

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 073 750**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②1 N° d'enregistrement national : **17 61030**

⑤1 Int Cl⁸ : **B 01 J 13/02 (2018.01), A 61 K 49/18, B 82 Y 5/00, 15/00, 40/00**

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②2 Date de dépôt : 22.11.17.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.05.19 Bulletin 19/21.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablissement public — FR.

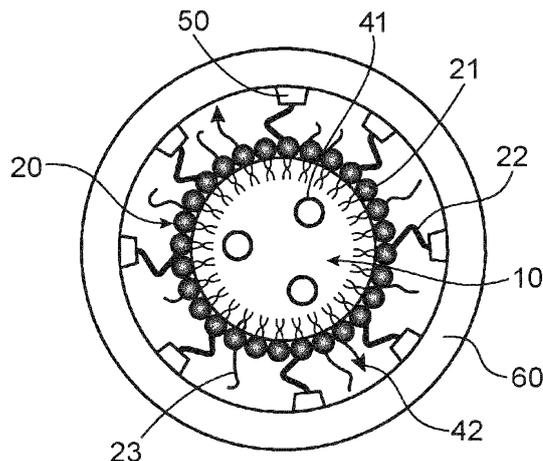
⑦2 Inventeur(s) : BOUTRY DELPHINE, ARNOULD AMANDINE, AUGER AURELIEN et TEXIER-NOGUES ISABELLE.

⑦3 Titulaire(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablissement public.

⑦4 Mandataire(s) : Ahner Philippe.

⑤4 **NANOPARTICULE LIPIDIQUE MARQUEE POUR POUVOIR ETRE OBSERVEE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.**

⑤7 Nanoparticule lipidique marquée pour pouvoir être observée par microscopie électronique en transmission, la nanoparticule lipidique comprenant un cœur (10) lipidique entouré d'une coquille lipidique (20), la coquille lipidique (20) comprenant au moins une couche de surfactants lipidiques amphiphiles (21), et des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) par un groupement S-H (50), la nanoparticule lipidique étant recouverte au moins localement par une couche métallique (60) liée aux groupements S-H (50) des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) via une liaison de coordination métallique.



FR 3 073 750 - A1



NANOPARTICULE LIPIDIQUE MARQUÉE POUR POUVOIR ÊTRE OBSERVÉE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE EN TRANSMISSION

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE ET ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

La présente invention se rapporte à une nanoparticule lipidique
5 marquée pour pouvoir être observée par microscopie électronique en transmission, à un
procédé de caractérisation de nanoparticules lipidiques, et à un procédé de marquage de
nanoparticules lipidiques.

Les nanoparticules lipidiques (ou LNP pour « Lipid NanoParticles ») sont
utilisées depuis de nombreuses années pour transporter des molécules d'intérêt, tel que
10 des principes actifs, ou des agents d'imagerie, dans le corps humain dans un but
thérapeutique ou pour réaliser des diagnostics.

Ces nanoparticules présentent une structure cœur-coquille, la coquille
comprenant majoritairement des surfactants lipidiques. Les lipides sont les éléments
constitutifs de la matière grasse qui compose tout être vivant. Ainsi, du fait de leur origine
15 physiologique, ils sont naturellement assimilables par le corps humain et donc
biocompatibles, biodégradables et non toxiques. Les nanoparticules lipidiques ont donc,
naturellement, la capacité de passer certaines barrières physico-chimiques du corps
humain et peuvent être acheminées jusqu'à leur site de destination sans être
préalablement dégradées ou assimilées. Elles permettent une libération contrôlée et/ou
20 prolongée des molécules d'intérêt au niveau de leur site d'action.

Il existe différents types de nanoparticules lipidiques.

Dans les années 80, des nanoparticules issues d'émulsions huile dans
eau (O/W) furent élaborées. Pour réaliser ces émulsions, des nanogouttelettes d'huile
sont dispersées dans une phase aqueuse, le tout étant stabilisé par un surfactant. Bien
25 que ce type de particule puisse solubiliser une large gamme de molécules lipophiles, leur
stabilité reste néanmoins très fragile dans le temps.

Un autre type de LNP correspond aux liposomes. Il s'agit de vésicules sphériques comprenant au moins une bicouche de phospholipides et un cœur aqueux. Leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs microns selon le type de liposomes synthétisés. Ce sont les premières particules lipidiques à avoir passé les
5 essais cliniques et donc à avoir été commercialisées dans le cadre de traitements par chimiothérapie de certains cancers, comme le cancer du sein. De par leur structure, des principes actifs aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes peuvent être respectivement encapsulés dans le cœur ou bien insérés dans la bicouche lipidique.

10 Finalement, récemment les recherches se sont tournées vers les nanoparticules lipidiques, comprenant une phase lipidique plus ou moins solide, entourée par une coquille monocouche comprenant, généralement, un surfactant lipidique amphiphile et un surfactant hydrophile. Ces nanoparticules lipidiques présentent une bonne stabilité dans le temps et sont des éléments de vectorisation très prometteurs, non seulement, pour la délivrance de médicaments et le diagnostic de cancers, mais aussi
15 dans le cadre de la thérapie génique ou cellulaire.

D'une manière générale, les LNP sont destinées à traverser différentes barrières du corps humain pour atteindre des zones cibles pour délivrer des médicaments ou diagnostiquer des maladies, et il est donc important de pouvoir caractériser leurs
20 tailles et leur dispersion mais aussi leur forme pour comprendre comment le principe actif va être internalisé dans les LNP.

Les LNP peuvent être caractérisées par microscopie électronique en transmission (MET ou TEM pour « Transmission Electron Microscopy »). Plusieurs techniques de caractérisation TEM existent : par voie sèche, avec ou sans coloration négative, par cryogénie, ou par voie liquide.

25 Pour observer les nanoparticules lipidiques au MET par voie sèche, une goutte d'échantillon contenant les LNP dispersées en solution est déposée sur une grille MET, après évaporation de la solution, il ne reste que les LNP. Sans coloration, les LNP sont généralement trop peu contrastées pour être observées, c'est pourquoi il faut avoir recours à la coloration négative. Classiquement, la coloration est réalisée avec de
30 l'acétate d'uranyle qui se dépose autour des LNP. C'est l'acétate d'uranyle qui est

observé. Cependant, comme représenté sur la figure 1A, avec une telle technique, on observe une agglomération des LNP. L'agglomération peut être due à l'étape de séchage de l'échantillon sur la grille et/ou à cause d'une agglomération naturelle des LNP. Il n'est pas possible de savoir à quel moment les LNP se sont agglomérées ni de déterminer leur dimension exacte. De plus, le colorant masque la structure cœur/coquille des LNP.

Il est également possible d'observer les LNP par microscopie cryogénique (figure 1B). Pour cela, une goutte d'échantillon est déposée sur la grille MET, l'excès de liquide est absorbé avec un papier filtre puis les LNP sont cryogénisées. La dispersion des LNP reste identique à celle en solution, mais elles sont, généralement, déformées, ce qui pourrait venir de l'étape de drainage lors de la préparation pour la surgélation. Il est donc impossible d'observer la forme et la taille réelle des LNP avec cette méthode.

La microscopie *in-situ* liquide semble être la voie la plus prometteuse. L'échantillon est observé directement à l'état liquide et ne nécessite pas de passer par une étape de changement de phase. Les particules ne sont pas déformées ni agglomérées suite à la préparation de l'échantillon. Cependant, comme les LNP sont composées d'éléments légers tels que l'oxygène et le carbone, leur observation par MET *in-situ* est quasiment impossible, à cause du manque de contraste électronique (figure 1C).

