

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2015

THESE N°: 01

**LES SYSTÈMES VECTORISÉS NANOPARTICULAIRE  
ET PLACE DES LIPOSOMES  
DANS LE TRAITEMENT ANTICANCÉREUX**

THESE

*Présentée et soutenue publiquement le : .....*

**PAR**

**Mlle. Hind NAJI**

*Née le 22 Juillet 1990 à Rabat*

**Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie**

**MOTS CLES:** Cancer – Système de vectorisation – Nanoparticules – Liposome.

**JURY**

<b>Mr. M. ZOUHDI</b> Professeur de Microbiologie		<b>PRESIDENT</b>
<b>Mr. A. LAATIRIS</b> Professeur de Pharmacie Galénique		<b>RAPPORTEUR</b>
<b>Mme. S. TELLAL</b> Professeur de Biochimie	}	<b>JUGES</b>
<b>Mme. S. HAMZAOUI</b> Professeur de Microbiologie		
<b>Mr. A. BELMEKKI</b> Professeur d'Hématologie		

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا  
إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ



UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT

**DOYENS HONORAIRES :**

**1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ**

1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

**ADMINISTRATION :**

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI  
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes  
Professeur Mohammed AHALLAT  
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération  
Professeur Taoufiq DAKKA  
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie  
Professeur Jamal TAOUFIK  
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS  
ET  
PHARMACIENS**

**PROFESSEURS :**

**Mai et Octobre 1981**

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-vasculaire  
Pr. TAOBANE Hamid\* Chirurgie Thoracique

**Mai et Novembre 1982**

Pr. BENOSMAN Abdellatif C3irurgie Thoracique

**Novembre 1983**

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

**Décembre 1984**

Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne  
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation  
Pr. SETTAF Abdellatif Chirurgie

**Novembre et Décembre 1985**

Pr. BENJELLOUN Halima Cardiologie  
Pr. BENSaid Younes Pathologie Chirurgicale  
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa Neurologie

**Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. AJANA Ali Radiologie  
Pr. CHAHED OUAZZANI Houria Gastro-entérologie  
Pr. EL YAACOUBI Moradh Traumatologie Orthopédie  
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah Gastro-entérologie  
Pr. LACHKAR Hassan Médecine Interne  
Pr. YAHYAOUI Mohamed Neurologie



**Décembre 1988**

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib  
Pr. DAFIRI Rachida  
Pr. HERMAS Mohamed

Chirurgie Pédiatrique  
Radiologie  
Traumatologie Orthopédie

**Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990**

Pr. ADNAOUI Mohamed  
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali\*  
Pr. CHAD Bouziane  
Pr. CHKOFF Rachid  
Pr. HACHIM Mohammed\*  
Pr. KHARBACH Aïcha  
Pr. MANSOURI Fatima  
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda  
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne  
Cardiologie  
Pathologie Chirurgicale  
Pathologie Chirurgicale  
Médecine-Interne  
Gynécologie -Obstétrique  
Anatomie-Pathologique  
Neurologie  
Anesthésie Réanimation

**Février Avril Juillet et Décembre 1991**

Pr. AL HAMANY Zaïtounia  
Pr. AZZOUZI Abderrahim  
Pr. BAYAHIA Rabéa  
Pr. BELKOUCHI Abdelkader  
Pr. BENABDELLAH Chahrazad  
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif  
Pr. BENSOUA Yahia  
Pr. BERRAHO Amina  
Pr. BEZZAD Rachid  
Pr. CHABRAOUI Layachi  
Pr. CHERRAH Yahia  
Pr. CHOKAIRI Omar  
Pr. JANATI Idrissi Mohamed\*  
Pr. KHATTAB Mohamed  
Pr. SOULAYMANI Rachida  
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chirurgie Générale  
Hématologie  
Chirurgie Générale  
Pharmacie galénique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Biochimie et Chimie  
Pharmacologie  
Histologie Embryologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Pharmacologie  
Chimie thérapeutique

**Décembre 1992**Chirurgie Générale

Pr. BENSOUA Adil  
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib  
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBI Chafiq  
Pr. DAOUDI Rajae  
Pr. DEHAYNI Mohamed\*  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad  
Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. OUAZZANI Taïbi Med Charaf Eddine  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Gastro-entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Gynécologie Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Microbiologie



### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid  
Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. EL AOUAD Rajae  
Pr. EL BARDOUNI Ahmed  
Pr. EL HASSANI My Rachid  
Pr. ERROUGANI Abdelkader  
Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. HADRI Larbi\*  
Pr. HASSAM Badredine  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. JELTHI Ahmed  
Pr. MAHFOUD Mustapha  
Pr. MOUDENE Ahmed\*  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. ABDELHAK M'barek  
Pr. BELAIDI Halima  
Pr. BRAHMI Rida Slimane  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHAMI Ilham  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. EL ABBADI Najia  
Pr. HANINE Ahmed\*  
Pr. JALIL Abdelouahed  
Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. CHAARI Jilali\*  
Pr. DIMOU M'barek\*  
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine\*  
Pr. EL MESNAOUI Abbes  
Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*

Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Gynécologie Obstétrique  
Immunologie  
Traumato-Orthopédie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Médecine Interne  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Anatomie Pathologique  
Traumatologie – Orthopédie  
Traumatologie- Orthopédie  
Gynécologie –Obstétrique  
Dermatologie

Urologie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Neurologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Gynécologie – Obstétrique  
Traumatologie – Orthopédie  
Radiologie  
Ophtalmologie  
Neurochirurgie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-rhino-laryngologie  
Cardiologie



Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. MANSOURI Aziz\*  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

**Décembre 1996**

Pr. AMIL Touriya\*  
Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan  
Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. MAHFOUDI M'barek\*  
Pr. MOHAMMADI Mohamed  
Pr. OUADGHIRI Mohamed  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

**Novembre 1997**

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BEN SLIMANE Lounis  
Pr. BIROUK Nazha  
Pr. CHAOUIR Souad\*  
Pr. ERREIMI Naima  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra  
Pr. HAIMEUR Charki\*  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. OUAHABI Hamid\*  
Pr. TAOUFIQ Jallal  
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

**Novembre 1998**

Pr. AFIFI RAJAA  
Pr. BENOMAR ALI  
Pr. BOUGTAB Abdesslam  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. EZZAITOUNI Fatima  
Pr. LAZRAK Khalid \*  
Pr. BENKIRANE Majid\*  
Pr. KHATOURI ALI\*  
Pr. LABRAIMI Ahmed\*

**Janvier 2000**

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer

Urologie  
Radiothérapie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Traumatologie-Orthopédie  
Néphrologie  
Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique  
Urologie  
Neurologie  
Radiologie  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Radiologie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Neurologie  
Psychiatrie  
Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie  
Neurologie  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Néphrologie  
Traumatologie Orthopédie  
Hématologie  
Cardiologie  
Anatomie Pathologique

Pneumo-phtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Chirurgie Générale



Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. EL OTMANY Azzedine  
Pr. ISMAILI Mohamed Hatim  
Pr. ISMAILI Hassane\*  
Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss  
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

**Novembre 2000**

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AIT OURHROUI Mohamed  
Pr. AJANA Fatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. HSSAIDA Rachid\*  
Pr. LAHLOU Abdou  
Pr. MAFTAH Mohamed\*  
Pr. MAHASSINI Najat  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
Pr. NASSIH Mohamed\*  
Pr. ROUIMI Abdelhadi\*

**Décembre 2000**

Pr. ZOHAIR ABDELAH\*

**Décembre 2001**

Pr. ABABOU Adil  
Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BELMEKKI Mohammed  
Pr. BENABDELJLIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOUACHANE Thami  
Pr. BENYOUSSEF Khalil  
Pr. BERRADA Rachid  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. DRISSI Sidi Mourad\*

Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Traumatologie Orthopédie  
Gastro-entérologie  
Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine

Interne

Neurologie  
Dermatologie  
Gastro-entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Anesthésie-Réanimation  
Traumatologie Orthopédie  
Neurochirurgie  
Anatomie Pathologique  
Pédiatrie  
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie

ORL

Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Ophtalmologie  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Dermatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Radiologie



Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL MOUSSAIF Hamid  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Saïd  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. GOURINDA Hassan  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABBAJ Saad  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

**Décembre 2002**

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOU Youssef \*  
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
Pr. BENZEKRI Laila  
Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
Pr. BERNOUSSI Zakiya  
Pr. BICRA Mohamed Zakariya\*  
Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
Pr. CHKIRATE Bouchra  
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
Pr. EL BARNOUSSI Leila  
Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
Pr. EL MANSARI Omar\*  
Pr. ES-SADEL Abdelhamid  
Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
Pr. HADDOUR Leila  
Pr. HAJJI Zakia  
Pr. IKEN Ali  
Pr. ISMAEL Farid  
Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
Pr. KRIOUILE Yamina  
Pr. LAGHMARI Mina  
Pr. MABROUK Hfid\*

Anesthésie-Réanimation  
Neurochirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Neurochirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Médecine Interne  
Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Dermatologie  
Gastro-entérologie  
Anatomie Pathologique  
Psychiatrie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Chirurgie Pédiatrique  
Gynécologie Obstétrique  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Ophtalmologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Traumatologie Orthopédie



Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid\*  
 Pr. NAITLHO Abdelhamid\*  
 Pr. OUIJALAL Abdelilah  
 Pr. RACHID Khalid \*  
 Pr. RAISS Mohamed  
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
 Pr. RHOU Hakima  
 Pr. SIAH Samir \*  
 Pr. THIMOU Amal  
 Pr. ZENTAR Aziz\*

**Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
 Pr. AMRANI Mariam  
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
 Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
 Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
 Pr. BOULAADAS Malik  
 Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
 Pr. CHAGAR Belkacem\*  
 Pr. CHERRADI Nadia  
 Pr. EL FENNI Jamal\*  
 Pr. EL HANCHI ZAKI  
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*  
 Pr. HACHI Hafid  
 Pr. JABOUIRIK Fatima  
 Pr. KHABOUZE Samira  
 Pr. KHARMAZ Mohamed  
 Pr. LEZREK Mohammed\*  
 Pr. MOUGHIL Said  
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
 Pr. TARIB Abdelilah\*  
 Pr. TIJAMI Fouad  
 Pr. ZARZUR Jamila

**Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*  
 Pr. ALAOUY Ahmed Essaid  
 Pr. ALLALI Fadoua  
 Pr. AMAZOUZI Abdellah  
 Pr. AZIZ Nouredine\*  
 Pr. BAHIRI Rachid  
 Pr. BARKAT Amina  
 Pr. BENHALIMA Hanane  
 Pr. BENYASS Aatif  
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani  
 Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed

Gynécologie Obstétrique  
 Cardiologie  
 Médecine Interne  
 Oto-rhino-laryngologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Chirurgie Générale  
 Pneumo-phtisiologie  
 Néphrologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Pédiatrie  
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie  
 Anatomie Pathologique  
 Oto-rhino-laryngologie  
 Gastro-entérologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
 Neurologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Anatomie Pathologique  
 Radiologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Pédiatrie  
 Cardiologie  
 Chirurgie Générale  
 Pédiatrie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Traumatologie Orthopédie  
 Urologie  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Ophtalmologie  
 Pharmacie Clinique  
 Chirurgie Générale  
 Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie  
 Rhumatologie  
 Ophtalmologie  
 Radiologie  
 Rhumatologie  
 Pédiatrie  
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale  
 Cardiologie  
 Ophtalmologie  
 Ophtalmologie



Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. EL HAMZAOUI Sakina\*  
Pr. HAJJI Leila  
Pr. HESSISSEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. NIAMANE Radouane\*  
Pr. RAGALA Abdelhak  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najia

**Décembre 2005**

Pr. CHANI Mohamed

**Avril 2006**

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. AKJOUJ Said\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal  
Pr. ESSAMRI Wafaa  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. GHADOUANE Mohammed\*  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Biophysique  
Microbiologie  
Cardiologie (mise en disposition)  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Rhumatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Gastro-entérologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Urologie  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie



## **Octobre 2007**

Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
Pr. ACHOUR Abdessamad*	Chirurgie générale
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*	Chirurgie cardio vasculaire
Pr. AMHAJJI Larbi*	Traumatologie orthopédie
Pr. AMMAR Haddou*	ORL
Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
Pr. BAITE Abdelouahed*	Anesthésie réanimation
Pr. BALOUCH Lhoussaine*	Biochimie-chimie
Pr. BENZIANE Hamid*	Pharmacie clinique
Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophthalmologie
Pr. CHARKAOUI Naoual*	Pharmacie galénique
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*	Chirurgie générale
Pr. ELABSI Mohamed	Chirurgie générale
Pr. EL BEKKALI Youssef*	Chirurgie cardio vasculaire
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
Pr. GANA Rachid	Neurochirurgie
Pr. GHARIB Nouredine	Chirurgie plastique et réparatrice
Pr. HADADI Khalid*	Radiothérapie
Pr. ICHOU Mohamed*	Oncologie médicale
Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*	Anesthésie réanimation
Pr. LOUZI Lhoussain*	Microbiologie
Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
Pr. MAHI Mohamed*	Radiologie
Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie
Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid	Anesthésier réanimation
Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
Pr. MRABET Mustapha*	Médecine préventive santé publique et hygiène
Pr. MRANI Saad*	Virologie
Pr. OUZZIF Ez zohra*	Biochimie-chimie
Pr. RABHI Monsef*	Médecine interne
Pr. RADOUANE Bouchaib*	Radiologie
Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
Pr. SEKHSOKH Yessine*	Microbiologie
Pr. SIFAT Hassan*	Radiothérapie
Pr. TABERKANET Mustafa*	Chirurgie vasculaire périphérique
Pr. TACHFOUTI Samira	Ophthalmologie
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*	Chirurgie générale
Pr. TANANE Mansour*	Traumatologie orthopédie
Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie



**Décembre 2007**

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

**Décembre 2008**

Pr ZOUBIR Mohamed\*

Pr TAHIRI My El Hassan\*

**Mars 2009**

Pr. ABOUZAHIR Ali\*

Pr. AGDR Aomar\*

Pr. AIT ALI Abdelmounaim\*

Pr. AIT BENHADDOU El hachmia

Pr. AKHADDAR Ali\*

Pr. ALLALI Nazik

Pr. AMAHZOUNE Brahim\*

Pr. AMINE Bouchra

Pr. ARKHA Yassir

Pr. AZENDOUR Hicham\*

Pr. BELYAMANI Lahcen\*

Pr. BJIJOU Younes

Pr. BOUHSAIN Sanae\*

Pr. BOUI Mohammed\*

Pr. BOUNAIM Ahmed\*

Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*

Pr. CHAKOUR Mohammed \*

Pr. CHTATA Hassan Toufik\*

Pr. DOGHMI Kamal\*

Pr. EL MALKI Hadj Omar

Pr. EL OUENNASS Mostapha\*

Pr. ENNIBI Khalid\*

Pr. FATHI Khalid

Pr. HASSIKOU Hasna \*

Pr. KABBAJ Nawal

Pr. KABIRI Meryem

Pr. KADI Said \*

Pr. KARBOUBI Lamyia

Pr. L'KASSIMI Hachemi\*

Pr. LAMSAOURI Jamal\*

Pr. MARMADE Lahcen

Pr. MESKINI Toufik

Pr. MESSAOUDI Nezha \*

Pr. MSSROURI Rahal

Pr. NASSAR Ittimade

Pr. OUKERRAJ Latifa

Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*

Pr. ZOUHAIR Said\*

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

Médecine interne

Pédiatrie

Chirurgie Générale

Neurologie

Neurochirurgie

Radiologie

Chirurgie Cardio-vasculaire

Rhumatologie

Neurochirurgie

Anesthésie Réanimation

Anesthésie Réanimation

Anatomie

Biochimie-chimie

Dermatologie

Chirurgie Générale

Traumatologie orthopédique

Hématologie biologique

Chirurgie vasculaire périphérique

Hématologie clinique

Chirurgie Générale

Microbiologie

Médecine interne

Gynécologie obstétrique

Rhumatologie

Gastro-entérologie

Pédiatrie

Traumatologie orthopédique

Pédiatrie

Microbiologie

Chimie Thérapeutique

Chirurgie Cardio-vasculaire

Pédiatrie

Hématologie biologique

Chirurgie Générale

Radiologie

Cardiologie

Pneumo-phtisiologie

Microbiologie



## **PROFESSEURS AGREGES :**

### **Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
Pr. BELAGUID Abdelaziz  
Pr. BOUAITY Brahim\*  
Pr. CHADLI Mariama\*  
Pr. CHEMSI Mohamed\*  
Pr. DAMI Abdellah\*  
Pr. DARBI Abdellatif\*  
Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
Pr. EL HAFIDI Naima  
Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
Pr. EL MAZOUZ Samir  
Pr. EL SAYEGH Hachem  
Pr. ERRABIH Ikram  
Pr. LAMALMI Najat  
Pr. LEZREK Mounir  
Pr. MALIH Mohamed\*  
Pr. MOSADIK Ahlam  
Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation  
Médecine interne  
Physiologie  
ORL  
Microbiologie  
Médecine aéronautique  
Biochimie chimie  
Radiologie  
Chirurgie pédiatrique  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie plastique et réparatrice  
Urologie  
Gastro entérologie  
Anatomie pathologique  
Ophtalmologie  
Pédiatrie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie générale  
Hématologie  
Anatomie pathologique

### **Mai 2012**

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. BELAIZI Mohamed\*  
Pr. BENCHEBBA Drissi\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Psychiatrie  
Traumatologie Orthopédique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie pathologique  
Psychiatrie  
Cardiologie

### **Février 2013**

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOUR Mourad  
Pr. AWAB Almahdi  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
Pr. BENSEFFAJ Nadia  
Pr. BENSNGHIR Mustapha\*

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie  
Informatique Pharmaceutique  
Immunologie  
Anesthésie Réanimation



Pr. BENYAHIA Mohammed*	Néphrologie
Pr. BOUATIA Mustapha	Chimie Analytique
Pr. BOUABID Ahmed Salim*	Traumatologie Orthopédie
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba	Anatomie
Pr. CHAIB Ali*	Cardiologie
Pr. DENDANE Tarek	Réanimation Médicale
Pr. DINI Nouzha*	Pédiatrie
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali	Anesthésie Réanimation
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa	Radiologie
Pr. ELFATEMI Nizare	Neurochirurgie
Pr. EL HARTI Jaouad	Chimie Thérapeutique
Pr. EL JOUDI Rachid*	Toxicologie
Pr. EL KABABRI Maria	Pédiatrie
Pr. EL KHANNOUSSI Basma	Anatomie Pathologie
Pr. EL KHLOUFI Samir	Anatomie
Pr. EL KORAICHI Alae	Anesthésie Réanimation
Pr. EN-NOUALI Hassane*	Radiologie
Pr. ERREGUIG Laila	Physiologie
Pr. FIKRI Meryim	Radiologie
Pr. GHANIMI Zineb	Pédiatrie
Pr. GHFIR Imade	Médecine Nucléaire
Pr. IMANE Zineb	Pédiatrie
Pr. IRAQI Hind	Endocrinologie et maladies métaboliques
Pr. KABBAJ Hakima	Microbiologie
Pr. KADIRI Mohamed*	Psychiatrie
Pr. LATIB Rachida	Radiologie
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra	Médecine Interne
Pr. MEDDAH Bouchra	Pharmacologie
Pr. MELHAOUI Adyl	Oncologie Médicale
Pr. NEJJARI Rachid	Pharmacognosie
Pr. OUBEJJA Houda	Chirurgie Pédiatrique
Pr. OUKABLI Mohamed*	Anatomie Pathologique
Pr. RAHALI Younes	Pharmacie Galénique
Pr. RATBI Ilham	Génétique
Pr. RAHMANI Mounia	Neurologie
Pr. REDA Karim*	Ophtalmologie
Pr. REGRAGUI Wafa	Neurologie
Pr. RKAIN Hanan	Physiologie
Pr. ROSTOM Samira	Rhumatologie
Pr. ROUAS Lamiaa	Anatomie Pathologique
Pr. ROUIBAA Fedoua*	Gastro-entérologie
Pr. SALIHOUN Mouna	Gastro-entérologie
Pr. SAYAH Rochde	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. SEDDIK Hassan*	Gastro-entérologie
Pr. ZERHOUNI Hicham	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ZINE Ali*	Traumatologie Orthopédie
<b>Avril 2013</b>	
Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Pr. GHOUNDALE Omar*	Urologie
Pr. ZYANI Mohammad*	Médecine Interne



*\*Enseignants Militaires*

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES  
 PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chim
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique



Mise à jour le 13/02/2014 par le

Service des Ressources Humaines



*Dédicaces*

*A ma chère mère*

*ELLAMI Saadia*

*Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier  
à sa juste valeur l'être qui a consacré sa vie à parfaire  
notre éducation avec un dévouement inégal associé à beaucoup de sacrifice.*

*Vous vous êtes investi à me transmettre le sens de la responsabilité,  
de la persévérance et de la droiture.*

*Merveilleuse maman j'espère que j'ai été à la hauteur de vos espérances.*

*Que ce modeste travail soit un début de mes récompenses envers vous.*

*Puisse Dieu vous garder longtemps auprès de nous et vous bénir infiniment.*



*A mon cher père*

*NAJI ELMUSTAPHA*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime,  
le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit  
pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis  
pour mon éducation et ma formation.*



*A ma sœur, et mon frère*

*Kawtar et Oussama*

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour  
et mon attachement.*

*Puisse nos fraternels liens se pérenniser et se consolider à jamais.  
Qu'il me soit permis aujourd'hui de vous assurer ma profonde et infinie  
reconnaissance.*

*J'implore DIEU qu'il vous apporte bonheur, amour  
et que vos rêves se réalisent.*



*A ma chère tante*

*Zahia Ellami*

*Aucun mot ne pourra exprimer tout l'amour et le respect  
que j'éprouve pour toi, en te remerciant pour ton soutien  
et tes prières qui m'ont toujours apporté force morale et affective lors des  
épreuves difficiles de mes études.*

*Puisse Dieu le tout puissant t'accorder bonne santé,  
prospérité et bonheur.*

*A La Memoire De Ma Grande Mere Maternelle :*

*Tu nous as quitté le 06/03/2014 mais ton souvenir reste ancré dans ma mémoire.  
Tu n'es pas avec moi maintenant pour partager la réalisation de mon rêve mais ce  
qui est clair c'est que sur les chemins de la vie, on y est qu'un instant... mais  
dans mon cœur tu y seras toujours présente. Que ton âme repose en paix,*

*A tous les membres des deux familles*

*NAJI & ELLAMI*

*petits et grands*

*Je vous dédie ce travail en témoignage  
de mon amour et mon attachement.*



*A mes chères ami(e)s et collègues*

*Rabab Boudaoui, Zakaria Laanibi, Abderhman Elayari, Mohamed Shaimi,  
Fouad Bounouira, Kawtar Ayyad, Leila Benghdefa, Soukaina Ellouzi, Hanane  
Bamohamed, Lamyae Berrada, Anass Rami .....*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous  
exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des  
frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.*

*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de  
tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie  
ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de réussite.*

*A tous ceux qui me sont trop chers  
et que j'ai omis de citer.*

*A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin  
à l'élaboration de ce travail.*

*A tous les professeurs auprès de qui j'ai eu l'honneur  
d'apprendre.*



# *Remerciements*

*A notre maître et Président de thèse  
Monsieur le professeur M. ZOUHDI  
Professeur de Microbiologie à la faculté  
de médecine et de  
Pharmacie de rabat*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites  
en acceptant la présidence de notre jury de thèse.  
Vous nous avez accueillis avec beaucoup de gentillesse et d'égard.  
Vos compétences, vos qualités humaines et la richesse  
de votre enseignement  
n'ont jamais cessé de susciter en nous l'admiration  
la plus profonde.  
Veuillez croire, cher maître à notre estime  
et notre respectueuse considération.*

*A notre maître et Rapporteur de thèse  
Monsieur le professeur A. LAATIRIS  
Professeur de pharmacie galénique à la faculté de médecine  
et de pharmacie de Rabat*

*Votre compétence, votre droiture et votre simplicité  
sont autant de qualité qui font de vous quelqu'un d'exceptionnel.*

*Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail  
et de veiller à son élaboration en ne ménageant  
ni votre temps ni vos conseils.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste  
valeur nos vifs remerciements..*

*A notre maître et juge de thèse  
Madame le professeur S. TELLAL  
Professeur de biochimie à la faculté de médecine  
et de pharmacie de Rabat*

*Vous nous avez honorés d'accepter avec grande  
sympathie de siéger parmi notre jury de thèse.  
Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos  
vifs remerciements.*

*A NOTRE maître et juge de thèse*  
*Madame le Professeur S. ELHAMZAOUI*  
*Professeur de Microbiologie*

*Vous avez accepté en toute simplicité de juger ce travail  
et c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger  
parmi notre jury de thèse.*

*Nos remerciements les plus sincères en hommage  
à votre sympathie, votre pédagogie et votre disponibilité.*

*Permettez-nous de vous présenter dans ce travail,  
le témoignage de notre profond respect.*

*A notre maître, et juge de thèse:*  
*Monsieur le Professeur A. BELMEKKI*  
*Professeur d'Hématologie*

*Nous sommes très émus par la spontanéité avec laquelle  
vous avez accepté de juger notre travail, et très honoré  
par votre présence parmi notre jury de thèse.*

*Nous vous remercions pour l'intérêt que vous  
avez manifesté pour notre travail.*

*Nous avons apprécié votre sympathie et vos qualités humaines.  
C'est pour nous l'occasion de vous témoigner estime et respect.  
Trouvez ici, le témoignage de notre profonde et sincère gratitude.*

A decorative border with a red, marbled, and floral pattern surrounds the text.

## *Liste des illustrations*

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABV</b>	: Adriblastine Bléomycine Vinblastine
<b>ACE</b>	: Antigène carcino-embryonnaire
<b>ACTH</b>	: Hormone adénocorticotrope
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>Ag</b>	: Antigène
<b>ANSM</b>	: Agence nationale de sécurité du médicament
<b>AUC</b>	: Aire sous la courbe
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>As</b>	: Arsenic
<b>ATP</b>	: Adénine triphosphate
<b>Bad</b>	: Bcl 2- antagonist of cell death
<b>Bak</b>	: Bcl 2- antagonist killer
<b>BALT</b>	: Tissu Lymphoïde associé aux bronches
<b>Bax</b>	: Bcl 2- associated x protein
<b>Bcl-w</b>	: B- cell- lymphoma protein
<b>Bcl-xl</b>	: B- cell- lymphoma protein
<b>Bcr-abl</b>	: Breakpoint cluster region Abelson
<b>Bid</b>	: Interacting domain death agonist
<b>CCFM</b>	: Concentration Critique pour Formation de Micelles
<b>Cd</b>	: Cadmium
<b>Cdk</b>	: cycline dépendante de kinase
<b>CMC</b>	: Concentration Micellaire Critique
<b>CPA</b>	: Cyclophosphamide
<b>DLS</b>	: Dynamic Light Scattering
<b>DOPC</b>	: dioleatephosphatidylcholine
<b>DOPE</b>	: dioleyphosphatidylethanolamine

<b>DOTMA</b>	: dioleoyloxypropyl-trimethylammonium
<b>DPPG</b>	: dipalmitate phosphatidylglycérol
<b>E-CDK 2</b>	: cyclin E dependant kinase
<b>ECG</b>	: Electrocardiogramme
<b>EGFR/ebf B</b>	: Epidermal Growth Factor / erythroblastic leukemia oncogene homolog 2
<b>EPP</b>	: Erythrodysesthésie Palmo-plantaire
<b>EPR</b>	: Enhanced Permeability and Retention
<b>ERO</b>	: Espèces Reactives de l'Oxygène
<b>FGF1et 2</b>	: Fibroblast Growth Factor
<b>GST</b>	: Gènes Suppresseurs de Tumeurs
<b>HEMA</b>	: Hydroxyethyl de methacrylate
<b>HER 2/neu</b>	: Human Epidermal growth factor Receptor
<b>HDL</b>	: High Density Lipoprotein
<b>HpD</b>	: Hematoporphirin Derivatives
<b>IGF1et 2</b>	: Insulin Growth Factor
<b>In</b>	: Indium
<b>IL</b>	: Interleukine
<b>IRM</b>	: Imagerie par Résonance Magnétique
<b>IV</b>	: Intraveineuse
<b>LCR</b>	: Liquide Céphalo-rachidien
<b>LDL</b>	: Low Density Lipoprotein
<b>LUV</b>	: unilamellar vesicles
<b>MALT</b>	: Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
<b>MBP</b>	: Mannose Binding Protein
<b>MDR</b>	: Multidrug resistance
<b>MEPG</b>	: methoxypolyéthylène glycol
<b>MET</b>	: Microscope électronique à transmission
<b>MLV</b>	: Multilamellar vesicles

<b>MPS</b>	: Système Phagocytaire Mononucléaire
<b>MWCNT</b>	: Multi Wall Carbone Nanotube
<b>ND</b>	: Nanodiamants
<b>nm</b>	: nanomètre
<b>NP</b>	: Nanoparticule
<b>NTC</b>	: Nanotubes de carbone
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oxygène moléculaire
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Oxygène singulet
<b>ODC</b>	: Ornithine Décarboxylase
<b>P</b>	: Phosphore
<b>PA</b>	: Principe actif
<b>PACA</b>	: Polyalkylcyanoacrylate
<b>PAMAM</b>	: dendrimère de polyamidoamide
<b>PDI</b>	: Polydispersity Index
<b>PDT</b>	: Thérapie Photodynamique
<b>PEG</b>	: Polyéthylène glycol
<b>PEO</b>	: Oxyde de polyéthylène
<b>PHCA</b>	: Polyhexylcyanoacrylate
<b>P-gp</b>	: P- glycoprotein
<b>PLA</b>	: Polyacide Lactique
<b>PLGA</b>	: Polyacide Lactique coglycolique
<b>PS</b>	: Photosensibilisateur
<b>Psi</b>	: pound-force per square inch
<b>RAF</b>	: Récepteur de l'acide folique
<b>RES</b>	: Système réticulo-endothélial
<b>Se</b>	: Selenium
<b>SK</b>	: Sarcome de Kaposi
<b>SNC</b>	: Système nerveux central

<b>SPIO</b>	: SuperParamagnetic Iron Oxyde
<b>SUV</b>	: Small unilamellar vesicles
<b>SWCNT</b>	: Single Wall Carbone Nanotube
<b>Tc</b>	: Température de la phase de transition
<b>Te</b>	: Tellure
<b>TGF</b>	: Transforming Growth Factor
<b>Vd</b>	: Volume de distribution
<b>VEGF</b>	: Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VIH</b>	: Virus d'immunodéficience humain
<b>VPF</b>	: Facteur de perméabilité vasculaire
<b>Zn</b>	: Zinc
<b>Mm</b>	: Micromètre

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Les étapes conduisant une cellule saine à devenir cancéreuse .....	7
<b>Figure 2.</b> Etapes de cancérogenèse .....	8
<b>Figure 3.</b> Les six principales propriétés acquises par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs .....	9
<b>Figure 4.</b> Une mitose anormale et une cellule à noyau irrégulier .....	13
<b>Figure 5.</b> Une mitose anormale, noyaux hyperchromatiques irréguliers repoussés par une volumineuse vacuole cytoplasmique .....	14
<b>Figure 6.</b> Noyaux hyperchromatiques avec contours irréguliers .....	15
<b>Figure 7.</b> Cellules de très grandes tailles avec noyaux multiples irréguliers .....	15
<b>Figure 8.</b> Interaction des proto-oncogènes avec la cellule normale .....	20
<b>Figure 9.</b> Evolution des télomères .....	23
<b>Figure 10.</b> Dérégulation de la prolifération cellulaire .....	24
<b>Figure 11.</b> Les différents sites d'action cellulaire des cytotoxiques .....	31
<b>Figure 12.</b> Principe de la thérapie génique .....	34
<b>Figure 13.</b> Principe de production des lymphocytes spécifiques pour l'immunothérapie .....	36
<b>Figure 14.</b> Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation .....	44
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique de l'effet EPR, du ciblage passif et du ciblage actif .....	47

<b>Figure 16.</b> Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques .....	48
<b>Figure 17.</b> Schéma des trois générations de nanoparticules .....	49
<b>Figure 18.</b> Représentation de l'état de l'endothélium cellulaire au voisinage des tissus sains ou des tumeurs .....	52
<b>Figure 19.</b> Schéma représentant la conformation « end on » et « side on » des particules.....	53
<b>Figure 20.</b> Nanoparticule multifonctionnelle .....	55
<b>Figure 21.</b> Obtention de nanoparticules par émulsion /évaporation de solvant.....	59
<b>Figure 22.</b> Obtention de nanoparticules par nanoprécipitation .....	61
<b>Figure 23.</b> Méthode de « Salting out » pour l'obtention de nanosphères .....	62
<b>Figure 24.</b> Méthode d'émulsification-diffusion – obtention de nanosphères ou nanocapsules .....	63
<b>Figure 25.</b> Méthodes d'élaboration des nanoparticules par polymérisation .....	65
<b>Figure 26.</b> Représentation d'une micelle en milieu aqueux ou en milieu organique .....	71
<b>Figure 27.</b> Représentation schématique de nanocapsules .....	73
<b>Figure 28.</b> Représentation schématique d'un dendrimère .....	75
<b>Figure 29.</b> Représentation schématique d'un quantum dots .....	77
<b>Figure 30.</b> Synthèse de nanoparticules d'or par réduction d'Au(III) en présence d'un thioalcane .....	79
<b>Figure 31.</b> Représentation d'une nanoparticule d'or, transportant une molécule thérapeutique .....	81

<b>Figure 32.</b> Représentation schématique d'un fullerène .....	83
<b>Figure 33.</b> Représentation anatomique de la peau et de ses annexes .....	85
<b>Figure 34.</b> Prédiction du dépôt de particules inhalées au niveau du système respiratoire chez l'homme en fonction du diamètre des particules .....	90
<b>Figure 35.</b> Passage des nanoparticules à travers l'épithélium intestinal .....	94
<b>Figure 36.</b> Schéma représentant les grandes étapes et l'action des différentes voies d'activation du complément .....	96
<b>Figure 37.</b> Elimination des nanoparticules par le MPS .....	97
<b>Figure 38.</b> Représentation schématique du ciblage passif et actif des nanoparticules via l'effet EPR .....	101
<b>Figure 39.</b> Cinétique des nanoparticules .....	103
<b>Figure 40.</b> Représentation schématique d'un liposome .....	111
<b>Figure 41.</b> Schéma développé d'une molécule de phospholipide .....	113
<b>Figure 42.</b> Formule du cholestérol .....	114
<b>Figure 43.</b> Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille .....	116
<b>Figure 44.</b> Incorporation de chaînes de polyéthylène glycol en surface du liposome .....	119
<b>Figure 45.</b> Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes. ....	121
<b>Figure 46.</b> Méthodes de préparation des liposomes .....	125
<b>Figure 47.</b> Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques .....	134
<b>Figure 48.</b> Différents voies d'interaction entre les liposomes et les cellules.....	136

<b>Figure 49.</b> Représentation schématique de la structure des trois types d'endothéliums .....	138
<b>Figure50.</b> Mécanismes de pénétration des liposomes et de libération du principe actif dans les tumeurs solides .....	140
<b>Figure 51.</b> Test d'efficacité anticancéreuse .....	142
<b>Figure 52.</b> Mécanisme de défense naturelle des cellules cancéreuses .....	143
<b>Figure 53.</b> Le nombre de cellules cancéreuses mortes mesurées par comptage histologique .....	144
<b>Figure 54.</b> Les étapes de la pénétration du liposome au sein de la cellule tumorale .....	147
<b>Figure 55.</b> Principe de la thérapie photodynamique .....	161
<b>Figure 56.</b> Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablanski et les types de réactions photochimiques engendrées .....	163
<b>Figure 57.</b> Mécanisme de destruction tumorale après PDT .....	165

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Description du système micellaire idéal dans le cadre de la vectorisation de principes actifs.....	72
<b>Tableau II.</b> Exemples de groupements chimique associé au groupement phosphate des phospholipides .....	113
<b>Tableau III.</b> Classification des liposomes selon .....	116

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie : Généralités sur l'oncogénèse</b> .....	4
I.1 Définition.....	5
I.2 Physiopathologie.....	5
I.2.1 Mécanisme.....	5
I.2.2 La carcinogénèse.....	8
I.2.3 Les propriétés de la cellule cancéreuse.....	9
I.2.4 Cytologie structurale de la cellule tumorale.....	13
I.2.4.1 Anomalies Morphologiques.....	13
I.2.4.2 Anomalies génétiques.....	18
a- Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs.....	18
b- Mécanismes d'activation des oncogènes.....	18
I.2.4.3 Anomalies métaboliques.....	21
I.2.4.4 Comportement in vitro.....	21
<b>Deuxième partie : Traitements anticancéreux habituels</b> .....	27
I. Traitements loco-régionaux.....	28
I.1 La chirurgie.....	28
I.2 La radiothérapie.....	28
II. Traitements généraux.....	29
II.1 La chimiothérapie.....	29
II.1.1 Principales classes d'anticancéreux.....	30
II.2 L'hormonothérapie.....	33
II.3 La thérapie génique.....	34
II.3.1 Les modalités de transfert des gènes et thérapie génique.....	35
II.3.2 L'immunothérapie.....	35
II.4 Thérapie ciblée: Anticorps monoclonaux.....	37

<b>Troisième partie : La vectorisation nanoparticulaire</b> .....	39
<b>Introduction</b> .....	40
I. Généralités sur le système de vectorisation.....	41
I .1 Historique .....	41
I.2 Définition du système de vectorisation .....	41
I .3 Caractéristiques principales des systèmes de vectorisation.....	42
I.4 Les avantages de la vectorisation .....	43
a. Protection de la molécule encapsulée.....	43
b. Réduction des effets secondaires et/ou toxiques des principes actifs .....	43
c. Amélioration des profils pharmacocinétiques .....	43
d. Sélectivité de la libération .....	44
I .5 Stratégies de ciblage .....	45
I .5.1 Ciblage tumoral passif : « effet EPR ».....	45
I .5.2 Ciblage tumoral actif.....	46
II. Les nanoparticules .....	48
II.1 Définition .....	48
II.2 Histoire .....	49
II.2.1 Première génération : Nanoparticules nues.....	50
II.2.2 Deuxième génération : Nanoparticules furtives .....	50
II.2.3 Troisième génération : Nanoparticules ciblantes .....	53
II.2.4 Nanoparticule multifonctionnelle .....	54
II.3 Les caractéristiques physico-chimiques .....	56
a) La taille .....	56
b) La charge.....	56
c) La forme.....	57
d) La stabilité.....	57
e) La solubilité.....	57
f) Le taux de chargement.....	57

II.4 Méthodes de préparation des nanoparticules.....	58
II .4.1 Méthodes de préparation utilisant des polymères préformés.....	59
II.4.1.1 Emulsification - évaporation de solvant .....	59
II.4.1.2. Nanoprécipitation .....	60
II.4.1.3. « Salting out » .....	62
II.4.1.4. Emulsification - Diffusion .....	63
II .4.2 Méthodes de préparation par polymérisation.....	64
II.4.2.1. Polymérisation micellaire : microémulsion inverse.....	64
II.4.2.2. Polymérisation en dispersion .....	66
II .4.2.3. Polymérisation en émulsion : phase continue aqueuse .....	66
II.4.2.4. Polymérisation interfaciale .....	67
II .4.3 Méthodes de préparation de nanoparticules lipidiques .....	68
II .4.3 .1 Nanoparticules lipidiques solides.....	68
II .5 Les principaux types de nanoparticules .....	70
II.5.1 Les micelles.....	70
II.5.2 Les nanocapsules .....	72
II.5.3 Les nanosphères .....	73
II.5.4 Les dendrimères .....	74
II.5.5 Les hydrogels .....	76
II.5.6 Les quantum dots .....	77
II.5.7 Les nanoparticules d'or .....	78
II.4.8 Les nanoparticules d'oxyde de fer .....	81
II.5 .9 Les nanoplateformes de carbone .....	82
II.6. Voies et conditions de pénétration.....	84
II.6.1 Pénétration par voie cutanée .....	84
II.6.1.1 La peau : rappels anatomiques.....	84
II.6.1.2. Fonction barrière de la peau .....	85
II.6.1.3 Les voies de pénétration cutanée .....	85

II.6.2 La pénétration par voie respiratoire.....	86
II.6.2.1. Anatomie de l'appareil respiratoire.....	86
II.6.2.2. La muqueuse respiratoire.....	87
II.6.2.3. Fonction barrière de l'épithélium respiratoire .....	87
II.6.2.4. Pénétration et accumulation dans les régions du système respiratoire.....	89
II.6.3. Pénétration par voie orale .....	91
II.6.3.1. Rappel anatomique : l'appareil digestif.....	91
II.6.3.2. La muqueuse du tube digestif.....	91
II.6.3.3. Fonctions du tube digestif.....	92
II.6.3.4. Pénétration et accumulation des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal.....	93
II.6.4 Administration des systèmes vectorisés par voie intraveineuse .....	94
a. Influence de la taille des nanoparticules sur leur biodistribution.....	95
b. Influence de la chimie de surface .....	98
II.6.5 Accumulation des nanoparticules au niveau tumoral grâce à l'effet EPR.....	99
II.7 Avantages et inconvénients des nanoparticules .....	102
II.7.1 Toxicocinétique des nanoparticules chez l'homme.....	103
II.8 Applications des nanoparticules .....	105
II.8.1 Applications en oncologie :.....	106
Quatrième partie : Place des liposomes dans le traitement anticancéreux.....	110
I.Généralités .....	111
I.1 Préambule .....	111
I. 2. Structure et matières premières .....	112
I. 2.1. Composition des liposomes.....	112
I.2.1.1.Les phospholipides .....	112
I.2.1.2. Les stéroïdes.....	114
I. 3 Classification des liposomes.....	115
I.3.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologiques .....	115

I. 3.2. Classification selon leur composition et leur application in vivo.....	117
I.3.2.1. Liposomes conventionnels.....	117
I.3.2.2. Liposomes furtifs –pégylés.....	117
I.3.2.3. Immunoliposomes.....	120
I.3.2.4. Liposomes cationiques.....	120
I.4 Formulation.....	122
I. 4.1 Formulation et stabilisation des liposomes.....	122
I.4.2 Méthodes de préparation des liposomes.....	122
I.4.2.1 Préparation par réhydratation de film.....	122
I.4.2.2 Préparation par dispersion d'une solution organique de phospholipides ...	123
I.4.2.2.1 Injection d'une solution organique de phospholipides.....	123
I.4.2.2.2 Evaporation en phase inverse.....	123
I.4.2.3 Préparation par élimination de détergents.....	124
I.4.3. Méthodes de réduction de taille des vésicules.....	125
I.4.3.1. Utilisation des ultrasons.....	125
I.4.3.2. Extrusion sur des membranes de polycarbonate.....	125
I.4.3.3. Microfluidisation.....	126
II.4.4. Méthodes d'augmentation d'encapsulation.....	126
II.4.4.1. Encapsulation passive.....	126
II.4.4.2. Encapsulation dite active par création de gradient de concentration.....	127
I.5 Stabilité et conservation des liposomes.....	128
II. DEVENIR DES LIPOSOMES in vivo.....	130
II.1 Administration des liposomes par voie orale.....	130
II.2 Administration des liposomes par inhalation.....	130
II.3 Administration par voie intraveineuse.....	130
II.3.1 Stabilité des liposomes dans le sang.....	131
II.3.1.1 Interactions des liposomes avec les cellules du système des phagocytes mononucléés (système réticulo-endothélial).....	131

II.3.1.2 Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques .....	133
II.3.1.3 Interactions des liposomes avec les cellules sanguines.....	135
II.3.2 La biodistribution des liposomes .....	137
II.3.2.1 Situation physiologique.....	137
III. Liposomes et cancer .....	141
III.1. Les liposomes de première génération le cancer du foie .....	141
III. 2 Les liposomes de deuxième génération pour contourner les défenses du foie .....	145
III .3 Les liposomes de troisième génération et la pénétration ultra-cellulaire.....	146
III.4 Monographie de quelques spécialités pharmaceutiques à base de liposomes et leurs applications en cancérologie .....	148
IV. Limites et toxicité des liposomes.....	159
V. Nouvelles approches anticancéreuses .....	160
V.1 Thérapie Photodynamique. ....	160
V.1.1 Définition et principe.....	160
V.1.2 Les mécanismes d'éradication tumorale après thérapie photodynamique .....	164
V.1.2.1 Effets directs de la PDT .....	166
V.1.2.2 Effets indirects de la PDT.....	167
V.1.2.2.1 Effets anti-vasculaires .....	168
V.1.2.2.2 Effets immunitaires et inflammatoires .....	168
V.1.3 Les photosensibilisateurs .....	169
V.1.4 Stratégies de ciblage en PDT .....	171
V.1.4.1 Ciblage actif : l'adressage .....	171
V.1.4.2 Ciblage passif : la vectorisation.....	173
V.2 Liposomes et la thérapie photodynamique .....	174
Conclusion .....	177
Résumés	
Références bibliographiques	



# *Introduction*

Le cancer touche 10 millions de personnes chaque année dans le monde. Cette incidence pourrait augmenter de 50 % d'ici 2020. Tout d'abord, dans le traitement d'une tumeur, l'importance du diagnostic a longtemps été sous-estimé, (un patient voit ses chances de guérison grandement augmentées grâce à un diagnostic précoce), de plus, les méthodes thérapeutiques actuelles sont souvent lourdes et généralisées à tout le corps (radiothérapie, chimiothérapie ...). Il est donc urgent de trouver de nouvelles armes dans la lutte contre le cancer. C'est donc face à ce réel problème de santé d'envergure mondiale que la nanotechnologie pourrait s'avérer comme une avancée majeure dans le traitement du cancer.

Une nouvelle génération de médicaments s'appuyant sur les progrès des nanotechnologies tente de cibler uniquement les organes et les tissus et les cellules malades. C'est le principe de la vectorisation. L'objectif est de permettre le transport de molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible. Pour cela, le vecteur doit répondre à de nombreuses exigences. Il doit être biocompatible, c'est à dire toléré par l'organisme, doit franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son site d'action. De plus, il ne doit pas être toxique pour l'organisme. Ces performances permettent de limiter les effets indésirables et la toxicité des médicaments. En piégeant la molécule dans une particule appelée « nanovecteur », le médicament est protégé des défenses naturelles du corps, il échappe au système immunitaire jusqu'au moment où il atteint les tissus visés, les cellules malades, voire l'intérieur même de la cellule.

Dans ce manuscrit, seuls les principaux « nanovecteurs » seront brièvement décrits. Parmi ces « nanovecteurs » nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanoparticules qui ont l'avantage de protéger la molécule et l'organisme et d'augmenter l'efficacité par un ciblage très spécifique et aux liposomes présentent l'avantage de pouvoir inclure des principes actifs tant hydrophiles qu'hydrophobes dans la même particule. En outre ils miment facilement la composition des membranes biologiques grâce à la nature lipidique des couches formant le revêtement, leurs membranes sont flexibles ce qui leur permet de pénétrer dans les pores et enfin le prix et la difficulté de traitement sont minimales grâce aux progrès enregistrés récemment sur le plan technologique.

Au travers d'une synthèse bibliographique structurée en quatre parties, nous allons présenter en premier les généralités de l'oncogenèse ainsi que des rappels sur les traitements anticancéreux habituels. La troisième partie sera réservée au système de vectorisation nanoparticulaire tandis que la quatrième partie va décrire la place des liposomes au sein du traitement anticancéreux où la dernière partie sera consacrée à la thérapie photodynamique comme nouvelle approche de traitement anticancéreux faisant appel à la nanotechnologie.

*Première partie :  
Généralités  
sur l'oncogénèse*

## I.1 Définition

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, la cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment et de pouvoir former des métastases.

Le cancer est un terme général pour n'importe quelle maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (un *néoplasme*) ou se propager à travers le corps et former des métastases [1].

## I.2 Physiopathologie

### I.2.1 Mécanisme

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur prolifération, et acquièrent des propriétés de migration leur permettant d'envahir tout l'organisme.

Le développement et l'évolution d'un cancer comporte trois grandes phases :

- ✓ la transformation maligne d'une cellule normale d'un tissu ou d'un organe en cellule cancéreuse (tumorigenèse ou carcinogénèse) et sa prolifération incontrôlée (désordre monoclonal),
- ✓ l'angiogénèse et l'extension locale de la tumeur,
- ✓ l'invasion ganglionnaire (invasion régionale) puis métastatique (invasion à distance).

Il est aujourd'hui bien établi que le cancer est une maladie liée à des changements dynamiques dans le génome et que la tumorigenèse est un processus multi-étape mettant en jeu plusieurs altérations géniques successives. Celles-ci affectent principalement les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, ainsi que dans les processus de réparation des lésions de l'ADN. Les gènes impliqués dans la carcinogénèse sont habituellement classés en deux familles :

### ✚ Les oncogènes :

Stimulés lors de la transformation maligne, ils codent pour des facteurs qui entraînent la perte du contrôle de la croissance cellulaire. Leur expression est dominante, la présence d'un seul exemplaire de l'oncogène suffit à l'expression du phénotype altéré de son produit.

Ces oncogènes comprennent, entre autres, les oncogènes qui codent pour des facteurs de croissance ou leur récepteur, des protéines kinases cytoplasmiques, des facteurs de transcription, des protéines inductrices de l'apoptose ou encore les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN.

### ✚ Les gènes suppresseurs de tumeurs :

Ces gènes sont à l'inverse réprimés lors de la transformation maligne. Leur expression étant récessive, les deux exemplaires du gène normal doivent alors être perdus ou mutés pour que disparaisse le rôle protecteur. Le plus connu de ces gènes est le suppresseur de tumeur p53 qui est altéré dans 50% des cancers.

Les modifications de l'expression de ces gènes ou de l'activité de leur produit peuvent résulter de modifications génétiques, à savoir d'une lésion directe du gène considéré suite à une mutation, une translocation, un réarrangement chromosomique, une délétion, une amplification génique ou une perte ou un gain de chromosome entier. Elles peuvent également provenir de mécanismes épigénétiques, tels que les modifications de la chromatine (acétylation des histones) ou la méthylation des promoteurs (inhibition de la transcription) [2].

