_care/clinical/brave/en/.
- (347) World Health Organization. FAQs: H5N1 influenza.pdf https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1_research/faqs/en/ (accessed Feb 5, 2020).

- (348) Geeraedts, F.; Goutagny, N.; Hornung, V.; Severa, M.; De Haan, A.; Pool, J.; Wilschut, J.; Fitzgerald, K. A.; Huckriede, A. Superior Immunogenicity of Inactivated Whole Virus H5N1 Influenza Vaccine Is Primarily Controlled by Toll-like Receptor Signalling. *PLoS Pathog.* **2008**, *4* (8), 1–9.
- (349) Beyer, W.; Palache, A.; Osterhaus, A. Comparison of Serology and Reactogenicity between Influenza Subunit Vaccines and Whole Virus or Split Vaccines. *Clin. Drug Investig.* **2006**, *15* (1), 1–12.
- (350) Nicholson, K. G.; Tyrrell, D. A. J.; Harrison, P.; Potter, C. W.; Jennings, R.; Clark, A.; Schild, G. C.; Wood, J. M.; Yetts, R.; Seagroatt, V.; Huggins, A.; Anderson, S. G. Clinical Studies of Monovalent Inactivated Whole Virus and Subunit A/USSR/77 (H1N1) Vaccine: Serological Responses and Clinical Reactions. *J. Biol. Stand.* **1979**, *7* (2), 123–136.
- (351) Van Boxtel, R. A. J.; Verdijk, P.; de Boer, O. J.; van Riet, E.; Mensinga, T. T.; Luytjes, W. Safety and Immunogenicity of Influenza Whole Inactivated Virus Vaccines: A Phase I Randomized Clinical Trial. *Hum. Vaccines Immunother.* **2015**, *11* (4), 983–990.
- (352) Harada, Y.; Ninomiya-Mori, A.; Takahashi, Y.; Shirakura, M.; Kishida, N.; Kageyama, T.; Tada, Y.; Tashiro, M.; Odagiri, T. Inactivated and Adjuvanted Whole-Virion Clade 2.3.4 H5N1 Pre-Pandemic Influenza Vaccine Possesses Broad Protective Efficacy against Infection by Heterologous Clades of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus in Mice. *Vaccine* **2011**, *29* (46), 8330–8337.
- (353) Geeraedts, F.; ter Veer, W.; Wilschut, J.; Huckriede, A. Effect of Viral Membrane Fusion Activity on Antibody Induction by Influenza H5N1 Whole Inactivated Virus Vaccine. *Vaccine* **2012**, *30* (45), 6501–6507.
- (354) Thermo Scientific. NHS and Sulfo-NHS Instructions <http://www.piercenet.com/instructions/2160650.pdf> (accessed May 20, 2019).
- (355) Carl Roth. Data and safety sheet of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate $\geq 99\%$ https://www.carlroth.com/downloads/sdb/fr/2/SDB_2156_CH_FR.pdf (accessed May 20, 2019).
- (356) Gros, F.; Fournel, S.; Liégeois, S.; Richard, D.; Soulas-sprauel, P. Le Système Immunitaire et La Lutte Contre Les Pathologies Infectieuses. In *Atlas d'immunologie: De la détection du danger à l'immunothérapie*; Dunod, **2018**; pp 34–39.
- (357) Pedersen, J. C. Hemagglutination-Inhibition Assay for Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to Influenza Virus. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1161*, 11–25.
- (358) Betts, M. R.; Nason, M. C.; West, S. M.; Rosa, S. C. De; Migueles, S. A.; Abraham, J.; Lederman, M. M.; Benito, J. M.; Goepfert, P. A.; Connors, M.; Roederer, M.; Koup, R. A. HIV Nonprogressors Preferentially Maintain Highly Functional. *Bloodjournal* **2006**, *107* (12), 4781–4790.