Afin d'améliorer le contraste, une solution consiste à fonctionnaliser les LNP de manière non covalente avec des nanoparticules d'or. Cependant, comme représenté sur la figure 1D, les nanoparticules d'or sont dispersées aléatoirement dans la solution et ne se positionnent pas forcément autour des LNP et peu de nanoparticules d'or se lient aux LNP. Par exemple, Xia et al. (« Construction of thermal- and light-responsive liposomes noncovalently decorated with gold nanoparticles » *RCS Adv.*, 2014, 4, 44568-44574) ont aussi réussi à fonctionnaliser de manière non covalente des liposomes avec des nanoparticules d'or. Cependant, une seule nanoparticule d'or fonctionnalise un liposome.

Une autre solution consiste à entourer le liposome d'un complexe d'or. Pour cela, Jin et al. (« Spectrally Tunable Leakage-Free Gold Nanocontainers », *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17774-17776) ont fonctionnalisé des liposomes avec de la

poly-L-histine (PLH). Les liposomes sont ensuite mis en présence d'une solution contenant des ions Au^{3+} , qui sont chélatés par la PLH à pH basique en présence d'un agent réducteur $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$. Cependant, les liaisons mises en jeu sont peu solides, ce qui rend la fonctionnalisation moins solide et moins stable dans le temps. De plus, le procédé met en jeu des conditions réactionnelles et/ou des réactifs, qui peuvent détériorer les LNP.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

C'est, par conséquent, un but de la présente invention de proposer des nanoparticules lipidiques marquées pouvant être facilement observées en microscopie électronique en transmission, le marquage devant être stable dans le temps.

Ce but est atteint par une nanoparticule lipidique marquée pour pouvoir être observée par microscopie électronique en transmission, la nanoparticule lipidique comprenant un cœur lipidique entouré d'une coquille lipidique, la coquille lipidique comprenant au moins une couche de surfactants lipidiques amphiphiles, et des surfactants hydrophiles fonctionnalisés par un groupement S-H, la nanoparticule lipidique étant recouverte au moins localement par une couche métallique liée aux groupements S-H des surfactants hydrophiles fonctionnalisés, via une liaison de coordination métallique.

L'invention se distingue fondamentalement de l'art antérieur par le marquage des nanoparticules lipidiques par un métal, via une liaison forte de coordination métallique. Ce marquage est stable et permet de visualiser facilement les nanoparticules en microscopie électronique en transmission (MET).

Avantageusement, la couche métallique est en or, en argent, en cuivre, en nickel, en cobalt, en iridium, ou en un mélange de ceux-ci. Ces éléments sont biocompatibles et/ou présentent un numéro atomique élevé afin d'avoir un meilleur contraste au MET.

Avantageusement, la couche métallique forme une couche continue autour des nanoparticules lipidiques. Le contour des nanoparticules lipidiques est plus visible.

Avantageusement, le cœur lipidique des nanoparticules lipidiques comprend une ou plusieurs molécules d'intérêt, tel qu'un principe actif, un agent d'imagerie ou un médicament.

5 Avantageusement, la couche comprend en outre des surfactants hydrophiles additionnels.

Avantageusement, des agents de ciblage sont greffés sur les surfactants hydrophiles additionnels et/ou sur les surfactants hydrophiles fonctionnalisés, les agents de ciblage étant, par exemple, des ligands biologiques de ciblage tels que des anticorps ou des peptides.

10 Avantageusement, les surfactants hydrophiles additionnels sont des polyéthylènes glycols et/ou les surfactants hydrophiles fonctionnalisés sont des polyéthylènes glycols fonctionnalisés.

15 Avantageusement, le cœur de la nanoparticule est un mélange d'une cire et d'une huile végétale, telle que l'huile de soja, et la coquille lipidique comprend une monocouche de phospholipides.

L'invention concerne également un procédé de caractérisation de nanoparticules lipidiques, comprenant les étapes successives suivantes :

- fourniture d'une solution aqueuse contenant des nanoparticules lipidiques marquées telles que définies précédemment,
- 20 - mise en place de la solution aqueuse dans une chambre d'observation d'un porte-objet de microscope électronique en transmission, et fermeture de la chambre d'observation,
- caractérisation des nanoparticules lipidiques marquées dans la solution aqueuse par microscopie électronique en transmission.

25 C'est un autre but de l'invention de proposer un procédé de marquage des nanoparticules lipidiques, efficace, peu coûteux, et ne détériorant pas les nanoparticules lipidiques.

30 Ce but est atteint par un procédé de marquage de nanoparticules lipidiques, pour obtenir des nanoparticules lipidiques telles que définies précédemment, comprenant les étapes successives suivantes :

a) fourniture d'une solution aqueuse comprenant des nanoparticules lipidiques, les nanoparticules lipidiques comprenant un cœur lipidique entouré d'une coquille lipidique, la coquille lipidique comprenant au moins une couche de surfactants lipidiques amphiphiles, et des surfactants hydrophiles fonctionnalisés par un groupement S-R avec R un groupe de protection de la fonction thiol,

b) ajout d'une molécule de déprotection à la solution aqueuse, de manière à déprotéger le groupement S-R pour obtenir des surfactants hydrophiles fonctionnalisés avec un groupement S-H,

c) dissolution d'un sel métallique dans la solution de manière à recouvrir au moins localement les nanoparticules lipidiques avec une couche métallique via une liaison de coordination métallique avec le groupement S-H des surfactants hydrophiles fonctionnalisés.

Le procédé utilisé est efficace, peu coûteux, avec des conditions réactionnelles douces, ce qui permet de préserver les nanoparticules lipidiques qui sont très sensibles à la température, au pH et aux produits chimiques.

Le procédé permet de marquer les nanoparticules lipidiques de manière stable sans modifier leurs tailles et/ou leurs compositions chimiques.

Avantageusement, le sel métallique est ajouté en excès par rapport au groupement S-H des surfactants hydrophiles fonctionnalisés de manière à former une couche métallique suffisamment épaisse et/ou recouvrant la plus grande surface de nanoparticules lipidiques.

Avantageusement, le sel métallique est un sel d'or, d'argent, de cuivre, de nickel, de cobalt, d'iridium ou un mélange de ces sels.

Avantageusement, la molécule de déprotection est du dithiothréitol. Ce composé est particulièrement réactif.

Avantageusement, la solution aqueuse fournie à l'étape a) est obtenue selon les étapes successives suivantes :

a1) préparation d'une phase huileuse comprenant un ou plusieurs composés lipidiques pour former le cœur lipidique des nanoparticules lipidiques, et les surfactants lipidiques amphiphiles,

a2) préparation d'une phase aqueuse,
a3) dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse, par exemple sous l'action d'un cisaillement, telle que par sonification, pour former des nanoparticules lipidiques,

5 les surfactants hydrophiles fonctionnalisés par un groupement S-R étant ajoutés lors de l'étape a2) ou a3).