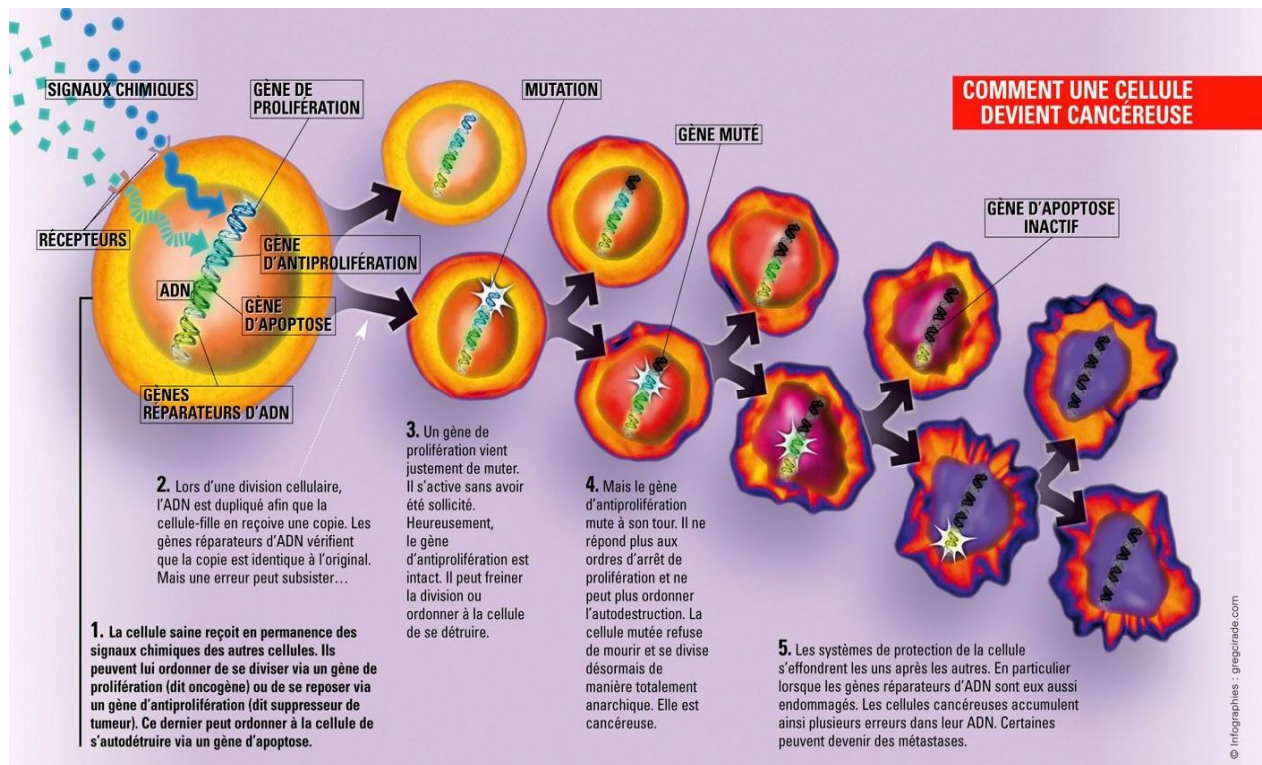
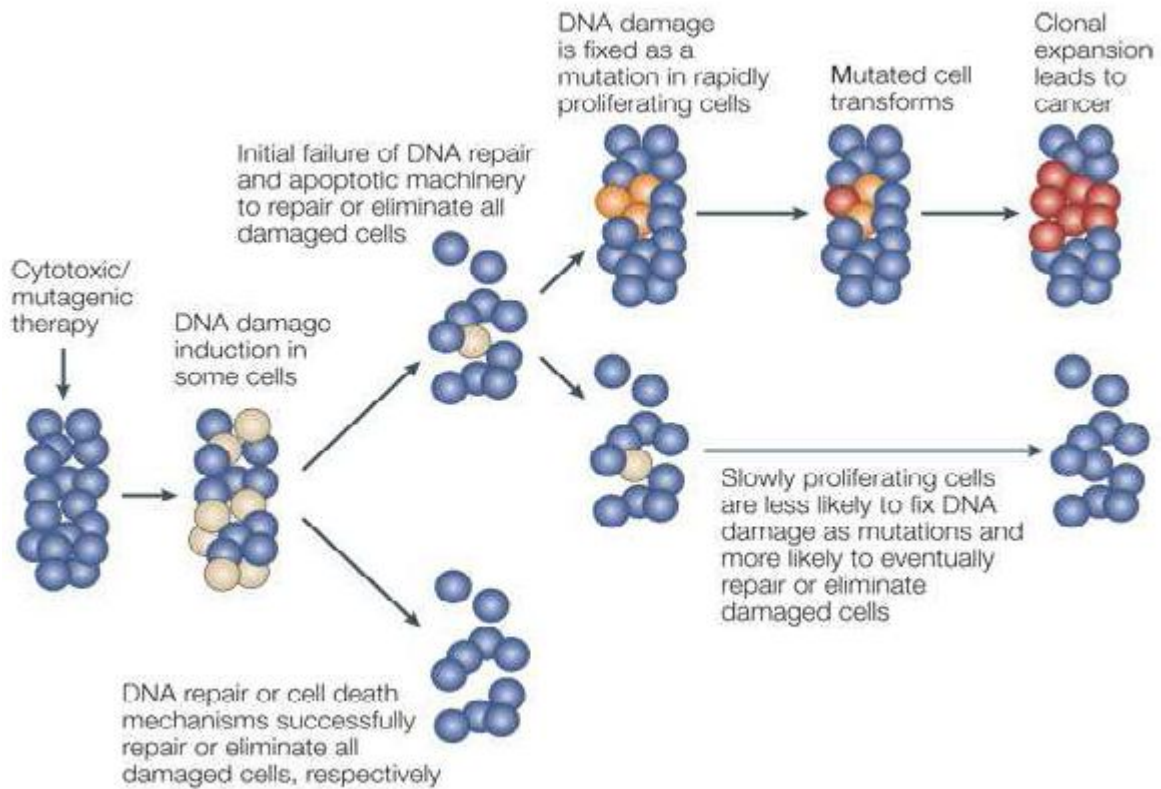


Figure1 : les étapes conduisant une cellule saine à devenir cancéreuse [3]

## I.2.2 La carcinogénèse :

Plusieurs types d'inducteurs et de nombreuses étapes sont en cause dans la cancérisation d'une cellule saine.



**Figure 2** : Etapes de cancérogenèse [4].

La carcinogénèse est un phénomène à plusieurs étapes, observé en cancérologie clinique et chez l'animal de laboratoire. La compréhension de son fonctionnement repose sur deux idées majeures :

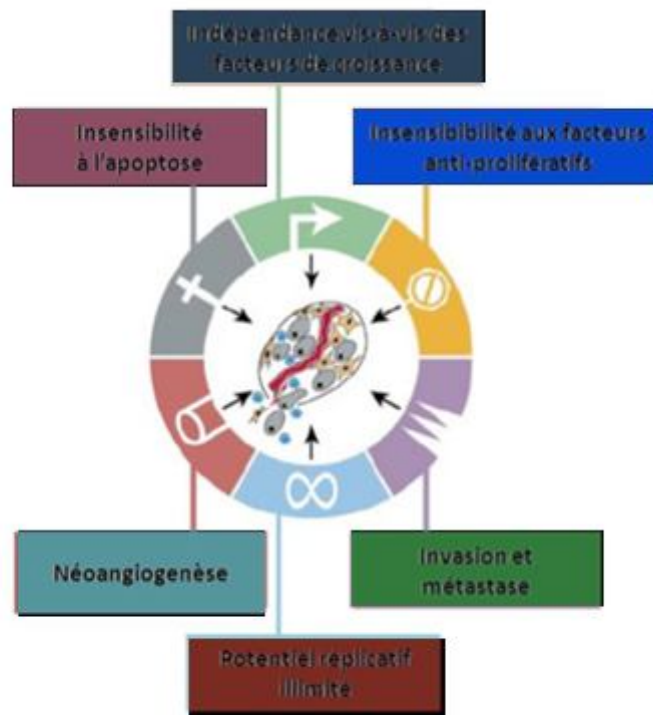
- La transformation tumorale est un processus cumulatif d'événements mutationnels,
- Ces événements sont interdépendants. Ainsi, des tumeurs bénignes montrant une prolifération cellulaire restreinte et contrôlée peuvent dégénérer en tumeurs malignes aux proliférations cellulaires anarchiques, incontrôlées, capables d'envahir les tissus adjacents.

Au cours de son évolution, une cellule maligne acquiert par mutations successives des propriétés nouvelles qui la rendent de plus en plus résistante et agressive pour l'organisme.

Le mécanisme essentiel de la carcinogenèse repose sur l'activation de certains oncogènes (gènes intervenant dans le contrôle de la prolifération cellulaire et capables de provoquer un processus de cancérisation) et sur l'inactivation d'antioncogènes (gènes suppresseurs de cancers, contrôlant l'intégrité du génome) [5].

### I.2.3 Les propriétés de la cellule cancéreuse :

Hanahan & Weinberg [2] ont décrit six propriétés essentielles acquises par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs (Figure 3) :



**Figure 3** : Les six principales propriétés acquises par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs [2].

**✚ Leur autosuffisance en signaux qui stimulent la croissance cellulaire.**

Les mécanismes par lesquels la cellule cancéreuse acquiert une capacité de croissance exagérée et une entière autonomie sont nombreux et concernent aussi bien les signaux de croissance extracellulaire, les transducteurs cellulaires, que les circuits intracellulaires. Dans le cas des cellules normales, le passage de l'état quiescent à l'état actif de prolifération est gouverné par un ensemble de signaux de croissance mitogènes solubles provenant essentiellement de voies de signalisation hétérotypiques (signaux paracrines ou endocrines).

La cellule maligne développe, elle, une propre boucle de stimulation autocrine conduisant à la génération de ses propres signaux de croissance.

Ceci n'exclut pas les stimulations hétérotypiques induisant la production de ces facteurs notamment par le stroma tumoral. Par ailleurs, la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance ainsi que leur mutation et activation constitutionnelle rendent la cellule cancéreuse hypersensible à des taux faibles en facteurs de croissance et induisent une signalisation souvent indépendante de la présence ou non du ligand (EGFR/erbB dans les tumeurs de l'estomac, du sein et du cerveau ; HER2/neu dans les carcinomes mammaires et gastriques). Les mécanismes les plus complexes conduisant à l'autonomie des cellules tumorales concernent toutefois l'aval des circuits de signalisation, notamment l'altération de certains maillons des chaînes de transduction (mutation du gène Ras dont le produit est impliqué dans la cascade de signalisation SOS-Ras-Raf-MAP kinase).

**✚ Leur insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire.**

La perte du contrôle de la prolifération cellulaire peut mettre en jeu l'inactivation des mécanismes de contrôle physiologique du cycle cellulaire (p53, p16 et autres inhibiteurs de cdk) ainsi que l'inactivation du récepteur ou de la chaîne de transduction de signaux anti-prolifératifs, comme dans le cas du TGF $\beta$ .

### **✚ Leur résistance à la mort cellulaire programmée.**

Les cellules normales disposent de plusieurs systèmes capables de détecter des situations extra- ou intracellulaires anormales et d'émettre des signaux en conséquence dirigés vers les effecteurs de la mort apoptotique. Les situations extracellulaires sont jugées par des couples ligand/récepteur capables d'induire des signaux de survie ou des signaux de mort.

Les cellules tumorales échappent à l'apoptose par la sécrétion autocrine de facteurs de survie cellulaire (IGF-1, IGF-2, IL-3) et l'inactivation des récepteurs des facteurs de mort. A l'intérieur de la cellule normale, les détecteurs sont éveillés par des dérèglements comme les dommages de l'ADN, l'insuffisance de signaux de survie ou l'hypoxie, et activent la voie apoptotique. Les protéines de la famille de Bcl-2 assurent ce rôle de gardien et comprennent des membres antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) et des membres pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid). Ces protéines sont très souvent dérégulées dans les cellules tumorales.

### **✚ Leur capacité de réplication illimitée.**

Les cellules tumorales acquièrent une capacité de division illimitée par échappement à la mort par sénescence. L'immortalisation peut provenir de la dérégulation du gène de la télomérase, enzyme impliquée dans l'addition des séquences télomériques, ou de l'activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomères.

### **✚ Leur capacité d'induire une néo-angiogenèse.**

La néo-angiogenèse est un processus physiopathologique clé de la progression tumorale. Elle intervient à une étape critique de la croissance de la tumeur.

En effet, si dans les phases précoces de la croissance de la tumeur (diamètre  $\leq 1-2$  mm) [6].les phénomènes de diffusion permettent l'alimentation de la tumeur en oxygène et nutriments (phases qualifiées d'avasculaires ou de quiescentes), en revanche lorsque la taille de la tumeur dépasse 2 mm, le simple apport en nutriments par diffusion ne suffit plus. La tumeur entre alors dans une phase dite vasculaire ou angiogénique, au cours de laquelle les cellules cancéreuses libèrent des stimuli angiogéniques en direction des vaisseaux sanguins proximaux du tissu hôte. Ces stimuli appellent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

et le développement d'un nouveau réseau vasculaire autour de la tumeur [7]. Alors que des cellules normales en prolifération n'ont à priori pas de potentiel angiogénique, les cellules cancéreuses, menacées de nécrose hypoxique, sont capables de déréguler l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse en augmentant la production des facteurs pro angiogéniques comme le VEGF ou les FGF-1 et -2 et en diminuant la régulation des inhibiteurs comme la thrombospondine-1 ou l'interféron  $\beta$  (« angiogenic switch »). La formation des ramifications vasculaires rapproche les vaisseaux nourriciers et soutient la croissance de la tumeur. Elle favorise d'autre part le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine et augmente donc les risques de formation de foyers métastatiques secondaires dans des organes éloignés. La densité de vascularisation tumorale a été associée à l'agressivité des tumeurs, mesurée par l'incidence des métastases et la survie des patients. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré une corrélation entre la densité des microvaisseaux tumoraux, l'apparition de métastases, la rechute et le faible pronostic des patients [8] [9] [10] [11].

Indispensable à la progression de la tumeur, la néo-angiogenèse est une cause fondamentale de la malignité des cancers et donc une cible thérapeutique convoitée.

#### **Leur capacité d'invasion des tissus et de formation de métastases.**

La progression tumorale se poursuit par l'extension ganglionnaire de la tumeur suite à l'envahissement régional des voies du drainage lymphatique par les cellules tumorales, puis par l'extension métastatique suite au passage des cellules malignes dans la circulation sanguine. Ces phénomènes sont dus à la perte ou aux modifications, sur les cellules tumorales, de glycoprotéines de surface assurant dans les phénomènes normaux la reconnaissance des cellules d'un même tissu les unes par rapport aux autres et la constitution des tissus organisés. (Les cadhérines). La perte de ces molécules d'adhésion intercellulaires et, dans le même temps, la sur-expression anormale de molécules d'adhésion cellule/tissu interstitiel (les intégrines) confèrent aux cellules tumorales des propriétés inhabituelles de migration. Libérant par ailleurs des enzymes responsables de la dissolution de la membrane basale. (collagénase, stromélysines, plasmine, cathépsines), les cellules tumorales envahissent

peu à peu la membrane basale et pénètrent la membrane des capillaires lymphatiques et sanguins. La présence des cellules tumorales dans la circulation sanguine leur permet alors d'envahir des régions éloignées de l'organisme et d'y établir des foyers tumoraux secondaires (métastases). L'extension métastatique concerne essentiellement les organes de filtration du volume sanguin et les sites de drainage habituels des organes : les poumons, le foie, les os et le cerveau sont les organes de localisation préférentielle des métastases. Le développement des métastases constitue la gravité du processus cancéreux.

Contrairement à une tumeur localisée, un cancer diffus et généralisé est souvent au delà de toute possibilité curative.

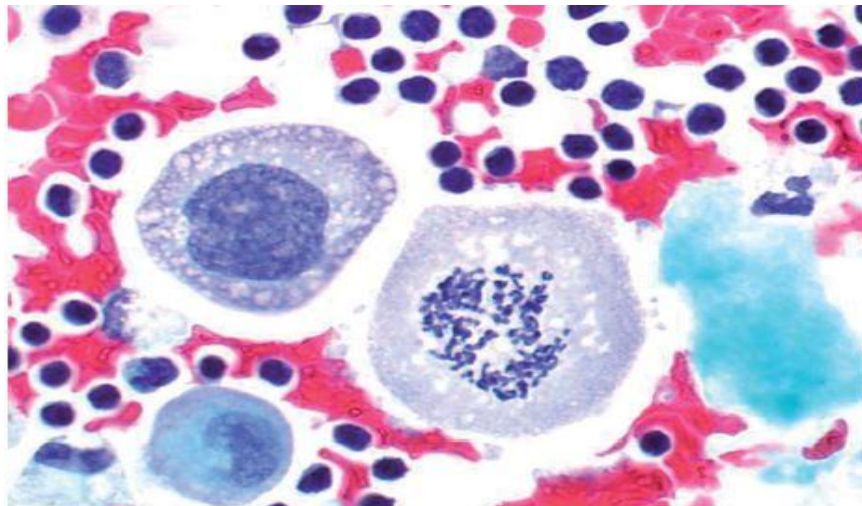
## I.2.4 Cytologie structurale de la cellule tumorale

### I.2.4.1 Anomalies Morphologiques :

#### ➤ Modifications du noyau

##### Noyau en mitose

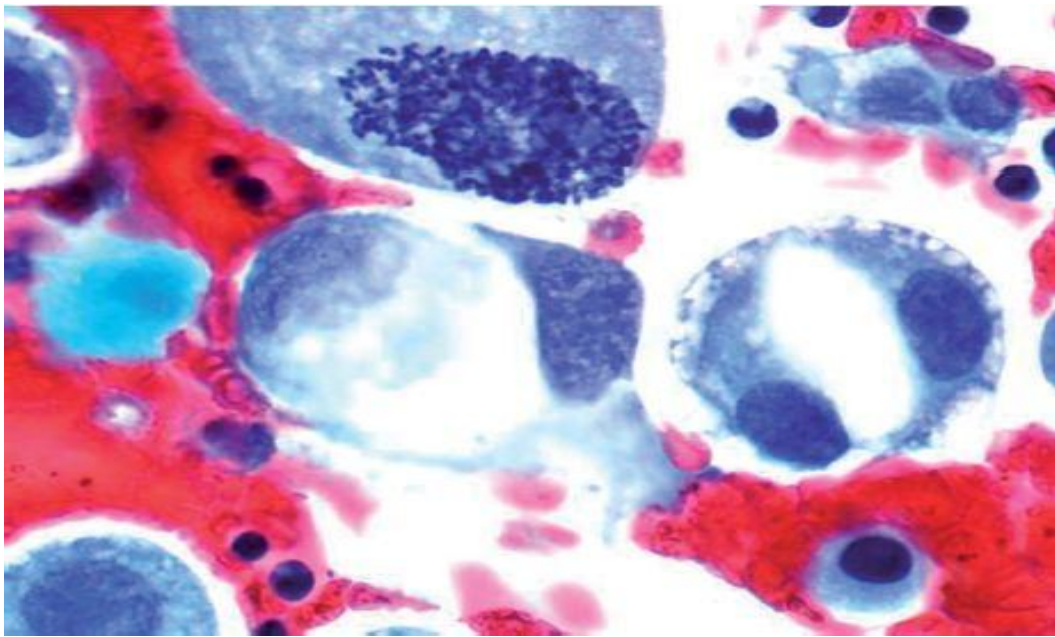
- Augmentation du nombre de cellules en mitoses.
- Mitoses anormales (**Figure 4**)



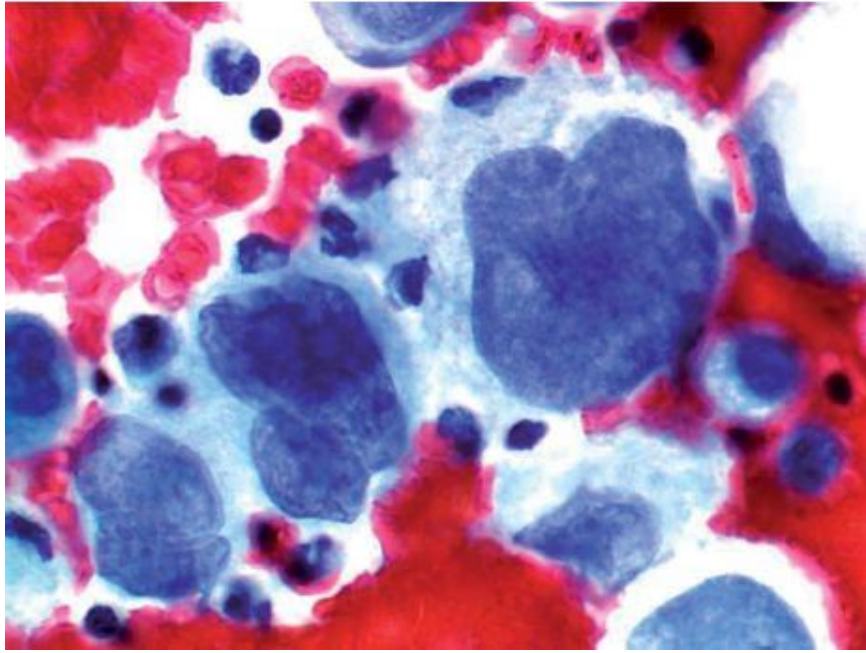
**Figure 4** : Une mitose anormale et une cellule à noyau irrégulier.

### Noyau interphasique

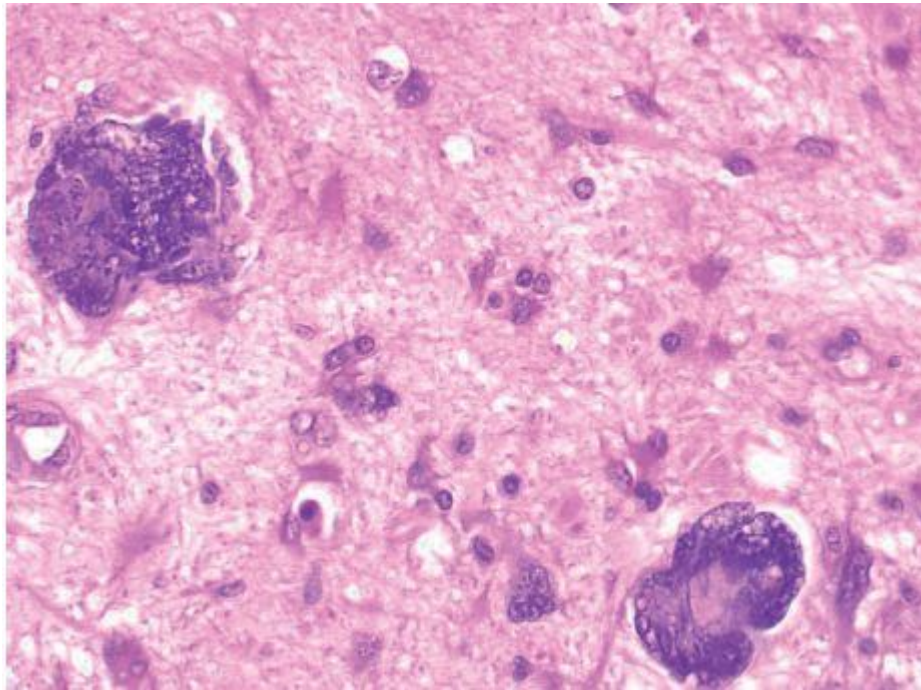
- Anisocaryose (du grec aniso = différent et caryo = noyau) : inégalité de taille d'un noyau à l'autre.
- Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique : le plus souvent due à une augmentation de la taille du noyau.
- Hyperchromatisme : aspect dense et sombre du noyau lié à une condensation ou à une augmentation du nombre des chromosomes (aneuploïdie) (**Figure 5**).
- Irrégularités de forme et de contours (**Figure 6**).
- Multinucléation (**Figure 7**).



**Figure5** : Une mitose anormale, noyaux hyperchromatiques irréguliers repoussés par une volumineuse vacuole cytoplasmique.



**Figure 6 :** Noyaux hyperchromatiques avec contours irréguliers.



**Figure 7 :** Cellules de très grandes tailles avec noyaux multiples irréguliers (glioblastome : tumeur gliale de haut grade).

➤ **Modifications du cytoplasme**

**Cytosquelette**

Dans la cellule normale, le cytosquelette est constitué de trois types de filaments :

- 1) microtubules : structures de 20–25 nm d'épaisseur constituées principalement de polymères de tubulines ;
- 2) microfilaments : structures contractiles de 6–8 nm d'épaisseur contenant notamment des filaments d'actine ;
- 3) filaments intermédiaires : les plus importants sont les filaments de cytokératine (présents dans les cellules épithéliales et mésothéliales) et de vimentine (surtout dans les cellules conjonctives = mésenchymateuses).

Dans la cellule cancéreuse, le cytosquelette est le plus souvent conservé, avec des anomalies de répartition. Il n'est pas visible en microscopie optique mais ses constituants peuvent être mis en évidence par immunohistochimie. Cette conservation est intéressante pour le pathologiste car la mise en évidence de tels ou tels types de filaments intermédiaires par exemple, permet de préciser le tissu d'origine d'une cellule cancéreuse.

**Système sécrétoire**

- Variations visibles sur les colorations standards, telles des vacuoles cytoplasmiques (excès de mucus) refoulant le noyau dans les adénocarcinomes mucosécrétants, ou un cytoplasme clair, optiquement vide (accumulation anormale de glycogène) dans les cancers du rein à cellules claires par exemple.
- Variations quantitatives des sécrétions normales (ex : pic d'immunoglobulines monoclonales dans le myélome).
- Apparition de substances nouvelles, soit par dérégulation d'une synthèse de protéines de type foetal (ex : alpha foetoprotéine, antigène carcino-embryonnaire = ACE), soit par sécrétion inappropriée d'une hormone (ex : sécrétion d'ACTH par certains carcinomes à petites cellules du poumon). Ces substances, considérées comme des marqueurs tumoraux, peuvent être dosées dans le sérum lorsqu'elles sont sécrétées ou identifiées *in situ* par immuno-histochimie.

➤ **Modifications de la membrane :**

✓ **Aspect morphologique :**

Les modifications morphologiques ne sont visibles qu'en microscopie électronique : irrégularités, microvillosités, bulles, projections, modifications des systèmes de jonction. Elles ne sont pas prises en compte pour le diagnostic de cancer en routine.

Il existe des modifications des protéines de surface, et notamment des molécules d'adhérence, qui sont impliquées dans les interactions intercellulaires et cellules-matrices extra-cellulaire.

✓ **Aspects fonctionnels**

- Anomalies des récepteurs membranaires : augmentation de nombre et perte de régulation.
- Modifications des enzymes membranaires : augmentation des enzymes protéolytiques (protéases, glycosidases) favorisant la dégradation de la substance intercellulaire.
- Modifications des antigènes de membrane :
  - altération ou perte des antigènes normaux (Ag d'espèces, d'organes ou de tissus) ;
  - apparition de néoantigènes : ré-expression d'antigènes embryonnaires : alpha foetoprotéine, antigène carcino-embryonnaire ;
  - expression anormale d'antigène de différenciation, d'Ag associés aux virus (ex : protéine latente de membrane du virus d'Epstein-Barr virus).
- Modifications de la perméabilité membranaire :
  - l'augmentation de perméabilité pour différents cations ( $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ ) joue un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires, en particulier la prolifération [12].

### I.2.4.2 Anomalies génétiques

#### a- Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Des protéines impliquées à différents niveaux dans la prolifération cellulaire sont codées par des gènes normaux à posteriori dénommés proto-oncogènes. Certaines formes mutées de ces gènes, les oncogènes, codent pour des protéines de stimulation qualitativement et/ou quantitativement plus puissantes, lesquelles sont capables d'induire et/ou maintenir une prolifération cellulaire excessive [13].

A contrario, des gènes suppresseurs de tumeur (GST) codent pour des protéines normales, inhibitrices de la prolifération cellulaire, mais des mutations peuvent rendre ces dernières inactives, privant ainsi les cellules des « freins » homéostatiques capables de limiter leur prolifération [14].

#### b- Mécanismes d'activation des oncogènes :

##### Amplification génique :

Accroissement du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors soit sous forme de mini chromosomes surnuméraires, les chromosomes double minute (DM), soit sous forme intégrée dans un chromosome. Cette amplification entraîne généralement une augmentation de l'expression génétique du gène [15].

##### Mutation ponctuelle :

La substitution d'un acide aminé par un autre par des mutations faux sens, peut activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation substitutive de la protéine.

##### Insertion virale :

Un virus s'insère dans ou à proximité d'un proto-oncogène activant son expression ou formant une protéine hybride ex: Virus de l'hépatite B dans l'hépatocarcinome.

### ✚ Translocation :

Les translocations chromosomiques, qui correspondent au transfert d'un fragment de chromosomes sur un autre, sont également fréquentes dans les tumeurs. Les mieux caractérisées s'observent dans les hémopathies malignes. Dans les leucémies myéloïdes chroniques, on observe par exemple l'apparition d'un chromosome anormal dit de philadelphie (Phi). Le chromosome de philadelphie est le résultat d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22, qui fusionne une partie d'un gène *bcr* avec une partie du proto-oncogène *abl* conduisant à la production par la cellule leucémique d'une protéine de fusion *bcr-abl*, absente des cellules normales [17].

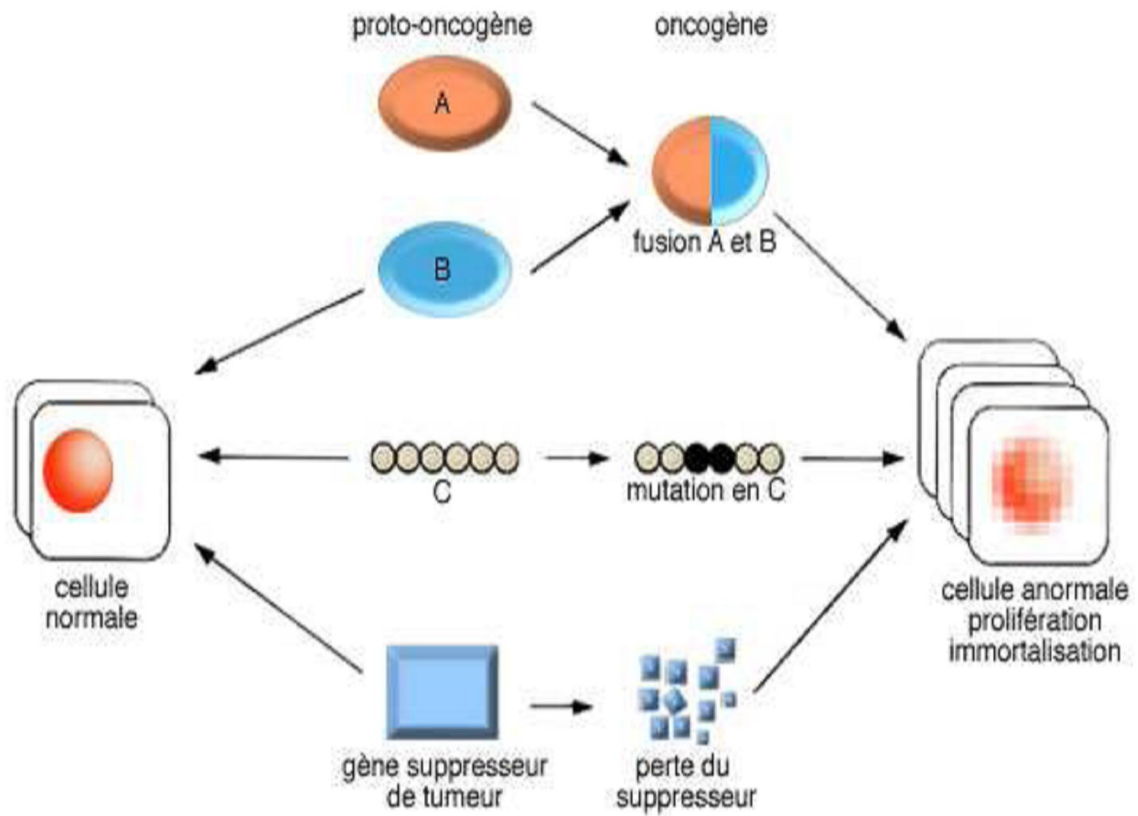
### ✚ Délétion :

Les délétions, qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation ou une inhibition anormale de certains gènes, si elles touchent une région régulatrice.

Exemple : l'activation du proto-oncogène Erb B qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intra cytoplasmique est alors actif de façon constitutive [18].

### ✚ Altérations des gènes suppresseurs de tumeurs :

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction des gènes suppresseurs dans les tumeurs solides sont variées, il peut s'agir de mutation, de délétions, d'insertion, d'anomalie de méthylation des promoteurs inhibant la transcription soit par altération de la voie biologique contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et passant par les gènes suppresseurs p53, p16 et RB). Le mélanome malin familial peut résulter de mutations constitutionnelles de p16 ou de CDK et les mutations somatiques de p16 sont très fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène constituent la base moléculaire du syndrome de Li- Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales [19].



**Figure 8 :** Interaction des proto-oncogènes avec la cellule normale [20].

### **I.2.4.3 Anomalies métaboliques:**

L'anomalie la plus fréquente consiste en une capacité accrue des cellules cancéreuses à utiliser la voie glycolytique pour la production d'ATP. Bien que la capacité glycolytique des cellules cancéreuses soit en règle générale supérieure à celle des cellules normales, il n'est pas pour autant permis d'établir une relation de cause à effet entre l'accroissement de la glycolyse intracellulaire et l'état cellulaire cancéreux [21].

Les cellules cancéreuses ont une propension à sécréter des facteurs de croissance et des protéases. Elles produisent également davantage de polyamines que les cellules normales. Ces molécules sont indispensables à la prolifération cellulaire et dérivent de la décarboxylation de l'ornithine en présence d'ornithine décarboxylase (ODC) : l'activité ODC est accrue dans les cellules cancéreuses. Cette enzyme est codée par un proto-oncogène situé dans l'espèce humaine sur les chromosomes 2 et 7. Le gène de l'ODC est situé à proximité immédiate d'un autre proto-oncogène, le N-myc.

Les cellules malignes peuvent également acquérir une résistance à certaines drogues antitumorales (cytostatiques à noyau aromatique hydrophobique), par l'intermédiaire de protéines transmembranaires du plasmolemme comme par exemple la P-gp (Permeability glycoprotein'). Cette protéine est responsable de ce que l'on appelle la « MultiDrug Resistance » (MDR). Dans l'espèce humaine les 2 gènes MDR1 et MDR2 sont également situés sur le chromosome 7 [22].

### **I.2.4.4 Comportement in vitro :**

#### **➤ Immortalité :**

Les cellules cancéreuses contrairement aux cellules normales peuvent proliférer et donc être cultivées de façon indéfinie. Cette immortalité serait due, d'une part à la défaillance de systèmes de contrôle du cycle cellulaire, d'autre part à la présence d'une enzyme spécifique aux cellules cancéreuses, la télomérase [23].

➤ **La présence des télomérases:**

Les cellules normales sont programmées pour un nombre limité de dédoublements (environ 60–70 *in vitro*). Aux extrémités des chromosomes se trouvent des séquences répétitives (télomères) qui sont érodées à chaque réplication de l'ADN. Leur disparition induit un arrêt de la prolifération (G0).

Dans la plupart des cellules tumorales, il existe un maintien des télomères au cours des réplifications successives. Ceci est dû à la surexpression des télomérases, qui sont les enzymes capables d'ajouter des séquences répétées à l'extrémité des chromosomes.

Dans une population cellulaire normale, il existe donc un « compteur de cycles » dénombant les divisions cellulaires. Ce « compte-tour » est situé au niveau des télomères des chromosomes. Ces fragments d'ADN vont au cours de chaque phase S (réplication) se raccourcir. Après un certain nombre de divisions (environ 50), les télomères devenus trop courts vont envoyer un message induisant les cellules à entrer en sénescence. Si les cellules n'entrent pas en sénescence, un dernier raccourcissement des télomères déclenchera un chaos chromosomique (chromosomes fusionnés, disloqués...) fatal à la cellule normale [23].

Mais, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses restaurent à chaque tour de cycle leurs fragments d'ADN télomérique détruits. Cette « maintenance » des télomères est due à la présence d'une enzyme: la télomérase. Cette enzyme qui est présente dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses est par contre absente de la majorité des cellules normales.

L'immortalité des cellules cancéreuses serait due en grande partie à la présence de cette enzyme. La télomérase constitue sans nul doute une cible de première importance pour ce qui est du traitement du cancer [19].

La figure 9 représente l'évolution des télomères. Au cours de divisions cellulaires successives, les télomères (en rouge) se raccourcissent progressivement jusqu'à atteindre une taille critique : c'est la crise télomérique qui conduit à la sénescence ou à l'apoptose. Si la cellule exprime la télomérase, elle régénère ses télomères et peut se diviser de façon illimitée [24].

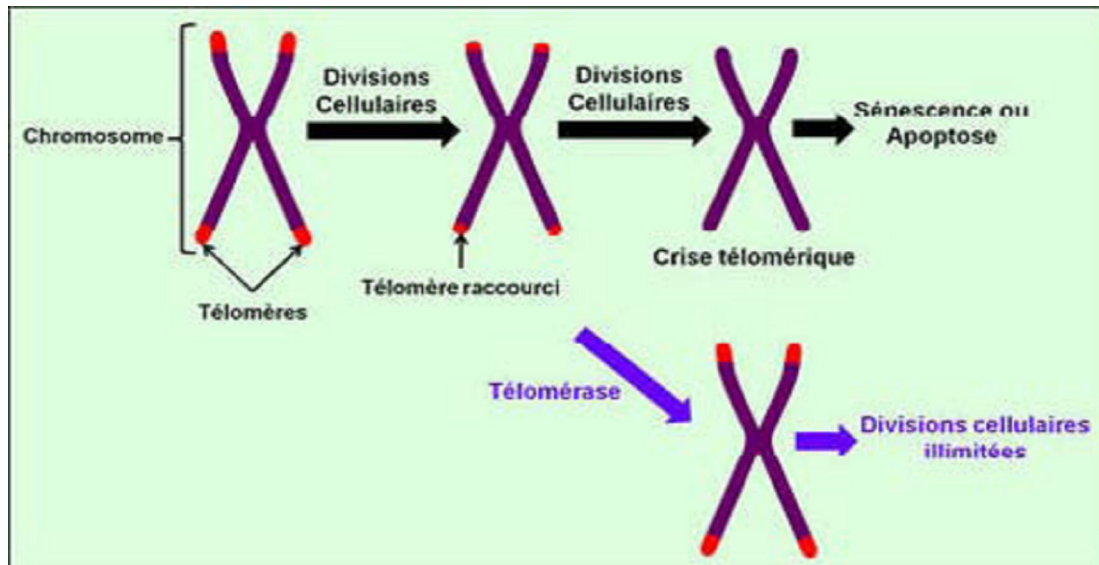


Figure 9 : Évolution des télomères [24].

➤ **Réduction des besoins en facteurs de croissance**

Les cellules cancéreuses sont moins dépendantes que les cellules normales de l'apport en facteur de croissance. Ceci peut au moins en partie s'expliquer par l'existence de perturbations au niveau des systèmes de signalisation intracellulaire. A l'état normal, nombre de proto-oncogènes codent pour des protéines normales participant à la transduction de messages d'origine extracellulaire capables de stimuler/inhiber la prolifération cellulaire (via des récepteurs membranaires spécifiques). À l'état cancéreux, la mutation d'un proto-oncogène (oncogène) peut provoquer l'activation continue d'une voie métabolique de prolifération cellulaire. En cas de cancer, il existera ainsi des perturbations de la cascade des signaux cytoplasmiques, et/ou de l'activité de facteurs de transcription nucléaires [25].

La Figure 10 représente la dérégulation de la de la prolifération cellulaire. En situation saine, une cellule a besoin de facteurs de croissance pour proliférer. Dans une situation cancéreuse, la cellule cancéreuse peut muter un oncogène pour qu'il génère de façon permanente des signaux de prolifération, indépendamment de la présence de facteurs de croissance [26].

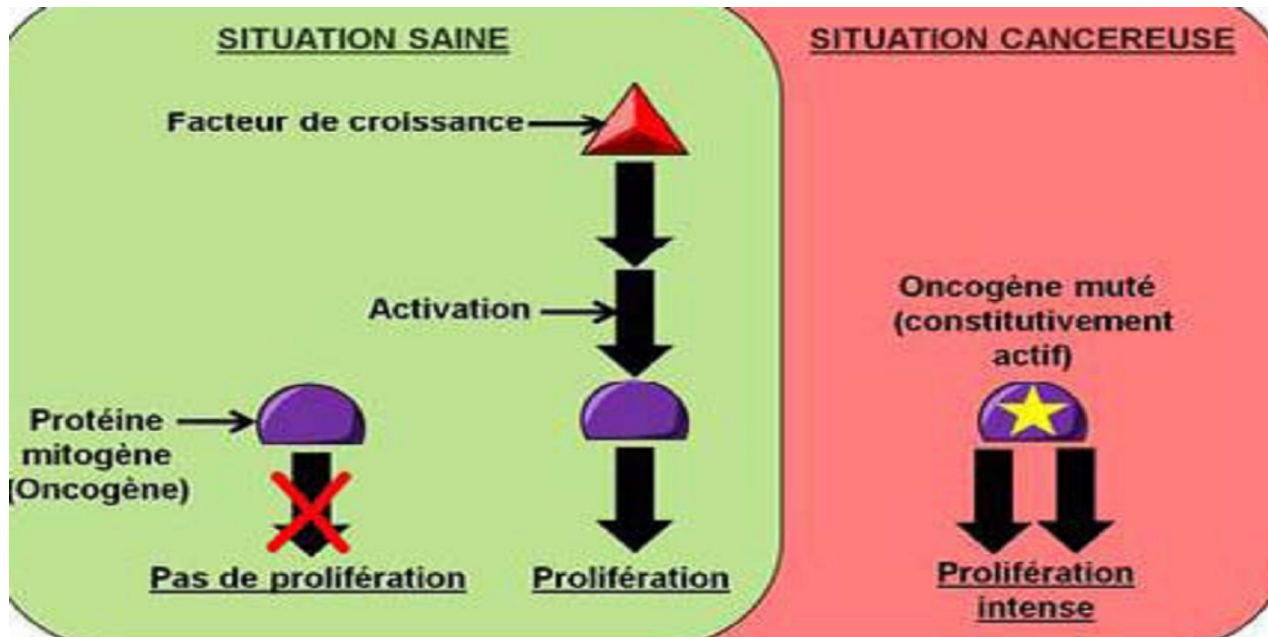


Figure 10 : Dérégulation de la prolifération cellulaire [26].

➤ **Prolifération indépendante de l'ancrage, perte de l'inhibition de contact**

Dans les tissus normaux, les cellules adhèrent les unes aux autres ainsi qu'à la matrice extracellulaire. C'est le cas des épithéliums, siège de la majorité des cancers. Des molécules assurant l'adhérence intercellulaire par l'intermédiaire de jonctions non communicantes, maintiennent les cellules à leur place. En cas de cancer, ces molécules sont absentes et/ou anormales. Dans de nombreux types de carcinomes, une molécule d'adhérence cellulaire nommée cadhérine-E, est partiellement ou totalement absente de la surface des cellules cancéreuses. On sait de plus que dans des lignées cellulaires exprimant peu la cadherine-E, les cellules sont d'autant plus malignes que l'expression de cette protéine à la surface des cellules est faible ; inversement, le caractère invasif de lignées cellulaires cancéreuses peut être supprimé en transférant dans ces cellules le gène codant pour la cadherine-E. Enfin, des

mutations du gène codant pour cette glycoprotéine d'adhérence (cadherine-E) sont observées dans nombre de carcinomes humains [27].

L'adhérence à la matrice extracellulaire permet aux cellules normales de survivre et de proliférer. Les cellules normales ne peuvent se multiplier *in vitro* qu'en adhérant à une surface « solide ». Cet ancrage est en grande partie assuré par des glycoprotéines transmembranaires du plasmolemme qui se lient à la matrice extracellulaire: les intégrines. Des cellules normales « libres », à qui on ne fournit pas de support solide, cessent ainsi de croître, parce que l'activité de protéines nucléaires commandant la croissance et la division cellulaire diminue quand les cellules ne disposent pas d'ancrage. Dans ces conditions de « non-ancrage », de nombreux types cellulaires entrent en apoptose. Les cellules cancéreuses n'ont pas besoin d'être ancrées pour survivre et proliférer, leur complexe cycline E-CDK2 reste en effet continuellement actif, qu'elles soient ancrées ou non [25].

#### ➤ Rôle des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de nature glycoprotéique qui se lient à des composants de la matrice extracellulaire. Leurs fonctions sont essentielles pour la migration cellulaire. Elles régulent des voies de signalisation qui contrôlent l'organisation du squelette et la survie cellulaire. Mais elles sont également impliquées dans l'activation de protéases qui dégradent les membranes basales des tissus. À ce titre, elles peuvent intervenir directement sur les processus de dissémination et d'invasion tumorale. Ainsi, certaines intégrines sont surexprimées dans certains cancers, alors que d'autres sont diminuées dans d'autres cancers.

Les intégrines peuvent également acquérir une affinité accrue vis-à-vis de leur ligand, ce qui facilite la migration de cellules tumorales. Dans le même temps en activant leurs voies de survie, les intégrines protègent de l'apoptose les cellules en migration [28].

➤ **Résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose**

Une cellule cancéreuse endure de nombreux stress et dommages qui menacent directement sa survie. D'une part, les cellules cancéreuses subissent beaucoup de mutations et d'anomalies chromosomiques qui normalement provoqueraient la mort de la cellule. D'autre part, au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses sont soumises à des stress forts comme une répartition hétérogène des nutriments et de l'oxygène, ou encore un pH acide, qui devraient normalement les tuer. Pour résister à la mort cellulaire, les cellules cancéreuses diminuent l'action des facteurs de mort, augmentent l'action des facteurs de survie ou effectuent ces deux actions simultanément. Par exemple, la prolifération cellulaire intense des cellules cancéreuses favorise la survie de la cellule en stimulant l'expression de facteurs de survie comme Bcl-2.

En dérégulant les voies de signalisation de la prolifération en leur faveur, les cellules cancéreuses peuvent donc bénéficier d'un double avantage : une forte prolifération et une résistance accrue à la mort cellulaire. La protéine p53 est capable d'induire l'apoptose des cellules qui présentent trop d'anomalies de survie. D'autres protéines qui déclenchent l'apoptose sont inactivées ou leur expression est diminuée dans les cellules cancéreuses pour augmenter leur capacité à survivre face aux stress et aux dommages qu'elles subissent en permanence [26].

*Deuxième partie :*  
*Traitements*  
*anticancéreux habituels*

## **I. Traitements loco-régionaux**

### **I.1 La chirurgie :**

La principale approche du traitement du cancer consiste à retirer chirurgicalement la tumeur. Autrefois, cela impliquait également l'ablation de tous les tissus et organes qui risquaient d'être atteints, y compris les tissus adjacents et les ganglions de la région. Dans certains cas, notamment dans celui du cancer du sein, cette chirurgie radicale (ablation du sein ou mammectomie) n'est plus nécessaire, ou l'est moins souvent. Les progrès des techniques chirurgicales et de l'anesthésie, la disponibilité des produits sanguins et des antibiotiques plus puissants ont permis de réduire l'ampleur des interventions et la fréquence des complications, et de raccourcir les délais de convalescence.

Malheureusement, de nombreux cancers sont découverts à des stades trop avancés pour être opérables. C'est le cas lorsque l'extension atteint des organes vitaux ou que les métastases sont déjà apparues. Il arrive cependant, dans de tels cas, que les chirurgiens choisissent d'intervenir afin de diminuer les symptômes, de réduire la taille de la tumeur et de faciliter l'action des autres traitements.

### **I.2 La radiothérapie**

Les rayonnements ionisants, provoquant des lésions sur l'ADN et induisant l'apoptose des cellules, sont utilisés pour détruire les cellules cancéreuses. Dans le cas de la radiothérapie externe, la source de rayonnement est située à distance du patient et le champ d'irradiation est adapté après repérage de la tumeur par le radiothérapeute. La curiethérapie suggère une source de rayonnement implantée dans la tumeur après absorption de molécules radioactives libérant un rayonnement à petite distance. Elle est surtout utilisée dans le cas de petites tumeurs et dans les cancers gynécologiques, les cancers du sein, de la bouche et de la peau. A la différence de la radiothérapie externe, le rayonnement photonique utilisé traverse d'abord la tumeur, où il s'atténue rapidement, ce qui permet de limiter l'irradiation des tissus sains adjacents. Elle présente alors l'avantage de pouvoir délivrer une dose importante de rayonnement dans un volume étroit avec, en principe, une dose satellite réduite.

La radiothérapie est complémentaire de la chirurgie, notamment lorsque celle-ci risque de léser les tissus voisins. Les rayonnements peuvent aussi être utilisés en association avec l'acte chirurgical. En cure préopératoire, ils permettent de stériliser les lésions tumorales et de prévenir la dissémination des cellules malignes lors de l'intervention. La radiothérapie contribue parfois à réduire le volume de la tumeur, ce qui peut faciliter l'opération ou rendre opérable une tumeur qui était auparavant inopérable. Dans certains cas, la radiothérapie est également utilisée en traitement postopératoire.

## **II. Traitements généraux**

### **II.1 La chimiothérapie**

La chimiothérapie est le traitement du cancer par des substances chimiques. Les médicaments sont véhiculés dans tout l'organisme par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Il existe un très grand nombre de médicaments anticancéreux, mais presque tous fonctionnent selon le même mécanisme : ils interfèrent avec la synthèse ou l'expression de l'ADN, ou avec les mécanismes de division cellulaire. Les cellules les plus sensibles à ces substances sont celles qui se divisent le plus fréquemment. Or, les tumeurs possèdent une plus forte proportion de cellules en cours de division que les tissus sains. Ces derniers sont donc plus résistants au traitement, mais certains d'entre eux, dont les cellules, proliférant rapidement (moelle osseuse, tissus du tube digestif), restent relativement sensibles. Les risques d'effets indésirables liés à ces tissus et organes limitent les doses que l'on peut administrer au cours des chimiothérapies.

