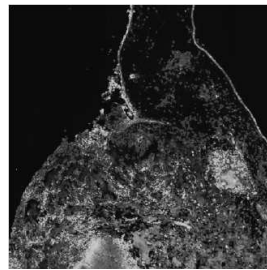
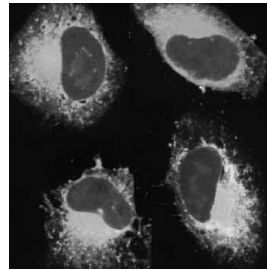
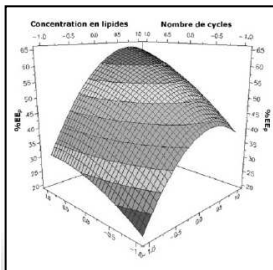




**Université de Liège**  
Faculté de Médecine  
Laboratoire de Technologie  
Pharmaceutique

## **Développement d'une nouvelle formulation pour l'administration d'un peptide antagoniste d'une oncoprotéine pour le traitement du cancer du sein**



**Ducat Emilie**  
Pharmacien

Promoteurs :  
Docteur G. Piel et Professeur B. Evrard

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en  
Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

**Année académique 2010-2011**

Copyright © E. Ducat, 2011



*Au terme de ce travail, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué à son aboutissement.*

*Je tiens particulièrement à remercier Madame le Professeur Brigitte Evrard-Germy pour son accueil dans le Laboratoire de Technologie Pharmaceutique, pour son soutien, ses conseils avisés et son aide tout au long de ce travail.*

*Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements à Madame le Docteur Géraldine Piel-Salpetier, Chef de travaux, pour m'avoir donné goût à la recherche, pour sa grande disponibilité et pour son appui scientifique. Qu'il me soit permis de lui témoigner de mon immense gratitude pour la gentillesse et le soutien constant dont elle a fait preuve à mon égard.*

*Je remercie très chaleureusement Monsieur le Professeur Luc Delattre, pour ses conseils judicieux lors de la réalisation et de la rédaction de ce travail ainsi que pour ses encouragements.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mesdames et Messieurs les Membres du Comité de Thèse, qui ont suivi et guidé la réalisation de mes travaux, ainsi qu'à Mesdames et Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*Ce travail n'aurait pu voir le jour sans la participation financière de la Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Energie du Ministère de la Région Wallonne, que je tiens dès lors à remercier vivement.*

*Le présent travail est le résultat d'une collaboration étroite avec des chercheurs et des techniciens de divers services. Ces collaborations ont été très enrichissantes tant sur le plan professionnel qu'humain, et c'est la raison pour laquelle il me tient à cœur de remercier en particulier :*

- *Madame le Professeur Marianne Fillet, pour m'avoir fait bénéficier de sa compétence en matière de spectrométrie de masse et de peptides et pour son aide très précieuse tout au long de ce travail ;*
- *Monsieur le Docteur Olivier Peulen, Professeur Adjoint, pour sa disponibilité constante, ses relectures attentives et son aide considérable lors de la réalisation de ce travail, et particulièrement pour le suivi des travaux d'études in vitro et in vivo des vecteurs ;*
- *Monsieur le Professeur René Rezsöhazi, pour ses encouragements animés et son aide lors de la rédaction de l'introduction sur le peptide Print3G;*
- *Monsieur le Professeur Gilles Ponchel, pour m'avoir si aimablement accueillie au sein du Laboratoire de Pharmacotechnie et de Biopharmacie de l'Université Paris-Sud et pour ses conseils très utiles lors des études ITC des vecteurs. Par la même occasion, je souhaiterais remercier très chaleureusement Madame Magali Noiray pour ses nombreux conseils scientifiques sur la technique ITC, sa grande disponibilité mais aussi pour ses qualités humaines qui ont rendu mon séjour à Paris si agréable ;*
- *Monsieur le Professeur Philippe Hubert et plus particulièrement Monsieur Frédéric Lecomte, Pharmacien et Assistant à l'Université de Liège, pour sa disponibilité et son aide lors du développement de la méthode analytique de dosage du peptide ;*
- *Monsieur le Professeur Vincent Castronovo et plus particulièrement Monsieur le Docteur Denis Mottet, Chercheur Qualifié auprès du FNRS, pour son aide lors de l'étude de toxicité des vecteurs et pour ses conseils scientifiques avisés ;*
- *Monsieur le Docteur Michaël Brion, qui m'a considérablement aidée lors de la réalisation du plan d'expériences ;*
- *Mademoiselle Julie Deprez, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances, de son temps, de ses conseils et de ses encouragements lors des études in vitro et in vivo des vecteurs, ainsi que pour sa bonne humeur ;*
- *Monsieur Gaël Cobraiville, pour son aide précieuse et sa disponibilité lors des expériences réalisées en spectrométrie de masse ;*

- *Monsieur Arnaud Gonzalez, doctorant dans le Laboratoire de Recherche sur les Métastases, pour son aide lors de l'étude in vivo des vecteurs et pour ses réveils matinaux afin de mener à bien ces expériences ;*
- *Monsieur Michel Deprez, chef technicien du département des préparations stériles, pour son aide précieuse et sa disponibilité lors de la réalisation des études de stérilisation des vecteurs ;*
- *Monsieur Vincent Hurllet, pour son aide et ses conseils avisés lors des études en chromatographie gazeuse ;*
- *Madame Laurence Collard, pour la réalisation consciencieuse des dernières expériences à un moment où je manquais de temps ;*
- *Monsieur Kevin Lantin, pour sa compétence en informatique qui me fait souvent défaut et pour son aide lors de la réalisation de la couverture de ce travail.*

*Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'aide inestimable et constante de tous les membres du Laboratoire de Technologie Pharmaceutique, pour leur écoute, leurs conseils avisés lors de nos « Tuesday Meeting », pour leurs encouragements, notamment lors de présentations « stressantes » et pour leur bonne humeur.*

*Je souhaiterais particulièrement remercier Mademoiselle Martine Cao, pour son soutien à toute épreuve, son temps, sa patience, son écoute et bien d'autres qualités encore qui m'ont aidées à aller de l'avant, dans les meilleurs moments mais aussi dans les plus difficiles, et ce tout au long de mes études.*

*Enfin, je voudrais dédier ce mémoire à mes parents, qui m'ont donné le goût d'apprendre et pour leur soutien, mais aussi à Jean-Claude, à Céline et bien sûr à Alain, pour l'immense patience dont il a fait preuve dans mes moments de doutes et pour son support inconditionnel.*

*Emilie Ducat*



<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
AVANT-PROPOS.....	5
I. LES SUBSTANCES ACTIVES PEPTIDIQUES.....	5
I. 1. Structure de base.....	6
I. 2. Stabilité.....	6
I. 2. 1. Instabilité chimique.....	7
I. 2. 2. Instabilité physique.....	8
I. 2. 3. Adsorption.....	9
I. 3. Les modes d'administration des peptides.....	10
I. 4. Le cas particulier du peptide Print3G.....	12
I. 4. 1. Le cancer du sein et ses traitements.....	13
I. 4. 2. Le mécanisme d'action du peptide Print3G.....	16
II. LES LIPOSOMES.....	18
II. 1. Structure et composition.....	18
II. 2. Les liposomes formulés pour l'administration intraveineuse d'une substance active anticancéreuse.....	23
II. 2. 1. Les stratégies pour favoriser l'accumulation dans la tumeur solide .....	23
II. 2. 2. Les stratégies pour favoriser la pénétration cellulaire.....	27
II. 2. 2. 1. Les mécanismes de pénétration cellulaire des liposomes.....	27
II. 2. 2. 2. Le cas particulier des liposomes pH-sensibles.....	29
II. 3. Les méthodes de préparation des liposomes.....	34
II. 4. Stabilité et conservation.....	36
III. REFERENCES.....	38
IV. TECHNIQUES UTILISÉES POUR SUIVRE LA PENETRATION CELLULAIRE DES LIPOSOMES (Publication).....	47
STUDY OF LIPOSOMES CELLULAR UPTAKE: FOCUS ON CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY TECHNIQUES.....	47
IV. 1. Abstract.....	48

## TABLE DES MATIÈRES

---

IV. 2. Introduction .....	49
IV. 3. Confocal laser scanning microscopy.....	50
IV. 3. 1. CLSM principle – gain over conventional fluorescence microscopy .....	50
IV. 3. 2. Labelling of liposomal drug delivery systems.....	53
IV. 3. 3. in vitro and in vivo studies using CLSM.....	57
IV. 4. Flow cytometry.....	59
IV. 4. 1. Flow cytometry principle.....	59
IV. 4. 2. Applications in cellular uptake studies .....	60
IV. 4. 3. Particular case of toxicity studies.....	62
IV. 5. Other .....	63
IV. 6. Conclusion .....	64
IV. 7. References.....	65
<b>OBJECTIFS ET PLAN DE THESE .....</b>	<b>73</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>77</b>
CHAPITRE 1: DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE LIPOSOMES PEGYLES ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G.....	79
I. 1. INTRODUCTION.....	80
I. 2. OPTIMISATION DE LA METHODE DE PRÉPARATION DE LIPOSOMES CLASSIQUES CONTENANT DU PEG <sub>2000</sub> ET ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G .....	82
I. 2. 1. Résumé des résultats de la publication.....	82
I. 2. 2. Publication.....	84
"THE EXPERIMENTAL DESIGN AS PRACTICAL APPROACH TO DEVELOP AND OPTIMIZE A FORMULATION OF PEPTIDE-LOADED LIPOSOMES" .....	84
I. 2. 2. 1. Abstract.....	85
I. 2. 2. 2. Introduction .....	86
I. 2. 2. 3. Material and methods.....	88
I. 2. 2. 4. Results and discussion.....	95



## TABLE DES MATIÈRES

---

I. 2. 2. 5. Conclusion.....	106
I. 2. 2. 6. Acknowledgments .....	107
I. 2. 2. 7. References .....	107
I. 3. FORMULATION DE LIPOSOMES CLASSIQUES CONTENANT DU PEG <sub>750</sub> .	111
I. 3. 1. Matériel et méthodes.....	111
I. 3. 2. Résultats .....	112
I. 3. 3. Conclusions.....	112
I. 4. ETUDE DE STABILITE DU PEPTIDE PRINT3G .....	113
I. 4. 1. Matériel et méthodes.....	113
I. 4. 2. Résultats .....	114
I. 4. 3. Conclusions.....	119
I. 5. ETUDE DE STABILITE DES LIPOSOMES PEGYLÉS.....	121
I. 5. 1. Matériel et méthodes.....	121
I. 5. 2. Résultats .....	122
I. 5. 3. Conclusions.....	123
I. 6. ETUDE DE CRYOPROTECTION DES LIPOSOMES PEGYLES .....	124
I. 6. 1. Matériel et méthodes.....	124
I. 6. 2. Résultats .....	125
I. 6. 3. Conclusions.....	129
I. 7. CONCLUSIONS DU CHAPITRE .....	130
CHAPITRE 2: ETUDE DE LA PENETRATION CELLULAIRE DE LIPOSOMES ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G .....	131
II. 1. INTRODUCTION .....	132
II. 2. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE FILTRATION STERILISANTE EN MILIEU ASEPTIQUE .....	133
II. 2. 1. Mise au point de la méthode de préparation de liposomes stériles .....	133
II. 2. 1. 1. Matériel et méthodes.....	133
II. 2. 1. 2. Résultats.....	134
II. 2. 2. Validation de la méthode de stérilisation.....	138
II. 2. 2. 1. Matériel et méthodes.....	138

## TABLE DES MATIÈRES

---

II. 2. 2. 2. Résultats .....	139
II. 2. 3. Conclusions .....	139
II. 3. EVALUATION DE LA PRESENCE DE CHLOROFORME RÉSIDUEL DANS LES FORMULATIONS .....	140
II. 3. 1. Matériel et méthodes .....	140
II. 3. 2. Résultats.....	141
II. 3. 3. Conclusions .....	144
II. 4. ETUDE PRELIMINAIRE DE LA PENETRATION CELLULAIRE DE LIPOSOMES PEGYLES PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE CONVENTIONNELLE .....	145
II. 4. 1. Matériel et méthodes .....	145
II. 4. 2. Résultats.....	146
II. 4. 3. Conclusions .....	149
II. 5. DEVENIR INTRACELLULAIRE D'UNE MOLECULE MODELE INSEREE DANS LA BICOUCHE LIPIDIQUE.....	151
II. 5. 1. Matériel et méthodes .....	151
II. 5. 2. Résultats.....	152
II. 5. 3. Conclusions .....	155
II. 6. ETUDE DE LA PENETRATION CELLULAIRE DES LIPOSOMES CLASSIQUES ET PH-SENSIBLES A BASE DE PEG <sub>750</sub> ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G	156
II. 6. 1. Résumé des résultats de la publication.....	156
II. 6. 2. Publication .....	160
"NUCLEAR DELIVERY OF A THERAPEUTIC PEPTIDE BY LONG CIRCULATING pH-SENSITIVE LIPOSOMES: BENEFITS OVER CLASSICAL VESICLES" .....	160
II. 6. 2. 1. Abstract.....	161
II. 6. 2. 2. Introduction .....	162
II. 6. 2. 3. Material and methods.....	165
II. 6. 2. 4. Results and discussion.....	173
II. 6. 2. 5. Conclusion .....	194
II. 6. 2. 6. Acknowledgements .....	194
II. 6. 2. 7. References.....	195
II. 7. CONCLUSIONS DU CHAPITRE.....	199

## TABLE DES MATIÈRES

---

CHAPITRE 3: ETUDES IN VIVO DE L'ACCUMULATION INTRATUMORALE DE LIPOSOMES PEGYLES .....	200
III. 1. INTRODUCTION .....	201
III. 2. RESUME DES RESULTATS DE LA PUBLICATION .....	202
III. 3. PROJET DE PUBLICATION .....	205
"ACCUMULATION OF PEGYLATED LIPOSOMES IN TUMOR-BEARING CHICKEN EMBRYO AND IN TUMOR-BEARING MICE AND ASSESSMENT OF LIPOSOME INTERACTION WITH BOVINE SERUM ALBUMIN" .....	205
III. 3. 1. Introduction .....	206
III. 3. 2. Material and methods .....	208
III. 3. 3. Results and discussion .....	212
III. 3. 4. Conclusion .....	225
III. 3. 5. References .....	226
III. 4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE .....	229
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>231</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>253</b>
<b>RESUMES .....</b>	<b>261</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>269</b>
I. RESULTATS RELATIFS A LA PUBLICATION SOUMISE "nuclear delivery of a therapeutic peptide by long circulating ph-sensitive liposomes : benefits over classical vesicles" .....	271
II. LETTRE D'ACCEPTATION DU DOSSIER SOUMIS A LA COMMISSION D'ETHIQUE ANIMALE – PARTIM POUSSIN .....	276
III. LETTRE D'ACCEPTATION DU DOSSIER SOUMIS A LA COMMISSION D'ETHIQUE ANIMALE – PARTIM SOURIS .....	277

## TABLE DES MATIÈRES

---

## ABREVIATIONS

<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>BODIPY</b>	Boron dipyrromethene difluoride
<b>BODIPY-CHOL</b>	23-(dipyrrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol
<b>BRCA</b>	Breast cancer
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CAM</b>	Chorioallantoic membrane
<b>CF</b>	6-carboxyfluorescein
<b>CHEMS</b>	Cholesteryl hemisuccinate
<b>CHOL</b>	Cholesterol
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>CLSM</b>	Confocal laser scanning microscopy
<b>DAD</b>	Diode array detector
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DOPE</b>	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<b>DOX</b>	Doxorubicine
<b>DSC</b>	Differential scanning calorimetry
<b>DSPE</b>	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<b>DSPE-PEG<sub>2000</sub></b>	N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol-2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<b>DSPE-PEG<sub>750</sub></b>	N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol-750)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<b>EE</b>	Encapsulation efficiency
<b>EE<sub>p</sub></b>	Encapsulation efficiency as a function of the quantity of peptide operated
<b>EE<sub>L</sub></b>	Encapsulation efficiency as a function of the quantity of lipids
<b>EPR</b>	Enhanced permeability and retention
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FCM</b>	Flow cytometry
<b>FID</b>	Flame ionization detector
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>FTM</b>	Fluid thioglycolate medium
<b>HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor-2
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography
<b>ICP-MS</b>	Inductively coupled plasma mass spectrometer
<b>IIs</b>	Immunoliposomes
<b>ITC</b>	Isothermal titration calorimetry
<b>LC</b>	Lipid concentration (liposomal excipients concentration)

## ABRÉVIATIONS

---

<b>LUV</b>	Large unilamellar vesicles
<b>m/z</b>	Rapport masse sur charge
<b>MLV</b>	Multilamellar vesicles
<b>MT</b>	Mixing time
<b>NBD</b>	7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl
<b>NBD-CHOL</b>	25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)methyl]amino]-27-norcholesterol
<b>NC</b>	Number of cycles
<b>PARP-1</b>	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PC</b>	Peptide concentration
<b>PCS</b>	Photon correlation spectroscopy
<b>PDI</b>	Polydispersity index
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamine
<b>PEG</b>	Polyethyleneglycol
<b>pI</b>	Point isoélectrique
<b>PI</b>	Propidium iodide
<b>PMT</b>	Photomultiplier tube detectors
<b>PS</b>	Phosphatidylserine
<b>QD-IIs</b>	Quantum dots immunoliposomes
<b>RES</b>	Reticuloendothelial system
<b>Rh</b>	Rhodamine
<b>S.D.</b>	Standard deviation
<b>SELDI-TOF</b>	Surface-enhanced laser desorption/ionisation - time of flight
<b>SERM</b>	Selective estrogen receptor modulators
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>NOD/SCID</b>	Non obese diabetic/severe combined immunodéficiente
<b>SPC</b>	Soybean phosphatidylcholine
<b>SSC</b>	Side scatter
<b>SSIIIs</b>	Sterically stabilized immunoliposomes
<b>SSL</b>	Sterically stabilized liposomes
<b>SUV</b>	Small unilamellar vesicles
<b>TFA</b>	Trifluoroacetic acid
<b>THS</b>	Traitement hormonal substitutif
<b>TSB</b>	Trypticase soy broth
<b>UV</b>	Ultraviolet

## **INTRODUCTION**





### **AVANT-PROPOS**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet « PEPSEIN » financé par la Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Énergie du Ministère de la Région Wallonne. L'objectif est de développer, d'étudier et de formuler des peptides antagonistes d'oncoprotéines impliquées dans le cancer du sein. Ce travail se focalise sur le développement d'une formulation pour l'administration d'un peptide sélectionné sur la base des travaux effectués par les autres partenaires du projet. L'introduction sera consacrée aux substances actives de nature peptidique et aux liposomes, vecteurs choisis pour l'administration intraveineuse des peptides.

### **I. LES SUBSTANCES ACTIVES PEPTIDIQUES**

Le développement et la formulation de substances actives peptidiques et protéiques connaît un intérêt croissant depuis ces dernières années. Enzymes, anticorps, polypeptides ou oligopeptides sont actuellement étudiés pour des applications très variées. En raison de leur mode d'action spécifique, de faibles doses sont généralement suffisantes pour obtenir une activité et peu d'effets indésirables sont constatés [1]. Pourtant, l'administration de peptides par voie intraveineuse présente de nombreuses difficultés, notamment leur élimination rapide du système vasculaire après filtration rénale, leur dégradation enzymatique (protéases), leur capture par le système réticulo-endothélial, leur accumulation dans les tissus non ciblés et leur difficulté à pénétrer dans le cytoplasme, voire dans le noyau des cellules. Pour observer un effet thérapeutique, il faut alors répéter les injections, ce qui s'accompagne de réactions indésirables. De plus, une série de caractéristiques intrinsèques telles que leur instabilité physique et chimique, ainsi que leur adsorption sur de nombreux matériaux en font des substances actives difficiles à manipuler et à formuler [2, 3]. Le but d'un vecteur élaboré pour l'administration d'une

substance active peptidique est donc d'en améliorer la stabilité tout en permettant sa libération au site d'action et de favoriser son accumulation dans le tissu ciblé.

### **I. 1. Structure de base**

Les peptides se définissent comme des assemblages de plusieurs acides aminés associés par des liaisons peptidiques covalentes. Une chaîne peptidique peut contenir entre 2 et 50 acides aminés. Une unité acide aminé au sein d'un peptide est appelée résidu. Le terme polypeptide fait référence à des chaînes contenant plus de 8 résidus, tandis que celui d'oligopeptide est utilisé pour désigner des chaînes en contenant moins de 8. Les polypeptides formés de plus de 50 acides aminés sont des protéines. Chaque peptide contient donc un groupement terminal libre aminé (extrémité N-terminale) ainsi qu'un groupement terminal libre acide carboxylique (extrémité C-terminale). Par convention, on lira toujours une séquence peptidique du groupement N-terminal au groupement C-terminal. La solubilité des peptides varie selon leur composition en acides aminés et est également dépendante du pH.

### **I. 2. Stabilité**

Lors du développement de substances actives peptidiques, il est impératif d'évaluer leur stabilité et de développer des méthodes de dosage permettant de suivre celle-ci au cours du temps. L'instabilité des peptides peut être chimique ou physique. Les méthodes conventionnelles de quantification des peptides les plus utilisées sont la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et l'électrophorèse capillaire couplée à un détecteur ultraviolet (UV). La spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée, couplée ou non à la CLHP, car elle offre des limites de détection plus faibles que les détecteurs UV [4]. Pour une conservation optimale, les substances actives peptidiques doivent être stockées sous forme lyophilisée, à -20°C voire à -80°C.

### **I. 2. 1. Instabilité chimique**

L'instabilité chimique des peptides est le résultat d'altérations ou de modifications des résidus acides aminés. Il existe différents types de réactions responsables de cette instabilité [5]:

- L'oxydation

C'est une des réactions majeures intervenant dans la dégradation des peptides, catalysée notamment par des métaux ou par la lumière. Plusieurs acides aminés y sont sensibles, notamment ceux contenant un cycle aromatique ou du soufre. Le produit d'oxydation qui en résulte possède une hydrophilie différente du produit parent. Un changement de masse peut être détecté en spectrométrie de masse. Un faible changement peut être détecté lors du gain d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène (par exemple, lors de l'oxydation de la méthionine) alors que des changements plus importants peuvent être observés lors de la formation de ponts disulfures (par exemple, lors de l'oxydation de la cystéine).

- L'hydrolyse

La liaison peptidique peut être sujette à l'hydrolyse. Celle-ci est favorisée lorsque l'un des deux résidus engagés dans la réaction est l'acide aspartique, surtout lorsqu'il est lié à une proline, dont le caractère basique important de l'azote déstabilise la liaison peptidique. L'hydrolyse peut survenir sur le lien de l'acide aspartique au niveau C- ou N-terminal. Les peptides contenant des résidus N-terminaux adjacents à une sérine ou à une thréonine y sont également plus sensibles. Cette instabilité peut être détectée au moyen de techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse ou la CLHP.

- La réduction

La réduction des ponts disulfures présents entre deux cystéines adjacentes provoque une cassure des liaisons intra- ou intermoléculaires, intervenant dans la stabilité de la structure tridimensionnelle du peptide. La modification

de cette structure tridimensionnelle peut affecter l'activité biologique du peptide [6].

- La conversion  
L'exposition des peptides à des substances basiques peut occasionner un phénomène de conversion de l'arginine en ornithine et/ou en citrulline.
- La désamination  
La désamination d'un groupement aminé d'une chaîne latérale ou de l'extrémité N-terminale d'un peptide peut survenir après hydrolyse ou après formation d'un imide cyclique. Cette réaction peut par exemple être quantifiée par mesure de l'ammoniac libéré.
- La racémisation  
La racémisation est la perte de l'intégrité chirale d'un acide aminé ou d'un peptide, c'est-à-dire lors de la conversion d'un énantiomère, le plus souvent la forme L, en un mélange racémique.

### **I. 2. 2. Instabilité physique**

L'instabilité physique des peptides et des protéines concerne les changements de structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Seuls les polypeptides peuvent présenter ce type de structure tridimensionnelle. Ils peuvent être sujets à la dénaturation, qui s'accompagne d'une perturbation des structures tertiaires et parfois secondaires. Leur composition chimique n'est alors pas altérée [6]. La température, le pH ou la présence de sels peuvent partiellement les dénaturer. Certaines substances telles que l'urée et le chlorhydrate de guanidine provoquent une dénaturation complète du peptide ou de la protéine. Cette dénaturation entraîne l'exposition de régions hydrophobes à un environnement hydrophile. Les protéines ou les polypeptides, partiellement ou totalement dénaturés, peuvent former des agrégats par des interactions hydrophobes [7]. La dénaturation des protéines et des peptides peut survenir lors de leur cryodessiccation, procédé souvent utilisé pour assurer leur conservation à long terme. Si l'élimination de l'eau permet de diminuer la mobilité de la protéine ou

du peptide et d'empêcher certains mécanismes de dégradation facilités par l'eau, ceci peut néanmoins occasionner un stress lié à la congélation et à la déshydratation [8]. Ce stress peut être diminué par l'addition d'excipients cryoprotecteurs pour maintenir la stabilité physique mais aussi chimique de la protéine ou du peptide [9].

Parmi les techniques permettant la détection de la dénaturation de protéines ou de peptides, des techniques d'analyse thermique peuvent être utilisées, telles que l'analyse thermique différentielle (DSC, Differential Scanning Calorimetry). On peut également citer l'électrophorèse employant un gel à gradient d'urée, permettant de suivre la transition du composé de sa forme native à sa forme dénaturée.

### **I. 2. 3. Adsorption**

L'adsorption des peptides sur différents types de surfaces lors de leur manipulation est souvent négligée, bien que très importante à déterminer. Ce phénomène est souvent attribué à des interactions non covalentes, électrostatiques ou hydrophobes, et dépendantes des conditions expérimentales. Par exemple, Pezeshki *et al.* ont étudié l'adsorption de peptides lors de l'étape d'élimination des solvants résiduels par évaporation-centrifugation et par lyophilisation. Ils ont montré qu'elle occasionnait une diminution de la concentration de 5 peptides modèles d'environ 10%. De plus, ils ont mis en avant l'importance du type de vial utilisé pour le stockage, l'adsorption sur le polypropylène étant notamment différente de celle sur le verre [10]. Hyenstrand *et al.* ont décrit l'adsorption de la microcystine sur les pipettes de polypropylène jetables [11]. A l'heure actuelle, il existe une large gamme de matériel de laboratoire « protein low binding » en polypropylène ultrapur.

### **I. 3. Les modes d'administration des peptides**

Plusieurs voies d'administration des substances actives peptidiques et protéiques sont actuellement étudiées. Leur masse moléculaire élevée, leur charge et leur instabilité sont responsables d'une mauvaise biodisponibilité ainsi que d'une faible capacité à traverser les membranes biologiques, et en font des molécules difficiles à formuler et à administrer, quelle que soit la voie choisie [2, 12].

La voie transdermale est une voie peu utilisée pour l'administration de peptides et de protéines en raison de la faible perméabilité de la peau à ce type de substances actives. Pourtant, elle présente un certain nombre d'avantages. La peau est le siège d'une activité enzymatique relativement faible, elle permet d'éviter la dégradation potentielle des substances actives dans le tractus gastro-intestinal ainsi que l'effet de premier passage hépatique et elle permet de développer des formes à libération prolongée [2]. Des stratégies pour augmenter sa perméabilité au moyen d'un faible courant électrique (iontophorèse, électroporation) ou d'ultrasons pourraient favoriser la pénétration de composés. Raiman *et al.* ont notamment étudié la pénétration de la nafaréline et de la gonadoréline par iontophorèse [13].

La voie pulmonaire est également intéressante pour l'administration systémique et non invasive de peptides et de protéines. Elle présente une grande surface d'échange, un épithélium alvéolaire relativement fin et une vascularisation importante qui en font une voie d'administration prometteuse. Sous forme de poudre sèche, de solution ou de suspension, les formulations peuvent être administrées par l'intermédiaire de différents types d'inhalateurs pour produire des particules de taille adéquate pour la déposition dans la zone alvéolaire. Selon les caractéristiques particulières du peptide ou de la protéine, leur biodisponibilité et leur stabilité dans les alvéoles pulmonaires varient fortement. En général, les doses requises pour observer un effet thérapeutique sont plus élevées pour la voie pulmonaire que pour la voie intraveineuse.

La voie nasale possède plusieurs avantages pour l'administration systémique de peptides. Son épithélium est très perméable aux molécules de taille inférieure à 1000 Da et l'absorption de la substance active est rapide. Elle fait également l'objet d'une recherche intensive pour administrer des substances actives via les neurones olfactifs jusqu'au tissu cérébral tout en évitant la barrière hémato-encéphalique. Dufes *et al.* ont montré la présence de peptide vasoactif intestinal intact dans le cerveau de rats, lorsqu'il est administré par voie nasale, alors que la voie intraveineuse ne le permettait pas [14]. Mais ce mode d'administration a également des désavantages, comme la grande quantité d'enzymes présentes dans la muqueuse nasale et dans les cellules épithéliales. De plus, l'administration chronique de substances actives peut détruire de manière irréversible la muqueuse olfactive. Par exemple, en Belgique, la desmopressine, un octapeptide aux propriétés antidiurétiques dérivé de la vasopressine est commercialisé sous forme de spray nasal (OCTOSTIM<sup>®</sup>, MINIRIN<sup>®</sup>).

La voie orale fait actuellement l'objet de nombreuses recherches pour l'administration de substances actives peptidiques car elle offre la meilleure compliance des patients, en évitant douleur et inconfort. Pourtant, il est difficile de développer des formulations capables de stabiliser le peptide ou la protéine jusqu'au tractus intestinal et de permettre son adhésion à la muqueuse et son absorption. L'encapsulation de ceux-ci dans des microparticules ou leur modification pour résister aux enzymes protéolytiques sont notamment en cours d'étude [15].

La voie parentérale est largement utilisée. La calcitonine existe par exemple sous forme de préparation pour administration sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse (MIACALCIC<sup>®</sup>, STEOCALCIN<sup>®</sup>). Plusieurs médicaments pour l'administration sous-cutanée prolongée de gonadoréline et de ses analogues (DECAPEPTYL<sup>®</sup>, LUCRIN DEPOT<sup>®</sup>, ZOLADEX<sup>®</sup>,...) ou de lutropine  $\alpha$  (LUVÉRIS<sup>®</sup>) sont commercialisés en Belgique. Lorsqu'une substance active peptidique ou

protéique est administrée seule par voie intraveineuse, des injections répétées et des doses importantes sont nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique. Une des approches développées pour augmenter le temps de demi-vie plasmatique de ces substances actives est de greffer des groupements polyéthylène glycol au peptide pour réduire sa clairance rénale et augmenter son temps de demi-vie plasmatique [16]. Le développement de nanoparticules pour l'administration de peptide permet d'obtenir une libération prolongée. Les nanoparticules possèdent une taille inférieure au micromètre [1]. Sabel *et al.* ont développé une formulation de particules d'acide polylactique (PLA) contenant de l'IL-12 (Interleukine-12), du TNF- $\alpha$  (Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ) et du GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Son administration par injection tumorale pour obtenir une libération prolongée a permis de diminuer la croissance de tumeurs cancéreuses du sein chez le rat [17]. L'augmentation du temps de demi-vie plasmatique pour l'administration de TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) en utilisant des nanoparticules pegylées a également été étudiée (TRAIL) [18]. Enfin, des formulations de peptides encapsulés dans des liposomes sont également en cours d'étude. Ils possèdent l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables, ce qui n'est pas toujours le cas des nanoparticules. Grâce à ce type de vecteur, il est possible de développer des stratégies pour augmenter la solubilité et la stabilité des substances actives peptidiques, prolonger leur temps de demi-vie plasmatique, permettre leur ciblage tumoral et leur pénétration cellulaire, voire nucléaire [19, 20].

### **I. 4. Le cas particulier du peptide Print3G**

Le peptide Print3G est un peptide antagoniste d'une oncoprotéine impliquée dans le cancer du sein. Il a été sélectionné lors d'un screening de différents peptides au cours du projet PESPEIN comme le peptide le plus prometteur et a donc été utilisé comme peptide modèle pour le développement galénique de vecteurs.



### **I. 4. 1. Le cancer du sein et ses traitements**

Dans la plupart des pays industrialisés, le cancer du sein est la première cause de mortalité chez la femme, touchant principalement les femmes de moins de 60 ans [21]. Cette maladie constitue donc un sérieux problème de santé publique et bénéficie depuis ces dernières années d'une attention particulière pour permettre son diagnostic précoce et pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le diagnostic du cancer du sein est fondé sur l'examen clinique, l'imagerie et la biopsie pour préciser l'anomalie et décrire son aspect ainsi que pour évaluer le caractère évolutif de la maladie. Pour estimer le stade du cancer nouvellement détecté, la détermination des récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone et des récepteurs HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor-2) est réalisée car ils sont à l'heure actuelle les seuls facteurs prédictifs de réponse au traitement. Quatre stratégies de traitement du cancer du sein peuvent être utilisées : le traitement chirurgical, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Elles sont très souvent employées en association. La chirurgie constitue la pierre angulaire du traitement, les trois autres stratégies peuvent être associées à celle-ci, visant principalement à diminuer le risque de récurrence et la propagation de métastases [22].

Le traitement chirurgical peut soit consister en une tumorectomie, une segmentectomie ou une mastectomie. Il permet également un diagnostic histologique précis et une analyse biologique de la tumeur avec recherche des récepteurs hormonaux, de telle manière à pouvoir orienter le traitement hormono- et/ou chimiothérapeutique. Enfin, l'exérèse et l'analyse des ganglions qui drainent la tumeur sont parfois pratiquées pour diminuer le risque de métastases. Dans le cas de cancers métastasés (métastases hépatiques ou osseuses), le traitement chirurgical peut également s'appliquer aux métastases diagnostiquées. Après l'intervention chirurgicale, une chirurgie oncoplastique

peut être réalisée, souvent pour les patientes ayant subi une mastectomie. Enfin, un troisième type de chirurgie peut être réalisée dans le cadre du cancer du sein, la chirurgie prophylactique. Elle s'applique donc à des femmes indemnes mais à haut facteur de risque de développement de la maladie, porteuses d'une mutation des gènes BCRA1 et BCRA2. Il s'agit alors de la pratique d'une mastectomie prophylactique, suivie d'une reconstitution mammaire immédiate [23].

La radiothérapie constitue la deuxième stratégie de traitement du cancer du sein. Elle diminue le risque de récurrence locale de plus de 60% après traitement chirurgical. Elle consiste le plus souvent en une irradiation de l'ensemble de la glande mammaire et peut également s'appliquer aux ganglions. La radiothérapie est toujours délicate à mettre en œuvre, principalement parce que ces régions se trouvent à proximité d'organes vitaux. En effet, selon la position de la tumeur, le volume pulmonaire et la partie antérieure du cœur peuvent être irradiés. Lorsque la radiothérapie est associée à une tumorectomie, on parle de traitement conservateur, qui, selon plusieurs études, se révèle aussi efficace qu'une mastectomie. Lorsqu'il existe un risque élevé, la radiothérapie peut être associée à une mastectomie. Dans tous les cas, une radiothérapie ne pourra être pratiquée en cas de récurrence, le risque de séquelles étant trop élevé [24].

L'hormonothérapie constitue le troisième volet du traitement du cancer du sein. Le tamoxifène est le traitement hormonal le plus utilisé pour traiter des tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux aux oestrogènes. Il fait partie de la famille des SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) et possède un effet antagoniste sur les récepteurs aux oestrogènes du sein. Par contre, il possède une activité agoniste sur d'autres organes comme l'endomètre, le système de la coagulation, les os et le foie. Sa large utilisation se justifie principalement par sa toxicité relativement faible lors d'une prise prolongée, le traitement durant en général 5 ans. Ce traitement est utilisé soit pour lutter contre la dissémination métastatique de manière précoce ou, dans certains cas, en prévention de

l'apparition du cancer. D'autres SERM peuvent être utilisés comme le torémifène ou le raloxifène, ce dernier étant principalement utilisé en prévention car il présente un risque moins élevé d'effets indésirables sévères tels que l'embolie, le cancer de l'endomètre et la cataracte. Malheureusement, des cas de résistance aux SERM ont été détectés. Une alternative est d'utiliser des antagonistes purs aux récepteurs aux oestrogènes, comme le fulvestrant, principalement utilisé pour le traitement de patientes ménopausées soignées pour un cancer métastatique exprimant les récepteurs aux oestrogènes.

Pour le traitement de patientes ménopausées, les inhibiteurs de l'aromatase sont souvent utilisés. En effet, ces patientes produisent des quantités importantes d'oestrogène par aromatisation des androgènes. Les inhibiteurs de l'aromatase, tels que l'exemestane ou l'anastrozole, suppriment cette activité en agissant respectivement par interaction avec le site de liaison de l'androgène à l'aromatase ou avec le coenzyme de l'aromatase [25, 26].

La chimiothérapie est également utilisée dans le traitement du cancer du sein. On parle soit de chimiothérapie néoadjuvante, soit de chimiothérapie adjuvante, selon qu'elle intervienne respectivement avant ou après la chirurgie et la radiothérapie. Le but d'une chimiothérapie néoadjuvante est de permettre une chirurgie conservatrice plus fréquente, de tester la chimiosensibilité tumorale *in vivo* et d'espérer contrôler de manière précoce la dissémination métastatique de la tumeur [27]. Les agents alkylants, les antimétabolites, les agents intercalants, les taxanes et les anti-topoisomérase II sont couramment utilisés en chimiothérapie du cancer du sein. Souvent, ces agents sont utilisés en association, pour une efficacité majorée, mais sont aussi accompagnés d'une toxicité élevée. Le statut HER2 de la patiente est déterminant pour le choix de la chimiothérapie. En effet, certaines tumeurs expriment des récepteurs HER2, jouant un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules tumorales. Ce type de tumeur est particulièrement agressive car peu différenciée, résistante et invasive, notamment par métastases cérébrales. Dans ce cas, la chimiothérapie classique est associée à l'administration de

trastuzumab, un anticorps monoclonal murin humanisé réagissant contre le domaine extracellulaire des récepteurs HER2 [28]. D'autres anticorps monoclonaux de la même famille que le trastuzumab peuvent être utilisés. En général, le traitement dure un an et peut diminuer le taux de rechute de 50% chez les patientes atteintes de tumeurs HER2 positives.

Les différents traitements utilisés pour soigner le cancer du sein varient selon le stade et la nature du cancer détecté. Ils sont souvent associés à divers traumatismes et effets indésirables, ces derniers étant liés à un manque de spécificité. De nombreuses situations de résistances au traitement apparaissent également. L'approche du projet PEPSEIN est de développer des peptides inhibiteurs d'oncoprotéines pour espérer une meilleure tolérance et une meilleure efficacité des traitements.

### **I. 4. 2. Le mécanisme d'action du peptide Print3G**

Pour mieux comprendre la physiologie des cellules tumorales mammaires, l'étude de cascades d'évènements moléculaires qui conduisent à la prolifération cellulaire et à l'oncogenèse peut permettre d'identifier certains facteurs déclenchant la pathologie ou associés à son agressivité. Hoxa1 est un facteur de transcription dont la dérégulation est suffisante pour provoquer la pathologie. De plus, cette dérégulation est associée au caractère infiltrant et métastatique du cancer. Zhang *et al.* ont montré que l'expression forcée d'Hoxa1 dans des cellules épithéliales humaines était suffisante pour déclencher la transformation oncogène. De plus, cette expression forcée dans les cellules issues d'un carcinome mammaire augmentait considérablement leur prolifération en agar mou [29]. Comme Hoxa1 n'a pas de fonction avérée dans la physiologie normale, toute drogue conçue pour invalider spécifiquement son action serait dépourvue d'effet indésirable. L'expression du gène codant pour Hoxa1 est modulée par l'hormone de croissance et son niveau d'expression est associé à l'agressivité du cancer mammaire [30].

Il a également été démontré que l'activité d'Hoxa1 était sévèrement voire totalement conditionnée par son aptitude à interagir avec les facteurs de transcription Pbx [31]. Morgan *et al.* ont montré que l'utilisation d'un antagoniste de l'interaction entre Hox et Pbx permettait de bloquer la croissance de cellules de mélanome malin [32]. Sur la base de la structure tridimensionnelle de l'interface entre Hoxa1 et Pbx, des peptides inhibiteurs de ces deux facteurs de transcription ont été conçus dans le cadre du projet PEPSEIN pour empêcher leur interaction.

Le peptide Print3G (M.M.=3000) est un peptide antagoniste d'Hoxa1 constitué de 25 acides aminés naturels et soluble dans l'eau. Dérivé de Pbx, il pourrait interagir avec l'hexapeptide, interface d'interaction de Hoxa1 avec Pbx, et ainsi invalider l'activité de Hoxa1 (Figure 1). Il a été prouvé par l'équipe du Professeur Rezsohazy qu'il diminuait cette interaction moléculaire *in vitro*.

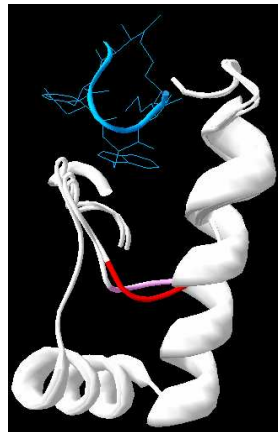


Figure 1. Modèle du peptide Print3G et son interaction avec l'hexapeptide (en bleu).

## **II. LES LIPOSOMES**

Les liposomes sont des vecteurs employés pour l'encapsulation de substances actives de taille et de nature très variables. Ils peuvent être utilisés par voie intraveineuse mais également par voie cutanée [33], orale [34, 35], oculaire [36] et pulmonaire [37]. En raison de cette large diversité de voies d'administration et du type de matériel encapsulé, il existe un grand nombre de formulations liposomales développées en recherche pharmaceutique. Seuls les liposomes développés pour une administration intraveineuse seront donc évoqués dans ce chapitre. Notons également que les liposomes sont de plus en plus utilisés comme modèles membranaires, par exemple pour étudier l'interaction entre une substance active et une membrane biologique [38]. L'utilisation d'un vecteur pour l'administration intraveineuse de peptides est le plus souvent nécessaire afin d'augmenter leur demi-vie plasmatique, de diminuer leurs effets indésirables et de favoriser leur libération au site d'action. A cette fin, les nanoparticules ou les liposomes peuvent être utilisés comme vecteurs [1, 39].

### **II. 1. Structure et composition**

Les liposomes (Figure 2C) sont des structures sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques (Figure 2B) délimitant un compartiment aqueux. Ces vésicules sont capables d'encapsuler des molécules hydrophiles dans leur cavité aqueuse, des molécules lipophiles dans leur bicouche phospholipidique mais aussi des molécules amphiphiles. On parle de liposomes unilamellaires lorsqu'ils sont composés d'une seule bicouche lipidique, appelés selon leur taille SUV (Small Unilamellar Vesicles) ou LUV (Large Unilamellar Vesicles) alors que les liposomes multilamellaires (MLV, Multi Lamellar Vesicles) sont composés de plusieurs bicouches (Figure 3) [40]. Leur diamètre peut varier entre 0,05 et 5  $\mu\text{m}$  [41]. Ils sont composés de lipides synthétiques ou naturels mais peuvent également contenir d'autres types de molécules (cholestérol, tensioactifs,

phospholipides conjugués à des polymères ou à des peptides,...). L'addition de ces molécules leur confère des propriétés particulières.

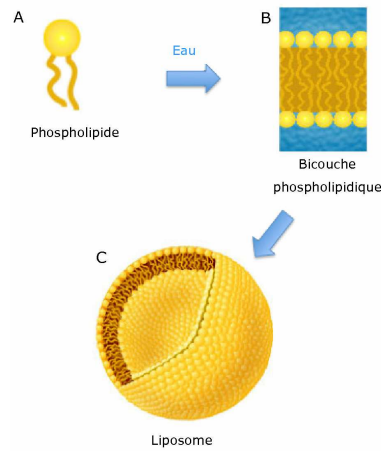


Figure 2. Structure d'un liposome. (A) Schéma d'un phospholipide, (B) d'une bicouche lipidique, (C) d'un liposome unilamellaire.

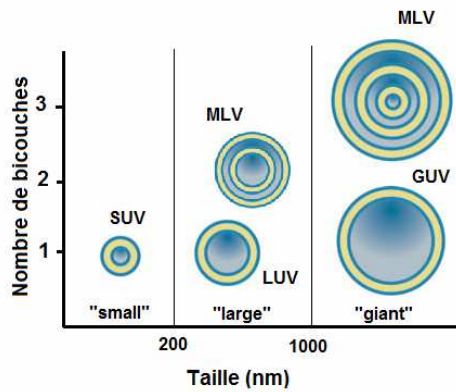


Figure 3. Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille.

Les constituants principaux des liposomes sont les phospholipides (Figure 2A). Ces molécules lipidiques amphiphiles sont formées de glycérol-3-phosphate estérifié en position R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> par des acides gras et sur leur groupe phosphoryle

par un groupement X (Figure 4). Cette composition confère aux phospholipides une structure amphiphile permettant la formation de la bicouche : les têtes polaires hydrophiles sont en contact avec la phase aqueuse et les queues aliphatiques non polaires sont orientées vers l'intérieur de la bicouche (Figure 2B).

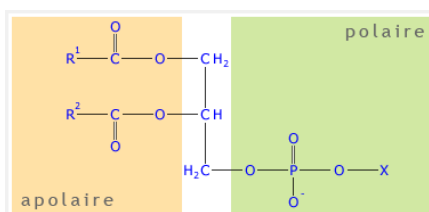


Figure 4. Structure chimique d'un phospholipide.

Par exemple, la phosphatidylcholine de soja (SPC) est un mélange de phospholipides qui possèdent tous un groupement X constitué d'une choline, mais qui diffèrent selon le type d'acide gras R et R' (Figure 5). Le groupement phosphate étant chargé négativement et la choline chargée positivement, la phosphatidylcholine est une molécule zwitterionique.

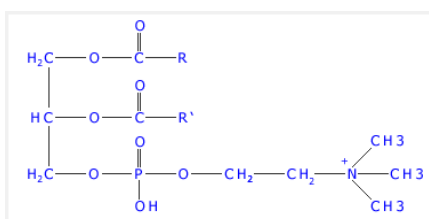


Figure 5. Structure chimique d'une phosphatidylcholine.

Les liposomes destinés à l'administration de substances actives par voie intraveineuse possèdent une composition particulière qui doit leur permettre de présenter une stabilité suffisante dans le sang. En effet, le diamètre, la charge et la composition des liposomes influencent drastiquement leur stabilité sanguine.



Les liposomes dits de « *première génération* » possèdent le désavantage majeur d'être rapidement éliminés de la circulation sanguine, s'accumulant dans les cellules de Kupffer du foie et dans les macrophages de la rate. Initialement, l'administration d'un excès de liposomes vides, d'une dispersion colloïdale ou de dextrane sulfate avait été proposée pour diminuer cet effet en espérant « saturer » l'adhésion de protéines plasmatiques [42]. Ensuite, l'addition de cholestérol dans la membrane liposomale a permis d'augmenter significativement le temps de rémanence vasculaire de ces vésicules [43, 44]. En effet, Semple *et al.* ont démontré que l'addition de 30 à 50% mol de cholestérol augmentait le temps de demi-vie plasmatique des liposomes de 5 heures [45]. Le cholestérol réduit la perméabilité de la bicouche lipidique aux molécules hydrophiles et diminue la fluidité de la membrane liposomale, contribuant donc à la stabiliser en diminuant l'interaction des protéines plasmatiques à la surface du liposome. Il a également été proposé qu'il diminuait les interactions hydrophobes entre la surface du liposome et les opsonines [45].

Les liposomes dits de « *seconde génération* », à rémanence vasculaire prolongée, présentent une surface modifiée par l'ajout de polymères synthétiques hydrophiles tels que les polyéthylèneglycols (PEG) (Figure 6). Ces polymères hydrophiles flexibles, inertes et biocompatibles sont greffés à un phospholipide qui s'insère dans la bicouche lipidique. Le PEG se dispose donc à la surface des liposomes. Plusieurs mécanismes permettraient aux PEG de prolonger la rémanence vasculaire du liposome. Ils masqueraient la charge en surface de la particule, diminueraient l'agrégation des liposomes par formation d'une barrière stérique autour de la particule et ils réduiraient l'adsorption de protéines plasmatiques à leur surface, notamment par répulsion stérique et dissimulation des régions hydrophobes présentes à la surface du liposome [46, 47]. Cette diminution de l'adhésion de protéines minimiserait alors la reconnaissance des liposomes injectés par le système réticulo-endothélial [48]. Price *et al.* ont montré que l'adhésion de fibrinogène à un liposome pegylé diminuait d'autant plus que la masse moléculaire du PEG utilisé augmentait.

Pourtant, ils n'ont pas pu démontrer de relation directe entre la clairance plasmatique et l'adhésion des protéines plasmatiques à la surface des liposomes. La masse moléculaire du PEG et la quantité incorporée dans la membrane liposomale auraient une influence directe sur cette capacité d'augmentation de la rémanence vasculaire. La densité de PEG à la surface du liposome et sa conformation seraient directement liées à sa capacité à stabiliser le liposome dans la circulation sanguine [49]. Le PEG<sub>2000</sub> est le plus souvent utilisé pour stabiliser les liposomes destinés à l'administration intraveineuse. Dos Santos *et al.* ont étudié la stabilité sanguine de liposomes contenant du PEG de masse moléculaire variant de 350 à 2000. Ils ont démontré qu'une concentration de minimum 2% mol de PEG<sub>2000</sub> et 5% de PEG<sub>750</sub> était nécessaire pour prolonger significativement le temps de demi-vie plasmatique [48]. Ils ont également montré qu'un pourcentage de recouvrement égal à 100% n'était pas nécessaire pour observer une rémanence vasculaire optimale du liposome. Levchenko *et al.* ont montré que la rémanence vasculaire de liposomes contenant un lipide chargé négativement ou positivement était fortement augmentée par l'addition de PEG à la surface du liposome. Par contre, cette protection n'était pas plus faible lorsqu'un PEG<sub>750</sub> était utilisé par rapport à un PEG<sub>5000</sub> [50]. La masse moléculaire du PEG ne serait donc pas le facteur déterminant pour la protection de la particule.

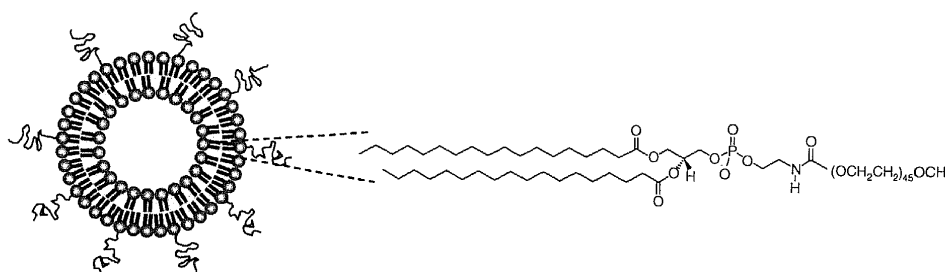


Figure 6. Illustration d'un liposome pegylé et de la structure moléculaire d'un PEG<sub>2000</sub> greffé à un phospholipide [51].

Il existe également des liposomes dits de « 3<sup>ème</sup> génération », qui présentent à leur surface des ligands de ciblages spécifiques greffés aux groupements PEG ou aux phospholipides. Dans le cadre d'un traitement anticancéreux, ceux-ci peuvent être constitués par exemple d'anticorps monoclonaux, tels que les anti-HER2, ciblant les tumeurs surexprimant les récepteurs HER2 ; ou de folate, son récepteur étant souvent surexprimé à la surface des cellules tumorales. Ce ciblage spécifique permettrait l'accumulation des liposomes au sein de la tumeur solide et une interaction spécifique du liposome avec la cellule cible [47]. Pourtant, ce ciblage tumoral est rendu très compliqué par la diversité des cellules tumorales et leur forte hétérogénéité au sein d'un même type tumoral [52].

## **II. 2. Les liposomes formulés pour l'administration intraveineuse d'une substance active anticancéreuse**

### **II. 2.1. Les stratégies pour favoriser l'accumulation dans la tumeur solide**

La connaissance de la physiologie particulière des tumeurs solides, en termes de structure et de fonction, et de ses différences par rapport à un tissu sain est essentielle au développement de stratégies thérapeutiques. Lors de l'administration d'un médicament anticancéreux, le but est d'optimiser son accumulation au sein de la tumeur solide, tout en minimisant sa pénétration dans les tissus sains, pour diminuer l'incidence d'effets indésirables [52, 53]. Cependant, entre l'administration et le site d'action d'une substance active, différentes barrières se dressent et influencent sa capacité à atteindre sa cible tumorale. Parmi ces barrières, nous pouvons citer [53, 54] :

- le volume vasculaire, l'organisation des vaisseaux sanguins tumoraux et le flux sanguin irrégulier. Ces caractéristiques du réseau vasculaire tumoral en font une structure unique et très différente de celle d'un tissu sain ;

- l'hétérogénéité de la perméabilité des vaisseaux sanguins ;
- la pression interstitielle plus élevée au centre de la tumeur qu'en périphérie, rendant difficile l'accès des macromolécules au centre de la tumeur.

Les barrières à surmonter pour la vectorisation de substances actives varient en fonction du type de cancer à traiter, de sa localisation et de son caractère invasif. Pour franchir ces barrières, des stratégies permettant de diminuer leurs fonctions physiologiques et/ou permettant d'adapter des caractéristiques intrinsèques du vecteur doivent être développées [55].

La structure des vaisseaux sanguins tumoraux diffère de celle des tissus sains. Dans un tissu sain, l'endothélium est une barrière structurelle qui sépare un compartiment intravasculaire de l'environnement interstitiel. On distingue différents types d'endothéliums, le plus abondant dans le corps humain étant l'endothélium *continu*, caractérisé par la présence de jonctions serrées, que l'on retrouve notamment dans les vaisseaux sanguins alimentant le cœur ou les muscles squelettiques. L'endothélium dit *fenestré* est caractérisé par la présence de fenêtres dans l'endothélium, pouvant atteindre 80 nm de diamètre. Ce type d'endothélium est présent au niveau de vaisseaux sanguins d'organes excréteur ou sécrétant des fluides biologiques (muqueuse gastro-intestinale, reins,...). Quant à l'endothélium *discontinu*, particulièrement présent dans le foie, la rate et la moelle osseuse, il présente de larges fenêtres de tailles comprises entre 100 et 150 nm de diamètre variant en réponses à différents modulateurs. Dans un tissu tumoral, le réseau vasculaire est désorganisé et la taille des fenêtres de l'endothélium peut être significativement augmentée, en général entre 400 et 600 nm, et peut parfois atteindre 4  $\mu\text{m}$  de diamètre dans certains types de tumeurs. De plus, il présente une plus grande perméabilité aux macromolécules et un taux plus élevé de prolifération des cellules endothéliales, jusqu'à 40 fois plus important que dans un tissu sain. Le développement d'une tumeur solide et sa croissance sont directement liés à sa capacité à développer de nouveaux

vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire pré-existant. Ce phénomène, appelé angiogenèse, n'apparaît dans les tissus sains que lors de l'embryogenèse et lors de la cicatrisation. Il permet l'apport en nutriments et en oxygène nécessaires à la prolifération tumorale. Enfin, la matrice interstitielle d'un tissu tumoral, composée de multiples protéines impliquées dans la communication et l'interaction des cellules entre elles, diffère drastiquement de celle présente dans un tissu sain [55].

Un phénomène particulier, décrit par Maeda [56] exploite les différences qui existent entre le réseau vasculaire sain et tumoral. Cet effet est donc applicable à toutes les tumeurs solides, excepté aux tumeurs hypovasculaires telles que celle du pancréas ou de la prostate. On parle d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) qui permet d'observer une accumulation passive de macromolécules préférentiellement dans le tissu tumoral [55].

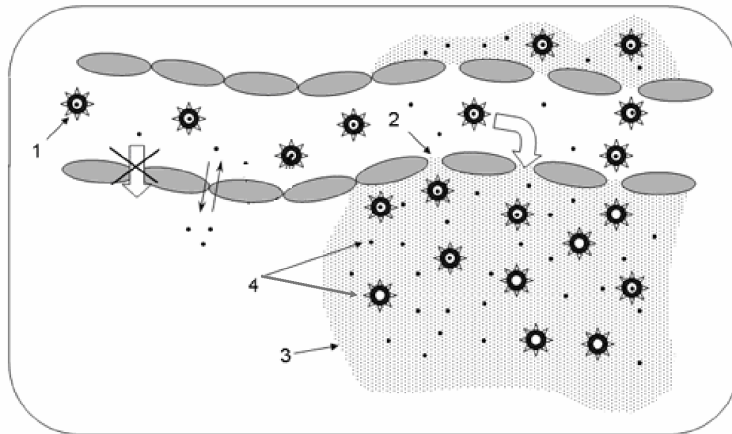


Figure 7. Illustration de l'effet EPR. Les vecteurs à rémanence vasculaire prolongée (1) peuvent traverser les vaisseaux sanguins tumoraux à larges fenestrations (2) et s'accumuler dans le tissu interstitiel (3) et enfin libérer la substance active (4), permettant son accumulation passive dans le tissu tumoral [47].