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

La présente invention sera mieux comprise sur la base de la description qui va suivre et des dessins en annexe sur lesquels:

10 - les figures 1A à 1D, précédemment décrites, sont des clichés obtenus par microscopie électronique en transmission correspondant à des échantillons de nanoparticules lipidiques, selon l'art antérieur,

- la figure 2 est une représentation schématique, en coupe, d'une nanoparticule lipidique marquée selon un premier mode de réalisation de l'invention,

15 - la figure 3 est une représentation schématique, en coupe, d'une nanoparticule lipidique marquée selon un deuxième mode de réalisation de l'invention,

- la figure 4 représente un schéma réactionnel du procédé de marquage d'une nanoparticule lipidique selon un mode de réalisation particulier de l'invention,

20 - la figure 5 est un cliché obtenu au microscope électronique en transmission d'un échantillon de nanoparticules lipidiques marquées avec de l'or selon l'invention, observées en voie sèche,

- la figure 6 est un cliché obtenu au microscope électronique en transmission d'un échantillon de nanoparticules lipidiques marquées avec de l'or selon l'invention, observées en cryogénie,

25 - la figure 7 est un cliché obtenu au microscope électronique en transmission d'un échantillon de nanoparticules lipidiques marquées avec de l'or selon l'invention, observées in situ en voie liquide,

- la figure 8 est un cliché obtenu au microscope électronique en transmission d'un échantillon de nanoparticules lipidiques marquées avec de l'argent selon l'invention, observées en cryogénie,

5 - la figure 9 est un cliché obtenu au microscope électronique en transmission d'un échantillon de nanoparticules lipidiques marquées avec de l'argent selon l'invention, observées in situ en voie liquide.

Les différentes parties représentées sur les figures ne le sont pas nécessairement selon une échelle uniforme, pour rendre les figures plus lisibles.

10 Les différentes possibilités (variantes et modes de réalisation) doivent être comprises comme n'étant pas exclusives les unes des autres et pouvant se combiner entre elles.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

Nanoparticules lipidiques marquées :

15 Comme représenté sur les figures 2 et 3, les nanoparticules lipidiques (ou LNPs « Lipid NanoParticles ») marquées ont une structure cœur-coquille.

Cœur des nanoparticules lipidiques :

Le cœur 10 des nanoparticules lipidiques est un cœur lipidique.

20 Par un cœur lipidique, on entend un cœur comprenant un ou plusieurs lipides, c'est-à-dire des corps gras ou des substances contenant des acides gras (i.e. des acides carboxyliques aliphatiques ayant une chaîne carbonée d'au moins 4 atomes de carbone, par exemple de 4 à 28 atomes de carbone) provenant des graisses d'origine animale et/ou des huiles d'origine végétale. Ce sont des molécules hydrophobes ou
25 amphiphiles formées principalement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Les huiles peuvent être choisies parmi les huiles biocompatibles, et en particulier parmi les huiles d'origine naturelle (végétale ou animale) ou synthétique. Les huiles d'origine naturelle végétale sont, par exemple, les huiles de soja, de lin, de palme, d'arachide, d'olives, de pépin de raisins et de tournesol. Les huiles synthétiques sont, par exemple, les

triglycérides, di glycérides et les mono glycérides. Le ou les lipides du cœur 10 présentent, de préférence, une affinité avec le surfactant lipidique amphiphile pour permettre sa solubilisation.

5 Les lipides peuvent être à l'état solide à température ambiante (25°C), comme dans les cires, et/ou à l'état liquide comme dans le cas des huiles. Le cœur 10 lipidique peut donc être plus ou moins solide.

Il existe quatre variantes de nanoparticules ayant un cœur lipidique. Pour ces quatre variantes, la coquille 20 est une monocouche de lipides amphiphiles 21 (figures 2 et 3).

10 Selon une première variante, la phase lipidique du cœur 10 est solide à température ambiante. La phase lipidique peut comprendre des cires et/ou des glycérides. Ce type de nanoparticule lipidique est appelé une nanoparticule lipidique solide (SLN « Solid Lipid Nanoparticle »).

15 Selon une deuxième variante, le cœur 10 de la particule comprend un mélange de lipides solides et de lipides liquides à température ambiante. Avec une telle structure, le cœur de la nanoparticule reste solide mais il a une structure amorphe ou cristalline imparfaite (polycristallin). Ainsi, les molécules d'intérêt peuvent s'insérer plus librement entre les chaînes de lipides solides. Ce type de nanoparticule lipidique est un transporteur lipidique nanostructuré (NLC « Nanostructured Lipid Carrier »).

20 Selon une troisième variante, une molécule d'intérêt (principe actif) hydrophile est conjuguée à un lipide insoluble dans l'eau. Ce composé lipidique est appelée un conjugué lipide - principe actif (LDC « Lipid-Drug Conjugate ») et peut-être mélangé avec d'autres lipides pour former le cœur 10 des nanoparticules.

25 Selon une quatrième variante, le cœur 10 comprend une huile liquide ou semi-liquide et une coquille de lipides solides à température ambiante. La nanoparticule lipidique est appelée une nanocapsule lipidique (LNC).

30 Comme représenté sur la figure 3, des molécules d'intérêt 41, peuvent être encapsulées dans le cœur 10 des nanoparticules lipidiques. Par molécule d'intérêt 41, on entend un agent thérapeutique ou de diagnostic. Il peut s'agir d'un principe actif agissant par voie chimique, biologique ou physique, ou encore d'un agent d'imagerie

notamment pour l'IRM (imagerie par résonance magnétique), le PET (en anglais « Positron Emission Tomography »), le SPECT (« Single Photon Emission Computed Tomography »), l'échographie ultrasonore, la radiographie, la tomographie X et l'imagerie optique (fluorescence, bioluminescence, diffusion...).

5

Coquille des nanoparticules lipidiques :

Le cœur 10 des nanoparticules lipidiques est enrobé dans une coquille lipidique 20. La coquille lipidique comprend des surfactants lipidiques amphiphiles 21, des surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22 par un groupement S-H et éventuellement des surfactants hydrophiles additionnels 23.

10

Par surfactant lipidique amphiphile 21, on entend des composés ayant une structure, conférant une affinité spécifique pour les interfaces huile/eau et eau/huile, ce qui permet de réduire l'énergie libre de ces interfaces et de stabiliser les systèmes dispersés. Le surfactant lipide amphiphile est, par exemple, un phospholipide, un cholestérol, un lysolipide, ou un glucolipide.

15

Par phospholipide, on entend des lipides ayant un groupe phosphate, en particulier des phosphoglycérides. Le plus souvent, les phospholipides comprennent une extrémité hydrophile formée par le groupe phosphate éventuellement substitué et deux extrémités hydrophobes formées par des chaînes d'acides gras. A titre illustratif, on peut citer la phosphatidylcholine (aussi appelée lécithine), le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline. Par exemple, la lécithine est un lipide formé à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras.

20

Par surfactant hydrophile, on entend une molécule permettant d'abaisser l'énergie de l'interface eau/huile et d'assurer une meilleure dispersion des nanoparticules lipidiques dans la phase aqueuse. Le surfactant hydrophile est, de préférence, alkoxylés et comportent, de préférence, au moins une chaîne composée de motifs d'oxyde d'éthylène (PEO ou PEG) ou d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène.

25

Les surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22 de la LNP marquées ont un groupement S-H. Il s'agit, de préférence, de PEG fonctionnalisés.

30

Comme représenté sur les figures 2 et 3, la coquille 20 peut comprendre, en outre des surfactants hydrophiles additionnels 23.

Selon un mode de réalisation particulier, tout ou au moins une partie des surfactants hydrophiles additionnels 23 peut posséder une fonction réactive, telle qu'un groupe maléimide, amine, ester, oxyamine ou aldéhyde. La présence de fonctions réactives permet le greffage de composés fonctionnels.

Les surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22 peuvent être intercalés entre les surfactants hydrophiles additionnels 23.