Pour que le traitement soit efficace, il faut que la tumeur soit plus sensible au traitement que la plupart des tissus sains. Certains types de tumeurs, très sensibles aux molécules anticancéreuses, sont particulièrement désignées pour le traitement chimiothérapique. Il s'agit notamment du cancer de l'utérus, des leucémies aiguës, surtout chez les enfants, de la maladie de Hodgkin, des lymphomes disséminés à grandes cellules, des carcinomes testiculaires ou ovariens, des carcinomes à petites cellules du poumon et de plusieurs cancers chez l'enfant. Ces types de cancers sont souvent déjà disséminés lors du diagnostic et ne peuvent pas être

traités autrement que par chimiothérapie. Les deux principaux problèmes limitant l'utilisation de la chimiothérapie sont la toxicité sur les tissus sains et l'apparition d'une résistance des cellules cancéreuses. Les méthodes contrôlant la toxicité et réduisant les risques de résistance ne cessent de s'améliorer. Il importe de commencer le traitement aussi tôt que possible, de déterminer les doses optimales et de répéter les cures de traitement aussi fréquemment que possible en tenant compte de la toxicité de la molécule. L'association de plusieurs médicaments anticancéreux constitue l'une des solutions. L'association chimiothérapique emploie plusieurs substances (souvent de trois à six). Ces substances sont choisies en fonction de leur mécanisme d'action qui doit être différent afin de limiter l'apparition de résistances croisées sans additionner les effets toxiques. Chaque substance peut ainsi être utilisée à sa dose optimale sans augmentation du risque.

La chimiothérapie peut également être associée à la chirurgie et à la radiothérapie. Elle est parfois utilisée comme adjuvant, en cure postopératoire, la chirurgie étant alors le traitement de première intention.

### **II.1.1 Principales classes d'anticancéreux**

La chimiothérapie anticancéreuse est née dans les années 1940 aux États-Unis. La classification des agents anticancéreux est basée sur leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire et leur appartenance à des familles chimiques (**Figure11**).

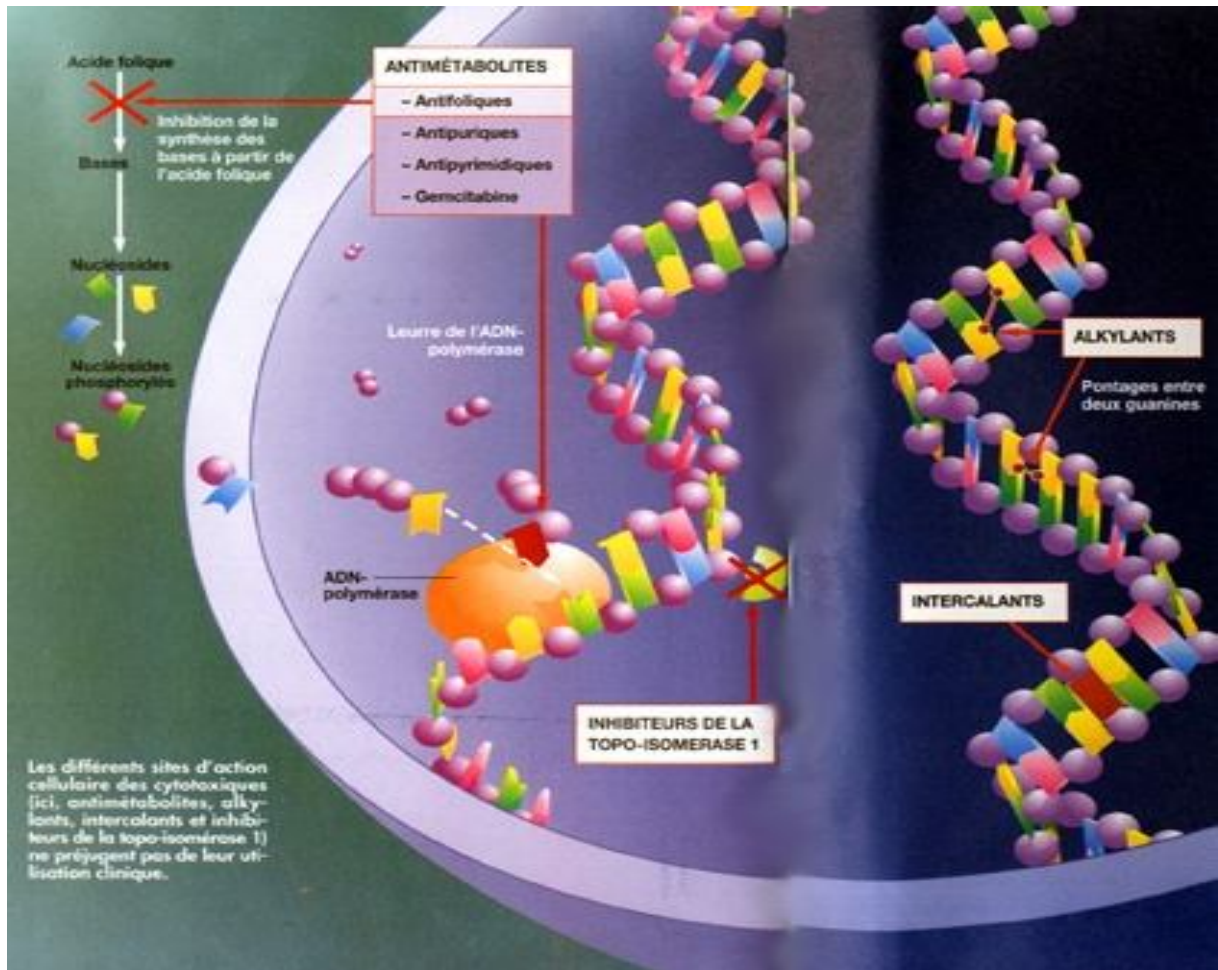


Figure 11 : les différents sites d'action cellulaire des cytotoxiques.

### Les anti-métabolites.

Ils inhibent la biosynthèse des acides nucléiques. Inhibiteur de la dihydrofolate réductase, le méthotrexate empêche la synthèse de l'acide folinique, indispensable pour la synthèse de l'uridine et de la thymidine. Cette catégorie comprend également les substances leurre, de structure chimique semblable à celles des composants métaboliques intermédiaires, et notamment les anti-pyrimidiques (leurre de la cytosine, de la thymine ou de l'uracile), dont le 5-fluoro-uracile (5-FU) ou la cytosine arabinoside, et les anti-puriques (leurre de l'adénine ou de la guanine), dont la 6-mercapto-purine ou la thio-guanine. Se rapproche de cette famille la L-asparginase qui détruit le pool de L-asparagine circulante et prive les cellules cancéreuses de cet acide aminé essentiel.

### Les agents alkylants.

Ces substances forment un lien covalent avec les acides nucléiques. Empêchant le dédoublement des deux brins d'ADN, ils inhibent la transcription et bloquent la division cellulaire. On distingue les alkylants mono-fonctionnels, comme le cyclophosphamide et les agents bi-fonctionnels pontant les deux bras d'ADN, comme le cisplatine.

Appartiennent également à cette classe de molécules les nitrosourées, comme la carmustine et la mitomycine.

### Les inhibiteurs de topo-isomérase.

Les topo-isomérase sont des enzymes indispensables pour dérouler la double hélice d'ADN avant les étapes de transcription et de réplication. On peut distinguer les inhibiteurs de topo-isomérase de type I comme l'irinotécan ou le topotécan qui empêchent la reconstitution du brin d'ADN après la coupure, et les inhibiteurs de topo-isomérase de type II comme l'étoposide qui empêche la soudure du double brin d'ADN.

### ✚ Les agents intercalants.

Les chefs de file de ces composés appartiennent à la famille des anthracyclines : doxorubicine, daunorubicine, epirubicine et mitoxantrone. De structure plane, leur mode d'action supposé initialement était une intercalation entre les brins de l'ADN. Plus récemment, un mécanisme de compétition avec les topo-isomérases a également été proposé.

### ✚ Les molécules induisant des coupures de brin.

La bléomycine semble être le seul médicament ayant une action destructive directe de l'ADN.

### ✚ Les poisons du fuseau cellulaire.

Ils empêchent la formation du fuseau mitotique et inhibent la séparation et la migration vers les pôles des chromosomes dédoublés. Les principaux médicaments en tête de cette liste sont la vincalécoblastine, la vincristine, la vindésine et la vinorelbine.

### ✚ Les taxanes.

S'associant à la tubuline, ces molécules ont la particularité de stabiliser les microtubules au détriment de la tubuline soluble et d'interrompre la division cellulaire dans la transition G2-M. Paclitaxel et docétaxel sont les deux drogues de cette famille à la disposition des cliniciens [29].

## II.2 L'hormonothérapie

Elle est utilisée dans le traitement des cancers hormono-dépendants. Cette thérapie consiste à empêcher les hormones d'influencer la croissance d'une tumeur en inhibant leur action sur la multiplication des cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, l'hormonothérapie permet de bloquer les œstrogènes et dans le cancer de la prostate, l'hormonothérapie permet de bloquer les androgènes [30] [31].

### II.3 La thérapie génique

La thérapie génique est une nouvelle approche thérapeutique utilisant l'ADN comme médicament. Cette stratégie consiste à introduire un gène étranger, appelé transgène, pour corriger un défaut génétique ou palier au déficit d'une protéine essentielle (**Figure12**). La thérapie génique a initialement suscité de grands espoirs.

Elle repose sur une idée simple : dans le cas des maladies monogéniques, le traitement consiste à remplacer le gène défectueux par le gène intact. Dans le cas des maladies acquises ou multigéniques, les choix sont plus larges et ne sont plus dictés par la génétique [32]. Malgré d'énormes avancées accomplies ces quinze dernières années afin de faire de cette utopie thérapeutique une réalité clinique, l'enthousiasme des années 90 a fait place aujourd'hui à un optimisme plus raisonné. En particulier à cause des difficultés techniques liées au transfert de gène qui ont considérablement freiné sa mise en pratique.

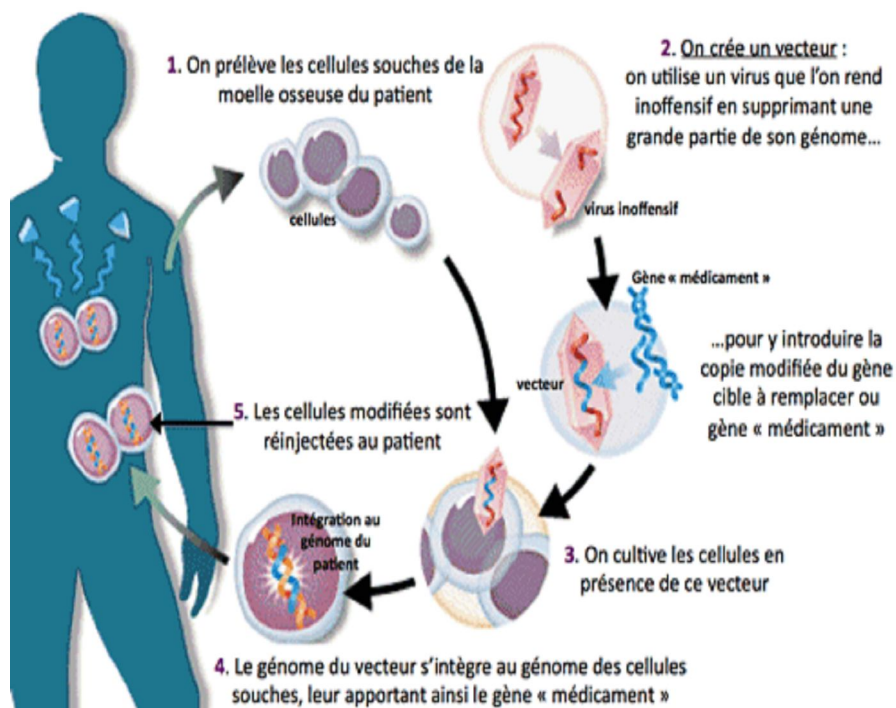


Figure 12 : Principe de la thérapie génique [33].

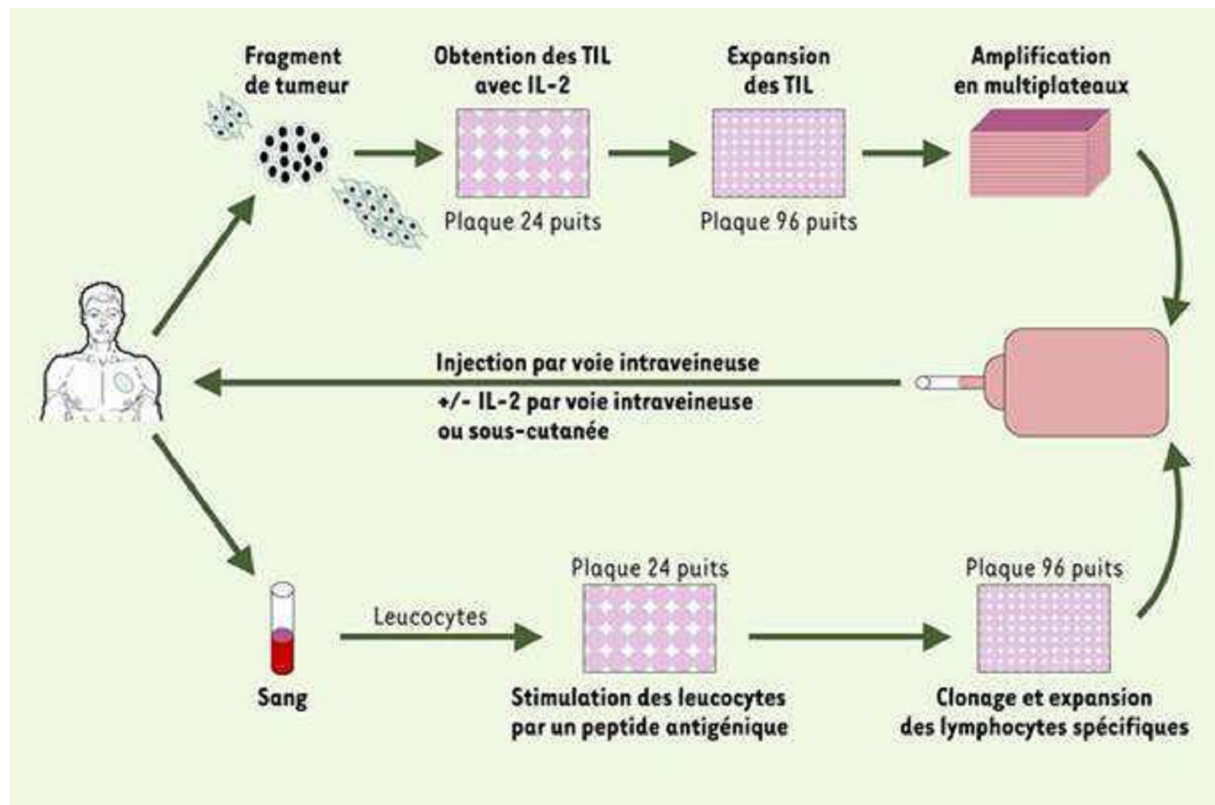
### II.3.1 Les modalités de transfert des gènes et thérapie génique

La thérapie génique a été appliquée selon des stratégies ou des modalités multiples variant selon le but recherché (complémentation ou réparation), le type de nucléotide transféré (ADN complémentaire, ADN génomique, oligonucléotide synthétique ou chimère d'ADN et d'ARN), la modalité de transfert de gène (à l'aide d'un vecteur viral ou d'un vecteur synthétique) et enfin le protocole clinique d'administration retenu (*in vivo*, *in situ* ou *ex vivo* dans des cellules préalablement prélevées et purifiées). Le transfert du gène (appelé aussi transgène) peut être opéré soit *in vivo* (injection du transgène dans la circulation générale ou dans un organe) ou *in situ* (injection directement dans le site pathologique) : il s'agira là de l'administration directe de la combinaison vecteur gène thérapeutique. Le transfert peut aussi être effectué *ex vivo* : après prélèvement des cellules du malade, une culture desdites cellules est effectuée dans des conditions de laboratoire appropriées favorisant leur multiplication, puis ces cellules sont transfectées (on dit aussi transduites) par la combinaison vecteur-gène thérapeutique et finalement réimplantées *in situ* après avoir intégré le transgène [34].

Les vecteurs de transfert de gène doivent remplir plusieurs conditions essentielles. Ils sont chargés de protéger le transgène dans le milieu extracellulaire, d'assurer la reconnaissance de la cellule à transduire et de permettre le transport du transgène jusqu'au noyau. Pour faciliter la pénétration du transgène dans la cellule ou l'organe, on utilise des vecteurs viraux ou non viraux [35].

### II.3.2 L'immunothérapie :

L'absence de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire est impliquée dans le développement et la progression des tumeurs. Ainsi, des cytokines comme l'interféron, l'IL-2 ou l'IL-12 sont employées dans le traitement de tumeurs malignes. Cependant, l'administration systémique de fortes doses de ces protéines purifiées ou recombinantes induit des effets secondaires importants et l'efficacité reste limitée. La thérapie génique a donc été proposée pour induire une production locale de cytokines antitumorales [36].



**Figure 13 :** Principe de production des lymphocytes spécifiques pour L'immunothérapie [37].

Une stratégie de thérapie génique pouvant permettre la production locale de doses thérapeutiques de cytokines, tout en améliorant la tolérance du traitement. Ainsi, des fibroblastes ont été transduit *ex vivo* à l'aide de vecteurs rétroviraux afin qu'ils expriment le gène de l'IL-12. Ces fibroblastes sont ensuite réinjectés dans le lit tumoral, afin d'induire une inflammation locale et ainsi attirer les cellules du système immunitaire dans la tumeur. Le risque est de précipiter, dans le cas de tumeurs sur cirrhose, une insuffisance hépatocellulaire.

Une autre approche d'immunothérapie par transfert de gène utilise des adénovirus réplicatifs pour délivrer les gènes de l'interleukine 1 et 2, pour le traitement de modèles de cancer pancréatique [38].

L'immunothérapie par transfert de gène peut améliorer la reconnaissance des antigènes tumoraux par les cellules du système immunitaire. Ainsi, l'alpha-foetoprotéine a servi d'antigène tumoral spécifique des carcinomes hépatocellulaires permettant au système immunitaire d'éliminer ce type de cancer. Les résultats obtenus après immunothérapie par transfert de gène sont encourageants. Cependant, ils ne concernent à l'heure actuelle que de modèles de tumeurs implantées chez l'animal [39].

#### **II.4 Thérapie ciblée: Anticorps monoclonaux:**

Au cours des vingt dernières années, une meilleure connaissance des mécanismes de l'oncogénèse, de la croissance et de la progression tumorale ont conduit à considérer davantage le cancer sous un angle « moléculaire». Dans certains cas, la connaissance des anomalies moléculaires impliquées dans le processus de cancérisation a permis de définir des éléments diagnostiques et pronostiques, en complément des données classiques histopathologiques et cliniques. Ces données peuvent aussi être utilisées pour permettre le développement d'agents anticancéreux plus ciblés, éventuellement plus efficaces. Parmi ces agents, les anticorps monoclonaux ont été développés, reposant sur l'hypothèse que les cellules tumorales exprimaient des cibles antigéniques potentielles à des niveaux plus élevés que les cellules normales. Ces épitopes pouvaient donc être ciblés par des anticorps, avec un effet anti-tumoral potentiel produit par des mécanismes faisant intervenir l'immunité via le complément ou via l'immunité cellulaire. Par ailleurs, ces anticorps monoclonaux peuvent être conjugués avec des toxines, des prodrogues, ou des molécules radioactives. Les trois anticorps monoclonaux actuellement les plus utilisés en thérapeutique oncologique ciblent des récepteurs de la famille des tyrosines kinases, HER2 [**Herceptin**\* (DCI : trastuzumab)] [40] [41] [42] [43] EGFR ou HER1 [**Erbitux**\* (DCI : cetuximab)]. La troisième cible un marqueur transmembranaire des proliférations lymphomateuses B, le CD20 : [**Mabthera**\* (DCI : rituximab)] [44] [45] [46] [47].

Trois catégories d'anticorps monoclonaux ont un intérêt en thérapeutique anticancéreuse

- Les anticorps monoclonaux non conjugués, l'anticorps monoclonal agit directement en induisant un signal de croissance négatif ou bien en induisant l'apoptose. Nous allons dans cet exposé essentiellement faire une revue de l'intérêt de ce type d'anticorps en cancérologie.
- Les anticorps monoclonaux conjugués à une drogue, l'anticorps monoclonal permettant la distribution sélective de la drogue vers les cellules tumorales. Dans certains cas, il est possible de coupler l'anticorps à une enzyme qui activera in situ une prodrogue pour la transformer en un agent cytotoxique localement efficace. Ils diminuent ainsi la toxicité générale de la drogue.
- Les anticorps monoclonaux peuvent aussi être conjugués à des éléments cytotoxiques ou radioactifs permettant la délivrance ciblée de radiations ionisantes (radio-immunothérapie).

Les caractéristiques des cibles impliquées dans une approche utilisant des anticorps monoclonaux en cancérologie :

- L'antigène doit être exprimé ou surexprimé à la surface des cellules tumorales (accessibilité).
- Il ne doit pas être exprimé de façon importante au niveau des cellules normales.
- Il doit avoir un rôle important dans la survie cellulaire.
- Il ne doit pas être relargué dans le milieu extra cellulaire sinon l'anticorps monoclonal agira avant d'arriver au niveau des cellules tumorales.
- De même le complexe antigène-anticorps ne doit pas être internalisé trop rapidement si l'on attend un effet cytotoxique de l'association.

*Troisième partie :  
La vectorisation  
nanoparticulaire*

## Introduction

Les médicaments sont traditionnellement administrés dans l'organisme soit par voie orale soit par injection, intramusculaire ou intraveineuse, en fonction des propriétés intrinsèques liées à leur structure moléculaire. La quantité finale de médicaments atteignant un site d'action correspond généralement à une très faible proportion de la dose administrée.

L'accumulation de ces substances dans des tissus qui ne sont pas impliqués dans la maladie, peut provoquer des réactions et conduire à des effets secondaires indésirables. De ce fait, l'administration de ces substances est adaptée en fonction de la balance risque/bénéfice.

Pour remédier à ce type de problème, une approche consiste à appliquer des médicaments directement aux sites d'action en utilisant des moyens d'administration locale (sprays, inhalateurs, crèmes, solutions nasales ou oculaires, etc.). Cependant, ce mode d'administration n'est possible que dans la mesure où les tissus sont aisément accessibles. Cette approche n'est donc pas utilisable comme thérapie anticancéreuse, car les tumeurs et surtout les métastases ne sont pas accessibles directement.

La vectorisation des médicaments constitue une voie prometteuse permettant de pallier à ces problèmes [48].

## **I. Généralités sur le système de vectorisation :**

### **I.1 Historique :**

L'origine de la vectorisation des principes actifs remonte au milieu des années soixante. Judah Folkman (université d'Harvard), en faisant circuler le sang d'un lapin à travers un tube préalablement exposé à un anesthésiant, provoqua l'endormissement du lapin [49].

En constatant que le tube pouvait jouer le rôle d'un « réservoir » qui peut permettre de libérer la drogue, différents matériaux et applications ont été développés par Alza, start up créée avec Alejandro Zaffaroni. Parmi les « macro » vecteurs commercialisés, on trouve le Vaginal Ring\* (contenant un contraceptif déposé dans le col de l'utérus) et Ocusert\* (contenant la pilocarpine contre le glaucome déposé sur la rétine) [50].

Trois dimensions ont été utilisées pour la vectorisation entre 1970 et 1980, macros puis micros et enfin nanos-objets [50].

Cette notion de réservoir n'est que la première étape nécessaire pour développer des nano-vecteur d'agents anticancéreux qui ciblent les tumeurs solides. Une fois la drogue chargée, les nano-vecteurs doivent la transporter à travers la circulation sanguine, atteindre la tumeur et dans les meilleurs des cas, pénétrer les cellules tumorales et libérer la drogue une fois l'intérieure.

### **I.2 Définition du système de vectorisation :**

La vectorisation est une méthode qui consiste à associer des principes actifs à un système de transport pour les transporter à travers l'organisme jusqu'au site à traiter. Dans ce cas, les principes actifs sont encapsulés et protégés par un vecteur, puis délivrés de façon contrôlée sur un laps de temps optimal, ce qui conduit à une augmentation de leur efficacité après injection. En conséquence, les concentrations et fréquences d'injection peuvent être diminuées permettant ainsi une meilleure tolérance vis à vis du traitement.

### **I.3 Caractéristiques principales des systèmes de vectorisation :**

Dans un système de vectorisation, le vecteur est l'élément clé. C'est un objet conçu pour transporter une grande quantité de principes actifs tout en les protégeant et en limitant son activité pendant le trajet vers les zones ciblées. Pour être efficace et utilisable en clinique, le vecteur idéal doit présenter certaines caractéristiques :

- Sa composition doit faire intervenir des composés relativement stables en milieu physiologique, non toxiques pour l'organisme, biocompatibles et biodégradables, de manière à faciliter leur élimination ultérieure
- Sa taille doit permettre à la fois le transport d'une quantité suffisante de principe actif et sa diffusion à travers certaines barrières physiologiques (barrière de l'endothélium, barrière hémato-encéphalique, organe, tissu, cellule, noyau cellulaire, etc.) pour atteindre la cible
- Il doit garder le principe encapsulé de façon stable et active, posséder une grande spécificité vis-à-vis des cellules ciblées et rester le plus longtemps possible dans la circulation sanguine pour pouvoir atteindre sa cible
- Le vecteur doit être suffisamment stable face à toutes les dégradations et interactions avec les biomolécules pendant son transport (notamment les protéines plasmatiques dans le cas d'une administration intraveineuse) et éviter les interactions en dehors de la zone visée
- Une fois arrivé au niveau de la zone à traiter, il doit délivrer le médicament à proximité ou à l'intérieur des cellules ciblées. Ce processus de libération contrôlée est envisageable grâce aux propriétés de composés associés au vecteur (rupture enzymatique, liaison réversible, sensibilité à une variation du milieu comme le pH, la température, la force ionique, l'état d'oxydo-réduction)
- Enfin, il doit résister à la stérilisation et être aisément stocké et administré.

Le principe actif encapsulé dans le vecteur est un élément tout aussi important dans la vectorisation. Il peut être de différente nature selon le type de thérapie envisagée : il peut

s'agir de molécules d'ADN ou d'oligonucléotides dans le cadre de la vectorisation de gènes ou « thérapie génique », d'agents anticancéreux pour la chimiothérapie, de facteurs de croissance, par exemple dans le cadre d'une thérapie réparatrice de lésions du système nerveux central ou encore de marqueurs radioactifs, magnétiques ou fluorescents en vue d'une application diagnostique. La méthode d'encapsulation varie en fonction du principe actif.

#### **I.4 Les avantages de la vectorisation :**

##### **a. Protection de la molécule encapsulée**

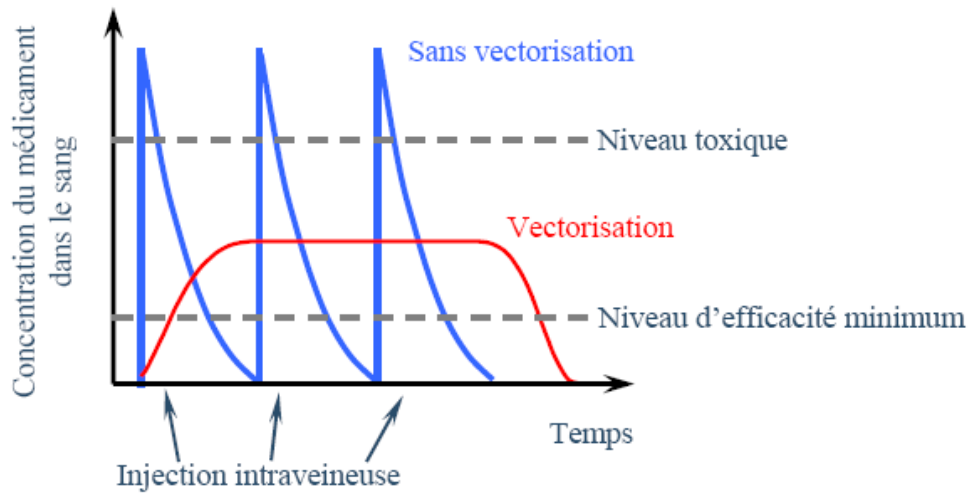
Beaucoup de molécules biologiquement actives sont instables physico-chimiquement ou biochimiquement lorsqu'elles se trouvent dans le corps humain. Leur encapsulation dans des vecteurs permet de les protéger contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. De cette manière on peut améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules, ce qui est utile si les principes actifs choisis sont à faible durée de vie *in vivo*.

##### **b. Réduction des effets secondaires et/ou toxiques des principes actifs**

Pour certaines maladies, notamment le cancer, les molécules employées comme traitement peuvent s'avérer toxiques alors qu'il est nécessaire d'en injecter des quantités importantes et/ou de répéter les injections pour obtenir un effet thérapeutique. L'encapsulation de ces principes actifs dans des vecteurs permet une libération prolongée des principes actifs et donc une diminution du nombre d'injections.

##### **c. Amélioration des profils pharmacocinétiques**

Les fluctuations de concentration en principe actif dans le sang peuvent être réduites en contrôlant la libération de celui-ci, ce qui permet de la maintenir dans la zone d'efficacité thérapeutique (**Figure 14**).



**Figure 14** : Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.

En effet, la concentration en médicament doit dépasser le niveau minimum d'efficacité, tout en restant inférieure au niveau toxique. Le contrôle de la vitesse de libération du principe actif encapsulé dans un vecteur particulière peut alors permettre d'assurer une concentration quasi constante, comprise entre ces deux niveaux, pendant une durée bien supérieure à celle obtenue avec une administration classique. Le principe actif encapsulé dans un vecteur pourra être libéré progressivement par dégradation de la particule sous l'effet de certains facteurs précis (pH, température, présence de certaines enzymes, magnétisme) ou par diffusion du principe actif. Ceci permet de maintenir la concentration en principe actif dans la fourchette souhaitée.

#### **d. Sélectivité de la libération :**

Dans certaines conditions, la vectorisation peut apporter un ciblage du médicament grâce à des ligands à la surface des vecteurs qui sont capables d'interagir avec des cellules cibles [51].

Ceci permet à la fois de limiter la biodistribution de médicament au sein de l'organisme et de réduire les effets secondaires indésirables au niveau des organes sains. Ainsi, la sélectivité et la spécificité de ces particules vis-à-vis de la cible peuvent permettre d'améliorer l'efficacité du principe actif.

## I .5 Stratégies de ciblage :

L'injection d'un vecteur chargé en principe actif dans l'organisme ne suffit pas toujours à améliorer l'effet de celui-ci. Il faut s'assurer que les molécules soient libérées au plus près possible de la zone à traiter sinon on risque de provoquer des effets secondaires, et d'observer l'opsonisation du vecteur. La libération à des endroits non stratégiques des principes actifs conduit à une intervention ratée.

Il existe plusieurs méthodes pour favoriser la présence des vecteurs à un endroit précis. Ce concept est défini sous le terme de ciblage. Il a été proposé dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par le Dr Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine 1908) qui a imaginé une « magic bullet », vecteur capable d'interagir spécifiquement avec un tissu ou une cellule donné [52].

Le ciblage constitue la délivrance du principe actif à proximité d'un tissu ou d'un type cellulaire. Il peut se faire soit par accumulation du vecteur qui va libérer les molécules qu'il contient au fur et à mesure de sa dégradation ou par endocytose, soit par déstabilisation de ce vecteur lorsqu'il circule à proximité de la cible.

On distingue deux types de ciblage : passif et actif.

### I .5.1 Ciblage tumoral passif : « effet EPR »

Dans le cas des tumeurs solides, les vaisseaux de la tumeur présentent des ouvertures entre les cellules endothéliales qui permettent un approvisionnement important en nutriments et permettre ainsi une croissance rapide de la tumeur. Cette structure anormale des vaisseaux engendre une fuite importante des composés plasmatiques, comme les macromolécules, les nanoparticules ou les particules lipidiques, vers la tumeur. De plus, du fait de la déficience de système lymphatique dans les tissus tumoraux, les composés plasmatiques s'accumulent dans la tumeur [53].

Ce phénomène, décrit il y a une vingtaine d'années et appelé effet EPR pour Enhanced Permeability and Retention, est mis à profit pour permettre la libération de composés thérapeutiques d'une manière passive au sein des tumeurs solides (**Figure15**). On l'appelle « le ciblage passif » des tumeurs. Les composés thérapeutiques de taille appropriée peuvent

traverser les vaisseaux perméabilisés mais aussi s'accumuler dans le compartiment où se situe la tumeur. Il est possible, en un à deux jours, d'atteindre de fortes concentrations locales en principe actif, 10 à 50 fois supérieures à celles obtenues dans les tissus sains [54].

Le ciblage passif nécessite l'utilisation de composés stables, non agrégés, furtifs et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du composé dans les tumeurs. Il nécessite aussi que les composés aient une taille appropriée qui ne dépasse pas la taille de pores des vaisseaux perméabilisés (entre 380 et 780 nm) [55] et qui ne soit pas trop petite. En effet, l'effet EPR est négligeable pour les petites molécules qui peuvent se redistribuer dans la circulation sanguine par diffusion et/ou convection et sont éliminées préférentiellement par voie rénale [56]. Enfin, la taille de la tumeur est un paramètre important.

L'effet EPR est plus marqué dans les tumeurs de petite taille, ce qui est probablement lié à une plus grande densité des vaisseaux par rapport aux tumeurs de grande taille présentant une région avasculaire [57].

Les limitations du ciblage passif ont contribué au développement d'une approche alternative, le ciblage actif.

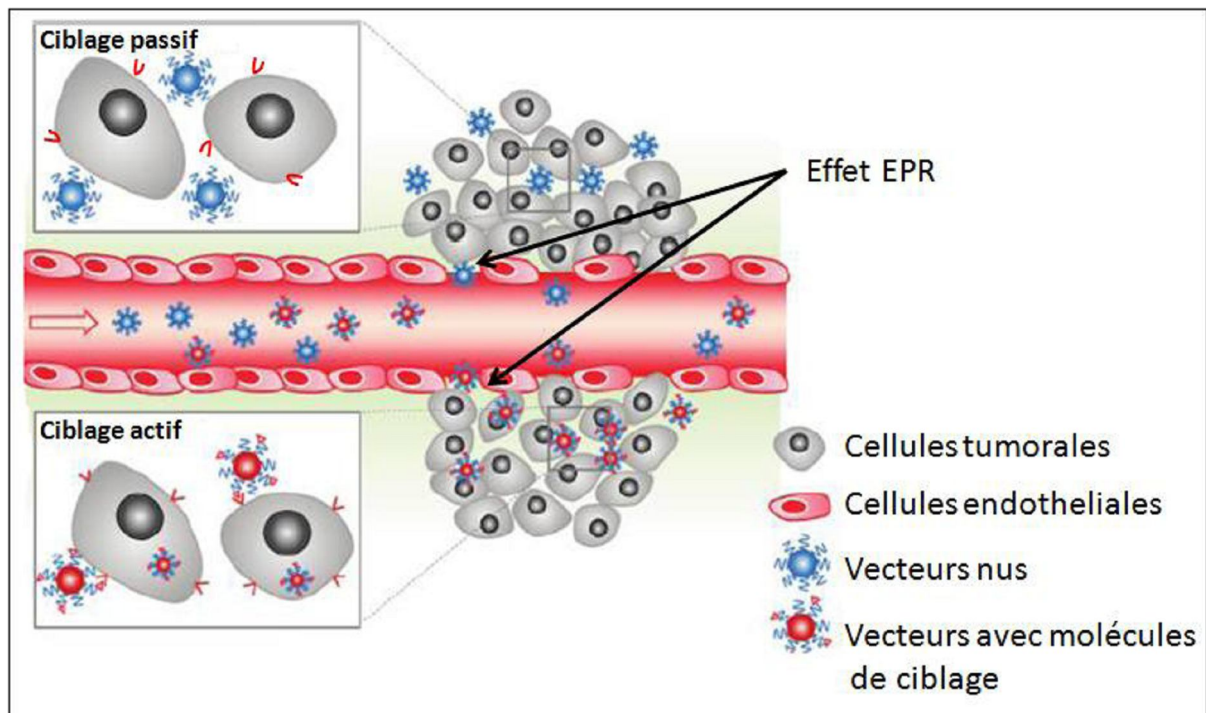
### **I .5.2 Ciblage tumoral actif :**

Les nombreux progrès réalisés dans les domaines de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génomique ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de formation des tumeurs, à l'identification de cibles et ont encouragé le développement d'approches de ciblage actif des tumeurs (**Figure 15**). Le ciblage actif de tumeur par des nanovecteurs repose sur deux éléments, la cible et la molécule reconnaissant la cible, qui doit être greffée sur le vecteur lui-même.

Le choix de la cible biologique doit répondre à différents critères :

- La cible doit être accessible : elle doit être exprimée à la surface des cellules et si possible être à proximité de la circulation sanguine.

- La cible, appelée récepteur ou antigène, doit être spécifique de la zone tumorale ou au moins, être exprimée plus fortement au sein des tumeurs que dans les autres tissus.
- Il doit exister un ligand ayant une grande sélectivité et une forte affinité pour la cible, l'idéal étant de disposer d'anticorps en raison de leur spécificité.



**Figure 15 :** Représentation schématique de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), du ciblage passif et du ciblage actif [57].

## II. Les nanoparticules

### II.1 Définition

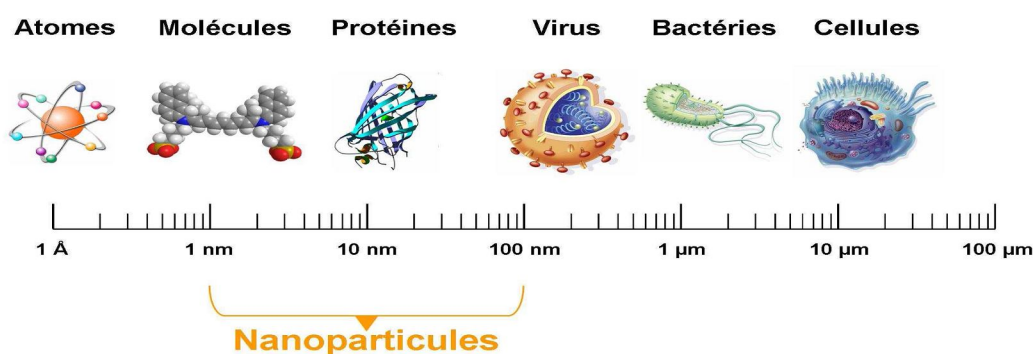
Le mot nanoparticule vient du grec « nano » qui signifie nain, et de particule qui désigne la quantité la plus infime d'un corps. Outre cet aspect étymologique, le préfixe nano désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre ( $10^{-9}$  m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet qui a une taille comprise entre 1 et 100 nm sur au moins une de ses dimensions.

En octobre 2011, la commission de l'union européenne a défini un nanomatériau comme « un matériau dont les constituants principaux ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm » [58].

Une nanoparticule est alors un assemblage d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm.

Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm. Ces particules, bien que de taille nanométrique, étant désignées comme submicrométriques.

A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (**Figure 16**).



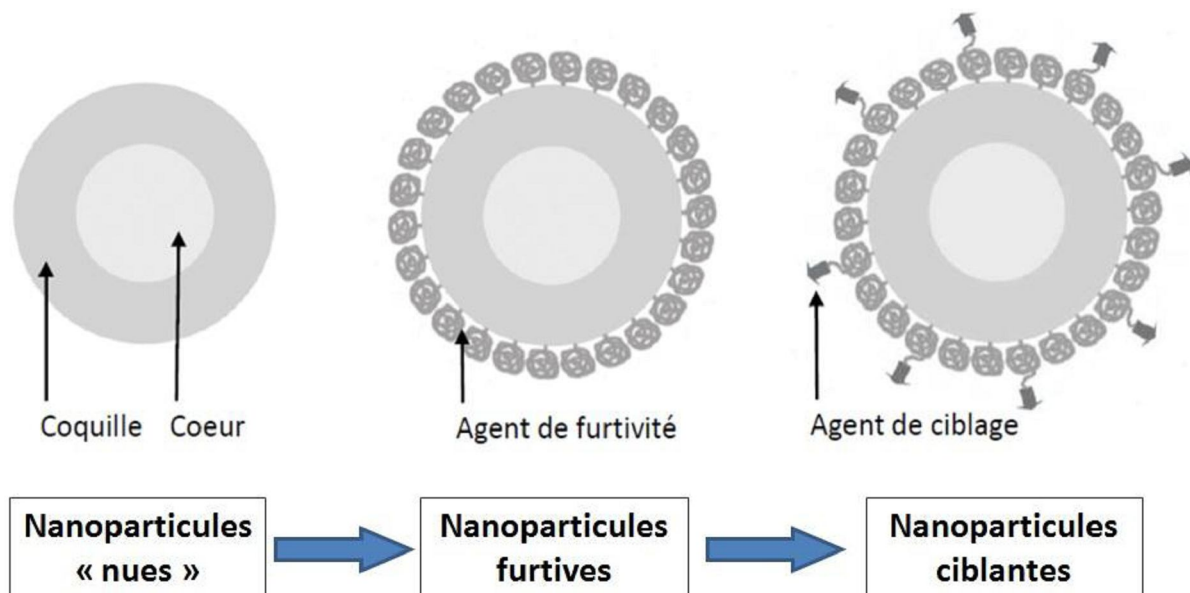
**Figure 16** : Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques.

## II.2 Histoire :

L'amélioration des procédés de vectorisation et la compréhension des phénomènes biologiques ont permis de développer différents vecteurs qui peuvent être utilisés en fonction des besoins. Il n'existe pas de vecteur universel, chaque problématique possède sa/ses propres solutions.

Ils peuvent être classés en trois groupes appelés générations correspondants à l'évolution historique de la Recherche scientifique (**Figure 17**) [59].

Cette classification concerne surtout les systèmes colloïdaux de taille submicronique.



**Figure17** : Schéma des trois générations de nanoparticules.

### **II.2.1 Première génération : Nanoparticules nues**

Elles sont le plus souvent constituées de polymère tel que le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) « nu » c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de groupements fonctionnels spécifiques en surface.

De fait, ces vecteurs sont généralement hydrophobes et présentent sur leur surface des groupements anioniques (carboxylates pour le PLA ou le PLGA) [60].

Une fois injectés par voie intraveineuse, ils vont s'accumuler préférentiellement dans le système réticulo-endothélial (RES), c'est-à-dire principalement le foie, la rate et les reins. Ceci est le résultat de leur opsonisation rapide, quelques minutes après leur injection. Ces vecteurs sont effectivement rapidement reconnus comme des corps étrangers et les opsonines (protéines cationiques présentes dans le sang) vont s'adsorber sur leur surface pour favoriser leur reconnaissance puis leur phagocytose par les macrophages [61].

Les macrophages sont présents en nombre dans le foie et la rate ce qui explique la concentration des particules dans ces organes (tropisme hépatosplénique).

Cette caractéristique est utile pour le ciblage de ces organes notamment dans le cas de cancer du foie. On a pu ainsi vectoriser de la doxorubicine grâce à des liposomes qui vont s'accumuler dans le foie. La localisation préférentielle des particules permet de limiter les effets secondaires liés à la doxorubicine qui peut être toxique en particulier pour le cœur [59]. La taille des vecteurs est aussi un paramètre important : ils ne doivent pas être trop petits au risque d'être éliminés par les reins dont les pores mesurent quelques nanomètres de diamètre, ni trop gros car ils risqueraient de boucher les plus petits capillaires sanguins.

### **II.2.2 Deuxième génération : Nanoparticules furtives:**

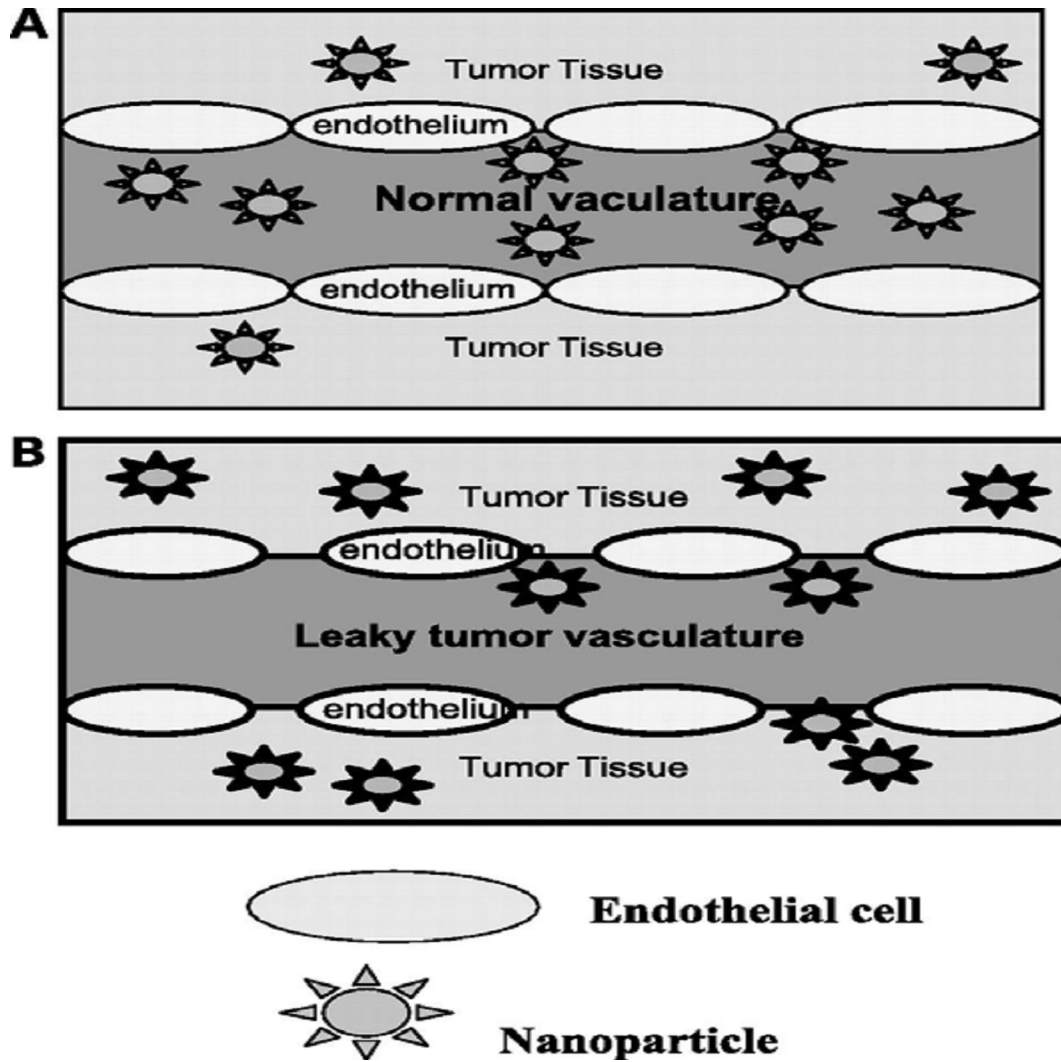
Ces nanoparticules ont été développées pour limiter, sinon bloquer, les phénomènes d'opsonisation et de phagocytose. Il s'agit d'une évolution des vecteurs de première génération qui consiste à modifier leur surface soit en recouvrant le polymère constitutif du colloïde, soit en le modifiant pour rendre l'adsorption des opsonines défavorable et ainsi permettre une prolongation du temps de résidence des particules dans le système sanguin.

On parle alors de « furtivité » des vecteurs. Les molécules qui recouvrent la surface des particules vont induire un encombrement stérique qui va empêcher la reconnaissance du vecteur comme corps étranger.

Ceci est basé sur les travaux de Pierre Gilles de Gennes (prix Nobel de physique 1991) et son concept de répulsion stérique [62].

La furtivité est particulièrement utile pour prolonger la durée de résidence des vecteurs dans la circulation sanguine (et donc les principes actifs qu'ils contiennent). On passe d'un temps de circulation de quelques minutes pour les vecteurs de 1ère génération à quelques heures [63] ce qui permet de cibler des organes autres que ceux du système hépatosplénique et notamment les tumeurs grâce à l'effet « EPR »(Enhanced Permeability and Retention).

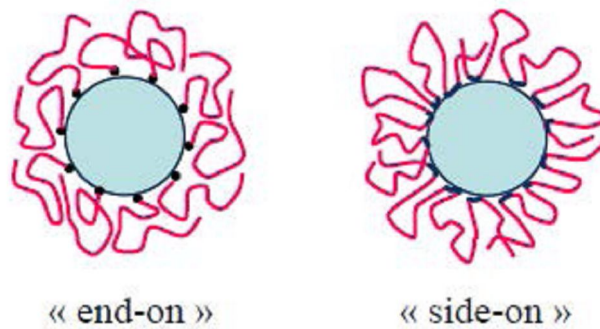
En effet, dans le cas de tumeurs, on observe une hausse de la vascularisation en périphérie de celles-ci et donc potentiellement une plus grande accumulation des particules. Ce « ciblage » est particulièrement favorisé en raison de « l'effet EPR » : au niveau des tissus pathologiques l'endothélium vasculaire est plus perméable qu'au niveau des tissus sains [64] de par l'existence de défauts dans la structure endothéliale et la migration des particules des vaisseaux sanguins vers les tumeurs va être favorisée (**Figure 18**).



**Figure 18** : Représentation de l'état de l'endothélium cellulaire au voisinage des tissus sains (A) ou des tumeurs (B) [65].

Les principales molécules utilisées pour rendre furtives les particules sont les poly(éthylène glycol) (PEG) qui sont des polymères hydrophiles. A concentration suffisamment élevée, ils vont adopter une conformation en forme de brosse, dite « end on » (**Figure 19**), à la surface de la particule et donc considérablement limiter l'interaction entre les opsonines et le vecteur. Cette conformation résulte du fait que les PEGs sont greffés ou adsorbés sur la matrice par une de leurs extrémités. Lorsqu'un tensio-actif possède plusieurs point d'attache sur la matrice, on observe une conformation « side-on »

La Figure 19 schématise l'absorption de molécules tensio-actives (en rouge) à la surface de particules (en bleu) [66]. La conformation « end-on » est obtenue lorsque le tensio-actif ne possède qu'un seul point d'ancrage tandis que pour la conformation « side-on », la molécule possède plusieurs sites de fixation.



**Figure 19** : Schéma représentant la conformation « end on » et « side on » des particules [66].

### II.2.3 Troisième génération : Nanoparticules ciblant

Appelées aussi nanoparticules à reconnaissance moléculaire, elles permettent un ciblage choisi des particules envers un type de cellule spécifique. Leur fonctionnement suit le même principe que le système « clef-serrure ».

Ceci implique que les caractéristiques de surface des cellules visées soient suffisamment connues et différentes des autres pour que le ciblage soit efficace et que seules les cellules

visées le soient (accumulation préférentielle des particules et donc diminution des effets secondaires dus à la non spécificité).