L'effet EPR est basé sur différentes anomalies physiologiques et anatomiques du tissu tumoral, telles que :

- l'angiogenèse active observée dans le tissu tumoral
- le réseau vasculaire dense
- la faible abondance voire l'absence de muscle lisse
- la désorganisation du réseau vasculaire, irrégulier et présentant de larges fenêtrés
- l'irrégularité du flux sanguin
- la clairance lymphatique faible qui favorise la rétention des macromolécules dans le tissu interstitiel
- le faible retour veineux qui défavorise l'élimination des macromolécules du tissu interstitiel

Ce phénomène peut être appliqué aux liposomes pegylés pour permettre leur accumulation tumorale par ciblage passif [3, 57]. Trop grands pour s'accumuler dans les organes dont l'endothélium est discontinu, ils peuvent s'accumuler passivement dans la tumeur solide grâce à l'effet EPR (Figure 7).

L'effet EPR pourrait être augmenté par l'utilisation de nitroglycérine ou d'angiotensine-II. Seki *et al.* ont montré que l'application topique de nitroglycérine sur la peau couvrant la tumeur augmentait l'efficacité de macromolécules anticancéreuses. Ils l'expliquent par le fait que l'oxyde nitrique généré augmente le flux vasculaire tumoral et la perméabilité de l'endothélium [58]. Li *et al.* ont décrit l'utilisation d'angiotensine-II, injectée par voie intraveineuse, pour augmenter l'accumulation de macromolécules dans la tumeur solide par rapport aux tissus sains [59]. En effet, l'angiotensine-II augmenterait le flux sanguin tumoral par manque d'autorégulation de celui-ci par le muscle lisse vasculaire. Dans les tissus sains, cette régulation est efficace et l'extravasation de macromolécules reste faible [60].

## **II. 2. 2. Les stratégies pour favoriser la pénétration cellulaire**

### *II. 2. 2. 1. Les mécanismes de pénétration cellulaire des liposomes*

Le développement de stratégies permettant d'augmenter la capacité des liposomes à délivrer des substances actives jusqu'au site d'action est le second élément clé du succès de la vectorisation d'une substance active anticancéreuse. L'interaction des liposomes avec les cellules cibles est un phénomène complexe. Une fois les liposomes parvenus au tissu cible, il faut que leur contenu pénètre dans la cellule, et ce sans subir de dégradation extra- ou intracellulaire. Quatre mécanismes d'interaction entre les liposomes et les cellules peuvent être décrits et sont illustrés à la figure 8 [61] :

- A. La pénétration du contenu liposomal dans la cellule par diffusion active ou passive, après avoir été relargué du liposome ;
- B. Le transfert des composés lipophiles de la bicouche du liposome dans le cytoplasme de la cellule par diffusion passive ;
- C. L'endocytose du liposome par invagination de la membrane cellulaire suivie de la dégradation de la bicouche au sein de l'endosome ;
- D. La fusion de la bicouche du liposome avec la membrane cytoplasmique.

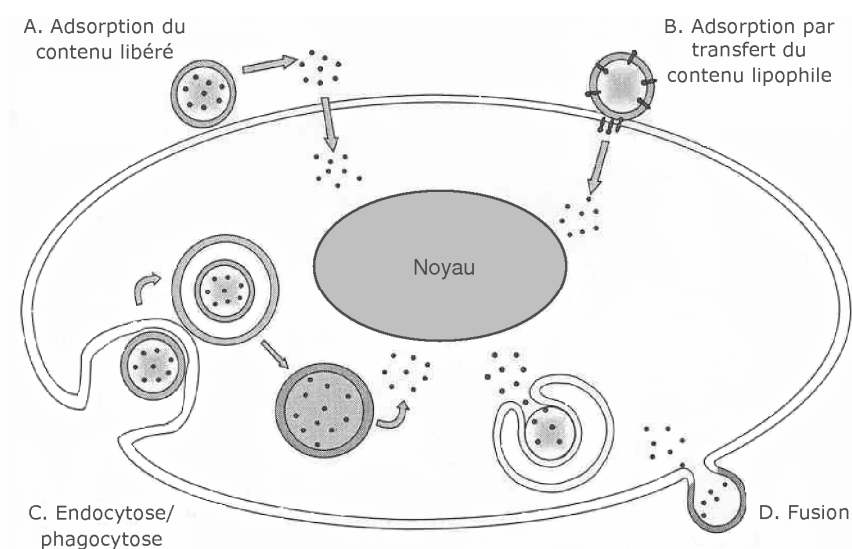


Figure 8. Mécanismes d'interaction entre le liposome et la cellule [61].

Le type de mécanisme qui survient lors de l'interaction du liposome avec la cellule dépend fortement de la composition, de la taille, de la charge et de la présence ou non d'un ligand de ciblage spécifique. L'endocytose est favorisée lorsque le liposome présente des ligands de ciblage spécifique à sa surface alors que la fusion ne s'observe que pour certains types de phospholipides tels que les liposomes composés uniquement de phosphatidylsérine [62].

La présence de PEG à la surface des liposomes peut diminuer cette capacité d'interaction. En effet, par formation d'une barrière stérique autour du liposome, le PEG peut empêcher l'interaction des phospholipides avec la membrane cytoplasmique et donc diminuer la pénétration cellulaire de la vésicule [63-65]. La présence de cholestérol pourrait également être à l'origine d'une diminution de la capacité d'interaction cellulaire des liposomes [66]. L'ajout de ligands de ciblage spécifique, d'autres types de polymères ou de lipides pegylés clivables [67-70] sont étudiés pour permettre de contourner ce problème.



### *II. 2. 2. 2. Le cas particulier des liposomes pH-sensibles*

Les substances actives anticancéreuses qui présentent une faible capacité de pénétration au sein de la cellule tumorale doivent forcément pénétrer par l'intermédiaire des liposomes puis être libérés au niveau du cytoplasme. De ce fait, il faudra permettre leur fuite hors de l'endosome avant sa transformation en lysosome. Ce dernier présente un pH acide et contient des enzymes de dégradation (hydrolases et peptidases) qui pourraient déstabiliser la substance active et diminuer son activité biologique [71]. Le développement de liposomes pH-sensibles pour permettre cette fuite pourrait significativement augmenter l'efficacité de composés anticancéreux. L'inclusion de lipides aux propriétés fusogéniques permettrait à ceux-ci de subir une transition de phase à pH acide. Les liposomes pH-sensibles sont donc stables à pH physiologique mais seraient capables d'interagir, de fusionner et/ou de déstabiliser les bicouches lipidiques, cytoplasmiques ou endosomales, lorsque le pH diminue [72]. Au départ, la capacité de libération de la substance active de ces liposomes, consécutive à l'acidification de leur environnement, devait être exploitée pour répondre au pH plus acide du tissu tumoral. Cependant, les sites tumoraux présentant une acidité significative sont souvent les plus éloignés du réseau vasculaire et leur pH ne descend que rarement en dessous de 6,5. Par contre, endosomes et lysosomes peuvent facilement atteindre des valeurs inférieures à 5. Le développement de liposomes sensibles à cette fenêtre de pH est donc plus aisément réalisable [71].

Les liposomes pH-sensibles sont donc des liposomes dont la capacité de fusion membranaire est modulée par une variation de pH grâce à un changement structurel de l'organisation de la bicouche. A pH physiologique, la bicouche des liposomes est organisée en phase lamellaire (Figure 9). Lorsque le pH diminue, une charge peut apparaître ou disparaître et changer l'hydratation de la zone ainsi que le volume qu'elle occupe. Le lipide change de forme et ce changement influence l'enchevêtrement des phospholipides et la structure de la bicouche qui

passera donc d'une phase lamellaire à une phase hexagonale, c'est-à-dire à une organisation lipidique où l'espacement de la partie lipophile est plus important, occasionnant une déstabilisation de la bicouche. L'apparition d'une phase non lamellaire, plus prompte à fusionner avec d'autres membranes, permettrait la libération de la substance active dans le cytoplasme tout en évitant sa dégradation [73].

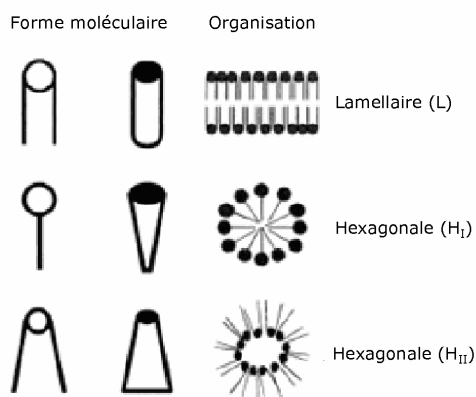


Figure 9. Illustration de l'organisation de lipides en phases lamellaire (L) et hexagonales (H<sub>I</sub> et H<sub>II</sub>).

Différents types de lipides peuvent être associés pour constituer une bicouche lipidique sensible au pH. Parmi ceux-ci, on peut citer les dérivés de phosphatidyléthanolamine couplés à un composé utilisé comme stabilisant à pH physiologique contenant un groupement acide. C'est cette association qui a été utilisée dans ce travail: la dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE, Figure 10) couplée au cholestérylhémisuccinate (CHEMS, Figure 11).

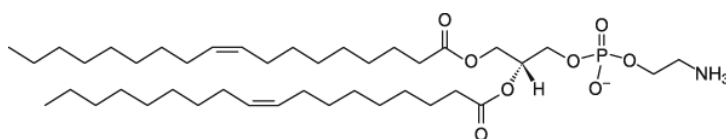


Figure 10. 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) zwitterionique à pH physiologique.

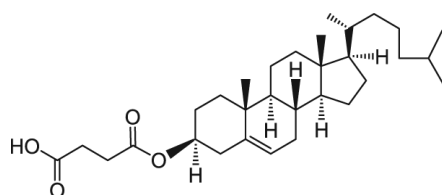


Figure 11. Cholesteryl hémissuccinate (CHEMS).

Entre pH 4,5 et pH 7,5, la DOPE est zwitterionique et sa partie hydrophile est plus étroite que sa zone hydrophobe. Quant au CHEMS, constitué de cholestérol auquel est greffé un groupement hémissuccinate, il est chargé négativement à pH physiologique et possède donc une tête hydrophile plus volumineuse que la partie hydrophobe. A pH inférieur à 5,8, il perd sa charge et adopte une structure plus cylindrique qui permet la transition de phase de la membrane vers une forme non lamellaire (Figure 12) [72, 73].

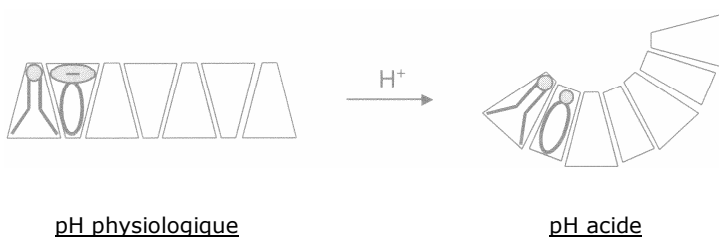


Figure 12. Transition de la phase lamellaire au pH physiologique à la phase hexagonale à pH acide (<5,8) pour un mélange DOPE/CHEMS. La DOPE, à gauche, est représentée par un cône. A pH physiologique, le CHEMS présente une charge négative et une forme conique inversée. A pH acide, il perd sa charge et l'organisation de la membrane passe en phase hexagonale [73].

D'autres associations de lipides peuvent être utilisées. Par exemple, le CHEMS peut être remplacé par des acides gras à longue chaîne comme l'acide oléique. Chargés négativement à pH physiologique, ils agissent par le même mécanisme d'action que le CHEMS. A pH acide, l'acide oléique capte des protons et sa tête

hydrophile devient moins volumineuse ce qui permet la transition de phase de la membrane du liposome. Un mélange de lipides anioniques et cationiques, par exemple un mélange de chlorure de dioleilydiméthylammonium (DODAC) et de CHEMS peut également être utilisé. A pH physiologique, le mélange est globalement anionique, et lorsque le pH diminue, une partie des lipides acides capte des protons et devient neutre, ce qui déstabilise la membrane liposomale. Citons encore l'utilisation de peptides, de dérivés de PEG ou des lipides zwitterioniques contenant des acides aminés, sensibles au pH [72, 74-76].

Lors du mécanisme de pénétration cellulaire par endocytose, le pH de l'endosome décroît par l'intermédiaire de pompes à protons ATP dépendantes (Figure 13). Cette décroissance entraîne un changement dans l'agencement des phospholipides du liposome pH-sensible et la déstabilisation de la bicouche phospholipidique. Finalement, la substance active contenue dans la vésicule serait libérée dans le cytosol. Trois hypothèses de mécanismes de libération sont proposées. La déstabilisation de la bicouche du liposome pH-sensible entraînerait : (A) la déstabilisation de la membrane de l'endosome par formation de pores ; (B) la libération du matériel encapsulé diffuserait seul vers le cytosol ou (C) la fusion du liposome avec la membrane de l'endosome accompagné de la libération de la substance active dans le cytosol (Figure 13).

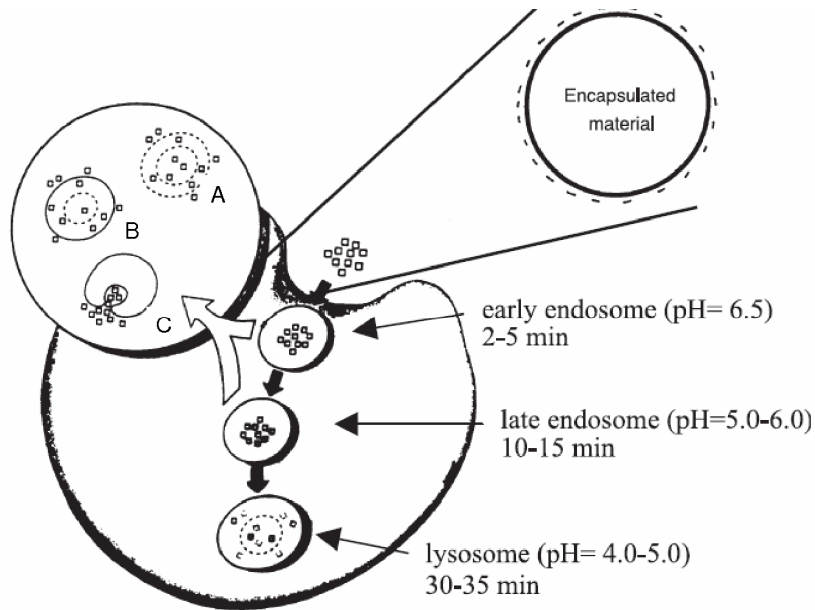


Figure 13. Mécanismes hypothétiques d'internalisation et de libération intracellulaire de liposomes pH-sensibles : (A) déstabilisation de la membrane par formation de pores, (B) libération du matériel encapsulé puis diffusion, (C) fusion avec la membrane de l'endosome [72].

Comme nous l'avons écrit précédemment, le vecteur idéal pour l'administration de substances actives peptidiques devrait à la fois présenter une stabilité sanguine acceptable, une accumulation significative dans la tumeur solide et une capacité de libération intracellulaire efficace pour permettre au peptide d'agir. L'ajout de cholestérol et de PEG à une composition lipidique sensible au pH risque de diminuer cette sensibilité et comme nous l'avons écrit précédemment, d'empêcher l'interaction du liposome avec la membrane cellulaire [68, 77-79]. Un compromis doit donc être trouvé pour permettre à la formulation de conserver toutes ses propriétés, de l'injection jusqu'au site d'action, puis jusqu'à la cellule cible.

Enfin, il faut tenir compte de la localisation de la cible de la substance active à vectoriser. Elle peut être cytoplasmique ou nucléaire. Par exemple, le peptide Print3G doit encore traverser la membrane du noyau cellulaire pour interagir avec sa cible. La présence de pores au niveau de la membrane nucléaire (Nuclear Pore Complex) d'une taille proche de 9 nm permettrait de laisser pénétrer par diffusion passive les ions et les molécules d'une taille inférieure à 40 000 Da. Pour les molécules de plus grande taille, des stratégies de conjugaison d'entités favorisant la pénétration de la molécule à travers la membrane nucléaire sont en cours de développement [80].

### **II. 3. Les méthodes de préparation des liposomes**

Plusieurs méthodes de préparation des liposomes peuvent être utilisées [81]. La méthode qui a été appliquée pour la préparation des liposomes décrits dans ce travail est la méthode d'hydratation du film lipidique (Figure 14). En pratique, les composés lipidiques sont dissous dans un solvant organique et placés dans un ballon. Ensuite, la formation d'un film lipidique est obtenue par évaporation du solvant organique à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Ce film est ensuite hydraté par une solution aqueuse. La dispersion des lipides est facilitée par l'utilisation du vortex et de billes de verre. A ce moment, des vésicules multilamellaires se forment. Pour obtenir des liposomes unilamellaires, différentes méthodes peuvent être appliquées telles que la sonication ou l'extrusion. L'extrusion consiste à forcer le passage sous pression d'azote de la suspension de liposomes à travers des membranes de polycarbonate dont la taille des pores est définie.

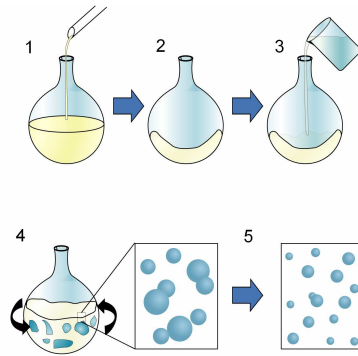


Figure 14. Préparation de liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique

Les liposomes peuvent également être préparés par évaporation en phase inverse. Cette méthode consiste à dissoudre des lipides dans un solvant organique non miscible à l'eau comme l'éther. Ensuite, la phase aqueuse est ajoutée pour former une émulsion eau dans huile. Le solvant organique est ensuite évaporé pour former les vésicules. Cette méthode permet d'obtenir des liposomes contenant de larges cavités aqueuses, souvent unilamellaires ou parfois oligolamellaires. Enfin, une troisième méthode peut être utilisée : la méthode par injection de solvant, consistant à injecter une solution éthanolique ou étherée de phospholipides dans une solution aqueuse pour former spontanément des vésicules lipidiques.

La substance active peut être incorporée dans les liposomes à différentes étapes de la fabrication, selon sa nature et sa stabilité. S'il est lipophile, il pourra être dissous dans le solvant organique utilisé pour la dissolution des phospholipides puis incorporé dans le ballon ; s'il est hydrophile, il pourra être dissous dans la solution d'hydratation du film lipidique. Enfin, il peut également être incorporé par différentes méthodes dans des liposomes blancs préparés préalablement, par exemple au moyen de cycles de congélation-décongélation [82] ou par gradient de pH [83].

Les liposomes devront finalement être purifiés pour éliminer le matériel non encapsulé. La dialyse, la chromatographie d'exclusion ou la centrifugation sont largement utilisées dans ce but.

### **II. 4. Stabilité et conservation**

Lors de la préparation et de la conservation des liposomes, ceux-ci peuvent subir des dégradations physiques et/ou chimiques [84].

En premier lieu, les acides gras des phospholipides, et particulièrement ceux contenant des insaturations, peuvent subir des phénomènes d'*oxydation* par formation de radicaux libres ou de peroxydes. Les têtes polaires hydrophiles peuvent également être sujettes à l'*oxydation*. La conséquence principale de l'*oxydation* des phospholipides est l'augmentation de la perméabilité de la bicouche liposomale. L'*hydrolyse* est également observée, souvent entre les liaisons ester présentes entre le glycérol et les acides gras des phospholipides. Elle est catalysée par la présence d'acides ou de bases. La liaison ester entre le glycérol et le phosphate étant peu sensible à ce phénomène, l'*hydrolyse* du groupement X qui y est attaché est moins fréquente.

Au cours du temps, les liposomes peuvent également subir des modifications physiques telles que l'*agrégation*, déstabilisant les membranes et augmentant leur perméabilité. La formation de ces larges complexes de plusieurs liposomes est un phénomène réversible par agitation ou par modification de la température. Les phénomènes d'*agrégation* sont plus fréquents pour les liposomes de grande taille (MLV) et pour les liposomes non chargés. La *fusion* irréversible des membranes liposomales peut également survenir, essentiellement pour des liposomes de petite taille, car leur courbure membranaire est importante et occasionne un stress. Le système tend donc à la fusion pour réduire ce stress en formant de plus larges vésicules. Ce phénomène est influencé par la température de stockage, favorisé lorsque les liposomes sont stockés à une température proche de leur température de transition de phase.



Le stockage à faible température ainsi que l'ajout de cholestérol dans la membrane liposomale permet de diminuer l'incidence de cet événement. Enfin, une *fuite du matériel encapsulé* au cours du temps est inévitable. Celle-ci est plus importante lorsque les composés encapsulés sont de faibles masses moléculaires ainsi que pour les composés amphiphiles ou lipophiles. Cette fuite est par contre diminuée pour les liposomes dont les membranes sont peu perméables aux substances actives hydrophiles, ce qui est le cas pour les liposomes composés de phospholipides dont les acides gras sont saturés ou pour les bicouches contenant du cholestérol.

En raison de cette instabilité physico-chimique, les liposomes doivent être conservés en chambre froide, à l'abri de la lumière, dans des tubes scellés sous atmosphère d'azote.

**III. REFERENCES**

1. Dass, C.R. and P.F. Choong, *Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy*. *Peptides*, 2006. **27**(11): p. 3020-3028.
2. Antosova, Z., et al., *Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?* *Trends Biotechnol.*, 2009. **27**(11): p. 628-635.
3. Torchilin, V., *Anti-cancer proteins and peptides in liposomes*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 155-182.
4. John, H., et al., *Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004. **378**(4): p. 883-897.
5. Reubsæet, J.L., et al., *Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998. **17**(6-7): p. 955-978.
6. Underberg, W.J., et al., *Separation and detection techniques for peptides and proteins in stability research and bioanalysis*. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2000. **742**(2): p. 401-409.
7. Reubsæet, J.L., et al., *Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: physical instability*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998. **17**(6-7): p. 979-984.
8. Maltesen, M.J. and M. van de Weert, *Drying methods for protein pharmaceuticals*. *Drug Discov. Today: Technologies*, 2008. **5**(2-3): p. e81-e88.
9. Franks, F., *Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998. **45**(3): p. 221-9.
10. Pezeshki, A., et al., *Adsorption of peptides at the sample drying step: influence of solvent evaporation technique, vial material and solution additive*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , 2009. **49**(3): p. 607-612.
11. Hyenstrand, P., et al., *Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by*

- high performance liquid chromatography*. Water Res., 2001. **35**(14): p. 3508-3511.
12. Pettit, D.K. and W.R. Gombotz, *The development of site-specific drug-delivery systems for protein and peptide biopharmaceuticals*. Trends Biotechnol., 1998. **16**(8): p. 343-349.
  13. Raiman, J., et al., *Delivery and stability of LHRH and Nafarelin in human skin: the effect of constant/pulsed iontophoresis*. Eur. J. Pharm. Sci., 2004. **21**(2-3): p. 371-377.
  14. Dufes, C., et al., *Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats*. Int. J. Pharm., 2003. **255**(1-2): p. 87-97.
  15. Singh, R., S. Singh, and J.W. Lillard, *Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins*. J. Pharm. Sci., 2008. **97**(7): p. 2497-2523.
  16. Esposito, P., et al., *PEGylation of growth hormone-releasing hormone (GRF) analogues*. Adv. Drug Deliver. Rev., 2003. **55**(10): p. 1279-1291.
  17. Sabel, M.S., et al., *Intratumoral IL-12 and TNF-alpha-loaded microspheres lead to regression of breast cancer and systemic antitumor immunity*. Ann. Surg. Oncol., 2004. **11**(2): p. 147-56.
  18. Lim, S.M., et al., *Improved biological half-life and anti-tumor activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) using PEG-exposed nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(13): p. 3538-3546.
  19. Egilmez, N.K., et al., *In situ tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity*. Cancer Res., 2000. **60**(14): p. 3832-7.
  20. Hill, H.C., et al., *Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptive antitumor immunity and cure of disseminated disease*. Cancer Res., 2002. **62**(24): p. 7254-63.

21. Amsalhem, P., S.M. Etesami, and J.-F. Morère, *Epidémiologie, facteurs de risques, dépistage*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 11-22.
22. Zelek, L., et al., *Diagnostic, bilan et prise en charge des cancers du sein: principes généraux*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 73- 110.
23. Alran, S. and R. Salmon, *Traitement chirurgical du cancer du sein*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 73-110.
24. Kirova, Y., et al., *Radiothérapie pour qui et comment?*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 111-124.
25. Moy, B. and P.E. Goss, *Hormonal therapy of breast cancer*, in *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice, 5th edition*, B.A. Chabner and D. Longo, Editors. 2011, walter kluwer: Philadelphia.
26. Pierga, J.-Y., *Traitement adjuvant du cancer du sein n'exprimant pas HER2*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 167-187.
27. Abrial, C., et al., *Quand faire de la chimiothérapie néoadjuvante?*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 125-154.
28. Dufresne, A. and X. Pivot, *Traitement du cancer du sein métastatique*, in *Le cancer du sein*, J.-F. Morère, et al., Editors. 2007, Springer: Paris. p. 209-225.
29. Zhang, X., et al., *Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene*. *J. Biol.Chem.*, 2003. **278**(9): p. 7580-7590.
30. Wennbo, H. and J. Tornell, *The role of prolactin and growth hormone in breast cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(8): p. 1072-6.
31. Remacle, S., et al., *Loss of function but no gain of function caused by amino acid substitutions in the hexapeptide of Hoxa1 in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, 2004. **24**(19): p. 8567-75.

32. Morgan, R., et al., *Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma*. *Cancer Res.*, 2007. **67**(12): p. 5806-13.
33. Gillet, A., et al., *Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **In Press, Corrected Proof**.
34. Li, H., et al., *Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor*. *Int. J. Pharm.*, 2003. **258**(1-2): p. 11-9.
35. Thirawong, N., et al., *Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes*. *J. Control. Release*, 2008. **125**(3): p. 236-45.
36. Diebold, Y. and M. Calonge, *Applications of nanoparticles in ophthalmology*. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2010. **29**(6): p. 596-609.
37. Wong, J.P., et al., *Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular Francisella tularensis infection*. *J. Control. Release*, 2003. **92**(3): p. 265-73.
38. Strömstedt, A.A., et al., *Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes*. *Curr. Opin. Colloid In.*, 2010. **15**(6): p. 467-478.
39. Tan, M.L., P.F. Choong, and C.R. Dass, *Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery*. *Peptides*, 2010. **31**(1): p. 184-93.
40. Chapman, D., *Physicochemical properties of phospholipids and lipid-water systems*, in *Liposome technology*, G. Gregoriadis, Editor. 1983, CRC press: Boca Raton. p.1-18.
41. Sharma, A. and U.S. Sharma, *Liposomes in drug delivery: Progress and limitations*. *Int. J. Pharm.*, 1997. **154**(2): p. 123-140.
42. Klibanov, A.L., V.P. Torchilin, and S. Zalipsky, *Long-circulating sterically protected liposomes*, in *Liposomes, second edition, a practical approach*,

- V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 231-265.
43. Cullis, P.R., A. Chonn, and S.C. Semple, *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): p. 3-17.
  44. Kirby, C., J. Clarke, and G. Gregoriadis, *Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro*. *Biochem. J.*, 1980. **186**(2): p. 591-8.
  45. Semple, S.C., A. Chonn, and P.R. Cullis, *Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes*. *Biochemistry*, 1996. **35**(8): p. 2521-5.
  46. Liu, D.Z., et al., *Microcalorimetric studies on the physical stability of polyethylene glycol-grafted liposome*. *Colloid. Surface. A.*, 2003. **212**(2-3): p. 227-234.
  47. Torchilin, V.P., *Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging*. *AAPS J.*, 2007. **9**(2): p. E128-47.
  48. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
  49. Vonarbourg, A., et al., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. *Biomaterials*, 2006. **27**(24): p. 4356-73.
  50. Levchenko, T.S., et al., *Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating*. *Int. J. Pharm.*, 2002. **240**(1-2): p. 95-102.
  51. Kaasgaard, T., O.G. Mouritsen, and K. Jorgensen, *Freeze/thaw effects on lipid-bilayer vesicles investigated by differential scanning calorimetry*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003. **1615**(1-2): p. 77-83.
  52. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **71**(3): p. 409-419.

53. Campbell, R.B., *Influence of tumor physiology on delivery of therapeutics*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 9-35.
54. Jain, R.K., *Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 149-68.
55. Greish, K., et al., *Enhanced permeability and retention (EPR) effect and tumor selective delivery of anticancer drugs*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V.P. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 37-52.
56. Maeda, H., T. Sawa, and T. Konno, *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. *J. Control. Release*, 2001. **74**(1-3): p. 47-61.
57. Maruyama, K., *Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011. **63**(3): p. 161-9.
58. Seki, T., J. Fang, and H. Maeda, *Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application*. *Cancer Sci.*, 2009. **100**(12): p. 2426-2430.
59. Li, C.J., et al., *Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure*. *Br. J. Cancer*, 1993. **67**(5): p. 975-80.
60. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **71**(3): p. 409-419.
61. Kamps, J. and G.L. Scherphof, *Liposomes in biological systems*, in *liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 267-288.
62. Duzgunes, scedil, and S. Nir, *Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999. **40**(1-2): p. 3-18.

- 
63. Roux, E., et al., *On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(2): p. 240-8.
  64. Woodle, M.C., M.S. Newman, and J.A. Cohen, *Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties*. *J. Drug Target.*, 1994. **2**(5): p. 397-403.
  65. Bellavance, M.A., M.B. Poirier, and D. Fortin, *Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells*. *Int. J. Pharm.*, 2010. **395**(1-2): p. 251-9.
  66. Kobayashi, T., et al., *Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells*. *Int. J. Pharm.*, 2007. **329**(1-2): p. 94-102.
  67. Kirpotin, D., et al., *Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro*. *Biochemistry*, 1997. **36**(1): p. 66-75.
  68. Momekova, D., et al., *Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2007. **32**(4-5): p. 308-317.
  69. Shin, J., P. Shum, and D.H. Thompson, *Acid-triggered release via dePEGylation of DOPE liposomes containing acid-labile vinyl ether PEG-lipids*. *J. Control. Release*, 2003. **91**(1-2): p. 187-200.
  70. Song, C.K., et al., *Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake*. *Int. J. Pharm.*, 2009. **380**(1-2): p. 161-169. Won, Y.W., K.S. Lim, and Y.H. Kim, *Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems*. *J. Control. Release*, **In Press, Corrected Proof**.
  71. Drummond, D.C., M. Zignani, and J. Leroux, *Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery*. *Prog. Lipid Res.*, 2000. **39**(5): p. 409-460.
  72. Simoes, S., et al., *On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004. **56**(7): p. 947-965.



73. Peschka, R. and R. Schubert, *pH-sensitive liposomes*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 305-217.
74. Obata, Y., S. Tajima, and S. Takeoka, *Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo*. *J. Control. Release*, 2010. **142**(2): p. 267-276.
75. Bergstrand, N., et al., *Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes*. *Biophys. Chem.*, 2003. **104**(1): p. 361-379.
76. Turk, M.J., et al., *Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002. **1559**(1): p. 56-68.
77. Johnsson, M. and K. Edwards, *Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids*. *Biophys. J.*, 2001. **80**(1): p. 313-23.
78. Slepushkin, V.A., et al., *Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(4): p. 2382-8.
79. Zignani, M., et al., *In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system*. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr*, 2000. **1463**(2): p. 383-394.
80. Won, Y.W., K.S. Lim, and Y.H. Kim, *Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems*. *J. Control. Release*, 2011. **In Press, Corrected Proof**.
81. Lasch, J., V. Weissig, and M. Brandl, *Preparation of liposomes*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 3-29.
82. De Oliveira, M.C., et al., *Delivery of antisense oligonucleotides by means of pH-sensitive liposomes*. *J. Control. Release*, 1997. **48**(2-3): p. 179-184.

83. Mayer, L.D., et al., *Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients*. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1990. **1025**(2): p. 143-151.
84. Zuidam, N.J., et al., *Stability, storage, and sterilization of liposomes*, in *Liposomes, Second edition*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 149-166.

## **IV. TECHNIQUES UTILISÉES POUR SUIVRE LA PÉNÉTRATION CELLULAIRE DES LIPOSOMES (Publication)**

### **STUDY OF LIPOSOMES CELLULAR UPTAKE: FOCUS ON CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY TECHNIQUES**

E. Ducat<sup>a\*</sup>, B. Evrard<sup>a</sup>, O. Peulen<sup>b</sup> and G. Piel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liege, B36, Tour 4, Level 2, Avenue de l'hôpital, 1, B-4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup> Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, University of Liege, Pathology building, B23, Level 4, B-4000 Liege, Belgium

Ce chapitre est soumis dans le *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

#### **IV. 1. Abstract**

For a few years, confocal laser scanning microscopy (CLSM) and flow cytometry, in particular fluorescence-activated cell sorting (FACS) are two advanced techniques used more and more to study the cellular uptake of liposomal drug delivery systems. These techniques provide new potentialities in order to localize vectors in cells and to quantify the amount of liposomal uptake, bringing essential information on the interaction between the formulation and the target cell. A better understanding of the mechanisms underlying behaviour of liposomes in biological systems is essential to adapt the liposomal formulation to improve the vector efficacy. The present review describes these two techniques and their use in liposomal research.

***Keywords:* Liposome – cellular uptake - confocal microscopy – flow cytometry**

## IV. 2. Introduction

Liposomes, spherical structures composed of one or several phospholipid bilayers, possess many attractive characteristics that stabilize and improve the pharmacological properties of drugs. Being biocompatible and biodegradable, liposomes cause very mild or no antigenic, pyrogenic, allergic or toxic reactions. They can entrap hydrophilic drugs within their aqueous compartment, lipophilic compounds in their membrane or amphipathic drugs. First generation of liposomes has been shown to be easily eliminated from the bloodstream and to accumulate in the Kupfer cells in the liver and in spleen macrophages [1]. Therefore, the strategy has been to graft polymers onto liposomal phospholipids. The most widely used polymers for this application are polyethyleneglycols (PEGs). PEGs are synthetic, inert and biocompatible polymers that allow the formation of a protective layer on the particle surface and provide protection against opsonization and capture by the RES [2, 3]. Moreover, the liposome surface can be modified with certain specific ligands (such as antibodies, sugars, peptides ...). This active targeting allows control of their biological properties and their biological behaviour [4-7]. To improve *in situ* and/or intracellular delivery, several types of liposomes are currently developed such as pH, light or temperature-sensitive liposomes [8].

Four mechanisms of liposome-cell interaction by which liposomes deliver their content in cells, can occur: (1) adsorption followed by extracellular release of liposome content; (2) endocytosis clathrin-(in)dependent; (3) lipid exchange by transfer of lipophilic compounds from the liposomal bilayer to the cell membrane and (4) fusion with the intracellular membrane [9]. Mechanisms of liposomes-cell interaction vary greatly as a function of the type and the composition of the formulation but also as a function of the type of cell and cell cycle [10]. For example, Papahadjopoulos *et al.* observed that fusion can occur when liposomes are constituted of pure phosphatidylserine but not when liposomes are constituted of pure phosphatidylcholine [11, 12]. On the other hand, Bergstrand *et al.* observed that pH-sensitive liposomes containing 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-

phosphoethanolamine (DOPE) do not interact or fuse readily with model membranes containing components close from those present in endosomal membranes [8]. Moreover, the presence of PEGs on the liposome surface could often hamper the interaction between liposomes and cell membranes [13], so as the presence of cholesterol [11].

The study of the cellular uptake of liposomes brings essential information about the formulation developed. The localization of the vector and of its encapsulated material in the cell can be evaluated, as well as the quantity of liposomes internalized. The type of liposome-cell interaction mechanism can also be investigated. Cellular uptake studies allow better understanding of the mechanisms underlying the behaviour of liposomes in biological systems and allow the adaptation of liposomal formulation in order to enhance efficacy. Herein, we focus on two techniques widely used for several years to evaluate and study the intracellular fate of liposomes and their content: confocal laser scanning microscopy (CLSM) and flow cytometry (FCM).

### **IV. 3. Confocal laser scanning microscopy**

Since the last decade, confocal laser scanning microscopy (CLSM) has been widely used by researchers in the field of liposomes to study the cellular uptake of these lipid vesicles and of their encapsulated material.

#### **IV. 3. 1. CLSM principle – gain over conventional fluorescence microscopy**

CLSM allows the acquisition of in-focus images from selected depths using the process of optical sectioning, which eliminates artefacts occurring during physical sectioning and fluorescent staining of tissue specimens for traditional forms of microscopy. Optical sectioning is a non-invasive method of image collection, using light to section the specimen. Two techniques of optical sectioning can be achieved: deconvolution and multiphoton imaging.

Deconvolution occurs after image acquisition and uses nearest-neighbour algorithms in order to extract information out of blurred images. The multiphoton imaging uses two long-wavelength photons that must arrive simultaneously in order to excite the fluorochrome. CLSM is built around a conventional light microscope, using a laser as light source and sensitive photomultiplier tube detectors (PMTs) placed behind a pinhole to detect points of light from the specimen. PMTs produce a signal directly proportional to the brightness of the light and then a computer builds images using the information output acquired from PMTs [14]. Image formation in a confocal microscope is fundamentally different from that in a conventional microscope; the quality of the image is enhanced over conventional fluorescence microscopy because image information from multiple depths in the specimen is not superimposed. CLSM achieves a controlled and highly limited depth of focus. It is able to control the depth of field and to reduce the background information away from the focal plane, avoiding image degradation. Unlike conventional fluorescence microscopy, image information is restricted to a well-defined plane, rather than being complicated by signals arising from remote locations in the specimen. Contrast and definition are dramatically improved due to the reduction in background fluorescence and improved signal-to-noise [15, 16]. Zoom of a specific area can be obtained without loss of resolution by decreasing the region scanned by the mirrors and high-quality images can be obtained from specimens prepared with fixed or living cells or tissues.

Confocal microscopes can be equipped with multiple light sources of different wavelengths to excite a variety of fluorophores. Sources of excitation commonly used, include argon (Ar, 488nm and 514nm), krypton (Kr, 568nm), argon-krypton (Ar-Kr, 488nm, 514nm and 568nm) and helium-neon (He-Ne, 633nm) lasers [16]. Several fluorescent compounds can be observed, which are incorporated into formulations or conjugated to a particular structure of the cell or tissue. A combination of 2, 3 or more labelling experiments can be achieved using multiple wavelength modes, in order to localize vectors in different structures of the cell/tissue.

Attention must be paid to the three phenomena that can produce artefacts when observing specimens by confocal microscopy.

Firstly, the **bleed-through phenomenon** of fluorescence emission, also termed crossover or crosstalk, is a fundamental problem that must be addressed in CLSM. It is usually manifested by the emission of one fluorophore being detected in the PMT channel or through the filter combination, reserved for a second fluorophore. Bleed-through artefacts often complicate the interpretation of experimental results, particularly if sub-cellular co-localization of fluorophores is under investigation. Indeed, this artefact can be easily confused with co-localization of the fluorophores. This phenomenon could be minimized by sequentially scanning the specimen with individual lasers and by detecting fluorescence in each channel. It leads to the production of a more accurate merged image of fluorophore distribution.

The second problem that may be encountered when using CLSM, is **photobleaching**. Indeed, this phenomenon occurs when a fluorophore permanently loses the ability to fluoresce due to photon-induced chemical damage and covalent modification. Fluorophores chosen for confocal applications must exhibit a sufficient brightness level and signal persistence in order not to suffer from excessive photobleaching.

Finally, attention must be paid to the **autofluorescence** phenomenon occurring naturally in most cell types when imaging some tissues or cells. Some reagents such as fixatives can also cause autofluorescence. The use of excitation wavelengths out of range of natural fluorescence, helps avoid or decrease this phenomenon. In all cases, a non-stained specimen must first be prepared and observed in CLSM whilst adjusting the PMT settings to get black level images. After that, all the stained specimens have to be examined with PMTs and laser power values lower or equal to those recorded for autofluorescence.

In most publications on liposome cellular uptake, images are taken in *xy* plane, which is parallel to the specimen plane, but three-dimensional information on a tissue (e.g. skin or tumor) could be obtained by acquiring a series of optical sections (*z*-series), taken at successive focal planes along the *z* axis [17].



Note that to compare several images obtained with CLSM in terms of fluorescence brightness and intensity, optical sections have to be recorded using the same settings, in particular the laser power and the PMT voltages. In most cases, CLSM is used to localize rather than to compare and to quantify fluorescence intensities that can be achieved with most suitable techniques such as flow cytometry (see section IV.4)).

### **IV. 3. 2. Labelling of liposomal drug delivery systems**

#### *Liposome labelling*

Several fluorescent markers allow us to follow vector internalization. Firstly, liposomes themselves can contain a fluorescent dye coupled with a liposomal membrane component, such as phospholipids or cholesterol. There are two ways to fluorescently label the phospholipid bilayer: (1) fluorescent markers can be incorporated in fatty acid chains or (2) a fluorescent dye can be grafted on phospholipid headgroups, such as phosphatidylserine (PS) or phosphatidylethanolamine (PE) associated with fluorophores: 25-Nitrobenzoxadiazol (NBD) [18], borondipyrromethene (BODIPY) [19], fluorescein, pyrene, etc... The presence of a tethered chromophore in a bilayer organization could introduce a perturbation to the system, making it necessary to add the lowest probe concentration in the formulation to preserve the properties of the bilayer structure [20].

Rhodamine B, a synthetic fluorescent dye from the family of substituted xanthenes, can be associated with PE (Rh-PE) and incorporated in the lipid bilayer by adding it to the lipid mixture before evaporation of the lipid film under reduced pressure [21-24]. Several publications followed cellular uptake of liposomes using Rh-PE at a concentration from 0.1 to 1 mol%. Kirpotin *et al* employed this component to label sterically stabilized immunoliposomes (SSILs) in order to study their penetration in breast cancer MCF-7 and SK-BR-3 cell lines. This labelling allows them to visualize liposomes in the cytoplasm of cells and in endosomes [25].

Some cholesterol derivatives could also be employed to follow liposome internalization. Lu *et al.* employed a fluorescent cholesterol derivative to evaluate the intracellular fate of sterically stabilized liposomes (SSLs). SSLs were actively targeted to  $\mu$  opioid receptor (MOR) expressing cells by grafting dermorphin to PEGs. Cholesteryl-BODIPY was encapsulated in liposomes to monitor the whereabouts of liposomes in cells. Significant fluorescent signals in CHO cells presenting human  $\mu$  opioid receptors (CHO-hMOR cells) were detected, but no fluorescence in the two other cell lines, which do not express MOR or  $\delta$  opioid receptors (DOR) [26].

Liposomal membranes can also contain a fluorescent lipophilic compound, such as carbocyanine, which is dissolved with lipids before evaporation [27, 28]. The main advantage of this method is that it does not interfere with proteins on the surface of actively targeted liposomes [29]; but it could still affect the perception of liposomal behaviour in cells by modifying the original composition of lipids.

#### *Fluorescent encapsulated material*

The second strategy for studying the penetration of liposome formulations by CLSM in cells is to encapsulate fluorescent compounds in liposomes or to label the drug with fluorescent markers [30]. The most widely hydrophilic fluorescent dye encapsulated in the inner cavity of liposomes, is the self-quenching fluorescent dye 6-carboxyfluorescein (CF) (M.W. = 376; log  $P$  = -5.219; 492/517 nm). Concentration quenching of CF is a complex phenomenon, based on dimerization and energy transfer to dimer [31-33]. This phenomenon is exploited in studies of cellular uptake of liposomes. CF, encapsulated at high concentration, is virtually non-fluorescent, owing to the formation of ground state dimers. Any fluorescence measured will be due to the leakage of calcein out of vesicles and dilution in the exterior aqueous media. Regain of fluorescence happens when liposomes are taken up by cells and lysed. Liposome content is released and then diluted in cytoplasm, allowing the fluorescence of CF. Chen *et al.* showed that fluorescence is completely quenched at 0.2M [31].

Lots of publications deal with CF penetration, but the quenched calcein concentration could vary greatly from 50 to 120 mM [23, 34-36]. This phenomenon is particularly exploited to assess the mechanism of action of pH-sensitive or thermosensitive liposomes. Simard *et al.* prepared pH-sensitive immunoliposomes (ILs) containing calcein encapsulated at a self-quenched concentration in order to verify that cargo release from endosomes could be achieved. Formulation was incubated for 30 min with leukemic cell line HL60. Upon release of the dye from the liposomes into the endosomal/lysosomal lumen, the cellular fluorescence is expected to increase significantly. They observed that calcein fluorescence remains largely quenched in the case of the pH-insensitive formulation, indicating minimal dye release. On the other hand, the pH-sensitive ILs rapidly released their content in cytoplasm, as revealed by the more intense and diffuse fluorescence signal [36].

Concerning formulations for doxorubicin (DOX) delivery, the use of model molecules is unnecessary because DOX is fluorescent when excited at 480nm (480/540nm) [37-40]. Elbayoumi *et al.* presented epi-fluorescence microscopy and confocal microscopy images of C26 and PC3 cell lines and demonstrate a strong increase of doxorubicin concentration inside cells when DOX is encapsulated in mAb2C5-modified Doxil<sup>®</sup>, compared to nonspecific controls (non modified Doxil<sup>®</sup>).

### *Cell components labelling*

To properly localize vectors in cells and to better understand their intracellular fate, lots of fluorescent compounds can be used to stain specific cellular structures and organelles using relatively simple protocols. Watson *et al.* proposed a list of several markers of cellular components available on the market [41]. In general, organelle probes consist of a fluorochrome nucleus attached to a target-specific moiety that assists in localizing the fluorophore through covalent, electrostatic, hydrophobic or similar types of bonds.

So far, the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a fluorescent stain that binds strongly to DNA, is used extensively in fluorescence microscopy to stain both

live and fixed nuclei cells. DAPI binds to double-stranded DNA but also to RNA, though it is not as strongly fluorescent. Stain nuclei in publications of Xiong *et al* and Song *et al*. were realized with DAPI in order to localize DOX fluorescence in the nucleus of cancer cell lines [39, 40]. This fluorescent stain was also employed by Wong *et al* in order to better understand the mechanism by which cationic liposome and DNA complexes are internalized and delivered to the nucleus and to identify which transport steps might be manipulated in order to improve transfection efficiencies [42].

Some publications use endosomal dyeing reagents to evaluate the endosomal escape of vectors and/or active principle. LysoTracker<sup>®</sup> probes (Molecular Probes) are fluorescent lysotropic probes for labelling and tracking acidic organelles in live cells. This endosomal dyeing reagent consists of a fluorophore linked to a weak base, only partially protonated at neutral pH. These probes are employed at nanomolar concentrations and possess several excitation wavelengths for detecting several fluorescent colours. Their mechanism of retention has not yet been established but probably involves their protonation and retention in the membranes of the organelles. Staining endosomes allows Obata *et al*. to observe the co-localization between endosomes and DOX and the release of DOX from them as a function of formulations applied on cells [38].

For the evaluation of endosomal escape, Fujiwara *et al*. described the use of PKH67 (Sigma-Aldrich) that colours the plasma membrane of endosomes green and the use of LysoTracker Green to colour lysosomes green, in order to investigate the intracellular trafficking in MDCK cells of octaarginine-modified liposomes. At 6 h of transduction, PKH67 was detected in a punctuate pattern indicative of endocytosis. This study allows them to localize most of the liposomes trapped in the membrane compartment (endosome) after internalization [43].

**IV. 3. 3. *in vitro* and *in vivo* studies using CLSM**

Of late, cellular uptake of liposomes has been widely studied *in vitro* using fluorescence microscopy to evaluate the penetration of a formulation or to compare several formulations and their localization in the cell. Some publications present results obtained with conventional fluorescence microscopy giving low-resolution images accompanied by difficulties in precisely localizing the vectors in cells [44-46]. Fluorescence microscopy can distort the reality and possibly confuse fluorescent compounds in the cytoplasm/nucleus with those adsorbed on the cell surface. CLSM ensures that nanoparticles and/or their content have penetrated the cell. As we said before, labelling liposomes in order to study their cellular uptake can be achieved with lots of reagents available on the market. Some publications present images of fluorescent labelled liposomes which are internalized in cells and, to confirm the internalization, merge the picture with pictures taken with bright field microscopy to reveal the cell precinct [47]. Others use several cellular stains to visualize a cellular, endosomal, or specific organelle co-localization.

In some publications, particular treatment of cells is applied in order to study the penetration mechanism of liposome. For example, incubation at 4°C and at 37°C of cells treated with liposome formulations allows these researchers to conclude that endocytic pathway for liposome internalization is predominant if penetration is hampered at 4°C [48-50]. Chemical inhibitors of endocytic pathways are also employed by researchers in order to profile cellular uptake, intracellular processing and subsequent transfection efficiency of nanovectors such as liposomes [51]. Fonseca *et al.* incubated cells with pH-sensitive SSIs in both the absence and the presence of inhibitors of endocytosis composed of a mixture of antimycin A, NaF and NaN<sub>3</sub> [52]. They observed that pre-treatment of the cells with inhibitors of endocytosis followed by incubation with pH-sensitive SSIs resulted in a drastic decrease of fluorescence intensity. It is important to note that they studied the influence of those inhibitors on cell viability to prove that the inhibitory effect on cell association observed under this

condition cannot be attributed to any cytotoxic effect. Vercauteren *et al.* describe the characterization of four commonly used endocytosis inhibitors (chlorpromazine, genistein, methyl- $\beta$ -cyclodextrin and potassium depletion) on cell viability and endocytosis in five cell lines. They drew the conclusion that some of those inhibitors significantly decreased cell viability, even after short incubation periods and at concentrations that are routinely used to inhibit endocytosis. They also found that transferrin and lactosylceramide, reported to enter cells via clathrin-dependent and clathrin-independent mechanisms respectively, actually presented poor specificity for inhibiting those distinct endocytic pathways. Finally, they conclude that any inhibitory effects are highly cell line dependent [53]. Therefore, that kind of inhibitor must be carefully chosen and their cell toxicity evaluated before concluding anything on vector internalization mechanisms.

On the other hand, CLSM could be helpful in supporting conclusions on *in vivo* studies. Indeed, the interactions of liposomes and tumour tissue can be observed using CLSM to confirm that nanocarriers accumulate in tumours by the enhanced permeation and retention effect (EPR effect) [54-56].

Weng *et al.* examined a 5  $\mu\text{m}$  section cut from frozen tumour tissues harvested 48 hours after injection of immunoliposomes containing quantum dots (QD-IIs) developed for cancer diagnosis and treatment by CLSM. In their study, QD-IIs showed extensive accumulation within tumour tissue and within tumour cells [57].

Recent progress in CLSM also allows *in vivo* study without mechanical sectioning and fixation [58]. The method consists of a non-invasive reflectance CLSM developed for *in vivo* biomedical applications of diagnosis for topical and local diseases (e.g., eye, oral cavity and skin) [59-61] but this technique has not yet been applied for studies of liposome accumulation in tumours because it has not yet been developed for examination of deep tissues.

## **IV. 4. Flow cytometry**

### **IV. 4. 1. Flow cytometry principle**

Flow cytometry (FCM) provides quantitative results related to the transfection of liposomes in cells. Cytometry allows the measurement of physical and/or chemical characteristics of a large number of single cells, streamed hydrodynamically through a fluid sheath sleeve [62, 63]. FCM simultaneously produce multiple optical measurements on individual cells at high rates, allowing us to sort cells that meet specific criteria with high precision [64]. Indeed, counting, examining and sorting heterogeneous populations of cells, suspended in a stream of fluid, can be achieved with a flow cytometer. A flow cytometer possesses five units: (1) a flow cell, carrying and aligning the cells under a fluid unilamellar stream; (2) a measuring system; (3) a detector, including detection of fluorescence signals; (4) an amplification system and (5) a computer for analysis of the signals. As a single particle intersects the central region of a laser beam, focused to provide uniform illumination across the diameter of the sample stream, the fluorescence and light scatter properties of the particle are measured. Detectors transform light intensity in voltage; light scattered detectors provide information about particle size and surface characteristics and fluorescence detector on total intensity, maximum intensity, polarization and lifetime of fluorescence. Forward scatter (FSC) gives information about the size of cells, because its magnitude is roughly proportional to the cell size while side scatter (SSC) is caused by granularity and structural complexity inside the cell. The fluorescent light travels along the same path as the SSC signal.

The number of applications of flow cytometry and particle sorting are numerous (e.g., measurements of nucleic acid content, enzyme activity, calcium flow, membrane potential, intracellular pH) but to study the cellular uptake of liposomes in cells, FACS is the most widely used technique employed. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) is a specialized type of flow cytometry. While many researchers use this term frequently for all types of

sorting and non-sorting applications, it is not a generic term for flow cytometry. It provides a method for sorting a heterogeneous mixture of biological cells into two or more containers, one cell at a time, based upon the specific light scattering and fluorescent characteristics of each cell. Intrinsic fluorescence, detected from cells that do not contain any fluorescent marker, and extrinsic fluorescence are quantified and directly proportional to the quantity of the specific constituent excited. So, specific fluorophore has to be loaded prior to analysis. During and following laser excitation, each cell scatters light or emits fluorescence characteristically allowing for the analysis of fluctuations in brightness [63]. Relevant negative controls must be correctly chosen to evaluate the autofluorescence of cells.

#### **IV. 4. 2. Applications in cellular uptake studies**

Most of the time, the study of the cellular uptake of liposomes using the FCM technique consists of fluorescently labelling liposomes and/or their encapsulated material to conduct FACS studies. Fluorescent probes used in FACS are usually the same as those employed for CLSM experiments (*see section 3. 2.*). Cunningham reported in a table the commonly used probes for FACS studies and their excitation/emission of wavelengths [65].

##### *Liposome labelling*

Firstly, liposomes themselves can be labelled to follow their cellular internalization by FACS technique. Bellavance *et al.* conducted FACS analysis to study the cellular uptake of fluorescent-labelled liposomes using 0.01 mol% Oregon Green grafted on the head group of a derivative of PE (Oregon Green DHPE) in two glioblastoma cell lines (F98 and U-118 MG). Time-course analysis of liposome uptake was taken after 0, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hours of continuous exposure of liposomes on cells. Results were expressed as the mean fluorescence of the function of time [66]. Huth *et al.* prepared pH-sensitive liposomes containing NBD-PE to study their uptake and intracellular fate in COS-



7 and HUVEC cells [51]. Nakona *et al.* used carbocyanine as a fluorescent marker of the phospholipid membrane to investigate the effect of a polymer coating using modified polyvinyl alcohol on the interaction between liposomes and macrophage cells (J774 cells) [67]. Aso *et al.* developed a drug delivery system that targets the injured myocardium. They investigated the interaction of 2 types of glycoside-conjugated liposomes containing carbocyanine with cardiomyocytes. They concluded that N-acetylglucosamine-conjugated liposomes are promising drug delivery systems for therapeutic applications for cardiac diseases [68].

### *Fluorescent encapsulated material*

Secondly, a FACS study of liposome cellular uptake could also be achieved by encapsulating a fluorescent model molecule. Calcein, described as widely used for CLSM studies (see section IV.3.2) could also be employed for a FACS study. Chebbi *et al.* loaded calcein and neridronate in liposomes to study their internalization in breast cancer cells MDA-MB-231. Graphs of the cell count as a function of calcein fluorescence illustrate that free neridronate is less internalized than when encapsulated in liposomes [69]. Engel *et al.* studied the influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells, employing calcein or NBD-CHOL to calculate a percentage of fluorescent liposome uptake as a function of the formulation studied. Moreover, they selected cells expressing mannose receptors by flow cytometry. Detection of these mannose receptors was carried out by a two-step assay using a monoclonal antibody against human 175-kDa mannose receptor [70].

DOX, fluorescent when excited at 480 nm, was also employed in FACS studies. Jung *et al.* prepared cationic liposomes with carboxylated polyethylene glycol, loaded with DOX as model drug. To investigate the intracellular uptake of DOX transfected by liposomes, the amount of DOX uptake into the B16F10 cells was evaluated by FACS. FACS results indicate that the cationic charge of liposomes can induce a greater electrostatic interaction with B16F10 cells and hence induce internalization by endocytosis [71]. In 2010, the same research group published

the study of cellular uptake of thermally denatured bovine serum albumin (BSA)-coated liposomes using flow cytometry. Cationic liposome surface-modified with BSA were prepared. Indeed, they postulated that the introduction of albumin on the surface of liposomes reduced the association of serum proteins to liposomes and hence resulted in a more prolonged circulation time of PEG liposome. DOX was loaded in liposomes as a model molecule. They concluded that BSA-coated liposomes present higher stability in the blood stream and higher intracellular uptake compared to Doxil® [72].

Propidium iodide (PI), a membrane impermeant dye could also be encapsulated into liposomes to compare formulations in terms of release of their encapsulated material in the cytoplasm of cells. Bellavance *et al.* explained that, as PI is membrane impermeable, it remains confined to the internal aqueous phase of liposomes until the integrity of their lipid bilayer is compromised. Moreover, this intercalating agent exhibits a strong fluorescence signal only when bound to nucleic acids. As PI is not permeable to phospholipid membranes, it requires the destabilization of both liposome and endosome bilayer membranes to interact with nucleic acids in cells [66].

#### **IV. 4. 3. Particular case of toxicity studies**

Researchers in the liposome field do not only use FCM to follow the cellular uptake of liposomes in cells. The technique is also often employed to study and quantify the cell toxicity induced by a liposomal formulation.