- (359) Martinez, J. S.; Keller III, T. C. S.; Schlenoff, J. B. Cytotoxicity of Free versus Multilayered Polyelectrolytes. *Biomacromolecules* **2012**, *12* (11), 4063–4070.
- (360) Chen, H.; Li, P.; Yin, Y.; Cai, X.; Huang, Z.; Chen, J.; Dong, L.; Zhang, J. The Promotion of Type 1 T Helper Cell Responses to Cationic Polymers in Vivo via Toll-like Receptor-4 Mediated IL-12 Secretion. *Biomaterials* **2010**, *31* (32), 8172–8180.
- (361) Morgan; D. A. Ruscetti, F. W. Gallo, R. Selective in Vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows. *Science* **1976**, *193* (4257), 1007–1008.
- (362) McElhaney, J. E.; Meneilly, G. S.; Beattie, B. L.; Helgason, C. D.; Lee, S. F.; Devine, R. D. O.; Bleackley, R. C. The Effect of Influenza Vaccination on IL2 Production in Healthy Elderly: Implications for Current Vaccination Practices. *Journals Gerontol.* **1992**, *47* (1), 4–9.
- (363) Strutt, T.; McKinstry, K.; Swain, S. IL-2 Produced by Memory CD4 T Cells Synergizes with Influenza A Virus to Amplify Detrimental Lung Inflammation (IRC10P.404). *J. Immunol.* **2015**, *194* (1 Supplement), 196.2-196.2.
- (364) Ye, C.; Brand, D.; Zheng, S. G. Targeting IL-2: An Unexpected Effect in Treating Immunological Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3* (1), 1–10.
- (365) McKinstry, K. K.; Alam, F.; Flores-Malavet, V.; Nagy, M. Z.; Sell, S.; Cooper, A. M.; Swain, S. L.; Strutt, T. M. Memory CD4 T Cell-Derived IL-2 Synergizes with Viral Infection to Exacerbate Lung Inflammation. *PLoS Pathog.* **2019**, *15* (8), 1–24.
- (366) Musumeci, T.; Leonardi, A.; Bonaccorso, A.; Pignatello, R.; Puglisi, G. Tangential Flow Filtration Technique: An Overview on Nanomedicine Applications. *Pharm. Nanotechnol.* **2018**, *06*, 48–60.
- (367) Wilson, R.; Spiller, D. G.; Prior, I. A.; Bhatt, R.; Hutchinson, A. Magnetic Microspheres Encoded with Photoluminescent Quantum Dots for Multiplexed Detection. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17* (41), 4400–4406.
- (368) Lavalley, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules* **2002**, *35* (11), 4458–4465.
- (369) Jourdainne, L.; Arntz, Y.; Senger, B.; Debry, C.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Lavalley, P. Multiple Strata of Exponentially Growing Polyelectrolyte Multilayer Films. *Macromolecules* **2007**, *40* (2), 316–321.
- (370) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers Stephan. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8153–8160.
- (371) Liu, W.; Kong, Y.; Tu, P.; Lu, J.; Liu, C.; Liu, W.; Han, J.; Liu, J. Physical-Chemical Stability and In Vitro Digestibility of Hybrid Nanoparticles Based on the Layer-by-Layer Assembly of Lactoferrin and BSA on Liposomes. *Food Funct.* **2017**, *8* (4), 1688–1697.

- (372) Okada, T.; Uto, K.; Sasai, M.; Lee, C. M.; Ebara, M.; Aoyagi, T. Nano-Decoration of the Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using a Layer-by-Layer Assembly Technique. *Langmuir* **2013**, *29* (24), 7384–7392.
- (373) Singh, M.; Li, X. M.; Wang, H.; McGee, J. P.; Zamb, T.; Koff, W.; Wang, C. Y.; O'Hagan, D. T. Controlled Release Microparticles as a Single Dose Diphtheria Toxoid Vaccine Immunogenicity in Small Animal Models. *Vaccine* **1998**, *16* (4), 346–352.
- (374) Tobío, M.; Schwendeman, S. P.; Guo, Y.; McIver, J.; Langer, R.; Alonso, M. J. Improved Immunogenicity of a Core-Coated Tetanus Toxoid Delivery System. *Vaccine* **1999**, *18* (7–8), 618–622.
- (375) Louis, D. N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W. K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Kleihues, P.; Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131* (6), 803–820.
- (376) Lovely, M. P.; Stewart-Amidei, C.; Arzbaecher, J.; Bell, S.; Maher, M. E.; Maida, M.; Mogensen, K.; Nicolaseau, G. Clinical Practice Guideline Series Update: Care of the Adult Patient with a Brain Tumor. *J. Neurosci. Nurs.* **2014**, *46* (6), 1–48.
- (377) Nakada, M.; Kita, D.; Watanabe, T.; Hayashi, Y.; Teng, L.; Pyko, I. V.; Hamada, J. I. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers* **2011**, *3*, 3242–3278.
- (378) Dong, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics* **2018**, *8* (6), 1481–1493.
- (379) Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *3* (1), 987–996.
- (380) Stupp, R.; Hegi, M. E.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Taphoorn, M. J. B.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Allgeier, A.; Fischer, B.; Belanger, K.; Hau, P.; Brandes, A. A.; Gijtenbeek, J.; Marosi, C.; Vecht, C. J.; Mokhtari, K.; Wesseling, P.; Villa, S.; Eisenhauer, E.; et al. Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-Year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Oncology* **2009**, *10*, 459–466.
- (381) Kesari, S. Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. *Semin. Oncol.* **2011**, *38* (SUPPL. 4), S2–S10.
- (382) Zanders, E. D.; Svensson, F.; Bailey, D. S. Therapy for Glioblastoma: Is It Working? *Drug Discov. Today* **2019**, *24* (5), 1193–1201.
- (383) Jay S. Desgrosellier; Cherech, D. A. Integrins in Cancer: Biological Implications in Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (1), 1–34.
- (384) Klapholz, B.; Brown, N. H. Talin – the Master of Integrin Adhesions. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 2435–2446.
- (385) Goodsell, D. Integrin <https://pdb101.rcsb.org/motm/134> (accessed Jul 7, 2019).