Comme représenté sur les figures 2 et 3, la coquille 20 peut éventuellement être fonctionnalisée avec des agents de ciblage 42. Les agents de ciblage peuvent être fixés à la surface des nanoparticules, par adsorption ou par liaison covalente, par exemple au niveau des surfactants hydrophiles additionnels 23 et/ou au niveau des surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22. Les surfactants hydrophiles 22 et/ou 23 peuvent jouer le rôle d'espaceur pour éloigner les agents de ciblage du cœur de la nanoparticule lipidique et les rendre plus accessibles. A titre illustratif, les agents de ciblage 42 peuvent être choisis parmi : des ligands biologiques de ciblage, pour permettre une reconnaissance spécifique de certaines cellules ou de certains organes, tels que des anticorps, des peptides, des saccharides, des aptamères, des oligonucléotides ou des composés comme l'acide folique ; un agent de furtivité pour conférer à la nanoparticule lipidique une furtivité vis-à-vis du système immunitaire, ce qui permet d'augmenter son temps de circulation dans l'organisme, et de ralentir son élimination.

Les nanoparticules lipidiques ont, par exemple, un diamètre allant de 10 nm à 500 nm, et de préférence de 30 à 300 nm.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la nanoparticule lipidique est un LipidotTM, c'est-à-dire une structure comprenant :

- un cœur lipidique, mélange de mono-, di- et triglycérides à longues chaînes carbonées (typiquement une chaîne carbonée en C₆-C₂₂, plus particulièrement C₁₆-C₁₈), le mélange étant par exemple, un mélange d'une cire et d'une huile végétale telle que l'huile de soja, le cœur lipidique pouvant comprendre, en outre, une molécule d'intérêt 41 à délivrer dans le corps,

- une coquille 20 comprenant une monocouche de phospholides 21, par exemple de la lécithine de soja (aussi connu sous la dénomination commerciale Lécithine S75), conjugués, de préférence, à des surfactants PEGylés 23, tel que le stéarate de PEG2000, aussi connu sous le nom commercial Myrj s40, et des surfactants PEGylés fonctionnalisés 22, avec un groupement S-H.

Des surfactants PEGylés 23 tel que Myrj s50 ou Myrj s100 pourraient également être utilisés.

De préférence, les Lipidot™ ont un diamètre allant de 30 nm à 120 nm.

10 Marquage métallique des nanoparticules lipidiques :

Comme représenté sur les figures 2 et 3, les nanoparticules lipidiques sont recouvertes par une couche métallique 60. La couche 60 forme une couche continue ou discontinue autour des nanoparticules lipidiques.

Par discontinue, on entend qu'elle peut être localisée uniquement au niveau des groupements S-H, ou encore au niveau des groupements S-H et entre certains groupements S-H (figure 2).

Par continue, on entend que la couche métallique externe 60 recouvre complètement la nanoparticule lipidique (figure 3).

Le marquage des nanoparticules est un marquage fort via une liaison de coordination métallique du type S-M, avec M un métal.

La couche métallique 60 est en or, en argent, en cuivre, en nickel, en cobalt, en iridium ou en un mélange de ceux-ci

De préférence, elle est continue et en or ou en argent.

Le marquage métallique de nanoparticules lipidiques, en plus de faciliter leur caractérisation, peut trouver des applications thérapeutiques notamment en ce qui concerne la photo-thermique (destruction de cellules tumorales par irradiation des nanoparticules greffées, en tenant compte de l'épaisseur de la couche métallique 60 pour la longueur d'onde d'irradiation).

Procédé de caractérisation au TEM des nanoparticules lipidiques

marquées :

Pour caractériser au TEM les nanoparticules lipidiques, un échantillon de la solution de nanoparticules lipidiques marquées telles que définies précédemment est prélevé.

L'échantillon est, par exemple, placé dans un porte-objet. Le porte-objet comprend une chambre d'observation, de préférence étanche, destinée à recevoir l'échantillon liquide. La chambre d'observation comprend deux faces principales, parallèles entre elles, destinées à être traversée par le faisceau d'électrons et une face latérale fermant la chambre d'observation. Les faces principales sont par exemple deux plaques en SiN. La face latérale a, par exemple, une épaisseur allant de 50nm à 1µm. La chambre peut comprendre un système fluide permettant de faire circuler un fluide à travers la chambre. Le procédé de marquage peut également être réalisé dans la chambre du porte-objet. La formation de la couche métallique externe peut ainsi être suivie au TEM.

Les LNP marquées peuvent ensuite être caractérisées in situ par voie liquide. Les observations TEM montrent que les nanoparticules marquées selon l'invention sont bien visibles au TEM en voie liquide.

Procédé de préparation des nanoparticules lipidiques :

Nous allons maintenant décrire le procédé de préparation de nanoparticules lipidiques. Il s'agit d'un procédé de préparation d'une nanoémulsion, comprenant une phase aqueuse continue et au moins une phase huileuse dispersée.

Les transporteurs lipidiques solides (SLN), les transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC), et les nanoparticules lipidiques LNC peuvent être synthétisés soit par ultrasons pour de petites quantités soit par homogénéisation haute pression (HPH) pour des quantités industrielles.

Les nanocapsules lipidiques (LNC) peuvent aussi être synthétisées selon un procédé d'inversion de phase avec la température (PIT) ou par ultrasons.

Nous allons décrire plus particulièrement le procédé de préparation d'une solution par sonication.

Le procédé comporte les étapes successives suivantes :

5 a1) préparation d'une phase huileuse comprenant le ou les composés lipidiques du cœur 10 lipidique, le surfactant lipidique amphiphile 21, éventuellement les molécules d'intérêt 41,

a2) préparation d'une phase aqueuse comprenant éventuellement les surfactants hydrophiles additionnels 23,

10 a3) dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse, par exemple sous l'action d'un cisaillement, telle que par sonification, pour former des nanoparticules lipidiques ayant un cœur 10 lipidique entouré d'une coquille 20 lipidique.

Les surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22 peuvent être ajoutés lors de l'étape a2) ou a3).

15 Lors de l'étape a1), le mélange peut éventuellement être facilité par mise en solution d'un des constituants ou du mélange complet dans un solvant organique approprié. Le solvant organique est ensuite évaporé, pour obtenir un mélange huileux homogène. Avantageusement, l'étape a1) est réalisée à une température à laquelle l'ensemble des différents composés est liquide.

20 La phase aqueuse, préparée à l'étape a2), comprend, par exemple, de l'eau et/ou un tampon tel qu'un tampon phosphate, comme le PBS (« Phosphate Buffer Saline ») ou une solution saline, par exemple du chlorure de sodium. La phase aqueuse pourrait également comporter un agent épaississant, comme du glycérol, un saccharide, un polysaccharide ou une protéine. On choisira de préférence une solution aqueuse non saline pour éviter la précipitation des sels lors de la caractérisation TEM.

25 Le procédé peut comporter une étape dans laquelle des agents de ciblage sont greffés sur les surfactants hydrophiles 23 ou sur les surfactants hydrophiles additionnels 22. Le couplage peut être réalisé avant ou après l'émulsification (avant ou après l'étape a3). De préférence, le pH lors de la réaction de couplage est compris entre 5 et 11, et de préférence entre 6 et 8.

Avantageusement, lors de l'étape a3), la phase huileuse est dispersée dans la phase aqueuse à l'état liquide. Il est préférable de réaliser le mélange à une température supérieure ou égale à la température de fusion des différents réactifs.

La proportion de phase huileuse et de phase aqueuse est très variable.

5 On pourra choisir de 1 à 50%, de préférence de 5 à 40% en poids de phase huileuse et de 50 à 99%, et de préférence de 60 à 95% en poids de phase aqueuse.