Ces vecteurs sont obtenus en greffant sur des vecteurs de deuxième génération des molécules (anticorps, ligands, ...) pouvant reconnaître un marqueur particulier présent à la surface de la cellule ciblée [66]. Une fois dans le corps humain, les particules vont être reconnues par les récepteurs de la membrane cellulaire via la formation d'un complexe ligand-récepteur. Toutefois il existe un équilibre difficile à trouver entre la furtivité nécessaire aux vecteurs pour qu'ils possèdent une durée de vie suffisante pour atteindre leur cible et la reconnaissance voulue [59]. La quantité de ligand présent à la surface des particules doit être suffisante pour favoriser le ciblage, mais si elle est trop importante la furtivité peut être défavorisée surtout si le ligand est hydrophobe et/ou chargé négativement et donc les particules vont être considérées comme des vecteurs de première génération et être opsonisées.

De l'acide folique [67], des anticorps monoclonaux [68] ou des peptides [69] ont, entre autres, été greffés en surface de particules pour favoriser la reconnaissance avec un type cellulaire particulier.

Le ciblage actif d'un type cellulaire précis est obtenu grâce aux vecteurs de troisième génération. Il faut donc avoir suffisamment de connaissance des récepteurs présents à la surface des cellules pour favoriser l'accumulation des particules à proximité.

#### **II.2.4 Nanoparticule multifonctionnelle :**

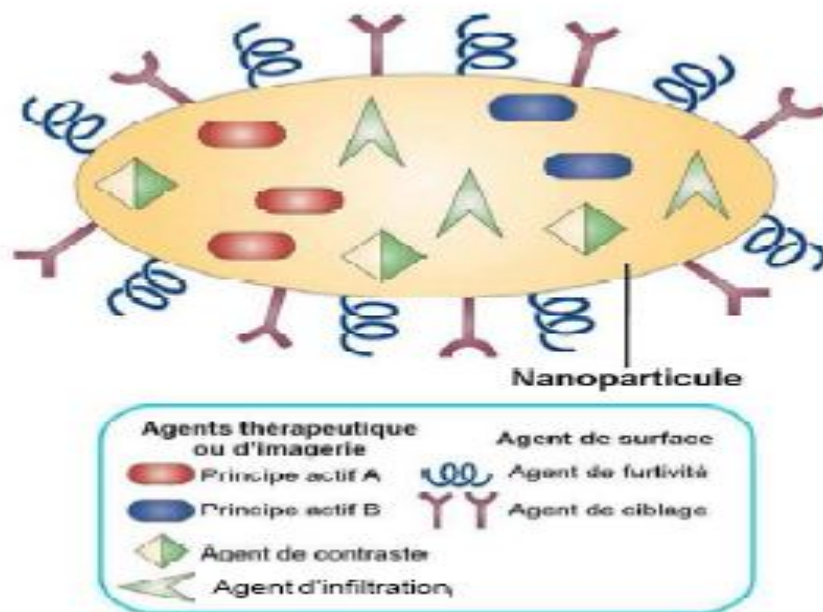
Le concept de nanoparticule multifonctionnelle décrit par Ferrari [70] prend en compte toutes les considérations citées précédemment et est illustré dans la **Figure 20**.

Une telle nanoparticule a la capacité de transporter un ou plusieurs principes actifs, ainsi qu'un agent de contraste permettant son suivi dans l'organisme du patient. La présence d'agents de furtivité à la surface des particules permet d'éviter leur capture par les macrophages et augmente leur temps de circulation dans l'organisme. Les agents d'infiltration permettent de traverser les barrières biologiques (telles que la paroi des vaisseaux sanguins) qui se dressent entre les nanoparticules et la zone ciblée. Enfin, les agents de ciblage

(anticorps par exemple) greffés sur la NP autorisent un ciblage actif et favorisent donc l'accumulation dans le tissu cible et/ou l'internalisation par les cellules visées [70].

La nanoparticule constitue alors une plateforme sur laquelle viennent se placer :

- L'agent de furtivité,
- L'agent de ciblage,
- L'agent d'infiltration,
- L'agent de contraste,
- L'agent thérapeutique.



**Figure 20:** Nanoparticule multifonctionnelle [70].

### II.3 Les caractéristiques physico-chimiques :

Les caractéristiques physico-chimiques souvent évoquées lors du développement de nouveaux vecteurs sont la taille, la charge, la forme, la stabilité, la solubilité et le taux de chargement. L'élaboration de suspensions de vecteurs uniformes est nécessaire afin de comprendre l'influence de ces caractéristiques lors des études *in vitro* et *in vivo*.

#### a) La taille

Il s'agit de la taille du rayon hydrodynamique des nano-objets. La technique souvent utilisée est la diffusion dynamique de la lumière (DLS, dynamic light scattering), appelée aussi diffusion quasi élastique de la lumière. Lors de la mesure de la taille, un indice très important, la polydispersité (PDI polydispersity index), est déterminé. Cet indice indique si la taille des nano-objets en solution est homogène ( $PDI < 0,15$  = la taille est homogène,  $PDI > 0,2$  = la taille est hétérogène). Il est calculé selon la méthode des cumulants [71].

La taille des vecteurs est un critère important dans le domaine de la vectorisation d'agents anticancéreux car leur mode d'accumulation dans les tumeurs se fait par l'effet EPR [72].

Aujourd'hui, il est admis que pour éviter la clairance rapide des vecteurs, la taille doit se situer entre 50 et 200 nanomètres : autour de 50 nm pour éviter la filtration par les reins et le passage probable dans les espaces interstitiels hépatiques puis inférieure à 200 nm pour s'accumuler dans les tumeurs par l'effet « EPR » [73] [74] [75].

#### b) La charge

Il s'agit de la charge globale de la surface des nano-objets. La technique utilisée est la migration électro-phorétique. Les nano-objets doivent être chargés soit positivement soit négativement pour éviter leur agrégation en solution. Les nanoparticules chargées positivement sont les plus internalisées par rapport aux nanoparticules chargées négativement ou neutres [74]. D'autre part, les nano-vecteurs fortement chargés (autour de 30 mV, quelle que soit la charge, positive ou négative) sont rapidement éliminés de la circulation sanguine [76]. Afin de réduire les interactions électrostatiques entre ces vecteurs chargés et les protéines sériques, des PEG sont souvent greffés à la surface de ces objets [77].

**c) La forme**

Le plus souvent, les nano-vecteurs des agents anticancéreux ont une forme sphérique comme les liposomes et les micelles. Cela est dû aux molécules amphiphiles souvent utilisées dans les formulations qui, en s'agréant, exposent spontanément un maximum de surface avec le milieu, formant ainsi des vésicules. Actuellement, aucune étude ne montre clairement que la forme des objets nanométriques (de très petite taille) influence l'activité des vecteurs, néanmoins cette caractéristique est de plus en plus prise en compte dans la vectorisation [78] [79] [80].

**d) La stabilité**

Elle désigne la libération de la drogue par les vecteurs au cours du temps. Ce relargage de la drogue doit être suffisamment lent pour que les nano-vecteurs puissent atteindre les tumeurs et pénétrer dans les cellules mais la stabilité ne doit pas être trop importante pour libérer la drogue une fois dans les cellules. Si la drogue est libérée instantanément dans le sang, le vecteur n'aura aucun rôle, de même si la drogue, une fois à l'intérieur des cellules, reste confinée dans les vecteurs, elle ne pourra atteindre sa cible.

**e) La solubilité**

Un des problèmes de certains agents anticancéreux est leur faible (ou l'absence de) solubilité dans l'eau. Exemple avec le cisplatine qui présente une solubilité de 1 mg/mL. Cette contrainte requiert l'injection de cette drogue avec une perfusion longue pour atteindre la concentration efficace ou impose l'addition d'adjuvants, par exemple, lors de l'administration du paclitaxel [81] [82]. L'augmentation de la solubilité de ces drogues est souvent évoquée après leur encapsulation dans des nano-vecteurs.

**f) Le taux de chargement**

Le taux de chargement présente le rapport entre la quantité de la drogue véhiculée et la quantité des molécules utilisée comme vecteur. Aujourd'hui, on essaye de plus en plus d'avoir des vecteurs avec un taux de chargement important permettant ainsi de véhiculer un maximum de drogue avec un minimum de vecteurs. Des modifications chimiques peuvent être

apportées sur la drogue pour augmenter son interaction avec le vecteur. Par exemple Perez-Zolez et son équipe ont augmenté l'hydrophobicité du cisplatine pour le vectoriser dans des liposomes [84]. La même stratégie est utilisée par Dhar et son équipe pour vectoriser la même drogue dans des nanoparticules de co-polymères [85].

Ces prodrogues lipophiles de cisplatine synthétisées permettent de charger ces deux systèmes (liposomes ou nanoparticules) avec plus de 18 % en cisplatine [86].

Ces deux stratégies et d'autres encore [83] [87] visent le même but, celui de charger au maximum les vecteurs en drogue.

#### **II.4 Méthodes de préparation des nanoparticules**

Les nanoparticules présentent de nombreux intérêts par rapport aux autres formes vecteurs, essentiellement liés à leur faible taille permettant d'envisager l'administration parentérale et en particulier intraveineuse, leur grande surface spécifique qui facilite l'adsorption en surface et offre ainsi de meilleures possibilités de ciblage et aussi leur stabilité par rapport aux liposomes. Les nanoparticules se sont avérées être des vecteurs très intéressants pour de nombreux principes actifs administrés par voie parentérale, orale ou topique (anticancéreux, anti-inflammatoires, antifongiques, protéines...) en fonction de la nature des polymères ou des lipides utilisés.

De nombreuses techniques existent pour la préparation des nanoparticules ; ce qui a l'avantage d'offrir la possibilité de produire des nanoparticules de structure et propriétés physico-chimiques désirées. Le choix de la méthode dépend essentiellement des propriétés du principe actif (solubilité, coefficient de partage) et du matériau encapsulant (polymère ou monomère) ainsi que des propriétés souhaitées pour les particules. Pour le matériau encapsulant, le choix est déterminé principalement par des critères comme la biocompatibilité, la biodégradation, la voie d'administration et le profil de libération de principe actif.

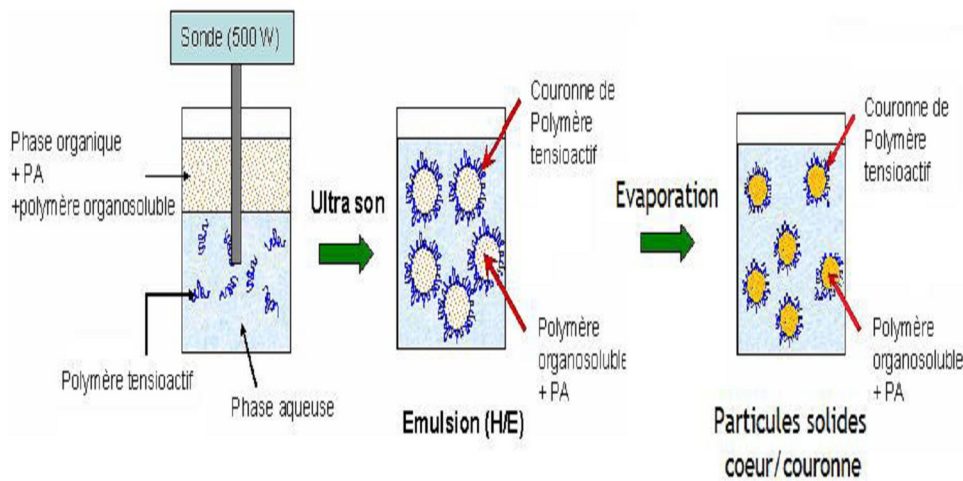
Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères sont basées soit sur des mécanismes de polymérisation de monomères soit sur l'utilisation de polymères préformés, afin de contourner les inconvénients liés à la polymérisation in situ. Les méthodes de préparation des nanoparticules lipidiques peuvent nécessiter quant à elles la mise en œuvre de méthodes spécifiques [88] [89].

## II .4.1 Méthodes de préparation utilisant des polymères préformés :

Le principe de ces méthodes, développées plus récemment que les méthodes de polymérisation, consiste à insolubiliser un polymère préalablement dissous dans un solvant, pour former des nanoparticules solides. Les méthodes diffèrent essentiellement par le fait d'utiliser ou non une étape préalable d'émulsification et par la façon de provoquer l'insolubilisation du polymère.

### II.4.1.1 Emulsification - évaporation de solvant :

L'émulsion/évaporation de solvant consiste à former une émulsion préalable à partir de deux phases non miscibles. La phase continue contient des tensioactifs, moléculaires ou polymères, qui s'adsorbent alors à l'interface liquide/liquide et stabilisent ainsi l'émulsion. La phase dispersée contient le ou les polymères destinés à former le cœur des particules. Un apport d'énergie (agitation mécanique, vortex ou ultrasons...) est nécessaire pour former les gouttes. Dans le cas de la fabrication de nanoparticules, des ultrasons sont couramment utilisés. Une fois les nanogouttes formées, le solvant organique est évaporé dans une seconde étape. C'est pourquoi il doit être volatil. Une dispersion de nanoparticules solides est alors obtenue (**Figure 21**).



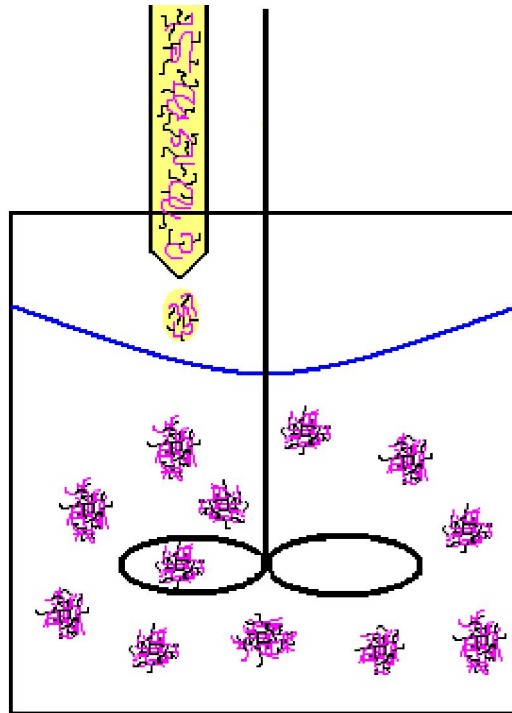
**Figure 21** : Obtention de nanoparticules par émulsion/évaporation de solvant.

L'avantage majeur du procédé d'émulsion/évaporation de solvant est l'efficacité d'encapsulation des principes actifs hydrophobes. Du fait de la non miscibilité des deux phases employées [90], le principe actif hydrophobe est majoritairement présent dans la phase discontinue et se trouve ensuite encapsulé au cœur des particules.

#### **II.4.1.2. Nanoprécipitation :**

Cette méthode, qui requiert l'emploi de deux solvants miscibles, est fondée sur l'interdiffusion de ces derniers quand ils sont mis en contact. Le polymère est solubilisé dans un premier solvant organique (bon solvant). Le deuxième solvant doit être choisi de façon à être miscible avec le premier, mais ne doit pas solubiliser le polymère (non-solvant). Ce deuxième solvant est en général l'eau. Il peut contenir des tensioactifs permettant la stabilisation des particules formées lors de la précipitation de la goutte organique au contact de l'eau. Toutefois, si le polymère étudié est amphiphile, il peut lui-même jouer le rôle de tensioactif.

L'ajout goutte-à-goutte et sous agitation de la solution de polymère dans le non-solvant entraîne la formation des nanoparticules par précipitation du polymère (**Figure 22**). L'utilisation de solutions diluées permet une précipitation du polymère à l'échelle nanométrique. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation ou par dialyse.



**Figure 22** : Obtention de nanoparticules par nanoprécipitation.

L'élaboration de nanoparticules par nanoprécipitation conduit à des objets de tailles plus petites par rapport à d'autres méthodes comme l'émulsion/évaporation de solvant, ainsi qu'à des distributions de tailles plus étroites [91]. Cette réduction de la taille des nanoparticules contribue à accroître la stabilité du système colloïdal (pas de phénomène de sédimentation par exemple). La nanoprécipitation est donc particulièrement intéressante en termes de stabilité lors de la préparation de dispersions et de leur stockage.

Cette méthode est facile à mettre en oeuvre et permet d'utiliser des solvants non toxiques. Elle est également plus économique que l'émulsion-évaporation de solvant car l'apport d'énergie (agitation magnétique) est moindre par rapport au précédent procédé (ultrasons).

L'inconvénient majeur de la nanoprécipitation est sa faible efficacité d'encapsulation du principe actif par rapport au procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Néanmoins, il est possible d'améliorer l'encapsulation des principes actifs hydrophobes lorsque le non-solvant employé est l'eau [92] [93] [94].

### II.4.1.3. « Salting out » :

Contrairement au précédent, le procédé de « salting out » passe par une étape d'émulsification préalablement à la production de nanoparticules. Le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant organique miscible à l'eau, généralement l'acétone. Une émulsion huile/eau est obtenue en ajoutant, sous agitation mécanique vigoureuse (de type rotor stator), la solution organique dans une solution aqueuse saturée en électrolyte (chlorure de magnésium la plupart du temps) et contenant un stabilisant. La saturation de la solution aqueuse empêche la diffusion de l'acétone et permet l'obtention d'une émulsion. L'émulsion est ensuite diluée par une quantité suffisante d'eau afin de provoquer la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse et la formation des nanosphères par agrégation du polymère. Enfin, une dernière étape de purification (filtration ou cycles centrifugation/lavages) est nécessaire pour éliminer le sel et le solvant.

La méthode de « salting out » est, comme les précédentes, limitée aux principes actifs lipophiles. Elle permet un meilleur contrôle de la taille des particules cependant, une étape de purification est nécessaire afin d'éliminer le sel utilisé pour la saturation de la phase aqueuse.

Il faut également s'assurer de la compatibilité des autres constituants (principe actif, tensio actif) avec le sel et vérifier la non toxicité de ce dernier.

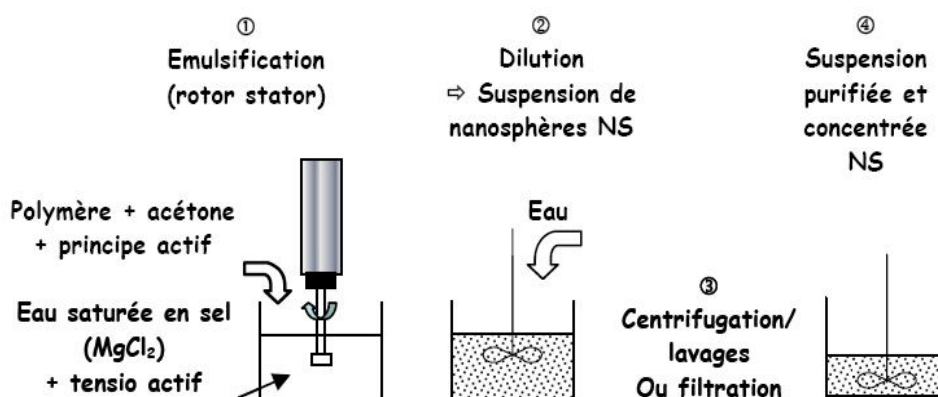


Figure 23 : Méthode de « Salting out » pour l'obtention de nanosphères.

#### II.4.1.4. Emulsification - Diffusion

La méthode d'émulsification diffusion est une alternative à la méthode précédente permettant d'éviter l'utilisation d'un électrolyte dont l'élimination est parfois longue et difficile. Le principe est basé sur l'emploi d'un solvant partiellement miscible à l'eau (acétate d'éthyle par exemple). Le solvant et l'eau sont mutuellement saturés avant leur utilisation pour la préparation des phases organique et aqueuse. La phase organique contient le polymère, le principe actif et éventuellement une huile pour la production de nanocapsules, la phase aqueuse contient un stabilisant. L'émulsion est réalisée comme précédemment sous agitation mécanique de type rotor stator. Sa dilution provoque ensuite la formation de nanoparticules par diffusion du solvant vers la phase aqueuse externe. Le solvant est enfin éliminé par évaporation ou filtration selon sa volatilité.

La technique d'émulsification diffusion permet l'obtention de nanoparticules de taille comprise entre 100 et 1000 nm contrôlée par l'étape d'émulsion, en étant adaptée aux principes actifs lipophiles. Elle permet la production de nanosphères ou de nanocapsules par ajout d'huile dans la phase organique.

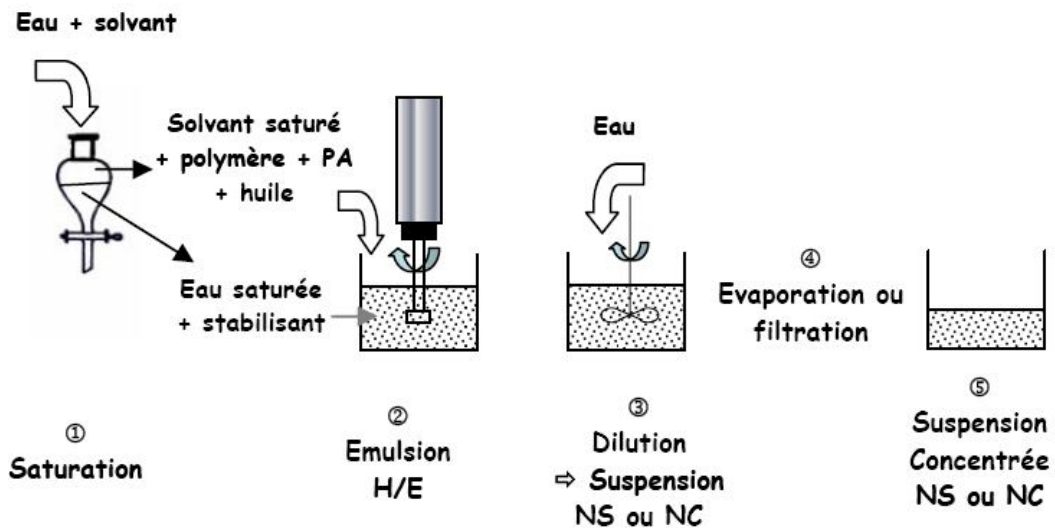


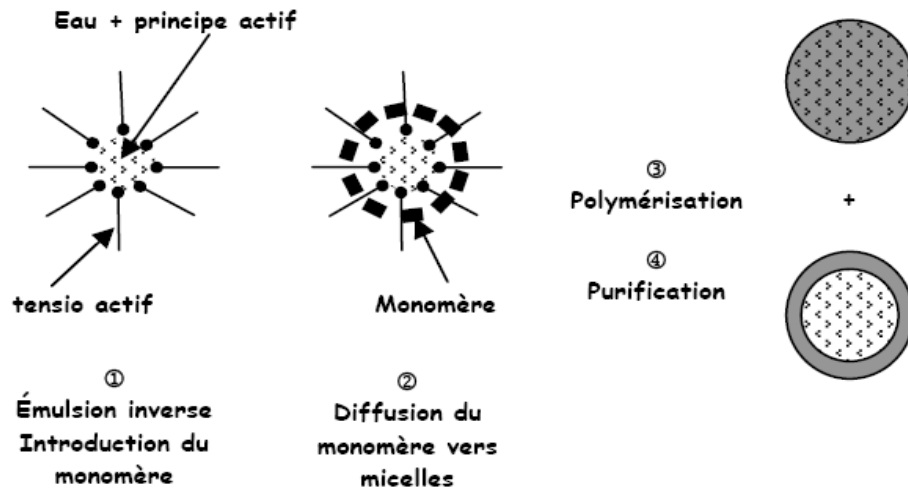
Figure 24 : Méthode d'émulsification-diffusion - obtention de nanosphères ou nanocapsules.

## **II .4.2 Méthodes de préparation par polymérisation**

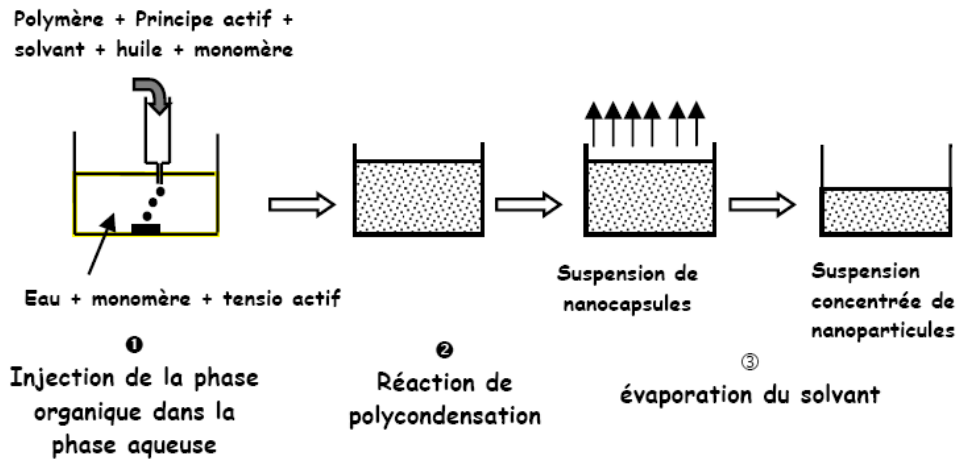
Il y a deux grandes approches pour la préparation des nanoparticules par polymérisation in situ : lorsque le monomère à polymériser est émulsionné dans un non-solvant, on parle de polymérisation en émulsion; dans le cas où le monomère est dissous dans un solvant qui se comporte comme un non-solvant du polymère à obtenir, on parle de polymérisation en dispersion.

### **II.4.2.1. Polymérisation micellaire : microémulsion inverse**

Cette technique est employée pour préparer des nanosphères de polyacrylamide. Le principe actif est dissous dans la phase aqueuse interne émulsionnée dans une phase organique contenant des quantités importantes de tensioactif. Les monomères hydrophiles sont ajoutés à l'émulsion, ils diffusent vers les micelles inverses stabilisées par le tensioactif. La polymérisation est initiée par irradiation  $\square$  ou par voie chimique en présence d'un initiateur, elle aboutit à la formation de nanosphères ou nanocapsules qui peuvent être isolées et purifiées par ultracentrifugation ou dialyse.



a) polymérisation micellaire



b) Polycondensation interfaciale couplée à l'émulsification spontanée : nanocapsules

Figure 25 : Méthodes d'élaboration des nanoparticules par polymérisation.

Cette technique permet d'encapsuler essentiellement des principes actifs hydrophiles. Elle a l'inconvénient d'utiliser de grandes quantités de solvants organiques et de surfactants toxiques nécessitant des étapes de purification difficiles. D'autre part, l'absence de biodégradabilité du polymère est un handicap majeur pour l'utilisation de ces particules.

#### **II.4.2.2. Polymérisation en dispersion :**

Le principe de la polymérisation en dispersion consiste à dissoudre un monomère hydrophile dans un milieu aqueux contenant éventuellement un surfactant non ionique. La polymérisation est directement initiée dans le milieu aqueux par irradiation  $\square$  ou par des agents chimiques (peroxodisulfate d'ammonium ou de sodium). La polymérisation conduit à la formation d'oligomères qui, au-delà d'une certaine masse moléculaire, précipitent pour donner naissance à des particules primaires stabilisées par le surfactant. Enfin, ces particules fusionnent pour donner naissance à des nanoparticules. Le principe actif est introduit avant la formation (cas des PA hydrophiles) ou après la formation (cas des PA lipophiles) des nanoparticules. Cette méthode présente l'avantage de se développer en milieu aqueux contrairement à la précédente, cependant la polymérisation est initiée par voie chimique ou physique entraînant des risques de dégradation du principe actif et une purification nécessaire.

#### **II. 4.2.3. Polymérisation en émulsion : phase continue aqueuse**

Ce procédé consiste à émulsionner un monomère insoluble ou partiellement soluble à l'eau dans une phase aqueuse additionnée d'une quantité importante de tensioactif. La méthode a été appliquée à la production de nanoparticules à base de polyalkylcyanoacrylates. Les monomères de type cyanoacryliques présentent en effet l'avantage de polymériser spontanément au contact des anions présents dans le milieu (polymérisation anionique). Les monomères lipophiles d'alkylcyanoacrylate sont émulsionnés dans une phase continue aqueuse contenant un principe actif et un stabilisant. Le principe actif peut être introduit dans le milieu réactionnel après la formation des nanosphères ; il est alors adsorbé en surface. La polymérisation est initiée par des ions hydroxydes (OH<sup>-</sup>) présents dans le milieu aqueux et se propage soit au sein des micelles contenant les monomères (si le monomère est très lipophile) soit dans le milieu aqueux puis dans les micelles (si le monomère n'est pas très lipophile). La

vitesse de polymérisation est dépendante du pH du milieu. A pH trop élevé, la polymérisation est très rapide et conduit à la prise en masse ; inversement à pH trop faible, le ralentissement de la polymérisation conduit à la formation de grosses particules. Le pH doit se situer dans un intervalle idéal de 2 à 3 afin d'assurer l'obtention de nanosphères monodispersées de l'ordre de 200nm. Cette acidité du milieu représente l'inconvénient majeur de cette technique, elle peut en effet nuire à la stabilité de certains principes actifs.

#### **II.4.2.4. Polymérisation interfaciale :**

La polymérisation interfaciale est pratiquement la seule technique de polymérisation conduisant à des nanocapsules. Elle est appliquée aux monomères cyanoacryliques décrits précédemment ainsi qu'aux polymères classiques en polycondensation interfaciale.

Dans les deux cas, le phénomène d'émulsification spontanée par diffusion du solvant est utilisé pour la formation de nanoémulsion suivie de polymérisation à l'interface.

Dans le cas des cyanoacrylates, les monomères sont dissous dans une solution d'éthanol contenant une huile et un principe actif. Cette solution est ensuite injectée dans une phase aqueuse contenant un tensioactif, la diffusion de l'éthanol provoque la formation instantanée de nanogouttelettes. Parallèlement les monomères s'orientent à l'interface huile/eau et la polymérisation est initiée par les ions  $\text{OH}^-$  du milieu à pH neutre (4-10) résultant en la formation d'une membrane de polymère autour des gouttes huileuses. Cette méthode a également été adaptée à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles en travaillant en phase externe organique, ce qui requiert cependant une étape supplémentaire de purification.

La deuxième méthode, consiste à introduire un monomère dans chacune des phases organique et aqueuse. La solution organique est alors composée d'un solvant polaire miscible à l'eau (acétone, alcool), d'une huile, d'un principe actif et du monomère lipophile ; la phase aqueuse contient le monomère hydrophile et un tensioactif.

Comme précédemment, la diffusion du solvant dans l'eau provoque la formation de nanogouttelettes, la réaction entre les deux monomères à l'interface conduit à la formation de la membrane des capsules. Selon le choix des monomères, cette méthode peut être appliquée à la formation de membrane en polyamide (chlorure d'acide + amine), polyurée (isocyanate + amine), polyuréthane (isocyanate + alcool).

Les méthodes d'encapsulation utilisant la polymérisation permettent de produire des nanosphères et des nanocapsules de petite taille (inférieure à 500 nm). Plusieurs techniques de polymérisation ont été développées, adaptées à l'encapsulation de principes actifs lipophiles ou hydrophiles avec des efficacités d'encapsulation importantes. Malgré des efforts permettant de réduire les quantités de solvants organiques et de surfactants utilisés, la présence de monomères et oligomères mal connus et potentiellement toxiques dans le milieu réactionnel reste un inconvénient majeur de ces techniques. D'autre part, le contrôle de la polymérisation conduisant à la formation d'un polymère de masse molaire définie est parfois difficile et les risques de dégradation du principe actif dans le milieu réactionnel sont une autre limite [95] [96] [97].

#### **II .4.3 Méthodes de préparation de nanoparticules lipidiques :**

Ces particules sont de 2 types :

##### **II .4.3 .1 Nanoparticules lipidiques solides :**

Les 2 méthodes principales de production des SLN sont l'homogénéisation haute pression et les ultrasons [98] [99].

##### **✚ Homogénéisation haute pression**

La première étape consiste à dissoudre le principe actif à encapsuler dans le cœur lipidique; cette opération a lieu à une température supérieure de 5 à 10 °C à la température de fusion du lipide choisi. L'homogénéisation peut ensuite se faire à chaud [100] ou à froid.

A chaud, le mélange est ensuite dispersé sous agitation dans une solution aqueuse de surfactant chauffée à la même température ce qui conduit à la formation d'une pré-émulsion qui va ensuite être homogénéisée dans un homogénéiseur haute pression. Le refroidissement de cette nanoémulsion entraîne la recristallisation du cœur lipidique et au final la formation de nanoparticules lipidiques solides.

Cette technique permet d'encapsuler des principes actifs relativement sensibles à la température car les temps de chauffage sont relativement courts et n'entraînent pas une dégradation trop importante.

La technique d'homogénéisation à froid est employée si les principes actifs sont très sensibles à la température ou s'ils sont hydrophiles. Dans ce cas, le mélange principe actif-cœur lipidique fondu est refroidi rapidement (pour assurer la répartition statistique du principe actif lors de la recristallisation) puis pulvérisé en microparticules de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  de diamètre par broyage. Elles sont ensuite dispersées à froid dans une solution aqueuse de surfactant. Puis la pré-émulsion obtenue est homogénéisée à froid afin d'obtenir les nanoparticules.

Contrairement à la technique d'homogénéisation à chaud, l'homogénéisation à froid conduit à la formation de particules plus grosses et dont la polydispersité est plus élevée [101].

Ces techniques sont déjà largement utilisées pour la production à grande échelle dans l'industrie pharmaceutique.

#### **Ultrasons**

De la même manière que pour l'homogénéisation à chaud, le principe actif est chauffé avec le cœur lipidique puis dispersé dans une solution aqueuse de surfactant à chaud [102]. Après agitation, la préémulsion formée est ensuite soniquée, la cavitation acoustique va rompre les microgouttelettes et conduire à la formation de nanoparticules [103].

Cette technique possède l'avantage d'être facilement mise en oeuvre au niveau d'un laboratoire mais conduit à la formation de particules plus grosses et plus polydisperses que dans le cas de l'homogénéisation. L'utilisation d'une sonde métallique peut aussi contaminer les lots de particules préparés en raison de la libération de petites particules métalliques.

#### **II.4.3.2. Nanocapsules lipidiques :**

Ces particules sont constituées d'un cœur huileux à base de triglycérides recouvert d'une paroi rendue rigide par l'association d'un couple d'agent de surface lécithine / Solutol HS15<sup>®</sup> (hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660 et polyéthylène glycol 660 libre). La préparation est basée sur un procédé par inversion de phase obtenue en faisant varier la température du mélange des excipients au dessus et au dessous de la température d'inversion de phase du système. Dans un deuxième temps le mélange d'huile et de surfactifs soumis à des cycles de

température subit un choc thermique irréversible avec une dilution dans de l'eau à une température proche de 0°C qui rigidifie la membrane. Les objets obtenus présentent une structure de nanocapsules à cœur lipophile de granulométrie monodispersée dans une gamme de taille allant de 20 à 100 nm et contrôlable en fonction des proportions respectives de départ.

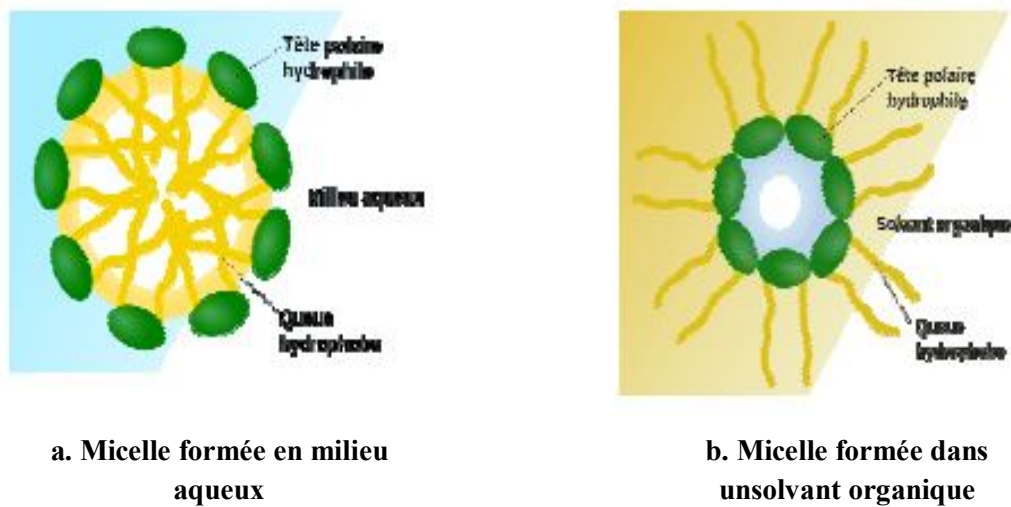
## **II .5 Les principaux types de nanoparticules**

Il existe une grande variété de nanoparticules allant des particules d'or aux liposomes passant par les nanoparticules polymériques. Si le choix du cœur des particules est primordial en ce qui concerne la protection et l'éventuel relargage des agents d'intérêt, le contrôle de la surface l'est tout autant. Ce sont en effet ses propriétés de surface qui permettront à la particule de véhiculer les agents thérapeutiques ou de diagnostic vers la zone ciblée [104]. Seules les nanoparticules les plus prometteuses, à notre avis, pour des applications médicales seront détaillées.

### **II.5.1 Les micelles**

Les micelles sont des nanoparticules auto-assemblées de 10 à 100nm, constituées d'une couronne de molécules amphiphiles en équilibre dynamique autour d'un cœur non solide [105].

En solution aqueuse, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément et adoptent la conformation structurelle la moins coûteuse en énergie, en minimisant les interactions de leurs parties hydrophobes avec l'environnement aqueux. En milieu organique en revanche, les molécules amphiphiles adoptent le comportement inverse et ce sont les parties hydrophiles qui sont orientées au cœur de la micelle.



**Figure 26 :** Représentation d'une micelle en milieu aqueux (a) ou en milieu organique (b)

Ces propriétés des micelles en font des nanoparticules intéressantes car elles sont faciles à préparer et peuvent permettre d'incorporer des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes. De plus, des études montrent que l'organisation stérique particulière de la couronne des micelles les protège de l'opsonisation qui est l'attachement des molécules du complément à la surface de la nanoparticule, et donc permet d'augmenter leur temps de demi-vie dans le sang [106].

La formation des micelles dépend de la quantité de molécules amphiphiles présentes en solution, et il existe une concentration dite « micellaire critique » (CMC) à partir de laquelle les molécules amphiphiles sont capables de s'auto-organiser en micelles, dont la stabilité augmente avec la concentration en molécules amphiphiles [107]. En dessous de la CMC en revanche, les micelles sont moins stables et se déstructurent. Cette dépendance à la CMC qui les rend instables à la dilution est donc l'une des principales limites à l'utilisation *in vivo* des micelles.

**Tableau I :** Description du système micellaire idéal dans le cadre de la vectorisation de principes actifs.

<b>Cœur de la micelle</b>	<b>Micelle dans son entité</b>	<b>Couronne de la micelle</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haute capacité d'encapsulation</li> <li>- Libération contrôlée</li> <li>- Haut degré de compatibilité entre le principe actif et le cœur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taille entre 10 et 100 nm</li> <li>- Grande stabilité : CMC basse</li> <li>- Vitesse lente de Dissociation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Barrière stérique efficace :</li> <li>• Epaisseur de la couronne</li> <li>• Densité de surface importante</li> <li>- Protection efficace de la Couronne</li> </ul>

### **II.5.2 Les nanocapsules :**

Les nanocapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante, contenu à l'intérieur d'une enveloppe solide de nature polymérique [108]. Dans les systèmes nanocapsulaires, les molécules sont généralement incorporées dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique. Le type de polymère et les propriétés de surface influencent: la stabilité de la nanocapsule, le type de molécule transportable et la pharmacocinétique de la formulation. Le réservoir des nanocapsules peut être de nature lipidique ou bien aqueuse, permettant d'incorporer des molécules chimiques hydrosolubles ou non [105]. Toutefois, la plupart des nanocapsules possèdent un réservoir lipidique. Dans le cas d'une nanocapsule à réservoir aqueux, on parle de polymersome. Les polymersomes possèdent une structure proche des liposomes, à la différence que la paroi polymérique des polymersomes est constituée de copolymères amphiphiles [109]. Cette catégorie de nanocapsules est adaptée pour l'incorporation de molécules hydrophiles.



**Figure 27** : Représentation schématique de nanocapsules.

### II.5.3 Les nanosphères :

Les nanosphères sont des nanoparticules polymériques colloïdales matricielles; c'est-à-dire dont la structure est entièrement solide. Elles peuvent être pleines ou poreuses. Les nanosphères pleines sont des structures nanométriques compactes, de formes généralement sphériques, synthétisées à base de polymères ou de copolymères. Parmi les plus connues, on trouve par exemple les nanoparticules de poly-(alkyl cyanoacrylate) (PACA) qui sont des particules biocompatibles et biodégradables, étudiées comme vecteurs de molécules dans différents types d'applications, et notamment la vectorisation de drogues anticancéreuses [110] [108].

On y trouve également les nanoparticules de PLGA. Dans le cas d'une nanosphère pleine, la molécule à vectoriser peut être associée à la surface de la nanoparticule déjà formée, ou bien incorporée à l'intérieur de la structure polymérique pendant la fabrication de la nanoparticule. Dans ce cas, le polymère doit être biodégradable et la dégradation de la nanoparticule à l'intérieur de l'organisme permet la libération du principe actif. C'est donc un système très intéressant pour la préparation de formulations à délivrance prolongée.

Contrairement aux nanosphères pleines, les nanosphères poreuses ont une structure de mailles plus ou moins serrées dont l'architecture est formée d'une matrice polymérique. Dans ce cas, la molécule d'intérêt peut être insérée dans les structures poreuses, adsorbée en surface, ou bien associée chimiquement au polymère formant la matrice. Ce type de structure poreuse

permet d'une part l'incorporation de la molécule dans une nanoparticule préfabriquée, et d'autre part la libération de la molécule sans dégradation du polymère. Par ailleurs, la présence de pores permet d'incorporer de grandes quantités de molécules, sans modifier la taille et les propriétés de surfaces de la nanoparticule [111] [112] [113].

De plus, l'architecture flexible de la paroi interne des pores permet de s'adapter à la forme et à la taille de la molécule insérée et augmente les capacités d'association [114]. Enfin, la structure interne de la nanoparticule poreuse peut être modifiée chimiquement par exemple en la rendant hydrophobe/hydrophile en fonction du type de molécule à associer. Ce sont donc des systèmes très attractifs pour des formulations à délivrance contrôlée.

#### **II.5.4 Les dendrimères :**

Les dendrimères (du grec *dendro* : arbre) sont des macromolécules branchées organisées autour d'un cœur plurifonctionnel. Ils forment une structure à trois dimensions composée d'unités monomère possédant au moins trois sites réactionnels dont un est lié à la génération précédente et dont les autres servent de point d'ancrage à la génération future. Les dendrimères ont un diamètre en général inférieur à 20 nanomètres, d'une part parce que les monomères constitutifs des particules sont petits et d'autre part, De Gennes a montré en 1983 qu'en raison de l'encombrement stérique il est difficile d'aller au-delà d'une dizaine de générations greffées.

Il y existe deux approches possibles pour la synthèse des dendrimères [115], l'une dite divergente [116] et l'autre dite convergente [117].

La synthèse divergente est la première à avoir été utilisée. Le dendrimère est construit à partir du cœur puis les monomères sont greffés au fur et à mesure (si les monomères possèdent trois sites réactionnels, on double le nombre de monomères greffés à chaque étape).

La synthèse convergente s'effectue de l'extrémité vers le cœur. Les monomères vont dans un premier temps former des dendrons (assemblage de monomères ne possédant qu'un seul site réactionnel) qui sont liés à chaque étape pour finalement se fixer sur le cœur.

Du point de vue pratique, la synthèse divergente est plus compliquée puisqu'elle nécessite des étapes de purification à chaque génération et engendre des défauts au niveau de l'assemblage. Les dendrimères obtenus par synthèse convergente sont plus faciles à purifier et cette méthode permet d'obtenir des particules monodispersées mais limite la taille finale en raison de l'encombrement stérique. Le choix de la méthode de synthèse est le plus souvent régi par le type de molécules utilisé.

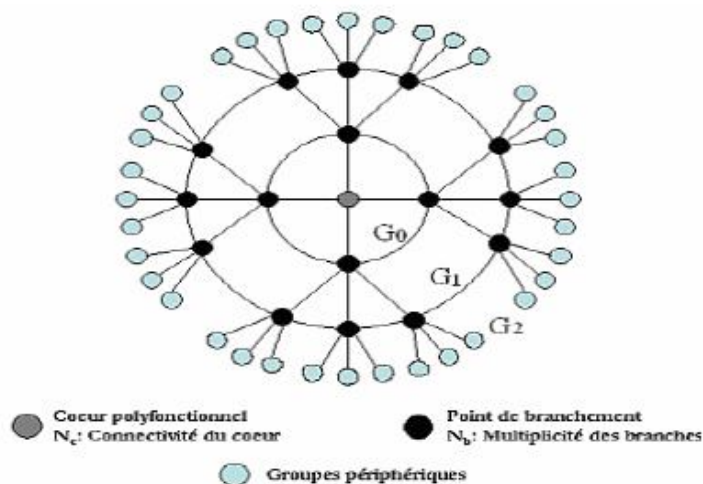


Figure 28 : Représentation schématique d'un dendrimère.

Les dendrimères sont utilisés de différentes manières au niveau biomédical [118], les particules peuvent encapsuler [119] ou adsorber des molécules en vue d'une injection au niveau du corps humain. Ceci nécessite parfois de modifier les dendrimères en surface pour cibler spécifiquement un type cellulaire [120].

On peut également les modifier au niveau de la couche interne afin de créer suffisamment d'espace pour pouvoir encapsuler des principes actifs ou pour utiliser la molécule à vectoriser comme cœur du dendrimère. On peut aussi greffer des dendrons en surface de nanoparticules [121] [122] afin d'augmenter la quantité de principe actif encapsulée et la taille de la particule.

Les dendrimères de la famille des PAMAMs (poly(amidoamine)) ont été les premiers décrits dans la littérature par Tomalia en 1985. Ils sont aussi bien utilisés en tant que vecteurs de principes actifs que pour du diagnostic ou de la transfection de gènes.

### II.5.5 Les hydrogels :

Un hydrogel est un réseau tridimensionnel de chaînes polymères insolubles dans l'eau capables de constituer un gel, parfois trouvé à l'état colloïdal, avec un immense pouvoir adsorbant. En effet, les hydrogels peuvent contenir jusqu'à 99% d'eau dans leur forme finale et possèdent ainsi un degré de flexibilité similaire aux tissus naturels.

Les premières applications des hydrogels datent des années 60 lorsque Witchterle et Lim en 1960 [123] introduisent l'utilisation d'un hydrogel pour la fabrication de lentilles de contact : l'hydroxyéthyl de méthacrylate (HEMA). Depuis, l'utilisation de ces biomatériaux de type hydrogel hydrophile et biocompatible s'est largement diversifiée. En 1980, Lim et Sun ont utilisé des microcapsules d'hydrogel d'alginate pour l'encapsulation de cellules, puis en 1989 l'équipe de Yannas proposait un hydrogel à base de collagène comme pansement artificiel pour les brûlures. Les nombreux domaines d'applications des hydrogels font que leur intérêt augmente au fil des années.

Les hydrogels peuvent être classés dans différentes catégories en fonction de différents paramètres dont : leur méthode de préparation, leur charge globale, leurs caractéristiques mécaniques et structurelles. Sur le critère de la méthode de préparation, les homopolymères et les copolymères doivent être distingués. Le critère de charge globale permet la séparation en trois sous-groupes : neutre, anionique et cationique, en fonction de la nature des blocs de polymères composant l'hydrogel. Enfin, il est possible de les classer en fonction de leur structure physique : amorphe, semi-cristalline, liée à l'hydrogène, supramoléculaire et hydrocolloïde. Le plus fréquemment, ils sont divisés en deux grandes familles : les gels chimiques et les gels physiques, aussi désignés sous les termes de gels irréversibles et gels réversibles. La différence entre ces deux familles réside dans la nature des liaisons qui constituent les réticulations : liaisons covalentes dans le premier cas et liaisons secondaires réversibles dans le second [124] (hydrogène, Van der Waals, ioniques, hydrophobes...).

Les hydrogels forment une matrice qui protège le principe actif de la dégradation et de l'inactivation : sa forte hydrophilicité permet l'incorporation de substances hydrosolubles et lui confère un caractère biocompatible. L'ajout de groupements hydrophobes de type PLA/PLGA, permet aux hydrogels d'étendre leurs champs. Ainsi, les molécules amphiphiles ou hydrophobes peuvent aujourd'hui être incorporées dans ce type de formulations.

### II.5.6 Les quantum dots :

Les Quantum Dots (boîtes quantique) sont des cristaux semi conducteurs en général de forme sphérique et d'un diamètre inférieur à 10 nanomètres. Ils sont constitués d'un alliage entre un élément de la colonne II et un élément de la colonne VI du tableau périodique [125] ou un élément des colonnes III et V [126] [127].



**Figure 29:** Représentation d'un quantum dots.

Ces particules, du fait de leur taille, possèdent des propriétés physiques particulières. L'excitation d'un Quantum Dot par un photon d'énergie supérieure au gap (bande interdite séparant la bande de valence et la bande de conduction) conduit à la formation d'un exciton : une paire trou-électron ; un électron se retrouve au niveau de la bande de conduction tandis que la bande de valence se retrouve en déficit (trou).

Lorsque l'électron retourne à son état fondamental, il émet de la fluorescence à une longueur d'onde proportionnelle au diamètre du Quantum Dot. Le contrôle de la taille des particules permet ainsi de sélectionner une longueur d'onde d'émission souhaitée : en faisant diminuer la taille des Quantum Dots, on augmente la valeur du gap [128].

Il existe deux grandes voies de synthèse des Quantum Dots :

- la première a été décrite par Murray en 1993 et nécessite des solvants organiques coordinants,
- la seconde, dite hydrothermale, se fait en milieu aqueux et a été développée par Weller en 1996.

Les Quantum Dots peuvent être utilisés en imagerie pour visualiser par fluorescence des cellules ou des tissus.

Cependant une modification de la surface des particules est nécessaire pour, d'une part rendre les molécules hydrophiles (et ainsi éviter leur agrégation après injection dans le corps) et, d'autre part protéger le cœur semi-conducteur de la dégradation et donc la libération de cations métalliques potentiellement toxiques [129]. Cette étape permet aussi d'augmenter la taille des particules et de prolonger leur durée de vie dans l'organisme.