- (386) Andrew D., E.; Jack W., S. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- (387) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. Selection in Vitro of an RNA Enzyme That Specifically Cleaves Single-Stranded DNA. *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- (388) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (389) Mercier, M. C.; Dontenwill, M.; Choulier, L. Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers. *Cancers* **2017**, *9* (69).
- (390) Fechter, P.; Cruz Da Silva, E.; Mercier, M. C.; Noulet, F.; Etienne-Seloum, N.; Guenot, D.; Lehmann, M.; Vauchelles, R.; Martin, S.; Lelong-Rebel, I.; Ray, A. M.; Seguin, C.; Dontenwill, M.; Choulier, L. RNA Aptamers Targeting Integrin $\alpha_5\beta_1$ as Probes for Cyto- and Histofluorescence in Glioblastoma. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *17*, 63–77.
- (391) Pastor, F. Aptamers: A New Technological Platform in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceuticals* **2016**, *9* (64), 1–13.
- (392) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202.
- (393) Pastor, F.; Berraondo, P.; Etxeberria, I.; Frederick, J.; Sahin, U.; Gilboa, E.; Melero, I. An RNA Toolbox for Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 751–767.
- (394) Yoon, S.; Rossi, J. J. Emerging Cancer-Specific Therapeutic Aptamers. *Curr. Opin. Oncol.* **2017**, *29*, 1–9.
- (395) Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D. Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; Entz-Werle, N.; Lehmann-Che, J.; Godet, J.; Martin, S.; Teisinger, J.; Dontenwill, M. Integrin $\alpha_5\beta_1$ Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the P53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72* (14), 3463–3470.
- (396) Shergalis, A.; Bankhead, A.; Luesakul, U.; Muangsin, N.; Neamati, N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70* (3), 412–445.
- (397) Kim, J.; Ahn, S. I.; Kim, Y. T. Nanotherapeutics Engineered to Cross the Blood-Brain Barrier for Advanced Drug Delivery to the Central Nervous System. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, *73*, 8–18.
- (398) U. S. National Library of Medicine. Trial record 1 of Phase of Nanoliposomal (NL CPT-11) in Patients With Recurrent High-Grade Gliomas <https://clinicaltrials.gov/ct2> (accessed Jul 7, 2019).
- (399) U. S. National Library of Medicine. An Open-label, Phase I/IIa, Dose Escalating Study of 2B3-101 in Patients With Solid Tumors and Brain Metastases or Recurrent Malignant Glioma. <https://clinicaltrials.gov/ct2> (accessed Jul 7, 2019).

- (400) U. S. National Library of Medicine. Phase II Study of Combined Temozolomide and SGT-53 for Treatment of Recurrent Glioblastoma <https://clinicaltrials.gov/ct2> (accessed Jul 7, 2019).
- (401) U. S. National Library of Medicine. Phase Study of Systemic Gene Therapy With in Patients With Solid Tumors <https://clinicaltrials.gov/ct2> (accessed Jul 7, 2019).
- (402) Socorro, E.; Christine, T.; Heurtault, B.; Schuber, F.; Frisch, B. Influence of Ligand Valency on the Targeting of Immature Human Dendritic Cells by Mannosylated Liposomes. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2385–2393.
- (403) Heurtault, B.; Gentine, P.; Thomann, J. S.; Baehr, C.; Frisch, B.; Pons, F. Design of a Liposomal Candidate Vaccine against *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Evaluation in Triggering Systemic and Lung Mucosal Immunity. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (2), 276–285.
- (404) Salomé, C.; Spanedda, M. V.; Hilbold, B.; Berner, E.; Heurtault, B.; Fournel, S.; Frisch, B.; Bourel-Bonnet, L. Smart Tools and Orthogonal Click-like Reactions onto Small Unilamellar Vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *188*, 27–36.
- (405) Wyatt Technology. Characterizing Fluorescent Macromolecules and Nanoparticles <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4812> (accessed Jul 9, 2019).