L'émulsification est, de préférence, réalisée à l'aide d'un sonificateur ou d'un microfluidiseur. De préférence, la phase aqueuse puis la phase huileuse sont introduites dans les proportions souhaitées dans un récipient cylindrique approprié puis
10 le sonificateur est plongé dans le milieu et mis en marche pendant une durée suffisante pour obtenir une nanoémulsion, le plus souvent quelques minutes. L'émulsion est ensuite purifiée par dialyse à l'aide membranes, typiquement avec un seuil de coupure de plus de 10 kDaltons (par ex membrane Roth Zellu Trans 12-14 kDa). On obtient alors une nanoémulsion homogène dans laquelle le diamètre moyen des gouttelettes d'huile va de
15 10 nm à 500 nm, et de préférence de 30 à 300 nm.

La nanoémulsion peut ensuite être conditionnée. Avant son conditionnement, la nanoémulsion peut être diluée et/ou stérilisée, par exemple par filtration et/ou dialyse. Cette étape permet d'éliminer les éventuels agrégats qui pourraient s'être formés au cours de la préparation de l'émulsion. L'émulsion ainsi
20 obtenue est prête à l'emploi, le cas échéant après dilution.

Procédé de marquage des nanoparticules lipidiques :

Le procédé de marquage des nanoparticules lipidiques, en vue de leur caractérisation par microscopie électronique à balayage, va maintenant être décrit. Il est
25 représenté schématiquement sur la figure 4. Le procédé de marquage comprend les étapes successives suivantes :

a) fourniture d'une solution aqueuse comprenant des nanoparticules lipidiques, les nanoparticules lipidiques comprenant un cœur 10 lipidique entouré d'une
20 coquille lipidique, la coquille lipidique comprenant des surfactants lipidiques amphiphiles 21, éventuellement des surfactants hydrophiles 23, et des surfactants
30

hydrophiles fonctionnalisés 22 par un groupement S-R avec R un groupement de protection de la fonction thiol,

5 b) déprotection de la fonction S-R, par ajout d'une molécule de déprotection, ayant, par exemple, une fonction thiol, à la solution aqueuse, de manière à obtenir des surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22 avec un groupement S-H 50,

c) dissolution d'un sel métallique dans la solution de manière à recouvrir au moins localement les nanoparticules lipidiques avec une couche métallique 60, liée via des liaisons de coordination métallique aux groupements S-H 50 des surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22.

10 De préférence, le groupement de protection de la fonction thiol S-R est choisi parmi la Spyridine, et un groupe triphénylméthyl, aussi appelé trityl, i.e. $C(C_6H_5)_3$.

Préférentiellement, S-R correspond au groupement S-Spyridine. Par exemple, le surfactant hydrophile fonctionnalisé 23 est un PEG ayant d'un côté une chaîne acide stéarique et de l'autre la fonction S-Spyridine, c'est-à-dire une thiopyridine. 15 Le groupe R protège le thiol du surfactant hydrophile fonctionnalisé 23. On choisira, de préférence, pour R la Spyridine, qui peut être facilement retirée par réaction avec une molécule fonctionnalisée avec un thiol. Le groupement de protection de la fonction thiol S-R est positionné, de préférence en bout de la chaîne du PEG.

De préférence, la molécule ayant une fonction thiol est du dithiothréitol.

20 Par sel métallique, on entend un ou plusieurs sels métalliques du même métal et/ou un plusieurs sels de métaux différents. De préférence, le sel métallique est un sel d'or, d'argent, de cuivre, de nickel, de cobalt, ou d'iridium.

De préférence, le sel métallique est ajouté en excès par rapport au groupement S-H 50. On choisira par exemple un excès de 30 équivalents maximum soit 25 3000%.

Exemples illustratifs et non limitatifs de modes de réalisation particuliers :

Nanoparticules lipidiques (LNP) et leur synthèse-

Le cœur lipidique 10 des LNP comprend 75% en poids de lipide solide (glycérides semi-synthétiques, vendue sous la dénomination commerciale Suppocire® NC 30 (Gattefossé)) et 25% en poids de lipide liquide (huile de soja, enrichie à 75 % de

phosphatidylcholine, vendue par la société Lipoid sous la dénomination commerciale Lipoid® S75)).

5 La coquille 20 comprend une monocouche de surfactants hydrophiles additionnels 23 (PEG) et de surfactants lipidiques amphiphiles 21 (lécithine) qui stabilise le cœur des LNP. La coquille comprend en outre des PEG fonctionnalisés 22 par des groupements S-Spyridine, intercalés entre les PEG hydrophiles additionnels 23.

A titre illustratif, les poids des différents réactifs utilisés sont : mélange eau/PBS : 1220mg, lipides internes (cœur) : 410mg, lécithine : 50mg, et PEG : 300mg.

10 Pour préparer les LNP, on mélange une phase huileuse, contenant les lipides formant le cœur lipidique et les surfactants lipidiques amphiphiles 21, avec une phase aqueuse, contenant les surfactants hydrophiles 23, et les surfactants hydrophiles fonctionnalisés 22. Après homogénéisation à 45°C, le mélange est soumis à une étape de sonification à 45°C, avec un sonificateur AV505[®] équipé d'une sonde conique de 3mm de diamètre (Sonics, Newtown).

15 L'émulsion obtenue peut être dialysée avec une membrane de dialyse de manière à éliminer les réactifs n'ayant pas réagi.

Déprotection du groupements S-R des nanoparticules lipidiques et formation d'un groupement S-H :

20 Afin de pouvoir fonctionnaliser de manière forte les LNP avec un métal, il faut déprotéger les fonctions thiol (SH) des LNP, c'est-à-dire casser le pont disulfure de la S-Spyridine greffée sur celles-ci. Pour cela, on utilise du DTT (Dithiothréitol) à hauteur de 20 équivalents que l'on ajoute directement dans une membrane de dialyse dans laquelle on a mis au préalable les LNP. Le solvant utilisé pour la dialyse est de l'eau
25 ultrapure. La dialyse dure environ 24h et l'eau doit être changée le plus souvent possible afin d'éliminer le groupe SPyridine et le DTT en excès.

Marquage des nanoparticules lipidiques par de l'or via une liaison de coordination métallique :

Les lots de LNP comprennent $3,55 \cdot 10^{14}$ particules/mL. On prélève 400 μ L de LNP à l'aide d'une micropipette, ce qui représente $1,42 \cdot 10^{14}$ particules. Sachant qu'il y a environ 1300 groupes thiol par particule, on a $1,85 \cdot 10^{17}$ groupements SH dans les 400 μ L prélevés, soit $3,07 \cdot 10^{-7}$ moles de SH.

On ajoute 1,2 mg de sel de chlorure d'or ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, n°CAS : 16961-25-4, M=393,83 g/mol). Le sel est en excès de 10% par rapport au nombre de moles de SH.

La réaction est réalisée dans un tube Eppendorf. On laisse réagir pendant 24h. Le tout est ensuite mis à dialyser pendant une durée de 24h.

Caractérisation des nanoparticules lipidiques par microscopie électronique en transmission :

Les LNP marqués ont été récupérées et observées en TEM en voie sèche, sans coloration négative, en cryogénie et en in-situ liquide.

Il apparaît qu'en voie sèche (figure 5), les LNP marquées avec de l'or sont peu ou pas visibles. Les particules sont peut-être encore trop sensibles pour être observées une fois séchées. La même tendance se retrouve par voie cryogénique (figure 6) : les particules sont visibles mais déformées.