Bellavance *et al.* studied the toxicity of their liposomal formulations using PI. In practice, cells were exposed to liposomes carrying only buffer. PI was added to cell suspensions just prior to analysis by flow cytometry. As said before, PI is an intercalating agent, membrane impermeable. They expressed liposome toxicity by the percentage of PI-positive cells as a function of time. This percentage did not cross 10% after contact with cells of 24h. So, they concluded that insignificant toxicity was detected by flow cytometry and that no cytostatic effect was observed [66]. Chebbi *et al.* added PI 5 minutes before doing flow

cytometry experiments. There was no difference between untreated cells and cells treated with PI, concluding that cells were still viable after 12h of contact with neridronate [69].

Moreover, some liposome toxicity studies make the distinction between apoptotic and necrotic cells. For example, Ruozi *et al.* investigated the toxicity of different liposomal formulations of neutral and cationic lipids for cidofovir delivery using an Annexin V-FITC Kit. Different concentrations of empty liposomes were added to cells and results were observed after 1, 4 and 7 days. This approach allows us to discriminate apoptotic and dead (necrotic) cells. Apoptotic cells are stained positively with Annexin V-FITC but are negative when staining with PI. Dead cells are stained positive for both Annexin V-FITC and PI, whereas viable cells are negative for both Annexin V-FITC and PI [73].

### **IV. 5. Other**

Despite the fact that CLSM and FACS techniques are the most widely used by researchers in the field of liposomes, some employed other techniques to quantify the cellular uptake of liposome contents. It is based on cells lysis after treatment with vectors, allowing us to determine the internalized content by several techniques [21, 74, 75]. For example, Yang *et al.* used this technique to quantify the cellular uptake of sterically stabilized paclitaxel-loaded liposomes tailored to target human breast cancer. In practice, after the incubation of cells (BT-474, SK-BR-3 and MDA-MB-231) with liposomes for 2 hours, cells were washed, collected and centrifuged. The cell pellet was destroyed by sodium dodecyl sulphate, acetonitrile was added to precipitate proteins and a second centrifugation was done. The paclitaxel contained in supernatant was determined by HPLC and the cellular uptake efficiency was expressed in terms of the percentage of paclitaxel present in cells compared to the total amount added to cells. This study allowed them to observe that the uptake efficiency of paclitaxel encapsulated in PEGylated ILs was close to 65% in HER2 high-expressing cells, which was twice of that for PEGylated liposomes [24]. Charest

*et al.* applied the same technique in order to determine cellular internalization of liposomal formulations containing cisplatin and oxiplatin, but solutions resulting from lysis and centrifugation of cells were analysed by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) to quantify the platinum accumulated in the cells. They observed that after loading the drug in liposomes, an important increase in cellular uptake was measured. Their hypothesis is that the ability of liposomes to bypass the P-glycoprotein pumps responsible for multidrug resistance can promote a higher uptake of chemotherapeutic agents in resistant cancer cells [76].

#### **IV. 6. Conclusion**

CLSM and FACS are two complementary techniques to evaluate the intracellular fate of liposomal drug delivery systems in cells. Taking into account the wide range of fluorescent compounds that can label liposome constituents, encapsulated materials such as drugs or model molecules and cell components, considerable advances can be made in order to better understand the mechanisms underlying drug-loaded liposome internalization.

Ideally, a study aiming to understand the internalization and intracellular fate of a liposomal drug delivery system, has to both combine CLSM and FACS studies. If the liposome itself, its encapsulated material and one or more organelles (at least the nucleus) are fluorescently labelled, CLSM will bring high-quality information about the doubtless localization of the vector and of its encapsulated material, unlike conventional fluorescence microscopy. Obviously, the choice of adequate negative controls to decrease autofluorescence artefacts, the use of fluorophores exhibiting sufficient brightness levels and signal persistence, the minimization of the bleed-through phenomenon and maintaining PMTs and laser power at the same level for all the pictures compared, will be crucial to obtain these high quality images and to draw any meaningful conclusions. Moreover, particular treatments of cells with inhibitors, for example of endocytosis

pathways, could bring supplementary information to help understand the involved internalization mechanisms. But, the confocal microscopy technique also has its limitations, such as the absence of quantitative measurements of cellular uptake observations; hence the ideal study on cellular uptake has to combine the CLSM with the FACS study. FACS analysis will bring a quantitative dimension to the CLSM conclusions. This technique allows us to compare quantitatively several formulations in terms of cellular internalization.

In spite of intensive research in the field of liposomes for several decades, there are still challenges to take up in order to better deliver the drug from the syringe to the target cell. The better understanding of the mechanisms underlying behaviour of liposomes in biological systems is one of the keys in order to adapt liposomal formulations for enhancing efficacy.

#### **IV. 7. References**

1. Klibanov, A.L., V.P. Torchilin, and S. Zalipsky, *Long-circulating sterically protected liposomes*, in *Liposomes, second edition, a practical approach*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 231-265.
2. Torchilin, V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **71**(3): p. 431-444.
3. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochim. Biophys. Acta, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
4. Ahmad, I., A.K. Sarkar, and B.K. Bachhawat, *Design of liposomes to improve delivery of amphotericin-B in the treatment of aspergillosis*. Mol. Cell. Biochem., 1989. **91**(1-2): p. 85-90.
5. Banerjee, G., et al., *Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes*. J. Antimicrob. Chemother., 1996. **38**(1): p. 145-50.

6. Huwyler, J., J. Drewe, and S. Krahenbuhl, *Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs*. *Int. J. Nanomedicine*, 2008. **3**(1): p. 21-9.
7. Torchilin, V.P., *Affinity liposomes in vivo: factors influencing target accumulation*. *J. Mol. Recognit.*, 1996. **9**(5-6): p. 335-46.
8. Bergstrand, N., et al., *Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes*. *Biophys. Chem.*, 2003. **104**(1): p. 361-379.
9. Kamps, J. and G.L. Scherphof, *Liposomes in biological systems, in liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 267-288.
10. Prasad, T.K., N. Rangaraj, and N.M. Rao, *Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections*. *FEBS Lett.*, 2005. **579**(12): p. 2635-42.
11. Duzgunes, Scedil, and S. Nir, *Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999. **40**(1-2): p. 3-18.
12. Papahadjopoulos, D., G. Poste, and B.E. Schaeffer, *Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles: influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973. **323**(1): p. 23-42.
13. Johnsson, M. and K. Edwards, *Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids*. *Biophys. J.*, 2001. **80**(1): p. 313-23.
14. Paddock, S.W., *Principles and practices of laser scanning confocal microscopy*. *Mol. Biotechnol.*, 2000. **16**(2): p. 127-49.
15. Cremer, C. and T. Cremer, *Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field*. *Microsc. Acta*, 1978. **81**(1): p. 31-44.
16. Dailey, M., et al., *Concepts in imaging and microscopy. Exploring biological structure and function with confocal microscopy*. *Biol. Bull.*, 1999. **197**(2): p. 115-22.

17. Alvarez-Roman, R., et al., *Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004. **58**(2): p. 301-16.
18. Golan, D.E., et al., *Lateral mobility of phospholipid and cholesterol in the human erythrocyte membrane: effects of protein-lipid interactions*. Biochemistry, 1984. **23**(2): p. 332-9.
19. Dagar, S., et al., *VIP receptors as molecular targets of breast cancer: implications for targeted imaging and drug delivery*. J. Control. Release, 2001. **74**(1-3): p. 129-34.
20. Lapinski, M.M. and G.J. Blanchard, *The role of phospholipid headgroups in mediating bilayer organization. Perturbations induced by the presence of a tethered chromophore*. Chem. Phys. Lipids, 2007. **150**(1): p. 12-21.
21. Chen, H., et al., *Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide*. Mol. Cancer Ther., 2009. **8**(7): p. 1955-63.
22. Mady, M.M., et al., *Efficiency of cytoplasmic delivery by non-cationic liposomes to cells in vitro: a confocal laser scanning microscopy study*. Phys. Med., 2009. **25**(2): p. 88-93.
23. Manconi, M., et al., *Intracellular distribution of fluorescent probes delivered by vesicles of different lipidic composition*. Colloids Surf. B Biointerfaces, 2007. **57**(2): p. 143-51.
24. Yang, T., et al., *Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome*. J. Control. Release, 2007. **120**(3): p. 169-177.
25. Kirpotin, D., et al., *Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro*. Biochemistry, 1997. **36**(1): p. 66-75.
26. Lu, J., et al., *Targeted drug delivery crossing cytoplasmic membranes of intended cells via ligand-grafted sterically stabilized liposomes*. J. Control. Release, 2006. **110**(3): p. 505-13.

27. Chekhonin, V.P., et al., *Polyethylene glycol-conjugated immunoliposomes specific for olfactory ensheathing glial cells*. Bull. Exp. Biol. Med., 2008. **145**(4): p. 449-51.
28. Yu, F., et al., *Galactosylated liposomes as oligodeoxynucleotides carrier for hepatocyte-selective targeting*. Pharmazie, 2007. **62**(7): p. 528-33.
29. Claassen, E., *Post-formation fluorescent labelling of liposomal membranes. In vivo detection, localisation and kinetics*. J. Immunol. Methods, 1992. **147**(2): p. 231-40.
30. Gao, J., et al., *Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes*. Int. J. Pharm., 2009. **374**(1-2): p. 145-52.
31. Chen, R.F. and J.R. Knutson, *Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers*. Anal. Biochem., 1988. **172**(1): p. 61-77.
32. Weinstein, J.N., et al., *Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker*. Science, 1977. **195**(4277): p. 489-92.
33. Duzgunes, N., bagatolli, L. A., Meers, P., Oh, Y.-K., Straubinger, R. M. , *Fluorescence methods in liposome research*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin, Weissig, V. , Editor. 2003, Oxford University Press: New York. p. 105-147.
34. Li, L., et al., *Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia*. J. Control. Release, 2010. **143**(2): p. 274-9.
35. Momekova, D., et al., *Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units*. Eur. J. Pharm. Sci., 2007. **32**(4-5): p. 308-317.
36. Simard, P. and J.C. Leroux, *pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells*. Int. J. Pharm., 2009. **381**(2): p. 86-96.
37. Elbayoumi, T.A. and V.P. Torchilin, *Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated*



- liposomes against various tumor cell lines*. Eur. J. Pharm. Sci., 2007. **32**(3): p. 159-68.
38. Obata, Y., S. Tajima, and S. Takeoka, *Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo*. J. Control. Release, 2010. **142**(2): p. 267-276.
39. Song, C.K., et al., *Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake*. Int. J. Pharm., 2009. **380**(1-2): p. 161-169.
40. Xiong, X.B., et al., *Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic*. J. Control. Release, 2005. **107**(2): p. 262-75.
41. Watson, P., A.T. Jones, and D.J. Stephens, *Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2005. **57**(1): p. 43-61.
42. Wong, A.W., S.J. Scales, and D.E. Reilly, *DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(31): p. 22953-63.
43. Fujiwara, T., H. Akita, and H. Harashima, *Intracellular fate of octaarginine-modified liposomes in polarized MDCK cells*. Int. J. Pharm., 2010. **386**(1-2): p. 122-30.
44. Chen, T., et al., *Alkylated derivatives of poly(ethylacrylic acid) can be inserted into preformed liposomes and trigger pH-dependent intracellular delivery of liposomal contents*. Mol. Membr. Biol., 2004. **21**(6): p. 385-93.
45. Tamaddon, A.M., F.H. Shirazi, and H.R. Moghimi, *Modeling cytoplasmic release of encapsulated oligonucleotides from cationic liposomes*. Int. J. Pharm., 2007. **336**(1): p. 174-82.

- 
46. Kullberg, E.B., M. Nestor, and L. Gedda, *Tumor-cell targeted epidermal growth factor liposomes loaded with boronated acridine: uptake and processing*. *Pharm. Res.*, 2003. **20**(2): p. 229-36.
  47. Skalko-Basnet, N., M. Tohda, and H. Watanabe, *Delivery of antisense oligonucleotides to neuroblastoma cells*. *Neuroreport*, 2000. **11**(14): p. 3117-21.
  48. Castelli, D.D., et al., *Evidence for in vivo macrophage mediated tumor uptake of paramagnetic/fluorescent liposomes*. *NMR Biomed.*, 2009. **22**(10): p. 1084-92.
  49. Schnyder, A., et al., *Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes*. *Biochem. J.*, 2004. **377**(Pt 1): p. 61-67.
  50. Wang, X.Y., T. Ishida, and H. Kiwada, *Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes*. *J. Control Release*, 2007. **119**(2): p. 236-244.
  51. Huth, U.S., R. Schubert, and R. Peschka-Suss, *Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging*. *J. Control. Release*, 2006. **110**(3): p. 490-504.
  52. Fonseca, C., et al., *Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005. **59**(2): p. 359-366.
  53. Vercauteren, D., et al., *The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls*. *Mol. Ther.*, 2010. **18**(3): p. 561-9.
  54. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **71**(3): p.409-419.
  55. Lassalle, H.P., et al., *Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC*. *J. Control. Release*, 2009. **134**(2): p. 118-24.

56. Yuh, E.L., et al., *Delivery of systemic chemotherapeutic agent to tumors by using focused ultrasound: study in a murine model*. Radiology, 2005. **234**(2): p. 431-7.
57. Weng, K.C., et al., *Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo*. Nano Letters, 2008. **8**(9): p. 2851-7.
58. Jin, S.E., J.W. Bae, and S. Hong, *Multiscale observation of biological interactions of nanocarriers: from nano to macro*. Microsc. Res. Tech., 2010. **73**(9): p. 813-23.
59. Chiou, A.G., et al., *Clinical corneal confocal microscopy*. Surv. Ophthalmol., 2006. **51**(5): p. 482-500.
60. Fink-Puches, R., et al., *Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology*. J. Cutan. Pathol., 1995. **22**(3): p. 252-9.
61. Maitland, K.C., et al., *In vivo imaging of oral neoplasia using a miniaturized fiber optic confocal reflectance microscope*. Oral. Oncol., 2008. **44**(11): p. 1059-66.
62. Mach, W.J., et al., *Flow cytometry and laser scanning cytometry, a comparison of techniques*. J Clin Monit Comput, 2010. **24**(4): p. 251-9.
63. Cram, L.S., *Flow cytometry, an overview*. Methods Cell. Sci., 2002. **24**(1-3): p. 1-9.
64. Ramanathan, M., *Flow cytometry applications in pharmacodynamics and drug delivery*. Pharm. Res., 1997. **14**(9): p. 1106-14.
65. Cunningham, R.E., *Overview of flow cytometry and fluorescent probes for flow cytometry*, in *Immunocytochemical methods and protocols* O.C.J.M. C., Editor. 2009. p. 319-326.
66. Bellavance, M.A., M.B. Poirier, and D. Fortin, *Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells*. Int. J. Pharm., 2010. **395**(1-2): p. 251-9.
67. Nakano, K., Y. Tozuka, and H. Takeuchi, *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): p. 174-9.*
68. Aso, S., et al., *Effective uptake of N-acetylglucosamine-conjugated liposomes by cardiomyocytes in vitro. J. Control. Release, 2007. 122(2): p. 189-98.*
69. Chebbi, I., et al., *In vitro assessment of liposomal neridronate on MDA-MB-231 human breast cancer cells. Int. J. Pharm., 2010. 383(1-2): p. 116-22.*
70. Engel, A., et al., *Influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells. Pharm. Res., 2003. 20(1): p. 51-7.*
71. Jung, S.H., et al., *Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity. Int. J. Pharm., 2009. 382(1-2): p. 254-61.*
72. Jung, S.H., et al., *Increased stability in plasma and enhanced cellular uptake of thermally denatured albumin-coated liposomes. Colloids Surf. B-Biointerfaces, 2010. 76(2): p. 434-40.*
73. Ruozi, B., et al., *Cidofovir-loaded liposomes: an intro-study using BCBL-1 cell line as a model for primary effusion lymphoma. Eur. J. Pharm. Sci., 2010. 41(2): p. 254-64.*
74. Pagnan, G., et al., *Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD(2)-targeted immunoliposomes: antitumor effects. J. Natl. Cancer Inst., 2000. 92(3): p. 253-61.*
75. Zeisig, R., et al., *Liposomal 4-hydroxy-tamoxifen: effect on cellular uptake and resulting cytotoxicity in drug resistant breast cancer cells in vitro. Breast Cancer Res. Treat., 2004. 87(3): p. 245-54.*
76. Charest, G., et al., *Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation. J. Neurooncol., 2010. 97(2): p. 187-93.*

## **OBJECTIFS ET PLAN DE THESE**



Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet PEPSEIN, financé par la Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Énergie du Ministère de la Région Wallonne. Ce projet a pour objectif l'étude et le développement de formulations de peptides antagonistes d'oncoprotéines impliquées dans le cancer du sein. L'incidence particulièrement élevée du cancer du sein dans nos sociétés occidentales justifie le développement d'une substance active qui ciblerait spécifiquement une oncoprotéine impliquée dans la physiologie du cancer, sans affecter celle des cellules saines de l'organisme. Cette spécificité permettrait non seulement de diminuer les effets indésirables mais aussi de proposer un traitement plus efficace, permettant d'améliorer les taux de rémission.

La formulation d'un vecteur du peptide Print3G, sélectionné sur la base des travaux effectués par les autres partenaires du projet, a été réalisée au moyen de liposomes. En effet, les liposomes présentent un intérêt certain pour l'administration par voie intraveineuse de substances actives. Biocompatibles et inertes, ils sont de bons candidats pour la vectorisation de peptides et constituent la base nécessaire à leur stabilité sanguine, au ciblage des cellules tumorales et à leur accumulation dans la tumeur.

La première partie de ce travail sera consacrée au développement et à l'optimisation de deux formulations de liposomes pegylés encapsulant le peptide Print3G. La première contient du polyéthylène glycol (PEG) 2000, connu pour augmenter la rémanence vasculaire des liposomes. Pourtant, ces propriétés de stabilisation pourraient diminuer la capacité d'interaction du liposome avec la membrane cellulaire. C'est pourquoi la seconde formulation de liposomes développée contient du PEG<sub>750</sub>, afin de trouver un compromis entre la rémanence vasculaire prolongée et une interaction cellulaire optimale.

Dans cette partie, une étude de la stabilité du peptide sera présentée. Le développement d'une méthode de préparation des liposomes et son optimisation grâce aux plans d'expériences seront réalisés. Enfin, une étude de la stabilité des formulations et de leur cryoprotection sera également présentée.

Dans le deuxième chapitre, ces deux formulations seront étudiées en terme de pénétration cellulaire. Une troisième formulation de liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> sera développée, dans le but d'améliorer la libération du peptide dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. Pour mener à bien cette étude *in vitro*, une méthode de filtration des liposomes en condition aseptique pour leur stérilisation et un procédé d'élimination du chloroforme résiduel seront développés et validés selon les méthodes préconisées par la Pharmacopée Européenne.

Enfin, le troisième chapitre sera consacré à l'étude *in vivo* de l'accumulation des vecteurs dans des modèles de développement tumoral. Les deux modèles choisis sont, d'une part, le développement de tumeurs sur membrane chorioallantoïque de poulet et, d'autre part, le développement sous cutané de tumeurs chez la souris immunodéficente. La toxicité *in vitro* des liposomes ainsi que leurs propriétés d'inhibition de l'adhésion d'une protéine globulaire à leur surface seront également discutés.



## **PARTIE EXPERIMENTALE**



**CHAPITRE 1: DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE  
LIPOSOMES PEGYLÉS ENCAPSULANT LE PEPTIDE  
PRINT3G**

## I. 1. INTRODUCTION

Deux formulations de liposomes ont été développées pour vectoriser le peptide Print3G par voie intraveineuse. Elles contiennent de la phosphatidylcholine, du cholestérol et du PEG greffé à un phospholipide. Le cholestérol possède des propriétés de stabilisation des membranes phospholipidiques et le PEG a été ajouté dans le but d'obtenir des liposomes furtifs, présentant une rémanence vasculaire prolongée. Les deux formulations diffèrent par la masse moléculaire du PEG utilisé. La première formulation contient du PEG<sub>2000</sub>. Dans la littérature, celui-ci est souvent utilisé dans les formulations de liposomes destinés à la voie intraveineuse. L'augmentation de la stabilité sanguine de formulations contenant ce type de PEG a été démontrée. Il permet de recouvrir la surface de la vésicule et empêche l'adsorption de protéines plasmatiques à leur surface. Par contre, en formant cette barrière stérique autour du liposome, il diminuerait sa capacité d'interaction avec la membrane cellulaire. C'est pourquoi la seconde formulation de liposomes développée contient du PEG<sub>750</sub>. L'hypothèse est qu'une formulation contenant un PEG de plus petite masse moléculaire permettrait de maintenir une rémanence vasculaire prolongée ainsi qu'une interaction avec les membranes cellulaires suffisante.

L'objectif de ce chapitre est de développer deux formulations de liposomes furtifs conventionnels que nous appellerons « classiques », dont la composition diffère par la masse moléculaire du PEG greffé. Leur caractérisation physicochimique et l'optimisation de leurs méthodes de préparation seront présentées dans ce chapitre.

Le développement de liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> et encapsulant le peptide Print3G a fait l'objet d'une première étude. L'optimisation de l'encapsulation du peptide dans ces liposomes et leur caractérisation ont été présentés dans la publication intitulée: « *The experimental design as practical approach to develop and optimize a formulation of peptide-loaded liposomes* ». La méthode

analytique de dosage du peptide Print3G par CLHP et sa validation y sont également discutées.

Ensuite, les conditions expérimentales optimales définies par cette première étude ont été appliquées à la formulation de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub>. Une étude de stabilité du peptide Print3G en solution aqueuse et des deux formulations de liposomes pegylés ainsi que des essais de cryoprotection des formulations ont également été réalisés.

## **I. 2. OPTIMISATION DE LA METHODE DE PREPARATION DE LIPOSOMES CLASSIQUES CONTENANT DU PEG<sub>2000</sub> ET ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G**

### **I. 2. 1. Résumé des résultats de la publication**

La méthode de dosage du peptide par CLHP a été mise au point et validée. Etant donné l'adsorption du peptide sur différents types de surfaces, la méthode d'encapsulation dans les liposomes vides par cycles de congélation-décongélation a été adoptée afin de limiter les pertes en peptide. Des liposomes blancs, préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique, sont mélangés à une solution de peptide Print3G et des cycles de congélation-décongélation sont appliqués pour promouvoir l'entrée du peptide dans les liposomes. Puisque de nombreux facteurs peuvent influencer l'encapsulation du peptide, une planification expérimentale a été mise en œuvre de façon à optimiser le taux d'encapsulation. Cette étude a été réalisée pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub>. Le plan d'expériences a permis de définir les conditions expérimentales en vue d'obtenir le meilleur taux d'encapsulation tout en minimisant le nombre d'essais à réaliser.

La première étape de *screening* a été réalisée grâce à un plan de Plackett-Burman afin d'identifier les paramètres influençant l'encapsulation. Pour chaque paramètre, trois niveaux ont été évalués et la réponse expérimentale a été exprimée en terme de taux d'encapsulation ( $EE_p$ ). Grâce à ces résultats, l'influence positive du nombre de cycles de congélation-décongélation et de la concentration en excipients utilisés pour la fabrication des liposomes (que nous appellerons par la suite « concentration en lipides ») a été mise en évidence. Au contraire, le temps de mélange et la concentration en peptide n'ont pas d'influence significative et seront donc maintenus respectivement au niveau le plus bas et au niveau intermédiaire.

Dans un second temps, l'*optimisation* a permis de déterminer la combinaison optimale des paramètres identifiés par le screening comme influençant

positivement l'encapsulation. A la figure I.2.1., la surface de réponse met en évidence les conditions optimales d'encapsulation du peptide Print3G.

Pour obtenir le meilleur taux d'encapsulation, les liposomes doivent en théorie être préparés dans les conditions suivantes :

- *concentration en lipides* : SPC:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (36.1:36.1:4, mM)
- *concentration en peptide* : 100  $\mu$ M
- *nombre de cycles de congélation-décongélation* : 11
- *temps de mélange entre chaque cycle* : 10 secondes

En appliquant ces conditions optimales, le taux d'encapsulation s'élève à  $62,7 \pm 2,9$  % (n=3), résultat très proche de la réponse prédite ( $64,7 \pm 3,5$  %).

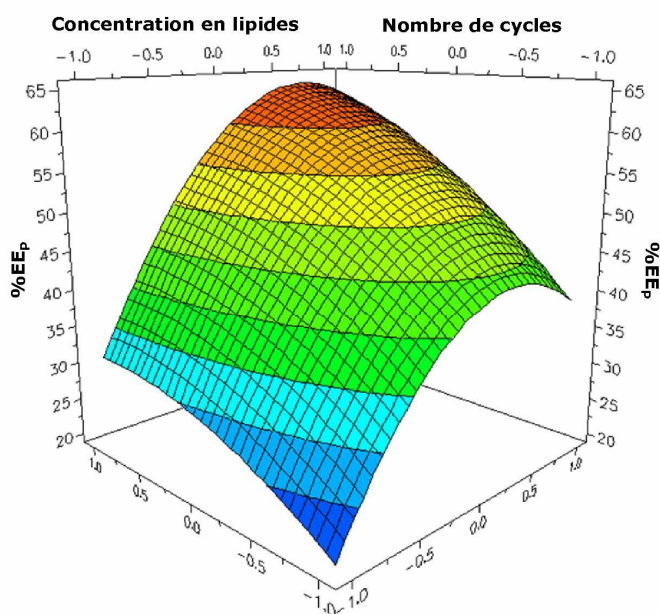


Figure I.2.1. Surface de réponse du procédé d'encapsulation du peptide Print3G au sein de liposomes contenant des PEG<sub>2000</sub>.

## **I. 2. 2. Publication**

### **THE EXPERIMENTAL DESIGN AS PRACTICAL APPROACH TO DEVELOP AND OPTIMIZE A FORMULATION OF PEPTIDE-LOADED LIPOSOMES**

E. Ducat<sup>a\*</sup>, M. Brion<sup>a</sup>, F. Lecomte<sup>b</sup>, B. Evrard<sup>a</sup> and G. Piel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liege, B36, Tour 4, Avenue de l'hôpital, 1, 4000, Liege, Belgium.

<sup>b</sup> Laboratory of Analytical Chemistry, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liege, Liege, Belgium.

Ce chapitre est publié dans AAPS PharmSciTech (2010), 11, 966-975



### **I. 2. 2. 1. Abstract**

To investigate the encapsulation of Print3G, a peptidic agent that could reduce the angiogenic development of breast tumors, pegylated liposomes used as intravenous vectors were studied and characterized. Recently, the path of liposomes has been explored with success to improve the pharmacological properties of peptidic drugs and to stabilize them. In this study, loaded unilamellar vesicles composed of SPC:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-DSPE (47:47:6, %mol) were prepared by the hydration of lipid film technique. An HPLC method was developed and validated for the determination of Print 3G to calculate its encapsulation efficiency. Observed Print 3G adsorption on different materials employed during liposome preparation (such as glass beads, tubing, and connections for extrusion) led to the modification of the manufacturing method. The freeze-thawing technique was used to enhance the amount of Print 3G encapsulated into blank liposomes prepared using the hydration of lipid film procedure. Many factors may influence peptide entrapment, namely the number of freeze-thawing cycles, the lipid concentration, the peptide concentration, and the mixing time. Consequently, a design of experiments was performed to obtain the best encapsulation efficiency while minimizing the number of experiments. The lipid concentration and the number of freeze-thawing cycles were identified as the positive factors influencing the encapsulation. As a result of the optimization, an optimum was found and encapsulation efficiencies were improved from around 30% to 63%. Liposome integrity was evaluated by photon correlation spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy to ensure that the selected formulation possesses the required properties to be a potential candidate for further in vitro and in vivo experiments.

**Keywords:** design of experiments; drug delivery system; freeze-thawing; liposomes; peptide

**I. 2. 2. 2. Introduction**

Solid tumors, whose expansion is directly related to the unregulated growth of cells and changes in the microenvironment, require the development of new blood vessels in order to develop and reach maturity [1,2]. Tumor cells need blood supply for growth, invasion and metastasis; their diameter cannot exceed 2–3 mm if vascularization is not sufficient for nutrient supply, waste removal, and exchange of gases. Thus, tissue invasion and the presence of metastasis are directly correlated with microvessel density [3]. Angiogenesis, defined by the growth of new blood vessels from an existing vasculature [4], is observed in physiological pathways during embryogenesis, fetal development, and, in the adult, it occurs transiently during the female reproductive cycle and wound healing [3]. By contrast, tumor angiogenesis appears when tumor cells, surrounding stromal and inflammatory cells release soluble factors, producing an “angiogenic switch” in favor of tumor vasculature development, triggered by various signals such as metabolic or mechanical stress, immune or inflammatory response or genetic mutations [5].

Use of antiangiogenic therapy presents several advantages such as the broad applicability to different tumor locations, the possibility of developing more selective treatments—with minimal side effects that could be associated with other types of cancer targets— and a partial independence of tumor cell resistance mechanisms. However, this therapy also presents some difficulties related to the heterogeneous characteristics of tumor vasculature [3]. Print3G, a hydrophilic 25-aa peptide (MW=3,000) is an antagonist of oncoprotein involved in breast cancer and may reduce the angiogenic development of breast tumors, leading to tumor dormancy. Unfortunately, only a few biologically active peptides are successfully used in clinical medicine because administration of peptidic drugs presents several drawbacks, related to their rapid elimination from the blood circulation by the lymphatic system, enzymatic degradation, uptake by the reticulo-endothelial system (RES) and non-selective accumulation [6-10].

The necessity of intravenous administration of Print3G led to the development of pegylated liposomes as drug carriers. Recently, several studies explored with success the path of liposomes for the administration of different peptides [7, 11-12]. Liposomes, spherical structures composed of one or several phospholipid bilayers, possess many attractive characteristics to stabilize peptidic drugs and to improve their pharmacological properties. Being biocompatible and biodegradable, they cause no or very mild antigenic, pyrogenic, allergic, and toxic reactions. They can entrap hydrophilic drugs within their aqueous compartment, lipophilic compounds in their membrane or amphipathic drugs. First generation liposomes have been shown to be easily eliminated from the bloodstream and accumulated in the Kupfer cells in the liver and in spleen macrophages [13]. Therefore, the strategy has been to graft polymers onto nanoparticles and particularly onto liposomal phospholipids with polyethylene glycol (PEG). Cholesterol was added to the formulation because of its stabilizing properties [14]. The increase in circulation lifetime by PEG<sub>2000</sub> was demonstrated by Dos Santos et al., who showed an enhancing of vascular remanence for the surface-grafted PEG liposomes, preventing aggregation and building a steric barrier around the liposome, in comparison with non-grafted vectors [14]. PEGs are synthetic, inert, and biocompatible polymers, allowing the formation of a protective layer on the particle surface, providing protection against opsonization and capture by the RES [15]. These two properties, namely the increase in circulation time and the decrease in capture by the RES, explain the enhanced permeability and retention effect, applicable to almost all rapidly growing solid tumors [16]. The enhanced extravasations of macromolecules from blood vessels to tumor and their retention within these tissues, due to the anatomical and permeability particularities of tumors, represent a phenomenon not observed in normal tissue, leading to a passive targeting towards affected tissues. In fact, tumor endothelium possesses anatomical and physiological abnormalities in comparison with normal endothelium, such as disorganized anatomy and blood flow, high vascular permeability (large fenestrations amounting to 400–600 nm in diameter), and a lack of smooth muscle layer and

efficient lymphatic system [5,17]. Therefore, pegylated liposomes, too large to be collected by fenestrated organs such as the liver, will passively accumulate in solid tumor.

The purpose of this study was to investigate the encapsulation of Print3G into pegylated liposomes made of SPC:CHOL:PEG-2000-DSPE (47:47:6, molar% ratio) and to characterize these vesicles. Small unilamellar vesicles (SUV) were produced and their integrity was evaluated by photon correlation spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy. An HPLC method was developed and validated for the determination of Print3G so as to calculate its encapsulation efficiency. Because many factors may influence drug encapsulation into a liposome, a design of experiments was built to obtain the best encapsulation efficiency while minimizing the number of experiments. Performing only those experiments at critical points of the model consumes a lesser quantity of the active principle, which, in the case of peptidic drugs, is very expensive. With this in mind, this study proposes a practical approach based on the theory of experimental design, expected to facilitate and accelerate the development of novel liposomal formulations. Our aim was to identify the critical parameters for attaining the optimal encapsulation of a peptidic drug into a suitable vector in order to obtain a potential candidate for further in vitro and in vivo studies.

### **I. 2. 2. 3. Material and methods**

#### *I. 2. 2. 3. 1. Materials*

Soybean phosphatidylcholine (SPC; purity, 98%) and N-(carbonyl-methoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoylsn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt (PEG-2000-DSPE, purity>95%) were provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol (CHOL, purity>95%) and trifluoroacetic acid (TFA, purity >99%) were purchased from Sigma- Aldrich (Bornem, Belgium). Print3G (purity, 98.44%) was acquired from GL Biochem (Shanghai, China). HPLC grade acetonitrile (LiChrosolv®) was supplied by Merck

(Darmstadt, Germany). Water was deionized using the Millipore system (18.2 M $\Omega$ /cm resistivity) and was filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore Millipak®-40 disposable filter unit (Millipore Corporation, USA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

#### *I. 2. 2. 3. 2. Liposome preparation*

Unilamellar vesicles made of SPC:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-DSPE (47:47:6, molar% ratio) were prepared by the hydration of lipid film method. Briefly, required amounts of SPC, CHOL, and PEG<sub>2000</sub>-DSPE were dissolved in 3 ml chloroform and were evaporated under reduced pressure in a round-bottomed flask in order to form a thin lipid film. The film was hydrated using a vortex mixer with 3 ml of 50  $\mu$ M Print3G solution in 0.22- $\mu$ m-filtered 10 mM HEPES buffer, containing 67 mM NaCl and was adjusted to pH 7.4 with 0.1 N NaOH solution. The obtained suspension was extruded five times through a 0.2  $\mu$ m Nucleopore polycarbonate membrane (Whatman International Ltd, Maidstone, UK). A second preparation method using freeze-thawing cycles was also used. In practice, blank liposomes were prepared by the hydration of lipid film method described previously. The hydration of the thin film was performed with 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer. Thereafter, the blank liposome suspension was mixed with 1.5 ml of 100, 200, or 300  $\mu$ M Print3G solution in HEPES buffer, frozen for 1 min at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen and thawed for 5 min at  $30^{\circ}\text{C}$  in a water bath. One, three, six, or 11 cycles were performed to promote the entry of Print3G into the vesicles. Between each cycle, the suspension was mixed for 10, 60, or 110 s using a vortex mixer. Liposomes prepared by the hydration of lipid film method or by the freeze-thawing method underwent two ultracentrifugations at 35,000 rpm for 3 h 30 at  $4^{\circ}\text{C}$  using the Beckman SW60 rotor (86,496 $\times$ g) to remove free Print3G.

*I. 2. 2. 3. Determination of encapsulation efficiency*

## Print3G Determination

An HPLC method with UV/visible diode array detector (DAD) was developed and validated for the determination of Print3G. The HPLC equipment consisted of a Hewlett-Packard 1100 series (Agilent Technologies, USA). Ten-microliter samples were injected on a Zorbax 300 SB-C18 (3.5  $\mu\text{m}$ , 150 $\times$ 4.6 mm I.D. from Agilent) in an oven set at 35°C with a mobile phase containing water and acetonitrile (ACN). Both solvents were acidified with 0.1% of TFA. The applied gradient was as follows: 18–22.8% ACN from 0 to 20 min, 100% ACN at 25 min, and 18% at 25.2 min. Finally, the column was equilibrated by an isocratic mobile phase water-ACN (82:18, v/v) for 9.8 min before the next injection. The flow rate was set at 1.0 ml/min. Detection was achieved with the DAD detector at an absorbance wavelength of 220 nm. Calibration and validation standards of Print3G were prepared in HEPES buffer at three concentration levels: 12.5, 25.0, and 125.0  $\mu\text{g/ml}$  and were stored in the dark at 4°C. Each series was prepared in duplicate for the calibration standards and in triplicate for the validation standards. The e.noval® software V2.0 (Arlenda, Liège, Belgium) was used to compute the accuracy profile and validation results.

## Encapsulation Efficiencies

Encapsulation efficiency (EE) may be expressed in two ways:

1. EE in terms of the quantity of peptide loaded into liposomes as a function of the quantity operated ( $EE_p$ ).

This EE was calculated by the following equation (Eq. 1).

$$EE_p = \left( 1 - \frac{\text{Amount of free Print3G}}{\text{Total amount of Print3G}} \right) \times 100 \quad (1)$$

where the “amount of free Print3G” is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) present in the supernatants harvested after the successive ultracentrifugations and the “total amount of Print3G” is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) implemented.

2. EE in terms of the quantity of peptide loaded into liposomes as a function of the quantity of lipids ( $\text{EE}_L$ ).

This EE was calculated by the following equation (Eq. 2).

$$\%EE_L = \left( \frac{\text{Total Amount of Print3G} - \text{Amount of free Print3G}}{\text{Total amount of phospholipids}} \right) \times 100 \quad (2)$$

where the “total amount of Print3G” is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) implemented, the “amount of free Print3G” is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) present in the supernatants harvested after the successive ultracentrifugations and the “total amount of lipids” is the amount of lipids (in  $\mu\text{g}$ ) present in the liposome suspensions, determined by an enzymatic method (LabAssay Phospholipid, choline oxidase—DAOS method, Wako Chemicals, Neuss, Germany). Phospholipids are hydrolyzed to choline in a reaction catalyzed by phospholipaseD. The oxidation of choline in betaine by choline oxidase leads to a quantitative production of hydrogen peroxide, which causes DAOS and 4-aminoantipyrine to undergo an oxidative condensation catalyzed by peroxidase, producing a blue pigment. The amount of phospholipids contained in the sample is determined by measuring the absorbance at 600 nm of the blue color (spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 11).

#### *1. 2. 2. 3. 4. Design of experiments*

Data were fitted by means of multiple linear regressions (MLRs) and were analyzed using the statistical software package Modde 6.0 (Umetrics AB, Sweden). All experiments were carried out in a randomized order to minimize

the effect of unexplainable variability in the observed response due to irrelevant factors.

#### Screening Study

The screening study was performed using a Plackett–Burman design in order to find the relevant main parameters of the peptide encapsulation efficiency [18]. Four experimental factors were investigated through a design matrix of 11 experiments (N=8, N0=3) using a simple linear model (Eq. 3):

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i \quad (3)$$

where Y is the dependent variable,  $\beta_i$  represents the parameter estimates,  $X_i$  is the level of the independent variables, and  $\beta_0$  is the model constant. The experimental response was expressed in terms of encapsulation efficiency (%EE<sub>p</sub>) and the parameters were as follows:

- (1) peptide concentration (PC),
- (2) lipid concentration (LC),
- (3) number of freeze-thawing cycles (NC), and
- (4) mixing time (MT).

The extreme levels of each factor were set based on preliminary experiments and the literature. Prior to any investigations, the normality of data and residues were checked by using the Shapiro–Wilk normality test (N=11,  $\alpha=5\%$ ) and N-probability plot, respectively. Finally, the significance of each variable was tested using both the coefficients plot and confidence intervals ( $\alpha=5\%$ ). Symbols and coded and actual levels of variables of the screening study are shown in Table 1.

#### Optimization Study

The optimization study was performed using a central composite face-centered design ( $\alpha=1$ ) in order to find the optimal conditions of the peptide encapsulation. The main relevant parameters, found in the screening study (lipid



concentration and number of freeze-thawing cycles), were investigated through a design matrix of 12 experiments (N=8, N0=4) using a quadratic model (Eq. 4):

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_{i>j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_i \beta_{ii} X_i^2 \quad (4)$$

where Y is the dependent variable,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$ ,  $\beta_{ii}$  are the parameter estimates,  $X_{i,j}$  are the levels of the independent variables and  $\beta_0$  is the model constant. Before any investigations were carried out, diagnostic plots were examined to find eventual outliers, required transformations, and to ensure MLR was meaningful. The N-probability plot, residuals plot and Shapiro–Wilk test (N=12,  $\alpha=5\%$ ) were used for this purpose. Model adequacy was confirmed by ANOVA analysis. Finally, the retained quadratic model was expressed, graphically, in terms of response surface model. The Nedler–Mead simplex method was used to find the optimal conditions for the peptide encapsulation. The theoretical maximum response was predicted ( $\alpha=5\%$ ) and compared to the corresponding experimental value. Symbols and coded as well actual level of the variables of the optimization study are shown in Table 1.

Table 1. Experimental conditions for the screening and optimization studies.

Symbol	Factors	Experimental values (screening)		Experimental values (optimization)	
		Low level (-1.0)	High level (+1.0)	Low level (-1.0)	High level (+1.0)
$X_1$ (PC)	Peptide concentration ( $\mu\text{M}$ )	50	150	100	
$X_2$ (LC)	Lipid concentration (SPC : Chol : PEG-PE) (mM)	(20:20:2.5)	(40:40:5)	(20:20:2.5)	(40:40:5)
$X_3$ (NC)	Number of freeze-thawing cycles	1	11	1	11
$X_4$ (MT)	Mixing time (sec)	10	110	10	

*I. 2. 2. 3. 5. Evaluation of liposome integrity*

Liposome integrity was evaluated by photon correlation spectroscopy (PCS) and freeze-fracture electron microscopy to ensure that the selected formulation possesses the required properties in terms of shape and size for further intravenous administration of the encapsulated peptide.

Photon correlation spectroscopy

Liposome dispersions were measured by PCS (HPPS, Malvern Instruments). Measurements were made at 25°C with a fixed angle of 90°. Quoted sizes, measured after ultracentrifugation, represented the average mean for the liposomal hydrodynamic diameter (nm). The polydispersity index expressed the size distribution width. Measurements were made before and after freeze-thawing cycles to ensure that liposome size remained acceptable after freeze-thawing cycles.

Freeze-fracture electron microscopy

Freeze-fracture replicas of liposome suspensions were analyzed under transmission electron microscopy. In practice, a drop of liposome suspension, containing 20% (v/v) glycerol as a cryoprotectant, was deposited into a small gold cup and rapidly frozen in liquid nitrogen. Fracturing, freeze etching, and shadowing with Pt-C were performed at -100°C in shadowing equipment (Balzers® BAF-400) fitted with a freeze-fracture and etching unit. The replicas were examined with a JEOL (JEM-100SX) transmission electron microscope, operating at 80 kV accelerating voltage.

## I. 2. 2. 4. Results and discussion

### I. 2. 2. 4. 1. Peptide determination method

The analytical method was developed to ensure the separation between Print3G and its manufacture and degradation impurities, which interfere at the time of retention, and to obtain a suitable peptide peak shape. The aim of the validation was to determine the suitability of the method for its intended use and consequently to prove the reliability of the obtained results within well-defined limits. The acceptance limits were set at  $\pm 5\%$  and the  $\alpha$ -risk at 5%. Several widely recognized validation criteria were evaluated, including trueness (systematic error), precision (random error), accuracy, and limits of detection and quantification. The present method was validated using the accuracy profile approach. From the results obtained, the mean relative bias and the upper and lower  $\beta$ -expectation tolerance limits at 95% were determined (Table 2). The best and simplest response function was achieved with the linear regression, and the upper and lower  $\beta$ -expectation tolerance limits (%) did not exceed the fixed acceptance limits ( $\pm 5\%$ ) for each concentration level. Using the accuracy approach, this validation provides the guarantee that each further measurement of the unknown samples is included within the tolerance limits. The method was found to be accurate over a concentration range from 12.45 to 124.5  $\mu\text{g/ml}$  and the limit of detection was evaluated at 2.192  $\mu\text{g/ml}$ .

Table 2. Method validation for Print3G determination.

Level	Response function	Mean introduced concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative bias (%)	Relative $\beta$ -expectation tolerance limits (%)
1.0		124.5	0.2426	[-4.212 , 4.697]
2.0	Linear regression	49.82	-0.2094	[-2.808 , 2.390]
3.0		12.45	-1.462	[-4.522 , 1.597]

*I. 2. 2. 4. 2. Preparation of liposomes*

## Preparation of liposomes by the hydration of lipid film method

Peptide-loaded liposomes were initially prepared by the hydration of lipid film method. However, when the potential Print3G adsorption onto materials employed to prepare loaded liposomes was evaluated, a significant loss of Print3G was observed. The loss of peptide after each step of the manufacturing process was evaluated: mixing without glass beads; mixing with glass beads; mixing in a polypropylene tube; extrusion without PC membrane; and extrusion after passage on PC membrane. Concentration of the five harvested solutions was determined by HPLC and the loss of Print3G was expressed in terms of mean percentage and standard deviation of three replicates (Table 3).

Table 3. Peptide average loss of Print3G solution (40 µg/ml) by adsorption during the manufacturing of liposomes by hydration of lipid film (n=3).

	<b>Average Loss (%)</b>	<b>Standard Deviation (SD)</b>
Mixing with glass beads	28.83	19.55
Mixing without glass beads	2.83	0.74
Mixing in a propylene tube	0	0
Extrusion without a PC membrane	53.43	15.96
Extrusion with a PC membrane	66.06	16.64

When a 16.6 µM Print3G solution was mixed with glass beads during the lipid film hydration, a concentration decrease of 28.83±19.55% was observed. After one extrusion on a 0.2 µm PC membrane, average loss amounted to 66.06 ± 16.64%. As shown in Table 3, a significant loss of Print3G was observed during the manufacturing process, associated with an important standard deviation. Because of its consequent adsorption, no significant amount of peptide could be encapsulated.

A few studies [19-22] have already described the adsorption of peptides onto solid surfaces, in particular, using pipette tips, reaction vials, tubing, and connections for extrusion. This adsorption is believed to be due to non-covalent interactions and to depend upon experimental conditions (peptide properties, physical state of the surface, and sample environment properties).

Consequently, the freeze-thawing technique was investigated to promote the entry of peptide into blank liposomes, avoiding the contact of Print3G with the manufacturing materials used.

#### Preparation of liposomes by the freeze-thawing method

The first results obtained by the second manufacturing method were produced with parameters chosen on the basis of the literature [23,24]: three freeze-thawing cycles, a lipid concentration of 50 mM, and 10 s of mixing time. The Print3G concentration was 50  $\mu$ M. Encapsulation efficiencies amounted to  $26.20 \pm 7.98\%$ ,  $n=3$  ( $EE_p$ ) and to  $0.26 \pm 0.07\%$ ,  $n=3$  ( $EE_l$ ).

In order to evaluate the potential loss of Print3G with this second method, a 50  $\mu$ M Print3G solution was quantified after 11 freeze-thawing cycles ( $100.91 \pm 1.28\%$ ,  $n=3$ ) and after ultracentrifugation cycles ( $100.69 \pm 1.77\%$ ,  $n=3$ ), demonstrating that no significant loss was observed.

Because many factors may influence the entrapment of peptide into the vesicles: the number of freeze-thawing cycles, lipid concentration, peptide concentration, and mixing time, a design of experiments was performed (for the screening, a Plackett and Burman plan and for the optimization, a central composite design).

#### *I. 2. 2. 4. 3. Design of experiments*

##### Screening study

Encapsulation efficiency was studied as a function of four parameters:

1. peptide concentration,
2. lipid concentration,

3. number of freeze-thawing cycles, and
4. mixing time.

Symbols and coded and actual level of variables plus the experimental design of the screening study are shown in Tables 1 and 4. The experimental results of the Plackett–Burman design are indexed in Table 4.

Table 4. Plackett-Burman design matrix with corresponding experimental results.

Run order	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	%EE <sub>p</sub>
11	-1	-1	-1	1	6.98
8	-1	1	-1	-1	51.45
9	1	-1	1	-1	34.67
4	1	1	1	1	55.96
10	-1	-1	-1	-1	20.03
3	1	1	-1	1	39.95
6	-1	-1	1	1	36.15
7	1	1	1	-1	56.67
5	0	0	0	0	37.42
2	0	0	0	0	41.36
1	0	0	0	0	42.35

The Shapiro–Wilk test clearly showed that the normality of the collected data was ensured and, consequently, no normalization transformation was required ( $G_{\text{calc}}=0.930$  is larger than  $G_{\text{table}}=0.850$ ). After fitting the simple linear model, statistical analysis demonstrated the normality of the residues, as can be seen in Figure 1a. Indeed, in the N-probability plot, deleted studentized residuals are plotted on a cumulative normal probability scale. The deleted studentized residual is the raw residual,  $e_i$ , divided by its “deleted standard deviation”, which is the residual standard deviation computed with observation  $i$  left out of the analysis. The points on this plot form a nearly linear pattern, which indicates that the normal distribution was a good model for the residues of the linear model.

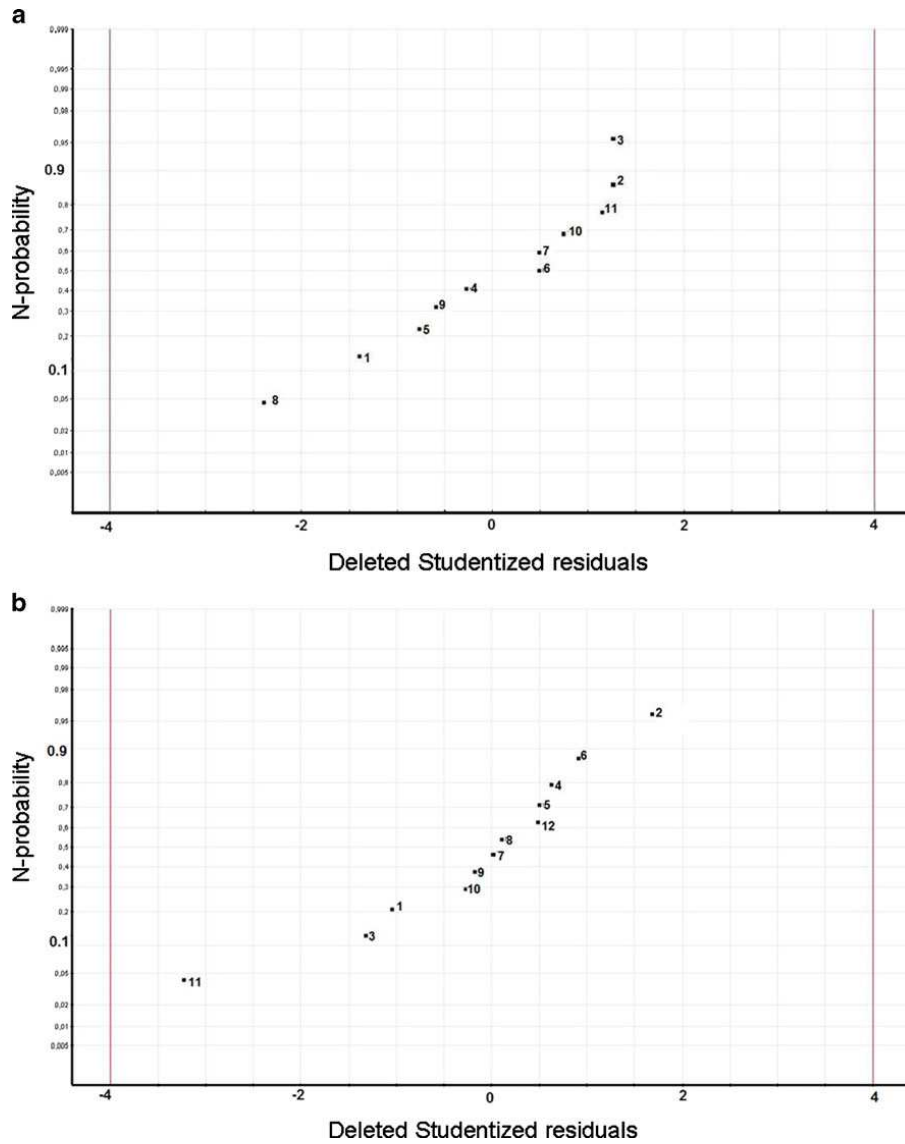


Figure 1. Residual analysis. N-probability plot of residues **a)** for the screening study; **b)** for the optimization. **c)** The residuals plot (versus predicted response) for the second-order polynomial model used during the optimization. The reference line at 0 emphasizes that the residuals are split about 50–50 between positive and negative.

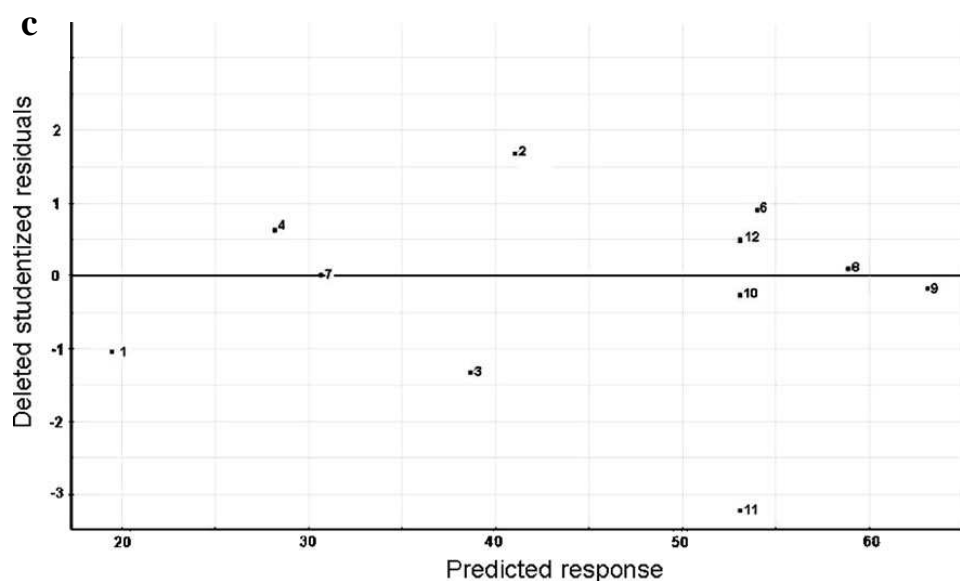


Figure 1. Residual analysis (*continued*). **a**) N-probability plot of residues *a* for the screening study; **b**) for the optimization. **c**) The residuals plot (versus predicted response) for the second-order polynomial model used during the optimization. The reference line at 0 emphasizes that the residuals are split about 50–50 between positive and negative.

Normality conditions fulfilled, the significant parameters of the peptide encapsulation were determined using the coefficients plot (Figure 2), which illustrates the influence of all factors on response with clearly stated 95% confidence intervals. All factors in the studied model were characterized by a *p* value. The smaller the *p* value, the greater the influence of the parameter concerned on the model. From the information given by the coefficients plot, we can infer that the lipid concentration and the number of the freeze-thawing cycles had a positively significant effect on the peptide encapsulation. By contrast, the peptide concentration and the mixing time were considered as not



significant and were disregarded for the optimization step. Using the calculated parameter estimators, the simple linear model can be written as follows (Eq. 5):

$$EE_p(\%) = 39.18 - 3.25PC + 13.90LC + 8.75CN - 1.97VT + \varepsilon \quad (5)$$

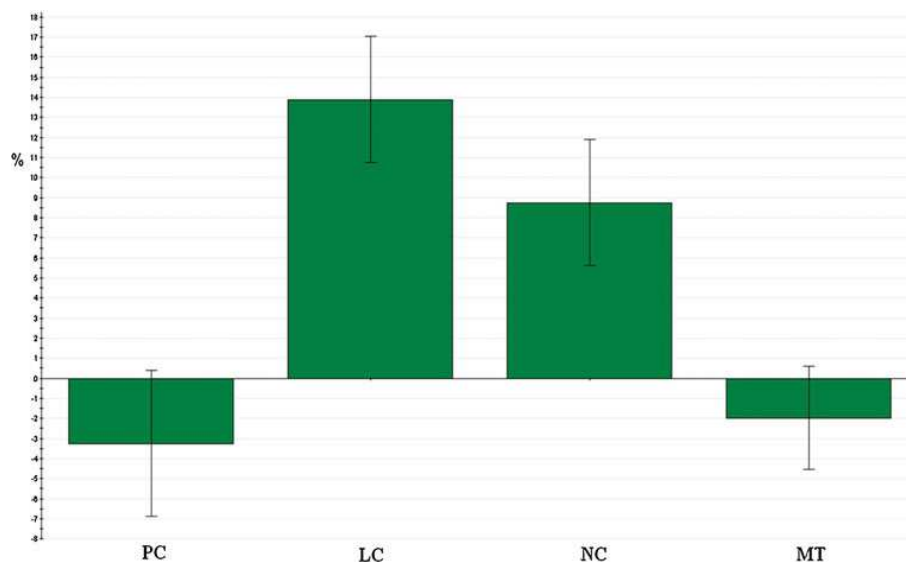


Figure 2. Coefficients plot for the simple linear model (screening).  
PC peptide concentration, LC lipid concentration, NC number of freeze-thawing cycles, MT mixing time.

#### Optimization study

During the optimization, the two relevant parameters, found in the previous screening study (the lipid concentration and the number of freeze-thawing cycles), were optimized using a central composite face-centered design. Other factors were kept constant throughout this study. This particular type of design was chosen because the optimal conditions were expected to be found close to the extreme level, for at least one of the studied parameters. All the results are indexed in Table 5.