Recouvrement et modification de nanoparticules afin d'optimiser leurs propriétés physico-chimiques pour des applications pharmaceutiques

Résumé

La technique du recouvrement couche par couche (« Layer-by-Layer », LbL) s'est imposée en tant que méthode simple et efficace pour la modification et la fonctionnalisation de surfaces, notamment de nanoparticules. Nous avons exploré cette technique de recouvrement afin d'augmenter la résistance de liposomes conventionnels. Nous avons mis au point une procédure de formulation couche par couche en utilisant deux polyélectrolytes biodégradables et biocompatibles de charges opposées : la poly(L-lysine) (PLL) et l'acide poly(L-glutamique) (PGA). Cette procédure a permis de développer des formulations très homogènes de liposomes recouverts jusqu'à 6 couches de polymères (layersomes) et de liposomes recouverts de deux couches de polyélectrolytes réticulés. Le recouvrement a été caractérisé par diffusion dynamique de la lumière (DLS), par la technique de microbalance à cristal de quartz (QCM), ainsi que par transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET). Des études de stabilité des formulations à 4°C dans une solution tamponnée ont démontré que certaines structures sont stables sur 2 mois sans impacter leur capacité d'encapsulation. Les résultats suggèrent une meilleure résistance des liposomes recouverts en présence d'un détergent non-ionique (Triton™ X-100) ainsi qu'en présence de plasma. Dans un second temps, cette procédure a été adaptée au recouvrement de particules virales inactivées de type H5N1, dans le but de développer une forme « retard » du virus. Des particules virales recouvertes jusqu'à 4 couches de polymères ainsi que des particules recouvertes de 2 couches de polyélectrolytes réticulés ont été obtenues et caractérisées par DLS, par diffraction laser (LD) ainsi que par microscopies confocale et électronique à transmission. Des études de stabilité ont démontré que le recouvrement des virus conservés à 4°C est stable au moins 2 mois. Nous avons montré que le recouvrement n'a pas eu d'impact sur l'immunogénicité des particules virales et qu'un relargage différé du virus était probable. Ces travaux ont ainsi démontré l'adaptabilité de l'assemblage couche par couche de nanoparticules pour des applications pharmaceutiques variées.

Mots-clés : recouvrement couche par couche – LbL – vecteur – virus – liposomes – polyélectrolytes – vaccin

Résumé en anglais

The Layer-by-Layer (LbL) technique has emerged as a simple and effective method for surface modification and functionalization, especially of nanoparticles. We have explored this coating technique to increase the resistance of conventional liposomes. We have developed a layer-by-layer formulation procedure using two biodegradable and biocompatible polyelectrolytes with opposite charges: poly(L-lysine) (PLL) and poly(L-glutamic) acid (PGA). This procedure has allowed the development of very homogeneous formulations of liposomes coated with up to 6 layers of polymers (layersomes) and liposomes coated with two layers of cross-linked polyelectrolytes. The coating was characterized by dynamic light scattering (DLS), quartz crystal microbalance technique (QCM), and energy transfer between two fluorescent molecules (FRET). Studies on the stability of formulations at 4°C in a buffered solution have shown that some structures are stable over 2 months without impacting their encapsulation capacity. The results suggest a better resistance of the coated liposomes in the presence of a non-ionic detergent (Triton™ X-100) as well as in the presence of plasma. In a second step, this procedure was adapted to coat inactivated H5N1 virus particles in order to develop a "delayed" form of the virus. Viral particles coated with up to 4 polymer layers as well as particles coated with 2 layers of cross-linked polyelectrolytes were obtained and characterized by DLS, laser diffraction (LD) as well as confocal and transmission electron microscopy. Stability studies have shown that the coating of viruses stored at 4°C is stable for at least 2 months. We showed that the LbL assembly had no impact on the immunogenicity of the viral particles and that a delayed release of the virus was likely. This work has demonstrated the adaptability of layer by layer assembly of nanoparticles for various pharmaceutical applications.

Keywords: Layer-by-Layer coating - LbL - vector - virus - liposomes - polyelectrolytes - vaccine