Les LNP ayant une couche métallique en or sont bien visibles lorsqu'elles sont observées en TEM in-situ liquide (figure 7). Les contrastes obtenus ont été comparés avec des LNP greffées avec des nanoparticules d'or, stabilisées dans du citrate. Les contrastes avec une coquille sont supérieurs à ceux obtenus avec les nanoparticules d'or. L'amélioration du contraste peut être due à un meilleur greffage des ions or sur les thiols et/ou à une quantité d'or plus importante.

Les résultats ont été comparés avec des LNP comprenant des PEG dépourvus de groupements S-R. Il a été confirmé que le greffage de l'or sur ces LNP n'a pas fonctionné. Aucune LNP n'est observable au TEM avec cet échantillon. On peut seulement voir des particules d'or.

Marquage des nanoparticules lipidiques par de l'argent via une liaison de coordination métallique et observation par microscopie électronique en transmission :

Dans cet exemple, 0,52mg de sel de nitrate d'argent (AgNO_3 , n°CAS : 7761-88-8, M= 169,87 g/mol) a été ajouté aux LNP dans un tube Eppendorf, ce qui

5 représente un excès de 10% molaire.

L'ensemble est laissé à réagir pendant 24h, puis une dialyse est réalisée pendant 22h.

Les LNP marqués sont récupérés et observés en TEM en cryogénie (figure 8) et en in-situ liquide (figure 9). Les LNP ne sont pas caractérisables par

10 cryogénie, seules les nanoparticules d'argent sont visibles. Les LNP marquées sont, en revanche, particulièrement bien visibles lorsqu'elles sont observées en TEM in-situ liquide.

REVENDICATIONS

1. Nanoparticule lipidique marquée pour pouvoir être observée par microscopie électronique en transmission, la nanoparticule lipidique comprenant un cœur (10) lipidique entouré d'une coquille lipidique (20), la coquille lipidique (20) comprenant au moins une couche de surfactants lipidiques amphiphiles (21), et des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) par un groupement S-H (50), la nanoparticule lipidique étant recouverte au moins localement par une couche métallique (60) liée aux groupements S-H (50) des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) via une liaison de coordination métallique.

2. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la couche métallique (60) est en or, en argent, en cuivre, en nickel, en cobalt, en iridium ou en un mélange de ceux-ci.

3. Nanoparticule selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la couche métallique (60) forme une couche continue autour des nanoparticules lipidiques.

4. Nanoparticule selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le cœur lipidique des nanoparticules lipidiques comprend une ou plusieurs molécules d'intérêt (41), tel qu'un principe actif, un agent d'imagerie ou un médicament.

5. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la coquille (20) comprend en outre des surfactants hydrophiles additionnels (23).

6. Nanoparticule selon la revendication précédente, caractérisée en ce que des agents de ciblage (42) sont greffés sur les surfactants hydrophiles additionnels (23) et/ou sur les surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22), les agents de ciblage (42)

étant, par exemple, des ligands biologiques de ciblage tels que des anticorps ou des peptides.

5 7. Nanoparticule selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce que les surfactants hydrophiles additionnels (23) sont des polyéthylènes glycols et/ou en ce que les surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) sont des polyéthylènes glycols fonctionnalisés.

10 8. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le cœur (10) de la nanoparticule est un mélange d'une cire et d'une huile végétale, telle que l'huile de soja, et en ce que la coquille lipidique (20) comprend une monocouche de phospholipides (21).

15 9. Procédé de caractérisation de nanoparticules lipidiques, comprenant les étapes successive suivantes :

- fourniture d'une solution aqueuse contenant des nanoparticules lipidiques marquées telles que définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 8,
- mise en place de la solution aqueuse dans une chambre d'observation d'un porte-objet de microscope électronique en transmission, et fermeture
20 de la chambre d'observation,
- caractérisation des nanoparticules lipidiques marquées dans la solution aqueuse par microscopie électronique en transmission.

25 10. Procédé de marquage de nanoparticules lipidiques, pour obtenir des nanoparticules lipidiques telles que définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, comprenant les étapes successives suivantes :

- a) fourniture d'une solution aqueuse comprenant des nanoparticules lipidiques, les nanoparticules lipidiques comprenant un cœur (10) lipidique entouré d'une coquille lipidique (20), la coquille lipidique (20) comprenant au moins une couche de

surfactants lipidiques amphiphiles (21), et des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) par un groupement S-R avec R un groupement de protection de la fonction thiol,

b) ajout d'une molécule de déprotection à la solution aqueuse, de manière à déprotéger le groupement S-R pour obtenir des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) avec un groupement S-H (50),

c) dissolution d'un sel métallique dans la solution de manière à recouvrir au moins localement les nanoparticules lipidiques avec une couche métallique (60) via une liaison de coordination métallique avec le groupement S-H (50) des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22).

10

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le sel métallique est ajouté en excès par rapport au groupement S-H des surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22).

15

12. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que le sel métallique est un sel d'or, d'argent, de cuivre, de nickel, de cobalt, d'iridium ou un mélange de ces sels.

20

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la molécule de déprotection est du dithiothréitol.

25

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que la solution aqueuse fournie à l'étape a) est obtenue selon les étapes successive suivantes :

a1) préparation d'une phase huileuse comprenant un ou plusieurs composés lipidiques pour former le cœur lipidique (10) des nanoparticules lipidiques, et les surfactants lipidiques amphiphiles (21),

a2) préparation d'une phase aqueuse,

a3) dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse, par exemple sous l'action d'un cisaillement, telle que par sonication, pour former des nanoparticules lipidiques,

les surfactants hydrophiles fonctionnalisés (22) par un groupement S-R, étant ajoutés lors de l'étape a2) ou a3).