Table 5. Central composite face centered design matrix with experimental results.

Run order	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	%EE <sub>p</sub>
3	-1	-1	18.51
8	0	-1	43.14
1	1	-1	37.55
4	-1	0	29.15
7	0	0	54.06
5	1	0	55.36
2	-1	1	30.69
11	0	1	59.03
9	1	1	62.94
12	0	0	52.57
10	0	0	49.5
6	0	0	54.02

Before further investigation, data normality was tested using the Shapiro–Wilk test, which indicated that a normalization transformation was required ( $G_{calc}=0.921$  is larger than  $G_{table}=0.859$ ). After fitting the second-order polynomial model, the analysis of residues was performed. The N-probability plot demonstrated the normality of the residues (Figure 1b) and that the residuals plot (Figure 1c) did not exhibit any particular structure, emphasizing the adequacy of the used model.

At this point, the ANOVA analysis of the retained model was undertaken. The first decomposition, in ANOVA, split the total variation into two parts (Eq. 6) and was used to test the significance of the regression model.

$$SS_{total} = SS_{regression} + SS_{residual} \quad (6)$$

$SS_{total}$  represents the total variation of the selected response,  $SS_{regression}$  the amount of the variation that can be modeled, and  $SS_{residual}$  the amount of the variation that cannot be modeled. The size of the corresponding variances was

compared by an F test ( $\alpha=5\%$ ). As shown in Table 6, the variance explained by the quadratic model was significantly larger than the unexplained variance. Accordingly, the first test of the ANOVA analysis assessed the significance of the regression. The second decomposition, in ANOVA, split the residual variation into two parts (Eq. 7) and was performed to compare the model error with the replicate error components.

$$SS_{\text{residual}} = SS_{\text{LoF}} + SS_{\text{replicate}} \quad (7)$$

$SS_{\text{LoF}}$  represents the lack of fit of the quadratic model and  $SS_{\text{replicate}}$  the experimental variability. The corresponding variances were also compared by means of an F test ( $\alpha=5\%$ ).

Table 6. ANOVA analysis for the second-order polynomial model.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	p-value
Total corrected	2080.15	11	189.105		
Regression	2055.89	5	411.178	101.695	< 0.0001
Residual	24.26	6	4.043		
Lack of fit	10.52	3	3.5054	0.765	0.584*
Pure error	13.74	3	4.5811		

\* Null hypothesis ( $H_0$ ): the model has a lack of fit ( $\alpha = 5\%$ )

As can be seen in Table 6, the p value of 0.584 ensured that the model did not present a significant lack of fit. The quadratic model can be written as follows (Eq. 8):

$$EE_p(\%) = 53.10 + 12.92LC + 8.91NC - 11.97LC^2 - 3.14NC^2 + 3.30CL * NC + \varepsilon \quad (8)$$

Finally, the coefficient of determination,  $R^2$  or explained variation, was calculated at 0.988 and the coefficient of prediction,  $Q^2$  or the fraction of the variation of the response that can be predicted, was calculated at 0.950.

In order to maximize the experimental response, the optimal conditions were evaluated using the Nedler–Mead simplex method. In Figure 3, the response surface showed a stationary point when 11 freeze-thawing cycles were applied and for the following lipid concentrations: 36.1mM SPC, 36.1mM CHOL, and 4mM PEG<sub>2000</sub>-DSPE. The extreme value for the number of cycles, which had been previously predicted, justified the use of a central composite face-centered design.

Under these conditions, the observed response ( $n=3$ ) was measured at  $62.68 \pm 2.93\%$ , which represents an increase of 36.48% in comparison with the first chosen conditions and is close to the predicted response of  $64.75 \pm 3.55\%$ .  $EE_L$  was also calculated, amounting to  $0.89 \pm 0.04\%$ . The positive impact of the number of freeze-thawing cycles, identified as the first parameter with a positive and significant influence on the encapsulation efficiencies ( $EE_p$ ), could be explained by an increase in the permeability of the lipid bilayer when liposome suspensions are plunged into liquid nitrogen. Cryopreservation studies [25-28] indicate that the formation of ice crystals during the freezing of liposomes is responsible for the leakage of compound trapped in SUV. Furthermore, this leakage increases at the gel–liquid phase transition temperature of the phospholipid bilayer composed of phosphatidylcholine [29]. This outflow could be related to the reverse effect observed in the study of Higgins et al., namely to the entry of the peptide into the inner cavity of the liposome [29]. In that study, higher drug permeability was observed with a slow cooling rate in comparison with a high cooling rate and those experiments were not conducted in the exact conditions used for our experiments. However, the observations made in that study could identify the crossing of Print3G through the phospholipids bilayer and could also explain the fact that the more cycles we carried out, the more drug entry was promoted.

Increasing the lipid concentration level certainly led to an increase in the number of liposomes present per millilitre and, therefore, to an increase in the total inner volume of liposomes [30]. This explains why encapsulation efficiencies were improved for high lipid concentrations. Nevertheless, a saturation of this effect and even a decrease was observed on the response surface of the optimization study (Figure 3). This might be explained by the handling difficulties of suspensions at very high lipid concentrations and by the possible impediment of the viscosity of the medium, which could hamper the free movement of Print3G into the inner cavity of liposomes.

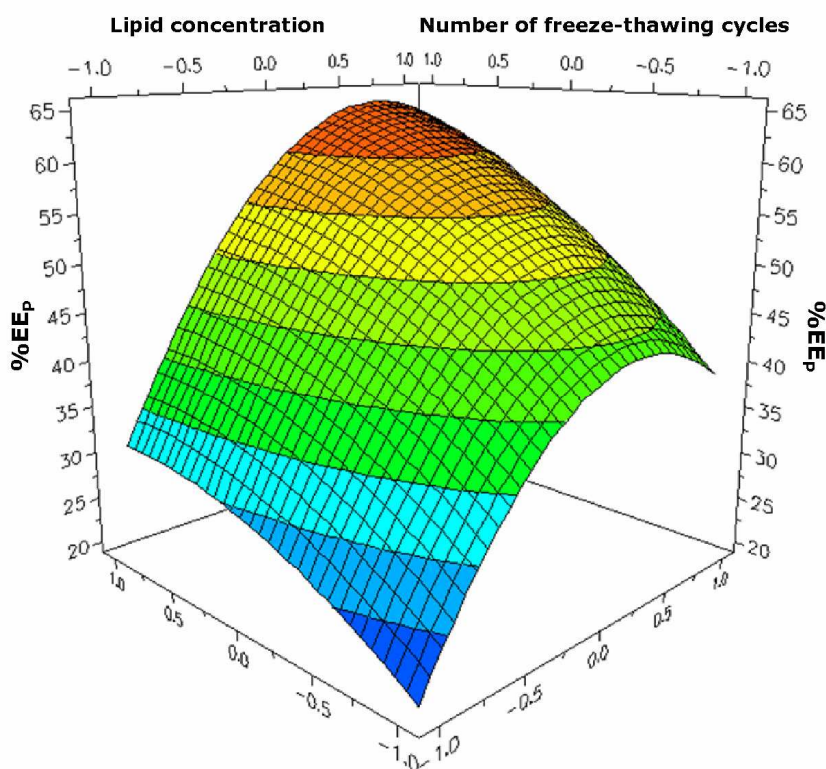


Figure 3. The response surface of the optimization study. The upper darker area represents the optimal condition for the peptide encapsulation.

*I. 2. 2. 4. 4. Characterization of peptide-loaded liposomes*

Unilamellar liposomes were first characterized using the PCS technique. Measurements were made before and after freeze-thawing cycles in order to ensure the physical integrity of liposomes during this manufacturing step. Sizes of  $161.2 \pm 12.7$  nm before and of  $162.0 \pm 4.4$  nm after freeze-thawing cycles were obtained with a polydispersity index always lower than 0.2, proof that samples were relatively monodisperse. Moreover, freeze-fracture electron microscopy allowed us to visualize the shape of liposomes after the freezing step, providing results close to those obtained with PCS (Figure 4).

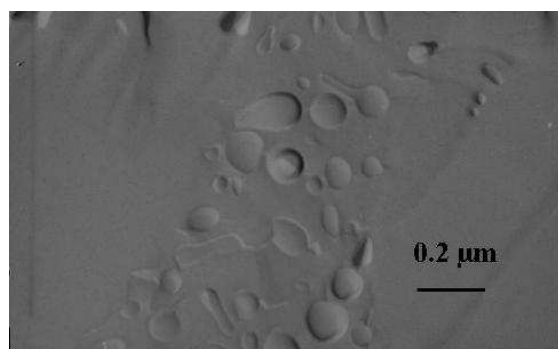


Figure 4. Transmission electron micrograph of freeze-fractured sample composed of SPC:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-PE liposomes after 11 freeze-thawing cycles. Bar represents 0.2  $\mu\text{m}$ .

**I. 2. 2. 5. Conclusion**

In conclusion, the theory of experimental design allowed us to prepare a peptide-loaded liposome formulation with an  $EE_p$  close to 62% in a minimum of experiments number. This formulation of SUV, produced by the freeze-thawing method, was characterized in terms of size (around 200 nm) and shape by photon correlation spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy. At the end of this study, the critical parameters to attain the optimal encapsulation of a

peptidic drug into a suitable vector were identified to obtain an attractive candidate for further in vitro and in vivo studies.

Moreover, this study highlights a practical approach based on the theory of experimental design, to facilitate and accelerate the development of novel liposomal formulations. It emphasizes the fact that the experimental design is an essential tool to optimally develop formulations for valuable and expensive drugs.

#### **I. 2. 2. 6. Acknowledgments**

This study was supported by the Walloon Region. We are grateful to P. Compere for helping us to carry out the freeze-fracture electron microscopy study.

#### **I. 2. 2. 7. References**

1. Campbell, R.B., *Influence of tumor physiology on delivery of therapeutics*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 9-35.
2. Marson, L.P., W.R. Miller, and J.M. Dixon, *Angiogenesis and breast cancer*. *The Breast*, 1998. **7**(6): p. 299-307.
3. Morabito, A., et al., *Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer*. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, 2004. **49**(2): p. 91-107.
4. Scappaticci, F.A., *Mechanisms and Future Directions for Angiogenesis-Based Cancer Therapies*. *J. Clin. Oncol.*, 2002. **20**(18): p. 3906-3927.
5. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
6. Torchilin, V., *Anti-cancer proteins and peptides in liposomes*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 155-182.

7. Katanasaka, Y., et al., *Antiangiogenic cancer therapy using tumor vasculature-targeted liposomes encapsulating 3-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,3-dihydro-indol-2-one, SU5416*. *Cancer Lett.*, 2008. **270**(2):p.260-268.
8. Zhou, X.H. and A. Li Wan Po, *Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration*. *Int. J. Pharm.*, 1991. **75**(2-3): p. 97-115.
9. Banga, A.K. and Y.W. Chien, *Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins*. *Int. J. Pharm.*, 1988. **48**(1-3): p. 15-50.
10. Zhou, X.H. and A.L.W. Po, *Peptide and protein drugs: II. Non-parenteral routes of delivery*. *Int. J. Pharm.*, 1991. **75**(2-3): p. 117-130.
11. Hanato, J., et al., *Liposomal formulations of glucagon-like peptide-1: improved bioavailability and anti-diabetic effect*. *Int. J. Pharm.*, 2009. **382**(1-2): p. 111-116.
12. Petrikovics, I., et al., *Characterization of liposomal vesicles encapsulating rhodanese for cyanide antagonism*. *Drug Deliv.*, 2009. **16**(6): p. 312-319.
13. Klibanov, A.L., V.P. Torchilin, and S. Zalipsky, *Long-circulating sterically protected liposomes*, in *Liposomes, second edition, a practical approach*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 231-265.
14. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
15. Torchilin, V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **71**(3): p. 431-444.
16. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **71**(3): p.409-419.
17. Greish, K., et al., *Enhanced permeability and retention (EPR) effect and tumor selective delivery of anticancer drugs*, in *Delivery of protein and*



- peptide drugs in cancer*, V.P. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 37-52.
18. Vatanara, A., et al., *A Plackett-Burman design for screening of the operation variables in the formation of salbutamol sulphate particles by supercritical antisolvent*. J. Supercrit. Fluids, 2007. **40**(1): p. 111-116.
  19. Hyenstrand, P., et al., *Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography*. Water Res., 2001. **35**(14): p. 3508-3511.
  20. John, H., et al., *Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem., 2004. **378**(4): p. 883-897.
  21. Sallberg, M., et al., *Passive adsorption of immunologically active and inactive synthetic peptides to polystyrene is influenced by the proportion of non-polar residues in the peptide*. Immunol. Lett., 1995. **46**(1-2): p. 25-30.
  22. Grohganz, H., M. Rischer, and M. Brandl, *Adsorption of the decapeptide Cetorelix depends both on the composition of dissolution medium and the type of solid surface*. Eur. J. Pharm. Sci., 2004. **21**(2-3): p. 191-196.
  23. Katanasaka, Y., et al., *Effective delivery of an angiogenesis inhibitor by neovessel-targeted liposomes*. Int. J. Pharm., 2008. **360**(1-2): p. 219-224.
  24. Ramaldes, G.A., et al., *Use of an enzyme immunoassay for the evaluation of entrapment efficiency and in vitro stability in intestinal fluids of liposomal bovine serum albumin*. Int. J. Pharm., 1996. **143**(1): p. 1-11.
  25. Fransen, G.J., P.J.M. Salemink, and D.J.A. Crommelin, *Critical parameters in freezing of liposomes*. Int. J. Pharm., 1986. **33**(1-3): p. 27-35.

26. Talsma, H., M.J. Van Steenberg, and D.J.A. Crommelin, *The cryopreservation of liposomes: 3. Almost complete retention of a water-soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant containing dispersion after a freezing/thawing cycle*. *Int. J. Pharm.*, 1991. **77**(2-3): p. 119-126.
27. Siow, L.F., T. Rades, and M.H. Lim, *Characterizing the freezing behavior of liposomes as a tool to understand the cryopreservation procedures*. *Cryobiology*, 2007. **55**(3): p. 210-221.
28. Holovati, J.L., M.I. Gyongyossy-Issa, and J.P. Acker, *Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality*. *Cryobiology*, 2009. **58**(1): p. 75-83.
29. Higgins, J., et al., *Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1986. **38**(4): p. 259-263.
30. Zuidam, N.J., et al., *Stability, storage, and sterilization of liposomes*, in *Liposomes, Second edition*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 149-166.

### **I. 3. FORMULATION DE LIPOSOMES CLASSIQUES CONTENANT DU PEG<sub>750</sub>**

Dans la section précédente, nous avons décrit une composition de liposomes pegylés (SPC:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-DSPE (47:47:6, % mol)) pour la vectorisation du peptide Print3G ainsi que l'optimisation de son encapsulation. Une seconde formulation de liposomes pegylés a été développée, dans laquelle le PEG<sub>2000</sub> est remplacé par le PEG<sub>750</sub>, dans la perspective d'obtenir une meilleure pénétration cellulaire des liposomes. La composition de cette seconde formulation est la suivante : SPC:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (47:47:6, %mol). Le taux d'encapsulation du peptide au sein de cette formulation et l'intégrité des liposomes après application des cycles de congélation-décongélation ont été étudiés.

#### **I. 3. 1. Matériel et méthodes**

Les liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> ont été préparés en utilisant la même méthode que celle appliquée pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> (voir section I.2.2.3.2.). Les conditions optimales déterminées par le plan d'expériences ont été appliquées :

- *concentration en lipides* : SPC:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (36.1:36.1:4, mM)
- *concentration en peptide* : 100 µM
- *nombre de cycles de congélation-décongélation* : 11
- *temps de mélange entre chaque cycle* : 10 secondes

Les taux d'encapsulation ont été déterminés selon la méthode décrite à la section I.2.2.3.3. Pour vérifier la stabilité des liposomes après les 11 cycles de congélation-décongélation, leur taille a été mesurée par spectroscopie à corrélation de photons (PCS) et par microscopie électronique après cryofracture (voir section I.2.2.3.5.).

### I. 3. 2. Résultats

Des taux d'encapsulations  $EE_p$  de  $50,5 \pm 5,8 \%$  ( $n=6$ ) et  $EE_L$  de  $0,73 \pm 0,08 \%$  ont été obtenus. Le diamètre des liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> est de  $172,6 \pm 14,7$  nm ( $n>3$ ,  $PDI<0,2$ ) et n'est pas significativement différent ( $p>0,05$ ) de celui obtenu après application des cycles de congélation-décongélation ( $163,8 \pm 7,2$  nm ( $n>3$ ,  $PDI<0,2$ )). Il n'y a aucune différence significative entre le diamètre des liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> ou du PEG<sub>2000</sub> ( $p>0,05$ ). L'image de microscopie électronique après l'application des cycles de congélation-décongélation permet de visualiser la forme sphérique ou parfois allongée des liposomes. Leur intégrité n'est donc pas menacée par les cycles de congélation-décongélation.

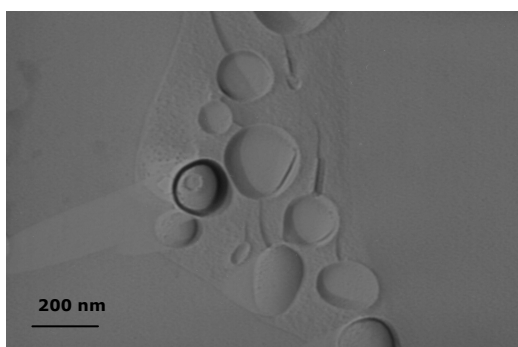


Figure I.3.1. Image obtenue par microscopie électronique à transmission après cryofracture de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> après 11 cycles de congélation-décongélation. La barre représente 200 nm.

### I. 3. 3. Conclusions

La technique de préparation développée et optimisée pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> peut être utilisée pour préparer ceux à base de PEG<sub>750</sub>. La méthode des cycles de congélation-décongélation ne menace pas l'intégrité des liposomes et permet l'obtention d'un bon taux d'encapsulation.

## **I. 4. ETUDE DE STABILITÉ DU PEPTIDE PRINT3G**

L'influence de la température sur la stabilité du peptide Print3G a été quantifiée par CLHP et évaluée qualitativement par spectrométrie de masse.

### **I. 4. 1. Matériel et méthodes**

#### *Etude de stabilité par dosage HPLC*

En pratique, l'analyse quantitative a été réalisée comme suit : chaque solution de peptide Print3G d'une concentration de 120  $\mu$ M dans une solution tampon HEPES isotonique de pH 7,4 a été préparée. Les solutions ont été placées dans des contenants en polypropylène ultrapur (Eppendorfs Low Binding<sup>®</sup>). Elles ont toutes été conservées à l'abri de la lumière. Quatre conditions de température ont été testées : -20°C, 4°C, 25°C et 37°C. La concentration en peptide présente dans chaque solution a été mesurée directement après préparation (temps 0) puis après 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois et 3 mois de conservation.

#### *Etude de stabilité par spectrométrie de masse*

L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée afin de détecter l'apparition de produits de dégradation. Deux températures de conservation ont été testées, 4°C et -20°C, à l'abri de la lumière. Les analyses ont été réalisées en double, directement après préparation puis après 1 mois, 3 mois et 6 mois de conservation. Elles ont toujours été comparées au spectre obtenu avec une solution fraîchement préparée de peptide Print3G. L'intégrité physique du peptide a été examinée par spectrométrie de masse, permettant de séparer des substances ionisées sur la base de leur rapport masse sur charge (m/z). La technique utilisée est appelée SELDI-TOF (PCS4000 SELDI-TOF, Bio-Rad) pour Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation (source d'ionisation) - Time Of Flight (analyseur de masse).

En pratique, la solution de peptide 10  $\mu\text{M}$  est diluée 100x dans de l'eau de qualité CLHP. 10  $\mu\text{L}$  sont déposés sur une surface hydrophile (barrette ProteinChip<sup>®</sup> NP20 Array Normal Phase, Bio-Rad) permettant une présélection protéique, puis lavée à l'eau Milli-Q afin d'éliminer les composés pouvant interférer avec l'analyse. Ensuite, chaque spot est recouvert par 1  $\mu\text{L}$  d'une matrice (ProteinChip<sup>®</sup> alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CHCA, M.M.=189,2), Bio-Rad) facilitant la désorption et l'ionisation des peptides. Brièvement, 5 mg de matrice sont mis en suspension dans 250  $\mu\text{L}$  d'un mélange acétonitrile/eau Milli-Q/acide trifluoroacétique (50:49,5:0,5 ; v/v). La suspension est agitée pendant 10 min et centrifugée pendant 10 min. Enfin, 10  $\mu\text{L}$  du surnageant sont dilués dans 10  $\mu\text{L}$  du mélange acétonitrile/eau Milli-Q/acide trifluoroacétique. L'analyseur TOF sépare les ions en fonction de leur vitesse et des spectres d'intensité en fonction du rapport m/z peuvent alors être interprétés. Les conditions spectrométriques appliquées sont les suivantes :

- Gamme de masse : 0 à 200 000 Da
- Masse cible : 3000 Da
- Tirs laser de chauffe : 2 tirs à 990 nJ
- Tirs laser de lecture : 20 tirs à 900 nJ

## **I. 4. 2. Résultats**

### *Etude de stabilité par dosage CLHP*

Les résultats de l'étude de stabilité par dosage CLHP d'une durée de 3 mois sont présentés à la figure I.4.1.

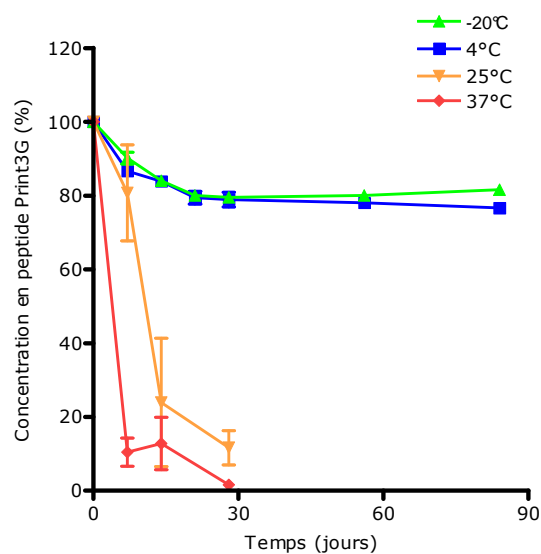


Figure I.4.1. Stabilité d'une solution de peptide Print3G 120 µM conservée à -20°C, 4°C, 25°C et 37°C (n=4).

Après 3 mois de conservation à la température de -20°C, à l'abri de la lumière et dans des contenants de type Low Binding®, une perte en peptide de  $18,4 \pm 2,5\%$  est observée. Pour la solution conservée à 4°C, une perte significativement plus élevée a été mesurée ( $23,4 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0.01$ ). Le stockage à 25°C et 37°C, à l'abri de la lumière, ne permet pas une bonne conservation du peptide. La concentration des solutions conservées à ces températures décroît rapidement pour atteindre des valeurs proches de zéro après un mois. De plus, des pics d'impuretés apparaissent sur les chromatogrammes de ces solutions. Dès que le peptide est mis en solution, sa stabilité est menacée, quelle que soit la température de conservation. La congélation est la condition de conservation qui occasionne le moins de perte en peptide. Pour conserver une concentration en peptide dans l'intervalle  $100 \pm 5\%$ , une solution ne doit pas être conservée plus de 3 jours à -20°C, plus de 2 jours à 4°C et pas plus d'une journée à 25°C (calcul par extrapolation).

*Etude de stabilité par spectrométrie de masse*

La stabilité du peptide en solution a également été examinée par spectrométrie de masse. Le spectre obtenu après préparation de la solution de peptide Print3G (temps 0) est représenté à la figure I.4.2.

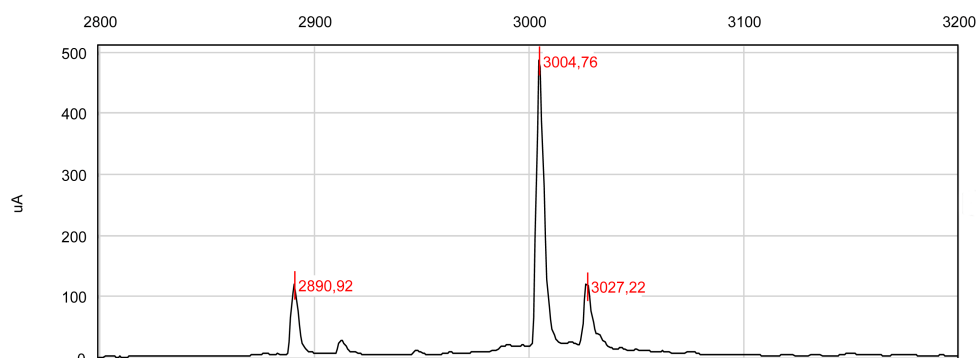


Figure I.4.2. Spectre de la solution de peptide Print3G (lot n°P071029-XZ74631) obtenu après préparation (temps 0).

Le pic principal, présent à un rapport  $m/z$  de 3004,76 correspond au peptide d'intérêt (M.M.= 3000). Deux pics secondaires sont également présents à un rapport  $m/z$  de 2890,92 et 3027,22, correspondant respectivement à la perte d'une proline (-114, impureté de fabrication) et au gain d'un atome de sodium (+22).

Les résultats obtenus après un mois et demi de conservation sont présentés à la figure I.4.3. Le spectre de la solution fraîchement préparée a été obtenu avec un autre lot de peptide Print3G, c'est pourquoi le pic correspondant à l'impureté de fabrication (-114) est absent. Sur les spectres des solutions conservées à 4°C et à -20°C, le pic principal, le pic représentant l'impureté de fabrication ainsi que celui correspondant au gain d'un atome de sodium sont toujours présents. Aucun pic correspondant à une impureté de dégradation n'apparaît.



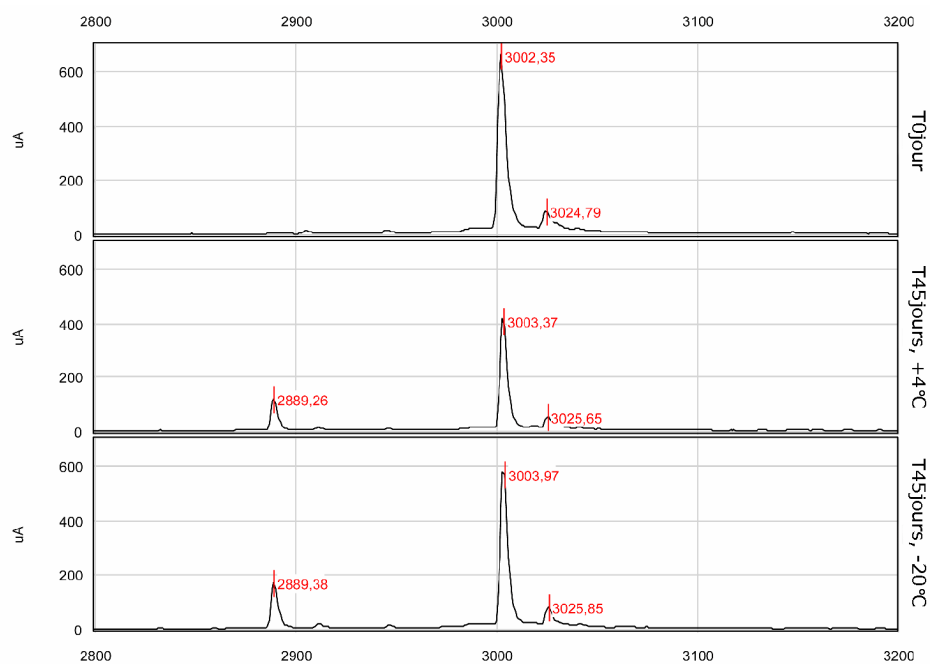


Figure I.4.3. Spectre d'une solution fraîchement préparée (lot n°: P071219-KC74631, en haut) et des aliquots conservés respectivement à 4°C (au milieu) et à -20°C (en bas) pendant 1 mois et demi.

Au temps 3 mois (Figure I.4.4.), on observe particulièrement bien le pic correspondant au peptide oxydé (+16) et un pic supplémentaire non identifié à +28 apparaît.

Après 6 mois de conservation (Figure I.4.5.), le pic principal est toujours accompagné des pics correspondants à l'impureté de fabrication, au peptide ayant capté un atome de sodium et au peptide oxydé, mais aucun pic correspondant à une impureté de dégradation qui posséderait un rapport m/z inférieur à celui du peptide n'apparaît.

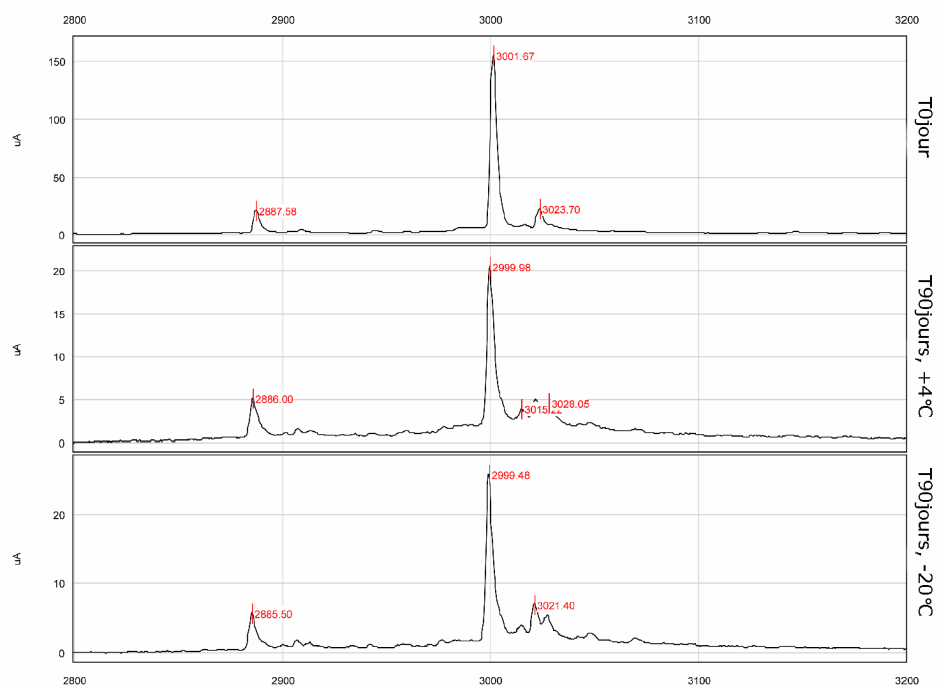


Figure I.4.4. Spectre d'une solution fraîchement préparée (lot n°P071029-XZ74631, en haut) et des aliquots conservés respectivement à 4°C (au milieu) et à -20°C (en bas) pendant 3 mois.

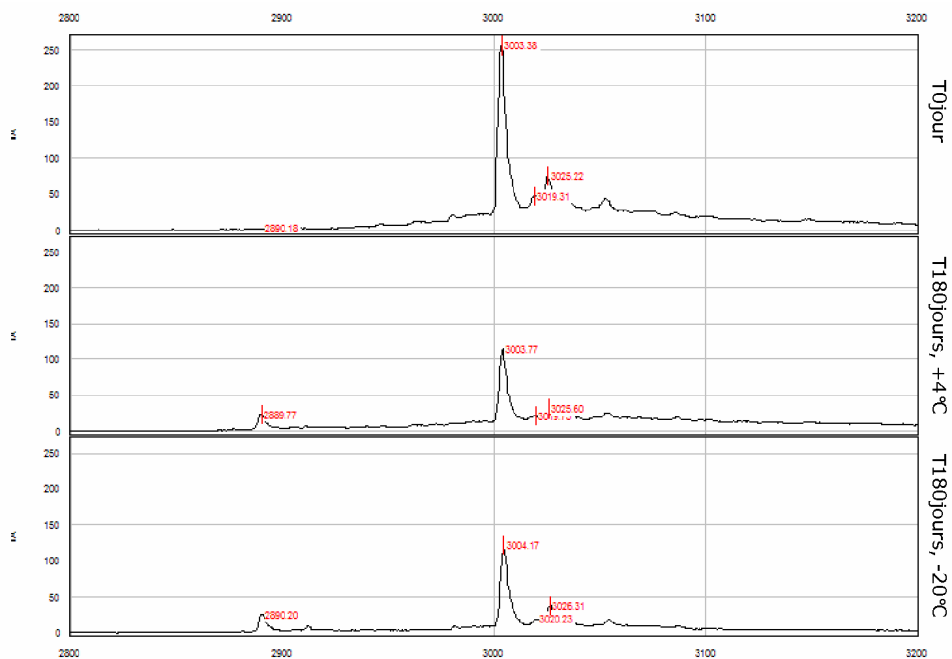


Figure I.4.5. Spectre d'une solution fraîchement préparée (lot n°: P071219-KC74631, en haut) et des aliquots conservés respectivement à 4°C (au milieu) et à -20°C (en bas) pendant 6 mois.

L'analyse qualitative des solutions de peptide Print3G conservées pendant 6 mois ne montre pas de différence majeure entre une solution fraîchement préparée, une solution stockée à 4°C et à -20°C.

### I. 4. 3. Conclusions

Bien qu'une perte significative ait été observée à la température de -20°C, elle constitue la meilleure condition de conservation d'une solution de peptide Print3G. Pour rester dans les limites d'acceptation de  $\pm 5\%$ , une solution de peptide Print3G ne peut pas être conservée plus de 3 jours à cette température. Ceci souligne l'importance de préparer les solutions de peptide de manière

extemporanée, la dissolution de celui-ci engendrant une instabilité significative au cours du temps.

## I. 5. ETUDE DE STABILITÉ DES LIPOSOMES PEGYLÉS

La libération de matériel encapsulé à l'extérieur des liposomes pegylés a été évaluée au moyen d'un traceur fluorescent : la calcéine. Cette molécule présente l'avantage de posséder des propriétés d'absorption et d'émission dans l'UV-visible. L'utilisation de ce traceur fluorescent pour les études de stabilité des liposomes pegylés est basée sur le phénomène de *self-quenching*. En concentration importante en solution aqueuse, la calcéine se trouve sous forme de dimères et sa fluorescence est inhibée par un transfert d'énergie de résonance. Lorsqu'elle sort du liposome, elle se dilue dans le milieu extérieur et sa fluorescence augmente (monomères).

### I. 5. 1. Matériel et méthodes

Les liposomes sont été préparés par la technique d'hydratation du film lipidique avec une solution de calcéine 40 mM (Sigma-Aldrich, Boenem, Belgique). La calcéine non encapsulée a été éliminée par 6 cycles d'ultracentrifugation à 4°C à 35000 rpm (Beckman SW60, 86496 g) d'une durée de respectivement 60, 45, 30, 30, 30 et 30 minutes. Les concentrations utilisées sont les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36:36:4, mM) et SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36:36:4, mM). Le taux de relargage de la calcéine a été mesuré pendant 1 mois.

En pratique, 100 µL de suspension de liposomes sont ajoutés soit à 100 µL de tampon HEPES isotonique pH 7,4, soit à 100 µL d'une solution de Triton<sup>®</sup>X-100 à 4% (Sigma-Aldrich, Boenem, Belgique). Le Triton<sup>®</sup>X-100 est un détergent utilisé pour perméabiliser la membrane des liposomes et permettre de libérer la calcéine dans le milieu extérieur. La libération de calcéine a été mesurée au moyen d'un spectrofluorimètre (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) aux longueurs d'onde suivantes :  $\lambda_{\text{excitation}} = 490\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 520\text{nm}$ . Le pourcentage de calcéine libérée a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage de calcéine libérée (\%)} = \frac{I}{I_t} \times 100$$

I représente l'intensité de fluorescence mesurée et  $I_t$  représente l'intensité de la fluorescence mesurée après destruction des liposomes par le Triton<sup>®</sup>X-100, soit de la fluorescence totale.

## I. 5. 2. Résultats

Du premier au 8<sup>ème</sup> jour de l'étude, la conservation à 4°C est la condition qui occasionne le moins de perte en calcéine ( $p < 0,05$ ). Ensuite, aucune différence significative n'est observée entre les trois températures de conservation (Figure I.5.1.). Le pourcentage de calcéine libérée après 28 jours de stockage en chambre froide s'élève à  $18,0 \pm 8,5 \%$  contre  $26,7 \pm 7,2 \%$  à 37°C.

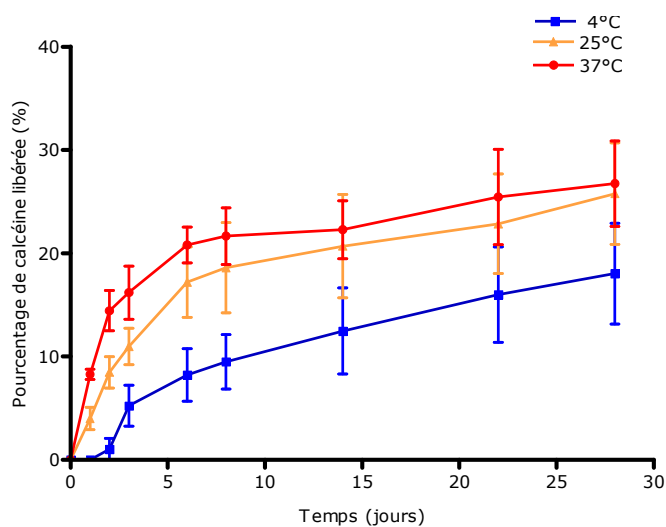


Figure I.5.1. Pourcentage de calcéine libérée hors de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub>, dans trois conditions de conservation différentes (4°C, 25°C, 37°C) pendant 1 mois.

Concernant les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> (Figure I.5.2.), on observe une différence significative entre la conservation à 4°C et celle à 37°C ( $p < 0,05$ ). Au 28<sup>ème</sup> jour de l'étude, aucune différence n'est observée entre le stockage à 25°C et à 37°C. Le pourcentage de calcéine libérée est de  $20,3 \pm 2,4$  % après 1 mois de conservation à 4°C.

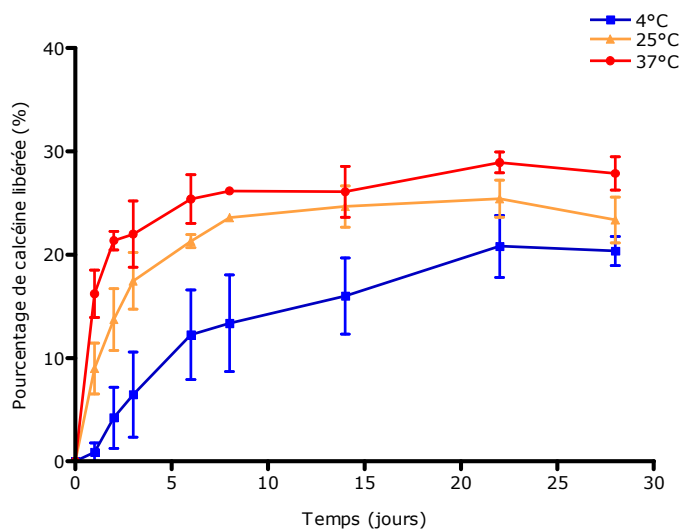


Figure I.5.2. Pourcentage de calcéine libérée hors de liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub>, dans trois conditions de conservation différentes (4°C, 25°C, 37°C) pendant 1 mois.

### I. 5. 3. Conclusions

Afin de garantir la plus faible libération possible de matériel encapsulé à partir des liposomes, les suspensions devront être conservées à 4°C.

## **I. 6. ETUDE DE CRYOPROTECTION DES LIPOSOMES PEGYLÉS**

Le peptide Print3G est instable en solution aqueuse. Une étude de cryoprotection des liposomes a été réalisée comme première étape vers le développement d'une méthode de lyophilisation. Le saccharose ou le tréhalose ont été utilisés comme cryoprotecteurs. Ils ont été sélectionnés sur la base d'une étude préliminaire de mesure de la taille des liposomes avant et après congélation et permettent de maintenir le diamètre des vésicules après congélation. L'encapsulation de calcéine a permis d'étudier l'influence de l'incorporation du cryoprotecteur à l'intérieur et à l'extérieur du liposome puis d'étudier l'influence des températures de congélation et de décongélation. Enfin, la libération de peptide Print3G encapsulé après congélation a été évaluée.

### **I. 6. 1. Matériel et méthodes**

Les liposomes ont été préparés par la technique d'hydratation du film lipidique avec une solution de calcéine 40mM (Sigma-Aldrich, Boenem, Belgique) contenant ou non le cryoprotecteur. La calcéine non encapsulée a été éliminée par 6 cycles d'ultracentrifugation à 4°C à 35000 rpm (Beckman SW60, 86496 g) pendant respectivement 60, 45, 30, 30, 30 et 30 minutes. Le dernier culot a été repris avec du tampon HEPES isotonique pH 7,4 contenant ou non du cryoprotecteur.

Pour la sélection du cryoprotecteur adéquat, la solution d'hydratation du film contenait ou non du tréhalose ou du saccharose à un rapport molaire sucre/lipide égal à 4. Les concentrations finales utilisées sont les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (18:18:2, mM) et SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (18:18:2, mM).

Pour l'étude de l'influence des températures de congélation et de décongélation, le cryoprotecteur est présent à l'intérieur et à l'extérieur du liposome à un rapport molaire sucre/lipide égal à 2 et les concentrations finales utilisées sont



les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36:36:4, mM) et SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36:36:4, mM).

Pour l'étude de la libération du peptide encapsulé après congélation, les vésicules ont été préparées par la méthode des cycles de congélation-décongélation décrite précédemment. Le cryoprotecteur est présent à l'intérieur et à l'extérieur du liposome à un rapport molaire sucre/lipide égal à 2 et les concentrations finales utilisées sont les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36:36:4, mM) et SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36:36:4, mM).

La perte de la calcéine encapsulée a été mesurée comme à la section précédente (I.5.1.). La libération de peptide Print3G à partir du liposome a été évaluée par dosage CLHP dans le surnageant après application d'un cycle d'ultracentrifugation.

## **I. 6. 2. Résultats**

### *Sélection du cryoprotecteur*

Concernant les liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub>, le pourcentage de rétention est significativement plus élevé lorsque le cryoprotecteur est incorporé à l'intérieur et à l'extérieur du liposome ( $p < 0,05$ ). Par contre, il n'existe pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre le pourcentage de rétention obtenu avec le tréhalose ( $84,3 \pm 5,0$  %,  $n=3$ ) et celui obtenu avec le saccharose ( $83,4 \pm 3,2$  %,  $n=3$ ) (Fig. I.6.1.).

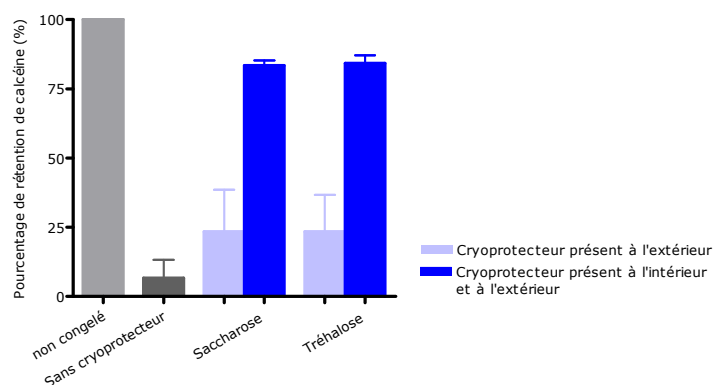


Figure I.6.1. Pourcentage de rétention de la calcéine encapsulée dans des liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> en utilisant le saccharose ou le tréhalose comme cryoprotecteur (n=3).

Le tréhalose présent à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules contenant du PEG<sub>750</sub> permet d'obtenir la meilleure cryoprotection ( $75,4 \pm 2,4\%$  de rétention) (Figure I.6.2.). Ce pourcentage est significativement plus élevé ( $p < 0,01$ ) que lors de l'utilisation de saccharose ( $62,2 \pm 4,3\%$ ).

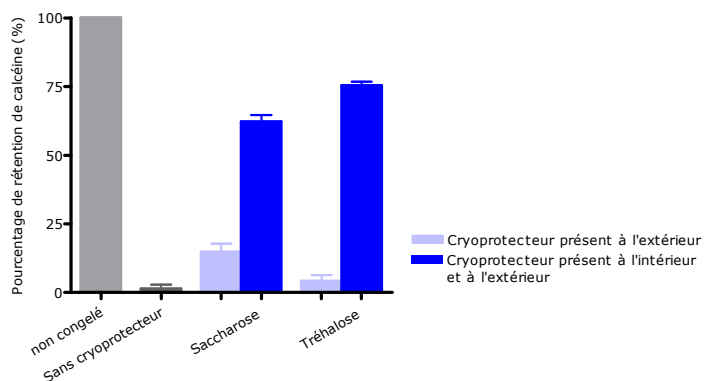


Figure I.6.2. Pourcentage de rétention de la calcéine encapsulée dans des liposomes classiques contenant du PEG<sub>750</sub> en utilisant le saccharose ou le tréhalose comme cryoprotecteur (n=3).

La présence de cryoprotecteur à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule constitue donc une condition indispensable à la protection du liposome lors de la congélation à la température de  $-20^{\circ}\text{C}$  pour éviter une fuite importante de matériel encapsulé. Le tréhalose donne les meilleurs résultats pour les liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> et le saccharose a été retenu pour la cryoprotection des liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub>.

*Etude de l'influence des températures de congélation et de décongélation*

Deux températures de congélation et deux températures de décongélation ont été testées. Chaque formulation a été divisée en 4 aliquots, le protocole appliqué pour chaque échantillon est décrit dans le tableau I.6.1.

Tableau I.6.1. Protocole de l'étude de cryoprotection.

Congélation		Décongélation	
Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temps (min)	Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temps (min)
-20	60	4	45
-20	60	40	8
-196	10	4	45
-196	10	40	8

Les résultats obtenus pour les liposomes classiques à base de PEG<sub>2000</sub> ou de PEG<sub>750</sub> sont présentés au tableau I.6.2. Quel que soit le type de formulation, la perte moyenne la plus faible est obtenue lorsque la température de congélation est égale à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cette tendance est significative pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> ( $p < 0,001$ ). Le pourcentage de calcéine libéré est plus important pour les liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> ( $p < 0,001$ ).

Tableau I.6.2. Pourcentage de calcéine libérée (%) en fonction des températures de congélation et de décongélation appliquées aux liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> ou du PEG<sub>750</sub>. Le saccharose ou le tréhalose est présent à un rapport molaire sucre/lipide=2 (n=3).

Liposomes contenant du PEG <sub>2000</sub>	-20°C/4°C	-20°C/40°C	-195°C/4°C	-195°C/40°C	Non congelé
Perte moyenne (%)	0,90	4,29	8,49	4,75	0,00
Ecart-type	0,54	1,11	0,92	0,49	0,00
Liposomes contenant du PEG <sub>750</sub>					
Perte moyenne (%)	10,81	10,09	15,99	12,54	0,00
Ecart-type	1,49	2,44	2,57	2,27	0,00

*Libération de peptide Print3G après congélation des liposomes*

La fuite de peptide Print3G à partir des deux formulations de liposomes a été étudiée en utilisant les meilleurs paramètres définis dans les deux études précédentes. Les résultats sont présentés au tableau I.6.3.

Tableau I.6.3. Pourcentage de peptide Print3G libéré (%) après congélation à -20°C de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> (tréhalose à un rapport molaire sucre/lipide=2, n=3) ou du PEG<sub>2000</sub> (saccharose à un rapport molaire sucre/lipide= 2, n=3).

	Perte après congélation	
	Liposomes classiques contenant du PEG <sub>2000</sub>	Liposomes classiques contenant du PEG <sub>750</sub>
<b>Avec cryoprotecteur</b>	9,0 ± 1,4	10,17 ± 2,7
<b>Sans cryoprotecteur</b>	10,3 ± 1,1	14,7 ± 2,2

La fuite de peptide Print3G est acceptable, la congélation des liposomes occasionnant une perte en peptide proche de 10%. Cependant, et contrairement à ce qui avait été observé pour la calcéine, cette perte n'est pas

significativement plus élevée lorsque les liposomes sont congelés en l'absence de cryoprotecteur. La calcéine étant une petite molécule hydrophile, elle n'a probablement pas le même comportement que le peptide Print3G.

### **I. 6. 3. Conclusions**

Le saccharose a été retenu comme cryoprotecteur pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> et le tréhalose pour ceux à base de PEG<sub>750</sub>. Employés à un rapport molaire sucre/lipide égal à 2, ils permettent de diminuer la libération de matériel encapsulé hors du liposome, *a fortiori* lorsque la température de congélation est de -20°C. La congélation à cette température n'occasionne pas de perte en peptide importante. Cette étude constitue une étape préliminaire vers la lyophilisation des vecteurs de Print3G, indispensable pour leur conservation à long terme, puisque le peptide est instable en solution aqueuse.

## I. 7. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

L'utilisation d'un plan d'expériences a permis d'optimiser l'encapsulation du peptide Print3G dans les liposomes pegylés, de définir les paramètres influençant cette encapsulation ainsi que leur combinaison optimale. L'étude de l'intégrité des liposomes a permis d'assurer que cette méthode de fabrication ne menaçait pas la stabilité physique des liposomes. Cette méthode de fabrication optimisée a permis d'atteindre des taux d'encapsulation supérieurs à 62% pour les liposomes contenant du PEG<sub>2000</sub> et supérieurs à 50% pour ceux contenant du PEG<sub>750</sub>. Cette étude souligne l'intérêt d'utiliser ce type d'approche expérimentale pour développer des formulations à base de substances actives innovantes et onéreuses, en diminuant le nombre d'expériences à réaliser.

Les études de stabilité du peptide Print3G ont démontré sa dégradation lorsqu'il est conservé en solution. Les liposomes encapsulant Print3G devront être stockés à 4°C et fraîchement préparés avant les futures manipulations pour engendrer le moins de perte possible en peptide. Une étude de cryoprotection a été menée comme étape préliminaire à la lyophilisation des vecteurs, permettant de montrer que la fuite de peptide après congélation des liposomes est proche de 10%.

En conclusion, ces deux formulations possèdent les caractéristiques nécessaires pour poursuivre nos travaux par des études *in vitro* et *in vivo* des liposomes pegylés encapsulant le peptide Print3G.

**CHAPITRE 2: ETUDE DE LA PENETRATION CELLULAIRE  
DE LIPOSOMES ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G**

## II. 1. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, une formulation de liposomes dits «pH-sensibles» a été développée, par opposition aux deux premières formulations qui sont qualifiées de « classiques ». Ces liposomes pH-sensibles possèderaient de meilleures capacités de pénétration cellulaire et permettraient une libération accrue de la substance active dans le cytoplasme en évitant la dégradation de celle-ci par les enzymes lysosomales. Ils contiennent également du cholestérol et du PEG<sub>750</sub>, ajoutés pour garder une rémanence vasculaire suffisante. Ils constitueraient un compromis entre une bonne stabilité sanguine et une interaction cellulaire efficace. Les trois compositions qui seront étudiées au cours de ce chapitre sont les suivantes : les liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> (SPC:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-DSPE (47:47:6, %mol)), les liposomes classiques à base de PEG<sub>750</sub> (SPC:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (47:47:6, %mol)) et les liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> (DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6, %mol)).



## **II. 2. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE FILTRATION STERILISANTE EN MILIEU ASEPTIQUE**

Il était essentiel de développer et de valider une méthode de stérilisation des liposomes encapsulant le peptide Print3G pour pouvoir utiliser les formulations liposomales en culture cellulaire mais également pour les administrer par voie intraveineuse. La filtration sur membrane stérile de 0,22  $\mu\text{m}$  en milieu aseptique a été retenue. Cette méthode présente plusieurs avantages :

- elle est applicable aux vecteurs développés, leur diamètre étant inférieur au diamètre des pores du filtre utilisé ;
- elle ne menace pas la stabilité du peptide ;
- elle ne nécessite pas de désinfection préalable du matériel utilisé lors de la fabrication des liposomes. Elle est appliquée en milieu aseptique sur les suspensions finales de liposomes.

### **II. 2. 1. Mise au point de la méthode de préparation de liposomes stériles**

#### **II. 2. 1. 1. Matériel et méthodes**

Les suspensions de liposomes ou les solutions de peptide Print3G ont été filtrées sur une membrane hydrophile stérile en polyéthersulfone d'une taille de 33 mm de diamètre et dont la taille des pores est égale à 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GP, SLGP033RB, Millipore, Carrigtwohill, Irlande). Cette filtration a été réalisée sous flux laminaire en condition aseptique.

Les liposomes de composition classique encapsulant le peptide Print3G ont été préparés par la technique de cycles des congélation-décongélation décrite au chapitre 1. Par contre, les liposomes pH-sensibles étant détruits par les cycles successifs de congélation-décongélation, ils ont été préparés par la technique d'hydratation du film lipidique. Pour éviter une perte importante de peptide lors

de l'extrusion, l'extrudeur a été saturé avec une solution de peptide Print3G avant le passage des suspensions de liposomes. Deux étapes de centrifugation de 3h30 à 4°C et à 35000 rpm (Beckman SW60, 86496 g) ont été réalisées pour éliminer le peptide non encapsulé. Les concentrations finales sont les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36 :36 :4, mM); SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36:36:4, mM) et DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (33:16:23:4,5 ; mM).

Pour évaluer l'adsorption du peptide Print3G sur le filtre, une solution à 100 µM a été dosée avant et après passage sur le filtre. Pour évaluer la perte en peptide encapsulé lors de la filtration, les liposomes stérilisés ont subi un cycle de centrifugation supplémentaire et le peptide présent dans le surnageant a été dosé par CLHP. Pour évaluer les pertes en liposomes sur le filtre, la phosphatidylcholine a été dosée par méthode enzymatique avant et après passage sur filtre (LabAssay Phospholipid, Wako chemicals, Neuss, Germany, voir section I.2.3.3). Etant donné que les liposomes pH-sensibles ne contiennent pas de phosphatidylcholine, un test enzymatique de dosage du cholestérol a été utilisé (Cholesterol FS, Diaysis, Holzheim, Allemagne). Le principe de cette méthode consiste à doser le cholestérol après hydrolyse enzymatique et oxydation. L'indicateur coloré est la quinoneimine. Elle est générée par réaction de la 4-aminoantipyrine avec un phénol sous la catalyse de la peroxidase. Enfin, la taille et la forme des liposomes ont été mesurées avant et après passage sur le filtre par PCS et par microscopie électronique à transmission après cryofracture.

## **II. 2. 1. 2. Résultats**

Concernant l'adsorption du peptide sur le filtre, la perte a été évaluée à  $3,2 \pm 0,7$  % (n=3). Celle-ci était suffisamment faible (inférieure à 5%) pour pouvoir envisager la filtration des vecteurs sur ce type de filtre.

Les pertes en phosphatidylcholine pour les liposomes classiques à base de PEG<sub>2000</sub> ou de PEG<sub>750</sub> sont de  $0,1 \pm 0,1\%$  et de  $3,5 \pm 0,7\%$ , respectivement (n=3). Pour les liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>, les pertes en cholestérol ont été évaluées à  $1,1 \pm 1,8 \%$  (n=3).

Lorsque les trois types de liposomes encapsulant le peptide Print3G sont filtrés, la perte en peptide encapsulé se chiffre à  $0,23 \pm 0,31\%$  pour les liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> (n=3), à  $0,50 \pm 0,86\%$  (n=3) pour ceux à base de PEG<sub>750</sub> et à  $8,6 \pm 0,5 \%$  pour les liposomes pH-sensibles. Cette perte est donc significativement plus importante que celle observée pour les liposomes de composition classique ( $p < 0,001$ ).

Enfin, la conservation de l'intégrité des vecteurs après filtration a été évaluée par mesure PCS de la taille des vésicules avant et après filtration stérilisante. Les résultats sont présentés à la figure II.2.1. Quelle que soit la formulation testée, il n'y a pas de différence significative entre la taille moyenne des liposomes avant et après filtration. De plus, une analyse par microscopie électronique à transmission avec traitement des échantillons par cryofracture a été réalisée (Figure II.2.2-4). Elle confirme la stabilité des liposomes après filtration. Leur forme est arrondie, parfois allongée.

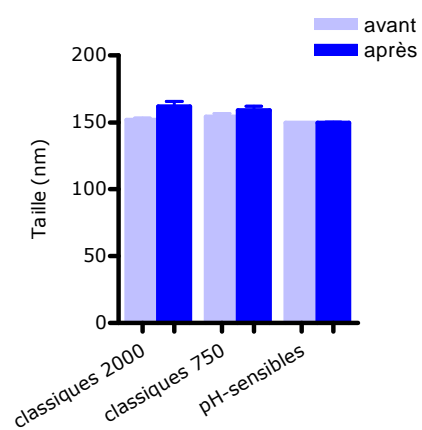


Figure II.2.1. Taille moyenne (nm) des liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub>, du PEG<sub>750</sub> ou pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>, avant (bleu clair) et après (bleu foncé) filtration stérilisante (n=3, PDI<0,2).

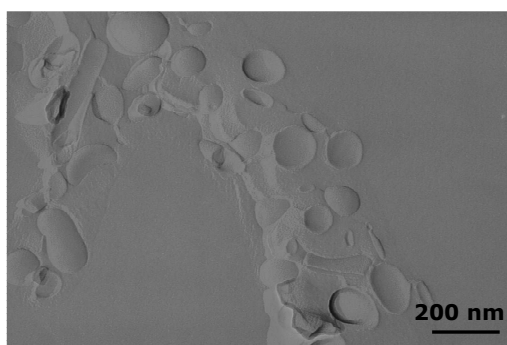


Figure II.2.2. Micrographie de liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> après stérilisation par filtration. La barre représente 200 nm.