Cette fonctionnalisation de la surface peut conduire à des interactions spécifiques ou non avec un type cellulaire. On peut ainsi recouvrir les Quantum Dots de PEGs [130], de liposomes [131]. Il est possible de lier les Quantum Dots à des anticorps pour cibler spécifiquement des marqueurs de surface cellulaire.

### **II.5.7 Les nanoparticules d'or :**

Les colloïdes à base d'or ont été étudiés depuis de nombreuses années. Les premiers travaux publiés remontent à 1857 avec Michael Faraday qui a décrit la réduction des ions  $\text{AuCl}_4^-$  par des composés phosphorés [132].

L'or est un matériau biocompatible. Sous forme de particules, il est utilisé principalement en détection mais on peut aussi l'employer pour du ciblage actif et passif ; toutefois il est nécessaire de modifier sa surface afin d'éviter que les particules d'or s'agrègent. La formulation des nanoparticules d'or est facile et rapide ; de plus en fonction du ligand employé pour stabiliser les particules, il est possible d'ajuster la taille des particules et de greffer des molécules pouvant interagir avec des récepteurs de surface des cellules dans le but d'un ciblage actif [133].

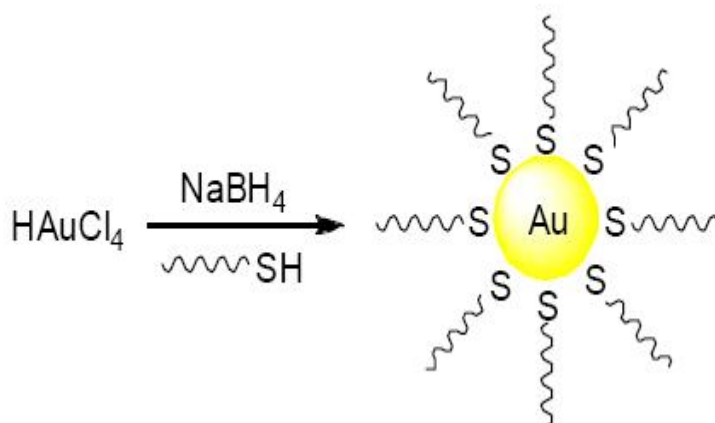
Les nanoparticules peuvent être visualisées en MET car le noyau d'or est dense ; on l'utilise aussi comme agent de contraste grâce à la résonance plasmon de surface (disparition de l'onde réfléchié sous excitation).

Historiquement, la synthèse de nanoparticules d'or consiste en la réduction d'Au (III) ou Au (I) en Au(0). La réduction est d'autant plus facile que l'or est le métal de transition le plus électronégatif.

En 1951, Turkevitch décrit la formation de particules après réduction d'ions  $\text{HAuCl}_4$  puis stabilisation par du citrate de sodium. La synthèse en milieu aqueux conduit à la formation de particules d'un diamètre de 20 nanomètres [134].

Néanmoins la liaison entre le citrate et l'or n'est pas très forte et le plus souvent les particules préparées par cette méthode sont ensuite stabilisées après une réaction d'échange de ligands par des molécules thiolées (la liaison Au-S est une liaison forte) [132].

L'autre mode de synthèse chimique des particules développée par Brust conduit directement à la stabilisation des particules par des ligands thiolés, l'or est dissout dans un solvant organique grâce à des agents de transfert de phase puis réduit en présence de groupements thiolés [132] [134].



**Figure 30** : Synthèse de nanoparticules d'or par réduction d'Au(III) en présence d'un thioalcane.

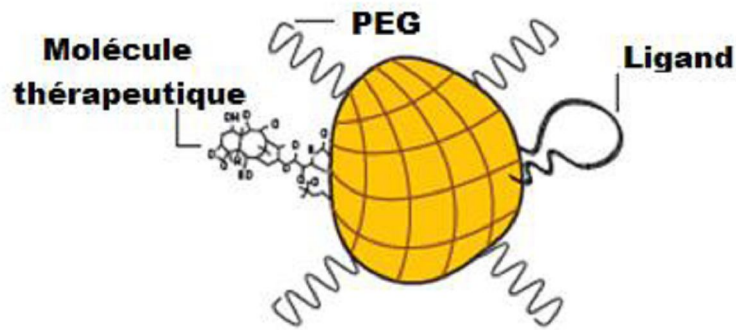
Le choix du mode de synthèse dépend de l'utilisation des particules. Bien souvent on choisira la méthode de Turkevitch pour les applications biomédicales car elle n'utilise pas de solvants organiques. La nature du réducteur employé peut varier mais en général il s'agit de  $\text{NaBH}_4$ , les caractéristiques des particules d'or étant dépendantes des conditions opératoires (rapport molaires or/ligands, température, type de réducteur, ...)

Il existe aussi quelques procédés physiques de préparation des particules tels que l'ablation laser ou la synthèse métal vapeur qui génère un gaz d'atomes d'or qui vont être condensés de manière contrôlée en particules.

Les particules d'or peuvent être utilisées de deux façons différentes : pour la délivrance de molécules d'intérêt [135] ou comme agent de contraste afin de marquer certaines zones du corps humain (les tumeurs principalement). Il a ainsi été démontré que des nanoparticules d'or injectées par voie intraveineuse chez des souris développant une tumeur peuvent être facilement détectées par radiographie au niveau de cette tumeur tout en utilisant des concentrations moins élevées que pour des composés à base d'iode [136].

Les propriétés de résonance de plasmon des particules permettent de créer un échauffement local lorsque celles-ci sont soumises à un rayonnement infrarouge ; on les utilise donc en cancérologie pour cibler et détruire les tumeurs par photothermie [137].

Les nanoparticules d'or, décorées en surface par des oligonucléotides possèdent des propriétés intéressantes concernant l'administration de médicaments : bonne pénétration cellulaire, faible toxicité, et protection des principes actifs vis-à-vis de la dégradation. Ces nanoparticules d'or ont été recouvertes en surface d'un oligonucléotide portant un groupement aminé terminal libre condensé à un complexe du platine. L'activité de ces nanoparticules a été évaluée *in vitro* sur des lignées cellulaires (ostéosarcomes humains, carcinome du poumon humain, cancer des cervicales et de la prostate).



**Figure 31** : Représentation d'une nanoparticule d'or, transportant une molécule thérapeutique. Du PEG et un ligand y sont greffés [138].

#### II.4.8 Les nanoparticules d'oxyde de fer :

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques désignées par le terme SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine. Elles peuvent servir d'agents de contraste pour l'IRM, de « points chauds » locaux capables de tuer les cellules malignes et de transporteurs colloïdaux lors de la vectorisation de médicaments ou du diagnostic [138] [139] [140].

La propriété des SPIOs provient du fort moment magnétique qu'ils acquièrent en présence d'un champ magnétique externe. Leur moment magnétique élevé engendre un fort contraste en imagerie IRM. En plus de posséder d'excellentes propriétés magnétiques, les SPIOs sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer [141].

Les SPIOs sont généralement synthétisés par co-précipitation de suspensions alcalines de  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  et  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  [142]. La taille des particules peut varier entre quelques nanomètres et plusieurs centaines nanomètres de diamètre [143].

Pour accroître leur stabilité, leur demi-vie de circulation et leur biocompatibilité, diverses méthodes ont été utilisées pour fonctionnaliser les nanoparticules de SPIO avec un revêtement de polymères inertes, comme le dextrane [144], des polysaccharides [145]. le polyéthylène glycol (PEG) et l'oxyde de polyéthylène (PEO) [146].

Les SPIOs servent essentiellement d'agents de contraste au niveau biomédical, leurs propriétés magnétiques engendrent une diminution du temps de relaxation transversal ( $T_2$ ) en IRM et on peut ainsi visualiser leur localisation.

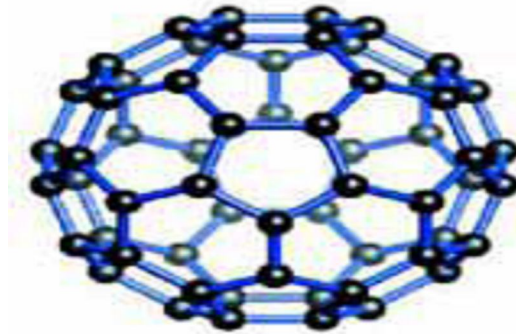
Les SPIOs peuvent être utilisées pour un ciblage passif ou actif. Dans le cas du ciblage passif, on emploie des SPIOs nues ou recouvertes de molécules non spécifiques (dextrane, PVA, ...). Les particules vont être internalisées par différentes cellules [147] : Les macrophages, les cellules tumorales, les ganglions lymphatiques, ainsi que les organes du RES (Système Réticulo-endothélial).

#### **II.5 .9 Les nanoplateformes de carbone :**

On distingue principalement les fullerènes, les nanotubes de carbone (NTC) et les nanodiamants.

Les fullerènes sont une famille de composés du carbone dont l'existence a été prédite en 1970 et officiellement prouvée en 1985 [148] [149]. La forme la plus connue est le fullerène  $\text{C}_{60}$ . Les fullerènes peuvent prendre une forme géométrique rappelant celle d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube ou d'un anneau. Grâce à leurs caractéristiques physiques, chimiques, propriétés électriques et optiques, les fullerènes et leurs dérivés sont incorporés dans des nouveaux dispositifs ou matériaux [150] [151].

Les fullerènes peuvent jouer le rôle de radio protecteur. En effet, ils permettent la protection contre les dommages causés par irradiation aux rayons X *in vitro* et *in vivo* chez la souris, en réduisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène [152].



**Figure 32 :** Représentation schématique d'un fullerène et des 60 atomes de carbone (noir) qui le compose. Les ronds noirs symbolisent les atomes de carbone, les traits bleus représentent les liaisons covalentes [153].

Des études se poursuivent sur l'augmentation de la solubilité des fullerènes et leur toxicité [154].

Les nanotubes de carbone (NTC) sont des feuilles de graphène cylindriques. Les NTC peuvent être utilisés pour l'ablation des cellules cancéreuses par hyperthermie en raison de leur forte absorption optique dans la région du NIR, ainsi que pour la vectorisation de médicaments vers les cellules cancéreuses en raison de leur grande surface spécifique. On distingue : les NTC mono paroi désignés par le terme SWCNT (Single Wall Carbone Nano Tube) dont le diamètre est compris entre 1 et 3 nm et la longueur comprise entre 5 et 30 nm, des NTC multi parois désignés par le terme MWCNT (Multi Wall Carbone Nano Tube) de diamètre compris entre 10 et 150 nm et de longueur allant de 200 nm à quelques micromètres [155].

Les Nanodiamants (ND) sont des agents très intéressants pour des applications en biologie et en médecine en raison de leur plus grande biocompatibilité par rapport à d'autres nanomatériaux de carbone, leur photo-stabilité, la facilité de purification, la disponibilité commerciale et de leur faible cytotoxicité [156]. Ils peuvent être fonctionnalisés et conjugués à une grande variété de molécules pour le marquage cellulaire et la vectorisation de médicaments, ce qui leur confère un potentiel important d'applications thérapeutiques et de diagnostic [157].

## **II.6. Voies et conditions de pénétration**

### **II.6.1 Pénétration par voie cutanée :**

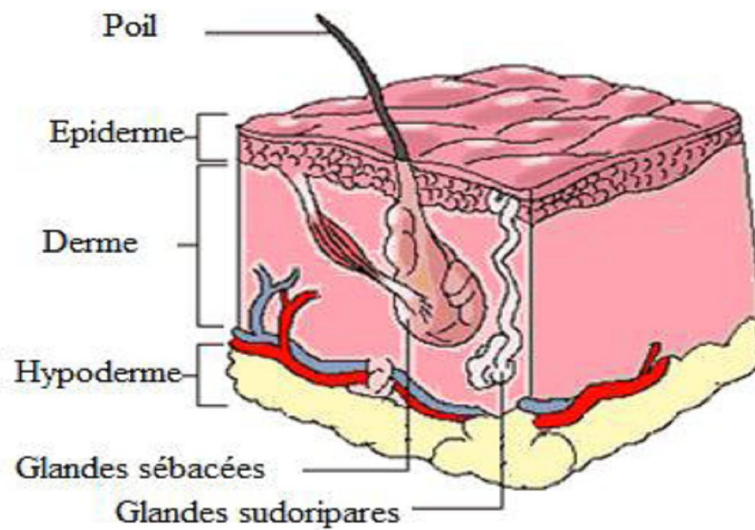
#### **II.6.1.1 La peau : rappels anatomiques**

La peau est constituée d'environ 70 % d'eau, 27 % de lipides, 2 % de protéines et d'environ 1% d'oligo-éléments. La peau est l'organe du corps humain le plus étendu et le plus lourd, c'est un tissu de revêtement très souple, résistant et imperméable.

Elle constitue la couche corporelle protectrice externe mais elle est également impliquée dans différents processus fondamentaux tels que la régulation de la température corporelle, la défense immunitaire, le métabolisme (synthèse des vitamines D, hormones, sébum), ou encore la perception sensorielle.

Elle est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est la couche la plus externe, protectrice. L'épaisseur moyenne de l'épiderme est de 100 µm mais peut varier de 50 µm au niveau de la paupière à 1 mm au niveau de la paume de la main ou de la plante des pieds.

A la surface de la peau sont présents des follicules pileux d'où émergent des poils, ainsi que des pores où s'ouvrent les glandes sudoripares et sébacées. Elle présente également des sillons formant les empreintes digitales [158].



**Figure 33:** Représentation anatomique de la peau et de ses annexes.

### **II.6.1.2. Fonction barrière de la peau**

La peau constitue une frontière mécanique, physique, chimique et immunologique. Elle joue le rôle de barrière de protection contre les agressions externes multiples (rayonnements, micro-organismes, substances chimiques, allergènes...) et évite la déshydratation de l'organisme. Elle est également le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions sensorielles, immunitaires et thermorégulatrices [159].

La notion de «barrière cutanée» se réfère à la fonction de la couche cornée qui est la couche externe de l'épiderme. D'un point de vue physiologique et fonctionnel, la fonction barrière résulte d'une organisation tissulaire et biochimique bien spécifique et particulière au niveau protéique, lipidique et enfin au niveau de la composition et de la distribution ionique [159].

### **II.6.1.3 Les voies de pénétration cutanée**

L'absorption percutanée correspond au transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. L'étape de pénétration est une diffusion passive. Elle dépend du gradient de concentration des molécules existantes dans le véhicule et de la surface épidermique. Une fois absorbée, la substance est distribuée dans l'organisme puis, après avoir

été ou non métabolisée, c'est-à-dire transformée par l'organisme, est éliminée. Au sein de l'épiderme, la couche cornée est reconnue comme barrière à la diffusion.

Anatomiquement, deux voies sont possibles pour la pénétration des particules : l'une, par diffusion passive, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée et à travers les cellules cornée elles-mêmes dite *voie transépidermique* ; l'autre empruntant les annexes cutanées comme les follicules pilo-sébacés et/ou les glandes sudoripares, dite *voie transannexielle*. La pénétration ne s'effectue pas uniquement par l'une des voies, les deux participent au phénomène. La pénétration globale résulte donc à la fois d'un passage transépidermique et transannexiel [159]

## **II.6.2 La pénétration par voie respiratoire :**

### **II.6.2.1. Anatomie de l'appareil respiratoire**

L'appareil respiratoire est l'ensemble des organes dont la fonction est d'assurer la respiration permettant les échanges gazeux entre l'air et le sang. A l'appareil respiratoire, sont annexés l'appareil olfactif et une partie de l'appareil phonatoire [160].

D'un point de vue anatomique, l'appareil respiratoire comprend les voies aériennes, les poumons, la plèvre, la circulation pulmonaire et les muscles respirateurs insérés sur la paroi thoracique. Les voies aériennes sont divisées en voies aériennes supérieures et voies aériennes inférieures. Les voies aériennes supérieures sont situées dans la face et le cou et comprennent les fosses nasales (annexées à l'olfaction), les sinus paranasaux, le pharynx (carrefour avec l'appareil digestif), et le larynx (annexé à la phonation) [160].

Les voies aériennes inférieures sont situées dans le cou et le thorax. Elles sont composées de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

Les poumons, entourés de la plèvre, sont les deux organes parenchymateux où se produisent les échanges gazeux entre l'atmosphère et la circulation pulmonaire ou petite circulation.

La paroi thoracique entoure la cavité thoracique où se situent les poumons. Elle est mobile grâce à l'action des muscles respirateurs [161].

Les voies aériennes sont couvertes d'un épithélium, qui est un tissu composé de cellules épithéliales jointives et solidaires les unes des autres grâce à des jonctions intercellulaires. Les alvéoles sont elles-mêmes composées de trois couches : les cellules épithéliales, l'interstitium et une couche d'endothélium. L'interstitium est composé d'un tissu conjonctif qui soutient les cloisons alvéolaires [161].

### II.6.2.2. La muqueuse respiratoire

La muqueuse respiratoire est présente depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales intra-pulmonaires. Elle se compose d'un épithélium, d'une lame basale d'une épaisseur d'environ 1000 Å et d'un chorion. Le chorion est un tissu conjonctif lâche constitué d'éléments caractéristiques : Le MALT / BALT (Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses / aux Bronches), système de veille immunologique. Ce chorion présente un infiltrat lymphocytaire (sous forme de lymphocytes isolés ou regroupés en follicules primaires et secondaires), des monocytes et des macrophages ainsi que des cellules pro-inflammatoires, comme les mastocytes ou les polynucléaires. Sont également présentes des glandes séreuses qui sécrètent des solutions protéiques très fluides ainsi que des glandes muqueuses qui sécrètent des mucines.

Plusieurs types d'épithéliums sont présents au niveau de l'appareil respiratoire : *l'épithélium pseudo-stratifié* qui est un épithélium simple (une seule assise de cellules), mais qui ressemble, sur des coupes histologiques, à un épithélium stratifié (toutes les cellules sont en contact avec la lame basale mais toutes n'atteignent pas le pôle apical) ; *l'épithélium prismatique, ou cylindrique* : les cellules sont plus hautes que larges ; *l'épithélium cilié* : les cellules ciliées majoritaires sont pourvues de cils vibratiles apicaux. Ils participent à l'escalator muco-ciliaire, système de clairance spécifique des voies de conduction [161].

### II.6.2.3. Fonction barrière de l'épithélium respiratoire :

L'organisme dispose au niveau de l'appareil respiratoire de moyens de défense très diversifiés et sophistiqués contre les agressions des gaz et des particules de l'air ambiant.

Tout d'abord des moyens mécaniques. La disposition anatomique des voies aériennes et de l'arbre trachéobronchique favorise la déposition des particules. Il se produit donc une filtration nasopharyngée et trachéobronchique, et une évacuation mécanique par le tapis mucociliaire [161].

L'épithélium respiratoire est très actif grâce à des fonctions sécrétoires (production de mucus), des fonctions d'épuration par clairance mucociliaire, de transport d'ions et d'autres substances, mais aussi des fonctions d'adhérence bactérienne.

Le mucus forme un revêtement continu tapissant toutes les voies de conduction. Il a une triple fonction. Il assure l'humidification de l'air inspiré, la protection physique des cellules épithéliales et piège les particules. Les sécrétions bronchiques peuvent être assimilées à un milieu bi-phasique.

D'une part, une phase « *sol* » aqueuse, profonde et fluide (ions, lipides, protéine) dans laquelle baignent les cils. D'autre part une phase « *gel* », viscoélastique et superficielle, présente au sommet des cils [161] [162].

Le mucus contient des mucines. Ce sont des macromolécules acides ou neutres de hauts poids moléculaires très hétérogènes. Ces chaînes polypeptidiques sur lesquelles sont fixés des groupes glucidiques représentent des sites de liaison pour les adhésines bactériennes et les virus, avant leur élimination mécanique par l'activité ciliaire.

Des moyens physico-chimiques constituent également un système de défense. Cela concerne toutes les surfaces de contact avec l'air inhalé en raison de la présence de revêtements de protection des parois (mucus des voies de conduction, surfactant alvéolaire).

Enfin, des moyens cellulaires. Ils jouent un rôle majeur au niveau de la zone alvéolaire : les macrophages alvéolaires (cellules à "poussières") prennent en charge les particules insolubles par phagocytose. Ils entourent les particules, les digèrent et les dirigent vers l'ascenseur muco-ciliaire pour l'élimination. L'efficacité de la phagocytose dépend de la forme, de la taille et de la quantité de particules présentes. En effet, ce système peut être saturé par un nombre trop important de particules à éliminer [163].

#### II.6.2.4. Pénétration et accumulation dans les régions du système respiratoire

L'inhalation représente la principale voie d'exposition aux nanoparticules chez l'homme. Un nombre considérable de nanoparticules ou particules ultrafines sous forme d'aérosol existe dans l'environnement, en grande partie en raison du trafic automobile et des divers procédés industriels [164].

L'étude du dépôt des particules dans le système respiratoire révèle d'importantes différences concernant les sites de déposition. Le diamètre des particules inhalées, en particulier entre les particules de taille nanométrique et les particules de taille plus importante influence grandement leur dépôt.

Cinq mécanismes interviennent dans le dépôt de particules : *la sédimentation*, liée à la gravité agissant sur les particules ; *l'impaction inertielle*, qui caractérise le comportement des particules massives ; *l'interception*, qui se produit au moment où une particule entre en contact avec une surface ; *la diffusion*, liée au mouvement aléatoire des particules très fines et *l'attractio électrostatique*, pouvant influencer nettement le dépôt pour les particules fortement chargées [165].

Afin d'examiner la déposition des nanoparticules, le système respiratoire est divisé en trois régions : les régions naso-pharyngée, trachéo-bronchique et alvéolaire. Chaque région constitue un lieu de dépôt de nanoparticules de différentes tailles.

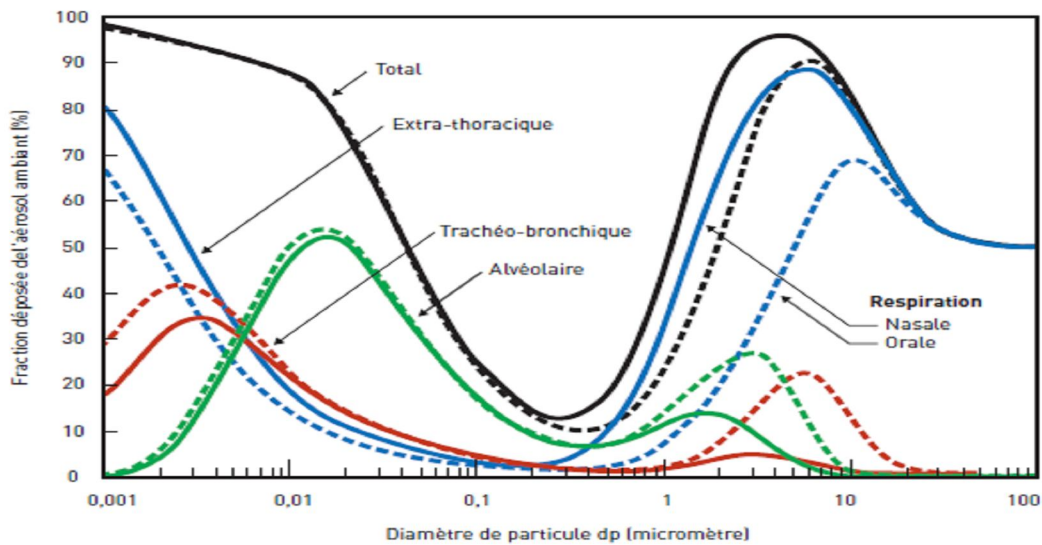
La morphologie de l'arbre respiratoire et les paramètres physiologiques varient de manière importante en fonction des individus et de leur activité.

L'âge, le sexe, les pathologies telles que les syndromes obstructifs (bronchopneumopathie chronique obstructive) et restrictifs (asthme) sont des éléments qui peuvent altérer le fonctionnement et la structure « normale » des voies respiratoires [165].

De manière générale, le plus faible dépôt est constaté pour les particules d'un diamètre d'environ 300 nm. A cette taille, les particules sont trop grosses pour que le mécanisme de diffusion soit important et trop petites pour que l'impaction et la sédimentation aient un effet [165].

La Figure 34 représente le dépôt total et régional dans l'arbre respiratoire des particules en fonction de leur diamètre (compris entre 1 nm et 100 µm). Ces courbes correspondent à un sujet « référent », c'est-à-dire respirant majoritairement par le nez ou la bouche et passant un tiers de son temps assis et deux tiers de son temps en activité légère. Pour les particules de diamètre inférieur à 300 nm, le dépôt augmente de manière significative car la diffusion devient prédominante. Les nanoparticules de diamètre supérieur à 10 nm se déposent à plus de 50% au niveau alvéolaire, tandis que celles inférieures à 10 nm se déposent principalement en région extra thoracique (plus de 80%), et de manière moins importante dans la région trachéo-bronchique.

Notons qu'entre 10 nm et 200 nm, le mode de respiration a peu d'effets sur le dépôt des particules. Ces importantes différences de lieux de déposition ont des conséquences sur les effets potentiels des nanoparticules dans le système respiratoire.



**Figure 34** : Prédiction du dépôt de particules inhalées au niveau du système respiratoire chez l'homme en fonction du diamètre des particules. Le sujet respirant majoritairement par la bouche (pointillé) ou par le nez (ligne continue) [165].

### II.6.3. Pénétration par voie orale :

#### II.6.3.1. Rappel anatomique : l'appareil digestif

Le tube digestif s'étend de l'œsophage jusqu'au canal anal. Il est formé d'une paroi regroupant cinq tuniques concentriques. De l'intérieur vers l'extérieur, on distingue ainsi : *une muqueuse* constituée d'un épithélium reposant sur un chorion (tissu conjonctif). C'est la tunique la plus interne, en contact avec la lumière du tube digestif ; *une musculaire-muqueuse*, tunique fine faite de cellules musculaires lisses ; *une sous-muqueuse*, constituée de tissu conjonctif ; *une musculuse*, tunique épaisse constituée de cellules musculaires lisses ; *une adventice* faite de tissu conjonctif.

#### II.6.3.2. La muqueuse du tube digestif

Trois types d'épithélium présentant des morphologies et des fonctions différentes constituent le revêtement interne du tube digestif : un *épithélium de protection mécanique*, un *épithélium de protection chimique* et un *épithélium d'absorption*.

L'épithélium de protection mécanique est observé au niveau des deux extrémités du tube digestif (œsophage et canal anal). Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié. Il est non kératinisé sauf au niveau des 2/3 inférieurs du canal anal où il s'agit d'un prolongement de l'épiderme.

L'épithélium de protection chimique est localisé au niveau de l'estomac. Il s'agit d'un épithélium prismatique simple, c'est-à-dire formé de cellules plus hautes que larges, alignées en monocouche.

Ces cellules sont sécrétrices et dites à pôle muqueux fermé. C'est un épithélium sécrétoire. Le mucus produit par cet épithélium sécrétoire contribue à lubrifier la paroi gastrique et à la protéger de l'attaque du suc gastrique. L'épithélium gastrique s'invagine et forme de petites dépressions appelées cryptes au fond desquelles s'ouvrent les canaux excréteurs des glandes gastriques.

L'épithélium d'absorption est localisé au niveau de l'intestin. Il s'agit d'un épithélium prismatique simple constitué d'entérocytes et accueillant des cellules glandulaires isolées, les cellules caliciformes. Les entérocytes présentent une différenciation de leur pôle apical sous forme de microvillosités. Les microvillosités sont de petites expansions cytoplasmiques pouvant s'organiser sous deux formes : plateau strié encore appelé bordure en brosse et stéréocils. La fonction des entérocytes est l'absorption digestive des nutriments (c'est-à-dire des glucides, des protéides, et des lipides) au niveau des microvillosités. De nombreuses enzymes sont présentes et vont permettre d'achever l'hydrolyse des protéides en acides aminés qui seront pris en charge par des transporteurs spécifiques de la membrane plasmique apicale. Au niveau de cet épithélium se trouvent aussi des cellules caliciformes. Ce sont des cellules glandulaires à sécrétion muqueuse participant à la lubrification du tube digestif.

L'organisation de cet épithélium d'absorption présente des variations régionales.

Au niveau de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), les entérocytes sont beaucoup plus abondants que les cellules caliciformes et leur plateau strié constitue le dernier niveau d'un dispositif complexe d'amplification de la surface d'absorption. Ce dispositif comprend : *les anses intestinales* (replis de l'intestin), *les valvules conniventes* (plis transversaux permanents de la muqueuse et de la musculaire muqueuse), *les villosités intestinales* : expansions en doigt de gant de la muqueuse contenant des cellules musculaires lisses et des vaisseaux sanguins et lymphatiques, enfin, *les microvillosités* du plateau strié des entérocytes.

Au niveau du côlon et du rectum, les cellules caliciformes sont beaucoup plus nombreuses que les entérocytes. Il n'y a pas de système d'amplification de la surface intestinale.

### **II.6.3.3. Fonctions du tube digestif**

Le tube digestif exerce essentiellement trois types de fonctions : *des fonctions digestives*, *des fonctions immunitaires* et *des fonctions endocrines*.

Les fonctions digestives sont assurées par trois constituants majeurs de la paroi digestive :

l'épithélium de revêtement, qui participe au transit des aliments et à l'absorption des nutriments ; les glandes exocrines du tube digestif, qui protègent et lubrifient les parois du tube digestif et participent à la dégradation des aliments ; la musculature lisse du tube digestif, qui permet la progression et le brassage mécanique des aliments.

Les fonctions immunitaires sont assurées par les organes lymphoïdes du tube digestif.

Enfin, les fonctions endocrines sont assurées par les cellules endocrines disséminées dans l'épithélium du tube digestif et qui sécrètent des hormones digestives.

#### II.6.3.4. Pénétration et accumulation des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal

Les nanoparticules peuvent atteindre le système gastro-intestinal après avoir été ingérées indirectement (non intentionnellement) si contenues dans l'alimentation, l'eau ou encore présentes dans les cosmétiques et produits d'hygiène (rouges à lèvres, dentifrice), voire *directement* (intentionnellement) en tant que vecteurs de médicaments. Elles peuvent également accéder au système gastro-intestinal après déglutition lorsqu'elles sont inhalées [166].

En effet, les nanoparticules inhalées se déposant sur l'arbre trachéo-bronchique peuvent être piégées dans le mucus qui tapisse la paroi des voies aériennes et transportées vers la cavité oro-pharyngée par mouvements mucociliaires. Ce mucus ensuite dégluti, transporte les particules vers le système gastro-intestinal. Notons que 98% des nanoparticules ingérées sont évacuées par les selles en 48 heures et une partie de la quantité restante par les urines. Cependant, un faible pourcentage de ces nanoparticules peut diffuser à travers le mucus, être absorbé par les entérocytes et gagner la circulation sanguine [167].

La pénétration des nanoparticules est favorisée par la superficie totale du tube digestif qui est d'environ 240 m<sup>2</sup> mais dépend aussi de leur taille et de leurs propriétés physico-chimiques comme la stabilité, ou la surface hydrophobe [168]. La charge semble également intervenir dans la pénétration des nanoparticules [169]. Pour exemple, les nanoparticules de latex chargées positivement sont piégées dans le mucus chargé négativement tandis que celles chargées positivement traversent le mucus et peuvent interagir avec les cellules épithéliales [170].

La translocation des nanoparticules à travers le système digestif se ferait majoritairement en partie terminale de l'iléon c'est-à-dire au niveau des plaques de Peyer (jonctions intercellulaires). Ces plaques sont composées de 10 % de cellules M [168]. L'absorption des nanoparticules par ces cellules représentent une voie potentielle après passage par le système lymphatique pour rejoindre les systèmes sanguins et les autres organes. D'autres hypothèses sont émises sur l'absorption des nanoparticules et concernent le passage à travers l'épithélium intestinal par voie paracellulaire voire transcellulaire (**Figure 35**) [170] [171].

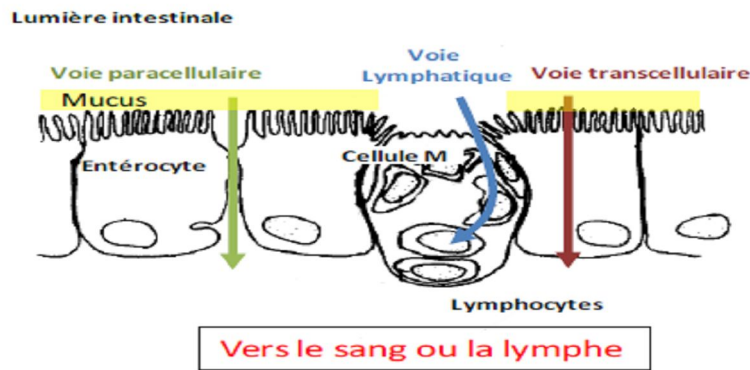


Figure 35: Passage des nanoparticules à travers l'épithélium intestinal [171].

L'analyse du passage du franchissement de l'épithélium intestinal par les nanoparticules prend tout son sens si l'on considère que l'abdomen constitue un « second cerveau » présentant 20 millions de neurones. En effet, son rôle clé dans le développement de nombreuses pathologies chroniques (dépression, anxiété, maladies neuro-dégénératives) commence seulement à être appréhendé. De plus, des inquiétudes sont soulevées par la présence de nanoparticules dans les laits maternisés et de leur éventuel passage à travers la barrière intestinale.

#### II.6.4 Administration des systèmes vectorisés par voie intraveineuse :

Pour un effet thérapeutique bénéfique, les principes actifs, dans leur état libre ou incorporés au sein des nanoparticules, doivent atteindre leur site d'action. Cependant, il existe plusieurs barrières biologiques face à ces nanoparticules. Ces barrières peuvent être classées en trois catégories : les barrières externes (peau et muqueuse), la barrière sanguine et la barrière cellulaire [172]. Les barrières externes peuvent être évitées en optant pour une administration par voie intraveineuse, ce qui est compatible avec la taille nanométrique de la plupart des nanoparticules. En revanche, avec ce type d'administration, les nanoparticules se heurtent à plusieurs problèmes, tels que l'élimination rénale et hépatique, la déstabilisation, l'agrégation, l'opsonisation et l'élimination par le système phagocytaire mononucléaire (MPS) [173].

Le MPS appartient au système immunitaire composé de cellules phagocytaires, tels que les monocytes dans le sang et les macrophages accumulés dans les nœuds lymphatiques, la rate et le foie (cellules de Küpffer).

### a. Influence de la taille des nanoparticules sur leur biodistribution

Les nanoparticules de taille inférieure à 10 nm sont rapidement éliminées du sang par filtration rénale.

L'élimination rénale peut affecter également les macromolécules dissociées des nanoparticules si leur masse moléculaire est inférieure à 48 kDa [172].

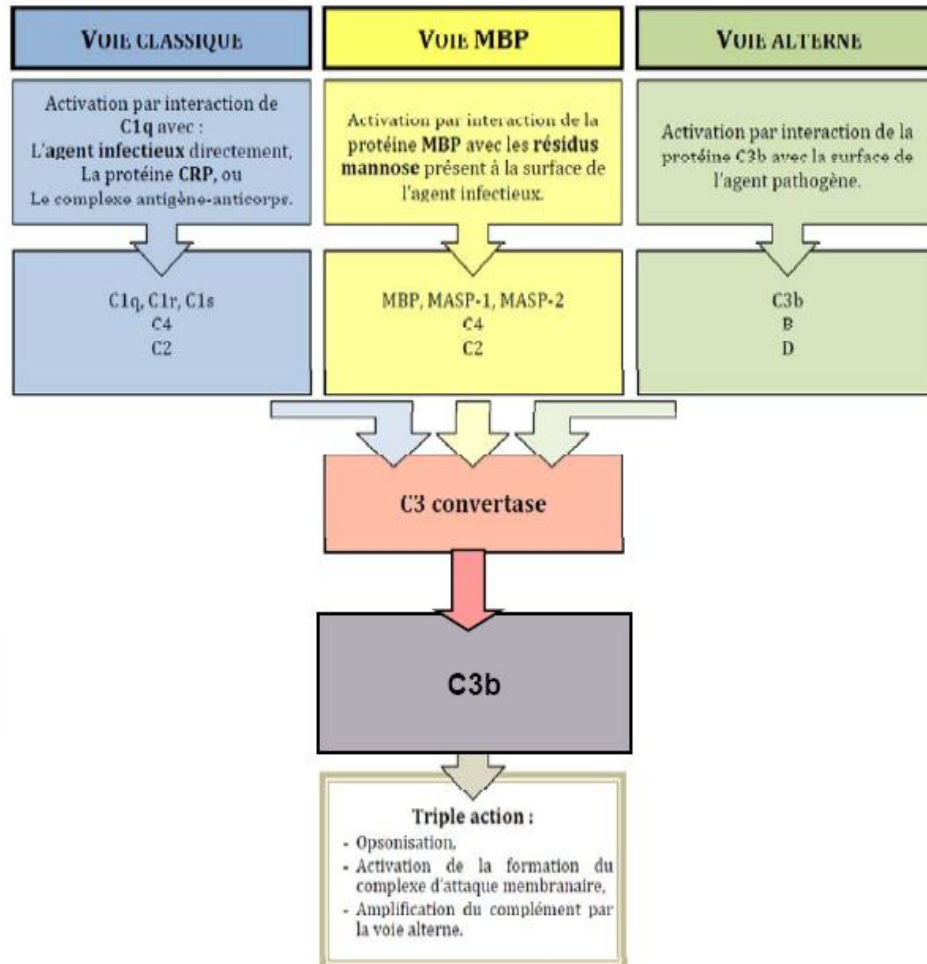
L'opsonisation et la phagocytose par le MPS font partie des obstacles majeurs à la stabilité et la délivrance *in vivo* des nanoparticules. Les cellules phagocytaires du MPS sont capables d'internaliser les nanoparticules et ensuite les dégrader et les éliminer de l'organisme. La phagocytose n'est pas spécifique à ce type de nanoparticules, il s'agit d'une réponse normale du système immunitaire en présence de matériaux étrangers.

Le processus de phagocytose est gouverné par le phénomène d'opsonisation. Ce dernier phénomène consiste en l'adsorption d'opsonines (protéines plasmatiques) à la surface de corps étrangers. Cette adsorption permet au système immunitaire de reconnaître les corps étrangers et induit ainsi leur phagocytose. Le système d'opsonines est composé essentiellement par le complément du sérum (protéines plasmatiques) [174] [175].

D'autres protéines telles que l'immunoglobuline et la fibronectine peuvent aussi contribuer à ce processus d'opsonisation. Le complément, qui est primordial pour la reconnaissance d'agents pathogènes, est constitué d'environ 30 protéines localisées dans le plasma, ou comme récepteurs à la surface de plusieurs cellules.

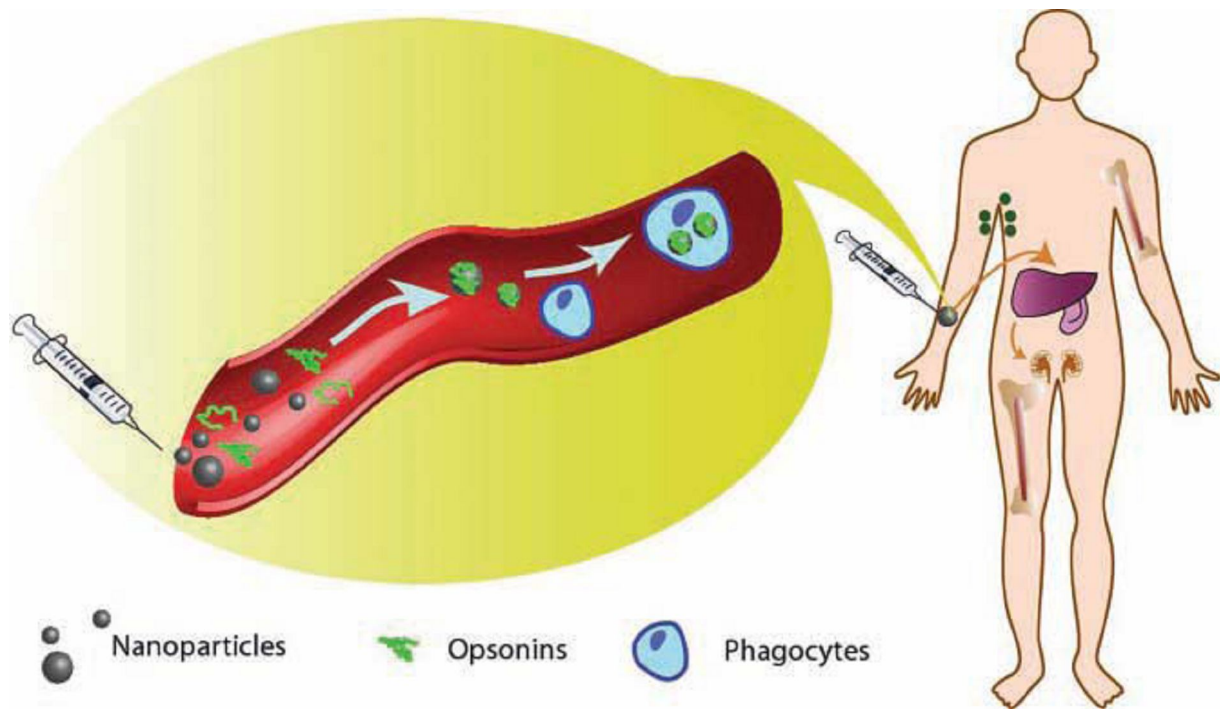
Lorsque certaines opsonines s'adsorbent à la surface d'un corps étranger, il en résulte l'activation du complément du sérum par différentes voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (appelée aussi la voie MBP de l'anglais « *Mannose Binding Protein* »)

(**Figure 36**). Cette activation permet d'induire une cascade de transformations capable d'amplifier le phénomène d'opsonisation et la réponse immunitaire.



**Figure 36 :** Schéma représentant les grandes étapes et l'action des différentes voies d'activation du complément.

Lorsque la surface étrangère est recouverte d'opsonines dont la protéine C3b, cette dernière est reconnue par des récepteurs spécifiques, provoquant ainsi la phagocytose du complexe « corps étranger-C3b ». Cette reconnaissance spécifique se fait notamment par l'intermédiaire du récepteur CR1/CD35 présent en grande quantité à la surface des globules rouges. Ces derniers transportent les complexes immuns jusqu'au foie où ils sont phagocytés par les cellules de Kupffer, d'origine macrophagique. Une élimination des complexes opsonisés par C3b est également possible via les cellules phagocytaires circulantes (**Figure 37**) [176].



**Figure 37:** Elimination des nanoparticules par le MPS [177].

L'adsorption de ces protéines à la surface des nanoparticules peut potentiellement les déstabiliser, essentiellement dans le cas des micelles polymériques, et induire une libération rapide et prématurée de l'agent encapsulé [178] [179].

Le principe actif peut ainsi causer une toxicité indésirable.

Les nanoparticules de grande taille (>200 nm) possèdent de faibles rayons de courbure, ce qui permet d'augmenter les interactions des opsonines à leur surface et d'accélérer leur élimination *in vivo* [180]. Ces nanoparticules sont ensuite capturées par le MPS.

Les nanoparticules de taille intermédiaire (20-100 nm) ont donc le plus grand potentiel pour des applications *in vivo*, parce qu'elles sont capables de circuler de manière prolongée dans le sang, lorsqu'elles sont conçues de façon appropriée. Ces nanoparticules sont assez larges pour éviter la filtration rénale et lymphatique et assez petites pour éviter l'opsonisation. De plus, dans cette gamme de taille, les nanoparticules semblent être plus facilement internalisées par les cellules [181]. Par ailleurs, elles sont capables de s'accumuler dans certains tissus avec une forte perméabilité vasculaire, tels que les tumeurs et les sites d'inflammation. Cette accumulation dans les tissus tumoraux est très utile pour maintenir des concentrations élevées en agent thérapeutique. L'accumulation est aussi favorisée par le faible drainage lymphatique au niveau des tumeurs.

#### **b. Influence de la chimie de surface**

La charge de surface des nanoparticules est un paramètre important qui contribue à l'interaction non-spécifique des nanoparticules avec les cellules et les protéines plasmatiques.

Les nanoparticules de charge positive sont rapidement éliminées par les cellules du MPS, à cause de leur interaction avec les protéines plasmatiques (par interactions électrostatiques) ce qui induit l'activation du complément [182]. Les surfaces cationiques interagissent aussi avec les phospholipides et les protéines de charge négative qui sont à la surface des membranes cellulaires. Cette interaction favorise la capture cellulaire des nanoparticules par endocytose ou par pénétration directe de la membrane cellulaire [183]. L'opsonisation est également influencée par la balance hydrophile/hydrophobe des nanomatériaux. Ce processus est plus rapide lorsque les nanoparticules sont plus hydrophobes.

En effet, les protéines plasmatiques s'adsorbent plus facilement à la surface des particules hydrophobes grâce à des interactions hydrophobes [184] [185].

La modification des propriétés de surface des nanoparticules à l'aide de certains polymères hydrophiles et neutres (ex. PEG) permet dans certains cas de minimiser le phénomène d'opsonisation [186] [187]. Ceci permet donc aux nanoparticules de circuler plus longtemps dans le sang et atteindre le tissu tumoral de manière plus efficace. Les nanoparticules possédant une surface neutre et hydrophile semblent être les meilleurs candidats pour éviter la capture par les macrophages du MPS [182].

### **II.6.5 Accumulation des nanoparticules au niveau tumoral grâce à l'effet EPR**

Les nanoparticules qui évitent leur capture par le MPS sont capables d'atteindre le tissu tumoral après une circulation prolongée dans le sang. En théorie, le temps de circulation prolongée des nanoparticules leur permet une accumulation préférentielle dans certains sites biologiques, comportant des anomalies vasculaires (tumeurs et inflammations), grâce à l'effet EPR. Maeda *et al.* [188] ont bien décrit ce phénomène.

En effet, dans des conditions inflammatoires, la perméabilité des vaisseaux sanguins augmentent par l'action de différents agents (appelés généralement « facteurs ») agissant sur les cellules endothéliales et ouvrant les jonctions serrées intercellulaires. Parmi ces facteurs, nous citons la bradykinine, l'histamine, les prostaglandines, et le facteur de nécrose tumorale.

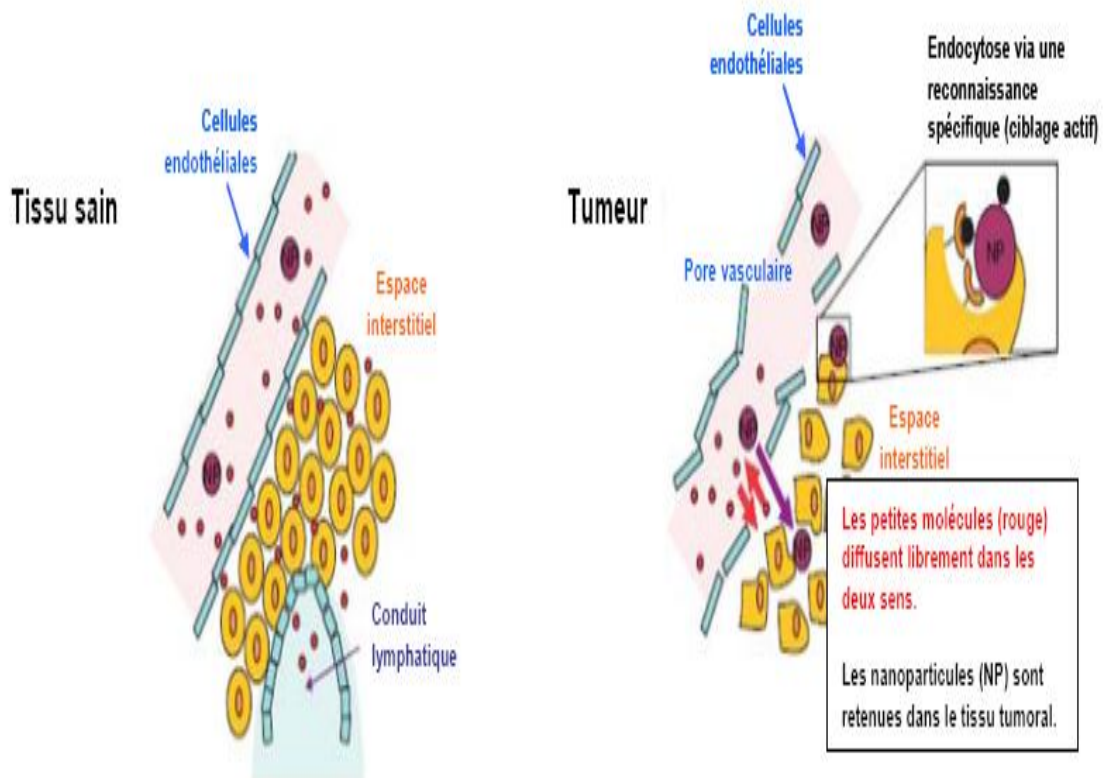
Ce phénomène a été également démontré dans le cas d'infections microbiennes. Dans le cas du tissu tumoral (cancer), il y a au moins deux facteurs qui modulent la perméabilité vasculaire : le facteur de perméabilité vasculaire (VPF) et la bradykinine. Tous ces facteurs induisent une hypervascularisation du tissu tumoral, avec des vaisseaux présentant de larges fenestrations (ou pores) [188].

Les macromolécules de taille supérieure à 40 kDa et les nanoparticules, ayant un temps de circulation dans le sang prolongé, montrent une accumulation tumorale importante [188]. Une fois au niveau du site tumoral, les petites particules diffusent de manière significative à

l'extérieur de la tumeur pour rejoindre de nouveau la circulation sanguine, d'où une plus faible accumulation tumorale en comparaison avec les grosses molécules.

En plus de la perméabilité des tissus tumoraux, il existe un deuxième facteur qui influence l'accumulation passive des macromolécules et nanoparticules au niveau de la tumeur. Les tissus tumoraux sont caractérisés par un plus faible drainage lymphatique, en comparaison avec les tissus sains [188]. Par conséquent, les macromolécules et les nanoparticules sont retenues pour une période de temps prolongée dans l'interstitium tumoral. La combinaison de ce faible drainage avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau de la tumeur donne naissance à l'effet EPR (**Figure 38**). Cet effet EPR est un phénomène général qui encourage le développement d'agents thérapeutiques macromoléculaire et de la nanomédecine.

Il est donc primordial de concevoir des nanoparticules capables d'éviter le phénomène d'opsonisation et d'acquérir une circulation prolongée dans le sang, afin d'atteindre efficacement le tissu tumoral. Plusieurs stratégies ont été développées pour préparer ce type de nanoparticules appelées « furtives ». La méthode la plus utilisée est la couverture des nanoparticules par une couronne de PEG qui, par un effet de répulsion stérique, va empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules. L'ajout de ligands à la surface des nanoparticules permettrait, quant à lui, de reconnaître des récepteurs spécifiques afin de pouvoir délivrer l'agent thérapeutique à l'intérieur de la cellule cible (**Figure 38**).