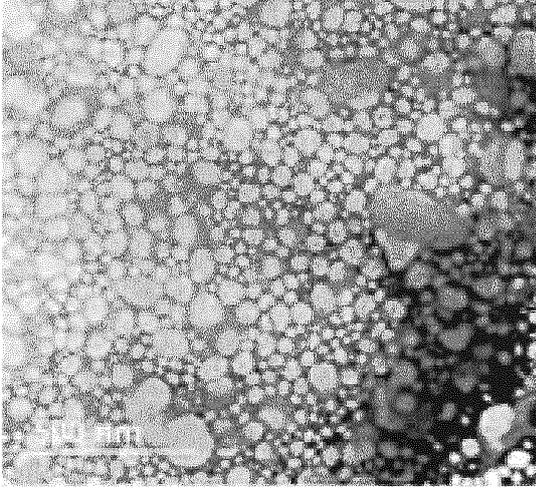


FIG.1A

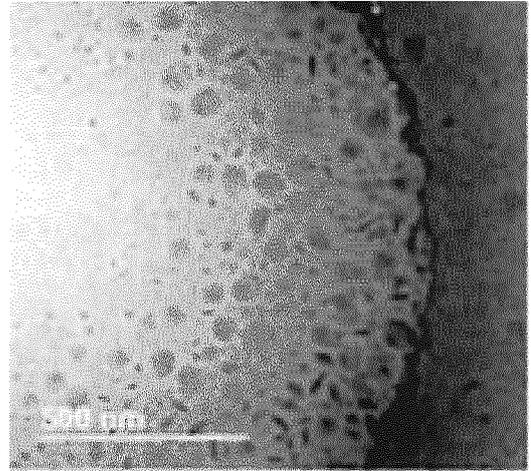


FIG.1B

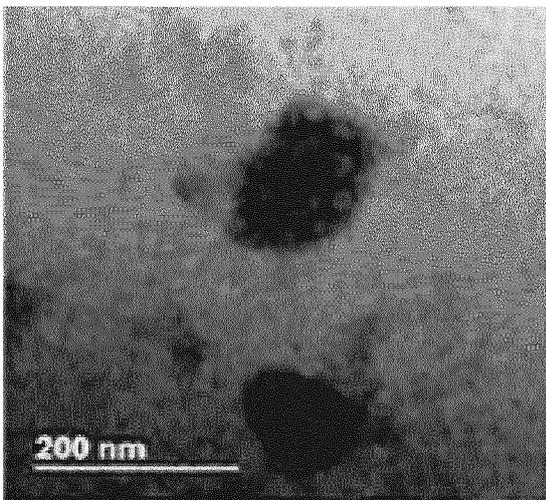


FIG.1C

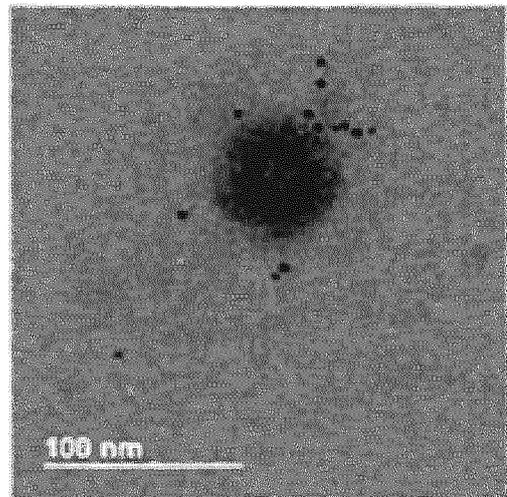


FIG.1D

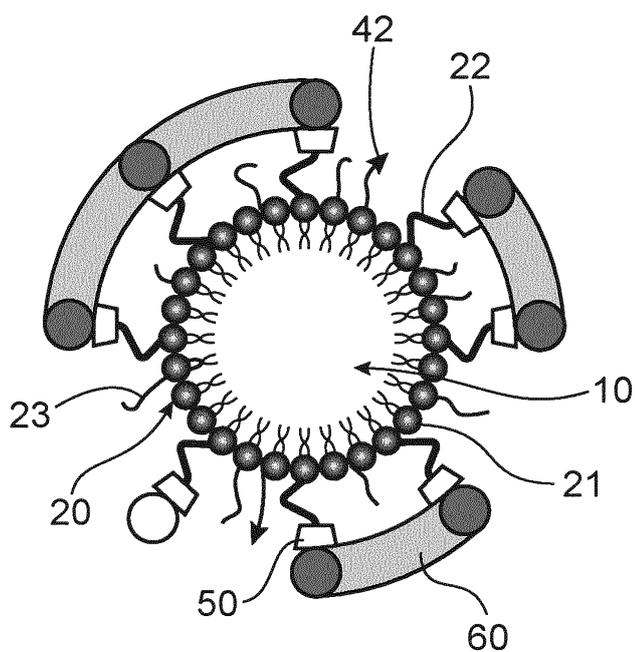


FIG. 2

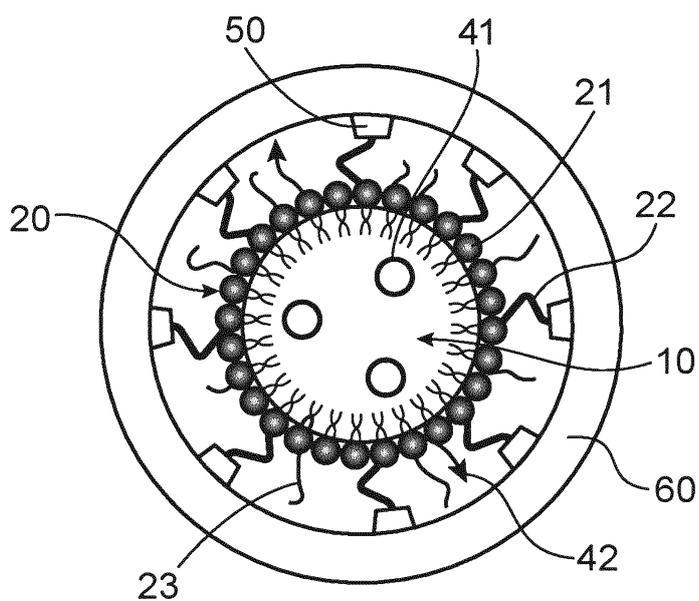


FIG. 3

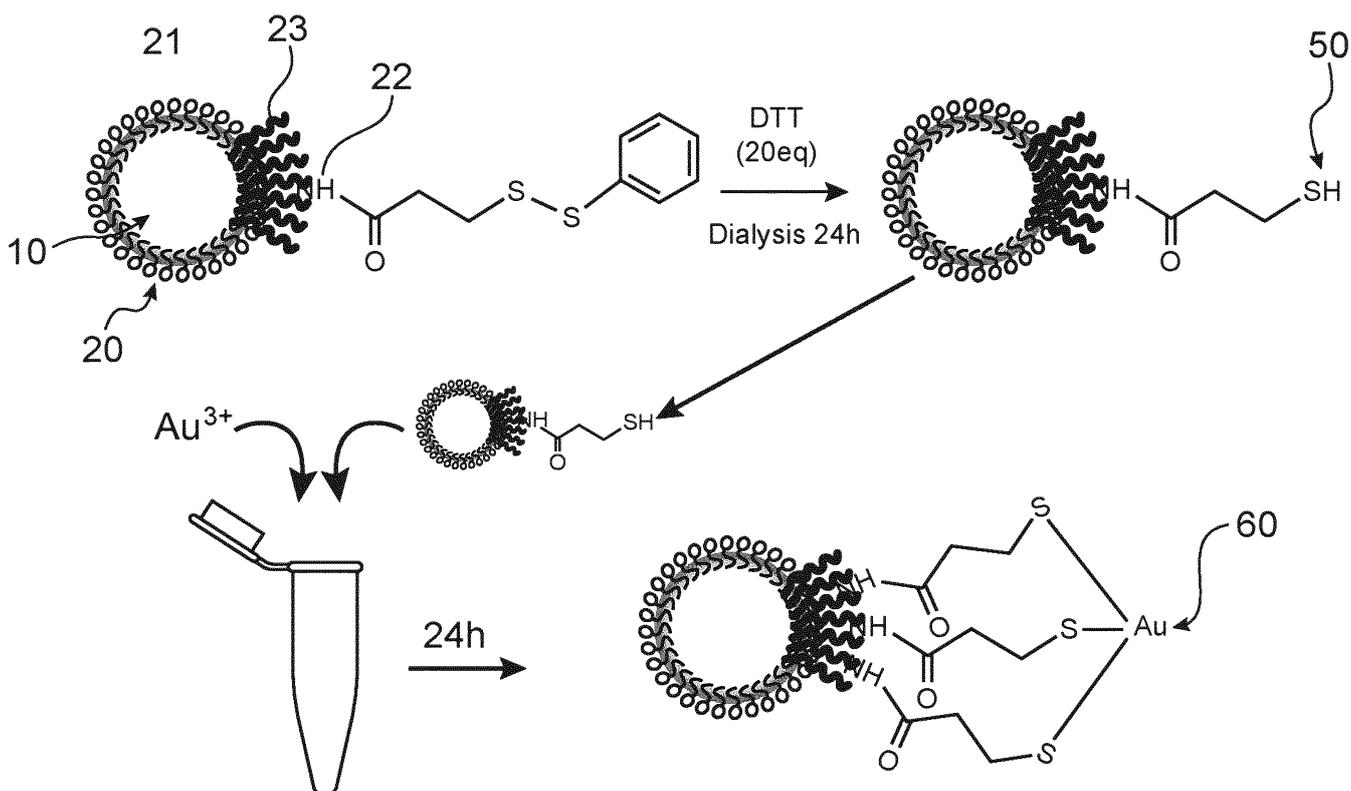


FIG. 4

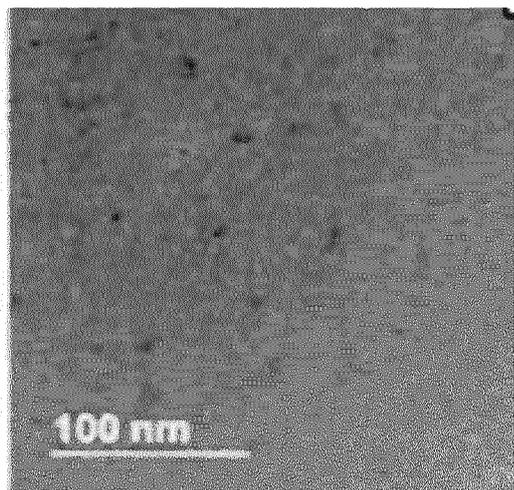


FIG.5

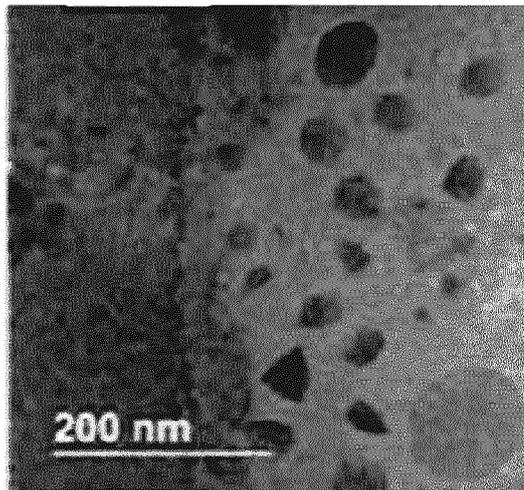


FIG.6

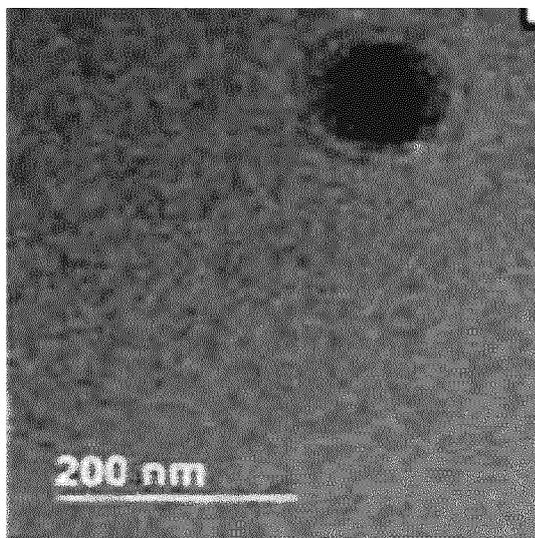


FIG.7

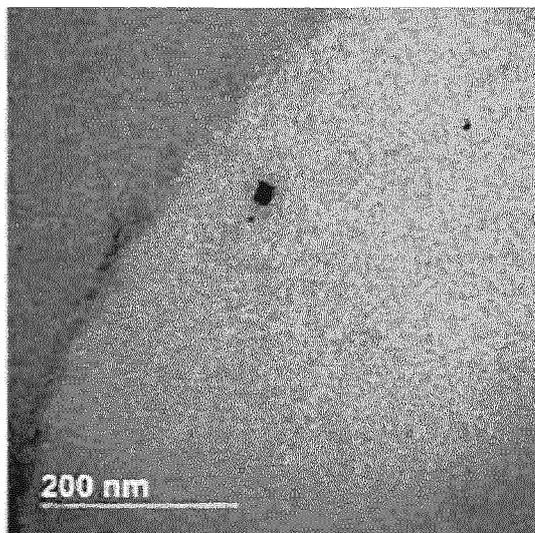
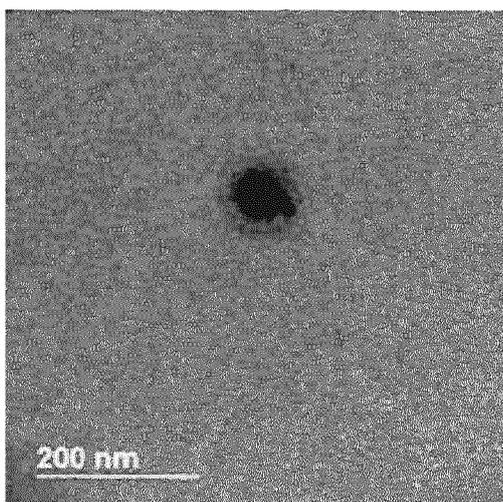


FIG.8

FIG.9





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 847660
FR 1761030

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	KARUTHA PANDIAN DIVYA ET AL: "Supported binary liposome vesicle-gold nanoparticle for enhanced label free DNA and protein sensing", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol. 95, 20 avril 2017 (2017-04-20), pages 168-173, XP055476063, NL ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/j.bios.2017.04.022	1,2	B01J13/02 A61K49/18 B82Y40/00 B82Y15/00 B82Y5/00
A	* abstract; parts 2.1 to 2.3; Figure 2 * -----	9,10	
X	JP 2008 039692 A (CANON KK) 21 février 2008 (2008-02-21)	1-8	
A	* alinéas [0001], [0003] - [0005], [0018], [0020], [0023], [0043] - [0054]; revendications 1, 3-5, 7; figures 1(a), 1(b) * -----	9,10	
X	US 2013/217037 A1 (BRISSEON ALAIN [FR] ET AL) 22 août 2013 (2013-08-22)	1,2	
A	* alinéas [0001], [0097], [0119], [0120], [0134] - [0136]; figure 7 * -----	9,10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	US 4 429 008 A (MARTIN FRANK J [US] ET AL) 31 janvier 1984 (1984-01-31) * colonne 1 lignes 6-15; revendication 1 * -----	1,2	B01J G01N A61K B82Y