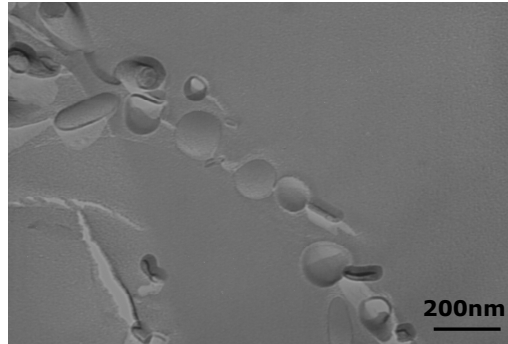


Figure II.2.3. Micrographie de liposomes classiques contenant du PEG<sub>750</sub> après stérilisation par filtration. La barre représente 200 nm.

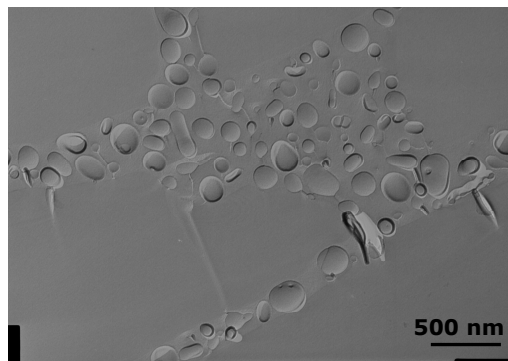


Figure II.2.4. Micrographie de liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> après stérilisation par filtration. La barre représente 500nm.

Nous pouvons donc conclure que l'intégrité des vecteurs est maintenue lors de la filtration stérilisante. Leur taille et leur forme sont conservées, les pertes en peptide et en excipients sur le filtre sont négligeables pour les liposomes de composition classique. Les pertes en peptide encapsulé dans les liposomes pH-sensibles sont néanmoins plus élevées que celles mesurées pour les liposomes de composition classique. Elles restent toutefois suffisamment faibles pour conserver cette méthode pour stériliser ces liposomes.

## II. 2. 2. Validation de la méthode de stérilisation

La stérilité des suspensions de liposomes a été validée grâce à un test recommandé par la *Pharmacopée Européenne* (6<sup>ème</sup> édition, 2010, chapitre 2.6.1.).

### II. 2. 2. 1. Matériel et méthodes

Les trois types de formulations de liposomes blancs ont été préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique. Le film a été hydraté avec du tampon HEPES isotonique de pH 7,4, préparé avec de l'eau pour préparations injectables (VIAFLO, Baxter, Lessines, Belgique). Les concentrations utilisées étaient les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36:36:4, mM); SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36:36:4, mM) et DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (33:16:23:4,5, mM). Avant filtration, les suspensions de liposomes ont été diluées 4 fois dans du tampon HEPES pour ne pas créer d'opalescence visible dans les milieux de culture.

Deux milieux ont été utilisés : le *milieu trypticase – soja* (TSB, T406.65.0100., Tritium Microbiologie, Pays-Bas) et le *milieu au thioglycolate* (FTM, 1.08191.0500., Merck, Darmstadt, Allemagne). Le milieu FTM est fourni sous forme lyophilisée, il est reconstitué avec de l'eau stérile à une concentration de 30 g/L. La solution est ensuite portée à ébullition pour éliminer l'oxygène. La solution est mise en fioles de 100 mL stérilisées en autoclave, 15 minutes à 121°C.

10 lots de chaque formulation ont été stérilisés puis placés chacun dans les deux types de milieux de culture, à raison de 1 mL de suspension par milieu. Chaque lot a également été déposé sur une gélose au sang. Selon les recommandations de la *Pharmacopée Européenne*, la totalité de la suspension a été utilisée pour le test. Les fioles contenant le milieu FTM ont été conservées 14 jours à 30-35°C et celles contenant le TSB, 14 jours à 20-25°C. A intervalles réguliers, les milieux

ont été observés pour détecter une éventuelle opalescence. Celle-ci indique alors une contamination microbienne. Le produit satisfait au test de stérilité si aucune opalescence n'est détectée dans aucun milieu.

#### **II. 2. 2. 2. Résultats**

Pour le test de stérilité, chaque formulation a été mise en contact avec deux milieux de cultures différents. Le milieu FTM permet la recherche de bactéries anaérobies mais également aérobies alors que le milieu TSB permet la recherche de bactéries aérobies, des levures et de moisissures. Aucune opalescence n'a été détectée sur les 10 lots de chaque formulation. Les géloses au sang étaient également toutes négatives. Les trois formulations satisfont au test de stérilité recommandé par la *Pharmacopée Européenne*.

#### **II. 2. 3. Conclusions**

La méthode de filtration stérilisante développée permet d'obtenir des suspensions liposomales stériles, dont l'intégrité n'est pas menacée lors du passage à travers la membrane de filtration stérilisante de 0,22 µm.

## II. 3. EVALUATION DE LA PRESENCE DE CHLOROFORME RÉSIDUEL DANS LES FORMULATIONS

Les deux méthodes de fabrication des liposomes présentées dans ce travail, à savoir la méthode d'hydratation du film lipidique et la méthode des cycles de congélation-décongélation, commencent par la dissolution des différents constituants dans le chloroforme. Cette solution est ensuite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le chloroforme est décrit par la *Pharmacopée Européenne* (6<sup>ème</sup> édition, 2010, chapitre 5.4.) comme un solvant organique de classe 2, «*produit chimique organique volatil dont l'utilisation est soumise à limitation, présumé être à l'origine d'effets toxiques ; carcinogène animal non génotoxique ou éventuel agent causal d'autres effets toxiques irréversibles (neurotoxicité, tératogénicité)*» dont la limite de concentration préconisée au sein de préparations pharmaceutiques est de 60 ppm. «*L'utilisation de solvants de classe 2 (...) doit être limitée en vue de protéger les patients d'éventuelles réactions indésirables*». L'élimination du chloroforme présent dans les suspensions de liposomes est nécessaire, non seulement car elles sont destinées à la voie intraveineuse, mais aussi pour éviter toute toxicité lors de la mise en contact de celles-ci avec les cellules. Une première étude nous a permis de montrer que l'évaporation du film lipidique sous vide pendant une nuit permet de diminuer significativement la quantité de chloroforme résiduel.

### II. 3. 1. Matériel et méthodes

#### *Préparation des liposomes*

Les trois types de formulations ont été préparés par hydratation du film lipidique. Trois lots de chaque formulation ont été étudiés. Le film a été hydraté par du tampon HEPES isotonique à pH 7,4. Les concentrations obtenues sont les suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (36m:36:4, mM), SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE



(36:36:4, mM) et DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (33:16:23:4,5, mM). Avant injection, les liposomes ont été dilués 10x dans l'éthanol absolu.

*Conditions chromatographiques*

- Injection Espace de tête
- Gaz vecteur Hélium
- Four Température initiale : 40°C  
Cette température est maintenue pendant 10 minutes puis augmente de 40°C/min pendant 5 minutes pour atteindre 240°C. Elle est maintenue à cette valeur pendant 5 minutes.
- Temps d'analyse 20 min
- Colonne Capillaire HP5 (5% phényle) - méthylsiloxane  
Longueur : 30 m  
Diamètre interne : 250 µm  
Épaisseur du film : 0,25 µm  
Vitesse : 8 cm/sec
- Détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme)  
Température : 280°C  
H<sub>2</sub>/air pour la flamme

Deux solutions témoins de chloroforme à 1 et à 6 ppm ont été préparées dans l'éthanol absolu. Le pic de la solution à 6 ppm sera comparé avec le pic obtenu pour chaque formulation de liposomes. Comme ces formulations ont été diluées 10x et que la limite autorisée par la *Pharmacopée Européenne* est de 60 ppm, ces pics ne devront pas être supérieurs à celui obtenu pour le témoin à 6 ppm.

## **II. 3. 2. Résultats**

La figure II.3.1.A.. présente le chromatogramme obtenu après injection d'une solution témoin contenant précisément 6 ppm de chloroforme. Le pic

correspondant au chloroforme se situe à un temps de rétention de 6,2 minutes. C'est le seul pic supplémentaire qui apparaît par rapport à un chromatogramme obtenu après injection d'éthanol absolu. Il présente une séparation acceptable du pic principal d'éthanol et des autres impuretés. Les chromatogrammes obtenus après injection des solutions des trois formulations de liposomes sont présentés aux figures II.3.1.B., C. et D.

Aucun chromatogramme des formulations de liposomes ne présente de pic détectable à un temps de rétention de 6,2 minutes alors que l'injection de la solution témoin à 1 ppm permet d'obtenir un pic de chloroforme encore visible à 6,2 minutes.

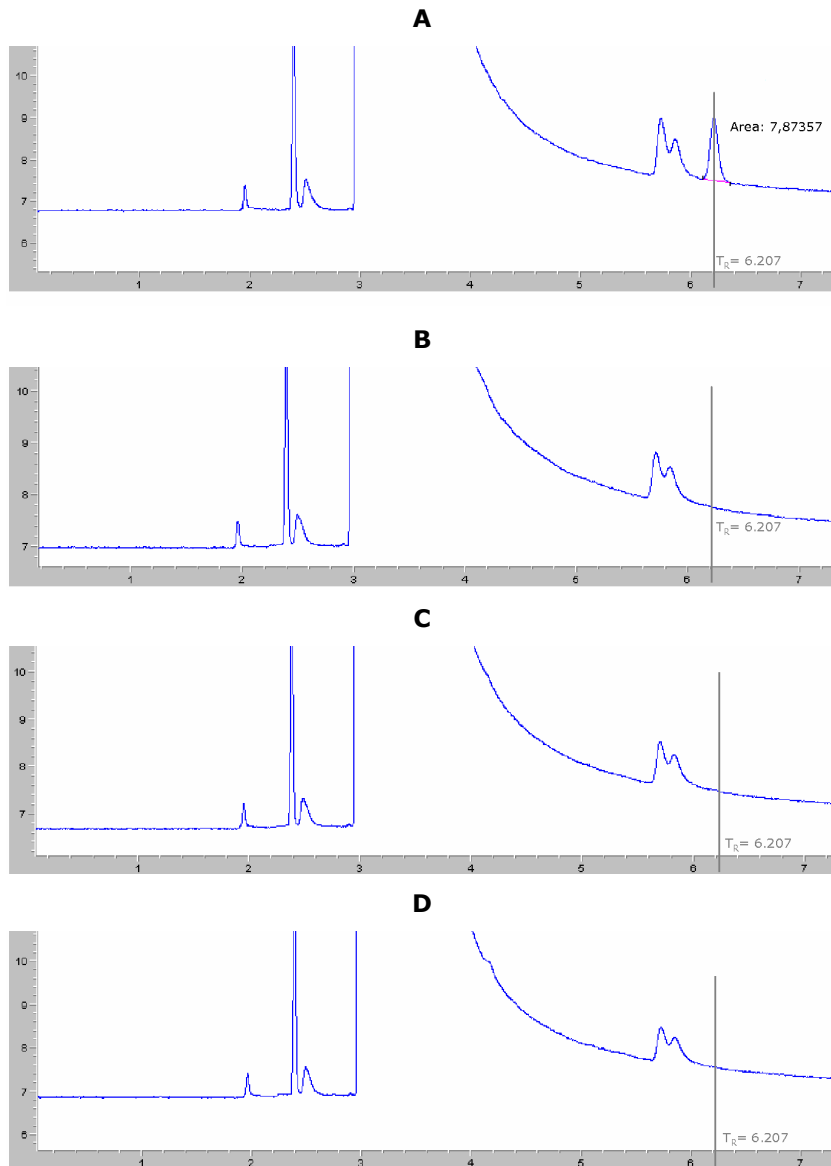


Figure II.3.1. Chromatogrammes (A) d'une solution témoin à 6 ppm, (B) des formulations de liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> ou (C) du PEG<sub>750</sub> et (D) de la formulation de liposomes pH-sensibles à base de PEG<sub>750</sub>.

### **II. 3. 3. Conclusions**

Les trois formulations renferment une concentration en chloroforme inférieure à la limite exigée par la *Pharmacopée Européenne* et cette concentration est inférieure à 10 ppm.

Dans la suite du travail, la préparation des liposomes pour les études *in vitro* et *in vivo* comportera toujours une étape d'élimination du chloroforme résiduel dans une étuve à vide pendant une nuit.

## **II. 4. ETUDE PRÉLIMINAIRE DE LA PENETRATION CELLULAIRE DE LIPOSOMES PEGYLES PAR MICROSCOPIE À FLUORESCENCE CONVENTIONNELLE**

Une première étude en microscopie à fluorescence a été réalisée afin d'évaluer la pénétration des trois types de formulations de liposomes pegylés dans les cellules Hs578t issue d'une lignée cancéreuse mammaire non tumorigène. La pénétration du contenu liposomal a été étudiée en encapsulant un traceur fluorescent, la calcéïne. La pénétration cellulaire des constituants membranaires des liposomes a pu être suivie grâce au 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)methyl]amino]-27-norcholesterol (NBD-CHOL), constitué de cholestérol associé à un fluorochrome.

### **II. 4. 1. Matériel et méthodes**

La lignée cellulaire humaine Hs578t a été fournie par l'American Type Culture Collection (Manassas, USA). Les cellules ont été cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5% en CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules Hs578t sontensemencées sur une plaque 96 puits (5000 cellules/puits) puis placées à nouveau à l'incubateur à 37°C durant une nuit. Le milieu est ensuite remplacé par 100 µL de suspension de liposomes. La plaque est placée dans l'incubateur à 37°C pendant 3 heures puis le milieu est remplacé par du milieu complet. La plaque est ensuite placée à l'incubateur une nuit à 37°C. Enfin, le milieu est remplacé par du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 et chaque puits est examiné au microscope à fluorescence inversée (Axiovert25 fluorescence and phase contrast inverted microscope, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Les liposomes encapsulant de la calcéine ont été préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique avec une solution de calcéine 40 mM. Les formulations contenant du NBD-CHOL ont été également préparées par cette méthode. Le NBD-CHOL a été incorporé à la concentration de 300  $\mu$ M lors de la dissolution des lipides avant évaporation. Le film obtenu a été hydraté par une solution isotonique de tampon HEPES pH 7,4. Pour les liposomes contenant de la calcéine, 6 cycles d'ultracentrifugation à 4°C à 35000 rpm (Beckman SW60, 86496 g) ont été effectués pendant respectivement 60, 45, 30, 30, 30, 30 minutes pour éliminer la calcéine non encapsulée. Les liposomes contenant du NBD-CHOL n'ont subi qu'un cycle d'ultracentrifugation pendant 3h30. Les culots ont finalement été repris par du milieu DMEM sans sérum pour atteindre les concentrations finales suivantes : SPC/CHOL/PEG<sub>2000</sub>-DSPE (7,2:7,2:0,8, mM) ; SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (7,2:7,2:0,8, mM) et DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (6,6:3,2:4,6:0,9, mM). Les liposomes ont été stérilisés par filtration sur membrane stérile de 0,22  $\mu$ m en condition aseptique avant mise en contact sur les cultures cellulaires.

## II. 4. 2. Résultats

L'encapsulation d'une solution de calcéine dans les différents types de liposomes a été réalisée afin de visualiser la pénétration cellulaire du matériel encapsulé dans la cavité interne des liposomes. Les images présentées à la figure II.4.1. permettent de comparer les trois formulations étudiées. La fluorescence de la calcéine encapsulée dans les liposomes classiques contenant du PEG<sub>750</sub> (Figure II.4.1. B et E) est visible dans quelques cellules alors qu'aucune fluorescence n'est visible à l'intérieur des cellules mises en contact avec les liposomes contenant des PEG<sub>2000</sub> (Figure II.4.1. A et D). Les meilleurs résultats sont ceux présentés à la figure II.4.1 C et F, obtenus par traitement des cellules Hs578t avec les liposomes pH-sensibles encapsulant la calcéine. Dans cette étude, la calcéine est encapsulée à une concentration telle que sa fluorescence est minimale (phénomène de self quenching). Lorsqu'elle se dilue dans le milieu

extérieur, sa fluorescence est maximale. La faible intensité de fluorescence sur les images des cellules traitées avec les liposomes de composition classique peut s'interpréter de deux manières. Premièrement, les liposomes ne pénétreraient pas efficacement dans la cellule car la présence de PEG à leur surface diminue leur capacité d'interaction avec la membrane cellulaire, et donc leur internalisation. Deuxièmement, les liposomes classiques ne seraient pas capables de libérer la calcéine dans le cytoplasme des cellules. La calcéine resterait encapsulée dans les liposomes où sa fluorescence reste faible et ne peut être visualisée.

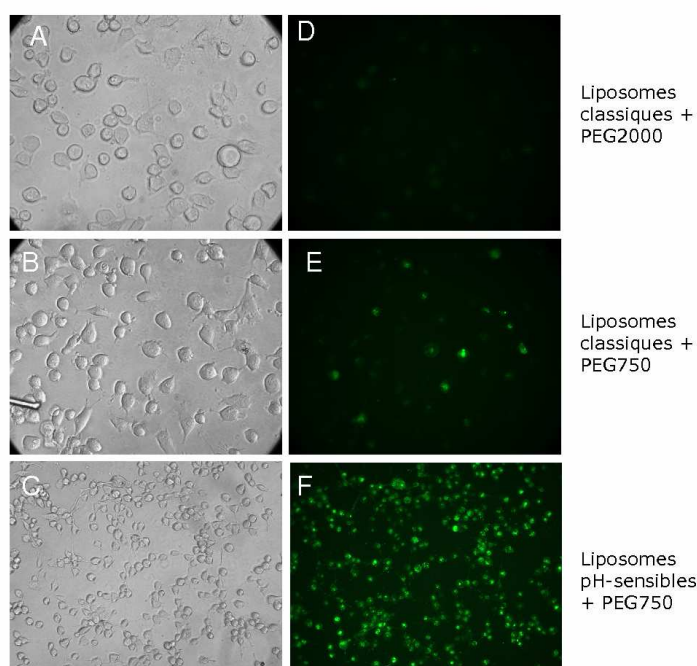


Figure II.4.1. Images obtenues par microscopie optique (A, B, C) et à fluorescence (D, E, F) de cellules Hs578t après 3h d'exposition aux liposomes encapsulant la calcéine. Les cellules ont été traitées avec (A, D) des liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> ; (B, E) des liposomes classiques contenant des PEG<sub>750</sub> (B, E) ou (F, G) des liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>.

(A,D,B,E) objectif 40x ; (C,F) objectif 20x.

Dans la suite des études de pénétration cellulaire des vecteurs, deux formulations ont donc été retenues, les liposomes classiques et les liposomes pH-sensibles contenant tout deux du PEG<sub>750</sub>.

Pour étudier la pénétration des constituants membranaires des liposomes à l'intérieur des cellules Hs578t, un dérivé fluorescent de cholestérol, le NBD-CHOL, a été inclus dans la membrane phospholipidique. Les photos présentées à la figure II.4.2. montrent une fluorescence dans le cytoplasme de toutes les cellules exposées aux liposomes contenant du NBD-CHOL, qu'ils soient de composition classique ou pH-sensible. La pénétration des deux types de liposomes semble effective dans toutes les cellules traitées ce qui tend à conforter la seconde hypothèse d'un mauvais relargage du contenu liposomal pour les liposomes classiques.



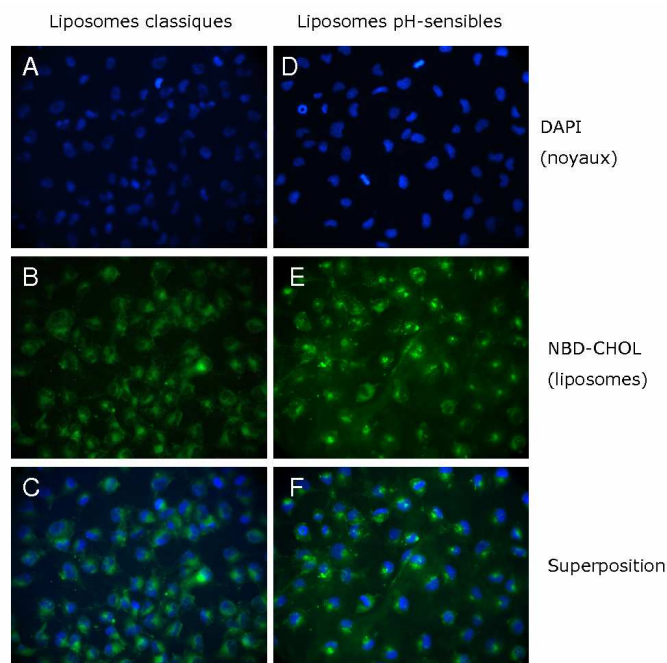


Figure II.4.2. Images obtenues par microscopie à fluorescence de cellules Hs578t après 3h d'exposition aux liposomes classiques contenant du PEG<sub>750</sub> (A, B, C) ou pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> (D, E, F) marqués au NBD. (A, D) coloration bleue des noyaux par marquage au DAPI ; (B, E) coloration verte des liposomes marqués au NBD-CHOL ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de D et E. Objectif 40x.

### II. 4. 3. Conclusions

L'utilisation de PEG<sub>750</sub> semble permettre de maintenir une pénétration efficace des vésicules dans les cellules et les liposomes pH-sensibles semblent libérer plus efficacement le matériel encapsulé dans le cytoplasme, comparé à une formulation classique.

Néanmoins, cette technique de microscopie à fluorescence ne nous permet pas de visualiser spécifiquement et uniquement l'intérieur des cellules. Il se pourrait

donc que la fluorescence observée soit présente à la surface cellulaire et non uniquement dans le cytoplasme. C'est pourquoi la suite des études de pénétration des vecteurs utilisera la technique de microscopie confocale. En effet, la microscopie confocale permet de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan observé. La localisation de la fluorescence à l'intérieur des cellules, émise par les molécules incorporées dans les liposomes, sera donc validée par cette technique.

## **II. 5. DEVENIR INTRACELLULAIRE D'UNE MOLECULE MODELE INSEREE DANS LA BICOUCHE LIPIDIQUE**

L'encapsulation de rhodamine dans la membrane liposomale a été réalisée afin d'étudier le devenir intracellulaire d'un composé plus lipophile que la calcéine, encapsulé dans la bicouche phospholipidique du liposome.

### **II. 5. 1. Matériel et méthodes**

Les lignées cellulaires humaines Hs578t et MDA-MB-231, respectivement utilisées comme cellules cancéreuses non tumorigènes et tumorigènes, ainsi que dans la lignée cellulaire WI-26, utilisée comme lignée non cancéreuse et constituée de cellules de fibroblastes pulmonaires immortalisées, ont été fournies par l'American Type Culture Collection (Manassas, USA). Les cellules ont été cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5% en CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de FBS décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules sontensemencées sur des lamelles couvre-objet en verre déposées dans des plaques 24 puits. Celles-ci sont ensuite placées à l'incubateur à 37°C pendant 24h. Après cette période d'incubation, le milieu est ensuite remplacé par une suspension de liposomes. La plaque est placée à l'incubateur à 37°C pendant 2h30. Les cellules sont lavées plusieurs fois avec du tampon PBS puis sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% et enfin rincées au PBS. Les lamelles couvre-objets sont montées avec du milieu Vectashield DAPI sur des lames porte-objets pour l'observation par microscopie confocale (Olympus FluoView FV1000). Toutes les images ont été prises avec les mêmes réglages (PMT et pourcentage des lasers).

Les liposomes encapsulant la rhodamine ont été préparés par la technique d'hydratation du film lipidique. Le film a été hydraté par une solution isotonique de rhodamine à 20 mM. Ensuite, 7 cycles d'ultracentrifugation à 4°C à 35000

rpm (Beckman SW60, 86496 g) ont été effectués pendant respectivement 60, 45, 30, 30, 30, 30 et 30 minutes pour éliminer la rhodamine non encapsulée. Le dernier culot a été repris par du milieu DMEM sans sérum et stérilisé avant application sur les cultures cellulaires. Les concentrations finales appliquées sur les cellules sont les suivantes SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (7,2:7,2:0,8, mM) et DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (6,6:3,2:4,6:0,9, mM).

## **II. 5. 2. Résultats**

Les images des cellules Hs578t traitées avec les deux types de formulations sont présentées à la figure II.5.1. La rhodamine pénètre dans les cellules Hs578t avec la même efficacité pour les deux formulations étudiées. La même observation a été réalisée sur les lignées MDA-MB-231 et WI-26 (figures II.5.2. et 3.). La rhodamine, contrairement à la calcéïne, ne présente pas de phénomène de self-quenching. Elle émet de la fluorescence avec la même intensité quand elle est insérée dans la bicouche membranaire que lorsqu'elle diffuse hors du liposome. Nous ne pouvons donc pas affirmer qu'elle est effectivement libérée dans le cytoplasme des cellules.

Comme nous le verrons par la suite, il existe pourtant une différence de pénétration cellulaire entre les deux types de liposomes étudiés (voir section II.6.). Nous montrerons que les liposomes pH-sensibles pénètrent mieux dans les cellules Hs578t que les liposomes classiques. Donc, malgré cette différence de pénétration des liposomes, aucune différence n'est visible quant à la pénétration de la rhodamine. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'insertion d'un composé dans la bicouche phospholipidique est moins stable que l'encapsulation dans la cavité aqueuse du liposome. En effet, ce composé peut diffuser de la membrane liposomale vers le milieu extracellulaire plus aisément qu'une molécule hydrophile, encapsulée dans la cavité centrale du liposome, qui doit traverser la bicouche membranaire pour être libérée. Il se peut que cette instabilité permette à la rhodamine de diffuser seule vers le cytoplasme des cellules.

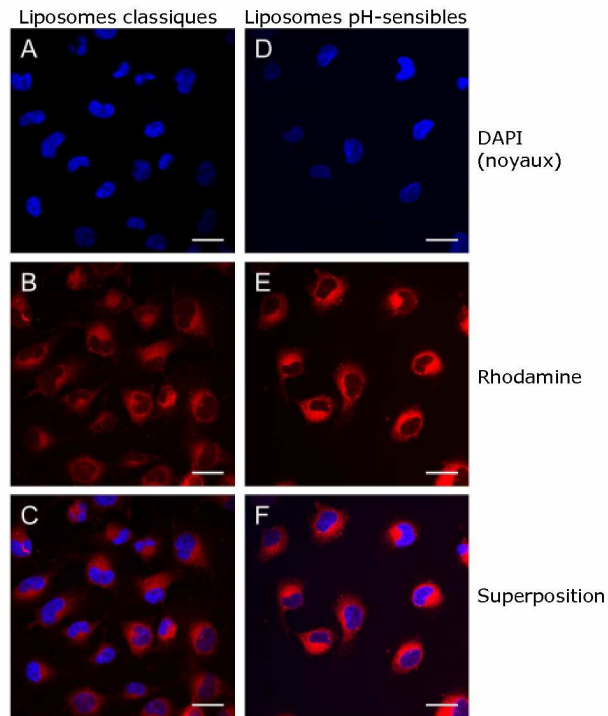


Figure II.5.1. Images obtenues par microscopie confocale de cellules Hs578t traitées pendant 2h30 avec des liposomes pegylés classiques (A,B,C) ou pH-sensibles (D,E,F) encapsulant de la rhodamine. (A,D) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, E) coloration rouge de la rhodamine insérée dans les liposomes ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de D et E. La barre représente 30  $\mu\text{m}$ .

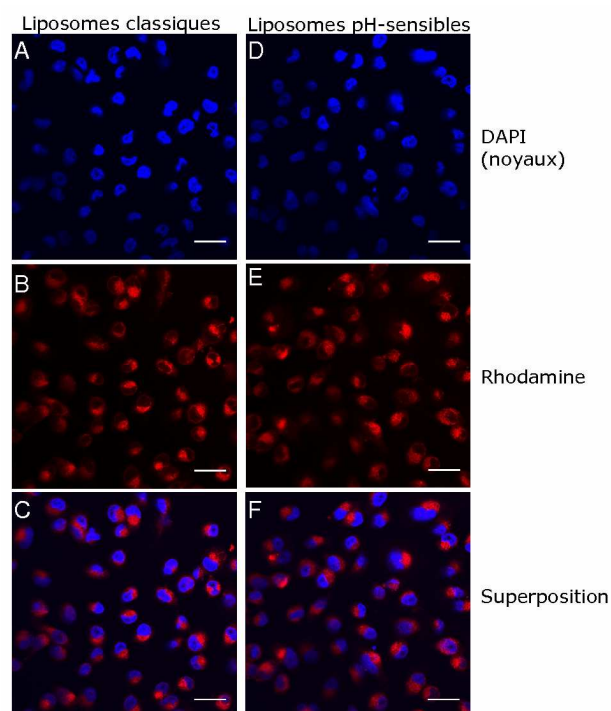


Figure II.5.2. Images obtenues par microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées pendant 2h30 avec des liposomes pegylés classiques (A,B,C) ou pH-sensibles (D,E,F) encapsulant de la rhodamine. (A,D) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, E) coloration rouge de la rhodamine insérée dans les liposomes ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de D et E. La barre représente 30  $\mu\text{m}$ .

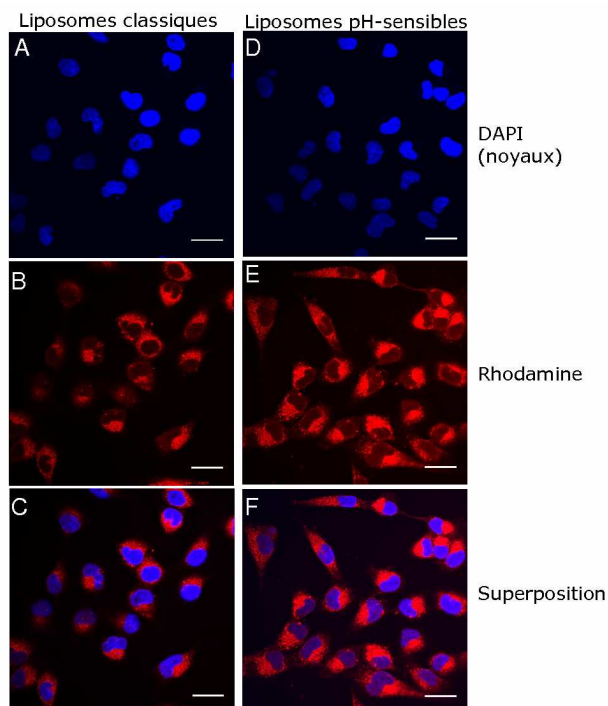


Figure II.5.3. Images obtenues par microscopie confocale de cellules WI-26 traitées pendant 2h30 avec des liposomes pegylés classiques (A,B,C) ou pH-sensibles (D,E,F) encapsulant de la rhodamine. (A,D) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, E) coloration rouge de la rhodamine insérée dans les liposomes ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de D et E. La barre représente 30  $\mu\text{m}$ .

### II. 5. 3. Conclusions

L'utilisation de la rhodamine comme molécule modèle encapsulée dans la bicouche phospholipidique n'a pas permis d'observer une différence entre les deux formulations, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. Les liposomes pH-sensibles ne présenteraient pas d'avantage particulier pour la vectorisation de ce type de substances actives.

## **II. 6. ETUDE DE LA PENETRATION CELLULAIRE DES LIPOSOMES CLASSIQUES ET PH-SENSIBLES A BASE DE PEG<sub>750</sub> ENCAPSULANT LE PEPTIDE PRINT3G**

### **II. 6. 1. Résumé des résultats de la publication**

La formulation de liposomes pH-sensibles a été caractérisée en termes de taille, de taux d'encapsulation du peptide Print3G, de stabilité et de cryoprotection<sup>1</sup>. Nous avons pu montrer que les liposomes pH-sensibles présentent un très bon taux d'encapsulation du peptide, une taille adéquate et une stabilité satisfaisante. Une étude de stabilité des deux types de formulations en fonction du pH a permis de mettre en évidence une libération du matériel encapsulé significativement plus importante à pH 5 qu'à pH 7,4 pour les liposomes pH-sensibles et ce, malgré la présence de PEG qui pourrait réduire leur déstabilisation à pH acide. Ce maintien de la sensibilité au pH, probablement dû à l'emploi de PEG de plus faible masse moléculaire, laisse espérer une meilleure efficacité de transfection pour les liposomes pH-sensibles que pour les liposomes classiques.

L'objet de cette publication est d'étudier la pénétration des vecteurs et de leur matériel encapsulé dans différentes lignées cellulaires. Des études en cytométrie de flux et en microscopie confocale ont été réalisées. Puisque le peptide Print3G est antagoniste d'une oncoprotéine impliquée dans le cancer du sein, deux lignées issues de carcinomes mammaires ont été employées, Hs578t et MDA-MB-231, respectivement utilisées comme cellules cancéreuses non tumorigènes et tumorigènes, ainsi que dans la lignée cellulaire WI-26, utilisée comme lignée non cancéreuse et constituée de cellules de fibroblastes pulmonaires immortalisées.

---

<sup>1</sup> Les résultats de cryoprotection ne sont pas discutés dans la publication. Une étude de cryoprotection des liposomes pH-sensibles à base de PEG<sub>750</sub> a été réalisée selon le même protocole qu'au chapitre I.6.2. et la perte en peptide après congélation mesurée est inférieure à 5%.



Les mesures réalisées en cytométrie de flux montrent une libération trois fois plus importante de calcéine dans les cellules cancéreuses traitées par les liposomes pH-sensibles que lorsqu'elles sont traitées par des liposomes classiques (Figure II.6.1.). La calcéine est utilisée comme molécule modèle du peptide Print3G, lui aussi encapsulé dans la cavité aqueuse des liposomes. La fluorescence de la calcéine, minimale lorsqu'elle est encapsulée dans la cavité interne du liposome, augmente lorsqu'elle est libérée dans le cytoplasme des cellules.

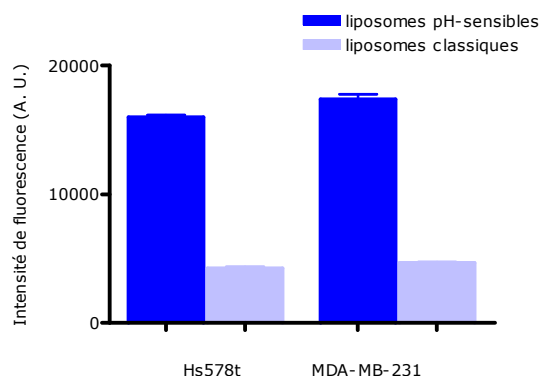


Figure II.6.1. Fluorescence de la calcéine (unités arbitraires) dans les cellules Hs578t et MDA-MB-231 traitées avec des liposomes pH-sensibles (bleu foncé) ou classiques (bleu clair).

L'utilisation d'un marqueur de la membrane liposomale nous a permis de montrer une meilleure pénétration cellulaire des liposomes pH-sensibles par rapport aux liposomes classiques. Ceci peut se justifier par la présence de DOPE dans ce type de formulation, permettant une meilleure interaction avec la membrane cellulaire.

Toutefois, la différence entre les deux formulations est beaucoup moins marquée, ce qui porte à croire que l'avantage des liposomes pH-sensibles sur les classiques réside plutôt dans leur capacité à libérer le matériel encapsulé que dans la quantité de liposomes capables d'entrer dans la cellule.

Cette hypothèse a été confirmée par les études de pénétration cellulaire des liposomes encapsulant le peptide Print3G. Une première étude a permis de montrer la présence de peptide dans le cytoplasme des cellules mais aussi dans certains noyaux cellulaires après un temps de contact de 2h30 (Figure II.6.2.).

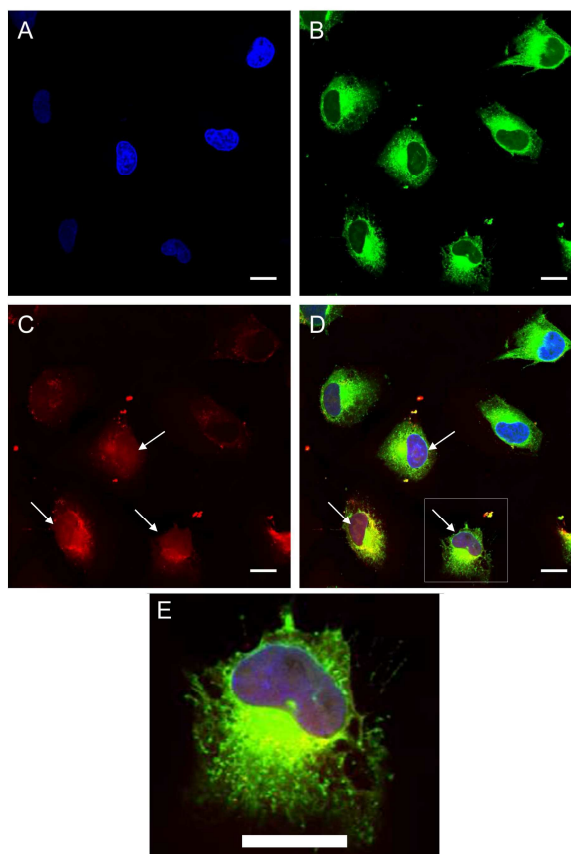


Figure II.6.2. Images obtenues par microscopie confocale de cellules Hs578t traitées pendant 2h30 avec des liposomes contenant du NBD-CHOL et encapsulant le peptide Print3G. (A) coloration bleue des noyaux avec le DAPI; (B) coloration verte des liposomes marqués au NBD; (C) coloration rouge du peptide Print3G; (D) superposition de A, B, C. (E) agrandissement d'une cellule de la figure C. La barre représente 20  $\mu\text{m}$ .

Une accumulation importante des liposomes classiques après 5 heures de traitement a été observée, la présence de peptide n'étant toutefois localisée que dans le cytoplasme des cellules Hs578t et MDA-MB-231. Quant à l'accumulation des liposomes pH-sensibles, elle est croissante au cours du temps et maximale après 15 heures de contact avec de plus, une pénétration du peptide dans le noyau des cellules (Figure II.6.3).

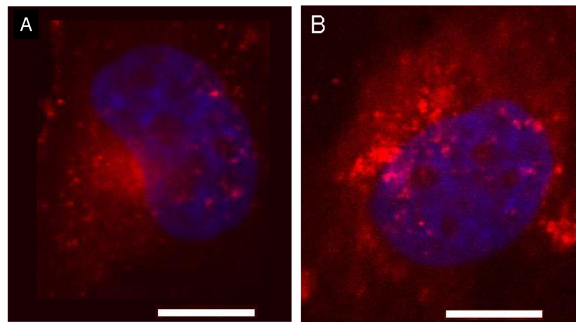


Figure II.6.3. Images obtenues par microscopie confocale de cellules Hs578t traitées pendant (A) 5 heures ou (B) 15 heures avec des liposomes pH-sensibles marqués au NBD et encapsulant le peptide Print3G biotinylé. La barre représente 10  $\mu\text{m}$ .

## II. 6. 2. Publication

### **NUCLEAR DELIVERY OF A THERAPEUTIC PEPTIDE BY LONG CIRCULATING PH-SENSITIVE LIPOSOMES: BENEFITS OVER CLASSICAL VESICLES**

E. Ducat<sup>a\*</sup>, J. Deprez<sup>b</sup>, A. Gillet<sup>a</sup>, A. Noël<sup>b</sup>, B. Evrard<sup>a</sup>, O. Peulen<sup>c#</sup>  
and G. Piel<sup>a#</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liege, B36, Tour 4, Level 2, Avenue de l'hôpital, 1, B-4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup> Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA-Cancer, University of Liege, Pathology building, B23, Level 4, B-4000 Liege, Belgium

<sup>c</sup> Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, University of Liege, Pathology building, B23, Level 4, B-4000 Liege, Belgium

# The last two authors contributed equally to this research

Ce chapitre est soumis pour publication dans le Journal of Controlled Release

**II. 6. 2. 1. Abstract**

The purpose of this study is to propose a suitable vector combining increased circulation lifetime and intracellular delivery capacities for a therapeutic peptide. Long circulating classical liposomes [SPC:CHOL:PEG-750-DSPE (47:47:6 molar% ratio)] or pH-sensitive stealth liposomes [DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6 molar% ratio)] were used to deliver a therapeutic peptide to its nuclear site of action. The benefit of using stealth pH-sensitive liposomes was investigated and formulations were compared to classical liposomes in terms of size, shape, charge, encapsulation efficiency, stability and, most importantly, in terms of cellular uptake. Confocal microscopy and flow cytometry were used to evaluate the intracellular fate of liposomes themselves and of their hydrophilic encapsulated material. Cellular uptake of peptide-loaded liposomes was also investigated in three cell lines: Hs578t human epithelial cells from breast carcinoma, MDA-MB-231 human breast carcinoma cells and WI-26 human diploid lung fibroblast cells. The difference between formulations in terms of peptide delivery from the endosome to the cytoplasm and even to the nucleus was investigated as a function of time. Characterization studies showed that both formulations possess acceptable size, shape and encapsulation efficiency but cellular uptake studies showed the important benefit of the pH-sensitive formulation over the classical one, in spite of liposome PEGylation. Indeed, stealth pH-sensitive liposomes were able to deliver hydrophilic materials strongly to the cytoplasm. Most importantly, when encapsulated in pH-sensitive stealth liposomes, the peptide was able to reach the nucleus of tumorigenic and non tumorigenic breast cancer cells.

**Keywords:** peptide; pH-sensitive liposomes; drug delivery; PEG; cellular uptake; confocal microscopy

**II. 6. 2. 2. Introduction**

Print3G is a putative antagonist of an oncoprotein involved in breast cancer growth and invasion. Until now, only a few biologically active peptides have been successfully used in clinical medicine. Indeed, administration of peptidic drugs presents several disadvantages, related to their rapid elimination from the blood circulation by the lymphatic system, their enzymatic degradation, their uptake by the reticulo-endothelial system (RES) and their non-selective accumulation [1-4].

The necessity for intravenous administration of Print3G has led to the development of PEGylated liposomes as drug carriers. Recently, several studies successfully explored the path of liposomes for the administration of several peptides [2, 5, 6]. Liposomes, spherical structures composed of one or several phospholipid bilayers, possess many attractive characteristics for stabilizing peptidic drugs and for improving their pharmacological properties. Being biocompatible and biodegradable, liposomes cause no or very mild antigenic, pyrogenic, allergic or toxic reactions. They can entrap hydrophilic drugs within their aqueous compartment, lipophilic compounds in their membrane or amphipathic drugs. First generation liposomes have been shown to be easily eliminated from the bloodstream and to accumulate in the Kupfer cells in the liver and in spleen macrophages [7]. Therefore, the strategy has been to graft polymers onto nanoparticles and particularly onto liposomal phospholipids with polyethylene glycol (PEG). PEGs are synthetic, inert and biocompatible polymers, allowing the formation of a protective layer on the particle surface and providing protection against opsonization and capture by the RES [8]. The increase in circulation lifetime by PEGs was demonstrated by Dos Santos et al., who showed an increase in vascular remanence for the surface-grafted PEG liposomes, preventing aggregation and building a steric barrier around the liposome, in comparison with non-grafted vectors [9]. These two properties, namely the increase in circulation time and the decrease in capture by the RES, explain the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, applicable to

almost all rapidly growing solid tumours [10]. The enhanced extravasations of macromolecules from blood vessels to tumour and their retention within these tissues, due to the anatomical and permeability particularities of tumours, represent a phenomenon not observed in normal tissue, leading to a passive targeting towards affected tissues.

Print3G is a hydrophilic peptide composed of 25 natural amino acids (M.W.=3000, pI=11.1), freely soluble in water, as such it is encapsulated in the inner aqueous cavity of liposomes. The first formulation of PEGylated liposomes developed as Print3G vector [11] was made of soybean phosphatidylcholine (SPC), methoxypolyethyleneglycol grafted onto distearoylphosphoethanolamine (PEG<sub>750</sub>-DSPE) and cholesterol (CHOL), added because of their stabilizing properties [9, 12, 13]. In order to improve the introduction of encapsulated material into the cytoplasm, a second formulation was developed, replacing SPC with a combination of dioleoylphosphoethanolamine (DOPE) and cholesterylhemisuccinate (CHEMS) [14]. DOPE exhibits a conical shape because of its small and minimally hydrated headgroup, compared to its lipophilic tail. DOPE is associated with a compound used as a stabilizer of the liposomal membrane: CHEMS. This molecule possesses an inverted cone shape at physiological pH, but, under acidic conditions, the carboxylic acid group becomes protonated and loses this particular shape. During endocytosis, the pH decreases within the endosome, resulting in a destabilization of the liposomal membrane transiting from a lamellar to a hexagonal phase. Some publications have described the mechanism of action of pH-sensitive liposomes containing a derivative of PE associated with a compound containing an acidic group as stabilizer [15-18]. PEG and cholesterol added into formulations decrease the membrane fluidity of fluid liposomes and can hamper their penetration capacity/potency and their pH-sensitivity [19, 20]. Cholesterol indeed is able to increase the fluidity of solid membranes. The use of PEG<sub>750</sub>, characterized by a lower molecular weight than PEG often used to obtain long circulating liposomes, could allow finding a compromise between the improvement of vascular remanence and intracellular delivery. Maintenance of liposomes pH-sensitivity

thanks to the use of DSPE-PEG<sub>750</sub> will be studied and discussed in this publication. Moreover, few publications have described formulations of long circulating pH-sensitive liposomes [21-23], none has investigated the difference in terms of cellular uptake between classical and pH-sensitive liposomes and no study has proposed a suitable vector for the delivery of nuclear peptides.

The purpose of this study is to propose a suitable vector for the intracellular delivery of a therapeutic peptide called Print3G, while keeping the formulation properties of long-circulating liposomes to effectively deliver the peptide to its site of action. To investigate the benefit of developing a formulation of long circulating pH-sensitive liposomes beside a classical formulation of stealth liposomes, these two formulations were compared in terms of size, shape, charge, encapsulation efficiency, stability and cellular uptake. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were used to evaluate the intracellular fate of liposomes themselves and of their encapsulated material as a function of time. In order to demonstrate the benefit of the vector, research was expanded to various cell lines: Hs578t human epithelial cells from breast carcinoma, MDA-MB-231 human breast carcinoma cells and WI-26 human diploid lung fibroblast cells.

Firstly, we studied the cellular uptake of liposomes themselves, using NBD-CHOL as a fluorescent marker of the phospholipids bilayer.

Secondly, the delivery of a model molecule, calcein, was investigated. Calcein was chosen as a model molecule for two reasons: (1) its localization in the aqueous compartment of liposomes because of its hydrophilicity similar to Print3G and (2) its self-quenching behavior, often used to study the endosomal escape triggered by pH-sensitive liposomes [24-26].

Finally, we studied the intracellular outcome of Print3G, which has to reach the nucleus for its therapeutic action. This helped us to discern the difference between the two formulations in terms of delivery of the entrapped peptide from the endosome to the cytoplasm and even to the nucleus.



**II. 6. 2. 3. Material and methods***II. 6. 2. 3. 1. Materials*

Soybean phosphatidylcholine (SPC, purity: 98%) was provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). N-(Carbonyl-methoxypolyethylenglycol-750)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (PEG-750-DSPE, purity 100%) and 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) were purchased from Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Switzerland). Cholesterol (CHOL, purity > 99%), Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) and calcein were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Print3G (purity: 95.39%) Biotinylated peptide called Print3G (purity: 98.44%) was acquired from GL Biochem (Shanghai, China). 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)methyl]amino]-27-norcholesterol (25-NBD-CHOL) was purchased from Avanti Polar Lipids (Pelham, USA). Water was deionized using the Millipore system (18.2 M $\Omega$ /cm resistivity) and was filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore Millipak<sup>□</sup> - 40 disposable filter unit (Millipore Corporation, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Foetal Bovine Serum (FBS), Penicillin Streptomycin, L-glutamine and streptavidin conjugate Alexa fluor 555 were purchased from Gibco-Life Technologies (Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Paraformaldehyde and polysorbate 20 were provided by Merck (Schuchardt and Darmstadt respectively, Germany). Vectashield mounting medium with DAPI was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

*II. 6. 2. 3. 2. Liposome characterization*

Liposome characterization was performed by Photon Correlation Spectroscopy (PCS), Zeta potential measures and freeze-fracture electron microscopy to ensure that the selected formulations possessed the required properties of

shape and size for *in vitro* studies and further intravenous administration of the encapsulated peptide.

#### II. 6. 2. 3. 2. 1. Blank liposomes

Blank unilamellar vesicles, made of SPC:CHOL:PEG-750-DSPE (47:47:6, molar% ratio) for classical stealth liposomes or made of DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6, molar% ratio) for pH-sensitive long circulating liposomes, were prepared by the hydration of lipid film method. Briefly, required amounts of lipids were dissolved in chloroform and evaporated under reduced pressure in a round-bottomed flask to form a thin lipid film. The film was hydrated using a vortex mixer with HEPES-buffered saline, containing 67 mM NaCl and adjusted to pH 7.4 with 0.1 N NaOH solution. The resulting suspension was extruded 5 times through a 0.2 µm Nucleopore polycarbonate membrane (Whatman International Ltd, Maidstone, UK). Final concentrations of lipids were as follows: SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (36.1:36.1:4, mM) and DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE (33:16:23:4.5, mM).

#### II. 6. 2. 3. 2. 2. Photon correlation spectroscopy (PCS)

Liposome dispersions were diluted 10 times in isotonic HEPES buffer for PCS measurements (HPPS, Malvern Instruments, UK). Measurements were made at 25 °C with a fixed angle of 90°. Quoted sizes represented the average mean for the liposomal hydrodynamic diameter (nm). The polydispersity index (PDI) expressed the size distribution width.

#### II. 6. 2. 3. 2. 3. Zeta potential

The Zeta potential of liposomes formulations was measured with a Zetasizer 2000 DTS52013 (Malvern Instruments, UK) at pH 7.4. Liposome suspensions

were diluted 100 times in HEPES buffer pH 7.4, then loaded into a capillary cell mounted on the apparatus and measured 5 times at 37 °C.

#### II. 6. 2. 3. 2. 4. Freeze-fracture electron microscopy

Freeze-fracture replicas of blank liposome suspensions were analysed under transmission electron microscopy. In practice, a drop of liposome suspension containing 20% (v/v) glycerol as a cryoprotectant was deposited into a small gold cup and rapidly frozen in liquid nitrogen. Fracturing, freeze etching and shadowing with Pt-C were performed at  $-100^{\circ}\text{C}$  in shadowing equipment (Balzers® BAF-400) fitted with a freeze-fracture and etching unit. The replicas were examined with a JEOL (JEM-100SX) transmission electron microscope, operating at 80 kV accelerating voltage.

#### II. 6. 2. 3. 3. *Determination of Print3G encapsulation efficiency*

##### II. 6. 2. 3. 3. 1. Print3G encapsulation

The encapsulation of Print3G into the classical formulation of liposomes was made using the freeze-thawing method. Blank liposomes (see section II.6.2.3.2.1) were mixed with a 400  $\mu\text{M}$  Print3G solution in HEPES buffer, frozen for 1 min at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen and thawed for 5 min at 30 °C in a water bath. 11 cycles were performed to promote the entry of Print3G into vesicles. Between each cycle, the suspension was mixed for 10 seconds using a vortex mixer [11].

Concerning the classical formulation, the freeze-thawing method was found to give the best results because it avoids adsorption of Print3G on materials during manufacture. Encapsulation efficiencies were significantly increased in comparison to the hydration of lipid film technique. A design of experiments was built to obtain the best encapsulation efficiency for this formulation and was plainly described by Ducat *et al.* [11].

On the contrary, this method could not be used to encapsulate Print3G into pH-sensitive pegylated liposomes because liposome destruction after freeze-thawing cycles was observed by PCS measurements. High encapsulation efficiency for pH-sensitive liposomes was obtained using the hydration of lipid film method associated with pre-saturation of the extruder by a Print3G solution.

Liposomes were prepared by the hydration of lipid film method described in section II.6.2.3.2.1., the hydration of the lipid film was made with a 200  $\mu$ M Print3G solution in HEPES buffer. Before extrusion, the extruder was saturated with the same solution to avoid any adsorption of the peptide onto extrusion materials. The resulting suspension was extruded five times through a 0.2  $\mu$ m polycarbonate membrane.

Finally, the obtained suspensions underwent two ultracentrifugation cycles at 35,000 rpm for 3 h 30 at 4 °C using the Beckman SW60 rotor (86,496 g) in order to remove free Print3G.

#### II. 6. 2. 3. 3. 2. Print3G determination

An HPLC method with UV/visible diode array detector (DAD) was developed and validated for the determination of Print3G using a Hewlett-Packard 1100 series equipment (Agilent Technologies, USA). This method was detailed in our previous study [11]. Ten- $\mu$ l samples were injected into a Zorbax 300 SB-C18 (3.5  $\mu$ m, 150 mm x 4.6 mm I.D, Agilent Technologies, USA) in an oven set at 35 °C with a mobile phase containing water and acetonitrile (ACN). Both solvents were acidified with 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA). The applied gradient was as follows: 18-22.8% ACN from 0 to 20 min, 100% ACN at 25 min and 18% at 25.2 min. Detection was achieved at absorbance wavelengths of 220 nm and 275 nm.

### II. 6. 2. 3. 3. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was expressed in terms of the quantity of peptide loaded into liposomes as a function of the quantity operated. This encapsulation efficiency (EE) was calculated by the following equation (Eq. 1).

$$EE(\%) = \frac{\text{Amount of encapsulated Print3G}}{\text{Total amount of Print3G}} \times 100 \quad (1)$$

where the "amount of encapsulated Print3G" is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) loaded into liposomes and the "total amount of Print3G" is the amount of Print3G (in  $\mu\text{g}$ ) implemented.

### II. 6. 2. 3. 4. Stability

Calcein was encapsulated into vesicles in order to study the leakage of a hydrophilic encapsulated material. A 60 mM calcein isotonic solution was used to hydrate the lipid film (see section II.6.2.3.4.) in order to detect a leakage-induced effect. After extrusion, external calcein was removed by 6 ultracentrifugation cycles at 35,000 rpm for 60-45-30-30-30-30 minutes at 4 °C using the Beckman SW60 rotor (86,496 g).

Encapsulated calcein shows minimal fluorescence, owing to the formation of ground state dimers. Any fluorescence measured will be due to the leakage of calcein out of vesicles and dilution in the exterior aqueous media [27]. Fluorescence was measured after 0, 1, 2, 7, 14 and 28 days of storage at 4 °C and 37 °C. For the pH sensitivity study, the leakage of calcein as a function of the pH was measured after 6 hours under stirring in phosphate buffers at pH 5, pH 6 and pH 7.4. In practice, 100  $\mu\text{l}$  liposome suspension were added to 100  $\mu\text{l}$  HEPES buffered solution or 100  $\mu\text{l}$  of a 4% Triton X-100 solution, for complete liposome destruction, in a 96-well plate. Calcein release from liposomes was measured fluorometrically (SpectraMax Gemini XS); excitation and emission

wavelengths were 490 and 520 nm respectively. The amount of calcein released was calculated using the following equation (Eq. 2):

$$\% \text{calcein released} = \frac{I}{I_t} \times 100 \quad (2)$$

where  $I$  is the fluorescence intensity at 520 nm and  $I_t$  is the fluorescence intensity at 520 nm after complete destruction of the liposomes by Triton X-100.

#### *II. 6. 2. 3. 5. Cellular uptake of liposomes and of their encapsulated material*

##### II. 6. 2. 3. 5. 1. Liposomes

In order to follow the intracellular delivery of the encapsulated material, calcein was used as hydrophilic fluorescent marker. These liposomes were prepared as described in section II.6.2.3.4., using a 40 mM isotonic solution of calcein. Intracellular penetration of the liposomes themselves was studied using 25-NBD-CHOL incorporated into the bilayer. These vesicles were prepared using the hydration of lipid film method. 300  $\mu$ M of 25-NBD-CHOL in chloroform was added before evaporation under reduced pressure. Intracellular penetration of Print3G was studied using a biotinylated derivative of Print3G, which was incorporated into liposomes using the same methods as described in section II.6.2.3.3.1.

Final concentrations of lipids were 5 times lower than those used for blank liposomes (see section II.6.2.3.2.1.)

##### II. 6. 2. 3. 5. 2. Cell culture

The human cell lines used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Hs578t and MDA-MB-231 were chosen as breast carcinoma cell lines, respectively non-tumorigenic and tumorigenic. The last cell line chosen, WI-26, is an SV-40 immortalized lung fibroblast cell line.

Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 4.5 g/l glucose, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The three cell lines were seeded on glass coverslips in 24-well plates for CLSM analysis. For FACS studies, Hs578t cells and MDA-MB-231 cells were seeded respectively in 6-well and in 19-well plates.

After 24 h incubation, cells were grown to 70% confluence. The medium was removed before adding liposomes resuspended in serum-free DMEM.