**Figure 38:** Représentation schématique du ciblage passif et actif des nanoparticules via l'effet EPR.

La différence entre le tissu sain et la tumeur met en évidence l'accumulation passive des nanoparticules [189].

## II.7 Avantages et inconvénients des nanoparticules :

La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes : elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. Ces particules ont, effectivement l'avantage de former des solutions homogènes qui ne sédimentent ou ne crèment pas. Mais ce sont surtout leurs capacités à esquiver les défenses immunitaires et leur capacité à cibler une population de cellules particulières qui en font des vecteurs prometteurs.

L'utilisation des nanoparticules pour la détection et le traitement de pathologies ouvre un nouveau domaine de recherche. L'un des terrains d'application le plus prometteurs, et aussi le plus avancé actuellement, est la délivrance de médicaments (« drug delivery » en anglais), et en particulier le développement de thérapies ciblées pour l'oncologie. En effet, véhiculer les molécules anticancéreuses par des nanoparticules permet d'augmenter leur sélectivité pour les tumeurs, et ainsi de réduire les sévères effets secondaires accompagnant les chimiothérapies.

La délivrance spécifique d'agents d'intérêt vers un organe, un tissu ou une cellule constitue aujourd'hui un défi majeur pour la prévention, la localisation et le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

Actuellement, l'obtention de concentrations efficaces en principes actifs au niveau des zones ciblées ne peut se faire qu'au détriment de cellules saines, puisqu'une partie importante des substances administrées est captée par d'autres tissus. Cette accumulation au sein de tissus non visés occasionne des effets toxiques conséquents et parfois rédhibitoires qui peuvent entraîner l'abandon du traitement en dépit de son efficacité.

De nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaires, etc.) peu favorables au passage des nombreuses barrières cellulaires, physico-chimiques et biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ces principes actifs sont donc toujours mal absorbés, souvent très rapidement dégradés, métabolisés, ou éliminés et donc incapables d'atteindre leur cible au niveau tissulaire ou cellulaire. Il faut savoir que 95 % des nouveaux principes actifs développés ont des propriétés pharmacocinétiques médiocres [190]. Pour toutes ces raisons, le développement de vecteurs de médicaments permettant la délivrance spécifique de la molécule active au niveau du site d'action a pris un essor considérable au cours des dernières années.

### II.7.1 Toxicocinétique des nanoparticules chez l'homme.

Afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité des nanoparticules, il est nécessaire de déterminer le devenir de ces éléments dans l'organisme, c'est-à-dire leur cinétique. La cinétique regroupe l'ensemble du processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion).

Dans un premier temps la substance (médicament ou toxique) est absorbée. Cela correspond à son passage dans la circulation sanguine. Elle est ensuite distribuée aux différents organes et peut subir un métabolisme (ou biotransformation) au niveau du foie. Enfin elle peut être éliminée de l'organisme par voie rénale, biliaire ou fécale.

Pour les substances chimiques « classiques », la toxicocinétique peut être prédite par comparaison avec des analogues structuraux. En revanche, pour les nanoparticules, trop peu de données sont disponibles et une étude au cas par cas serait nécessaire afin de déterminer leur devenir dans l'organisme, chaque nanoparticule engendrant des effets différents.

Cependant quelques hypothèses peuvent être émises [191].

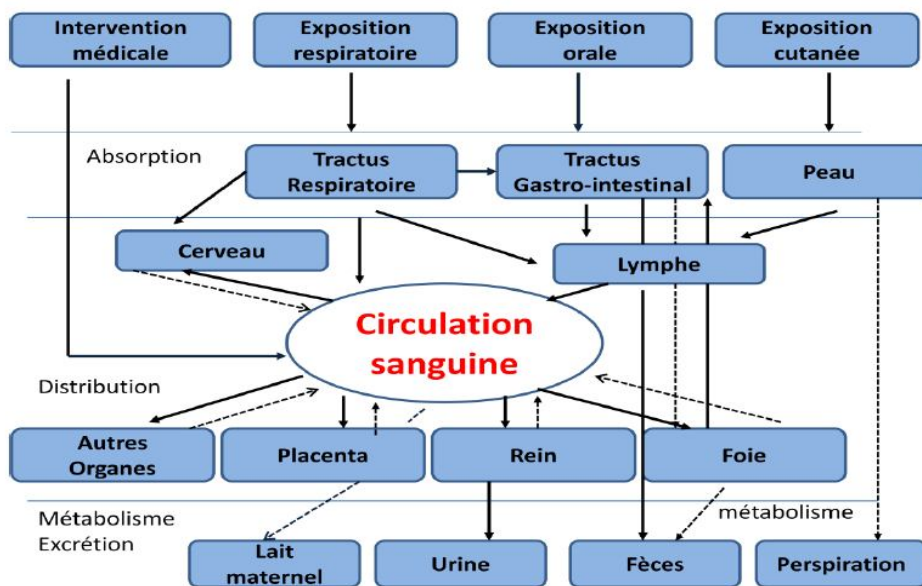


Figure 39 : Cinétique des nanoparticules [191].

La principale voie d'exposition aux nanoparticules est la voie pulmonaire en raison de la grande quantité de nanoparticules présentes dans l'environnement. Cependant, du fait de l'essor des nanoparticules dans les domaines de la cosmétique, de l'alimentaire et du médical, les voies cutanée, gastro-intestinale et parentérale ne doivent pas être négligées.

L'absorption est la première étape de la cinétique. Concernant la voie pulmonaire, ce passage se fera principalement au niveau des alvéoles pulmonaires, système richement vascularisé. Les nanoparticules présentes dans le tractus gastro-intestinal peuvent quant à elles atteindre la circulation sanguine ou lymphatique par les entérocytes ou les plaques de Peyers.

La deuxième étape de la cinétique est la distribution de ces nanoparticules aux différents tissus ou organes (foie, rate, cœur, cerveau). Lorsque les nanoparticules atteignent la circulation générale, elles peuvent interagir avec les protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation, les globules blancs ou les globules rouges.

Le métabolisme à présent, concerne les nanoparticules absorbées au niveau du système gastro-intestinal qui rejoignent le foie (organe de la métabolisation) par la veine porte. Cependant peu de résultats sont à ce jour disponibles sur ce point.

L'élimination des nanoparticules s'effectue ensuite par différentes voies : soit par leur « porte d'entrée » si celles-ci ne sont pas absorbées (escalator mucociliaire pour la voie pulmonaire) ; soit par voie rénale ou biliaire pour les nanoparticules ayant gagné la circulation générale.

La cible rénale doit faire l'objet d'une attention particulière, le rein intervenant majoritairement dans le processus d'élimination des nanoparticules [192]. Il est donc nécessaire de s'interroger sur l'impact de la présence de nanoparticules au niveau de cet organe d'élimination. Des études *in vitro* ont ainsi été réalisées (Laboratoire de biologie cellulaire, Faculté de sciences biologiques de Bordeaux) sur des lignées cellulaires humaines issues de la partie glomérulaire (lieu de filtration) et tubulaire proximale (lieu de réabsorption et d'accumulation) des néphrons [193]. Une exposition limitée (24 heures) des cellules rénales aux nanoparticules met en évidence l'influence de leurs caractéristiques physico-chimiques sur les effets biologiques alors qu'une exposition prolongée (28 jours) permet d'évaluer l'impact de la durée d'exposition sur les effets toxicologiques des nanoparticules.

La composition chimique et la libération de cations par les nanoparticules apparaissent comme des paramètres essentiels à l'origine d'effets cytotoxiques sur les cellules rénales.

## II.8 Applications des nanoparticules

La délivrance de médicaments concerne principalement des molécules chimiques (principes actifs) mais elle englobe également les agents thérapeutiques biologiques comme les protéines, les peptides et également l'ADN ou l'ARN pour les thérapies géniques. Outre la délivrance de principes actifs chimiques ou biologiques au sein des tissus ciblés, les nanoparticules peuvent également être utilisées pour d'autres types de thérapies, telles que la radiothérapie, la thermothérapie ou encore la thérapie photodynamique.

- La radiothérapie consiste à détruire des cellules placées à proximité d'une source émettant des rayonnements radioactifs. L'intérêt des nanoparticules est alors de véhiculer la source radioactive directement au niveau de la zone à traiter [194].
- La thermothérapie ou hyperthermie a la même finalité, mais utilise une élévation de la température pour y parvenir. Il s'agit alors de provoquer par un champ extérieur (magnétique ou laser par exemple) un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C) induisant la destruction des cellules [195] [196].
- La thérapie photodynamique [197] se base sur des molécules (photosensibilisatrices) qui, suite à l'absorption d'un rayonnement lumineux, produisent de l'oxygène singulet ou des radicaux libres. Ces substances ont d'importantes propriétés oxydantes qui conduisent à la mort des cellules environnantes. Une fois de plus, les nanoparticules jouent le rôle de transporteur permettant de véhiculer le photosensibilisateur dans la zone d'intérêt [198] [199].

Dans les trois cas, les nanoparticules sont utilisées pour véhiculer les agents thérapeutiques (source radioactive, matériaux provoquant l'hyperthermie, photosensibilisateur) dans la zone ciblée. En effet, il est toujours préférable que ces agents thérapeutiques s'accumulent de façon préférentielle au sein des tissus à traiter afin de minimiser leur impact sur les cellules saines.

Le diagnostic, et plus particulièrement l'imagerie médicale, constitue également un champ d'application auquel la nanomédecine peut apporter de réelles améliorations, les nanoparticules jouant le rôle de traceurs ou d'agents de contraste.

Une grande partie des nanoparticules inorganiques possèdent intrinsèquement des propriétés thérapeutiques ou diagnostiques. C'est notamment le cas des boîtes quantiques fluorescentes (« Quantum dots » en anglais) utilisées comme agent de contraste en IRM (Imagerie de Résonance Magnétique), ou encore des particules pour la thérapie. En revanche, les particules organiques sont dépourvues de telles propriétés. Leur rôle consiste à protéger les agents thérapeutiques ou diagnostiques qui leur sont adjoints, à les véhiculer vers une zone de l'organisme ciblée, et éventuellement à les relarguer.

Ainsi, outre la protection des agents d'intérêt (thérapeutiques ou diagnostiques) et leur libération éventuelle, la principale mission des nanoparticules est de véhiculer les agents d'intérêt vers une zone ciblée. Cela sous-entend donc qu'elles disposent de propriétés de vectorisation particulière.

### **II.8.1 Applications en oncologie :**

Les progrès en nanotechnologie suscitent l'espoir de nouveaux traitements du cancer, plus efficaces, mieux ciblés et mieux tolérés. Les nanoparticules, de part leur taille, leurs propriétés physiques et leurs interactions avec les tissus vivants, peuvent répondre à certains critères et se concentrer à un endroit précis de l'organisme par exemple.

Les nanoparticules peuvent être utilisées selon les principes suivants :

- la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques
- l'exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules pour la thérapie.

#### **II.8.1.1. Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques à visée anticancéreuse.**

La chimiothérapie conventionnelle, apparue dans les années 1940 repose sur l'administration de drogues « non spécifiques », cystostatiques et cytotoxiques.

Il est nécessaire de proposer de nouvelles stratégies plus ciblées, basées sur des médicaments dirigés spécifiquement contre les altérations moléculaires responsables de cancers, et administrés spécifiquement au site tumoral plutôt que de manière généralisée.

Les propriétés physiques des nanoparticules sont particulièrement adaptées au développement de stratégies innovantes pour la médecine. Elles constituent de petits « chevaux de Troie » permettant de transporter jusqu'à la tumeur des agents cytotoxiques pour la thérapie améliorant considérablement leur propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. La nanotechnologie offre la possibilité d'un ciblage à deux niveaux. Le ciblage moléculaire consiste à concevoir des médicaments capables d'interagir spécifiquement avec une cible moléculaire pour neutraliser son action (ciblage de l'activité enzymatique de protéine). Le ciblage cellulaire consiste à diriger l'agent thérapeutique vers un récepteur spécifiquement exprimé à la surface des cellules cancéreuses (anticorps, fragments peptidiques ou ligands complémentaires) [200].

De plus, les nanoparticules sont couplées à des agents stabilisateurs pour permettre une diffusion prolongée dans l'organisme et réduire leur reconnaissance et l'opsonisation par le système immunitaire [200] [201].

Les nanoparticules augmenteraient la concentration de drogues anticancéreuses au sein des cellules atteintes tout en limitant la toxicité de ces médicaments [202].

Les nanoparticules d'or, décorées en surface par des oligonucléotides possèdent des propriétés intéressantes concernant l'administration de médicaments : bonne pénétration cellulaire, faible toxicité, et protection des principes actifs vis-à-vis de la dégradation. Ces nanoparticules d'or ont été recouvertes en surface d'un oligonucléotide portant un groupement aminé terminal libre condensé à un complexe du platine. L'activité de ces nanoparticules a été évaluée *in vitro* sur des lignées cellulaires (ostéosarcomes humains, carcinome du poumon humain, cancer des cervicales et de la prostate). Les nanoparticules d'or sont 2 à 10 fois plus actives que le Cisplatine sur toutes les lignées, en raison d'une meilleure pénétration cellulaire et d'une meilleure biodisponibilité [203].

D'autres nanoparticules d'or ou d'argent sur lesquelles sont greffées des molécules thérapeutiques ont été proposées pour le traitement topique de maladie de peau comme le psoriasis ou le cancer.

Une meilleure biodisponibilité et un meilleur ciblage (tout en réduisant la toxicité des molécules) sont les avantages mis en avant par certains auteurs concernant l'utilisation de ces nanoparticules par rapport aux nombreuses molécules déjà présentes sur le marché [202].

### **II.8.1.2. Exploitation des caractéristiques propres aux nanoparticules**

Les nanoparticules magnétiques (nanoparticules d'or, d'argent, nanotubes de carbone) sont également activables à distance et s'échauffent sous l'effet d'un champ magnétique oscillant à haute fréquence. Introduites au sein d'une tumeur, elles peuvent endommager les cellules cancéreuses en provoquant une hyperthermie locale.

Une des limitations de l'hyperthermie magnétique est le faible pouvoir chauffant des nanoparticules magnétiques usuelles. En conséquence, pour obtenir un effet thérapeutique, de fortes doses de nanoparticules doivent être injectées localement dans la tumeur. La plupart des études vise donc l'optimisation du pouvoir chauffant des nanoparticules magnétiques afin de réduire les doses injectées [204].

Un autre exemple de caractéristique propre aux nanoparticules exploitable en nano-médecine est la potentialisation des effets des rayonnements ionisants (radiothérapie anticancéreuse). Dans ce cadre, le produit NBTXR3\* de la société Nanobiotix a reçu en juin 2013 l'autorisation de l'ANSM pour démarrer un nouvel essai clinique de phase 1 chez une population cible de patients atteints de carcinome épidermoïde localement avancé de la cavité buccale ou de l'oropharynx.

Cet essai clinique de phase 1 est une étude ouverte, non randomisée, avec escalade de doses évaluant la toxicité et le profil de tolérance du produit. NBTXR3\* est implanté par injection intraartérielle ou intra-tumorale et activé par radiothérapie de haute précision (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité ou IMRT), conformément à la pratique médicale.

Les objectifs secondaires de l'étude incluent l'évaluation de la réponse complète et globale par IRM et l'évaluation de la survie sans progression locale et générale [205].

Cette étude représente la deuxième indication du développement clinique du NBTXR3\*, actuellement en cours d'évaluation chez des patients atteints d'un sarcome des tissus mous.

L'activation par rayons X de ce type de nanoparticules génère des électrons provoquant la destruction des cellules cancéreuses. Cette approche, en réduisant les doses de radiothérapie nécessaire, limite les dommages des tissus sains et effets indésirables [206].

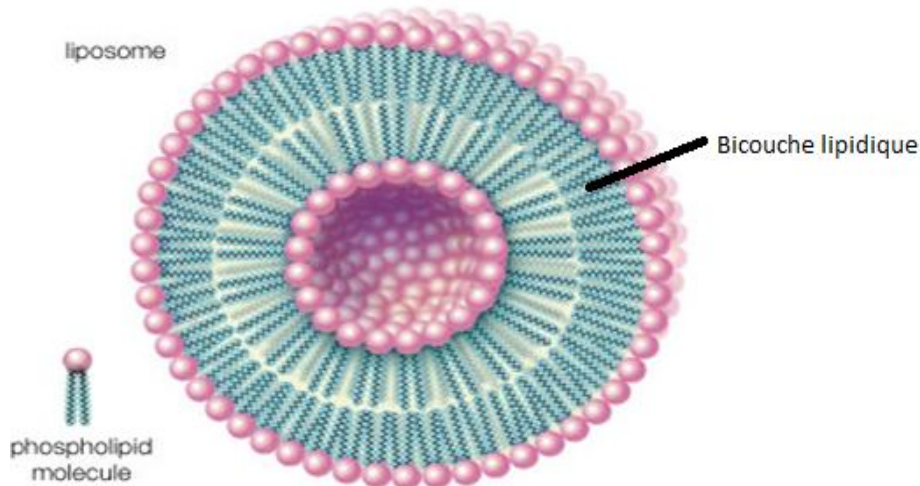
*Quatrième partie :  
Place des liposomes dans  
le traitement anticancéreux*

## I. Généralités :

### I.1 Préambule :

Les liposomes furent fabriqués pour la première fois en 1965 par Alec Bangham et ses collègues alors qu'ils effectuaient des recherches sur les propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique [207].

Ce sont des vésicules (structures fermées) sphériques composées de bicouches phospholipidiques (**Figure 40**) qui encapsulent une partie du solvant dans lequel elles se trouvent [208] Leur taille varie d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres. L'épaisseur d'une bicouche phospholipidique mesure quelques nanomètres (en fonction de la nature des phospholipides). En solution, la membrane des liposomes (la ou les bicouches) a un caractère dynamique, c'est-à-dire qu'elle va interagir avec le milieu et évoluer [209]. Une partie des phospholipides sont solubilisés en solution et une autre partie des phospholipides sont donc organisés en bicouches. Des échanges de molécules de phospholipides se font entre les bicouches d'un même liposome, entre liposomes et entre les bicouches et la solution.



**Figure 40** : Représentation schématique d'un liposome.

## I. 2. Structure et matières premières :

### I. 2.1. Composition des liposomes

La matière première des liposomes comprend généralement un ou plusieurs phospholipides, éventuellement un stérol et une substance ionique lorsque les liposomes souhaités doivent avoir une charge positive ou négative. Les caractéristiques des liposomes dépendent de leur mode de fabrication et du choix des composants de la bicouche, notamment des phospholipides, qui influencent fortement la rigidité (ou la fluidité) ainsi que la charge de la bicouche. Par contre, ils ont l'avantage d'être atoxiques et facilement dégradés, car ils font partie des constituants naturels des membranes biologiques.

Lors de la préparation des liposomes, il est indispensable de fixer au préalable différents paramètres comme le rapport molaire des différents constituants lipidiques, la concentration finale en lipides dans la suspension, ainsi que le volume final de la suspension. Ces paramètres permettent, connaissant le poids moléculaire de chacun des composés, de calculer les quantités de lipides à utiliser pour la préparation.

#### I.2.1.1. Les phospholipides :

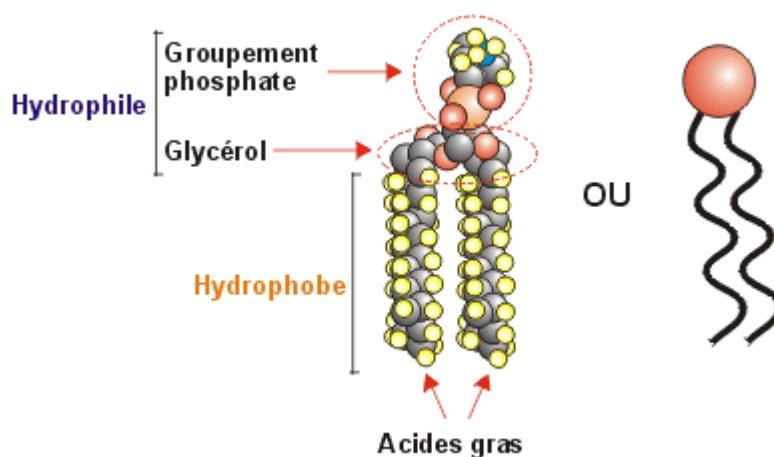
Les lipides sont des corps gras d'origine naturelle. Les lipides les plus répandus au niveau des membranes biologiques sont les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols. Les phospholipides font partie de la famille des glycérolipides. Les glycérolipides sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe polaire, qui constitue la tête polaire du lipide. Dans le cas des phospholipides, il s'agit du groupe phosphate, lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés. Les acides gras possèdent généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peuvent comporter une ou plusieurs insaturations, non conjuguées en général. C'est essentiellement la tête polaire (groupe phosphate dans notre cas) qui va dicter le comportement des différents lipides et qui va permettre leur classification ; ainsi, dans le cas des phospholipides, on trouve : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS)... [210] (**Tableau II**). Les phospholipides (**Figure 41**) sont

donc constitués de deux parties (polaire et apolaire) qui possèdent des affinités pour deux milieux incompatibles, d'où l'appellation des phospholipides comme molécules amphiphiles ou tensioactifs ou surfactants [211].

Les molécules de phospholipides vont donc avoir tendance à s'organiser en solution de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires et inversement.

**Tableau II** : Exemples de groupement chimique associé au groupement phosphate des phospholipides.

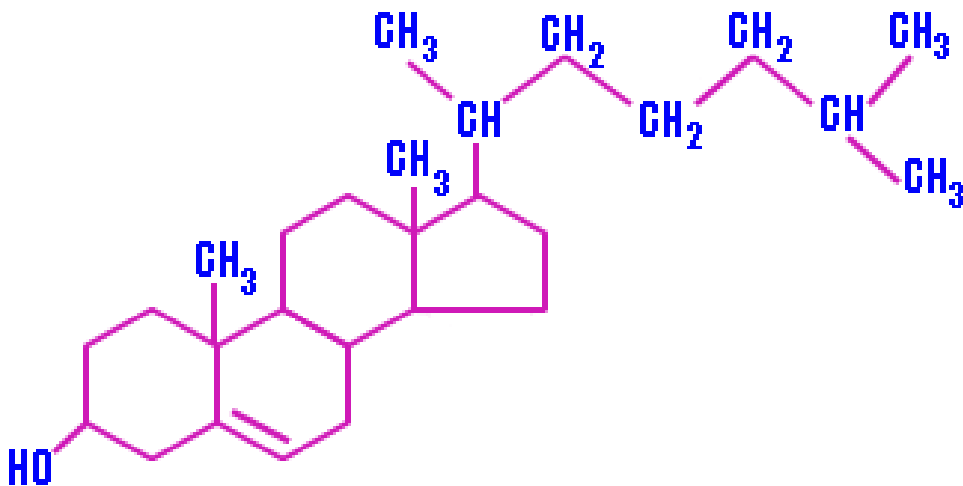
Nom	Formule chimique
<b>Phosphatidylethanolamine (PE)</b>	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
<b>Phosphatidylglycérol</b>	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$
<b>Phosphatidylcholine (PC)</b>	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$
<b>Phosphatidylsérine (PS)</b>	$-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2\text{COOH}$



**Figure 41**: Schéma développé d'une molécule de phospholipide.

### I.2.1.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur administration. Le cholestérol (**Figure 42**) diminue la fluidité de la bicouche lipidique car la structure rigide du stéroïde limite les mouvements des chaînes des acides gras. Il diminue ainsi la perméabilité membranaire pour les molécules hydrosolubles et enfin, il augmente la rigidité de la bicouche favorisant ainsi sa stabilité en milieu sérique [212]. Les liposomes sans cholestérol ont tendance à interagir avec les protéines du sang comme l'albumine, la transferrine ou les macroglobulines.



**Figure 42** : Formule du cholestérol.

### I. 3 Classification des liposomes

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application *in vivo*) ou même, selon leur méthode de préparation.

#### I.3.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologiques :

Les liposomes sont classés en fonction de leur nombre de bicouches appelé lamellarité et de leur taille. Ces caractéristiques varient en fonction de la méthode de formation employée et des matières premières utilisées pour les former [208].

Les vésicules unilamellaires (*unilamellar vesicles* ou LUV) sont formées d'une seule bicouche concentrique. A l'inverse, les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles* ou MLV) comptent plusieurs bicouches concentriques.

En prenant en compte la taille des liposomes, les vésicules géantes unilamellaires (*large unilamellar vesicles* ou LUV) sont des vésicules unilamellaires de tailles comprises entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  et les petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicles* ou SUV) sont des vésicules unilamellaires de tailles comprises entre 0,02 et 0,1  $\mu\text{m}$ . Enfin, les vésicules multilamellaires ont une taille comprise entre 0,2 et 100  $\mu\text{m}$ .

Enfin, les vésicules multivésiculaires sont des vésicules pour lesquelles plusieurs vésicules sont emprisonnées dans une vésicule plus grosse.

Ces éléments sont regroupés sur la **Figure 43** et dans le **Tableau III**.

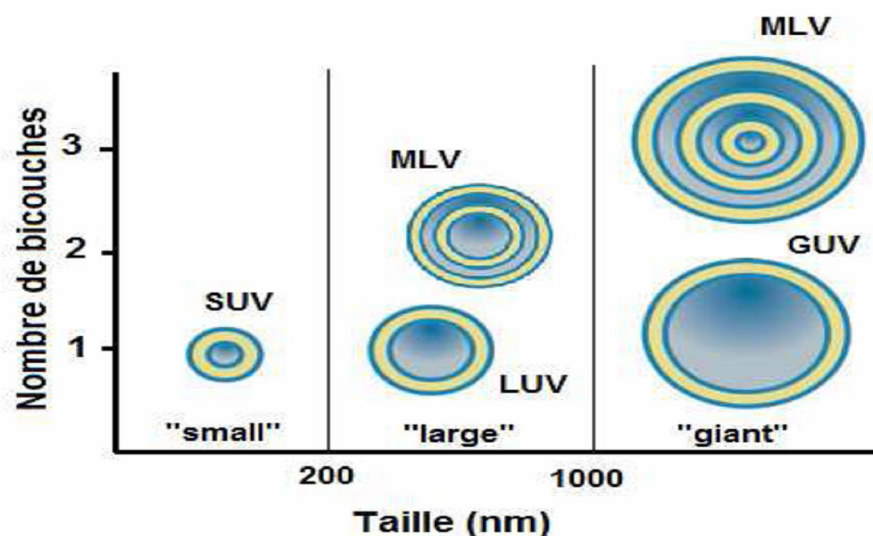






Figure 43 : Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur Taille.

Tableau III : Classification des liposomes selon Papadopoulos (1977)

Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
Représentation				
Taille	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 $\mu$ m
Capacité	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV.	peu utilisés
% d'encapsulation	0,5-1	35-60	5-15	
Stabilité	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface : MLV > LUV > SUV La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm.			

### **I. 3.2. Classification selon leur composition et leur application in vivo :**

#### **I.3.2.1. Liposomes conventionnels**

Ils peuvent être définis comme les liposomes typiquement composés de phospholipides (neutres ou chargés négativement) et/ou de cholestérol. La plupart des liposomes utilisés comme vecteurs de médicaments sont des liposomes conventionnels. Ils sont caractérisés par un temps de circulation sanguine relativement court. En effet, après administration *in vivo* (par voie parentérale le plus souvent), on observe une captation rapide de ces liposomes par les cellules phagocytaires (macrophages) du système réticuloendothélial.

Ils s'accumulent alors dans le foie et la rate principalement. La capture naturelle des liposomes par les macrophages permet leur utilisation pour cibler et délivrer des agents antimicrobiens à un certain nombre de microorganismes infectieux. Plusieurs vaccins sont également élaborés, et même commercialisés (en Suisse), à partir de ces liposomes conventionnels.

#### **I.3.2.2. Liposomes furtifs –pégylés**

L'élimination rapide des liposomes conventionnels de la circulation sanguine, par les macrophages du foie et de la rate, a sérieusement compromis leur application pour un grand nombre de traitements concernant l'affection d'autres tissus [213].

A la fin des années 80, la découverte de liposomes dits furtifs, a élargi les potentialités thérapeutiques des liposomes, grâce à l'amélioration de leurs temps de circulation dans l'organisme.

Le principe de ces liposomes est de réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et d'échapper à la phagocytose par les cellules du système réticuloendothélial, en modifiant leur membrane [214]. Pour cela, la création d'une barrière stérique tout autour de la bicouche lipidique est réalisée avec des résidus sialiques (gangliosides ou sphingomyéline) ou grâce à des polymères hydrophiles [215]. Les liposomes ainsi obtenus se caractérisent par une grande stabilité en milieu biologique.

## ✚ La Pégylation

Le premier succès de la conjugaison d'une drogue avec un polymère est réalisé avec le polyéthylène glycol (PEG) connu sous le nom de pégylation. A la fin des années soixante, Frank F. Davis travaillait sur l'immunogénicité des protéines recombinantes. En lisant un article rapportant l'utilisation en intraveineuse d'un surfactant à base de PEG et de polypropylène glycol chez des patients opérés pour réduire les risques d'embolie, il a eu l'idée de lier les protéines avec le PEG. Ce lien réduisait l'immunogénicité de ses protéines recombinantes et augmentait leur temps de circulation dans le sang. Il a créé une start-up de pégylation appelée Enzon au début des années 80. Les premiers enzymes pégylés produits pour l'utilisation thérapeutique sont l'asparaginase et la glutaminase [216]. Des drogues libres et des protéines ont été couplées à des polymères dans un premier temps [217] puis des liposomes et d'autres systèmes de vectorisation dans un deuxième temps. La pégylation des systèmes de vectorisation consiste à décorer leur surface avec le polyéthylène glycol par adsorption ou par des liens covalents [218].

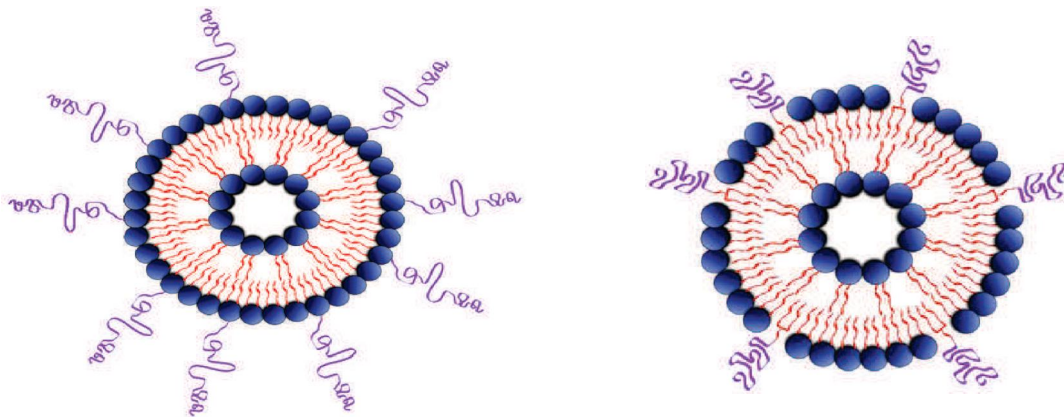
Comme le polymère est hydrophile, il augmente la solubilité des vecteurs facilitant ainsi leur circulation dans le sang. Mais la fonction principale des PEGs est de constituer une barrière stérique entre le vecteur et les opsonines du sang [219]. L'inhibition de ce contact réduit la phagocytose et par conséquent l'élimination rapide des vecteurs par le système réticulo-endothélial.

Cette augmentation du temps de circulation dans le sang passe de quelques minutes (objets non pégylés) à quelques heures voire quelques jours (objets pégylés) favorisant ainsi l'accumulation des vecteurs dans les tumeurs par l'effet EPR (Enhanced Permeation and Retention) [220]. Par exemple, Hong et son équipe ont évalué l'impact de la pégylation des liposomes sur leur demi-vie *in vivo* (les souris). Ces auteurs ont montré que plus le pourcentage des PEGs augmente (de 0 % à 6 %) à la surface des liposomes chargés en doxorubicine, plus leur temps de circulation dans le sang est allongé, et ce, quelle que soit la dose injectée (6 ou 10 mg/Kg). Cette pégylation (6 %) des liposomes augmente de près d'une fois et demie la quantité de la drogue accumulée dans les tumeurs après 3 jours d'injection par rapport aux liposomes non pégylés [221].

### ✚ Liposomes pégylés [222]

Dans l'organisme, les liposomes de première génération subissent, comme rappelé précédemment, une capture préférentielle et relativement rapide par Le systèmes de phagocytes mononuclées (SPM), principalement le foie et la rate, après leur administration intraveineuse, diminuant leur disponibilité pour les cibles thérapeutiques.

Une inhibition de la capture par le SPM peut être obtenue en les recouvrant de polymères hydrophiles et flexibles, pouvant conférer une certaine hydrophilie à leur membrane et/ou induisant un encombrement stérique qui diminue la réaction avec les opsonines. C'est le cas des liposomes pégylés qui associent de façon covalente des molécules de PEG de bas poids moléculaire aux phospholipides, permettant d'allonger de façon importante la demi-vie plasmatique.



**Figure 44 :** Incorporation de chaînes de polyéthylène glycol en surface du liposome

Ces liposomes sont qualifiés de furtifs (*Stealth* liposome) car ils échappent à l'identification «radar» du SPM. L'extrémité hydrophile agit comme une chevelure mobile à l'extérieur du liposome, empêchant la fixation des opsonines et la cascade de réactions aboutissant à la capture hépatique. Et plus ces vecteurs sont de petites tailles, plus ils sont furtifs. La durée de résidence vasculaire est fonction : de la longueur des chaînes de PEG greffées sur les lipides constitutifs de la membrane, et de la densité à la surface des liposomes. La structure en brosse serait la plus efficace.

Les trois points essentiels à retenir en ce qui concerne les vecteurs « furtifs » sont:

- une réduction des fuites du médicament hors des liposomes dans le sang, comme il peut s'en produire avec les liposomes conventionnels ;
- la non reconnaissance par le système des phagocytes mononucléés à l'origine d'une rémanence vasculaire prolongée;
- la possibilité d'extravasation sélective au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral, plus perméable que le tissu sain, en raison de la petite taille des liposomes.

#### **I.3.2.3. Immunoliposomes :**

Ce sont des liposomes qui portent à leur surface des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques d'une cible antigénique et pouvant contenir différents composés à activité biologique. Grâce à ce système de vectorisation et de protection des molécules encapsulées, il est possible de fixer spécifiquement ces liposomes à la surface des cellules cibles (tumoraux par exemple) et d'y relarguer leur contenu [223].

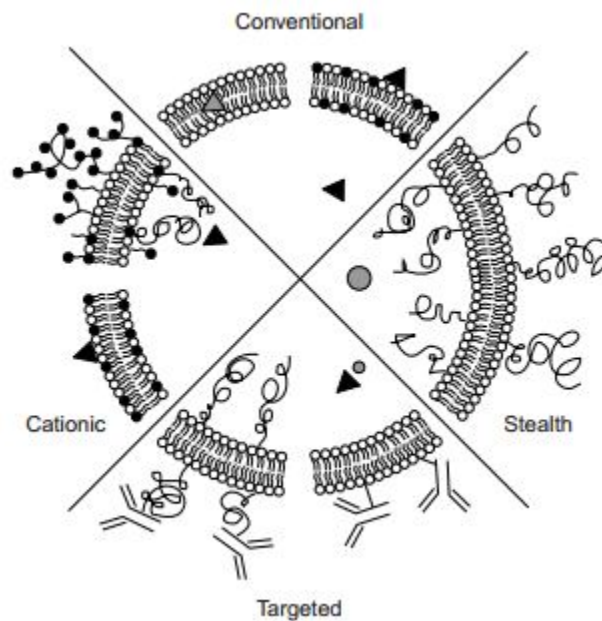
Plusieurs études ont été réalisées où les immunoliposomes sont également rendus furtifs afin de prolonger leur demi-vie dans l'organisme et de favoriser leur passage vers les tissus ciblés.

#### **I.3.2.4. Liposomes cationiques**

Les liposomes cationiques sont utilisés dans une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée Lipofection. Du fait de leur nature lipidique et de leurs propriétés d'encapsulation de grosses molécules, les liposomes cationiques sont des candidats potentiels au transfert de

gènes et font l'objet, depuis une vingtaine d'années, d'études intensives comme véhicules d'ADN. Ces liposomes sont composés d'un lipide cationique synthétique, le DOTMA (Dioleoyloxypropyl-triméthylammonium) en association avec le DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine).

Les liposomes cationiques et l'ADN interagissent spontanément par interaction de charges pour former un complexe de grande taille (environ 500 nm) et chargé positivement. Certains auteurs ont proposé comme mécanisme d'action probable de la transfection, une fusion des lipides DOTMA / DOPE avec la membrane plasmique cellulaire et/ou les vésicules intracellulaires suivie de la libération de l'ADN dans le cytoplasme.



**Figure 45:** Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes [224].

## **I.4 Formulation**

### **I. 4.1 Formulation et stabilisation des liposomes**

La stabilisation de la paroi peut être obtenue de différentes façons. L'utilisation de lipides synthétiques possédant une température de transition élevée permet de diminuer considérablement la perméabilité des liposomes à 37°C.

La formulation de liposomes possédant des lipides chargés permet d'obtenir des vésicules possédant une charge de surface limitant ainsi les phénomènes d'agrégation et de fusion des liposomes par répulsion électrostatique.

L'incorporation de cholestérol confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité de la paroi des liposomes.

Le greffage de polymères à la surface des liposomes permet de diminuer les interactions avec le milieu environnant par répulsion stérique. Le polymère joue alors un rôle protecteur en se déployant et en balayant la surface des liposomes empêchant alors les contacts inter-particulaires et la fixation de molécules à sa surface. La liaison covalente de polyéthylène glycols (PEG) par exemple à la surface des liposomes leur confère une certaine hydrophilie qui améliore nettement leur pharmacocinétique *in vivo* [225].

Enfin, lorsque les liposomes doivent subir une lyophilisation, les agents cryoprotecteurs, comme le saccharose, jouent un rôle majeur dans la stabilisation physique des liposomes limitant les phénomènes d'agrégation, de fusion et de perméabilité.

Indépendamment de la formulation, la stabilité physique des liposomes dépend aussi de la structure de la paroi, de la taille des liposomes et enfin du procédé de préparation.

### **I.4.2 Méthodes de préparation des liposomes :**

#### **I.4.2.1 Préparation par réhydratation de film**

Cette technique initiée dès les années 60 consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température

supérieure à la température de transition de phase gel-cristal liquide ( $T_c$ ) des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de la préparation, le film phospholipidique, au contact de la solution aqueuse, gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de type MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de la taille est très hétérogène. Les techniques d'homogénéisation telles que les ultrasons, l'extrusion ou la microfluidisation permettent de réduire la taille et l'hétérogénéité des vésicules. Enfin, le faible volume aqueux encapsulé peut être augmenté par addition de 10 à 20 mol% de lipides chargés. Les taux d'encapsulation peu élevés (2 à 15%) peuvent être majorés par une augmentation de la durée d'hydratation qui par contre entraîne une augmentation du diamètre des vésicules.

#### **I.4.2.2 Préparation par dispersion d'une solution organique de phospholipides**

##### **I.4.2.2.1 Injection d'une solution organique de phospholipides**

Cette technique consiste à former spontanément des liposomes unilamellaires de petite taille à la suite d'une injection d'une solution organique de lipides dans une solution aqueuse et de l'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite, par dialyse ou par filtration tangentielle. Les faibles diamètres et polydispersités des liposomes sont obtenus des vitesses d'injection et des vitesses d'agitation rapides ainsi qu'à des concentrations en phospholipides réduites. Cette méthode facilement transposable à l'échelle industrielle a une utilisation limitée par la solubilité des phospholipides dans les solvants organiques tels que l'éthanol, l'éther éthylique, le mélange éther éthylique/méthanol ou le diméthylsulfoxyde.

##### **I.4.2.2.2 Evaporation en phase inverse**

Afin d'améliorer le rendement d'encapsulation des liposomes, une méthode de préparation, dite d'évaporation en phase inverse (REV) a été mise au point afin de permettre de préparer des liposomes LUV constitués d'une grande cavité aqueuse. Dans ce procédé, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tel que l'éther éthylique. La phase aqueuse est ensuite ajoutée à un excès de phase organique émulsionnée aux ultrasons (H/L), avec des lipides se plaçant à l'interface. L'élimination du solvant par évaporation sous pression réduite conduit au rapprochement des micelles inverses puis à la formation d'un gel.

Au cours de cette étape, les micelles inverses, formées de monocouches de phospholipides entourant des compartiments aqueux, s'agrègent pour former un réseau compact gélifié. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel et le rapprochement des monocouches pour former des liposomes. Les vésicules ainsi obtenues sont unilamellaires avec un diamètre moyen de 0,5  $\mu\text{m}$  et une encapsulation maximale de la phase aqueuse (65%) en présence d'une solution de faible force ionique (0,01M NaCl). La filtration des liposomes sur des membranes de polycarbonate de diamètre de pores décroissants jusqu'à 0,1  $\mu\text{m}$  permet d'obtenir des liposomes homogènes d'un diamètre moyen de 150 nm mais en diminuant le taux d'encapsulation de 48 à 12%. Un excès de lipides augmente le volume d'encapsulation et le taux d'encapsulation de ces liposomes.

#### **I.4.2.3 Préparation par élimination de détergents**

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord dispersés, en milieu aqueux, à l'aide d'un détergent. Il se forme alors des micelles mixtes. Ensuite, le détergent est éliminé par dialyse, filtration sur gel ou par adsorption par des polymères. Au fur et à mesure de cette élimination, les micelles s'enrichissent en phospholipides et finalement, deviennent coalescentes pour former les vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV. Les détergents non ioniques qui possèdent, à l'exception de l'octyl glucoside, une concentration critique pour la formation de micelles (CCFM) faible et un nombre d'agrégation élevé sont plus difficiles à éliminer que les détergents ioniques qui ont une CCFM élevée et un faible nombre d'agrégation.

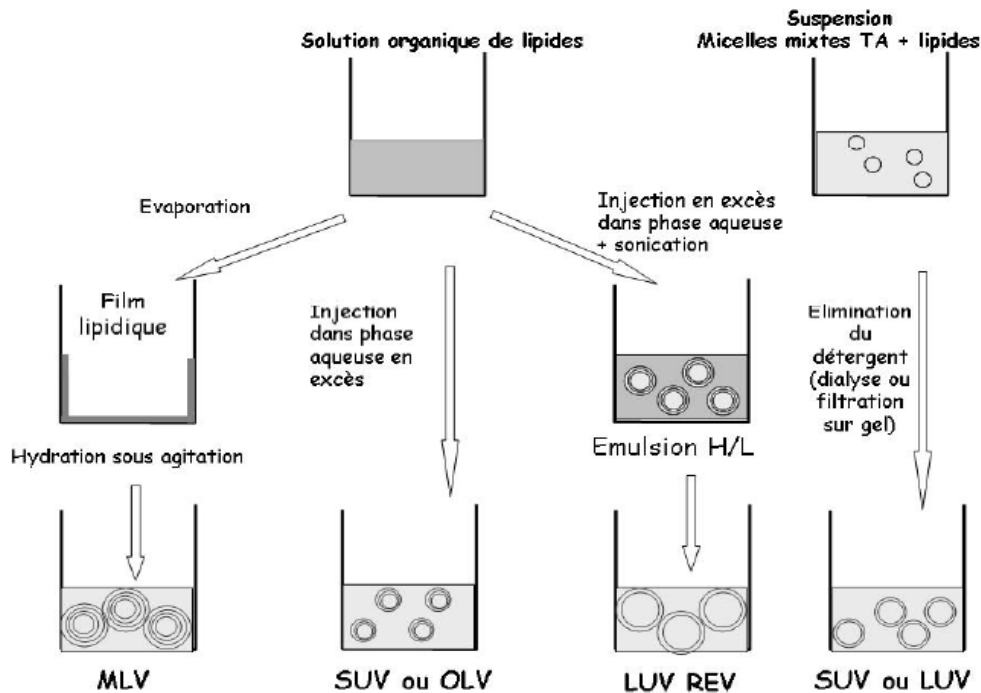


Figure 46 : Méthodes de préparation des liposomes.

### I.4.3. Méthodes de réduction de taille des vésicules

#### I.4.3.1. Utilisation des ultrasons

Afin de réduire le diamètre des liposomes MLV, obtenus par hydratation d'un film phospholipidique, la suspension liposomale peut être soumise à l'action des ultrasons dans un bain ou plus efficacement à l'aide d'une sonde pour former des SUV de 20 à 50 nm. Cette taille très réduite de vésicules limite fortement les volumes encapsulés et les taux d'encapsulation (< 1%). Il est possible en fin de préparation d'éliminer tous les liposomes

MLV qui contaminent la suspension en les centrifugeant à grande vitesse.

#### I.4.3.2. Extrusion sur des membranes de polycarbonate

Ce procédé consiste à calibrer la taille des liposomes MLV ou des LUV en les faisant passer à travers des membranes, dont le diamètre des pores est bien défini. Quand les liposomes sont filtrés sous faible pression d'azote sur des cellules de filtration munies de plusieurs

membranes en polycarbonate de diamètres de pores décroissants (1 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2  $\mu\text{m}$ ) les diamètres descendent jusqu'à 200-300 nm. Avec des pressions d'azote atteignant 800 psi les réductions de taille vont jusqu'à 60-100 nm après 5 à 10 passages sur des membranes de 0,1  $\mu\text{m}$ . Le volume aqueux encapsulé est assez faible, entre 1 et 3  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  de lipides et les taux d'encapsulation varient entre 5 à 30%.

#### **I.4.3.3. Microfluidisation**

Cette technique permet d'homogénéiser les suspensions de liposomes MLV. La suspension de vésicules passe par l'intermédiaire d'une pompe, sous de fortes pressions (10000 psi), à travers un filtre, comportant des pores de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, pour se retrouver ensuite dans une chambre d'interaction. A ce niveau, les fluides sont séparés en deux canaux qui se rejoignent au bout de la chambre à des vitesses très importantes ( $>500$  m/s). Des collisions de vésicules se produisent et s'accompagnent d'un transfert d'énergie élevé. Le choc des particules entre elles provoque la rupture des grandes vésicules qui se reforment pour donner de petites vésicules de taille homogène. Ainsi, au bout de deux passages de liposomes MLV, le diamètre diminue jusqu'à 0,1-0,2  $\mu\text{m}$ . Après 10 passages, les liposomes obtenus sont des SUV avec un diamètre inférieur à 0,1  $\mu\text{m}$ .

#### **II.4.4. Méthodes d'augmentation d'encapsulation**

Les substances actives sont généralement ajoutées au cours du procédé de fabrication des liposomes par encapsulation dite passive dans la phase au sein de laquelle elles sont les plus solubles : phase organique pour les PA lipophiles, phase aqueuse pour les PA hydrophiles.

Afin de majorer la faible capacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dans certains cas, différentes méthodes de préparation ont été développées :

##### **II.4.4.1. Encapsulation passive**

- **Dispersion de liposomes déshydratés**

Cette méthode consiste à disperser dans une solution aqueuse de produit à encapsuler, un suspension de liposomes SUV préformés préalablement lyophilisée. Après reconstitution par

une solution aqueuse de faible volume, on obtient des liposomes dont le diamètre moyen est inférieur à 1  $\mu\text{m}$  et qui autorisent des pourcentages d'encapsulation élevés, de l'ordre de 40%.

Contrairement aux lipides séchés par évaporation de solvant, les SUV lyophilisés conservent leur structure membranaire. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, les membranes des SUV fusionnent pour former des vésicules multilamellaires avec un volume d'encapsulation important.

Une modification de cette méthode consiste à sécher les lipides sur des particules de chlorure de sodium ou de sorbitol. On obtient ainsi une poudre déshydratée connue sous le nom de "proliposome". Après hydratation, le film phospholipidique formé sur les particules gonfle pendant que le support pulvérulent se dissout rapidement. Il se forme par cette technique des liposomes MLV.

- **Dispersion de liposomes congelés**

Dans ce procédé de préparation, les liposomes SUV et le soluté à encapsuler sont congelés dans de l'azote liquide puis ensuite ramenés à température ambiante. A ce stade, une sonication permet de réduire la perméabilité des vésicules en accélérant la disparition des défauts des membranes qui surviennent lors de la congélation. Il est ainsi possible d'obtenir par cette technique des vésicules qui possèdent un volume d'encapsulation de l'ordre de 10  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  de lipides avec des taux d'encapsulation de 30%. Les liposomes formés sont des

LUV et résultent de la fusion des liposomes SUV de départ. Cette technique n'est réalisable qu'en présence d'une charge au sein des lipidiques des vésicules et sans cryoprotecteurs comme le saccharose, ou sans cations divalents ou encore de solutions à force ionique élevée.

Les LUV obtenus sont extrudables pour former des vésicules entre 50 et 150 nm.

#### **II.4.4.2. Encapsulation dite active par création de gradient de concentration**

L'encapsulation dite active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes préformés. La principale technique développée au niveau industriel consiste à charger les liposomes par création d'un gradient de pH transmembranaire soit en production soit extemporanément au chevet du patient. Un tampon alcalin extraliposomal permet aux

principes actifs, qui sont des bases faibles, de perdre leur charge et ainsi de diffuser au travers de la bicouche lipidique des liposomes préformés, avant de s'ioniser et d'être piégés au contact de la cavité lipidique interne acidifiée. Des taux d'encapsulation de plus de 90% avec des fuites très limitées sont ainsi obtenus. Une autre méthode d'encapsulation active alternative consiste à introduire, pendant quelques minutes, dans la membrane, un détergent (le cholate de sodium ou l'octylglucopyranoside) capable de former des pores transitoires laissant diffuser les substances du milieu extérieur vers la cavité aqueuse. Les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 50% [226] [227].

### **I.5 Stabilité et conservation des liposomes :**

Lors de la préparation et de la conservation des liposomes, ceux-ci peuvent subir des dégradations physiques et/ou chimiques [228].

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 fréquenté. 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 influence par la température de stockage, favorise lorsque les liposomes sont stockes a une température proche de leur température de transition de phase.

Le stockage a 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 composes encapsules sont de faibles masses moléculaires ainsi que pour les composes 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 composes de phospholipides dont les acides gras sont satures 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 scelles sous atmosphère d'azote.

## **II. DEVENIR DES LIPOSOMES in vivo :**

Les liposomes peuvent être administrés par voie intraveineuse, orale, transdermique, sous-cutanée, intrapéritonéale, intratrachéale ou en aérosol [229].