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 mai 2018		Fauché, Yann	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 847660
FR 1761030

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	Nanoprobes ET AL: "Gold Labeling for Cryoelectron Microscopy and Electron Tomography", 1 février 2011 (2011-02-01), XP055476072, Extrait de l'Internet: URL:http://www.immunosource.com/media/gold_labeling_for_cryoelectron_microscopy.pdf [extrait le 2018-05-17] * le document en entier *	1,2	
A	Amandine Arnould: "CHARACTERIZATION OF NANO CARRIERS FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS: THE LIPIDOTS", Nanosafe Conference 2016, 11 novembre 2016 (2016-11-11), XP055475747, Grenoble, France Extrait de l'Internet: URL:http://www.cea.fr/cea-tech/pns/nanosafe/en/Documents/Session%205.3/PS5.3-2.pdf [extrait le 2018-05-16] * le document en entier *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 mai 2018		Fauché, Yann	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1761030 FA 847660**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **17-05-2018**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 2008039692 A	21-02-2008	JP 5196749 B2 JP 2008039692 A	15-05-2013 21-02-2008

US 2013217037 A1	22-08-2013	CA 2650008 A1 EP 2018559 A1 US 2009098574 A1 US 2013217037 A1 WO 2007122259 A1	01-11-2007 28-01-2009 16-04-2009 22-08-2013 01-11-2007

US 4429008 A	31-01-1984	CA 1197190 A EP 0097691 A1 US 4429008 A WO 8302069 A1	26-11-1985 11-01-1984 31-01-1984 23-06-1983