#### II. 6. 2. 3. 5. 3. Confocal microscopy analysis

Cells were treated with fluorescently labelled liposomes for various lengths of time (15 minutes, 2.5 hours, 5 hours or 15 hours) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. This step was followed by several washes with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at 4°C and rinsed in PBS. If biotinylated Print3G was encapsulated into liposomes, streptavidin conjugate Alexa Fluor 555 was used as binding pair to link and reveal the biotinylated peptide. In practice, cells were permeabilized with 0.2% polysorbate 20 in PBS for 30 minutes at room temperature, incubated with streptavidin conjugate Alexa Fluor 555 at a dilution of 1:500 (v/v) for 30 minutes at room temperature and washed with PBS. The coverslips were finally mounted with Vectashield Medium with DAPI onto glass slides for microscopic observations.

The location of intracellular fluorescence was validated using confocal laser scanning microscope (Olympus FluoView FV100). Several fluorescent molecules were used and observed at several excitation wavelengths: DAPI at 405 nm, calcein and 25-NBD-CHOL at 488 nm, Alexa fluor 555 at 561 nm.

All optical sections were recorded with the same settings (in particular the laser power and the photomultiplier voltage) for each colour detected. Kalman collection filter 3-frame was used for each acquired image and for each colour.

## II. 6. 2. 3. 5. 4. Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis was conducted on liposomes containing calcein or NBD-CHOL and on empty liposomes without any fluorescent markers (negative controls). Fluorescence intensities and lipid content determination were used as liposome quality control before application on cells. Fluorescence intensities were measured using the SpectraMax Gemini XS; excitation and emission wavelengths were 490 and 520 nm respectively. Lipid concentration was measured using the phospholipids C test (Wako chemicals, LabAssay Phospholipid, choline oxidase – DAOS method, Wako Chemicals, Neuss, Germany) or the Cholesterol FS test (Dyasis diagnostic systems, Holzheim, Germany). Difference between pH-sensitive and classical formulations was less than 10% in terms of fluorescence and lipid concentration.

Cells were treated for 2,5h with blank liposomes, liposomes containing NBD-CHOL or liposomes encapsulating calcein. After incubation at 37°C, cells were washed twice with PBS and dissociated with 0,05% trypsin/EDTA. After a centrifugation step at 1,200 rpm for 5 minutes at 4°C, supernatants were discarded and cell pellets were washed with cold PBS. Cells were then fixed in paraformaldehyde (4% v/v) at 4°C for 10 minutes and washed twice with cold PBS. Finally, cells were resuspended in 250µL of cold PBS and kept on ice in the dark.

Analyses were performed using the flow cytometer FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The autofluorescence of each cell line was determined with non fluorescent blank liposomes. For calcein-loaded liposomes experiments (n=3), a total of 10,000 events were recorded. For pH-sensitive (n=3) and classical (n=2) formulations of liposomes incorporating NBD-CHOL, a total of respectively 10,000 and 5,000 events were recorded. Cell-associated calcein or NBD-CHOL was excited with 488-nm solid state laser (20mW) and fluorescence was detected using 502LP and 530/30 filters. Data were analyzed using FACSDiva and FlowJo software programs.



### *II. 6. 2. 3. 6. Statistical analysis*

Assuming Gaussian distribution and homoscedasticity, the statistical significance of the results in the liposome integrity section was tested using the student's *t*-test. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. For the measurements of calcein leakage in the stability study, multiple comparisons were performed using a one-way ANOVA. A *p* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## **II. 6. 2. 4. Results and discussion**

### *II. 6. 2. 4. 1. Liposome characterization*

Unilamellar liposomes were first characterized using the PCS technique. Data on size and zeta potentials of both formulations of empty liposomes, liposomes loaded with calcein and liposomes encapsulating Print3G are presented in Table 1. Sizes of  $172.6 \pm 14.7$  nm were obtained for blank liposomes of classical composition while pH-sensitive liposomes gave sizes around  $150.4 \pm 14.1$  nm, with a PDI always lower than 0.2 (Table 1). Blank stealth pH-sensitive liposomes are significantly smaller than the classical formulation ( $p < 0.01$ ). Loaded-liposomes were comparable in size regardless of the type of formulation ( $p > 0.05$ ). These sizes were acceptable for the following experiments and were consistent with the concept of passive accumulation in tumour tissues by the EPR effect [10]. Zeta potentials of  $-8.0 \pm 3.9$  mV and of  $-16.3 \pm 5.1$  mV were respectively obtained for blank classical and blank pH-sensitive stealth liposomes. Liposomes containing calcein or Print3G follow the same tendency. The relatively negative net charge obtained for pH-sensitive liposomes is conferred by the amphiphilic stabilizer (CHEMS), not completely masked by the protective layer constituted by PEGs.

Table 1. Z-average sizes and zeta potentials of classical and pH-sensitive stealth liposomes (n>3).

	<b>classical stealth liposomes</b>	<b>pH-sensitive stealth liposomes</b>
<b>Empty liposomes</b>	172.6 ± 14.7 nm	150.4 ± 14.1 nm
	-8.0 ± 3.9 mV	-16.3 ± 5.1 mV
<b>Liposomes containing calcein</b>	162.6 ± 4.3 nm	176.2 ± 21.3 nm
	-11.5 ± 3.4 mV	-16.6 ± 3.4 mV
<b>Liposomes containing Print3G</b>	163.8 ± 7.2 nm	165.2 ± 1.4 nm
	-6.8 ± 2.8 mV	-14.0 ± 3.4 mV

Freeze-fracture electron microscopy allowed the visualization of the shape of the two types of liposomes. Unilamellar vesicles of classical or pH-sensitive stealth liposomes are shown in Figure 1.

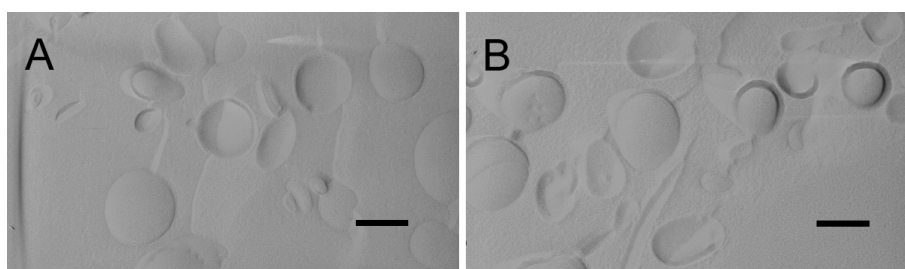


Figure 1. Micrographs of (A) classical or (B) pH-sensitive PEGylated liposomes as observed on freeze-fracture replicas in transmission electron microscopy.

Bars represent 125 nm.

These experiments allowed the visualization of the round shape of vesicles, sometimes elongated, their relatively close size distribution width and their size,

close to 130  $\mu\text{m}$  in diameter. PCS gives hydrodynamic diameters, resulting in higher sizes than those given by freeze-fracture electron microscopy.

#### *II. 6. 2. 4. 2. Encapsulation efficiency*

Print3G is a hydrophilic peptide freely soluble in water, as such it is encapsulated in the inner aqueous cavity of liposomes. In order to encapsulate Print3G into the formulation of classical stealth liposomes, blank liposomes were mixed with a Print3G solution, then freeze-thawed to promote the entry of the peptide into the vesicles. The encapsulation efficiency with this first formulation amounted to  $62.68 \pm 2.93\%$  ( $n=3$ ). This encapsulation technique had been described in a previous study by Ducat, *et al.* [11], using the experimental design to improve peptide entrapment.

This method could not be used to encapsulate Print3G into pH-sensitive pegylated liposomes because liposome destruction after freeze-thawing cycles was observed by PCS measurements. High encapsulation efficiency for pH-sensitive liposomes was obtained using the hydration of lipid film method associated with pre-saturation of the extruder by a Print3G solution. The encapsulation efficiency amounted to  $90.69 \pm 5.65\%$  ( $n=4$ ). Both formulations possess comparable sizes and shapes and good encapsulation efficiencies of Print3G. Even if two protocols are used, the final formulations are similar. The encapsulation efficiency of Print3G in the pH-sensitive formulation was found to be significantly better than in the classical one ( $p<0.05$ ). This could be explained by the presence of more negative charges in pH-sensitive liposomes, which could promote the entrapment of Print3G, presenting a theoretical positive charge of +6.1.

#### *II. 6. 2. 4. 3. Stability*

A 1-month stability following the leakage of calcein from the two types of liposomes was conducted at physiological temperature and at 4°C. As shown in

Figure 2, a significantly higher leakage of the encapsulated material was observed at 37°C than at 4°C after 30 days ( $p < 0.05$ ). No significant difference was observed between the two formulations. The leakage of calcein did not exceed 3% after one month at 4°C.

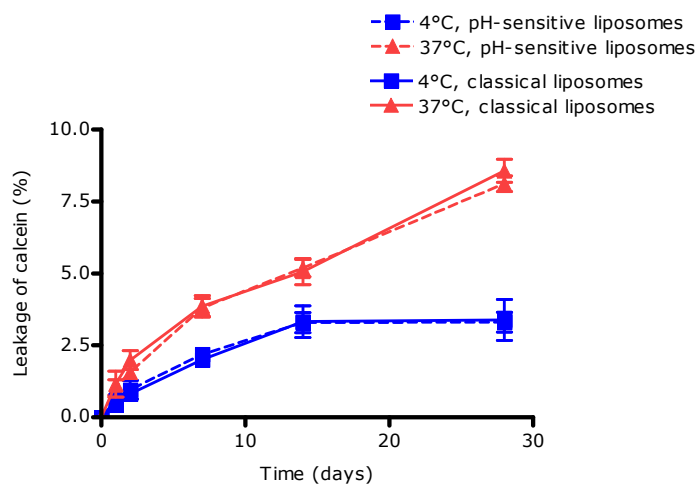


Figure 2. Leakage of calcein from pH-sensitive liposomes (dotted lines) or standard liposomes (plain lines) as a function of time at 37°C (full triangles) and 4°C (full squares) in isotonic HEPES buffer. Data points represent mean values ( $\pm$  S.D.) of three independent experiments.

For the study of the influence of pH on stability (Fig. 3), liposomes containing pH-sensitive lipids showed a leakage of calcein significantly higher at pH 5 (ANOVA-1,  $p < 0.05$ ).

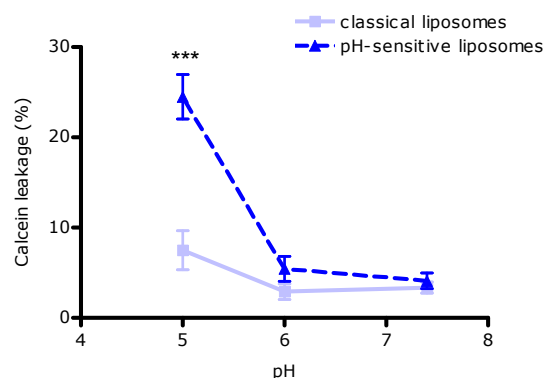


Figure 3. Leakage of calcein from pH-sensitive liposomes (dotted lines) or classical liposomes (plain lines) as a function of the pH. Data points represent mean values ( $\pm$  S.D.) of three independent experiments.

However, there was no significant difference between results at pH 6 and pH 7 ( $p > 0.05$ ). Moreover, compared to classical liposomes, the leakage of calcein after 6 hours at pH 5 was significantly higher ( $p < 0.05$ ). These results are linked to the composition of liposomes. Long circulating pH-sensitive liposomes contain DOPE which exhibits a conical shape and which is associated with a compound used as a stabilizer of the liposomal membrane: CHEMS. This molecule possesses an inverted cone shape at physiological pH, but, under acidic conditions, the carboxylic acid group becomes protonated and loses this particular shape. The pH decrease destabilizes the liposomal membrane, transiting from a lamellar to a hexagonal phase. The actual data could not be compared with the results found in other studies in the literature because various protocols were followed in those cases to evaluate the pH sensitivity of liposomes. Nevertheless, our results are consistent with those shown in the literature [28]. We can hypothesize that the pH-sensitivity of this formulation is partially hampered because pH-sensitive liposomes made of only DOPE and CHEMS release almost 85% of their calcein content at pH 5 [14, 28]. Johnsson and Edwards showed in their studies that adding PEG-lipids to a system made of DOPE alone, could stabilize the lamellar phase [29]. Despite these observations,

we measured a significant increase of calcein release by pH-sensitive formulation compared to the classical one. The use of PEG of lower molecular weight than those usually used to obtain long circulating pH-sensitive liposomes, such as PEG<sub>2000</sub>, could explain why pH-sensitive liposomes containing DSPE-PEG<sub>750</sub> keep a significant sensitivity at low pH.

So as a compromise must be found between intracellular delivery and protection against opsonisation, this pH-sensitivity study allows us expecting a better efficacy of transfection for pH-sensitive formulation than for the classical one, enabling a leakage of the drug into the cytoplasm and avoiding enzymatic degradation.

#### *II. 6. 2. 4. 4. Cellular uptake of liposomes and of their encapsulated material*

The Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) study allowed evaluating the intracellular fate of liposomes themselves and of their encapsulated material as a function of time and in various cell lines. CLSM offers the major benefit of optically sectioning the cell. Simple fluorescence microscopy can distort the reality and possibly confuse fluorescent compounds in the cytoplasm/nucleus with those adsorbed on the cellular surface. CLSM ensures that liposomes and/or their content have actually penetrated the cell [30]. Note that all the pictures used to compare formulations were acquired at the same settings (PMT and %laser).

CLSM is frequently associated with Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) to provide quantitative results related to the transfection of vectors in cells. FACS produces simultaneously multiple optical measurements on individual cells at high rates, allowing sorting of cells that meet specific criteria. Herein, FACS study was conducted on Hs578t and MDA-MB-231 cell lines to compare the internalization of classical and pH-sensitive stealth liposomes.

II. 6. 2. 4. 4. 1. Liposomes containing NBD-CHOL

The penetration of liposomes themselves was studied using NBD-CHOL as a fluorescent marker of the phospholipid membrane. Indeed, cholesterol is the only common compound of both formulations that is inserted in the phospholipids bilayer of classical and pH-sensitive liposomes. Nitrobenzoxidiazol, covalently grafted to cholesterol, was added at the same molar ratio in the two formulations. Therefore, it was a suitable compound to label fluorescently the phospholipids membrane of liposomes in order to follow their intracellular fate. Results obtained using CLSM to evaluate the cellular uptake of NBD-CHOL liposomes by Hs578t cells are presented on Figure 4. Figure 4E shows a strong green fluorescence in the cytoplasm of Hs578t cells with a brighter area near the nucleus, following the application of stealth pH-sensitive liposomes. When cells were treated with the classical formulation of stealth liposomes (Figure 4B), the cytoplasmic fluorescence was weaker and no brighter area was observed near the nucleus. Results obtained for penetration of fluorescent-labelled liposomes within WI-26 cells were similar to those obtained with Hs578t cells while difference between the two formulations was not discernible in MDA-MB-231 cells (data not shown<sup>2</sup>).

---

<sup>2</sup> Les résultats obtenus en microscopie confocale sur cellules MDA-MB-231 et WI-26 concernant l'étude de la pénétration cellulaire des liposomes marqués au NBD sont présentés à l'annexe 1.

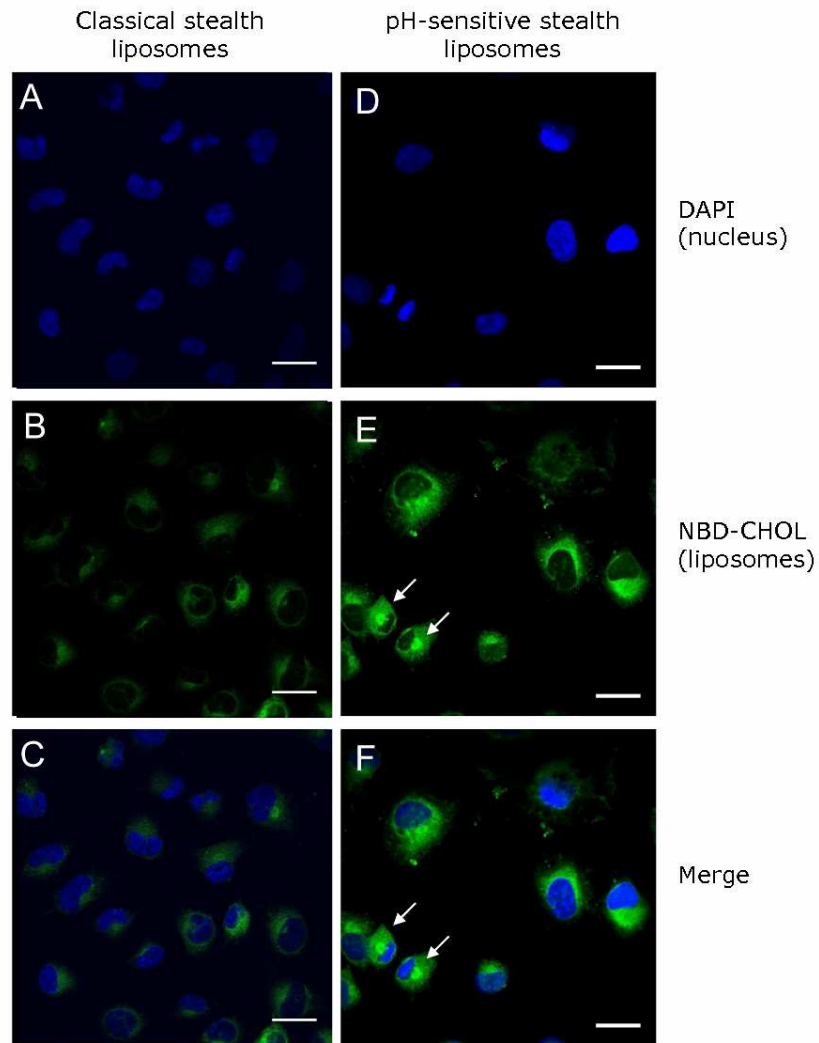


Figure 4. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 2,5h with classical stealth NBD-CHOL liposomes (A, B, C) or with NBD-CHOL pH-sensitive stealth liposomes (D, E, F). (A, D) nuclei blue staining with DAPI; (B, E) green staining of NBD-CHOL liposomes; (C, F) merge of DAPI and NBD-CHOL channels. Bars represent 30  $\mu\text{m}$ .



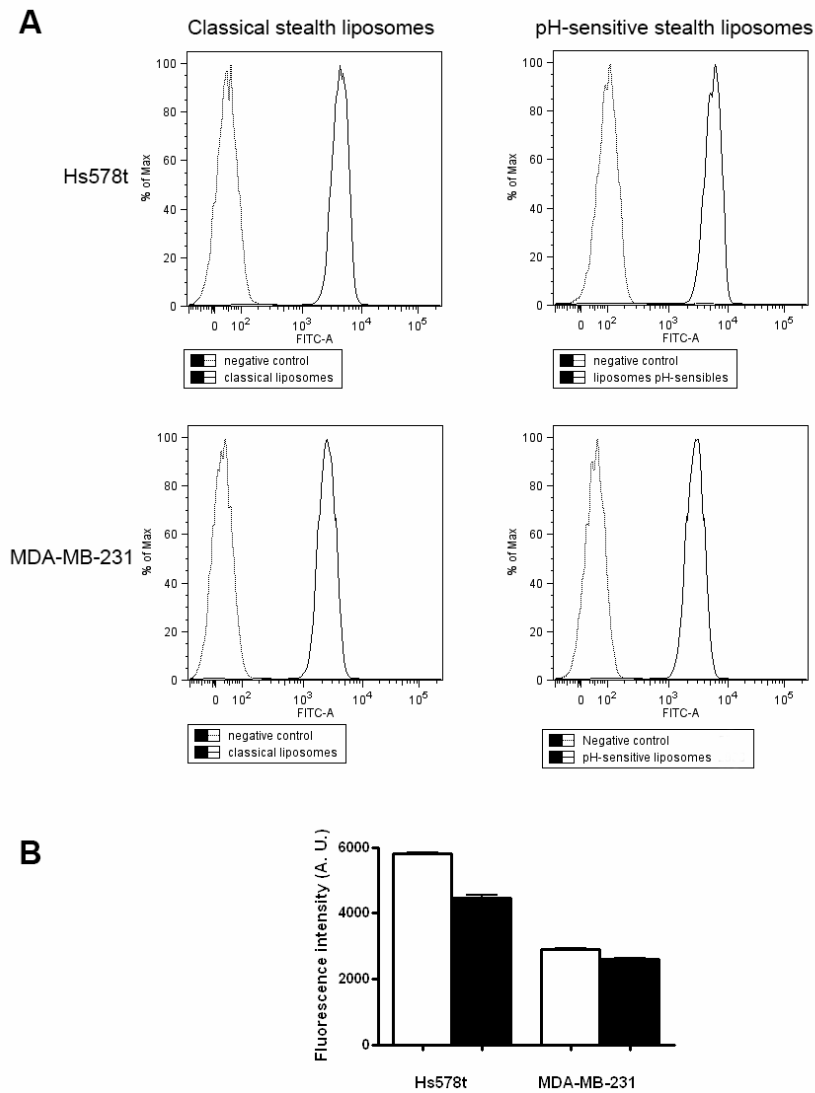


Figure 5. Flow cytometry analysis of Hs578t or MDA-MB-231 cells treated for 2.5h with classical or pH-sensitive PEGylated liposomes. (A) Representative FACS normalized histogram of liposomes without NBD-CHOL (dotted lines) or NBD-CHOL liposomes (plain lines). (B) NBD-CHOL-associated fluorescence (arbitrary unit) in Hs578t cells or MDA-MB-231 cells treated with NBD-CHOL classical (black) or pH-sensitive (white) liposomes.

To support these CLSM results, FACS study was carried out on Hs578t cells and MDA-MB-231 cells (Figure 5). Results obtained with Hs578t cells showed that long circulating pH-sensitive liposomes gave fluorescence intensities of  $5804 \pm 73$ , higher than those obtained for classical stealth liposomes ( $4705 \pm 109$ ). When liposomes were applied on MDA-MB-231 cells, fluorescence intensities of  $2966 \pm 12$  were obtained using long circulating pH-sensitive liposomes and of  $2496 \pm 45$  for the classical formulation of stealth liposomes. These results confirmed those obtained by confocal microscopy. CLSM and FACS results indicate that long circulating pH-sensitive liposomes penetrate in a higher quantity in Hs578t cells.

This difference could be explained by the fact that the lipids employed in this formulation should allow a better interaction with the cellular membrane [15]. DOPE is a non bilayer, fusion-promoting lipid, because it can adopt inverted lipid phases and then promote the fusion of lipid bilayers while the presence of PEG could decrease this DOPE capacity [31]. Indeed, such a fusion process requires a very close contact between the two membrane structures (cell and liposome). Dos Santos et al. explained that PEG<sub>750</sub> do not cover completely the liposome surface, in opposition to PEG<sub>2000</sub> [9]. Moreover, their results suggest that a complete surface coverage is not required for PEG to cause increased circulation time. If PEG<sub>750</sub> does not cover totally the surface of pH-sensitive liposomes, it could remain some regions of interactions between DOPE and cellular/endosomal membrane, but also a significant pH-sensitivity. The use of DSPE-PEG<sub>750</sub>, of lower molecular weight, could allow keeping an effective interaction of DOPE with the cellular membrane, explaining the better internalization of the pH-sensitive formulation.

#### II. 6. 2. 4. 4. 2. Calcein-loaded liposomes

The penetration of calcein-loaded liposomes was studied in order to better understand the intracellular delivery mechanism of an encapsulated material in classical or pH-sensitive stealth liposomes. Hydrophilic model molecule calcein

(M.W. = 376;  $\log P = -5.219$ ; 492/517 nm) was entrapped at a self-quenched concentration within the two formulations. The use of calcein as a model molecule could be justified by two ways. Firstly, Calcein is encapsulated in the inner cavity of liposomes because of its hydrophilicity. Print 3G, which is also water-soluble, is entrapped in the same liposome compartment. Secondly, calcein is a self-quenching fluorescent dye, often used to study the endosomal escape of hydrophilic compounds triggered by pH-sensitive liposomes. Concentration quenching of calcein is a complex phenomenon, based on dimerization and energy transfer to dimer [27, 32, 33]. Calcein, encapsulated at high concentration, is virtually non-fluorescent, owing to the formation of ground state dimers. Any fluorescence measured will be due to the leakage of calcein out of vesicles and dilution in the exterior aqueous media. Regain of fluorescence happens when liposomes are taken up by cells and lysed.

Figure 6 shows CLSM images illustrating the cellular uptake of calcein-loaded liposomes by Hs578t cells. As shown in Figure 6B, calcein fluorescence is weak when using classical liposomes. By contrast, the majority of cells were found to be fluorescent when calcein-loaded pH-sensitive liposomes were applied onto cells (Figure 6). Song *et al.* observed this fact using a classical formulation of doxorubicin in PEGylated liposomes [34]. They evoked the possibility of self-quenched doxorubicin presenting a low fluorescence, not discernible in cells. In our study, calcein is encapsulated at a self-quenched concentration [27] and may not be distinguished in the picture. Due to the lowering of the pH, a significant fraction of calcein is delivered from pH-sensitive stealth liposomes, from endosomes to cytoplasm, allowing observing a bright fluorescence.

As it can be also observed on Figure 6E, fluorescence is sometimes dotted, which might suggest that it remains some calcein entrapped in endosomes. But we can conclude that a significant amount of the dye is delivered in cytoplasm because of the bright fluorescence observed. If calcein remained totally in endosomes, the fluorescence should be significantly lower and pictures should be like figure 6B, obtained with the classical formulation.

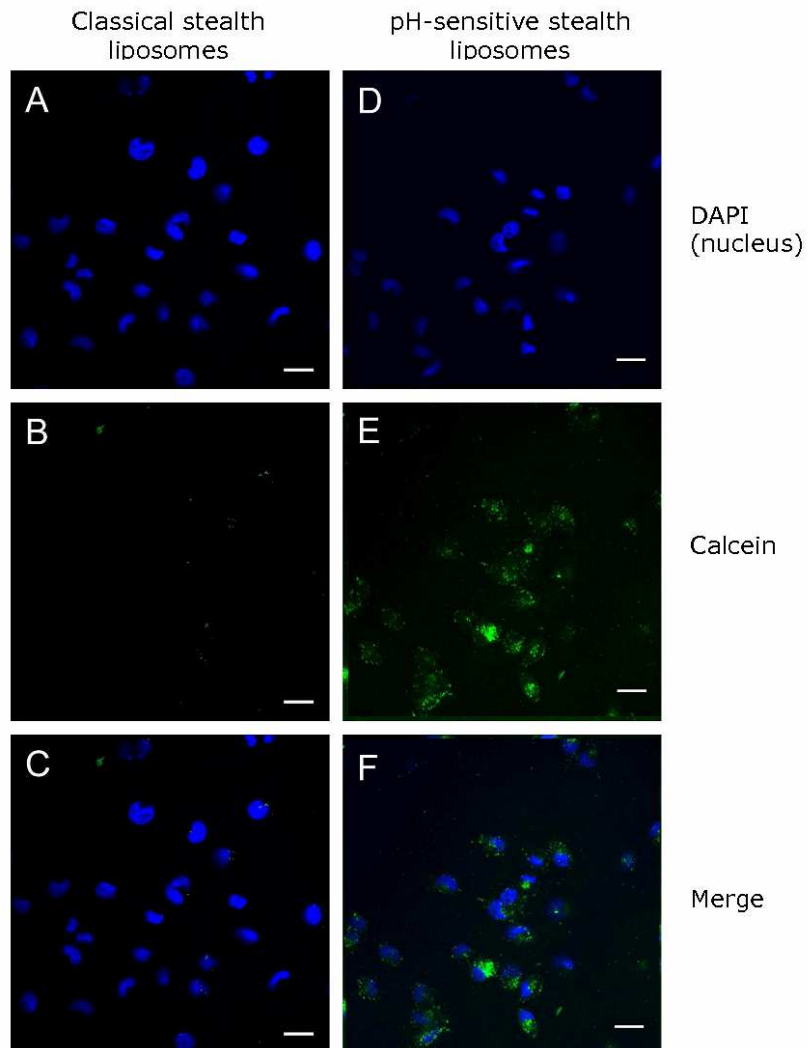


Figure 6. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 2,5h with classical stealth liposomes (A, B, C) or with pH-sensitive stealth liposomes (D, E, F) encapsulating calcein. (A, D) nuclei blue staining with DAPI; (B, E) green staining of liposomes containing calcein; (C, F) merge of DAPI and calcein channels. Bars represent 30  $\mu\text{m}$ .

FACS study was conducted on Hs578t cells and MDA-MB-231 cells to confirm results obtained by CLSM study (Figure 7). Fluorescence intensities in positive Hs578t cells were respectively of  $15973 \pm 333$  for cells treated with pH-sensitive stealth liposomes and of  $4217 \pm 243$  for cells treated with classical stealth liposomes. In positive MDA-MB-231 cells, fluorescence intensities amounted to  $17357 \pm 716$  for pH-sensitive stealth liposomes and to  $4663 \pm 96$  for the classical formulation. Fluorescence intensity obtained for the pH-sensitive formulation was significantly higher ( $p < 0.001$ ) comparing to the classical one, regardless of the type of cell observed. These results confirmed those obtained using CLSM, the calcein delivery is more efficient using the pH-sensitive formulation. Therefore, calcein is not released in the cytoplasm but remains sequestered in classical stealth liposomes. On the contrary, pH-sensitive stealth liposomes escape from the endosome by disruption of their membrane, according to their mechanism of action, and then release their encapsulating material in the cytoplasm of cells. Then, calcein could be diluted in the cytoplasm and present a significant fluorescence on confocal pictures.

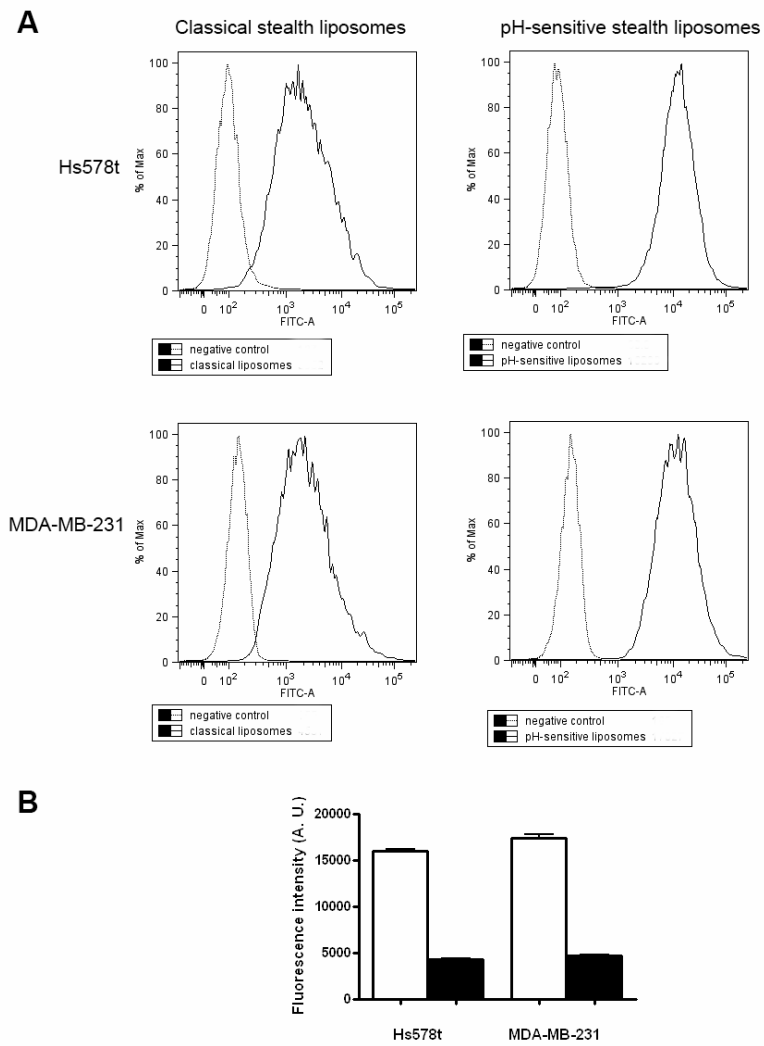


Figure 7. Flow cytometry analysis of Hs578t or MDA-MB-231 cells treated for 2.5h with classical or pH-sensitive stealth liposomes encapsulating calcein. (A) Representative FACS normalized histograms of empty (dotted line) or calcein-loaded (plain line) liposome-treated cells. (B) Calcein-associated fluorescence (arbitrary unit) in Hs578t or MDA-MB-231 cells treated with classical (black) or pH-sensitive (white) calcein-loaded liposomes. Results represent mean values ( $\pm$  S.D.) of 3 independent experiments.

## II. 6. 2. 4. 4. 3. Liposomes encapsulating Print3G

The two first studies using both CLSM and FACS techniques allowed us to expect a better efficacy of pegylated pH-sensitive liposomes as Print3G vectors than the classical formulation. However, calcein is not the perfect model molecule to predict the intracellular fate of the peptide and the next step of our study was to investigate the intracellular fate of the peptide, which has to reach the nucleus in order to interact with its target. Biotin was covalently grafted on Print3G in order to follow it to the cell nucleus using streptavidin conjugate Alexa Fluor 555.

*Free Print3G*

Firstly, the penetration of the free biotinylated peptide was evaluated at a concentration equivalent to that present in liposomes used for further experiments. Results are shown in Figure 8, revealing the weak penetration of the unencapsulated biotinylated peptide.

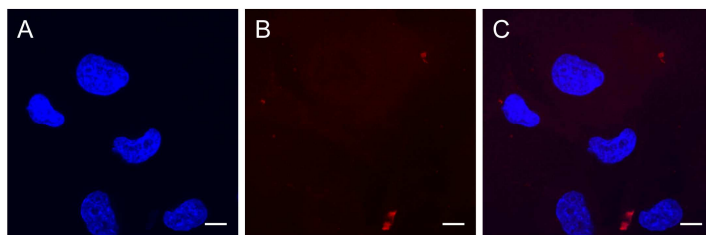


Figure 8. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 5h with free biotinylated Print3G. (A) nuclei blue staining with DAPI; (B) free biotinylated Print3G red staining; (C) merge of blue and red channels. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

*Encapsulated Print3G*

Long circulating pH-sensitive NBD-CHOL liposomes encapsulating biotinylated Print3G were then applied onto Hs578t cells for 2.5 hours. Results are shown in Figure 9. As it has been observed in our previous confocal experiments Figure 9B shows a small region near the nucleus with a brighter fluorescence, indicating an accumulation of NBD-CHOL liposomes at this position. In Figure 9C, an accumulation of the peptide clearly appears in some nuclei. Thanks to pH-sensitive liposomes, a significant amount of peptide could escape from the endosome by disruption of the liposomal membrane. The peptide can then diffuse freely from the cytoplasm to the nucleus of cells.



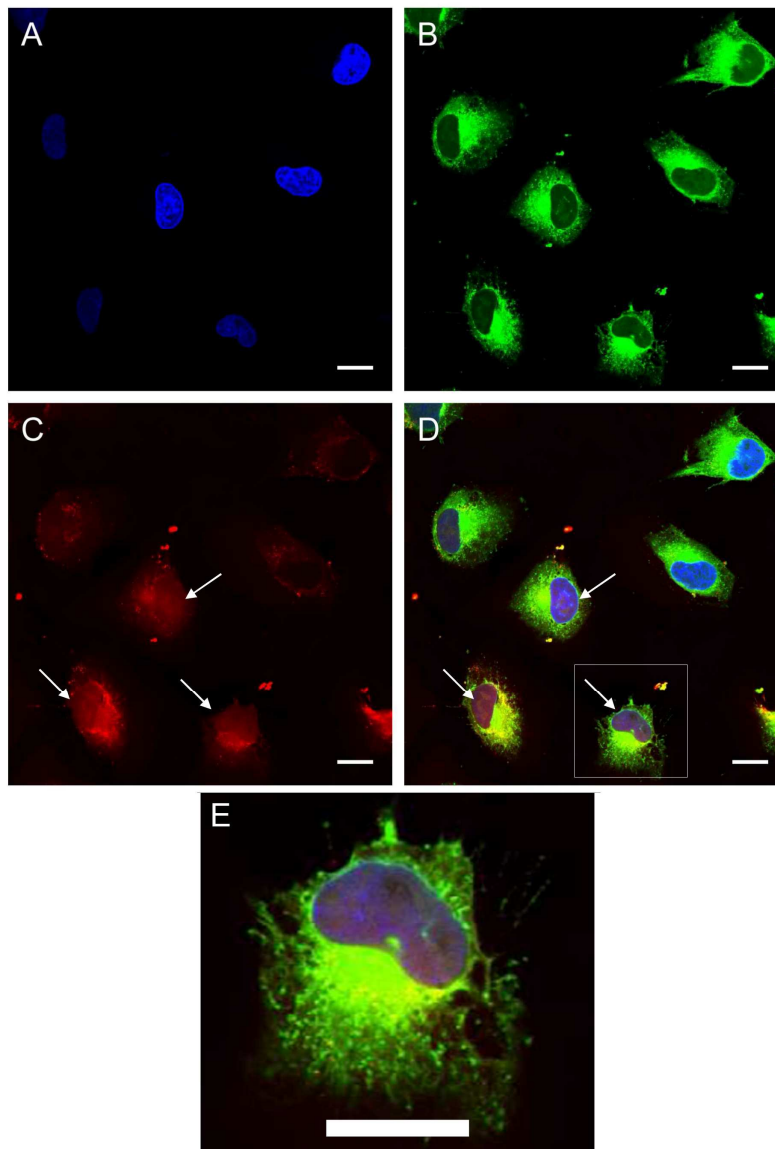


Figure 9. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 2,5h with long circulating pH-sensitive NBD-CHOL liposomes containing biotinylated Print3G. (A) nuclei blue staining with DAPI; (B) NBD-CHOL green staining of liposomes; (C) biotinylated Print3G red staining; (D) merge of blue, green and red channel; (E) magnification of a cell from picture D. Bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

In order to discern a difference between classical and pH-sensitive long circulating liposomes in terms of sequestered peptide delivery from the endosome to the cytoplasm and to investigate this phenomenon kinetic, Hs578t cells were incubated with classical or pH-sensitive liposomes for a period of 15 minutes, 5 hours and 15 hours. Confocal images obtained with the classical formulation of long circulating liposomes, incorporating NBD-CHOL in the phospholipid bilayer and the biotinylated peptide in their aqueous cavity, are shown in Figure 10. Comparing Figure 10B, F and J, the incursion of liposomes by themselves can be followed in the cytoplasm, peaking after 5 hours then decreasing, providing an image comparable to those obtained in the first experiments with NBD-CHOL and classical liposomes. Penetration of the peptide (Figure 10C, G and K) increases slightly but no fluorescence was observed in the cell nuclei.

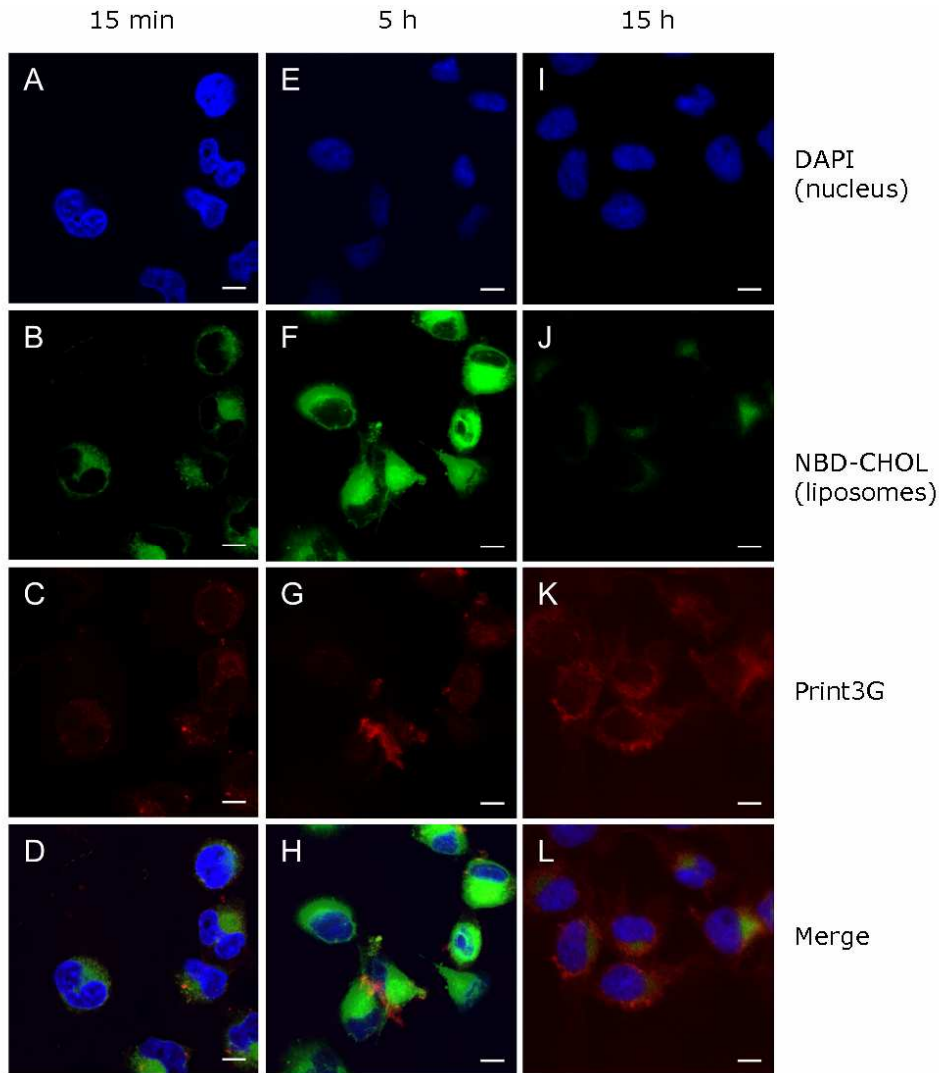


Figure 10. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 15 min (A, B, C, D), 5h (E, F, G, H) and 15h (I, J, K, L) with classical stealth NBD-CHOL liposomes encapsulating the biotinylated Print3G. (A, E, I) nuclei blue staining with DAPI; (B, F, J) NBD-CHOL green staining of liposomes; (C, G, K) biotinylated Print3G red staining; (D, H, L) merge of blue, green and red channels. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

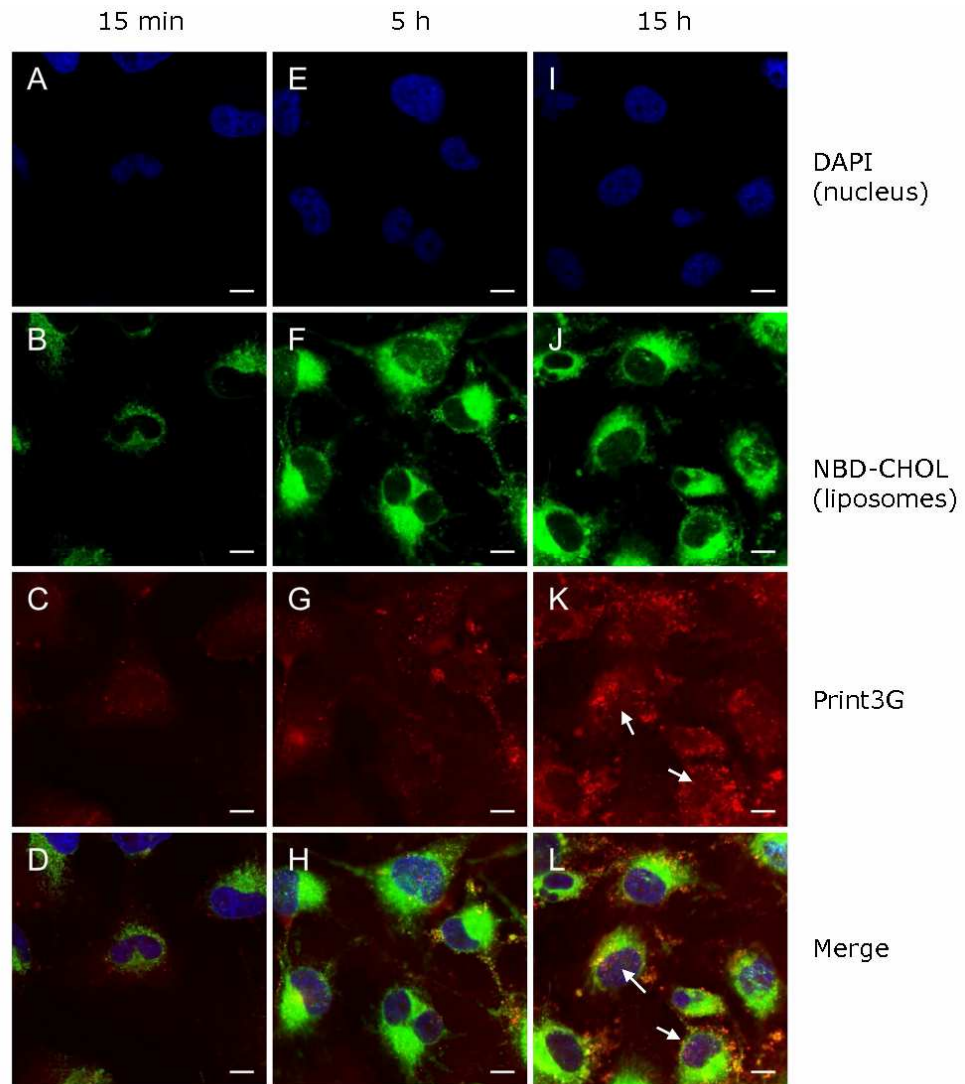


Figure 11. Confocal laser microscopy analysis of Hs578t cells treated for 15 min (A, B, C, D), 5h (E, F, G, H) and 15h (I, J, K, L) with pH-sensitive stealth NBD-CHOL liposomes encapsulating the biotinylated Print3G. (A, E, I) nuclei blue staining with DAPI; (B, F, J) NBD-CHOL green staining of liposomes; (C, G, K) biotinylated Print3G red staining; (D, H, L) merge of blue, green and red channels. Bars represent 10  $\mu$ m.

These experiments were also performed with a formulation of stealth pH-sensitive liposomes. Results are shown in Figure 11. Figure 11B, F and J shows an increasing uptake of pH-sensitive liposomes as a function of time with a high fluorescence that remains intense for at least 15 hours. The penetration of the peptide is also different from the one observed with classical liposomes: the peptide can enter the cell and reach the nucleus (Figure 11C, G and K). The presence of Print3G in the nucleus of cells treated with pH-sensitive liposomes and its absence in cell nuclei when treated with the classical formulation still emphasize our arguments. So as for calcein experiments (see section 3. 3. and 3. 4. 2.), this difference could be explained by the particular mechanism of action of pH-sensitive liposomes, which is efficient to deliver the peptide, avoiding its degradation. While calcein or Print3G remain entrapped in endosome compartment when encapsulated in the classical formulation –observed respectively by a minimal fluorescence for calcein experiments and by a cytoplasm localization for peptide experiments-, the pH-sensitive formulation allow the delivery of its encapsulated material in the cytoplasm, resulting respectively in a detectable fluorescence and in a nuclear localization of Print3G. The nucleus localization of the peptide after treatment with pH-sensitive formulation cannot be explained by the polysorbate permeabilization step. Indeed, the same permeabilization step was used when cells were treated with classical formulation but no peptide was observed in the nuclei even 15 hours after liposomes delivery.

When experiments were conducted on MDA-MB-231 cell line, the presence of peptide in cells was observed after treatment with pH-sensitive stealth liposomes encapsulating Print3G (data not shown<sup>3</sup>). The peptide was detected in the nucleus of the two cancerous cell lines.

---

<sup>3</sup> Les résultats obtenus en microscopie confocale sur la lignée MDA-MB-231 sont présentés à l'annexe 1.

**II. 6. 2. 5. Conclusion**

Classical and pH-sensitive stealth liposomes possess acceptable size, shape, encapsulation efficiency and stability to be potential vectors for Print3G delivery. However, the use of CLSM and FACS in this study highlights the important benefit of pH-sensitive liposomes over classical ones. Indeed, stealth pH-sensitive liposomes can penetrate by themselves all the cell lines tested and deliver more efficiently hydrophilic materials to the cytoplasm of cancerous cells. This better efficacy could be explained by the particular composition of liposomes allowing a better interaction with cellular membrane and an endosomal escape of entrapped materials. The use of PEG<sub>750</sub> replacing the widely used PEG<sub>2000</sub> to formulate long-circulating liposomes is probably the key for the maintenance of a sufficient interaction with cellular membrane and pH-sensitivity. Most importantly, the better capacity of long circulating pH-sensitive liposomes to mediate intracellular delivery allow observing the delivery of the therapeutic peptide to the nucleus of tumorigenic and non tumorigenic breast cancer cells, something not observed with classical liposomes encapsulating Print3G. These results were obtained using liposomes formulated to maintain a long circulation lifetime and our study proved that the penetration of stealth pH-sensitive liposomes remains efficient in spite of their pegylation. This study proves the benefit of developing stealth pH-sensitive formulations for peptide delivery.

**II. 6. 2. 6. Acknowledgements**

This study was supported by the Région Wallonne. We are grateful to P. Compere for helping us to carry out the freeze-fracture electron microscopy study. We are also very thankful to the GIGA Cell Imaging and Flow Cytometry Platform for their technical help in CLSM and FACS studies.

**II. 6. 2. 7. References**

1. Banga, A.K. and Y.W. Chien, *Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins*. Int. J. Pharm., 1988. **48**(1-3): p. 15-50.
2. Katanasaka, Y., et al., *Effective delivery of an angiogenesis inhibitor by neovessel-targeted liposomes*. Int. J. Pharm., 2008. **360**(1-2): p. 219-224.
3. Torchilin, V., *Anti-cancer proteins and peptides in liposomes*, in *Delivery of protein and peptide drugs in cancer*, V. Torchilin, Editor. 2006, Imperial college press: London. p. 155-182.
4. Zhou, X.H. and A. Li Wan Po, *Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration*. Int. J. Pharm., 1991. **75**(2-3): p. 97-115.
5. Hanato, J., et al., *Liposomal formulations of glucagon-like peptide-1: improved bioavailability and anti-diabetic effect*. Int. J. Pharm., 2009. **382**(1-2): p. 111-116.
6. Petrikovics, I., et al., *Characterization of liposomal vesicles encapsulating rhodanese for cyanide antagonism*. Drug Deliv., 2009. **16**(6): p. 312-319.
7. Klibanov, A.L., V.P. Torchilin, and S. Zalipsky, *Long-circulating sterically protected liposomes*, in *Liposomes, second edition, a practical approach*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 231-265.
8. Torchilin, V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2008. **11**(3): p. 431-444.
9. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochim. Biophys. Acta, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
10. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **11**(3): p. 409-419.

11. Ducat, E., et al., *The Experimental Design as Practical Approach to Develop and Optimize a Formulation of Peptide-Loaded Liposomes*. AAPS PharmSciTech, 2010. **11**(2): p. 966-975.
12. Kirby, C., J. Clarke, and G. Gregoriadis, *Cholesterol content of small unilamellar liposomes controls phospholipid loss to high density lipoproteins in the presence of serum*. FEBS Lett., 1980. **111**(2): p. 324-8.
13. Kirby, C., J. Clarke, and G. Gregoriadis, *Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro*. Biochem. J., 1980. **186**(2): p. 591-8.
14. Simoes, S., et al., *On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(7): p. 947-965.
15. Huth, U.S., R. Schubert, and R. Peschka-Suss, *Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging*. J. Control. Release, 2006. **110**(3): p. 490-504.
16. Peschka, R. and R. Schubert, *pH-sensitive liposomes*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 305-217.
17. Skalko, N., et al., *pH-sensitive liposomes for receptor-mediated delivery to chicken hepatoma (LMH) cells*. FEBS Lett., 1998. **434**(3): p. 351-6.
18. Straubinger, R.M., N. Duzgunes, and D. Papahadjopoulos, *pH-sensitive liposomes mediate cytoplasmic delivery of encapsulated macromolecules*. FEBS Lett., 1985. **179**(1): p. 148-54.
19. Bellavance, M.A., M.B. Poirier, and D. Fortin, *Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells*. Int. J. Pharm., 2010. **395**(1-2): p. 251-9.
20. Liu, D. and L. Huang, *Role of cholesterol in the stability of pH-sensitive, large unilamellar liposomes prepared by the detergent-dialysis method*. Biochim. Biophys. Acta., 1989. **981**(2): p. 254-60.



21. Junior, A.D., et al., *Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice*. Life Sci., 2007. **80**(7): p. 659-64.
22. Momekova, D., et al., *Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units*. Eur. J. Pharm. Sci., 2007. **32**(4-5): p. 308-317.
23. Obata, Y., S. Tajima, and S. Takeoka, *Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo*. J. Control. Release, 2010. **142**(2): p. 267-276.
24. Kono, K., T. Igawa, and T. Takagishi, *Cytoplasmic delivery of calcein mediated by liposomes modified with a pH-sensitive poly(ethylene glycol) derivative*. Biochim. Biophys. Acta-Biomembr., 1997. **1325**(2): p. 143-154.
25. Shi, G., et al., *Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations*. J. Control. Release, 2002. **80**(1-3): p. 309-319.
26. Hong, Y.-J., C.G. Pyo, and J.-C. Kim, *Liposomes incorporating hydrophobically modified silk fibroin: pH-dependent release*. : Int. J. Biol. Macromol., 2010. **47**(5): p. 635-639.
27. Chen, R.F. and J.R. Knutson, *Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers*. Anal. Biochem., 1988. **172**(1): p. 61-77.
28. Simoes, S., et al., *On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes*. Biochim. Biophys. Acta, 2001. **1515**(1): p. 23-37.
29. Johnsson, M. and K. Edwards, *Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids*. Biophys. J., 2001. **80**(1): p. 313-23.

30. Mady, M.M., et al., *Efficiency of cytoplasmic delivery by non-cationic liposomes to cells in vitro: a confocal laser scanning microscopy study*. *Phys. Med.*, 2009. **25**(2): p. 88-93.
31. Hafez, I.M. and P.R. Cullis, *Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **47**(2-3): p. 139-148.
32. Weinstein, J.N., et al., *Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker*. *Science*, 1977. **195**(4277): p. 489-92.
33. Duzgunes, N., bagatolli, L. A., Meers, P., Oh, Y.-K., Straubinger, R. M. , *Fluorescence methods in liposome research*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin, Weissig, V. , Editor. 2003, Oxford University Press: New York. p. 105-147.
34. Song, C.K., et al., *Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake*. *Int. J. Pharm.*, 2009. **380**(1-2): p. 161-169.

## II. 7. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Les formulations classiques et pH-sensibles développées au cours de ce travail possèdent les caractéristiques requises pour être des vecteurs potentiels du peptide Print3G en termes de taille, de taux d'encapsulation et de stabilité au cours du temps. De plus, une préparation injectable stérile et sans chloroforme, répondant aux exigences de la *Pharmacopée Européenne*, peut être produite.

La formulation de liposomes classiques à base de PEG<sub>2000</sub> a été abandonnée en raison de son manque de capacité d'interaction cellulaire, probablement du à la présence du PEG à la surface de la vésicule. L'utilisation de PEG de plus faible masse moléculaire a permis de conserver une interaction suffisante de la bicouche phospholipidique avec la membrane cellulaire.

Les études réalisées en microscopie confocale et en cytométrie de flux ont permis de souligner l'avantage des liposomes pH-sensibles. Comparés aux liposomes de composition classique, leur pénétration et leur capacité à libérer le matériel encapsulé hydrophile dans le cytoplasme des cellules sont plus efficaces. Néanmoins, ils n'ont pas montré de meilleure aptitude à délivrer une substance lipophile par rapport aux liposomes de composition classique.

L'utilisation de PEG<sub>750</sub> permet aux liposomes pH-sensibles de maintenir une interaction membranaire permettant la libération du matériel encapsulé dans le cytoplasme tout en gardant une formulation de liposomes furtifs.

Le maintien de la capacité de pénétration cellulaire et de sensibilité au pH de cette dernière formulation a été confirmé lors de l'encapsulation du peptide Print3G. Les liposomes pH-sensibles permettent de libérer efficacement le peptide biotinylé dans le cytoplasme des cellules issues de carcinome mammaire. Il peut alors librement diffuser dans les noyaux cellulaires.

**CHAPITRE 3: ETUDES *IN VIVO* DE L'ACCUMULATION  
INTRATUMORALE DE LIPOSOMES PEGYLES**

### III. 1. INTRODUCTION

Les vecteurs développés pour l'administration du peptide Print3G doivent atteindre deux buts. Le premier, discuté dans le chapitre précédent, est de permettre la libération du peptide intact dans le cytoplasme des cellules cancéreuses pour qu'il puisse librement accéder à sa cible nucléaire. Grâce à la formulation de liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>, l'objectif a été atteint et la présence du peptide Print3G dans le noyau des cellules cancéreuses a pu être observée. Le deuxième objectif est de permettre l'accumulation du vecteur dans le tissu tumoral et d'assurer sa rémanence vasculaire prolongée en évitant sa dégradation dans le compartiment sanguin. Les deux types de formulations de liposomes qui ont été développés présentent, en termes de taille et de composition, les caractéristiques nécessaires pour remplir cette tâche. En effet, leur taille est adéquate pour espérer obtenir un ciblage passif des vésicules grâce à l'effet EPR et elles contiennent toutes deux du cholestérol et du PEG greffés aux phospholipides pour obtenir une rémanence vasculaire prolongée. S'il a été prouvé que l'addition de PEG<sub>2000</sub> à la surface des liposomes de composition classique augmentait considérablement leur temps de circulation sanguine, l'utilisation de PEG de masse moléculaire plus faible (PEG<sub>750</sub>) est moins fréquente, d'autant moins lorsqu'ils sont greffés à des liposomes pH-sensibles.