### **II.1 Administration des liposomes par voie orale :**

Administrés oralement, les liposomes peuvent résister à la digestion stomacale, puis ils sont détruits par des enzymes lipolytiques intestinales. Cependant, quelques liposomes échappent à cette hydrolyse et sont captés par les cellules épithéliales intestinales afin d'y être dégradés [230]. Une résistance contre les sels biliaires a été rapportée pour les liposomes saturés en résidus acyl à longue chaîne et ayant une composition élevée en cholestérol. Une résistance contre l'activité phospholipasique a pu être obtenue en utilisant par exemple des analogues de l'éther des glycérophospholipides [229] [231].

### **II.2 Administration des liposomes par inhalation :**

Plusieurs études indiquent que l'encapsulation liposomiale de divers matériaux peut prolonger la rétention pulmonaire de ces substances, altérant ainsi leur pharmacocinétique [232] [233] [234].

Ceci peut amener à une action localisée de la substance au niveau du tractus respiratoire pendant que l'activité diminue aux sites distants des poumons [232] [235].

De plus, les liposomes constituent un réservoir pulmonaire pour la libération lente des substances aux cellules pulmonaires cibles.

### **II.3 Administration par voie intraveineuse :**

Après l'injection intraveineuse, les liposomes interagissent avec 2 groupes de protéines plasmatiques. L'un des groupes est appelé opsonines. Il s'agit de protéines qui vont s'adsorber à la surface des liposomes et les rendent faciles à phagocyter par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial.

Le second groupe, composé de lipoprotéines de haute densité attaque la vésicule liposomiale et avec l'aide de la phosphatidylcholine transférase, il remodèle les phospholipides de la bicouche [236]. Désormais, il est possible de renforcer les phospholipides contre ces lipoprotéines de haute densité en incorporant dans la membrane liposomiale du cholestérol en excès et/ou en fabriquant des liposomes présentant des liaisons intermoléculaires entre les phospholipides des liposomes et les lipides présents [237] [238].

Une fois dans le système sanguin, les liposomes sont rapidement métabolisés par les cellules et les organes du système réticulo-endothélial, spécifiquement les cellules hépatiques de Kupffer ainsi que les macrophages spléniques [239]. Ceci explique pourquoi la majorité des liposomes injectés finissent par s'accumuler dans le foie et la rate, et que peu sont retrouvés dans la moelle osseuse, les poumons ou les ganglions lymphatiques [240].

Dans ce cas, les liposomes peuvent être utilisés comme vecteur des médicaments pour le traitement des infections impliquant le système réticulo-endothélial. Cette captation prédominante des liposomes par le système réticulo-endothélial et leur rapide clairance de la circulation sanguine constituent un obstacle majeur à leur utilisation à visée organique, tissulaire et cellulaire autre que celle du système réticulo-endothélial.

### **II.3.1 Stabilité des liposomes dans le sang :**

#### **II.3.1.1 Interactions des liposomes avec les cellules du système des phagocytes mononuclées (système réticulo-endothélial) :**

Le système réticulo-endothélial (RES) est un large système de cellules comprenant des cellules endothéliales, fibroblastes, histiocytes et monocytes. Les cellules phagocytaires de ce système composent, ce qu'on appelle plus récemment, le système phagocytaire mononuclée (SPM) qui comprend l'ensemble des cellules de la lignée monocyttaire : les monoblastes et pro-monocytes de la moelle osseuse, les monocytes circulants et tous les macrophages. Les monocytes et leurs précurseurs ne sont pas responsables de la capture des liposomes. Ils se répartissent dans les tissus où ils se différencient en macrophages, adoptant parfois des caractéristiques spécifiques de lieu où ils se trouvent :

- cellules de Kupffer du foie (responsables de plus de 80 % de la phagocytose),

- macrophages fixes ou libres de la rate ou des ganglions.
- macrophages alvéolaires et interstitiels des poumons,
- ostéoclastes de l'os,
- cellules de Langherans de la peau etc...

La capture et l'élimination des liposomes par les macrophages est un phénomène très rapide, qui se compte en minutes, après administration de doses non saturantes. Elle se fait principalement dans le foie, puis au niveau splénique et médullaire, quand des doses importantes de liposomes ont entraîné une saturation hépatique [213].

#### **La phagocytose :**

Les cellules de Küpffer sont situées à la surface des cellules endothéliales du foie et leur activité physiologique principale est d'éliminer, principalement par phagocytose, les particules étrangères (virus, endotoxines bactériennes, micro-organismes), les cellules endommagées et les immuns-complexes. Elles contiennent de grosses granulations cytoplasmiques, les lysosomes, dans lesquelles ces particules sont digérées par de nombreuses enzymes. En plus de cette fonction de phagocytose, les macrophages sécrètent, surtout quand ils sont activés, de très nombreuses protéines dont les protéines du complément, impliquées dans l'opsonisation des particules. Ils participent également à l'immunité spécifique en présentant des antigènes aux cellules immunocompétentes.

#### **L'opsonisation :**

Le plus souvent, les particules étrangères de grande taille ne sont pas phagocytées directement, mais elles sont recouvertes par les opsonines, protéines plasmatiques qui facilitent la phagocytose (protéine C-réactive, fibronectine, facteur du complément C3b, immunoglobulines) et pour lesquelles les macrophages disposent de récepteurs [241] [242] [243].

Les particules étrangères chargées négativement sont rapidement reconnues par les macrophages à l'aide de ces récepteurs membranaires spécifiques :

- Pour le fragment C3b du complément
- pour les fragments Fc des IgG, IgA et IgE (faible affinité)
- pour l'interféron
- pour le galactose, le mannose....

La particule opsonisée est entourée progressivement par des pseudopodes dans un processus d'adhérence (modèle de la "fermeture-éclair") et se trouve finalement englobée dans une vacuole isolée, le phagosome, où elle sera digérée.

Une caractéristique fondamentale de la fixation des protéines sur les liposomes est la réversibilité du processus en fonction de l'abondance et de l'affinité de ces protéines plasmatiques. En raison de sa concentration plasmatique élevée et de son affinité pour les acides gras, l'albumine est la première protéine adsorbée sur les liposomes. Mais d'après Bonté (1986), elle n'intervient pas dans les processus de reconnaissance par les macrophages (c'est une dysopsonine) et sa liaison aux liposomes est faible. Elle est donc rapidement remplacée par des protéines moins abondantes mais plus fortement liées, qui elles, favoriseront la phagocytose du liposome (fibronectine ou IgG).

D'autres types de protéines favorisent l'adhérence des liposomes aux membranes cellulaires. Cependant leur association et le mécanisme par lequel elles augmentent l'élimination des liposomes *in vivo* restent peu clairs. A titre d'exemple, on peut citer l'alpha-2-macroglobuline, les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B et C. De plus, il existerait des opsonines spécifiques d'un organe du système phagocytant mononucléé qui augmenterait la reconnaissance des liposomes par les macrophages de celui-ci.

### **II.3.1.2 Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques :**

Les interactions avec les protéines plasmatiques sont diverses et complexes, et peuvent modifier terriblement la stabilité et le devenir *in vivo* des liposomes. Inversement, les phospholipides peuvent aussi modifier les activités biologiques des protéines.

La déstabilisation des liposomes dans le sang a été attribuée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) avec lesquelles il y a transfert des phospholipides par des protéines, du liposome vers les HDL avec fuite plus ou moins rapide du principe actif [244].

Scherphof *et al.* (1997), ont montré qu'il pouvait aussi s'effectuer une insertion de l'apoprotéine-E, venant des HDL, dans la bicouche, entraînant ensuite une désorganisation des liposomes en structures micellaires. Leurs travaux ont été confirmés en ajoutant de la lactoferrine, inhibiteur des lipoprotéines contenant l'apoE, qui semble effectivement pouvoir ralentir la clairance sanguine des liposomes.

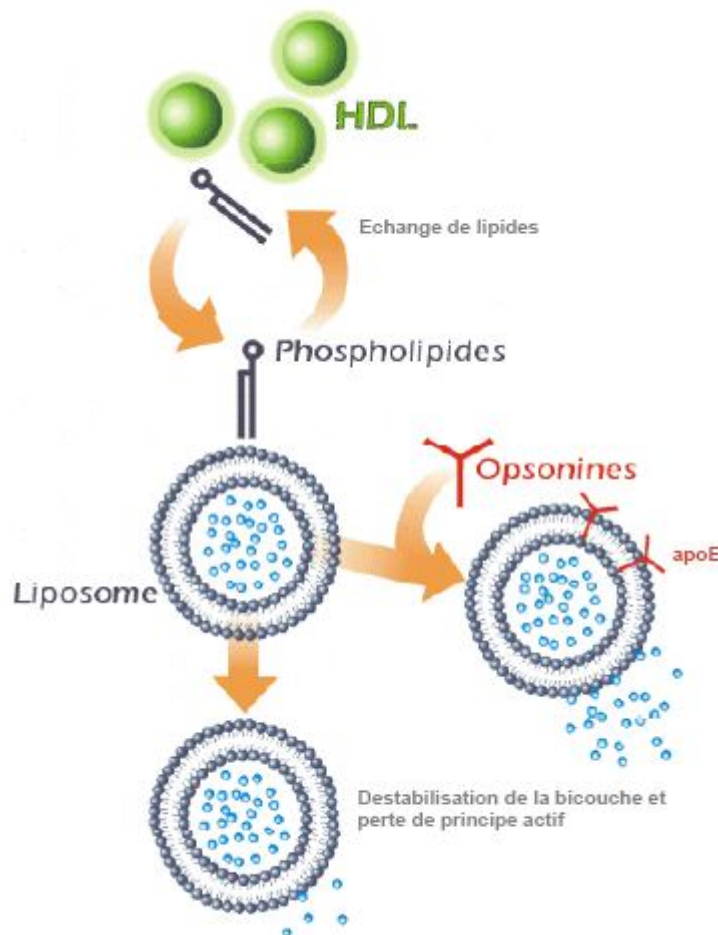


Figure 47 : Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques.

### II.3.1.3 Interactions des liposomes avec les cellules sanguines.

Dès la sortie du lit vasculaire et suivant la nature du tissu et la physiopathologie concernée, les liposomes s'accumulent à proximité du vaisseau dans le tissu interstitiel. Dès lors, deux mécanismes peuvent se produire. Soit les liposomes ainsi piégés commencent à libérer leur contenu et la molécule active doit alors atteindre les cellules cibles pour agir, la formulation des liposomes est alors essentielle dans le contrôle de cette cinétique de libération, soit les liposomes interagissent avec les cellules avoisinantes.

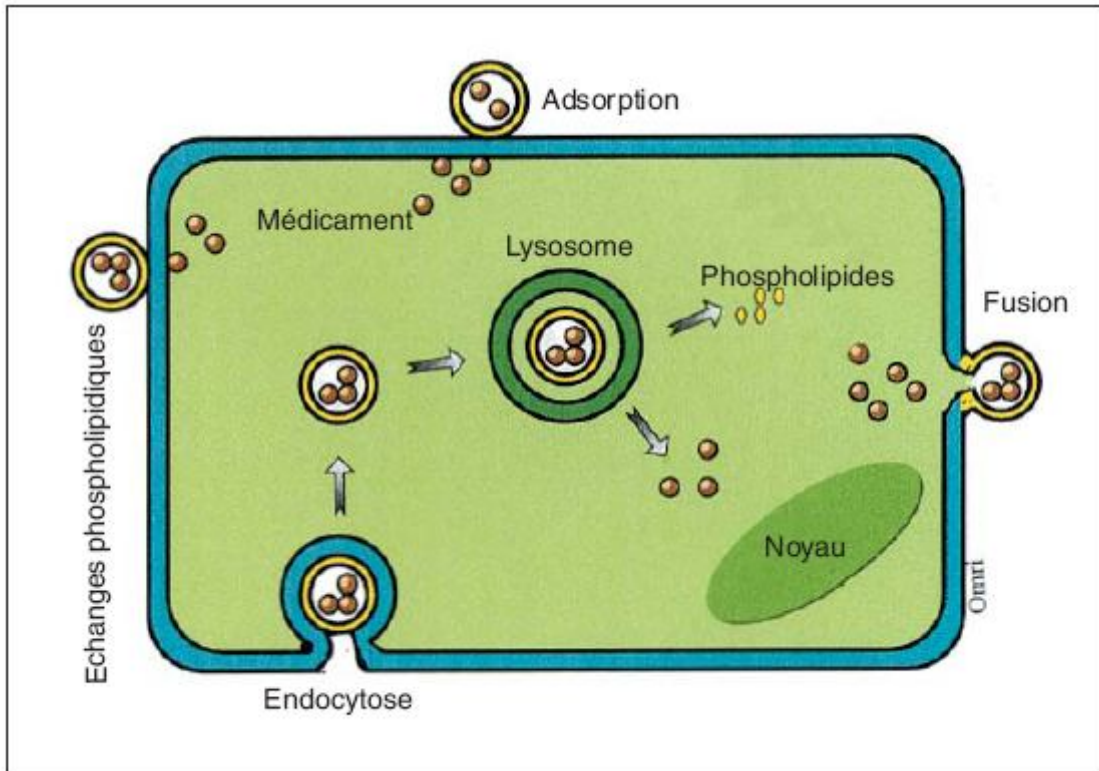
In vitro, la plupart des mécanismes d'interactions liposomes-cellules ont pu être élucidés ainsi que le devenir des molécules encapsulées grâce à différentes techniques d'encapsulation de marqueurs fluorescents [245] [246] ou par microscopie électronique. Cependant les difficultés méthodologiques liées au suivi des liposomes *in vivo* limitent l'interprétation de nombreux résultats scientifiques. L'utilisation de méthodes non invasives comme celle des produits radiopharmaceutiques, l'exploitation de la fluorescence naturelle de certains principes actifs doit permettre de mieux préciser ce comportement *in vivo*.

Les liposomes peuvent interagir avec les cellules selon les mécanismes suivants :

- Adsorption sur la membrane cellulaire (spécifique ou non spécifique),
- échange de lipides entre liposomes et cellules,
- fusion membranaire,
- pénétration intracellulaire par endocytose et dégradation cellulaire.

L'adsorption par les cellules phagocytaires est normalement suivie par une est normalement suivie par une endocytose ou rarement une fusion. Quand la membrane du liposome fusionne avec celle des cellules, son contenu est directement transféré dans le cytoplasme. Au cours de l'endocytose, différentes étapes plus complexes se succèdent avec englobement de la particule dans une vacuole isolée, le phagosome, qui fusionne avec des granules lysosomiaux intracytoplasmiques pour former un phagolysosome. La digestion de la paroi liposomiale par de nombreuses enzymes libère son contenu qui diffuse ensuite à travers la paroi des phagolysosomes.

Certains auteurs jugent que la fusion membranaire est peu probable et que dans la plupart des cas, on observe des transferts de lipides (liposomes-HDL) ou une internalisation des liposomes par endocytose. Ce phénomène dépend ensuite de la nature des liposomes, de leur taille mais aussi des caractéristiques de la cellule cible.



**Figure 48** : Différentes voies d'interaction entre les liposomes et les cellules.

## II.3.2 La biodistribution des liposomes :

### II.3.2.1 Situation physiologique

Le passage du secteur sanguin vers le secteur tissulaire constitue la condition nécessaire, mais non suffisante, d'un ciblage spécifique des liposomes vers des cellules cibles. La paroi des artères, veines et artérioles constitue une barrière infranchissable pour les liposomes. La seule extravasation envisageable se situe au niveau des capillaires dont la paroi endothéliale, formée d'une monocouche de cellules, autorise les échanges entre le sang et les tissus.

Les liposomes étant des particules dont le diamètre se situe dans un intervalle de 20 nm à un micron, un des critères majeurs de capture est la structure histologique des capillaires (continus, fenestrés, discontinus ou sinusoïdaux) représentée sur la **(Figure 49)**.

Une sortie du torrent circulatoire ne peut s'envisager que pour des capillaires dont la discontinuité forme un pore dont le diamètre est supérieur à celui des liposomes. Les seuls organes qui permettent un tel passage, en situation physiologique, sont ceux du SPM d'où l'accumulation des liposomes conventionnels dans le foie, la rate ou la moelle osseuse).

Les organes n'appartenant pas au SPM ne capturent pas les liposomes, ceux-ci étant incapables par ailleurs de s'évader du compartiment sanguin du fait de la continuité de l'endothélium vasculaire.

**a. Structure d'un endothélium capillaire de type continu :**



Capillaires de la très grande majorité des tissus : muscles lisses et striés, squelette, peau et tissu sous-cutané, cœur, cerveau, poumon.

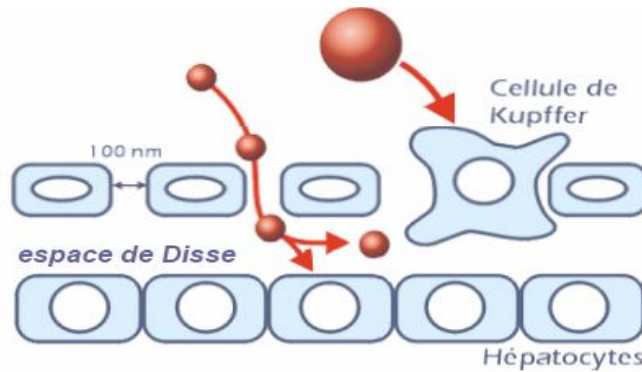
Composés d'une monocouche de cellules endothéliales jointives et d'une membrane basale fibreuse s'opposant au transfert passif des liposomes.

**b. Structure d'un endothélium capillaire de type fenestré :**



Structure voisine des capillaires continus mais absence totale de jonction entre certaines cellules (pores de 40 à 60 nm) permettant le passage de SUV d'un diamètre < 60 nm. Retrouvés dans le rein, l'intestin grêle et les glandes endocrines.

**c. Structure d'un endothélium capillaire de type discontinu :**



Caractérisé par l'absence de jonctions intercellulaires et de membrane basale (Multiples pores dont la taille est comprise entre 100 et 500 nm).

Rencontrés dans le foie (capillaires sinusoié), la rate et la moelle osseuse).

**Figure 49** : Représentation schématique de la structure des trois types d'endothéliums [247]

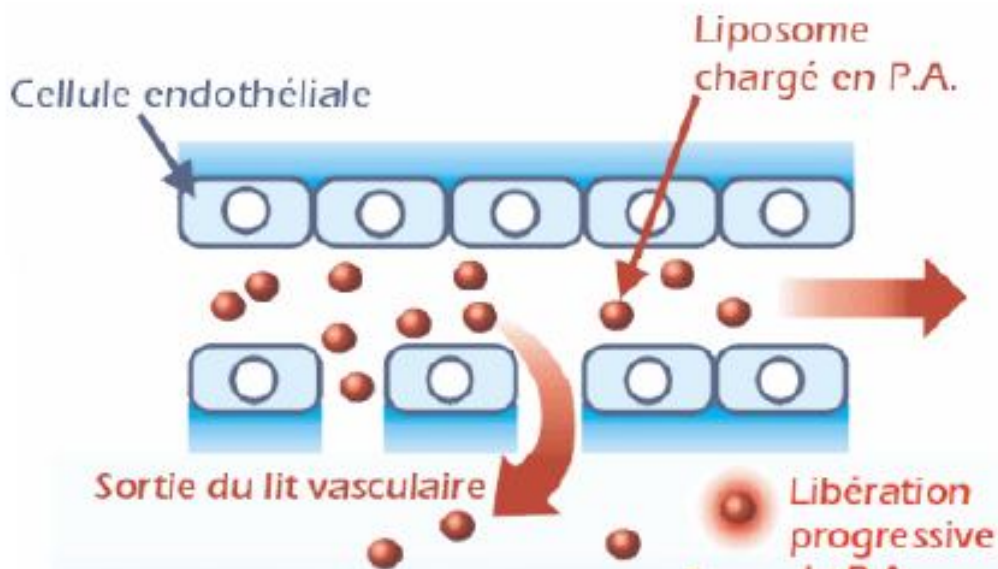
Les capillaires sinusoidaux du foie possèdent des pores de 100 nm de diamètre. Des liposomes différents par leur taille (< 100 nm ou > 100 nm) ne présentent pas le même type de capture. Ceux de petite taille sont capables soit d'être capturés par les cellules de Kupffer dont une partie du cytoplasme déborde dans le compartiment vasculaire, soit de franchir les pores, pénétrant ainsi dans l'espace de Disse pour interagir enfin avec les hépatocytes. Les liposomes dont le diamètre moyen est supérieur à 100 nm ne pourront être capturés que par les cellules de Kupffer.

### **II.3.2.2 Situation pathologique :**

La distribution extra-vasculaire des liposomes par filtration passive, paraît, en situation physiologique, limitée aux endothéliums discontinus, mais toute altération, par exemple pathologique, peut modifier leur capacité à diffuser dans les tissus. C'est le cas des tissus inflammatoires et tumoraux qui semblent présenter une perméabilité élevée, notamment aux liposomes de petite taille (incluant les SUV). Ce phénomène a été exploité en imagerie médicale, à l'aide de liposomes radiomarqués pour mettre en évidence des sites infectieux, inflammatoires ou tumoraux.

Quelques auteurs ont démontré l'accessibilité de certaines tumeurs particulièrement pour des liposomes ayant des temps de circulation prolongée, grâce à au phénomène EPR-effect pour « Enhanced Permeability and Retention » [53]. Les liposomes peuvent s'extravaser de la circulation générale, grâce à l'augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau des tumeurs, caractérisée par l'absence de membrane basale et la présence d'espaces entre les cellules endothéliales. Ils s'accumulent ensuite dans le compartiment interstitiel, d'autant mieux que les cellules tumorales se caractérisent par un drainage lymphatique diminué par rapport aux tissus sains.

Néanmoins, il existe peu d'informations au sujet de l'extravasation des liposomes au niveau de la microcirculation des tumeurs. L'importance des capillaires discontinus au sein d'une même tumeur n'est pas connue et varie certainement selon le type de tumeur [248]. De plus, la vascularisation tumorale est souvent diminuée, hétérogène, anarchique entraînant une nécrose de certaines zones tumorales. Un très grand nombre de cellules tumorales restent donc inaccessibles aux liposomes injectés par voie intraveineuse.



**Figure 50** : Mécanismes de pénétration des liposomes et de libération du principe actif dans les tumeurs solides [249].

### III. Liposomes et cancer

#### III.1. Les liposomes de première génération le cancer du foie

##### ✚ Améliorer l'efficacité et diminuer la toxicité du médicament :

Après administration par voie intraveineuse à un animal des liposomes simples, vecteurs de première génération n'ayant subi aucune modification chimique de leur surface, on observe que ces vecteurs se concentrent essentiellement au niveau des tissus du système **réticulo-endothélial**, c'est à-dire principalement dans le foie. Ce phénomène est essentiellement dû au fait qu'ils présentent une surface spécifique considérable, sur laquelle viennent s'adsorber de nombreuses protéines plasmatiques, en particulier des **opsonines**, qui seront par la suite reconnues sélectivement par les macrophages du foie. Ces derniers viennent alors interagir avec ces nanovecteurs : cela explique pourquoi les liposomes de première génération se concentrent rapidement au niveau hépatique.

Bien que cela puisse être considéré comme un inconvénient, on peut aussi en tirer avantage. En effet, ces systèmes constituent de véritables navettes pour amener de manière sélective des médicaments au niveau du tissu hépatique ; de cette manière, il est possible de traiter efficacement les pathologies sévères du foie, telles que l'**hépatocarcinome** résistant, ou encore les **métastases** hépatiques.

En vue de cette application, un médicament anticancéreux comme la doxorubicine a été encapsulé à l'intérieur d'un liposome conçu à partir d'un polymère, le poly (alkylcyanoacrylate). Ce polymère, déjà largement utilisé comme colle chirurgicale<sup>1</sup>, a l'avantage d'être biodégradable et biocompatible. Son utilisation peut donc être envisagée en clinique humaine.

Des tests ont ensuite été pratiqués dans des traitements de métastases hépatiques [250].

Les résultats montrent que, dans le cas d'un traitement par la doxorubicine sous une forme galénique traditionnelle, il apparaît un problème inhérent à la chimiothérapie anticancéreuse : le nombre de métastases diminue effectivement en fonction de la dose injectée ce qui montre bien l'activité anticancéreuse de la doxorubicine mais, à la dose de 5 mg/kg, on ne réduit que de 50% les métastases hépatiques, ce qui n'est pas suffisant ; et à la dose de 7,5 mg/kg, quelques animaux meurent, non pas de leur tumeur, mais de la toxicité cardiaque du produit.

On retrouve ici tout le problème du traitement du cancer par de petites molécules : la « fenêtre de tir » est extrêmement étroite entre la dose pharmacologiquement active et la dose toxique. En revanche, si l'on encapsule la doxorubicine, on observe que sa concentration au niveau du foie est fortement accrue et, pour une dose de seulement 2,5 mg/kg, le nombre de métastases hépatiques diminue de manière beaucoup plus importante qu'avec la doxorubicine seule. De plus, pour des doses de 5 à 7,5 mg/kg, il est possible de débarrasser les animaux de la quasi-totalité de leurs métastases, tout en réduisant fortement la toxicité cardiaque du produit.

Ces résultats montrent clairement l'un des principaux intérêts de la vectorisation :

Le médicament est mieux concentré au niveau de l'organe cible, alors que la toxicité est réduite, ce qui améliore considérablement son index thérapeutique.

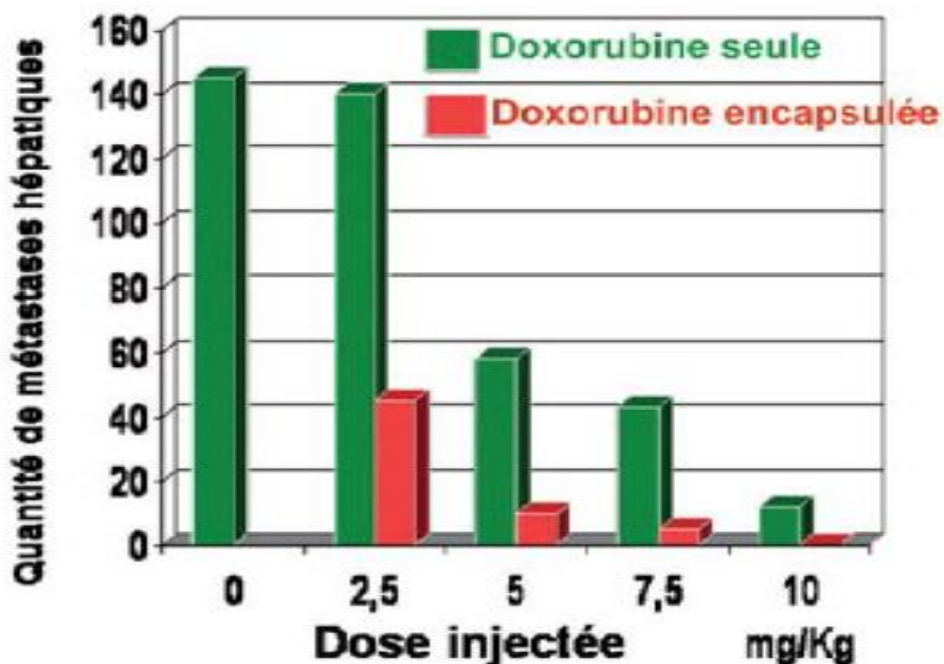


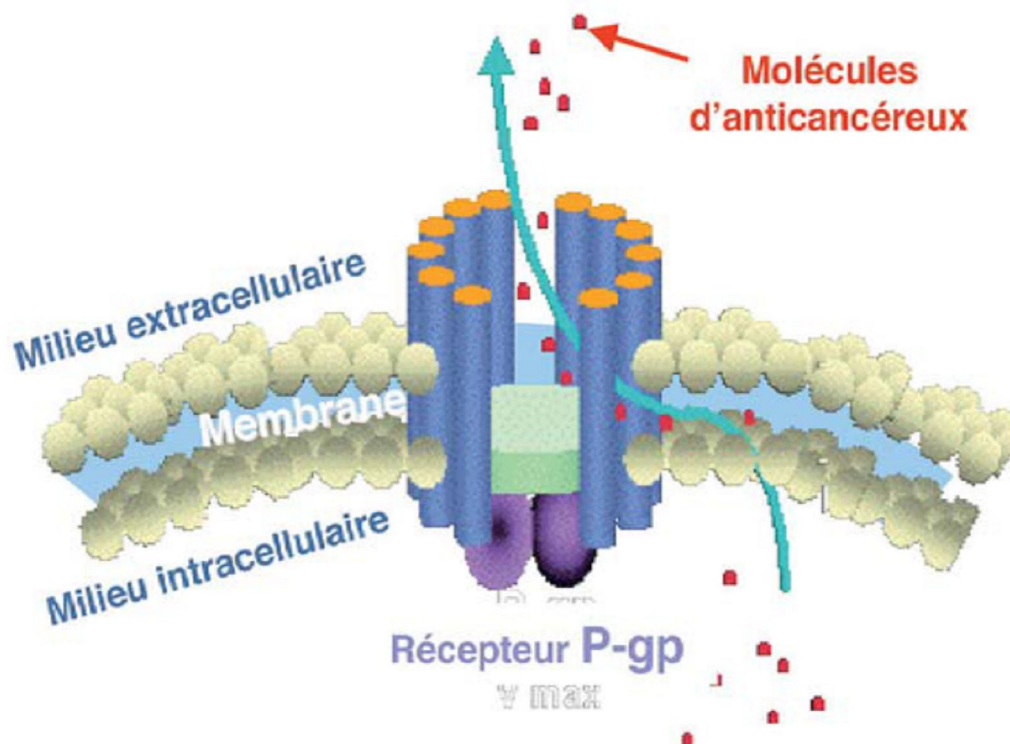
Figure 51: Test d'efficacité anticancéreuse [250].

### ✚ Réduire la résistance aux médicaments

Récemment, il a été montré que la vectorisation permettait également de contourner une résistance importante de certaines tumeurs : la résistance multidrogue.

C'est cette résistance qui fait que de nombreux cancers, d'abord sensibles aux médicaments, finissent par développer des résistances aux chimiothérapies. Elle est en fait due à la présence de « glycoprotéines » au sein de la membrane des cellules cancéreuses. Ces pompes d'efflux, comme la P-glycoprotéine (P-gp), prennent en charge les molécules de médicament, puis les expulsent à l'extérieur de la cellule.

Cela s'assimile à un mécanisme de défense naturelle de la cellule cancéreuse qui se « détoxifie » (**Figure 52**).



**Figure 52** : Mécanisme de défense naturelle des cellules cancéreuses.

Le raisonnement consiste alors à se dire que, si l'on enrobe ce médicament anticancéreux dans un nanovecteur à base de polymère biodégradable telle que le poly(hexylcyanoacrylate) (PHCA), on va le rendre invisible pour la P-gp, qui ne pourra donc pas la reconnaître ni l'expulser.

L'efficacité de cette approche a été montrée dans un hépatocarcinome humain présentant la résistance multidrogue. Lorsque ces cellules cancéreuses ont été incubées avec des concentrations croissantes de doxorubicine seule, pratiquement aucune activité anticancéreuse n'a été observée ; alors que vectorisée (PHCA-Dox), la molécule a présenté une cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Des tests ont également été menés *in vivo* sur un hépatocarcinome multirésistant chez la souris transgénique [252].

Les mesures ont montré que seules les liposomes de PHCA chargées en doxorubicine conduisent à une apoptose (mort) des cellules cancéreuses, alors que l'introduction de doxorubicine sous forme d'une simple solution conduit à un niveau d'apoptose faible, similaire à celui observé lors de l'administration de nanoparticules sans anticancéreux ou lors de l'administration d'un placebo sous forme d'une solution aqueuse de glucose à 5 %.

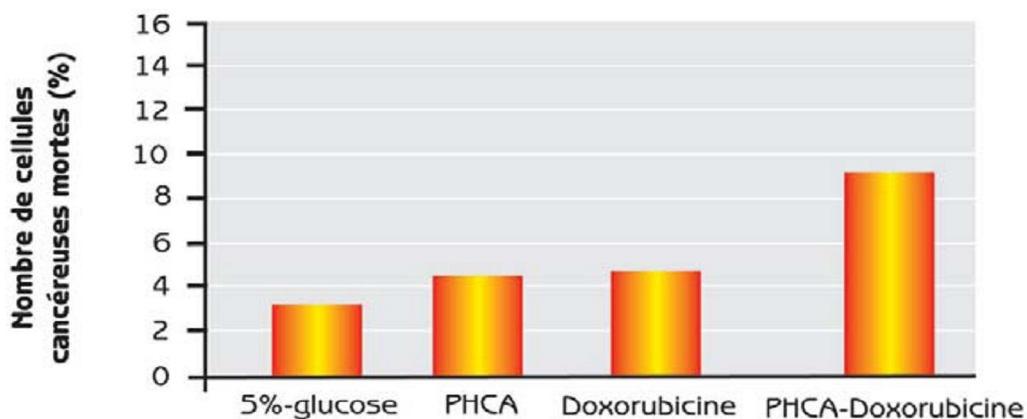


Figure 53 : Le nombre de cellules cancéreuses mortes mesurées par comptage histologique [252].

### **III. 2 Les liposomes de deuxième génération pour contourner les défenses du foie**

Comme expliqué précédemment, les opsonines qui viennent se fixer sur la surface des liposomes sont responsables de leur capture par le foie.

Pour contourner ce ciblage au niveau hépatique, l'idée est de « décorer » la surface de ces nanovecteurs par des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles, capables de ce fait de repousser ces opsonines. Une fois encore, l'apport de la chimie est important, en particulier dans le concept physico-chimique de « répulsion stérique » utilisé ici, à l'aide de liposomes dits de deuxième génération.

Les liposomes pegylés sont présentes beaucoup plus longtemps dans la circulation sanguine : étant partiellement furtives vis-à-vis des cellules du foie, elles sont beaucoup moins captées par cet organe. Ce résultat témoigne de leur meilleure efficacité en termes de pharmacocinétique.

Cette augmentation du temps de circulation va leur permettre de cibler d'autres tumeurs. Or les études histologiques montrent que, dans un tissu sain, l'endothélium vasculaire est dit jointif, c'est-à-dire que les jonctions intercellulaires sont serrées, ce qui empêche les nanovecteurs de pénétrer dans ce tissu. Inversement, au niveau des tissus cancéreux, on observe une réaction inflammatoire, caractérisée par l'arrivée de macrophages et une libération de toute une série de cytokines, qui induit une augmentation de la perméabilité vasculaire. Mécaniquement cette augmentation de perméabilité va permettre liposomes de pénétrer dans le tissu cancéreux par diffusion. Il y aura donc une pénétration ciblée au niveau de la tumeur, en raison de la réaction inflammatoire.

Il existe à la fois un effet de pénétration sélective mais aussi un effet d'accumulation dans la tumeur du fait de la présence du système nanoparticulaire.

L'effet « EPR » a par exemple été observé dans le cas du cancer du cerveau chez le rat.

Lorsque l'on introduit des liposomes pegylés de deuxième génération, on observe bien au cours du temps leur accumulation au niveau de la tumeur, alors qu'au niveau de l'hémisphère sain, aucune translocalisation de ces nanovecteurs n'est observée.

L'effet « EPR » n'est pas seulement observé dans les cancers, mais il peut s'appliquer à toutes les pathologies où l'on observe une réaction inflammatoire. C'est le cas, par exemple, de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, qui est une maladie auto-immune cérébrale induisant une forte réaction inflammatoire, en particulier au niveau de la moelle épinière.

Si ces vecteurs peuvent permettre de véhiculer sélectivement les médicaments au niveau des tissus cancéreux, ils ne restent cependant que dans l'espace interstitiel, c'est-à-dire entre les cellules cancéreuses, mais ils n'y pénètrent pas. Les liposomes de troisième génération ont été conçus afin de pouvoir traverser les membranes cellulaires.

### **III .3 Les liposomes de troisième génération et la pénétration ultra-cellulaire**

Les liposomes de 3ème génération sont équipés de ligands qui, à l'échelle moléculaire, vont être reconnus par des récepteurs situés sur les membranes tumorales, ce qui va leur permettre de rentrer dans les cellules.

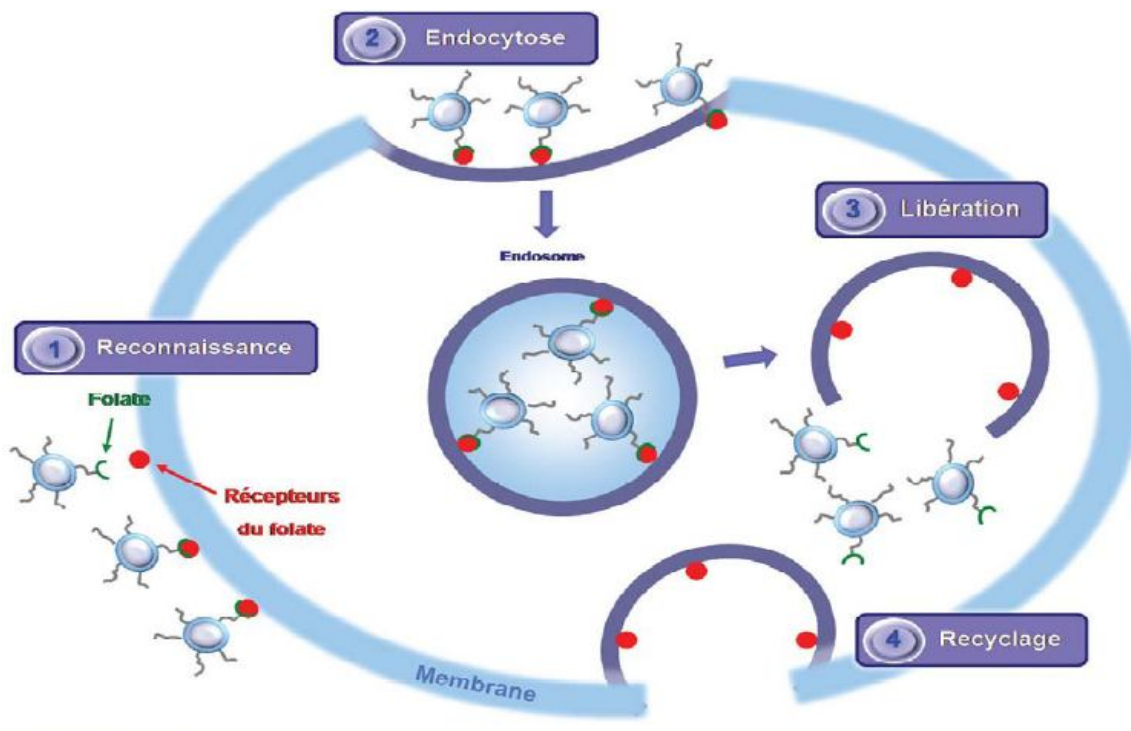
Dans le cas du cancer de l'ovaire par exemple, on sait que les cellules cancéreuses possèdent sur leurs membranes un récepteur de l'acide folique (on dit qu'elles surexpriment ce récepteur, par rapport aux cellules saines). Lorsque ce récepteur reconnaît son ligand, le complexe récepteur-ligand va être internalisé par la cellule et se retrouver dans un **endosome** intracellulaire, ce qui va permettre ensuite, *via* un mécanisme complexe, la libération du ligand à l'intérieur de la cellule.

Ce phénomène naturel peut être judicieusement utilisé comme moyen de routage pour permettre à des liposomes de troisième génération, qui seraient vectorisées avec de l'acide folique, de délivrer leur principe actif dans la cellule. La synthèse de ces nanovecteurs fait, une fois encore, appel à la chimie.

En effet, on utilise à nouveau les liposomes pegylés, mais dont les bras PEG ont été fonctionnalisés à leurs extrémités par des amines.

Ces derniers peuvent alors être couplés avec la fonction acide carboxylique de l'acide folique, *via* une réaction d'amidation. Et, en fonction de la densité de PEG aminé à la surface des particules, il est possible de contrôler la densité de l'acide folique qui va se retrouver au bout de ces chaînes de PEG. On obtient alors des liposomes qui ont une double fonctionnalité : d'une part, du fait des chaînes de PEG, ils repoussent les protéines plasmatiques (opsonines) et restent dans la circulation vasculaire (comme les liposomes de deuxième génération) ; d'autre part, l'acide folique est reconnu par le récepteur des cellules tumorales, permettant ainsi le transfert de ces nanovecteurs et de leur contenu dans la cellule, par **endocytose**

(Figure 54).



**Figure 54:** les étapes de la pénétration du liposome au sein de la cellule tumorale.

### III.4 Monographie de quelques spécialités pharmaceutiques à base de liposomes et leurs applications en cancérologie :

#### ✚ Liposomes de daunorubicine : DaunoXome\* [252] [253]

La daunorubicine, antibiotique de la famille des anthracyclines, est un antinéoplasique obtenu à partir de *Streptomyces peucetius*.

L'utilisation de la daunorubicine conventionnelle est limitée par son absence de spécificité pour les cellules tumorales. La toxicité affectant les tissus normaux limite la dose administrée et la valeur de la dose cumulée à ne pas dépasser. Bien que la toxicité limitante immédiate, la myélosuppression, soit rédhitoire pour la réalisation d'une cure, la toxicité cumulative limitante reste la cardiotoxicité.

DaunoXome\* se compose de chlorhydrate de daunorubicine encapsulé dans le noyau aqueux de vésicules lipidiques composées d'une bicouche membranaire unique de distéaroylphosphatidylcholine et de cholestérol dans un rapport molaire de 2/1, d'un diamètre moyen inférieur à 100 nm.

Dans la circulation générale, la forme galénique protège la daunorubicine encapsulée des dégradations chimique et enzymatique. Elle entraîne généralement une réduction de la capture du principe actif par les tissus sains ainsi que par le système non réticulo-endothélial. Une fois parvenues sur le site d'action, les vésicules de ce médicament pénètrent, intactes, dans les cellules tumorales. La daunorubicine est alors libérée peu à peu, directement au sein des cellules ou elle est en mesure d'exercer son activité antinéoplasique. La présence de jonctions étroites entre les cellules endothéliales dans la plupart des tissus normaux s'oppose à l'extravasation des SUV, même de très petit diamètre (inférieur à 30 nm), protégeant ces tissus des toxicités de la molécule encapsulée.

La capacité à maintenir des concentrations plasmatiques élevées de daunorubicine encapsulée est due à la stabilité des liposomes.

Les paramètres pharmacocinétiques de la daunorubicine sous forme liposomale diffèrent significativement de ceux de la daunorubicine conventionnelles (Cerubidine<sup>\*</sup>) :

- le pic sérique est dose-dépendant. Un phénomène de saturation est mis en évidence à partir de 60 mg/m<sup>2</sup>, les liposomes libérant lentement la daunorubicine libre ;
- multiplication par 10 des concentrations intratumorales avec DaunoXome<sup>\*</sup> ;
- la concentration plasmatique en équivalents daunorubicine a été 185 fois plus élevée avec DaunoXome<sup>\*</sup> ;
- L'AUC est 227 fois plus élevée ;
- Le Vd, 200 à 400 fois réduit, et la clairance corporelle, diminuée ;
- La vitesse d'accumulation intratumorale de DaunoXome<sup>\*</sup> est plus lente que celle de la daunorubicine libre ;
- la concentration intracardiaque est inférieure après administration de DaunoXome<sup>\*</sup> ;
- et la demi-vie d'élimination, augmentée.

La daunorubicine conventionnelle est liée à 63 % à l'albumine sérique, alors que DaunoXome<sup>\*</sup>, de par sa formulation, minimise la liaison aux protéines.

Le métabolisme est principalement hépatique avec une excrétion biliaire des métabolites. Les liposomes ne traverseraient que très peu ou pas la barrière hémato-méningée. La comparaison de doses équivalentes de daunorubicine indique que DaunoXome<sup>\*</sup> induit une inhibition de la croissance tumorale significativement plus importante que la daunorubicine libre.

DaunoXome<sup>\*</sup> est indiqué dans le traitement du sarcome de Kaposi (SK cutanéomuqueux extensif ou viscéral, chez des patients à un stade avancé de l'infection par le VIH (lymphocytes CD4 < 200/mm<sup>3</sup>).

La posologie doit être adaptée à chaque patient et le traitement, instauré à raison de 40 mg/m<sup>2</sup> toutes les 2 semaines. Des doses plus élevées, 60 mg/m<sup>2</sup>, à la même fréquence peuvent être utilisées transitoirement dans les formes sévères ou avec localisations

viscérales du SK. Seul le patient insuffisant hépatique fera l'objet d'une surveillance étroite en raison du métabolisme hépatique et de l'élimination biliaire des métabolites de DaunoXome\*.

Les contre-indications sont l'association avec d'autres chimiothérapies anticancéreuses induisant une myélosuppression et l'hypersensibilité au PA ou autres composants du médicament. Dans l'ignorance de l'éventuelle nocivité pour le fœtus, ce médicament ne doit pas être prescrit à la femme enceinte. L'allaitement maternel doit être interrompu pendant le traitement.

La principale toxicité est la myélosuppression se manifestant notamment par une leucopénie. La toxicité hématologique peut imposer une réduction des doses, le report de la cure ou l'arrêt du traitement.

Etant donné que des incidents cardiaques (myocardiopathie et insuffisance cardiaque) ont été constatés avec DaunoXome\*, une surveillance adaptée est recommandée (ECG, mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche par échographie...).

En raison du risque potentiel de myélosuppression, des numérations formule sanguine et plaquettaires devront être pratiquées régulièrement pendant la durée du traitement et, au minimum, avant chaque cure.

DaunoXome\* est un traitement efficace et relativement bien toléré dans le traitement du SK cutanéomuqueux associé au sida. Le traitement peut être administré en ambulatoire. La myélotoxicité est gérable et l'utilisation de facteurs de croissance permet de maintenir

Des doses optimales.

Un essai prospectif, randomisé ouvert de phase III conduit aux Etats-Unis et comparant DaunoXome\* à la polychimiothérapie standard: doxorubicine, bléomycine, vincristine (ABV) dans le traitement des formes avancées de SK associé au sida a montré une efficacité comparable de DaunoXome\* et du protocole ABV avec un taux statistiquement moindre d'effets indésirables à type d'alopécie et de neuropathie, sans toxicité cardiaque significative.

Les différents mécanismes pouvant expliquer la diminution de la toxicité cardiaque liée à l'encapsulation de la daunorubicine sont :

- une réduction de l'accumulation d'anthracyclines dans le tissu cardiaque;
- une plus faible hydroxylation de la daunorubicine en daunorubicinol, métabolite plus cardiotoxique que la molécule mère.

DaunoXome\* a pu être administré à des doses cumulées 2 ou 3 fois supérieures à celles de daunorubicine sans entraîner de cardiotoxicité majeure chez des patients atteints de SK associée au sida. Au cours des essais cliniques, des douleurs dorsales, des flushs et une striction thoracique ont été décrits occasionnellement. Des réactions, allergiques, avec hypotension peuvent survenir. D'autres réactions ont été signalées, telles que des céphalées, une fatigue, des frissons, une stomatite, des vertiges, des nausées et vomissements, des ulcérations des muqueuses et une alopécie.

#### **Liposomes de cytarabine : Depocyte\*** [252] [253]

Cette spécialité est une forme à libération prolongée de cytarabine, anti-métabolite analogue pyrimidique, destinée à une administration directe dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

La partie liposomale est constituée de cholestérol, de trioléine, de DOPC (dioleatephosphatidylcholine) et de DPPG (dipalmitate phosphatidylglycérol).

Chez les patients souffrant de méningite néoplasique, les paramètres pharmacocinétiques de ce médicament administré par voie intraventriculaire ou par ponction lombaire, suggèrent que l'exposition au médicament dans les espaces ventriculaires ou lombaires est similaire quelle que soit la voie d'administration.

La demi-vie terminale est de 100 à 263 heures pour une gamme posologique de 12,5 à 75 mg. En revanche, l'administration intrathécale de 30 mg de cytarabine libre a montré une demi-vie terminale d'environ 3,4 heures. Depocyte\* augmente la demi-vie biologique d'un facteur de 27 à 71 selon la voie d'administration et/ou le compartiment considéré.

La clairance de la cytarabine dans le LCR est similaire au débit du LCR, 0,24 mL/min.

La principale voie d'élimination du PA est son métabolisme en un composé inactif, l'Ara-U, uracile arabinoside, ensuite excrété au niveau urinaire.

Contrairement à la cytarabine qui, après administration systémique, est métabolisée rapidement en Ara-U, sa conversion en Ara-U dans le LCR est négligeable après une administration intrathécale, en raison d'une activité significativement plus faible de cytidine-desaminase dans le SNC et le LCR.

Depocyte\* est indiquée chez les adultes dans le traitement intrathécal de la méningite lymphomateuse, c'est-à-dire une localisation méningée des lymphômes. Cette indication est basée sur la démonstration de l'augmentation du taux de réponse complète comparée à la cytarabine libre, non liposomale.

La posologie est de 50 mg administrés par voie intrathécale. Le schéma thérapeutique recommandé est :

- à l'induction, 50 mg administrés à 14 jours d'intervalle pour 2 doses (semaines 1 et 3);
- en consolidation, 50 mg administrés à 14 jours d'intervalle pour 3 doses (semaines 5, 7 et 9) suivies d'une dose supplémentaire de 50 mg à la semaine 13 ;
- en entretien, 50 mg administrés à 28 jours d'intervalle pour 4 doses (semaines 17, 21, 25 et 29).

En cas de neurotoxicité, il conviendra de diminuer la posologie à 25 mg. Si elle persiste, le traitement devra être arrêté.

Depocyte\* doit être administré, non dilué, par injection lente (1 à 5 minutes) dans le LCR soit *via* un réservoir intraventriculaire, soit par injection directe dans le sac lombaire. Une corticothérapie doit être associée avec, par exemple, de la dexaméthasone orale ou IV à raison de 4 mg, deux fois par jour pendant 5 jours à partir du 1<sup>er</sup> jour de chimiothérapie cytotoxique.

Les contre-indications sont l'hypersensibilité à la cytarabine ou à l'un des excipients et une infection méningée évolutive.

Etant donné que la cytarabine a un pouvoir mutagène et crée des dommages chromosomiques dans les spermatozoïdes humains, il est conseillé aux hommes traités par cet anti métabolite et à leur partenaire de recourir à une méthode de contraception efficace. Les femmes susceptibles d'être enceintes ne doivent pas recevoir ce traitement tant qu'une grossesse n'est pas exclue.

En raison de l'excrétion possible dans le lait maternel et du risque de survenue d'effets indésirables graves chez les enfants nourris au sein, l'utilisation de ce médicament n'est pas recommandée chez les femmes qui allaitent.