Dans cette partie du travail, l'accumulation *in vivo* des liposomes pH-sensibles dans la tumeur solide sera étudiée et comparée à celle de liposomes classiques au moyen d'un modèle de développement tumoral sur membrane chorioallantoïque (CAM) d'embryon de poulet et d'un modèle de développement tumoral sous cutané chez la souris immunodéficiente. La toxicité *in vitro* des deux formulations a été étudiée sur deux lignées cellulaires. Enfin, une étude par Isothermal Titration Calorimetry (ITC) a été réalisée pour évaluer l'influence de l'addition de PEG et de leur masse moléculaire sur l'adhésion de la sérum albumine bovine à la membrane liposomale.

### III. 2. RESUME DES RESULTATS DE LA PUBLICATION

Après un contact de 24 heures avec les deux formulations testées, aucun signe de toxicité n'a été observé sur les lignées cellulaires MDA-MB-231 et HUVEC. Les cellules ont été observées en microscopie et n'ont pas montré de souffrance particulière. De plus, les liposomes n'induisent pas de mort cellulaire par apoptose.

La première étude *in vivo*, basée sur le modèle CAM, a permis de mettre en évidence une accumulation préférentielle des liposomes dans la tumeur solide, quelle que soit la formulation testée (Figure III.2.1). Cette accumulation a été observée jusque dans le cytoplasme des cellules.

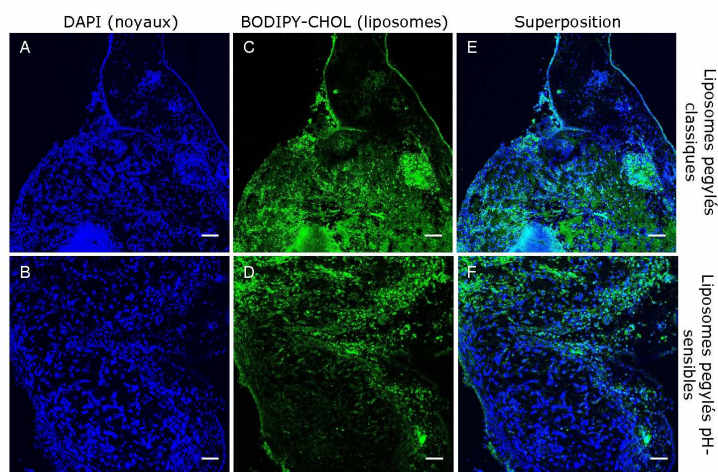


Figure III. 2.1. Images obtenues par microscopie confocale de coupes de tumeurs provenant d'embryons de poulets traités pendant 15h avec des liposomes classiques (A,C,E) ou pH-sensibles (B,D,F) contenant du BODIPY-CHOL. (A,B) coloration bleue des noyaux cellulaires par le DAPI ; (C,D) coloration verte des liposomes contenant du BODIPY-CHOL ; (E,F) superposition des canaux bleu et vert. La barre représente 100 $\mu$ m pour A,B,C et 50 $\mu$ m pour B,D,F.

L'accumulation préférentielle des liposomes a pu être confirmée avec le modèle murin. Une intensité de fluorescence plus forte dans les tumeurs par rapport à celle observée au niveau du foie, de la rate et des reins a été observée (Figure III.2.2). Ces études ont donc permis de visualiser l'accumulation préférentielle des liposomes dans les tumeurs solides grâce à l'effet EPR.

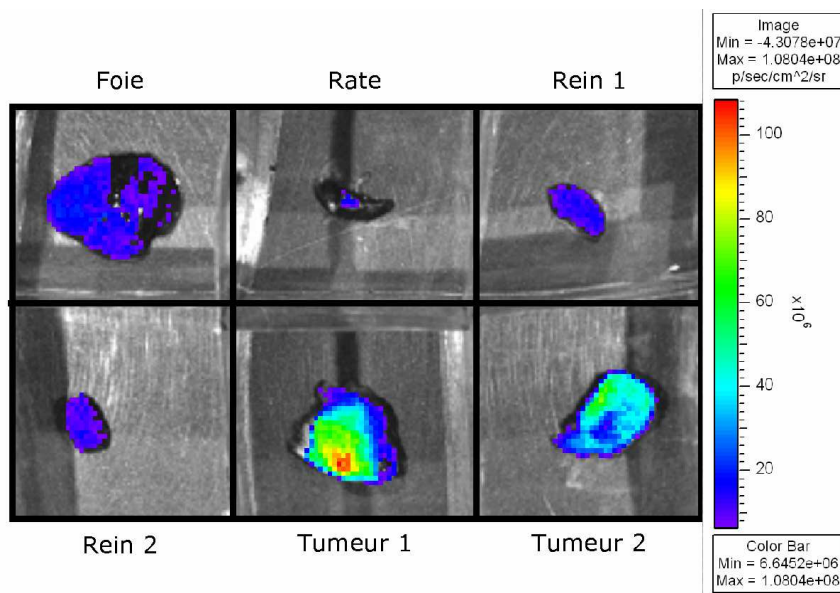


Figure III.2.2. Images de fluorescence *ex vivo* d'organes disséqués directement après sacrifice d'une souris traitée par des liposomes pH-sensibles contenant des PEG<sub>750</sub> et du BODIPY-CHOL.

Ces résultats ont été obtenus grâce à des études menées sur des modèles immunodéficients et ne permettent donc pas d'évaluer la résistance à l'opsonisation des liposomes. Afin d'évaluer l'adhésion de protéines plasmatiques à la surface des vecteurs, une étude préliminaire de l'interaction de la sérum albumine bovine (BSA) avec les liposomes par ITC a été réalisée. Six formulations, trois classiques et trois pH-sensibles, non pegylées ou pegylées avec du PEG<sub>2000</sub> ou du PEG<sub>750</sub>, ont été étudiées. Aucune formulation n'a montré

de forte interaction avec la BSA, ce qui peut s'expliquer par la présence de cholestérol dans tous les types de liposomes testés. L'ensemble des liposomes de composition classique a montré une interaction plus faible que leurs homologues pH-sensibles. L'addition de PEG diminue l'interaction, quel que soit le type de formulation étudiée. Aucune influence de la masse moléculaire du PEG n'a été observée. Ces résultats semblent montrer une résistance à l'opsonisation acceptable des deux types de formulations étudiées mais nécessitent des études plus approfondies, par exemple menées avec d'autres types de protéines, pour confirmer nos hypothèses.



### III. 3. PROJET DE PUBLICATION

**ACCUMULATION OF PEGYLATED LIPOSOMES IN TUMOR-BEARING  
CHICKEN EMBRYO AND IN TUMOR-BEARING MICE AND  
ASSESSMENT OF LIPOSOME INTERACTION WITH BOVINE SERUM  
ALBUMIN**

E. Ducat<sup>a\*</sup>, J. Deprez<sup>b</sup>, A. Noël<sup>b</sup>, B. Evrard<sup>a</sup>, A. Gonzalez<sup>c</sup>, D.  
Mottet<sup>c</sup>, M. Noiray<sup>d</sup>, O. Peulen<sup>c</sup>, G. Ponchel<sup>d</sup> and G. Piel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liege, B36, Tour 4, Level 2, Avenue de l'hôpital, 1, B-4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup> Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA-Cancer, University of Liege, Pathology building, B23, Level 4, B-4000 Liege, Belgium

<sup>c</sup> Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, University of Liege, Pathology building, B23, Level 4, B-4000 Liege, Belgium

<sup>d</sup> UMR CNRS 8612, Laboratoire de Pharmacotechnie et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

### **III. 3. 1. Introduction**

The purpose of our work is to develop a suitable vector for the intravenous delivery of the peptide Print3G, a putative antagonist of an oncoprotein involved in breast cancer growth and invasion. This type of vector has to reach two goals: (1) the delivery of the peptide to the nucleus of cancer cells, so it can interact with its target and (2) a prolonged vascular remanence, so as it accumulates in tumour tissue. In order to develop this type of formulation, liposomes were used as Print3G vectors. Liposomes possess many attractive characteristics for stabilizing peptidic drugs and for improving their pharmacological properties. They are spherical structures composed of one or several phospholipid bilayers and they can entrap hydrophilic drugs, such as Print3G, in their inner aqueous cavity. The first generation of liposomes has been shown to be easily eliminated from the bloodstream and to accumulate in the Kupffer cells in the liver and in spleen macrophages [1]. Therefore, polymers such as polyethyleneglycol (PEG) were grafted onto phospholipids headgroups in order to obtain stealth liposomes. PEGs form a protective layer on the particle surface and provide protection against opsonization and capture by the reticulo-endothelial system (RES) [2]. The increase in circulation time and the decrease in capture by the RES of this type of liposome explain the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, applicable to almost all rapidly growing solid tumours. The enhanced extravasations of macromolecules from blood vessels to tumour and their retention within these tissues, due to the anatomical and permeability particularities of tumours, represent a phenomenon not observed in normal tissue, leading to a passive targeting [3, 4].

In our previous study, two formulations of long circulating liposomes encapsulating Print3G were studied in terms of cellular uptake. Stealth pH-sensitive liposomes were found to be the best formulation to deliver the peptide in the cytoplasm of cells, so it can reach the nucleus of cancer cells freely [5]. Indeed, this type of formulation contains DOPE associated with CHEMS. This mixture of lipids destabilizes the liposomal membrane under acidic conditions

and allows delivery of the encapsulated material in cell cytoplasm, avoiding lysosomal degradation [6-8]. PEG and cholesterol were added to the formulation in order to obtain long circulating pH-sensitive liposomes. As PEG of high molecular weight can hamper the penetration capacity of pH-sensitive liposomes [9], they were replaced by PEG<sub>750</sub> in the formulation, allowing to detect the presence of Print3G in the nucleus of cancer cells.

The purpose of the present work is to assess the *in vivo* suitability of this pH-sensitive formulation [DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6, %mol)] and to compare it to a classical one [SPC:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (47:47:6, %mol)]. First, a chick chorioallantoic membrane (CAM) model was used for this purpose. CAM is a thin, transparent and highly vascularized membrane. It is the major respiratory organ of the chick embryo. This animal model was firstly used to examine progressive stages of embryogenesis [10], to study angiogenesis and to study the effect of pro- or antiangiogenic drugs on vasculature [11]. The highly vascularized nature of CAM greatly promotes the efficiency of tumor cell grafting and can also be used to monitor tumor and metastasis dissemination and to evaluate anticancer therapies [12, 13]. As the chick is a living system, although it is simple, it provides a more physiological system than classical *in vitro* models [14, 15]. Moreover, CAM model is increasingly used in biological and pharmaceutical research because of its simplicity and its low cost compared with rodent models [13, 15, 16].

CAM and mouse models were used and compared in order to study the passive accumulation of classical or pH-sensitive pegylated liposomes in tumour tissues. The toxicity of these two types of liposomes was also studied. Finally, Isothermal Titration microCalorimetry (ITC) study was carried out in order to investigate the interaction of liposomes with Bovine Serum Albumine (BSA), which will give information about the vascular stability of liposomes.

### **III. 3. 2. Material and methods**

#### **III. 3. 2. 1. Materials**

Soybean phosphatidylcholine (SPC, purity: 98%) was provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). N-(Carbonyl-methoxypolyethylenglycol-750)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (PEG-750-DSPE, purity 100%) and 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) were purchased from Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Switzerland). Cholesterol (CHOL, purity > 99%), Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) and calcein were acquired from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). 23-(dipyrrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol (BODIPY-CHOL) was purchased from Avanti Polar Lipids (Pelham, USA). Water was deionized using the Millipore system (18.2 M $\Omega$ /cm resistivity) and was filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore Millipak<sup>□</sup>-40 disposable filter units (Millipore Corporation, USA). 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer and Bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Foetal Bovine Serum (FBS), Penicillin Streptomycin and L-glutamine were purchased from Gibco-Life Technologies (Invitrogen Corporation, Paisley, UK). All other reagents and solvents were of analytical grade.

#### **III. 3. 2. 2. Methods**

##### *III. 3. 2. 2. 1. Apoptosis test*

###### *Blank liposome preparation*

Blank unilamellar vesicles, made of: (1) SPC:CHOL:PEG-750-DSPE (47:47:6, molar% ratio) for classical stealth liposomes and (2) DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6, molar% ratio) for pH-sensitive long circulating liposomes were prepared by the hydration of the lipid film

method. Briefly, required amounts of lipids were dissolved in chloroform and evaporated under reduced pressure in a round-bottomed flask to form a thin lipid film. In order to remove residual chloroform, the flask was stored under vacuum for one night. The film was hydrated using a vortex mixer with HEPES buffered saline, containing 67 mM NaCl and adjusted to pH 7.4 with 0.1 M NaOH solution. The resulting suspension was extruded 5 times through a 0.2 µm Nucleopore polycarbonate membrane (Whatman International Ltd, Maidstone, UK). Suspensions underwent one ultracentrifugation cycle at 35,000 rpm for 3.5 hours at 4°C using the Beckman SW60 rotor (86,496 g). Finally, liposomes were filtered aseptically through a 0,22 µm membrane (Millex GP, SLGP033RB, Millipore, Carrigtwohill, Ireland) for sterilization. MDA-MB 231 and HUVEC cell lines were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

Final concentrations of liposomes constituents were : SPC/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE 36,1mM :36,1mM :4mM and DOPE/CHEMS/CHOL/PEG<sub>750</sub>-DSPE 33 mM:16 mM:23 mM:4.5 mM.

Liposomes were diluted 10 times, 5 times or 1 time before application to cells.

#### *Western blot analysis*

Both floating cells and adhesive cells were pooled and lyzed with SDS Buffer (SDS 1%, Tris-HCl 40 mM pH 7.4 + Protease inhibitor cocktail). Equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE. The membranes were probed with primary antibodies against PARP-1 followed by HRP-conjugated secondary antibodies and developed using a chemiluminescence detection system. HSC70 protein was used as a loading control.

### *III. 3. 2. 2. In vivo studies of liposome accumulation*

#### *Liposome preparation*

The classical formulation of liposomes encapsulating the biotinylated Print3G was prepared using the freeze-thawing method. The pH-sensitive one was prepared using the hydration of the lipid film method including a step of pre-

saturation of the extruder with a Print3G solution. 650  $\mu\text{M}$  of BODIPY-CHOL in chloroform was added before evaporation under reduced pressure. After extrusion, suspensions underwent two ultracentrifugation cycles at 35,000 rpm at 4°C for 3.5 hours (Beckman SW60 rotor, 86,496 g). Finally, suspensions were filtered under aseptic conditions through a 0.22 $\mu\text{m}$  membrane for sterilization. Final concentrations were 5 times lower than those used for blank liposomes (see section III.2.2.2.1.).

#### *Cell culture*

MDA-MB 231 cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) supplemented with 1% (v/v) L-glutamin (Gibco) and 10% (v/v) fetal bovine serum.

#### *CAM model experiments*

##### *CAM tumour formation assay and injection procedure*

On embryonic day 3, after puncturing the air chamber, a window was opened in the eggshell using scissors. The window was sealed with durapore tape and the eggs were incubated at 37°C with 80% humidity until cell implantation. At embryonic day 11, MDA-MB 231 cells were implanted on the CAM. Briefly, after gentle laceration of the CAM surface, 100  $\mu\text{L}$  of a mixture (1:1, v/v) of DMEM (10% FBS) and matrigel, containing  $2 \times 10^6$  cells were placed in a plastic ring of 7 mm diameter onto the CAM. The window was sealed and eggs were incubated in the same conditions for 7 more days. On embryonic day 18, 100  $\mu\text{L}$  of HEPES buffer or liposome suspension were injected with an insulin syringe (0,33 X 12 mm, Terumo), in a blood vessel situated far from the tumour. After vessel closure, the window was sealed and eggs were incubated in the same conditions for 5, 7.5, 10 or 15 hours. Tumours were collected by Cam dissection and briefly washed in PBS then fixed in a paraformaldehyde solution (4%, v/v) during 30 minutes at 4°C. Fixation step was followed by an overnight incubation in

successive sucrose solutions (10% to 30%, v/v). Tumours were embedded in Tissue-tek at 20°C in methylbutane.

#### *Mouse model experiments*

All animal handling was performed in accordance with University of Liege animal use and care committee guidelines. Nine NOD/SCID mice (9 weeks) were used for this experiment, 3 mice per condition. To prepare tumour-bearing mice,  $2 \cdot 10^6$  MDA-MB-231 were subcutaneously inoculated into each mouse flank. When tumor diameter reached about 10 mm, 50  $\mu$ L of HEPES buffer or of liposome suspension were injected intravenously through the tail vein. 24 hours after injection, mice were anesthetized with isoflurane and then sacrificed by a cervical dislocation. Mice were then dissected and their organs were examined using Xenogen IVIS-200 System equipment and observed at 488 nm to detect green fluorescence of BODIPY-CHOL contained in liposomes.

### *III. 3. 2. 2. 3. Isothermal titration microcalorimetry*

#### *Liposome preparation*

Blank liposomes were prepared as described at section III.2.2.2.1. 6 formulations were studied: (1) SPC:CHOL:PEG-2000-DSPE (47:47:6, molar% ratio); (2) SPC:CHOL:PEG-750-DSPE (47:47:6, molar% ratio); (3) SPC:CHOL (53:47, molar% ratio); (4) DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>2000</sub>-DSPE (43:21:30:6, molar% ratio); (5) DOPE:CHEMS:CHOL:PEG<sub>750</sub>-DSPE (43:21:30:6, molar% ratio); (6) DOPE:CHEMS:CHOL (47:23:30, molar% ratio). After extrusion, suspensions in HEPES buffer were diluted to obtain concentrations of lipids 10 times lower than those used for blank liposomes (see section 2. 2. 1.).

#### *Isothermal Titration Microcalorimetry (ITC) studies*

ITC experiments were carried out with a VP-ITC, Microcal-GE Healthcare. Adsorption of BSA on liposomes from different formulation was assessed at 37°C by comparison, no fit could be made. Liposome suspension at 7.8 mM of lipids in

HEPES buffer was placed in the sample cell of 1.44 mL. They were titrated by the solution of BSA at 1.2 mM placed in the 298  $\mu$ L syringe, continuously rotating at 264 rpm. A first 2  $\mu$ L aliquot was injected, without taking into account the observed heat. Then, injections of 10  $\mu$ L of the BSA solution were made every 500 seconds for the fifth injections and every 300 seconds for the following ones.

### III. 3. 3. Results and discussion

#### III. 3. 3. 1. Apoptosis test

Liposomes-induced cell death by apoptosis was investigated after 24 hours of contact with HUVEC and MDA-MB-231 cells. Results are presented in Figure 1.

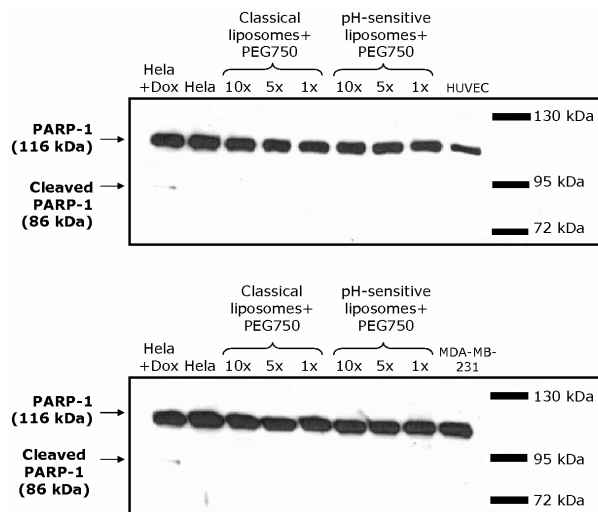


Figure 1. Detection of cleaved PARP in cell extracts of (A) HUVEC and (B) MDA-MB-231 cells treated with classical or pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>750</sub>.

The test consists of the detection the 86 kDa PARP-1 fragment and intact PARP-1 from cell extracts on a Western blot. The apparition of the 86kDa fragment



indicates cell death by apoptosis. The positive control is constituted of HeLa cells treated with doxorubicin (DOX), known to induce HeLa cell death by apoptosis. After application of liposomes for 24 hours on cells, no visible toxicity was observed. No cleaved Parp-1 was detectable in Figure 1, regardless of the type of formulation and of the cell line. This test allows us to expect poor toxicity of liposome formulations in *in vivo* models. However, it gives no information about cell death by necrosis.

### **III. 3. 3. 2. *in vivo* studies**

The *in vivo* properties of liposomes containing PEG<sub>750</sub> were studied in order to evaluate if long circulating pH-sensitive liposomes can accumulate in tumours as efficiently as the classical ones and if these formulations effectively penetrate cells.

#### *III. 3. 3. 2. 1. in vivo study of liposome accumulation using CAM model*

The accumulation of pH-sensitive stealth liposomes in tumours constituted of MDA-MB-231 cells was first evaluated as a function of time. Chick embryos were treated for 5 hours, 7.5 hours and 10 hours with liposomes to evaluate the accumulation phenomenon kinetic. Results are presented in Figure 2. After 5 hours of liposome circulation in embryos, the fluorescence of liposomes can only be located in tumour periphery and in CAM. After a further 2.5 hours, some weak fluorescence can be found heterogeneously in tumour tissues. Fluorescence is at its most intense after 10 hours of treatment.

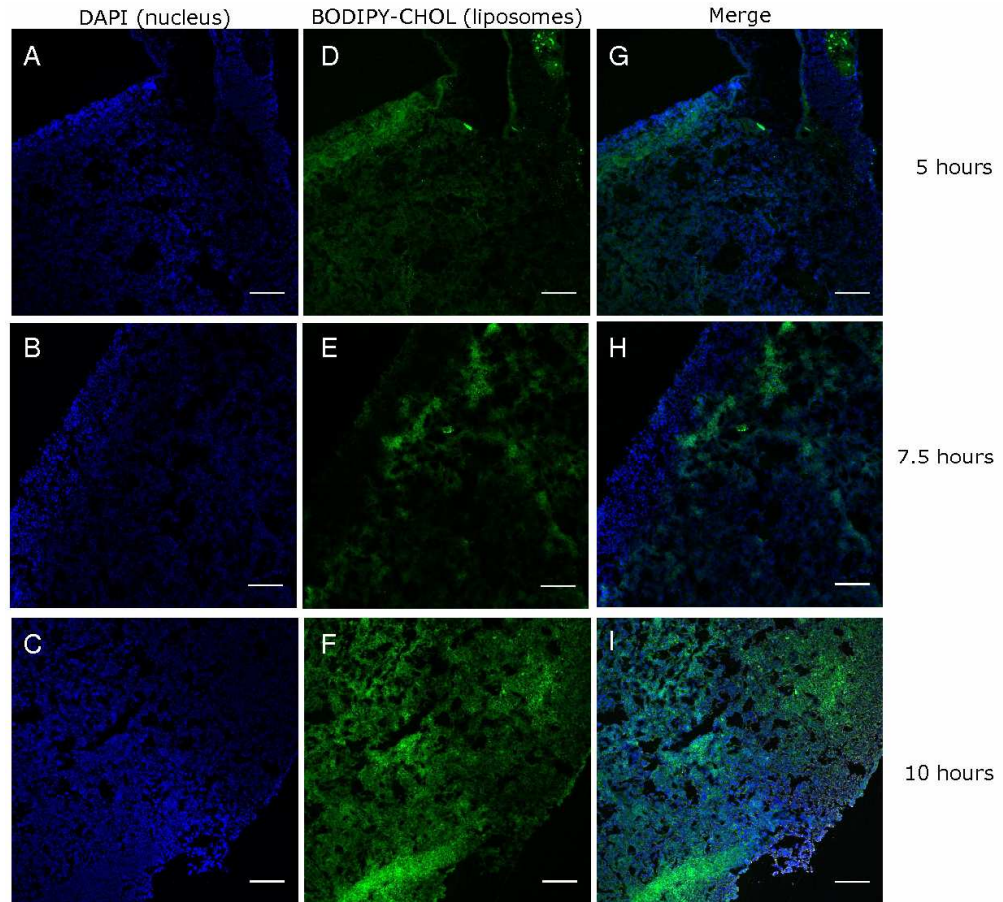


Figure 2. Confocal laser microscopy analysis of section from frozen tumour tissues of chick embryos treated for 5 hours (A,D,G), 7.5 hours (B,E,H) or 10 hours (C, F, I) with pH-sensitive stealth liposomes. (A,B,C) nuclei blue staining with DAPI; (D,E,F) green staining of BODIPY liposomes; (G,H,I) merge of blue and green channels. Bars represent 150  $\mu\text{m}$ .

Comparison between the two formulations was made after 15 hours of treatment of embryos with classical or pH-sensitive stealth liposomes (Figure 3). Accumulation of classical stealth liposomes is effective in tumour tissue (bottom of figure 3C), while CAM is less fluorescent (top of figure 3C). The same

observation can be made with long-circulating pH-sensitive liposomes: the area where the fluorescence is most important is located in the tumour tissue (top of figure 3D). No difference between the two formulations is discernible; they both accumulate in tumour after 15 hours of embryo treatment.

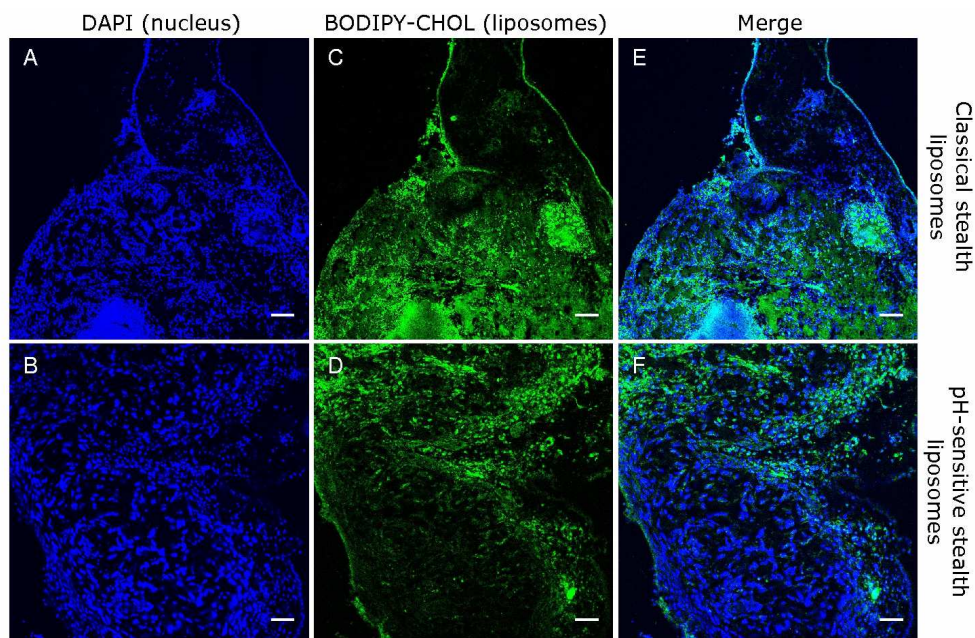


Figure 3. Confocal laser microscopy analysis of section from frozen tumour tissues of chick embryos treated for 15 hours with classical (A,C,E) or pH-sensitive (B,D,F) stealth liposomes. (A,B) nuclei blue staining with DAPI; (C,D) green staining of BODIPY liposomes; (E,F) merge of blue and green channels.

Bars represent 100  $\mu\text{m}$  for A,C,E pictures and 50  $\mu\text{m}$  for B,D,F pictures.

Finally, pictures at a higher magnification were taken to evaluate if liposomes can penetrate in tumour cells. In order to assess our statements, cells were treated with mouse anti-human vimentin in order to discern tumour cells from chick embryo healthy cells (Figure 4). The results obtained are presented in Figure 5.

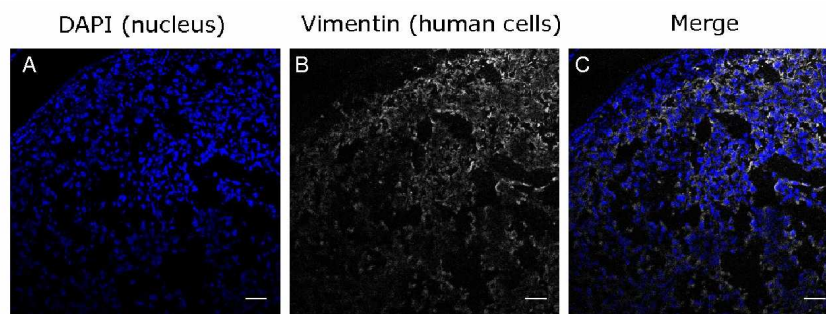


Figure 4. Confocal laser microscopy analysis of section from frozen tumour tissues. (A) nuclei blue staining with DAPI; (B) grey staining of human vimentin; (C) merge of blue and grey channels. Bars represent 50  $\mu\text{m}$ .

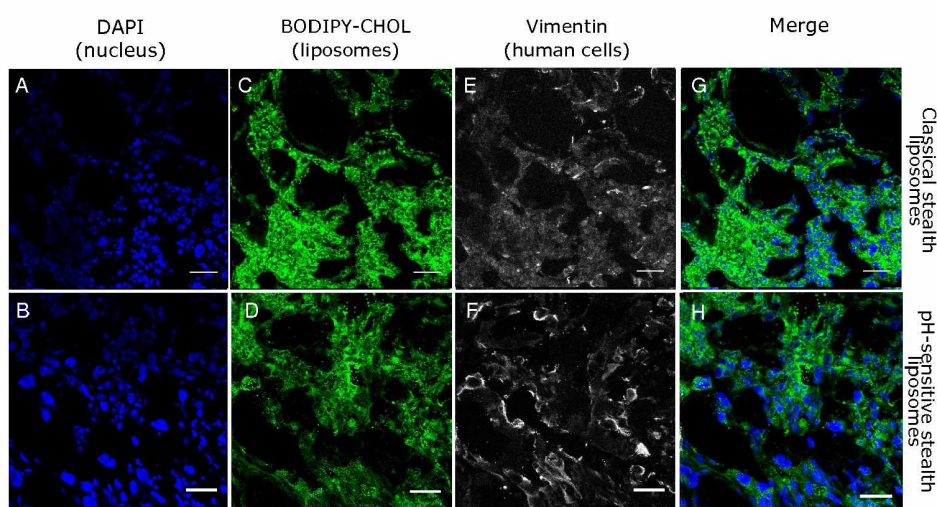


Figure 5. Confocal laser microscopy analysis of section from frozen tumours tissues of chick embryos treated for 15 hours with classical (A,C,E,G) or pH-sensitive (B,D,F,H) stealth liposomes. (A,B) nuclei blue staining with DAPI; (C,D) green staining of BODIPY liposomes; (E,F) grey staining of human vimentin; (G,H) merge of blue and green channels. Bars represent 30  $\mu\text{m}$ .

As it can be seen on the images presented in figure 5, liposome penetration is effective in cytoplasm of tumour cells from chick embryos treated with pH-sensitive or classical formulation of liposomes.

In conclusion, pH-sensitive and classical formulations of stealth liposomes present the same behaviour when they are injected in tumour-bearing chick embryos. They accumulate passively in tumour tissues and this accumulation increases as a function of time. Moreover, the liposome fluorescence can be located in cytoplasm of cells.

*III. 3. 3. 2. 2. In vivo study of liposome accumulation using the Mouse model*

Liposome accumulation in tumours was also assessed using the tumour-bearing mice model. Fluorescence images of dissected mice after treatment with classical liposomes are presented in Figure 6. The results obtained from mice treated with pH-sensitive stealth liposomes are presented in Figure 7. The fluorescence in liver, spleen and kidneys is weaker compared with that observed in tumours. Both formulations of liposomes accumulate passively in solid tumour, compared to other fenestrated organs.

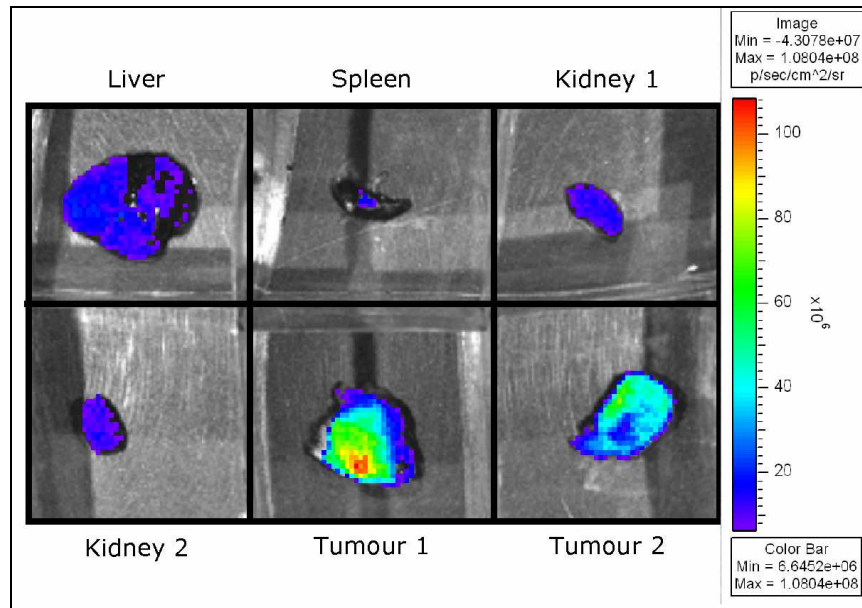


Figure 6. *Ex vivo* fluorescence images of organs (liver, spleen, first kidney, second kidney, first tumour and second tumour) dissected from mouse NOD/SCID treated for 24 hours with BODIPY pH-sensitive stealth liposomes.

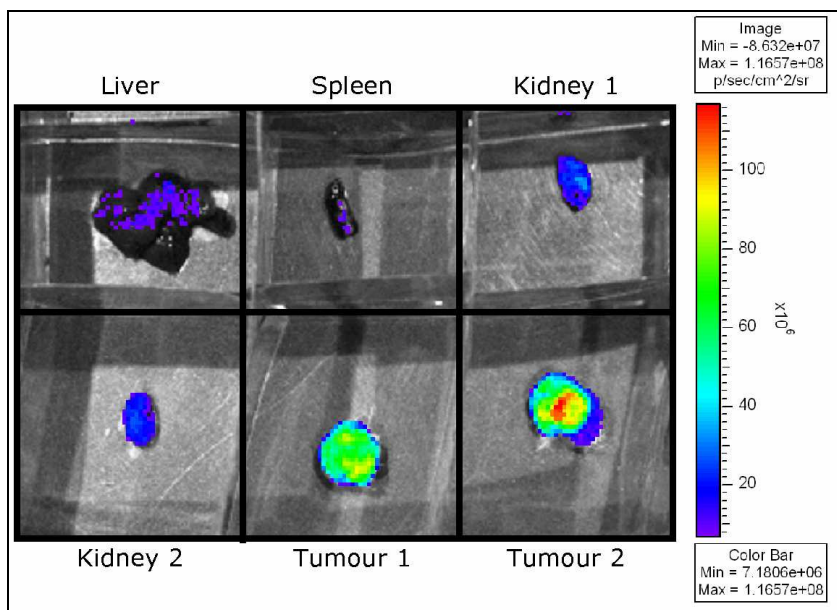


Figure 7. *Ex vivo* fluorescence images of organs (liver, spleen, first kidney, second kidney, first tumour and second tumour) dissected from mouse NOD/SCID treated for 24 hours with BODIPY classical stealth liposomes.

These two *in vivo* studies using CAM and mouse models allow us concluding that the two formulations of pegylated liposomes accumulated preferentially in tumour tissues. This accumulation is due to the EPR effect. This effect is based on the particular structure and physiological characteristics of tumour tissues comparing to healthy ones. The high permeability of tumour vasculature allows macromolecules and nanoparticles to enter the tumour interstitial space, while the defective lymphatic filtration allows them to remain in this tissue. Liposomes prepared for this study possess sizes between 150 and 200 nm. Thanks to their size, they are theoretically able to accumulate in solid tumours. Too large to be collected by fenestrated organs, they can pass through large fenestrations of tumour vasculature [17]. Most of studies evaluated this accumulation using classical formulations of liposomes containing PEG<sub>2000</sub> or PEG of higher molecular weights [18, 19]. These liposomes possess a global neutral charge. In this

study, we present results for classical and pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>750</sub>. They differ by their excipient composition and their surface charge, neutral for classical stealth liposomes and negative for pH-sensitive liposomes. These differences of composition and charge seem not to affect significantly their passive accumulation in solid tumours. Mouse model results were performed on 3 independent experiments. To truly quantify this accumulation, a larger number of experiments have to be performed. Moreover, it will be interesting in further experiments to study the accumulation of the liposome encapsulated material and to quantify its therapeutic effect on tumour sizes.

### **III. 3. 3. 3. ITC study**

Because tumour-bearing mice and chick embryos are immunodeficient models, they do not allow the assessment of the stability of liposomes in vascular compartment and their resistance to opsonisation. The two formulations of liposomes developed for the delivery of Print3G contain PEG<sub>750</sub> and CHOL, added because of their stabilizing properties. Indeed, classical stealth liposomes containing PEG<sub>2000</sub> are known to present an enhanced circulation lifetime compared to non pegylated liposomes [18-20]. However the use of PEG of low molecular weight to obtain stealth liposomes and especially to obtain stealth pH-sensitive liposomes is less described [21-23]. As the process of eliminating liposomes from blood involves protein adhesion to be recognized by the RES, we studied the interaction between a model globular protein (BSA) and the two types of liposomal formulations.

The interaction between a liposome and a blood protein depends on several liposome characteristics: (1) its charge: cationic and maybe anionic liposomes interact better with blood proteins than the neutral ones [20, 24]; (2) its composition: the type of phospholipid could affect the adhesion of proteins [20]; the size of liposomes: Harashima *et al.* showed that liposomes of 800 nm are degraded and opsonized more rapidly than those of 200 nm [25]; (3) its cholesterol content: increasing cholesterol content is accompanied by a marked



decrease in the total amount of protein which binds to the vesicles, (4) its surface coating: inclusion of PEG grafted to phospholipids drastically reduces the interaction.

The type of interaction that occurs when a blood protein binds to a liposome is less described. It could be related to the occurrence of hydrophobic domains at the vesicle surface. For example, albumin and IgG have strong affinities for hydrophobic domains and, consequently, become rapidly adsorbed on these regions [20, 26]. The use of cholesterol can prevent the formation of membrane surface defects and thus eliminating potential sites of adsorption. PEG-lipids inserted in liposomal membrane form an aqueous layer on the particle surface, preventing recognition of liposomes by opsonin and therefore prolong their circulation lifetime [27].

ITC results are shown in figures 8 and 9. Figure 8 shows heat flow peak after injection of 10  $\mu$ L of 1,2 mM solution of BSA on liposome suspensions. This concentration of BSA was used because it is closed to that present in blood. Six different liposomal formulations were studied: (1) classical formulation containing PEG<sub>2000</sub>, (2) classical formulation containing PEG<sub>750</sub>, (3) classical formulation without PEG, (4) pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>2000</sub>, (5) pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>750</sub> and (6) pH-sensitive liposomes without PEG. The area underneath each injection peak, equal to the total heat released for that injection is shown in Figure 9.

It can be observed in Figure 8 that injections of BSA in liposome suspensions generate a small amount of energy compared to other results found in literature when specific interactions [28] or interactions of nanoparticles [29] with proteins are studied. All the formulations were made to reduce interactions with blood proteins. They contain at least cholesterol, known for its stabilizing properties and the weak heat generated reflects the poor adsorption of BSA on vesicles. The use of a positive control containing only phospholipids could be an interesting way to confirm this hypothesis.

The observation of figure 9 helped us to classify formulations as a function of their interaction with BSA, by comparison of the total heat released at the second injection for each type of formulation. This amount is less important for classical formulations than for pH-sensitive ones. This observation could be explained by the more negative charge of pH-sensitive liposomes, not completely masked with PEG. Moreover, enthalpy is positive, meaning that the interaction between BSA and liposomes is entropically favored, due to hydrophobic interactions. The interaction with BSA is lower when liposomes contain PEG. This observation is in accordance with literature: PEG forms a protective layer on the liposome surface and decreases interaction with blood proteins. Despite the fact that PEG<sub>750</sub> is reported to not completely cover the liposome surface unlike PEG<sub>2000</sub> [21], there is no discernible difference between the two types of PEG when they are incorporated in pH-sensitive liposomes. However, the heat generated when classical liposomes containing PEG<sub>750</sub> interact with BSA is less important than that observed for classical liposomes containing PEG<sub>2000</sub>.

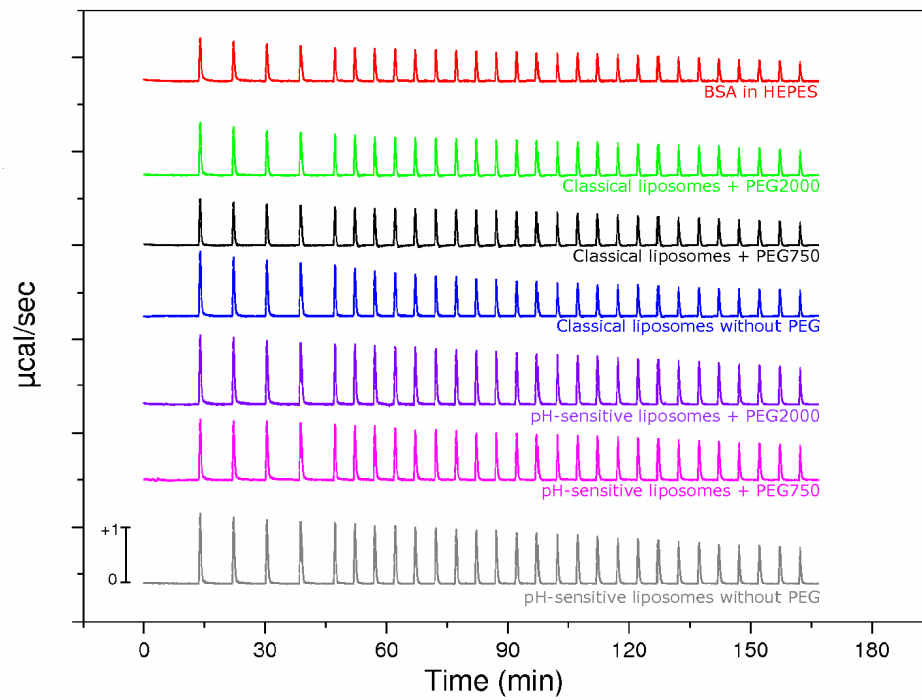


Figure 8. Microcalorimetric titration of classical or pH-sensitive liposomes, containing or not PEG<sub>750</sub> by BSA, heat flow versus time. Curves are moved in the y plane for comparison, bar represents 1  $\mu\text{cal}/\text{sec}$ .

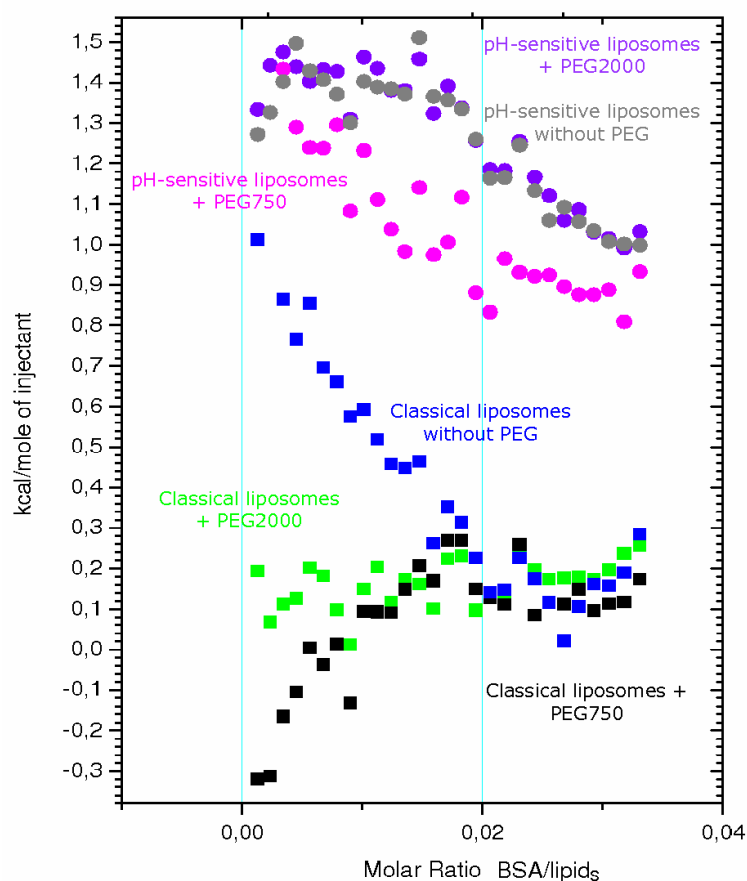


Figure 9. Integration of the heat signals of the microcalorimetric titration of classical or pH-sensitive liposomes, containing or not PEG, by BSA.

In conclusion, ITC results gave information about the interaction of BSA with liposomes. The adhesion of BSA on classical liposomes containing PEG<sub>750</sub> is the lowest observed while pH-sensitive liposomes without PEG gave the highest heat released. The use of PEG<sub>750</sub> replacing widely used PEG<sub>2000</sub> seems to have no consequence on this interaction. Thanks to these results, we could expect that the liposomes developed in this work for the delivery of Print3G will give an acceptable lifetime circulation. But these results gave information about the

interaction with a single protein, while lots of blood proteins, differing by their physicochemical and physiological properties, are involved in opsonisation mechanisms. Dimitrova *et al.* reported the difference in adhesion when several species of serum albumin are used [26]. Moreover, the mechanisms by which pegylated liposomes present a prolonged lifetime circulation are not fully understood and the adhesion of proteins is probably not the only mechanism involved in this blood remanence [21]. In this perspective, the best way to study the lifetime circulation of the studied formulations would be to investigate it by *in vivo* studies, using ITC as a tool to better understand which kind of interactions is involved.

### **III. 3. 4. Conclusion**

The two formulations of liposomes developed for the delivery of Print3G are promising vectors to present a prolonged vascular remanence and a passive accumulation in the targeted tumour tissue. *In vivo* studies confirm that the two formulations are able to accumulate passively in tumour thanks to the EPR effect. Moreover, the results obtained with the CAM model showed that liposomes were able to penetrate cell cytoplasm. This information is particularly important for the formulation of pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>750</sub> which gave good results to efficiently deliver the peptide to the cytoplasm of cancer cells, so as it can freely reach its nuclear target.

To really quantify the accumulation of liposomes in tumour, a larger number of experiments have to be performed. It will be interesting in further experiments to study the accumulation of the liposome encapsulated material and to quantify its therapeutic effect on tumour sizes. ITC results allow us to expect an acceptable blood stability of the two types of liposome formulations. However these results are preliminary results that have to be confirmed, using other types of blood proteins and *in vivo* studies using immunocompetent models.

**III. 3. 5. References**

1. Klibanov, A.L., V.P. Torchilin, and S. Zalipsky, *Long-circulating sterically protected liposomes*, in *Liposomes, second edition, a practical approach*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 231-265.
2. Torchilin, V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **71**(3): p. 431-444.
3. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **71**(3): p. 409-419.
4. Jain, R.K., *Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **46**(1-3): p. 149-68.
5. Ducat, E., et al., *Nuclear delivery of a therapeutic peptide by long circulating pH-sensitive liposomes: benefits over classical ones* submitted in J. Control. Release.
6. Huth, U.S., R. Schubert, and R. Peschka-Suss, *Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging*. J. Control. Release, 2006. **110**(3): p. 490-504.
7. Peschka, R. and R. Schubert, *pH-sensitive liposomes*, in *Liposomes, second edition*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 305-217.
8. Skalko, N., et al., *pH-sensitive liposomes for receptor-mediated delivery to chicken hepatoma (LMH) cells*. FEBS Lett., 1998. **434**(3): p. 351-6.
9. Bellavance, M.A., M.B. Poirier, and D. Fortin, *Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells*. Int. J. Pharm., 2010. **395**(1-2): p. 251-9.
10. Gabrielli, M.G. and D. Accili, *The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development*. J. Biomed. Biotechnol., 2010. **2010**: p. 940741.

11. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis*. *Histochem. Cell. Biol.*, 2008. **130**(6): p. 1119-30.
12. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Chapter 2. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules*. *Methods Enzymol.*, 2008. **444**: p. 21-41.
13. Vargas, A., et al., *The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007. **59**(11): p. 1162-1176.
14. Staton, C.A., M.W. Reed, and N.J. Brown, *A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays*. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2009. **90**(3): p. 195-221.
15. Saw, C.L., P.W. Heng, and C.V. Liew, *Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review*. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2008. **34**(11): p. 1168-77.
16. Vargas, A., et al., *Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos*. *Int. J. Pharm.*, 2004. **286**(1-2): p. 131-145.
17. Torchilin, V., *Tumor delivery of macromolecular drugs based on the epr effect*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011. **63**(3): p. 131-135.
18. Bradley, A.J., et al., *Inhibition of Liposome-Induced Complement Activation by Incorporated Poly(Ethylene Glycol)-Lipids*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998. **357**(2): p. 185-194.
19. Torchilin, V.P., *Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging*. *AAPS J.*, 2007. **9**(2): p. E128-47.
20. Cullis, P.R., A. Chonn, and S.C. Semple, *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): p. 3-17.

21. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochim. Biophys. Acta, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
22. Herrington, T.P. and J.G. Altin, *Effective tumor targeting and enhanced anti-tumor effect of liposomes engrafted with peptides specific for tumor lymphatics and vasculature*. Int. J. Pharm., 2011. **411**(1-2): p. 206-14.
23. Levchenko, T.S., et al., *Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating*. Int. J. Pharm., 2002. **240**(1-2): p. 95-102.
24. Chonn, A., S.C. Semple, and P.R. Cullis, *Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes*. J. Biol. Chem., 1992. **267**(26): p. 18759-65.
25. Harashima, H., et al., *Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes*. Pharm. Res., 1994. **11**(3): p. 402-6.
26. Dimitrova, M.N., et al., *Interaction of albumins from different species with phospholipid liposomes. Multiple binding sites system*. Int. J. Biol. Macromol., 2000. **27**(3): p. 187-94.
27. Maruyama, K., *Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2011. **63**(3): p. 161-9.
28. Barbosa, M.E., et al., *Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly(gamma-benzyl L-glutamate)-beta-cyclodextrin*. J. Mol. Recognit., 2008. **21**(3): p. 169-78.
29. Martinez-Barbosa, M.E., et al., *PEGylated Degradable Composite Nanoparticles Based on Mixtures of PEG-b-Poly(gamma-benzyl L-glutamate) and Poly(gamma-benzyl L-glutamate)*. Bioconjugate Chem., 2009. **20**(8): p. 1490-1496.



### **III. 4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE**

Grâce aux deux études *in vivo* utilisant respectivement le modèle CAM et le modèle murin, nous avons pu montrer que les deux formulations de liposomes développées pour la vectorisation du peptide Print3G s'accumulent passivement et préférentiellement dans la tumeur solide, jusque dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. Les résultats ITC ont montré la faible tendance des liposomes à interagir avec une protéine globulaire modèle, laissant espérer une stabilité sanguine suffisante des liposomes. Dans cette perspective, il serait intéressant d'étayer ces résultats par de plus amples études sur des modèles immunocompétents mais également par des études *in vivo* de l'accumulation du matériel encapsulé ainsi que par des études permettant de démontrer l'efficacité thérapeutique du système.



## **DISCUSSION**



L'administration du peptide Print3G par voie intraveineuse nécessitait de développer des vecteurs capables d'assurer son accumulation dans la tumeur et de permettre sa pénétration dans les cellules ciblées. Pour cela, trois formulations de liposomes ont été développées. Variant par leur composition phospholipidique, elles ont été développées et étudiées pour s'approcher le plus possible d'une composition idéale possédant les capacités nécessaires pour atteindre ce but. La première partie de la discussion sera consacrée au développement des formulations de liposomes encapsulant le peptide Print3G. La seconde partie discutera de l'influence de différents paramètres sur la pénétration cellulaire des vecteurs et leurs propriétés *in vivo*.

### **Développement des trois formulations de liposomes encapsulant le peptide Print3G**

La taille, la charge, l'hydrophilie plus ou moins marquée et les diverses instabilités des substances actives peptidiques en font une classe de composés particulière, pour laquelle nos méthodes habituelles de formulation doivent être adaptées [1].

Une étude de la stabilité du peptide Print3G a été réalisée et a permis de montrer son instabilité en solution, particulièrement aux températures de 25°C et 37°C. Bien que l'étude réalisée en spectrométrie de masse n'ait pas pu mettre en évidence une impureté de dégradation, la concentration en peptide Print3G mesurée par CLHP décroît au cours du temps quelle que soit la température de conservation. Afin de garantir une concentration de la solution supérieure à 95% de la concentration initiale, la solution de peptide ne devra pas être conservée plus de 3 jours à la température de -20°C et plus de 2 jours en chambre froide. Une préparation extemporanée des solutions de peptide ou des suspensions liposomales contenant celui-ci est donc à recommander. La lyophilisation est également envisageable pour une conservation à long terme, c'est la raison pour

laquelle une étude de cryoprotection des formulations a été réalisée en tant qu'étape préliminaire à la lyophilisation.

L'adsorption du peptide Print3G sur différents types de surfaces a également posé problème lors de l'utilisation de la méthode de préparation des liposomes par hydratation du film lipidique. Le contact de la solution de peptide avec l'extrudeur, le ballon et les billes de verre utilisés lors de la préparation diminuait considérablement la quantité de peptide qui pouvait effectivement s'insérer dans la cavité interne des liposomes. Pezeshki *et al.* ont décrit l'adsorption de cinq peptides différents sur le polypropylène et le verre [2] et Imamura *et al.* sur l'acier inoxydable [3]. Pour éviter cette adsorption, le peptide Print3G a été encapsulé grâce à la méthode des cycles de congélation-décongélation dans des liposomes vides préalablement préparés. Une solution de peptide a été dosée pour assurer que ces cycles de congélation-décongélation n'engendraient pas d'instabilité. Grâce à cette technique, le contact du peptide avec les différentes surfaces était réduit et les taux d'encapsulation ont pu être améliorés.

La seconde étape a été d'optimiser cette méthode de préparation. Pour identifier les facteurs influençant l'encapsulation du peptide, la technique des plans d'expériences a été utilisée. Contrairement aux méthodes expérimentales classiques qui consistent à étudier un seul facteur à la fois en fixant les autres à un niveau déterminé, cette méthode permet de faire varier tous les facteurs simultanément à chaque expérience de manière programmée et raisonnée. Cette technique est utilisée pour diminuer le nombre d'essais à réaliser pour optimiser une réponse [4, 5]. Plusieurs publications utilisent cette approche expérimentale pour étudier un système vésiculaire de type liposome, par exemple pour optimiser le développement d'une formulation [6, 7] ou pour déterminer les paramètres influençant son comportement *in vitro* [8]. Dans le cadre de nos recherches, deux paramètres influençant l'encapsulation du peptide Print3G dans les liposomes par la méthode des cycles de congélation et décongélation ont été mis en évidence. La concentration en lipides mise en

œuvre a été le premier paramètre identifié comme ayant un effet positif sur l'encapsulation. Accroître le niveau de concentration en lipides permet d'augmenter le nombre de liposomes par unité de volume de suspension et ainsi d'augmenter le volume interne total des liposomes [9, 10]. Ce volume étant plus important, il peut accueillir une plus grande quantité de peptide et le taux d'encapsulation mesuré est plus élevé. Mais cet effet est quadratique, ce qui signifie qu'à de trop fortes concentrations en lipides, le taux d'encapsulation diminue. Ceci peut être expliqué par l'accroissement de la viscosité de la suspension lorsque la concentration en excipients liposomaux augmente fortement, ce qui pourrait affecter le libre mouvement du peptide jusqu'à la cavité interne du liposome. Le second paramètre qui a été déterminé comme agissant positivement sur l'encapsulation du peptide Print3G est le nombre de cycles de congélation-décongélation qui sont appliqués pour permettre la pénétration du peptide dans le liposome. En effet, l'application de ces cycles permet d'augmenter la perméabilité membranaire et de faciliter ainsi l'entrée du peptide dans la cavité interne du liposome. Plusieurs études de cryoprotection indiquent que la formation de cristaux de glace dans la membrane phospholipidique serait responsable de la libération du matériel encapsulé de la cavité interne vers l'extérieur lors de la congélation [11-14]. Cette observation pourrait être, à l'inverse, utilisée pour expliquer l'entrée du peptide dans la vésicule. L'application des différents paramètres de formulation aux conditions optimales a permis d'obtenir des pourcentages d'encapsulation supérieurs à 62% pour les liposomes classiques contenant du PEG<sub>2000</sub> et supérieurs à 50% pour ceux contenant du PEG<sub>750</sub>.

Lorsque les liposomes pegylés pH-sensibles ont été étudiés, la méthode développée et optimisée pour l'encapsulation du peptide Print3G dans les liposomes de composition dite « classique » a été appliquée. Toutefois, les cycles de congélation et décongélation déstabilisaient les liposomes pH-sensibles, augmentant fortement leur diamètre, contrairement à ce qu'avaient observé Skalko *et al.* Ils ont en effet utilisé cette méthode pour encapsuler du dextran dans des liposomes pH-sensibles sans rencontrer de problème de

modification de taille [15]. Par contre, De Olivera *et al.* ont eux aussi observé une augmentation significative de la taille des liposomes pH-sensibles lors de l'encapsulation d'un oligonucléotide par cette technique [10]. La méthode d'hydratation du film lipidique a donc été appliquée pour encapsuler le peptide Print3G dans les liposomes pH-sensibles pegylés. Une étape de présaturation de l'extrudeur a permis de s'affranchir du problème d'adsorption du peptide. Le taux d'encapsulation obtenu, proche de 90%, peut être expliqué par la charge négative des liposomes pH-sensibles, favorisant l'interaction avec le peptide, possédant une charge théorique positive.

Pour étudier l'interaction des liposomes avec les cellules, deux études préliminaires ont dû être développées et validées afin de ne pas engendrer de toxicité due à la contamination microbienne ou de toxicité due à la présence de solvant résiduel. La méthode par filtration en condition aseptique a été retenue pour la stérilisation des liposomes. De taille inférieure à 220 nm, ils peuvent traverser la membrane de filtration. Cette méthode de stérilisation possède également l'avantage de s'appliquer une fois que les suspensions de liposomes sont terminées. La stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes est également réalisable mais était impossible à appliquer dans le cadre de notre travail, étant donné l'instabilité thermique du peptide Print3G [16]. Ensuite, une étape d'élimination du chloroforme résiduel a été ajoutée à la préparation des liposomes. Les films lipidiques ont été placés une nuit sous vide après l'étape d'évaporation pour obtenir des suspensions dont la teneur en chloroforme était inférieure aux limites préconisées par la *Pharmacopée Européenne* [17].

Un test de mort cellulaire par apoptose induite par les liposomes pH-sensibles et classiques à base de PEG<sub>750</sub> a été réalisé sur deux lignées cellulaires. L'utilisation de cellules MDA-MB-231 est justifiée par le fait qu'elles forment une tumeur solide dans les deux modèles *in vivo* que nous avons utilisé et le choix des cellules HUVEC est motivé par le fait que les liposomes, administrés par voie intraveineuse, seront en contact avec les cellules endothéliales. Ce test n'a



révéla aucune mort cellulaire par apoptose induite par l'application des suspensions liposomales pendant 24 heures. De plus, aucun signe de souffrance cellulaire n'a été détecté visuellement.

### **Influence de divers paramètres sur la pénétration cellulaire des vecteurs, leur rémanence vasculaire et leur accumulation dans la tumeur**

#### **1. Le diamètre des liposomes**

La taille des liposomes a été déterminée par spectroscopie à corrélation de photons et leur morphologie a été évaluée par microscopie électronique après cryofracture. Ces deux méthodes ont permis de déterminer que les trois formulations possèdent une taille proche de 160 nm.

##### *a. Influence sur la rémanence vasculaire*

Harashima *et al.* ont montré que la taille des liposomes avait une influence importante sur leur résistance à l'opsonisation, directement liée à leur capture hépatique [18]. En effet, une quantité élevée de liposomes de taille supérieure 200 nm de diamètre sont éliminés par le foie et cette élimination serait directement liée à l'opsonisation des liposomes. Vonarbourg *et al.* expliquent cette influence de la taille par le fait qu'il existerait une surface minimum nécessaire pour provoquer l'interaction entre l'opsonine et la nanoparticule. Cette interaction pourrait plus facilement être inhibée sur une particule plus incurvée car le PEG à la surface de celle-ci posséderait une flexibilité plus élevée qu'à la surface d'une grande particule, peu incurvée [29].

### *b. Effet EPR*

Cette taille joue également un rôle important dans l'accumulation passive et préférentielle des liposomes dans la tumeur solide grâce à l'effet EPR [19]. Des liposomes d'une taille comprise entre 100 et 200 nm peuvent s'accumuler efficacement dans le tissu tumoral en traversant la barrière endothéliale par des fenestrations de taille comprise entre 100 et 600 nm pour s'accumuler dans le tissu interstitiel [20, 21].

Pour étudier l'accumulation tumorale des deux formulations sélectionnées, deux modèles de développement tumoral ont été utilisés. Dans un premier temps, le modèle de développement de tumeurs sur CAM a été utilisé. 15 heures après injection des suspensions, les liposomes classiques et pH-sensibles ont pu être localisés dans la tumeur solide et plus particulièrement dans le cytoplasme des cellules. Ensuite, l'étude *in vivo* menée sur un modèle de développement sous-cutané de tumeurs chez la souris NOD/SCID a permis de confirmer l'accumulation préférentielle après 24 heures des liposomes dans la tumeur solide par rapport au foie, aux reins et à la rate. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre la formulation de liposomes pegylés pH-sensibles et la formulation de liposomes pegylés classiques, ce qui pourrait être justifié par leurs tailles semblables. L'utilisation de deux modèles animaux différents présentant des résultats concordants et complémentaires permet d'affirmer que les deux types de formulations peuvent s'accumuler préférentiellement dans la tumeur solide par ciblage passif (effet EPR). Trop grands pour être collectés par le foie et les reins mais suffisamment petits pour traverser la barrière endothéliale tumorale, ils s'accumulent dans le tissu interstitiel de la tumeur.

## 2. La charge des liposomes

La charge des liposomes influence l'adhésion de protéines à leur surface. La charge de surface des liposomes classiques est proche de la neutralité tandis que celle mesurée pour les liposomes pH-sensibles est négative. Cullis *et al.* expliquent qu'une charge apparente positive provoque une forte activation du complément. Pour les liposomes négatifs, il est plus difficile de tirer une conclusion tranchée. Selon le type de phospholipide, ils présenteraient une rémanence vasculaire plus ou moins longue [22]. Price *et al.* ont montré que l'adsorption de fibrinogène sur les liposomes anioniques diminuait fortement avec l'addition de PEG<sub>2000</sub>, même si elle reste légèrement plus élevée que pour les liposomes pegylés neutres [23]. L'étude de l'interaction des liposomes avec une protéine globulaire modèle, la sérum albumine bovine (BSA), par Isothermal Titration Calorimetry (ITC), a été réalisée pour obtenir des informations sur la capacité de résistance à l'opsonisation des formulations. En effet, le processus d'élimination des liposomes injectés par voie intraveineuse implique l'adhésion d'opsonines à sa surface. Cette technique thermodynamique mesure la chaleur dégagée ou absorbée lorsque deux composés interagissent. Ainsi, nous avons pu observer un dégagement de chaleur lorsqu'une solution de BSA est injectée dans une suspension de liposomes. Une différence a pu être observée entre les liposomes classiques et les liposomes pH-sensibles, ces derniers présentant une interaction légèrement plus forte avec la BSA que les classiques. En raison de leur charge plus négative, ils pourraient encore présenter à leur surface des sites d'interaction avec la sérum albumine qui ne seraient pas totalement recouverts par les PEG.

## 3. La présence de cholestérol

Les trois formulations développées contiennent une quantité significative de cholestérol (CHOL) connu pour stabiliser la membrane des liposomes et prévenir l'agrégation de ceux-ci. Les mesures ITC de chaleur dégagée lors de l'adsorption

de BSA à la surface des liposomes ont montré que l'interaction des liposomes avec la BSA était faible, quelle que soit la formulation testée, par rapport à celle mesurée lors d'une interaction entre une cyclodextrine et un principe actif [24] ou entre une nanoparticule polymérique et la BSA [25]. Cette faible réponse peut être expliquée par le fait que toutes les formulations contenaient du cholestérol, qui diminuerait les interactions hydrophobes avec les protéines plasmatiques [26].

#### **4. La sensibilité au pH**

Dans ce travail, une formulation de liposomes pH-sensibles a été développée pour améliorer la libération cellulaire du peptide dans la cellule. Le couple DOPE/CHEMS est organisé en une phase lamellaire stable à pH physiologique mais instable à pH acide, ce qui permet au matériel encapsulé d'être libéré à l'extérieur du liposome. Ce mécanisme d'action est exploité pour permettre cette fuite lors de la pénétration cellulaire par endocytose du liposome pH-sensible, ce qui permettrait d'éviter la dégradation du principe actif encapsulé par les enzymes lysosomales.

Lors des études de pénétration cellulaire des liposomes, la calcéine a été employée comme molécule modèle hydrophile, se localisant dans la cavité interne aqueuse des liposomes. Elle a été encapsulée à une concentration telle que sa fluorescence est faible à l'intérieur du liposome et n'augmente que lorsqu'elle se dilue dans le milieu extérieur [27]. Une fluorescence verte due à la calcéine diluée dans le cytoplasme des cellules n'a pu être observée que lorsqu'elles étaient traitées avec des liposomes pH-sensibles. Par cytométrie de flux, elle a pu être mesurée à une valeur trois fois supérieure à celle mesurée dans le cytoplasme de cellules cancéreuses traitées par la formulation classique. Les liposomes pH-sensibles pénètrent donc efficacement dans la cellule et sont également capables de libérer le matériel encapsulé dans le cytoplasme des cellules traitées.

Notons que la taille du peptide Print3G étant dix fois supérieure à celle de la calcéine, il n'est pas certain que la formulation de liposomes pH-sensibles pourrait délivrer aussi efficacement le peptide dans le cytoplasme des cellules cancéreuses [28]. En effet, un mécanisme de perméabilisation de la membrane liposomale à pH acide pourrait suffire à libérer la calcéine et permettre de visualiser sa fluorescence. Si tel était le cas, le peptide resterait alors confiné dans la cavité interne du liposome.

L'absence de fluorescence observée dans le cytoplasme des cellules traitées par des liposomes classiques peut être due soit à une pénétration inefficace, soit au fait que la calcéine reste encapsulée dans le liposome, sa fluorescence y étant minimale. Ces résultats n'expliquent donc pas si la différence entre les deux formulations réside dans la capacité de pénétration cellulaire ou dans la capacité de libération du matériel encapsulé.

Pour répondre à cette question, des études de pénétration cellulaire par microscopie confocale et par cytométrie de flux utilisant un marqueur de la membrane phospholipidique (NBD-CHOL) ont été réalisées. Elles ont permis de suivre la pénétration cellulaire des liposomes classiques et pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>. Une différence visuelle et quantitative a pu être mesurée lors des tests réalisés avec les cellules Hs578t. Toutefois, cette différence est moins marquée que lorsqu'on analyse les résultats obtenus avec la calcéine. De plus, aucune différence n'a pu être mise en évidence pour la lignée cellulaire MDA-MB-231.

La différence entre les deux types de liposomes réside donc dans la capacité des liposomes pH-sensibles à libérer efficacement le matériel encapsulé dans le cytoplasme.

L'étude du devenir intracellulaire du peptide Print3G a également permis de confirmer cette hypothèse. Sans l'aide du liposome, le peptide ne peut entrer dans la cellule, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. L'encapsulation du peptide Print3G dans les liposomes pH-sensibles a permis de libérer celui-ci pour

atteindre le noyau des cellules cancéreuses. Par contre, la pénétration du peptide encapsulé dans les liposomes de composition classique reste limitée au cytoplasme. Les liposomes pH-sensibles pegylés sont donc capables de libérer efficacement et en quantité suffisante le peptide Print3G dans le cytoplasme des cellules. Celui-ci peut alors librement diffuser vers le noyau.

### **5. La présence de polyéthylènesglycols**

#### *a. Influence sur la stabilité sanguine*

Les trois formulations développées contiennent du PEG<sub>2000</sub> ou PEG<sub>750</sub>, ajoutés pour augmenter leur rémanence vasculaire. En effet, le PEG greffé à un phospholipide peut s'insérer dans la membrane du liposome et former une barrière stérique et hydrophile pour empêcher l'adhésion de protéines à la surface des liposomes et empêcher leur élimination du système réticulo-endothélial (Figure 1). Lors des mesures ITC d'adhésion de la BSA aux liposomes, les formulations contenant des PEG, quels que soient la masse moléculaire du PEG et le type de formulation, engendrent une interaction plus faible que les liposomes sans PEG.

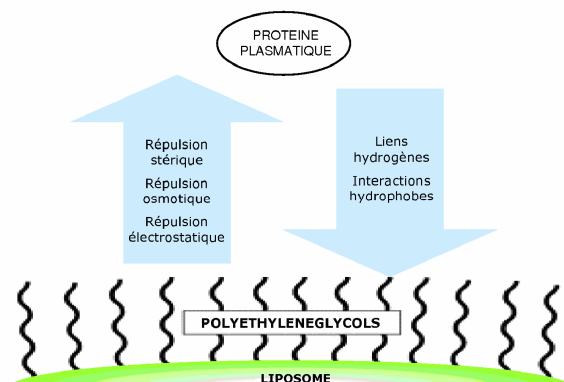


Figure 1. Représentation schématique des interactions principales entre un liposome pegylé et une protéine plasmatisque

En théorie, plus le PEG possède une masse moléculaire élevée, mieux il protégera le liposome de l'opsonisation. Mais l'influence de la densité de celui-ci à la surface du liposome est également importante, tout comme sa conformation, plutôt en « champignon » ou en « brosse » (Figure 2) [29].

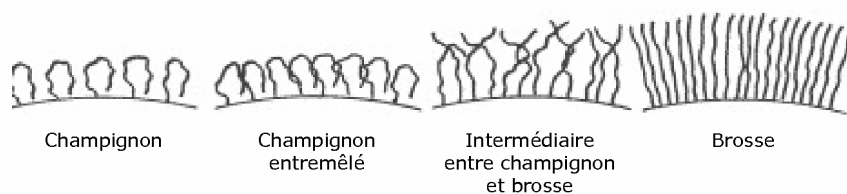


Figure 2. Conformations possibles des PEG à la surface d'une nanoparticule. [29]

Selon sa masse moléculaire et la quantité incorporée à la surface du liposome, le PEG peut adopter l'une ou l'autre conformation. Il n'existe pas de « meilleure » conformation mais selon la densité de celle-ci, des protéines pourront s'adsorber ou non à la surface du liposome.

Lors des mesures ITC, l'emploi de PEG<sub>2000</sub> n'a pas permis de diminuer l'interaction avec la BSA par rapport aux PEG<sub>750</sub>. En effet, aucune différence n'a pu être observée, que ce soit pour les liposomes pH-sensibles ou pour les

liposomes classiques. La chaleur dégagée était même plus faible lorsqu'ils contenaient du PEG<sub>750</sub> que lorsqu'ils contenaient du PEG<sub>2000</sub>. Ceci confirme les explications données par Vonarbourg *et al.* sur le fait que d'autres paramètres que le poids moléculaire du PEG affectent son action, comme la densité, la flexibilité de ses chaînes et sa conformation spatiale [29].

### *b. Influence sur la pénétration cellulaire*

Si les PEG assurent la rémanence vasculaire des liposomes, la barrière stérique qu'ils forment à la surface du liposome peut empêcher leur pénétration cellulaire [30, 31]. Plusieurs publications font également référence à une diminution de la pénétration cellulaire des liposomes pH-sensibles contenant des PEG<sub>2000</sub> [31, 32]. Lorsque les liposomes classiques PEG<sub>2000</sub> encapsulant la calcéine ont été mis en contact avec les cellules Hs578t, aucune fluorescence n'a pu être observée dans le cytoplasme des cellules. Lors de l'utilisation de PEG<sub>750</sub>, de masse moléculaire plus faible, une coloration verte a pu être détectée dans le cytoplasme de certaines cellules. La présence de PEG<sub>2000</sub> à la surface des liposomes diminue donc fortement leur capacité d'interaction avec la membrane cellulaire [31]. L'utilisation d'un marqueur de la membrane phospholipidique (NBD-CHOL) a permis de montrer la pénétration cellulaire efficace des liposomes classiques et pH-sensibles contenant des PEG<sub>750</sub>. L'utilisation de PEG<sub>750</sub> permettrait donc de maintenir une capacité suffisante de pénétration cellulaire des liposomes.

### *c. Influence sur la sensibilité au pH*

La sensibilité au pH des liposomes à base de DOPE et de CHMS pourrait être diminuée par l'addition de PEG à leur surface [33-35]. Simoes *et al.* ont étudié la libération de calcéine hors de liposomes pH-sensibles contenant des PEG<sub>2000</sub> en fonction du pH. Ils ont observé une diminution drastique de la libération de calcéine à pH acide lorsque des PEG<sub>2000</sub> sont présents en surface de liposomes



pH-sensibles [32]. Johnsson *et al.* ont montré que l'addition de PEG à la DOPE pure stabilisait la phase lamellaire [36]. Nos travaux ont montré un maintien de l'interaction cellulaire et de la sensibilité au pH des liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub>. La quantification de la fluorescence dans les cellules par cytométrie de flux montre une intensité de fluorescence plus de trois fois supérieure pour les liposomes pH-sensibles. La clé de ce maintien de sensibilité au pH malgré l'addition de PEG réside très probablement dans l'utilisation de PEG de masse moléculaire plus faible. Ceux-ci permettraient de maintenir une interaction suffisante du liposome avec les membranes cytoplasmique et endosomale. Ce phénomène pourrait en partie être expliqué par un pourcentage de recouvrement de la surface du liposome inférieur à 100%. En effet, Hristova *et al.* ont montré que le pourcentage de recouvrement de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub> pouvait décroître jusqu'à 43% selon le ratio molaire, alors que celui du PEG<sub>2000</sub> était toujours égal à 100% [37, 38].

### **6. L'encapsulation du principe actif**

La calcéine ou le peptide Print3G sont encapsulés dans la cavité interne des liposomes, puisqu'ils sont hydrophiles. L'utilisation de rhodamine, encapsulée préférentiellement dans la bicouche lipidique [39], n'a pas permis de montrer de différence entre les deux types de formulations. L'hypothèse est qu'un liposome encapsulant une substance active dans sa bicouche phospholipidique constitue un système moins stable que lorsque la molécule est encapsulée dans sa cavité interne. La rhodamine pourrait être plus facilement libérée qu'une molécule encapsulée dans la cavité aqueuse et ensuite diffuser seule du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des cellules. De plus, la rhodamine ne présente pas de phénomène de self-quenching, contrairement à la calcéine. Il n'est donc pas possible de déterminer si elle est effectivement libérée dans le cytoplasme des cellules.

En conclusion, l'utilisation de liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> semble être le meilleur compromis entre rémanence vasculaire et pénétration cellulaire. L'utilisation de PEG<sub>750</sub> remplaçant le PEG<sub>2000</sub> a montré le maintien d'une interaction cellulaire suffisante et de la sensibilité au pH de la formulation, ce qui a permis de localiser le peptide Print3G jusque dans le noyau des cellules cancéreuses. Les liposomes présentent une taille acceptable pour s'accumuler préférentiellement dans la tumeur solide et contiennent du cholestérol et du PEG<sub>750</sub> pour leur stabilité sanguine. La résistance à l'opsonisation de la formulation de liposomes pH-sensibles n'a fait l'objet que d'une étude préliminaire. Il serait nécessaire d'étudier l'interaction de ces liposomes avec d'autres protéines, comme le fibrinogène par exemple et de tester la stabilité des formulations *in vivo*. Les protéines impliquées dans l'opsonisation sont nombreuses et possèdent des propriétés physico-chimiques et physiologiques très différentes. Dimitrova *et al.* ont montré qu'en changeant seulement l'origine de la sérum albumine utilisée, les mesures d'adhésion de celle-ci au liposome pouvaient varier [40]. De plus, les mécanismes par lesquels les PEG permettent d'augmenter la rémanence vasculaire ne sont pas encore totalement compris, l'inhibition de l'adhésion de protéines à la surface du liposome n'est peut-être pas le seul mécanisme impliqué. Dos Santos *et al.* n'ont pas pu démontrer, pour certaines formulations de liposomes pegylés, qu'il existait une corrélation entre l'adhésion des protéines sanguines et le temps de circulation sanguine [38].

---

**Références**

1. Dass, C.R. and P.F. Choong, *Biophysical delivery of peptides: applicability for cancer therapy*. *Peptides*, 2006. **27**(12): p. 3479-88.
2. Pezeshki, A., et al., *Adsorption of peptides at the sample drying step: Influence of solvent evaporation technique, vial material and solution additive*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009. **49**(3): p. 607-612.
3. Imamura, K., et al., *Contribution of acidic amino residues to the adsorption of peptides onto a stainless steel surface*. *J. Colloid Interface Sci.*, 2003. **267**(2): p. 294-301.
4. Jaspard, S., et al., *Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007. **65**(1): p. 47-56.
5. Brion, M., et al., *The supercritical micronization of solid dispersions by Particles from Gas Saturated Solutions using experimental design*. *J. Supercrit. Fluids*, 2009. **51**(1): p. 50-56.
6. Stensrud, G., et al., *Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design*. *Int. J. Pharm.*, 2000. **198**(2): p. 213-228.
7. González-Rodríguez, M.L., et al., *Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes*. *Int. J. Pharm.*, 2007. **337**(1-2): p. 336-345.
8. Braun, E., et al., *Experimental design for in vitro skin penetration study of liposomal superoxide dismutase*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006. **40**(5): p. 1187-1197.
9. Zuidam, N.J., et al., *Stability, storage, and sterilization of liposomes*, in *Liposomes, Second edition*, V.P. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: Boston. p. 149-166.
10. De Oliveira, M.C., et al., *Delivery of antisense oligonucleotides by means of pH-sensitive liposomes*. *J. Control. Release*, 1997. **48**(2-3): p. 179-184.

11. Higgins, J., et al., *Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing*. J. Pharm. Pharmacol., 1986. **38**(4): p. 259-263.
12. Siow, L.F., T. Rades, and M.H. Lim, *Characterizing the freezing behavior of liposomes as a tool to understand the cryopreservation procedures*. Cryobiology, 2007. **55**(3): p. 210-221.
13. Talsma, H., M.J. Van Steenberg, and D.J.A. Crommelin, *The cryopreservation of liposomes: 3. Almost complete retention of a water-soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant containing dispersion after a freezing/thawing cycle*. Int. J. Pharm., 1991. **77**(2-3): p. 119-126.
14. Fransen, G.J., P.J.M. Salemink, and D.J.A. Crommelin, *Critical parameters in freezing of liposomes*. Int. J. Pharm., 1986. **33**(1-3): p. 27-35.
15. Skalko, N., et al., *pH-sensitive liposomes for receptor-mediated delivery to chicken hepatoma (LMH) cells*. FEBS Lett., 1998. **434**(3): p. 351-6.
16. Freise, J., *The preparation of sterile drug-containing liposomes*, in *Liposome Technology*, G. Gregoriadis, Editor. 2000, CRC Press: Boca raton. p. 131-137.
17. Witschi, C. and E. Doelker, *Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997. **43**(3): p. 215-242.
18. Harashima, H., et al., *Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes*. Pharm. Res., 1994. **11**(3): p. 402-6.
19. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **71**(3): p. 409-419.

20. Maruyama, K., *Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011. **63**(3): p. 161-9.
21. Huang, S.K., et al., *Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice*. *Cancer Res.*, 1992. **52**(19): p. 5135-43.
22. Cullis, P.R., A. Chonn, and S.C. Semple, *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): p. 3-17.
23. Price, M.E., R.M. Cornelius, and J.L. Brash, *Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001. **1512**(2): p. 191-205.
24. Barbosa, M.E., et al., *Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly(gamma-benzyl L-glutamate)-beta-cyclodextrin*. *J. Mol. Recognit.*, 2008. **21**(3): p. 169-78.
25. Martinez-Barbosa, M.E., et al., *PEGylated Degradable Composite Nanoparticles Based on Mixtures of PEG-b-Poly(gamma-benzyl L-glutamate) and Poly(gamma-benzyl L-glutamate)*. *Bioconjugate Chem.*, 2009. **20**(8): p. 1490-1496.
26. Semple, S.C., A. Chonn, and P.R. Cullis, *Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes*. *Biochemistry*, 1996. **35**(8): p. 2521-5.
27. Chen, R.F. and J.R. Knutson, *Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers*. *Anal. Biochem.*, 1988. **172**(1): p. 61-77.
28. Chu, C.J., et al., *Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture*. *Pharm. Res.*, 1990. **7**(8): p. 824-34.
29. Vonarbourg, A., et al., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. *Biomaterials*, 2006. **27**(24): p. 4356-73.

- 
30. Woodle, M.C., M.S. Newman, and J.A. Cohen, *Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties*. J. Drug Target., 1994. **2**(5): p. 397-403.
  31. Duzgunes, scedil, and S. Nir, *Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1999. **40**(1-2): p. 3-18.
  32. Simoes, S., et al., *On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes*. Biochim. Biophys. Acta, 2001. **1515**(1): p. 23-37.
  33. Roux, E., et al., *On the characterization of pH-sensitive liposome/polymer complexes*. Biomacromolecules, 2003. **4**(2): p. 240-8.
  34. Bellavance, M.A., M.B. Poirier, and D. Fortin, *Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells*. Int. J. Pharm., 2010. **395**(1-2): p. 251-9.
  35. Momekova, D., et al., *Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units*. Eur. J. Pharm. Sci., 2007. **32**(4-5): p. 308-317.
  36. Johnsson, M. and K. Edwards, *Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids*. Biophys. J., 2001. **80**(1): p. 313-23.
  37. Hristova, K., A. Kenworthy, and T.J. McIntosh, *Effect of Bilayer Composition on the Phase Behavior of Liposomal Suspensions Containing Poly(ethylene glycol)-Lipids*. Macromolecules, 1995. **28**(23): p. 7693-7699.
  38. Dos Santos, N., et al., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochim. Biophys. Acta, 2007. **1768**(6): p. 1367-1377.
  39. Gillet, A., et al., *Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition*. Eur. J. Pharm. Biopharm.. **In Press, Corrected Proof**.

40. Dimitrova, M.N., et al., *Interaction of albumins from different species with phospholipid liposomes. Multiple binding sites system.* Int. J. Biol. Macromol., 2000. **27**(3): p. 187-94.





## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Au cours de ce travail, trois formulations de liposomes ont été développées : des liposomes furtifs dits « classiques » à base de PEG<sub>2000</sub> ou de PEG<sub>750</sub> et des liposomes furtifs pH-sensibles contenant des PEG<sub>750</sub>. Le but était de s'approcher du vecteur idéal qui permettrait d'améliorer la stabilité sanguine du peptide Print3G, son accumulation préférentielle dans la tumeur solide et sa pénétration cellulaire.

Grâce aux études de caractérisation physico-chimiques, nous avons démontré qu'elles possédaient toutes trois une taille et une morphologie adéquate pour l'administration intraveineuse, une stabilité acceptable et de bons taux d'encapsulation du peptide Print3G. De plus, des méthodes de filtration stérilisante et d'élimination du chloroforme résiduel ont été validées afin d'éviter toute toxicité due à la contamination microbienne et au solvant résiduel lors des études *in vitro* et *in vivo*.

Les liposomes classiques à base de PEG<sub>2000</sub> constituaient une base solide pour développer un vecteur encapsulant le peptide Print3G car ils sont présentés dans la littérature comme possédant une rémanence vasculaire prolongée. Néanmoins, leur faible pénétration cellulaire et a été attribuée à la présence de PEG<sub>2000</sub> à la surface de la vésicule, diminuant la capacité d'interaction du liposome avec la cellule, et a conduit à l'abandon de cette formulation.

Une deuxième formulation de liposomes classiques a été développée. Le PEG<sub>2000</sub> y a été remplacé par du PEG<sub>750</sub>. L'idée était d'utiliser du PEG de masse moléculaire plus faible pour conserver une certaine capacité de pénétration cellulaire. Des molécules modèles fluorescentes, encapsulées dans la cavité interne (calcéine), insérées dans la bicouche phospholipidique (rhodamine) ou greffées au cholestérol (NBD-CHOL), ont permis de suivre la pénétration cellulaire du liposome et/ou de son contenu dans différentes lignées cellulaires. Grâce à l'utilisation de NBD-CHOL, la pénétration effective des liposomes classiques à base de PEG<sub>750</sub> a été démontrée. L'utilisation de ce PEG s'est donc

avérée intéressante pour maintenir une interaction de la vésicule avec les membranes biologiques.

La calcéine, encapsulée à concentration élevée dans la cavité interne du liposome, nous a permis d'étudier la libération de matériel encapsulé du liposome vers le cytoplasme. En effet, sa fluorescence est minimale lorsqu'elle est encapsulée dans la vésicule et augmente lorsqu'elle se dilue dans le milieu extérieur.

Seule une faible fluorescence de la calcéine a pu être observée lorsque les cellules ont été traitées par les liposomes classiques à base de PEG<sub>750</sub>. Le matériel contenu dans la cavité interne des liposomes classiques à base de PEG<sub>750</sub> ne peut donc être libéré efficacement dans le cytoplasme des cellules.

Une dernière formulation a été étudiée en vue d'améliorer la libération du matériel encapsulé dans le cytoplasme des cellules. La bicouche phospholipidique de liposomes pH-sensibles, composée notamment de DOPE et de CHMS, est organisée en une phase lamellaire stable à pH physiologique mais instable à pH acide, ce qui permet au matériel encapsulé d'être libéré à l'extérieur du liposome lors de l'endocytose de la vésicule. Cependant, ces liposomes sont très instables lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse et il est décrit dans la littérature que l'addition de PEG<sub>2000</sub> peut diminuer la capacité d'interaction cellulaire et occasionner la perte de sensibilité au pH de la formulation. C'est pourquoi du PEG<sub>750</sub> a été ajouté aux liposomes pH-sensibles, dans le but de trouver un compromis entre une rémanence vasculaire prolongée, une pénétration cellulaire efficace et une libération suffisante de la substance active dans le cytoplasme des cellules.

Cette troisième formulation a permis d'observer une libération efficace de calcéine dans le cytoplasme des cellules. La différence entre la formulation classique et pH-sensible à base de PEG<sub>750</sub> réside donc principalement dans la plus grande capacité de libérer le matériel encapsulé dans le cytoplasme.

Cette hypothèse a été confirmée lorsque la pénétration cellulaire du peptide Print3G encapsulé dans les liposomes a été étudiée. En effet, le peptide Print3G est présent uniquement dans le cytoplasme de cellules traitées avec des liposomes classiques, quel que soit leur temps de contact avec la cellule. Par contre, il a été localisé dans les noyaux des cellules cancéreuses lorsqu'il est encapsulé dans les liposomes pH-sensibles. Les liposomes pH-sensibles pegylés sont donc capables de libérer efficacement le peptide Print3G dans le cytoplasme des cellules et celui-ci peut alors librement diffuser vers le noyau.

Enfin, il était nécessaire de s'assurer que l'emploi de PEG<sub>750</sub> permettait de garder une stabilité sanguine acceptable et une accumulation suffisante des vecteurs dans la tumeur solide. Pour cela, deux modèles ont été utilisés : le modèle de développement tumoral sur CAM d'embryon de poulet et le modèle de développement tumoral sous-cutané chez la souris immunodéficiente. Dans le premier modèle, l'accumulation préférentielle des deux types de liposomes a pu être observée jusque dans le cytoplasme des cellules MDA-MB-231. Cette accumulation par ciblage passif a été confirmée par le second modèle, puisque la fluorescence observée dans les tumeurs était plus importante que celle observée dans le foie, la rate et les reins. Aucune différence n'a pu être démontrée entre les deux formulations.

Etant donné que les deux modèles *in vivo* employés sont immunodéficients, une étude de l'interaction des liposomes avec une protéine globulaire modèle, la BSA, a également été réalisée pour évaluer la résistance à l'opsonisation des formulations. Si l'addition de PEG a permis de diminuer l'interaction du liposome avec la BSA, l'utilisation de PEG<sub>2000</sub> ne présente pas d'avantage par rapport au PEG<sub>750</sub>. Enfin, une différence entre les deux types de formulations a pu être mise en évidence, les liposomes de composition classique provoquant une adhésion à la BSA plus faible que les liposomes pH-sensibles.

L'ensemble de nos travaux a donc permis de développer et de sélectionner une formulation de liposomes capable de présenter une stabilité vraisemblablement acceptable dans le compartiment sanguin, de s'accumuler dans la tumeur solide et de délivrer le peptide Print3G dans le cytoplasme et le noyau des cellules.

Dans les perspectives de ce travail, il conviendrait d'étudier plus en profondeur les mécanismes de pénétration des liposomes pH-sensibles contenant du PEG<sub>750</sub> pour confirmer l'hypothèse de libération du matériel encapsulé grâce au maintien de la sensibilité au pH. Ceci pourrait être réalisé au moyen de marqueurs cellulaires fluorescents ou en traitant les cellules avec des inhibiteurs chimiques de l'endocytose. Il serait également intéressant de pouvoir évaluer l'interaction du peptide Print3G avec sa cible nucléaire, *Hoxa1*, par exemple par co-localisation nucléaire.

Les études *in vivo* devraient être complétées non seulement en étudiant l'accumulation du peptide dans les tumeurs, mais aussi en évaluant l'efficacité thérapeutique du matériel encapsulé, par exemple par diminution de la taille des tumeurs après traitement.

L'utilisation d'un modèle *in vivo* immunocompétent permettrait de réaliser une étude pharmacocinétique des vecteurs pour démontrer la rémanence vasculaire prolongée de liposomes contenant du PEG<sub>750</sub>. En parallèle, la technique par ITC permettrait d'approfondir nos connaissances sur l'opsonisation des liposomes en mesurant leur interaction avec d'autres protéines plasmatiques.

D'autres formulations de liposomes pourraient être développées, contenant par exemple des lipides pegylés clivables pour améliorer encore la sensibilité au pH des liposomes. Le bénéfice d'un ciblage actif pourrait également être évalué en terme de pénétration cellulaire et d'accumulation des liposomes dans la tumeur.

Enfin, il serait intéressant de tester l'encapsulation d'autres peptides dans les liposomes pégylés pH-sensibles. Ceci permettrait de confirmer l'intérêt de la formulation pour la vectorisation d'autres substances actives peptidiques.





## **RESUMES**



L'administration intraveineuse de substances actives peptidiques présente plusieurs difficultés liées à leur instabilité, leur élimination rapide de la circulation sanguine et leur forte sensibilité à la dégradation enzymatique. Le peptide Print3G est un antagoniste d'une oncoprotéine impliquée dans le cancer du sein. L'objectif du travail était de développer des vecteurs liposomaux pour une administration intraveineuse du peptide, capables d'améliorer sa stabilité sanguine et de lui permettre d'atteindre sa cible tumorale.

Dans la première partie du travail, deux formulations de liposomes, dites « classiques », ont été étudiées. La première formulation contient du PEG<sub>2000</sub>, connu pour former une barrière hydrophile et stérique autour du liposome contre l'opsonisation et permettant d'obtenir des liposomes furtifs. La présence du PEG à la surface des vésicules pourrait toutefois diminuer leur capacité de pénétration cellulaire, c'est pourquoi la seconde formulation de liposomes développée contient du PEG<sub>750</sub>. De plus petite masse moléculaire, il pourrait permettre de maintenir une interaction suffisante avec la membrane cellulaire et constituer un compromis entre rémanence vasculaire prolongée et pénétration cellulaire efficace.

Une méthode de dosage CLHP du peptide Print3G a été développée et validée. Celle-ci a non seulement permis d'évaluer la stabilité du peptide mais aussi de connaître précisément son taux d'encapsulation dans les différentes formulations de liposomes développées. L'instabilité du peptide Print3G en solution aqueuse a été mise en évidence, conduisant à la préparation des formulations de manière extemporanée et à l'étude de cryoprotection des liposomes, dans la perspective de lyophiliser les vecteurs pour en améliorer la stabilité.

L'encapsulation du peptide Print3G dans les liposomes classiques a été réalisée grâce à la méthode des cycles de congélation-décongélation pour éviter l'adsorption du peptide sur les différents matériaux utilisés lors de la fabrication. Cette méthode a été optimisée au moyen d'un plan d'expériences qui a permis

d'atteindre de bons taux d'encapsulation du peptide dans les deux types de liposomes classiques.

La seconde partie du travail a été consacrée à l'étude de la pénétration cellulaire des liposomes et de leur contenu. Deux études préliminaires ont dû être développées et validées afin de ne pas engendrer de toxicité due à la contamination microbienne et à la présence de solvant résiduel.

Les liposomes classiques contenant des PEG<sub>2000</sub> ont montré une faible pénétration cellulaire, ce qui a conduit à l'abandon de cette formulation pour vectoriser le peptide Print3G.

Une troisième formulation de liposomes, dits « pH-sensibles » a été caractérisée en termes de taille, de taux d'encapsulation et de stabilité en fonction de la température. Elle a été développée dans le but de libérer efficacement le matériel encapsulé dans le cytoplasme des cellules. Lors de la pénétration cellulaire par endocytose, l'acidification de l'endosome permet de déstabiliser le liposome pH-sensible qui peut ensuite libérer le matériel encapsulé dans le cytoplasme, en évitant sa dégradation par les enzymes lysosomales. Les liposomes pH-sensibles développés contiennent également du CHOL et des PEG<sub>750</sub>, ajoutés pour maintenir une rémanence vasculaire suffisante.

Une étude de la libération du matériel encapsulé dans les liposomes pH-sensibles en fonction du pH a d'abord permis de mettre en évidence le maintien d'une activité pH-sensible malgré la présence de PEG<sub>750</sub> et de CHOL dans la formulation.

Ensuite, les études réalisées en microscopie confocale et en cytométrie de flux ont permis de montrer la pénétration cellulaire plus importante des liposomes pH-sensibles par rapport aux liposomes classiques, et surtout de mettre en évidence leur capacité à libérer une molécule modèle hydrophile encapsulée

dans la cavité interne du liposome. Cet avantage pourrait être expliqué par l'emploi de PEG<sub>750</sub>, permettant de maintenir l'interaction entre la membrane cellulaire et une sensibilité au pH suffisante. Cette hypothèse a été confirmée lors des études de pénétration cellulaire des vecteurs encapsulant le peptide Print3G biotinylé. Alors qu'il a seulement pu être localisé dans le cytoplasme des cellules cancéreuses traitées avec des liposomes classiques, sa présence dans le noyau a pu être détectée lors de l'utilisation de la formulation pH-sensible.

Dans la troisième partie du travail, nous avons pu montrer l'accumulation passive des liposomes pH-sensibles et classiques contenant du PEG<sub>750</sub> dans la tumeur solide, sur modèle CAM et sur modèle murin. Cette accumulation, observée jusque dans le cytoplasme des cellules tumorales, était plus importante que dans le foie, la rate et les reins et aucune différence significative entre les deux formulations n'a pu être mise en évidence.

Toutefois, les deux modèles *in vivo* utilisés sont immunodéficients et ne permettent donc pas d'évaluer la résistance à l'opsonisation des liposomes. Une étude de l'interaction des liposomes avec une protéine globulaire modèle, la BSA, a montré la faible adsorption de celle-ci à la surface des liposomes. L'utilisation du PEG<sub>2000</sub> par rapport au PEG<sub>750</sub> n'a pas permis de diminuer l'interaction du liposome avec la BSA. Grâce à ces résultats, nous pourrions nous attendre à une rémanence vasculaire acceptable des formulations étudiées. Mais pour s'en assurer, l'interaction de ces liposomes avec d'autres protéines et la résistance à l'opsonisation des vecteurs devraient être étudiées.

L'ensemble de nos travaux a donc permis de développer et de sélectionner une formulation de liposomes capable de délivrer le peptide Print3G dans le cytoplasme des cellules, de s'accumuler dans la tumeur solide et de présenter une stabilité vraisemblablement acceptable dans le compartiment sanguin.

Intravenous administration of peptide drugs presents several drawbacks, related to their instability, their rapid elimination from the blood circulation and their enzymatic degradation. Print3G is an antagonist of oncoprotein involved in breast cancer. The purpose of this work was to develop liposomal vectors for Print3G delivery that are able to improve its blood stability and to deliver it to its site of action.

The first part of this work was devoted to the study of the two "classical" formulations of liposomes. The first one contains PEG<sub>2000</sub>, which forms a steric and hydrophilic barrier on vesicle surface against opsonisation, in order to obtain stealth liposomes. However, PEG could hamper the cellular penetration of liposomes and the second formulation contains PEG<sub>750</sub> in order to maintain a sufficient interaction between the cellular membrane and the vesicle. This second formulation could constitute a compromise between prolonged vascular remanence and efficient cellular penetration.

An HPLC method was developed and validated for Print3G determination, allowing the evaluation of its stability and its encapsulation efficiency in liposomes. Because of Print3G instability, it was necessary to prepare Print3G aqueous solutions and formulations extemporaneously. This instability also led to the liposomal cryoprotection study in order to further lyophilize formulations.

Print3G encapsulation in classical liposomes was obtained using freeze-thawing cycles to avoid its adsorption on manufacture materials. This method was optimized using an experimental design in order to attain good encapsulation efficiency.

The second part of the work was to study cellular penetration of liposomes and of their encapsulated material. Two preliminary studies were developed and validated in order to avoid any toxicity due to microorganisms proliferation or presence of residual solvent.

A third formulation of liposomes, named "pH-sensitive", was characterized in terms of size, encapsulation efficiency and temperature stability. pH-sensitive liposomes were developed in order to efficiently deliver the encapsulated material in cell cytoplasm. During cellular internalization by endocytosis, endosome acidification allows to destabilize pH-sensitive liposome which can further deliver its encapsulated material to cell cytoplasm, avoiding its degradation by lysosomal enzymes. The formulation of pH-sensitive liposomes also contains CHOL and PEG<sub>750</sub>, added to maintain a sufficient vascular remanence. A stability study as a function of the pH allowed observing that the release of encapsulated material is maintained under acidic conditions.

CLSM and FACS studies allowed demonstrating the higher cellular penetration of pH-sensitive liposomes comparing to classical ones and, most importantly, their capacity for delivering a hydrophilic model molecule encapsulated in the inner cavity of liposomes. This observation could be explained by the use of PEG<sub>750</sub> which could maintain the interaction with cellular membrane and a sufficient pH-sensitivity.

This hypothesis was confirmed when the intracellular fate of Print3G encapsulated in liposomes was studied. While it has only been localized in the cytoplasm of cancer cells treated with conventional liposomes, its presence in the nucleus could be detected when using the formulation of pH-sensitive liposomes.

In the third part of the work, we showed the passive accumulation in solid tumor of classical and pH-sensitive liposomes containing PEG<sub>750</sub> in CAM and mouse models. This accumulation, observed in the cytoplasm of tumor cells, was higher than accumulation in liver, spleen and kidneys. No significant difference could be demonstrated between the two formulations.

However, the two *in vivo* models used to study accumulation of liposomes in tumours are immunodeficient and therefore, not suitable for studying liposome resistance to opsonisation. The study of interaction between liposomes and a globular model protein, BSA, showed its weak adsorption on the vesicle surface. The use of PEG<sub>2000</sub> compared to PEG<sub>750</sub> did not decrease the interaction between liposome and BSA. Thanks to these results, we can expect an acceptable vascular remanence of our liposomal formulations. In order to confirm this hypothesis, the interaction between liposomes and other proteins and evaluation of vectors *in vivo* stability should be studied.

In conclusion, a suitable formulation was developed and selected that is able to deliver Print3G to cell cytoplasm, to accumulate in solid tumours and will probably be stable in vascular compartment.



## **ANNEXES**



## I. RÉSULTATS RELATIFS A LA PUBLICATION SOUMISE

“nuclear delivery of a therapeutic peptide by long circulating ph-sensitive liposomes : benefits over classical vesicles”

### I. 1. Liposomes marqués au NBD

Les images des cellules MDA-MB-231 et WI-26 traitées avec des liposomes classiques ou pH-sensibles contenant des PEG<sub>750</sub> sont présentées aux figures 1 et 2.

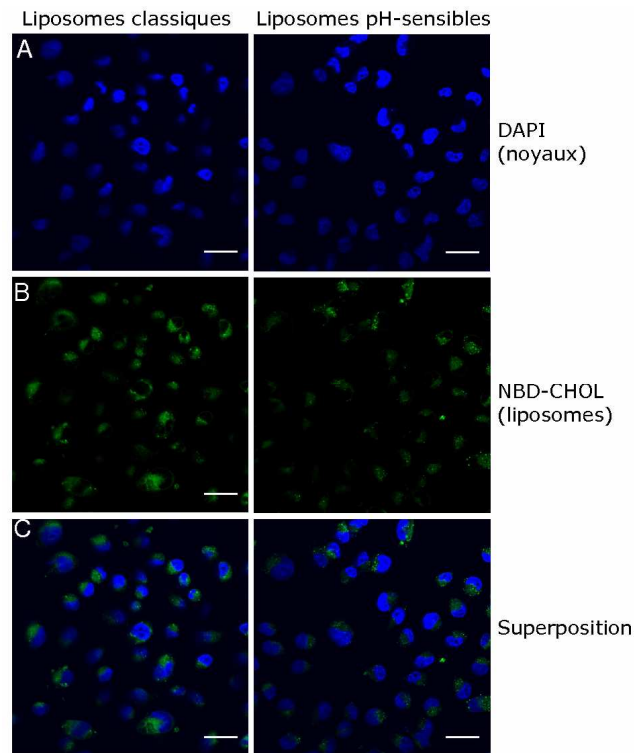


Figure 1. Images obtenues par microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées pendant 2h30 avec des liposomes pegylés classiques (A,B,C) ou pH-sensibles (D,E,F) marqués au NBD. (A,D) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, E) coloration verte des liposomes marqués au NBD ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de (D,E). La barre représente 30  $\mu$ m.

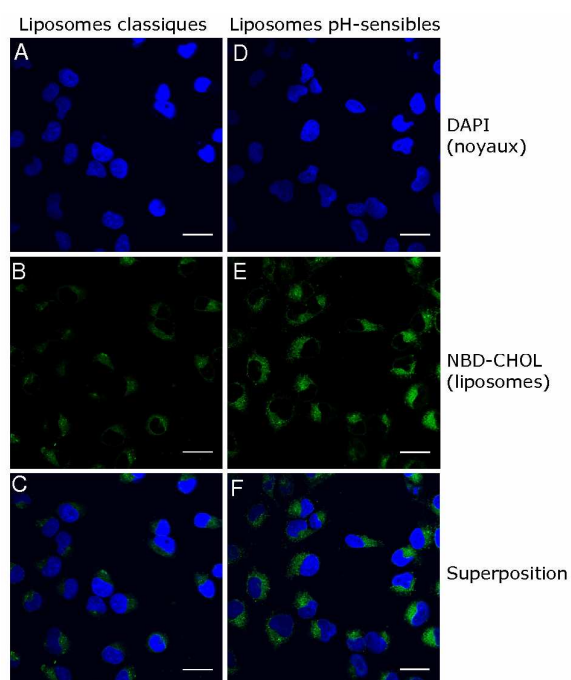


Figure 2. Images obtenues par microscopie confocale de cellules WI-26 traitées pendant 2h30 avec des liposomes pegylés classiques (A,B,C) ou pH-sensibles (D,E,F) marqués au NBD. (A,D) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, E) coloration verte des liposomes marqués au NBD ; (C) superposition de A et B ; (F) superposition de (D,E). La barre représente 30  $\mu\text{m}$ .

### **I. 2. Liposomes marqués au NBD et contenant le peptide Print3G – cinétique sur cellules MDA-MB-231**

Les images des cellules MDA-MB-231 traitées pendant 15 minutes, 5 heures ou 15 heures avec des liposomes classiques ou pH-sensibles contenant des PEG<sub>750</sub> sont présentées aux figures 1 et 2.

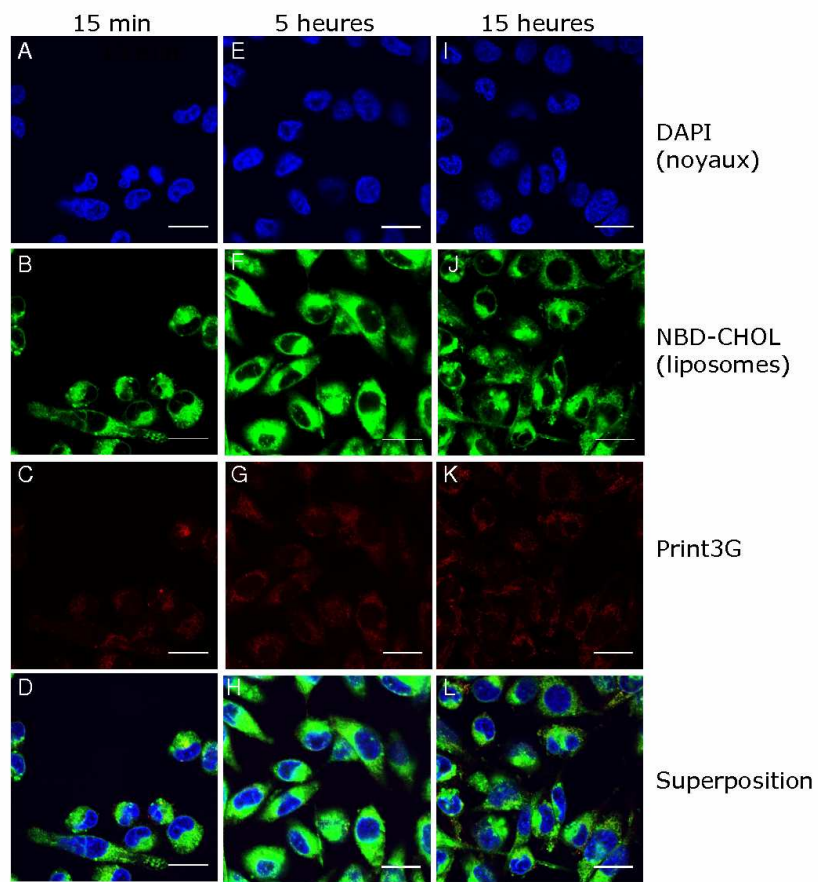


Figure 3. Images obtenues par microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées pendant 15 min (A,B,C,D), 5 heures (E,F,G,H) ou 15 heures (I,J,K,L) avec des liposomes pegylés classiques marqués au NBD et encapsulant le peptide Print3G biotinylé. (A,E,I) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, F,J) coloration verte des liposomes marqués au NBD ; (C,G,K) coloration rouge du peptide biotinylé ; (D,H,L) superposition des canaux bleu, vert et rouge. La barre représente 20  $\mu\text{m}$ .

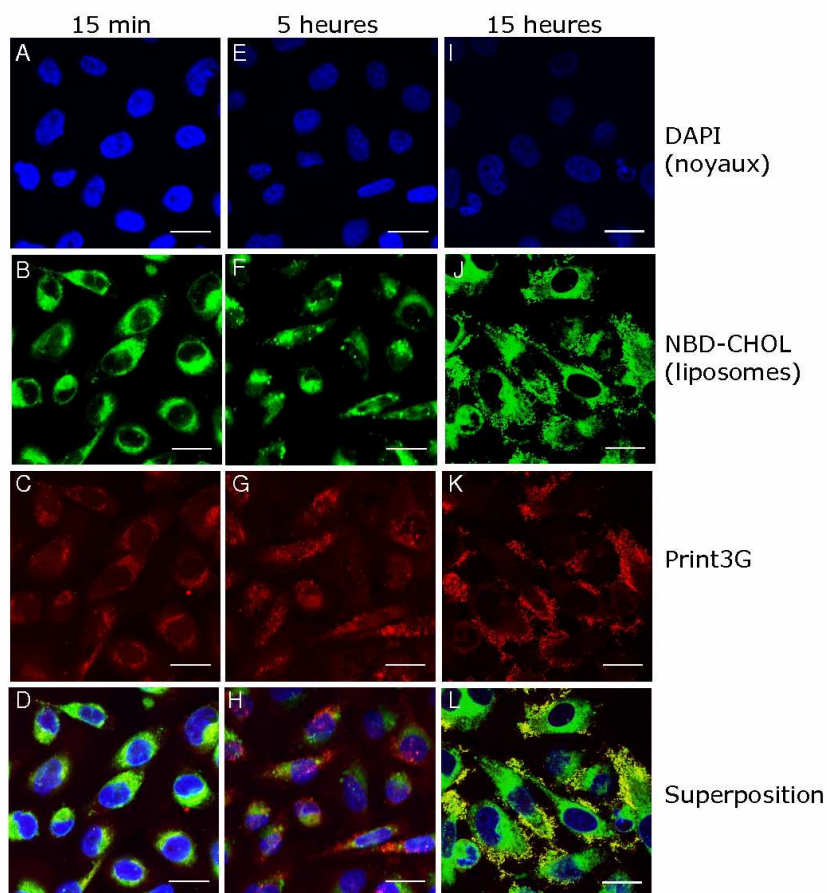


Figure 4. Images obtenues par microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées pendant 15 min (A,B,C,D), 5 heures (E,F,G,H) ou 15 heures (I,J,K,L) avec des liposomes pegylés pH-sensibles marqués au NBD et encapsulant le peptide Print3G biotinylé. (A,E,I) coloration bleue des noyaux marqués au DAPI ; (B, F,J) coloration verte des liposomes marqués au NBD ; (C,G,K) coloration rouge du peptide biotinylé ; (D,H,L) superposition des canaux bleu, vert et rouge. La barre représente 20  $\mu\text{m}$ .

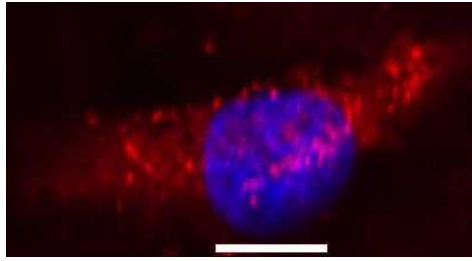


Figure 5. Image obtenue par microscopie confocale d'une cellule MDA-MB-231 traitée pendant 5 heures des liposomes pH-sensibles marqués au NBD et encapsulant le peptide Print3G biotinylé. La barre représente 10  $\mu\text{m}$ .

## II. LETTRE D'ACCEPTATION DU DOSSIER SOUMIS A LA COMMISSION D'ETHIQUE ANIMALE – PARTIM POUSSIN



DOCUMENT A CONSERVER  
PAR LE SERVICE

Liège, le  
25112010  
4000 Sart Tilman

Pr B EVRRARD  
Dr O PEULEN  
Laboratoire de Technologie Pharmaceutique  
Tour de pharmacie B36, +2  
CHU Sart-Tilman,

Chers Collègues,

Votre dossier intitulé « Essai de vectorisation de peptides thérapeutiques dans des tumeurs par des liposomes pH-sensibles. PARTIM OEUFS » a été examiné par mail par la Commission en date du 24112010 et a reçu le numéro **1120**.

**La Commission a rendu un avis favorable.**

Nous vous prions de croire, chers Collègues, en l'expression de nos sentiments les meilleurs et vous souhaitons plein succès pour vos recherches.

Pour le Pr. J Balthazart, Président,  
Pr. P. Drion, secrétaire.

**Codes et significations**

**Avis « favorable »** : Vous pouvez débiter le protocole.

**Avis « favorable sous réserve de... »** : Vous devez répondre aux questions posées par la Commission (et attendre son avis) **AVANT de débiter le protocole**.

**Avis défavorable** : Vous ne pouvez pas débiter le protocole, contactez la Commission.



### III. LETTRE D'ACCEPTATION DU DOSSIER SOUMIS A LA COMMISSION D'ETHIQUE ANIMALE – PARTIM SOURIS



DOCUMENT A CONSERVER  
PAR LE SERVICE

Liège, le  
25112010  
4000 Sart Tilman

Pr B EVRARD  
Dr O PEULEN  
Laboratoire de Technologie Pharmaceutique  
Tour de pharmacie B36, +2  
CHU Sart-Tilman,

Chers Collègues,

Votre dossier intitulé « Essai de vectorisation de peptides thérapeutiques dans des tumeurs par des liposomes pH-sensibles. PARTIM SOURIS » a été examiné par mail par la Commission en date du 24/11/2010 et a reçu le numéro **1121**.

**La Commission a rendu un avis favorable.**

Elle attend par retour de mail, dans les 15 jours, en vous référant au titre et numéro du dossier les réponses aux demandes suivantes :

-préciser la durée de conservation des animaux (4 semaines ou six semaines dans le point raffinement).

-préciser ce que vous entendez par adéquatement dans le point raffinement (« Un monitoring bi-quotidien est effectué durant toute la période de croissance tumorale, et l'inconfort éventuel traité adéquatement . »)

-point 17 : le choix C1 serait plus approprié

-point 19<sup>E</sup> : la Commission attend une dose de kétamine /xylozine en mg/kg et non en ml/animal ; vous devez en effet être précis et les réveiller... ; l'injection sous entend une pesée préalable de chaque animal.

Dans le même ordre d'idée, s'agissant d'une euthanasie, la Commission attend également une dose de pentobarbital en mg/kg et non en ml/animal ; l'injection sous entend une pesée préalable de chaque animal.

Nous vous prions de croire, chers Collègues, en l'expression de nos sentiments les meilleurs et vous souhaitons plein succès pour vos recherches.

Pour le Pr. J Balthazart, Président,  
Pr. P. Drion, secrétaire.

**Codes et significations**

Avis « favorable » : Vous pouvez débiter le protocole.

Avis « favorable sous réserve de... » : Vous devez répondre aux questions posées par la Commission (et attendre son avis) **AVANT de débiter le protocole.**

Avis défavorable : Vous ne pouvez pas débiter le protocole, contactez la Commission.