Depocyte\* a un potentiel toxique important, surtout au niveau neurologique. Il peut induire une arachnoïdite, syndrome caractérisé principalement par des nausées, des vomissements, des céphalées, une raideur de la nuque, un méningisme et de la fièvre. C'est pour prévenir ce syndrome, pouvant être fatal en l'absence de traitement, que la corticothérapie est recommandée. La neurotoxicité peut également se traduire par une cécité, une myélopathie, voire un déficit permanent.

L'association à d'autres agents anticancéreux neurotoxiques ou à une irradiation crânienne ou rachidienne augmente le risque de toxicité au niveau du système nerveux central.

#### **Liposomes de doxorubicine : Myocet\* [252][253][254]**

La doxorubicine appartient à la famille des anthracyclines comme la daunorubicine ou l'épirubicine. Elle possède un mécanisme d'action multiple: inhibition de la topoisomérase II, intercalation des polymérasés de l'ADN et de l'ARN et la formation de radicaux libres. Dans les années 1960, elle s'est rapidement imposée comme agent cytotoxique puissant.

Elle est largement utilisée dans le traitement des cancers solides, en association. Mais les bénéfices sont limités par une demi-vie courte, des effets indésirables sévères, une toxicité dose-dépendante et une toxicité aiguë contemporaines de pics plasmatiques élevés.

La forme liposomale est composée de lécithine d'œuf et de cholestérol.

L'incorporation de cette anthracycline dans les liposomes vise à le protéger de la dégradation chimique et enzymatique, ainsi qu'à minimiser les liaisons protéiques et le captage par les tissus sains. Une extravasation sélective, grâce à l'augmentation de la perméabilité du système vasculaire néoformé des tumeurs, est escomptée, suivie d'une libération du cytotoxique au sein des cellules cancéreuses.

En ce qui concerne les paramètres pharmacocinétiques, les concentrations plasmatiques de doxorubicine totale sont considérablement plus élevées avec Myocet\* qu'avec la

doxorubicine conventionnelle. A l'inverse, les concentrations plasmatiques maximales de doxorubicine libre (non encapsulée par des liposomes) sont plus faibles avec Myocet\* qu'avec la doxorubicine conventionnelle.

La clairance de Myocet\* est environ 9 fois inférieure à celle de la doxorubicine conventionnelle (5,1 L/h *versus* 46,7 L/h) et son volume de distribution, 26 fois inférieur (56,6 L *versus* 1451 L.)

Elle se métabolise en doxorubicinol et est bien connue pour son élimination hépatique.

Myocet\* est indiqué, en association avec le cyclophosphamide, dans le traitement en première ligne du cancer du sein métastatique.

La dose initiale recommandée est de 60 à 75 mg/m<sup>2</sup>, toutes les 3 semaines.

Pour les patients insuffisants hépatiques, l'ajustement posologique est réalisé en fonction de la bilirubinémie :

- entre 20,3 et 50,8 µm/L, réduction de 50 % de la dose usuelle ;
- > 50,8 µm/L, réduction de 75 %.

Pour les insuffisants rénaux en revanche, une adaptation posologique n'est pas nécessaire en raison de l'élimination biliaire de la doxorubicine.

La contre-indication est la classique hypersensibilité à la substance active, aux pré-adjuvants ou à l'un des excipients.

En raison de propriétés mutagènes et embryotoxiques, Myocet\* ne doit pas être administré au cours de la grossesse ou alors, utilisé en cas de nécessité clairement établie. Les femmes traitées par cet anticancéreux ne doivent pas allaiter.

Environ 90 % des malades ont eu une alopécie sous Myocet\*, de la même façon qu'avec la doxorubicine conventionnelle.

Une majorité des malades ont eu des troubles hématologiques à type de neutropénie, anémie ou encore thrombopénie ; entre 80 et 90 %, des nausées et vomissements ; environ la moitié, une infection ou une stomatite.

Enfin, un tiers des patients a souffert de diarrhée.

Aucune étude d'interaction avec d'autres médicaments n'ayant été conduite, on considère que l'association avec d'autres agents cytotoxiques, en particulier les agents myélotoxiques, doit faire l'objet d'une surveillance attentive.

C'est le cas du cyclophosphamide (CPA) et de la mercaptopurine, deux anticancéreux connus pour interagir avec la doxorubicine conventionnelle, avec majoration des effets cardiotoxiques de cette dernière, du risque de cystite hémorragique induite par le CPA et une majoration de l'hépatotoxicité de la mercaptopurine.

Les modalités de préparation de cette spécialité sont particulières et bien plus complexes que pour la doxorubicine conventionnelle (Adriblastine<sup>\*</sup>) :

- mise en route du système permettant le chauffage ultérieur de la préparation;
- reconstitution de la solution de doxorubicine ;
- ajustement du pH des liposomes pendant le chauffage de la solution reconstituée ;
- ajout des liposomes à la solution, suivi d'un mélange vigoureux ;
- dilution du mélange ainsi obtenu.

**✚ liposomes pégylés de doxorubicine : Caelyx<sup>\*</sup> [252] [253][255] [256]**

La forme liposomale pégylé de chlorhydrate de doxorubicine comporte des segments greffés en surface avec le polymère hydrophile de methoxypolyéthylène glycol (MPEG).

Ces groupements linéaires de MPEG sont étalés et la surface du liposome créant une pellicule protectrice qui réduit les interactions entre la double membrane lipidique et les protéines plasmatiques et limite la détection par le système immunitaire. Le faible diamètre des liposomes pégylés, environ 100 nm, et leur persistance dans la circulation sanguine favorisent leur extravasation à travers les vaisseaux anormalement perméables des tissus tumoraux. Ceci leur permet de s'accumuler dans l'espace interstitiel où les liposomes déversent progressivement la doxorubicine sur les cellules tumorales environnantes. Les liposomes pégylés ont également une matrice lipidique de faible perméabilité et un système tampon

aqueux qui permet de maintenir le chlorhydrate de doxorubicine sous forme encapsulée pendant le temps où le liposome reste dans la circulation sanguine.

La pharmacocinétique de Caelyx\* diffère significativement de celle des préparations conventionnelles de chlorhydrate de doxorubicine :

Caelyx\* est surtout confiné dans le volume vasculaire. Le dosage direct de la doxorubicine liposomale montre qu'au moins 90 % du médicament restent encapsulés dans les liposomes durant leur temps de présence dans la circulation;

La clairance de la doxorubicine dépend du véhicule liposomal. La clairance plasmatique de Caelyx\* est plus lente que celle de la forme classique de doxorubicine ;

- à doses équivalentes, les concentrations plasmatiques et les valeurs d'AUC sont significativement plus élevés avec Caelyx\* ;
- la clairance intrinsèque moyenne de Caelyx\* est de 0,030 Lh/m<sup>2</sup> contre 24 à 73 Lh/m<sup>2</sup> pour la doxorubicine conventionnelle ;
- Le Vd moyen est de 1,93 L/m<sup>2</sup> pour Caelyx\* contre 700 à 1100 L/m<sup>2</sup> pour la forme classique;
- la demi-vie apparente varie de 24 à 231 heures avec une moyenne de 73,9 heures, supérieure à celle de la doxorubicine conventionnelle.

L'élimination de la doxorubicine se fait essentiellement par voie biliaire.

Caelyx\* possède trois indications:

- cancer du sein métastatique avec risque cardiaque augmenté, en monothérapie;
- cancer de l'ovaire à un stade avancé après échec d'une chimiothérapie de première intention à base de platine ;
- sarcome de Kaposi (SK) associé au sida chez des patients ayant un faible taux de CD4 (< 200 lymphocytes CD4/mm<sup>3</sup>) et présentant des lésions cutanéomuqueuses ou viscérales étendues, en première intention ou non.

Caelyx\* ne doit cependant pas être utilisé pour traiter un SK associé au sida qui pourrait être traité efficacement par voie locale, ou systémique par l'interféron alpha.

Dans le cas du cancer du sein et de l'ovaire, la dose administrée est de 50 mg/m<sup>2</sup> en IV, une fois toutes les 4 semaines tant que la maladie ne progresse pas et que la patiente continue à tolérer le traitement. Afin de minimiser le risque de réactions à la perfusion, la dose initiale est administrée à une vitesse inférieure à 1 mg/min. Si aucune réaction n'est observée, les perfusions ultérieures de Caelyx\* peuvent être administrées sur une période de 60 minutes.

Dans le sarcome de Kaposi, la dose administrée est de 20 mg/m<sup>2</sup> en IV toutes les 2 à 3 semaines. Il faut éviter les intervalles inférieurs à 10 jours qui augmentent le risque de toxicité par accumulation. Un traitement de 2 à 3 mois est nécessaire pour obtenir une réponse thérapeutique.

Avant l'administration de Caelyx\*, il faut évaluer la fonction hépatique par dosage des transaminases, phosphatases alcalines et bilirubine sanguines.

La posologie doit être diminuée chez les patients ayant une fonction hépatique altérée.

En revanche, aucune adaptation posologique ne semble nécessaire chez les insuffisants rénaux.

Caelyx\* est contre-indiqué dans les cas d'hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.

En cas de grossesse, cette spécialité ne doit pas être administrée, sauf en cas de nécessité absolue. L'allaitement doit être interrompu avant toute administration de l'anticancéreux.

Les effets indésirables les plus fréquents sont :

- une toxicité hématologique. La première manifestation de la myélosuppression est une leucopénie ;
- l'érythrodysesthésie palmo-plantaire (EPP ou syndrome main-pied), avec une incidence voisine de 5 %. Chez les patients concernés, ces lésions apparaissent souvent après 6 semaines de traitement ou plus et disparaissent, chez la plupart, au

bout d'une à deux semaines. Son apparition est due à une prolongation du temps de circulation de Caelyx\*.

L'espacement de l'intervalle entre deux administrations a montré une réduction de l'incidence de l'EPP ;

- une stomatite.

Ces effets indésirables peuvent nécessiter une réduction de la dose ou un report de la cure.

L'apparition de la cardiotoxicité est dépendante de la dose cumulée et du pic sérique de doxorubicine libre. La cardiotoxicité est plus faible avec Caelyx\* du fait de la concentration de doxorubicine libre circulante plus faible. Cependant, la surveillance cardiaque, par ECG, reste recommandée.

De nombreux patients traités par Caelyx\* présentent une myélosuppression qui semble être l'effet indésirable dose-limitant chez les patient avec un SK-sida, justifiant des numérations formule sanguine et plaquettaires fréquentes pendant la durée du traitement et, au minimum, avant chaque administration de Caelyx\*.

Des réactions sérieuses engageant parfois le pronostic vital liées à la perfusion sont observées. Il s'agit de réactions de type allergique, anaphylactique, dyspnée, œdème facial, constriction thoracique ou laryngée et/ou hypotension.

Bien que Caelyx\* possède une activité au moins équivalente à celle de la doxorubicine dans les sarcomes avec un profil de toxicité amélioré, et en particulier une atteinte cardiaque échographique et une alopécie moins fréquentes, elle n'apporte aucun gain manifeste par rapport à la doxorubicine conventionnelle en termes de durée ou de qualité de survie. Par contre, d'autres effets tels que le syndrome main-pied ont été plus fréquents.

#### IV. Limites et toxicité des liposomes :

Les liposomes, par la biocompatibilité de leurs constituants, connaissent depuis plus de 30 ans un succès indéniable et les recherches au cours de ces dernières années sur ce domaine ont permis un avancement considérable de leur application dans le domaine thérapeutique. Cependant, ce type de système est loin de constituer le microréservoir « idéal » et de nombreuses limitations au développement des liposomes existent.

Il faut, en effet, noter la complexité de ce système qui doit être systématiquement adapté en fonction du soluté qu'il encapsule mais aussi en fonction de l'application souhaitée. Nous sommes loin du microréservoir idéal, facilement transposable et d'importants efforts de formulation doivent être systématiquement développés en fonction du domaine d'utilisation visé.

La toxicité doit être estimée afin de savoir si des liposomes vides, ou des liposomes chargés de médicaments et des médicaments biologiquement actifs sont impliqués. Plusieurs études ont été entreprises en injectant des doses uniques de liposomes de différentes tailles, compositions et doses. Administrés *in vivo* selon différentes voies, ils n'ont montré aucun effet toxique [257]. Cependant, l'administration intraveineuse de liposomes composés des phospholipides issus de cerveau bovin augmente significativement le métabolisme des catécholamines dans le cerveau des souris et induit la libération de l'acétylcholine des aires cérébrales corticales chez le rat [258] [259]. Après administration intraveineuse chez le cobaye, les liposomes composés de phosphatidylcholine et d'acide phosphatidique chargés négativement provoquent une agrégation plaquettaire [260]. D'autres effets, comme le décès suite à une embolie pulmonaire [261] ont pu être observés après injection intraveineuse des liposomes agrégés constitués surtout de sphingomyéline et de cholestérol [262].

Chez l'homme, une somnolence légère et transitoire a été notée chez des patients cancéreux ayant des infections fongiques et traités avec de l'amphotéricine B incorporée dans des liposomes constitué de phosphatidylcholine, de stéarylamine et de cholestérol avec un rapport molaire de 4:1:3 [263].

## V. Nouvelles approches anticancéreuses :

### Les liposomes et la thérapie photodynamique anticancéreuse

#### V.1 Thérapie Photodynamique.

##### V.1.1 Définition et principe

La PDT est une technique de traitement basée sur l'utilisation de molécules photosensibilisatrices (PS), non cytotoxiques à l'obscurité, et qui vont être activées par une irradiation lumineuse, de longueur d'onde appropriée (dépendante du PS). L'activation du PS va aboutir à la génération d'espèces fortement cytotoxiques (le plus souvent l'oxygène singulet [264] O<sub>2</sub>, mais aussi des espèces réactives de l'oxygène (EROs)) pour les cellules hôtes des PS.

La PDT anti-tumorale est un traitement local ou locorégional utilisé pour réduire le volume d'une tumeur massive, obtenir une cure radicale d'une petite tumeur superficielle, ou après échec d'une thérapie standard par chimiothérapie ou radiothérapie. Cette technique est utilisée pour traiter certains cancers (poumon, tête et cou, peau, prostate, vessie, des kératoses actiniques).

En effet, la plupart des PS montre une affinité relative envers les tissus tumoraux, qui reste toutefois très variable en fonction de l'étude, du PS et du modèle utilisé.

Dans le cas d'un traitement anticancéreux, le PS est administré dans un premier temps à un patient, le plus souvent par voie intraveineuse, mais aussi de manière topique pour un traitement de lésions superficielles, notamment cutanées. Une fois dans le sang, le PS va se lier à certaines protéines plasmatiques (lipoprotéine, albumine, globuline) en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, qui vont ensuite l'acheminer vers les différents tissus.

Dans le cas idéal, cette distribution tendra à se faire, idéalement, préférentiellement vers les tissus néoplasiques.

Dans un second temps, la tumeur va être illuminée localement par une lumière visible si possible monochromatique, dont la longueur d'onde va correspondre à un maximum d'absorption du PS [265].

On utilise généralement un rayonnement laser, guidé jusqu'à la tumeur

via une fibre optique et un diffuseur de lumière. Cette irradiation du PS en présence d'oxygène va induire des réactions de photo-oxydation, qui vont aboutir à la destruction des cellules tumorales ciblées. Un délai devra être respecté entre l'administration et l'irradiation, pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours. Ce délai, appelé Intervalle-Drogue

Lumière (IDL) et qui est fonction de la pharmacocinétique du PS et de l'application clinique, correspond à la durée nécessaire pour une localisation du PS en faveur de la tumeur par comparaison aux tissus sains. Le principe de la PDT est illustré sur la (Figure 55).

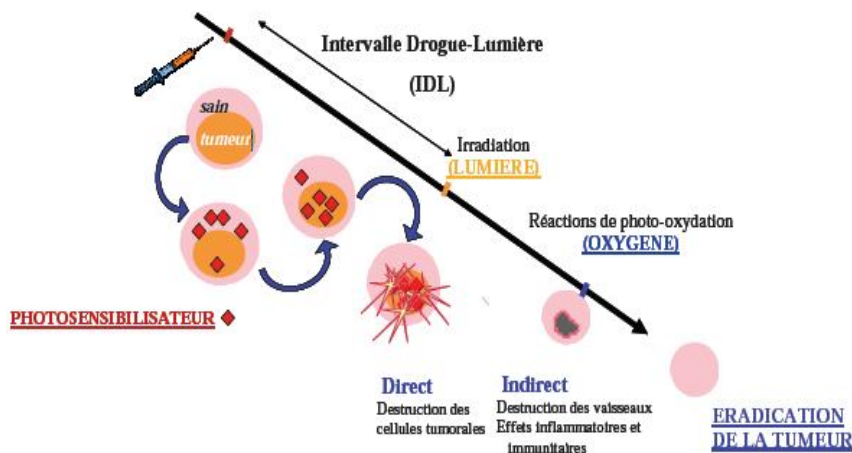


Figure 55 : Principe de la thérapie photodynamique.

L'activité photodynamique du photosensibilisateur est basée sur des principes photophysiques induisant, dans un système biologique, des réactions de photo-oxydation de type I et II [266]

(Figure 56). L'irradiation du photosensibilisateur induit une photo-activation de ce dernier, définie par son changement d'état. Par absorption de la lumière, le photosensibilisateur acquiert de l'énergie et passe d'un état de repos singulet  $S_0$  à différents états singulets excités

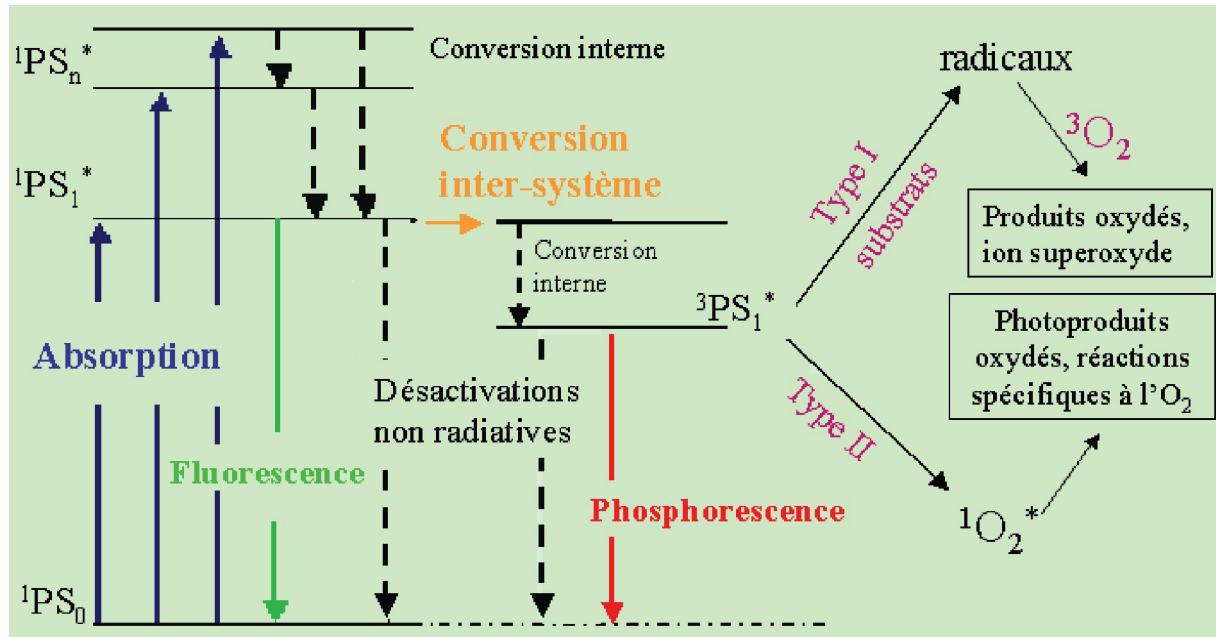
d'énergie supérieure  $S_1$  et  $S_n$ . La molécule excitée possède un excès d'énergie. Le photosensibilisateur excité va soit perdre rapidement cette énergie par fluorescence ou par désactivation non radiative, soit passer à un état triplet excité ( $^3PS_1^*$ ), qui se désactivera par phosphorescence ou bien sera responsable des phénomènes de photosensibilisation

**(Figure 56).**

Le photosensibilisateur à l'état triplet excité génère des espèces photo-actives à partir de deux voies de photo-oxydation cytotoxiques :

- La réaction de type I. Elle implique le transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène entre  $^3PS_1^*$  et des substrats biologiques pour former des radicaux et des ions radicalaires conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).
- La réaction de type II. Elle implique un transfert d'énergie de  $^3PS_1^*$  vers  $O_2$  qui passe alors à un état singulet excité ( $^1O_2^*$ ). Les réactions de type II sont prépondérantes lors du processus de PDT [266].  $^1O_2^*$  revient à son état fondamental par émission de luminescence (1270 nm). Il possède une durée de vie très courte (quelques  $\mu s$  dans l'eau) et est très réactif, susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans l'environnement proche. Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec  $^1O_2^*$  [267] [268].
- $^1O_2^*$  peut également réagir avec le photosensibilisateur à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation, dits photo-produits (phénomène de photoblanchiment ou de photomodification).

Ce phénomène se caractérise par une extinction plus ou moins rapide de la fluorescence du photosensibilisateur en imagerie.



**Figure 56 :** Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablonski et les types de réactions photochimiques engendrées.

Comparé à la radiothérapie, le rayonnement utilisé pour la PDT, situé dans le visible donc de moindre énergie, est inoffensif en tant que tel et non mutagène [269]. La sélectivité de la PDT pour les tissus cibles va résulter :

- du caractère localisé de l'irradiation lumineuse au niveau du site tumoral,
- de la localisation souvent préférentielle du PS dans les tissus tumoraux,
- de la faible durée de vie de l'oxygène singulet : celui-ci est en effet désactivé avant de pouvoir diffuser hors de la cellule dans laquelle il a été produit [269].

Toutefois, du fait de l'utilisation d'une lumière peu pénétrante dans les tissus, la PDT est surtout appliquée pour des tumeurs accessibles directement (tumeurs cutanées) ou par voie endoscopique (œsophage, vessie), ou certaines tumeurs solides en y insérant directement les fibres optiques (PDT interstitielle pour la prostate, le pancréas ou le foie par exemple).

De plus, certains problèmes, comme le calcul d'une dosimétrie adéquate, limitent la standardisation de la PDT en clinique. La faible sélectivité des espèces photosensibilisatrices vis-à-vis des tissus tumoraux reste également un facteur limitant. Il en résulte souvent une accumulation des PS dans les tissus sains, pour des durées pouvant aller de deux semaines à deux mois, ce qui peut aboutir à une sensibilisation cutanée rémanente ou à l'apparition de lésions lors du traitement de cavités internes complexes où il est difficile de bien délimiter l'irradiation. C'est pour cela que la PDT est actuellement utilisée en traitement curatif des cancers superficiels à des stades précoces ou en traitement palliatif (après échec de la radiothérapie et de la chirurgie).

#### **V.1.2 Les mécanismes d'éradication tumorale après thérapie photodynamique :**

Comme nous l'avons décrit, la PDT repose sur l'administration (par voie topique ou systémique) d'un PS chez un patient, puis à l'irradiation de la partie à traiter afin d'y déclencher la cascade de réactions photochimiques décrites ci-dessus. Trois mécanismes ont été identifiés comme contribuant à la régression et/ou la destruction tumorale [270]

(Figure 57)

- un effet direct de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie [271] ;
- un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale provoquant une privation de la tumeur en nutriments et oxygène et par conséquent la destruction tumorale ;
- un effet indirect dû à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

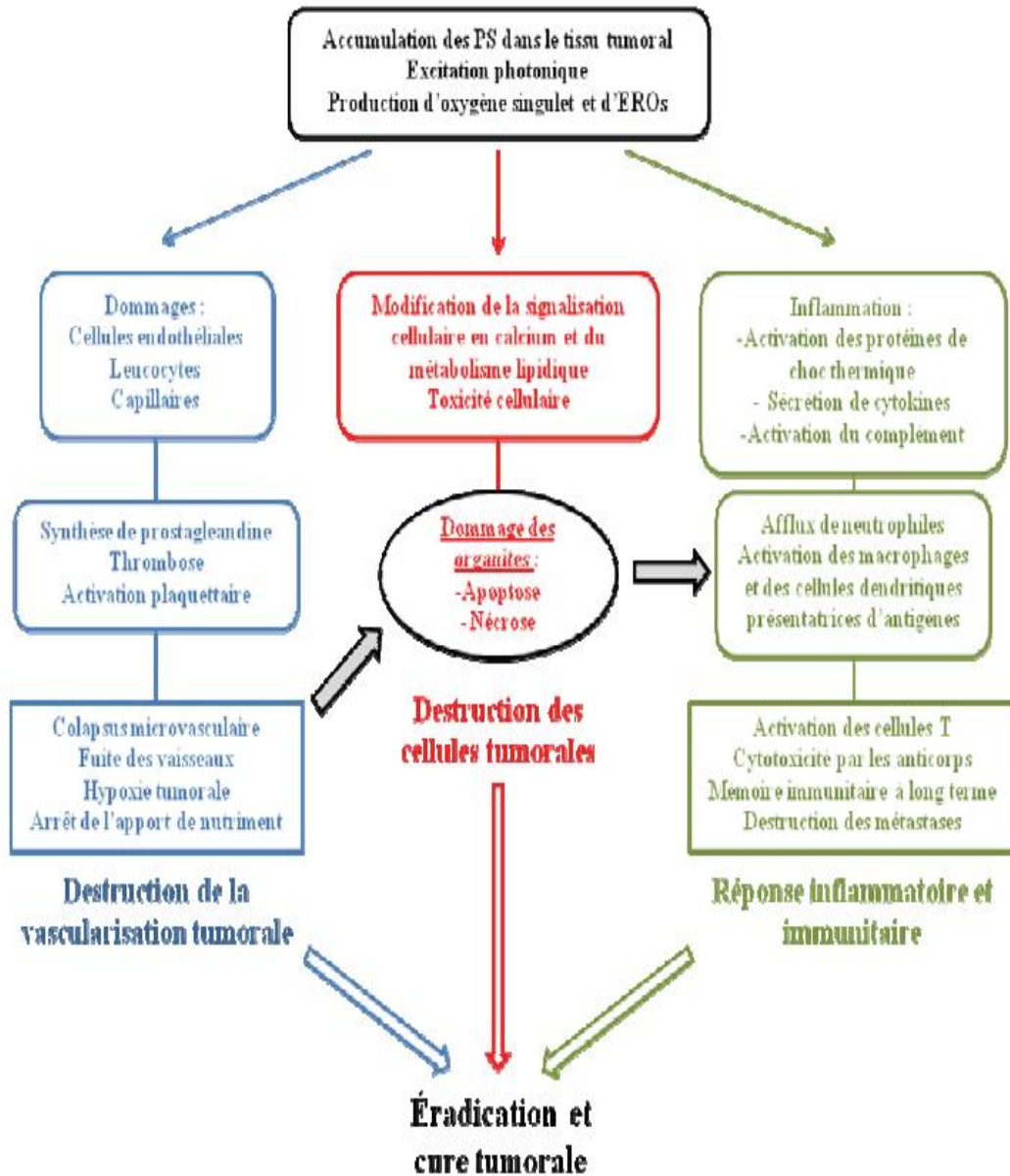


Figure 57 : Mécanisme de destruction tumorale après PDT.

### V.1.2.1 Effets directs de la PDT

Les dommages issus de l'irradiation et des réactions d'oxydation qui en découlent, vont se traduire par deux effets principaux : l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales [271].

La nécrose est une forme rapide et violente de dégénération, un phénomène passif qui résulte le plus souvent d'une atteinte de la membrane cytoplasmique de la cellule. C'est une mort non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. La cascade réactionnelle engendrée par un traitement PDT va aboutir à une destruction des organites ainsi qu'une peroxydation des lipides membranaires et ainsi causer la perte de l'intégrité membranaire. La cellule va alors gonfler à cause d'une entrée massive d'eau et d'électrolyte par pression osmotique, ce qui peut provoquer une rupture de la membrane. Le contenu du cytoplasme va alors se repandre à l'extérieur, et les enzymes cytoplasmiques et lysosomales ainsi libérées pouvant provoquer des réactions inflammatoires [270].

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est une dégénérescence physiologique et génétiquement programmées, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Elle est régie à la fois par des signaux

intra- et extra-cellulaires [272] conduisant à des modifications biochimiques et morphologiques. Ce type de mort cellulaire ne va pas engendrer d'inflammation, contrairement à la nécrose : les membranes plasmiques ne sont pas détruites [273] au cours de ce processus, et la cellule va émettre des signaux qui vont permettre sa phagocytose par des globules blancs, notamment les macrophages. Les mitochondries sont considérées comme l'organite clé de ce processus. Elles vont subir diverses modifications morphologiques et libérer le cytochrome *c* dans le cytoplasme de la cellule. Le cytochrome va provoquer une cascade de réactions d'activation d'enzymes appelées les caspases effectrices [274]. Ces enzymes vont induire la mort cellulaire par la destruction d'éléments nécessaires à sa survie : la chromatine du noyau cellulaire, par exemple, sera découpée de manière régulière (environ 180 paires de bases). Elles vont aussi participer au « bourgeonnement » de la cellule : il se forme des corpuscules qui, étant éliminés dans le milieu intercellulaire, emporteront des fractions du cytoplasme. Ces vésicules seront ensuite phagocytées par les cellules voisines ou les macrophages.

Des études plus récentes suggèrent une troisième voie de la destruction cellulaire qui pourrait être induite par la PDT : l'autophagie [275]

Si l'intégrité du lysosome est menacée, l'ensemble des enzymes lysosomales va se déverser dans le cytoplasme de la cellule. Une fois déversées, ces enzymes seront libres d'attaquer les organites de la cellule, provoquant par là même son « autodigestion ».

L'orientation vers l'un ou l'autre de ces trois phénomènes de destruction cellulaire va dépendre de la nature de la tumeur, de la dose de lumière (fluence, irradiance), mais aussi de la concentration, de la nature et surtout de la localisation intracellulaire du PS mais cela reste à définir. En revanche, il a été démontré que la combinaison de ces trois phénomènes est indispensable pour une éradication tumorale optimale à long terme.

#### **V.1.2.2 Effets indirects de la PDT**

Le processus de cancérisation se produit en plusieurs étapes au cours desquelles les cellules malades vont progressivement modifier les tissus environnants. Dans un premier temps, l'ADN d'une ou plusieurs cellules va subir une dégradation qui conduit cette dernière à ne plus répondre aux signaux régulant la prolifération ou la mort cellulaire. Cette ou ces cellules vont ensuite se multiplier de manière anarchique, tout en perdant les caractéristiques structurales de la cellule d'origine. Par la sécrétion de diverses enzymes, les cellules cancéreuses modifient ensuite la matrice extracellulaire, favorisant l'invasion des tissus.

Lorsque la taille dépasse quelques millimètres cubes, la tumeur, n'étant pas vascularisée, devient hypoxique, et ces cellules sécrètent alors une cascade de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF est le chef de file [276] [277]. Ces molécules vont provoquer le bourgeonnement des vaisseaux sanguins proches, puis la néo-vascularisation de la tumeur. La croissance tumorale peut ainsi reprendre, et le système vasculaire sanguin ou lymphatique peut disséminer des cellules cancéreuses dans l'organisme, provoquant l'apparition de nouveaux foyers métastatiques. Si la tumeur est autonome dans son comportement répliatif, elle n'en demeure pas moins dépendante de son environnement direct. Le traitement photodynamique peut agir indirectement sur la tumeur en influant sur cet environnement.

#### **V.1.2.2.1 Effets anti-vasculaires :**

L'effet anti-vasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après traitement et contribuant à long terme à l'éradication tumorale [278]. La PDT peut engendrer une destruction du réseau vasculaire de la tumeur, soit par action sur les cellules endothéliales, soit par rupture de l'équilibre des facteurs de coagulation, engendrant la formation de thrombine et la stase vasculaire. Au niveau des cellules endothéliales, l'effet photodynamique peut engendrer la nécrose, l'apoptose ou la déformation du cytosquelette [279].

Ces modifications entraînent des fuites sanguines hors des vaisseaux, et l'adhésion de plaquettes, de globules rouges et de neutrophiles sur les parois. Ces adhésions contribuent à une réduction du diamètre interne des vaisseaux concernés, conduisant à des phénomènes de thromboses et de stases vasculaires. Lorsque le PS est circulant, les espèces oxydantes générées peuvent rompre l'équilibre des facteurs régulant la coagulation. Les espèces réactives interagiraient notamment avec le monoxyde d'azote (NO), une molécule vasodilatatrice et anticoagulante [280].

La PDT engendre donc des fuites vasculaires, des thromboses et des vasoconstrictions au niveau des tissus irradiés. Ces phénomènes provoquent « l'asphyxie » de la tumeur : n'étant plus suffisamment vascularisée, les déchets métaboliques s'accumulent dans les cellules et celles-ci deviennent hypoxiques. Les cellules tumorales sont éradiquées, conduisant à une réduction du volume tumoral [281].

#### **V.1.2.2.2 Effets immunitaires et inflammatoires :**

Les effets de la PDT anticancéreuse sur la réponse immunitaire se présentent sous deux aspects : un traitement PDT peut en effet induire soit une inflammation des cellules, soit une réponse antitumorale à long terme. Les modifications de la membrane plasmique ainsi que des membranes des organites cellulaires induites par la PDT sont issues d'une activation des phospholipases membranaires, qui vont alors rapidement dégrader les phospholipides environnant, et des médiateurs de l'inflammation vont être déversés massivement dans le milieu extracellulaire.

Les signaux inflammatoires post-PDT initient une invasion massive de neutrophiles, suivis par les mastocytes qui faciliteront à leur tour l'arrivée des monocytes et des macrophages.

Les épitopes présentés à la surface de ces macrophages peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD<sub>4</sub>. Ces lymphocytes ainsi activés activent à leur tour des lymphocytes T CD<sub>8</sub> cytotoxiques qui pourront détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes.

Des études ont démontré une diminution de 70% de l'efficacité de la PDT par le Photofrin\* chez des animaux déficients en neutrophiles ou encore l'impossibilité d'induire une seconde fois la même tumeur chez des rats traités avec succès par cette méthode. Ces résultats mettent en exergue l'importance de la réponse immunitaire dans le succès d'un traitement photodynamique et surtout le rôle qu'elle peut jouer dans la prévention d'apparition des métastases. En effet, en stimulant le système immunitaire du patient par le mécanisme précédemment décrit, que l'on appelle vaccination *in situ*, la PDT peut prévenir la dissémination des cellules malades et contribuer à la destruction de foyers métastatiques encore réduits.

### V.1.3 Les photosensibilisateurs :

Les photosensibilisateurs utilisés en PDT sont des molécules photo-activables capables d'absorber l'énergie lumineuse afin de la transmettre au milieu extérieur local pour former des espèces réactives de l'oxygène. Ils sont capables de détruire les cellules environnantes *via* des mécanismes photochimiques décrits précédemment. Il existe de nombreux photosensibilisateurs d'origine naturelle ou synthétique. Ceux utilisés en PDT sont facilement différenciables selon leur origine tétrapyrrolique ou nontétrapyrrolique [282] :

- Les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques
- Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques, dont la structure est basée sur celle de la porphyrine :
  - de 1<sup>ère</sup> génération : les molécules d'origine naturelle,
  - de 2<sup>ème</sup> génération : les molécules de synthèse,
  - de 3<sup>ème</sup> génération : les molécules vectorisées

La 1<sup>ère</sup> génération de photosensibilisateurs regroupe l'hématoporphyrine et ses dérivés (Hematoporphyrin Derivatives, HpD). L'HpD a été extraite en 1961 par Lipson à partir de l'hémoglobine du sang par un traitement avec un mélange d'acides sulfurique et acétique, suivi d'un traitement alcalin [283]. Il ne s'agit pas d'un composé pur mais d'un mélange de monomères et d'oligomères (polymères de porphyrine reliés par des ponts ester, éther et carbone) qui peuvent être partiellement séparés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). L'HpD présente une faible sélectivité pour les tissus cibles ainsi qu'une faible clairance [284].

D'un point de vue photophysique, l'HpD absorbe les photons dans le bleu et le vert, longueurs d'onde qui pénètrent faiblement dans les tissus biologiques puisque absorbées principalement par la mélanine et l'hémoglobine.

L'utilisation de photosensibilisateurs de 1<sup>ère</sup> génération présente donc des inconvénients qui ont conduit à la définition du photosensibilisateur idéal, devant posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques suivantes :

- pureté chimique, synthèse reproductible et facile ;
- faible toxicité à l'obscurité ;
- coefficient d'extinction molaire élevé à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre thérapeutique, c'est à dire dans la région rouge du spectre de la lumière visible, voire dans le proche IR (600-850 nm) afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le photosensibilisateur optimale ;
- bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet. Pour cela, son rendement quantique en  $^3\text{PS}_1$  doit être élevé, et la durée de vie de  $^3\text{PS}_1$  et sa valeur énergétique doivent être suffisantes pour permettre le transfert d'énergie vers l' $\text{O}_2$  ;
- solubilité en milieu aqueux pour faciliter son administration systémique et éviter l'agrégation entre molécules de photosensibilisateurs qui inhibe leur fluorescence, l'accessibilité de l' $\text{O}_2$  et la production d' $^1\text{O}_2$  (phénomène de *quenching*) ;
- clairance élevée pour limiter dans le temps la photosensibilité cutanée et ophtalmique de l'individu traité ;
- sélectivité élevée pour le tissu cible.

Afin de se rapprocher de ces caractéristiques « idéales », les photosensibilisateurs de 2<sup>ème</sup> génération ont été développés. Ces photosensibilisateurs sont principalement des dérivés de chlorine, bactériochlorine ou phthalocyanine. Ce sont des composés purs avec notamment une bande d'absorption se situant entre 650 et 800 nm.

Les photosensibilisateurs de 3<sup>ème</sup> génération sont des photosensibilisateurs de 2<sup>ème</sup> génération modifiés de manière à cibler de façon passive (vectorisation) ou active (adressage) les tissus cibles.

#### **V.1.4 Stratégies de ciblage en PDT :**

##### **V.1.4.1 Ciblage actif : l'adressage**

Le ciblage actif consiste à s'appuyer non pas sur les différences de biodistribution, mais sur les particularités phénotypiques et fonctionnelles des cellules cancéreuses. Les tissus cancéreux sont caractérisés par une altération de l'expression des récepteurs, protéines et lipides de surface. Cette altération peut se manifester par une expression ou surexpression de certains récepteurs ou marqueurs membranaires qui sont habituellement très peu présents, voire complètement absents de la surface des cellules [285]. Une croissance plus rapide et importante des cellules tumorales va également entraîner une surexpression de ces récepteurs.

L'idée est donc de cibler ces changements biologiques pour augmenter la sélectivité du photosensibilisant vis-à-vis des tissus cancéreux et par là, l'efficacité de la PDT.

Ces récepteurs et/ou marqueurs surexprimés ne sont pas les mêmes selon le modèle tumoral étudié, mais tous forment des cibles potentielles dans le cadre de la recherche contre le cancer. C'est dans cette optique que des PS dits « de troisième génération » ont été synthétisés. Ces molécules sont composées d'un PS de seconde génération couplé à une molécule d'adressage *via* un « espaceur ». Si la molécule d'adressage est suffisamment accessible, l'assemblage sera reconnu par les récepteurs spécifiques, ou reconnaîtra les marqueurs, surexprimés à la surface des cellules tumorales, facilitant leur incorporation par ces dernières. Contrairement au ciblage passif qui améliore la biodistribution et la biodisponibilité, cette

stratégie permet théoriquement d'améliorer l'accumulation du PS dans la zone à traiter sans pour autant augmenter sa concentration dans les tissus sains.

Dans cette approche d'adressage, deux stratégies sont à considérer : soit greffer des molécules ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses, soit des molécules ciblant les néovaisseaux (stratégie anti-angiogénique).

Dans le cadre d'un ciblage des cellules tumorales, les stratégies les plus développées sont :

**Adressage par des sucres** : l'adjonction de sucres sur des PS de type cycles tétrapyrroliques permet de rendre le PS plus hydrophile [286].

De plus, cette stratégie permet d'exploiter une propriété particulière des cellules tumorales : l'activité de croissance accrue des cellules cancéreuses se traduit souvent par une glycolyse augmentée par rapport aux cellules saines [287] et vont alors activement assimiler par endocytose les sucres présentés à leur surface par le PS en milieu aqueux [288] [289].

**Utilisation d'anticorps monoclonaux** : basée sur l'existence de marqueurs spécifiques, cette méthode consiste à produire un anticorps spécifique d'un antigène tumoral et à l'utiliser afin de détruire les cellules tumorales ou à le faire produire par l'organisme du patient [290].

**Adressage par des peptides** : ce sont des séquences de moins de cinquante acides aminés et qui, selon la séquence peptidique, peuvent interagir de manière spécifique avec différentes protéines, notamment avec celles qui constituent les récepteurs. Leur petite taille offre l'avantage d'un contrôle plus facile du site de greffage d'une molécule thérapeutique, permettant d'éviter les éventuels problèmes de dénaturation. La structure tridimensionnelle des peptides est aussi moins bien définie que pour les protéines, ainsi les déformations éventuelles induites par le couplage avec un PS ne résultent pas forcément en une perte d'affinité avec le récepteur cible. Enfin, ils peuvent être synthétisés. Il s'agit donc d'une alternative intéressante aux macromolécules de type hormones ou anticorps, plus complexes à obtenir et à manipuler. Les peptides ainsi utilisés en tant que molécules de ciblage peuvent alors servir à internaliser un PS de manière spécifique, à modifier sa localisation intracellulaire, ou encore à s'assurer de son activation dans le stroma tumoral.

**Ciblage du récepteur à l'acide folique :** L'acide folique, connu également sous le nom de vitamine B9, l'un des rôles principaux de l'acide folique est d'agir en tant que coenzyme dans le transfert de groupements méthyles, mais a aussi un rôle important dans la réplication de l'ADN. Le récepteur de l'acide folique (RAF) est surexprimé dans de nombreux cancers humains, notamment les tumeurs cérébrales ou pulmonaires [291]. Dans les cancers ovariens, il constitue un marqueur de choix. De plus, l'expression du RAF est très limitée au niveau des tissus humains non pathologiques.

#### **V.1.4.2 Ciblage passif : la vectorisation**

Les PS présentent une sélectivité relative envers les cellules cancéreuses. Plusieurs facteurs relatifs à la nature même des tumeurs et du stroma environnant ont été désignés comme potentiellement responsables. Ainsi, la vascularisation plus dense et perméable, le drainage lymphatique plus faible, l'acidité relative du stroma tumoral causée par l'accumulation de métabolites, ou encore la vitesse de prolifération plus élevée des cellules tumorales pourraient expliquer cette sélectivité.

La structure chimique des PS pourrait aussi avoir son importance : la charge, la taille et la balance hydrophile/hydrophobe pourraient générer des interactions préférentielles entre l'agent thérapeutique et le milieu particulier que constitue le stroma tumoral. Il va être possible, par un choix adéquat de vecteurs appelés aussi transporteurs, d'augmenter la sélectivité du PS envers les tissus à traiter. Généralement, il est considéré que les molécules les plus hydrophiles circulent avec le flux sanguin, ce qui favorise leur élimination [292]. Cela peut permettre d'éviter des problèmes de toxicité liés à de trop fortes concentrations du produit dans certains tissus, mais limite sa biodisponibilité pour le traitement. Au contraire, les plus hydrophobes se collent aux parois vasculaires ou les traversent et sont ensuite stockés dans les tissus.

Il existe deux types de transporteurs : les vecteurs incorporants qui englobent le photosensibilisant au sein de leur structure (liposomes, micelles) et les vecteurs non-incorporants (LDL, albumine) qui sont liés à la molécule d'intérêt de façon covalente. Un bon transporteur ne doit altérer ni l'efficacité, ni l'affinité du PS pour les cellules cancéreuses.

Il doit être aussi biodégradable et sans immunogénicité.

Parmi les vecteurs non-incorporants, les lipoprotéines basse densité (ou LDL pour *Low Density Lipoproteins*) jouent un rôle important dans la sélectivité des PS hydrophobes. En effet, il a été démontré qu'après administration, les PS sont véhiculés dans le flux sanguin au sein d'agrégats de LDL. Ces agrégats présentent des apoprotéines à leurs pôles qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques. Probablement en raison de leurs besoins accrus, les cellules tumorales surexpriment les récepteurs aux LDL. Cette surexpression, couplée aux propriétés spécifiques du stroma tumoral, expliquent la meilleure rétention des PS hydrophobes au niveau de la tumeur.

Dans une stratégie de vectorisation par transporteur non-incorporant, on peut aussi noter l'intérêt de la protéine la plus abondante du sérum humain : l'albumine. Elle régule la pression osmotique sanguine, transporte les acides gras du foie aux tissus et lie de manière covalente et réversible un grand nombre de composés endogènes et exogènes. Un taux élevé d'albumine a été décelé dans les masses tumorales : ceci est vraisemblablement dû à l'augmentation du métabolisme et à la prolifération excessive des cellules cancéreuses. Ainsi, une association liant le photosensibilisateur à l'albumine pourrait être réalisée. Cependant, de telles molécules possèdent par définition une solubilité médiocre dans les milieux aqueux, ce qui pose un problème évident quant à leur mode d'administration. La formulation du médicament prend alors un rôle essentiel. Une alternative réside dans l'incorporation de PS au sein de structures tels les liposomes.

## **V.2 Liposomes et la thérapie photodynamique :**

Les liposomes sont des vésicules biocompatibles et biodégradables, composées de phospholipides et de cholestérol organisés en monocouche ou bicouche lipidique, entourant un cœur aqueux. Le cholestérol apporte la rigidité à la membrane lipidique en réduisant sa perméabilité aux molécules encapsulées et en augmentant sa stabilité en présence de fluides. En PDT, les liposomes sont utilisés comme vecteurs de molécules photo-activables pour des administrations topique ou systémique. De façon schématique et simplifiée, la formulation topique facilite la pénétration cutanée du photosensibilisateur. La formulation systémique, quant à elle, permet d'encapsuler et de véhiculer les photosensibilisateurs dans une structure les protégeant ainsi de leur métabolisme plasmatique.

En PDT, de nombreuses études ont été réalisées pour établir l'efficacité des liposomes comme vecteurs de photosensibilisateurs. Les liposomes sont capables d'incorporer les photosensibilisateurs hydrophobes [293] [294]. Le cœur aqueux est également capable d'encapsuler des molécules chargées, solubles dans l'eau, tel que le bleu de méthylène [295] [296].

Les caractéristiques physico-chimiques des liposomes, telles que la taille, la nature des lipides, le ratio phospholipide/cholestérol et la charge de surface, vont influencer la circulation des liposomes dans le sang, la capacité de relargage, la localisation intracellulaire des photosensibilisateurs et donc l'efficacité thérapeutique en PDT [297].

Pour améliorer la pharmacocinétique et la distribution tumorale des liposomes, des molécules de carbohydrate ou de polymères hydrophiles peuvent être greffées à leur surface, telles que le polyéthylène glycol (PEG) et le monosialoganglioside (GM1). Ces surfactants permettent d'éviter la reconnaissance des liposomes par les macrophages du SRE et la capture par ses organes constitutifs. Bien que la distribution tumorale des liposomes soit essentielle pour l'efficacité par PDT, le concept de libération du principe actif dans la cellule tumorale revêt toute son importance.

Différents « systèmes » ont été référencés, soit dans le microenvironnement tumoral, soit dans la cellule tumorale après internalisation du liposome [297].

- liposomes sensibles au pH, activés par le pH plus acide du microenvironnement tumoral [298];
- liposomes fusionnant avec la membrane cellulaire par échange de lipides [299] ;
- liposomes sensibles aux enzymatiques, activés par des enzymes surexprimées au niveau tumoral [300] ;
- liposomes sensibles à la lumière, activés lors de la PDT [301] ;
- liposomes sensibles à la chaleur, activés par thermo thérapie [302] ;
- liposomes sensibles aux ultra-sons [303].

Ces systèmes de relargage des photosensibilisateurs sont généralement sélectifs du site tumoral.

Les systèmes liposomaux présentent néanmoins l'inconvénient de pouvoir se fixer aux lipoprotéines de haut poids moléculaire (High Density Lipoprotein, HDL) et d'échanger des lipides, ce qui provoque leur désintégration. Le photosensibilisateur se retrouve ainsi libéré dans le compartiment sanguin. Deux phénomènes interviennent : l'échange de phospholipides du liposome avec les apolipoprotéines des HDL, ou le passage des phospholipides du liposome vers les HDL, sans perte d'apolipoprotéine L'interaction des liposomes avec les HDL dépend des paramètres physicochimiques des liposomes (taille, charge, fluidité) [304] [305].



*Conclusion*

Le cancer est une maladie qui a pour cause la division et la prolifération cellulaires incontrôlées. Alors que les mécanismes exacts impliqués dans ce phénomène ne sont pas complètement élucidés, plusieurs facteurs exogènes (maladies infectieuses, produits chimiques, tabagisme, exposition aux radiations) et endogènes (profil génétique, hormones) ont cependant été identifiés.

Malgré les innovations thérapeutiques réalisées dans le domaine de l'oncologie au cours des dernières décennies, le cancer reste la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième cause de mortalité chez la femme. Le cancer est donc une priorité en matière de santé publique.

La chirurgie constitue une première ligne de traitement pour les tumeurs solides et permet d'éliminer les foyers tumoraux visibles. Toutefois, les foyers de cellules métastatiques difficilement décelables ne peuvent être retirés chirurgicalement et un certain nombre de cellules tumorales peuvent persister malgré la chirurgie. Un autre arsenal thérapeutique est souvent envisagé, à savoir la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Cependant ces traitements posent un problème majeur aux niveaux de la thérapie et l'effet secondaire indésirables. De nombreuses possibilités ont été proposées, mais un mécanisme de traitement sure n'est pas encore établi. Le problème commence à partir de la détection du cancer, le choix des médicaments appropriés pour le traitement, la durée du traitement, et enfin les effets secondaires. Les applications récentes de la nanotechnologie en oncologie a créé un nouveau espoir pour le traitement de cette maladie mortelle.

Ces systèmes vectorisés nanoparticulaire font l'objet, depuis plusieurs décennies, de nombreuses études afin d'apporter une solution aux problèmes de stabilité et d'efficacité des médicaments. Ces derniers de part leur taille, leurs propriétés physiques et leurs interactions avec les tissus vivants, peuvent répondre à certains critères et se concentrer à un endroit précis de l'organisme.

En oncologie, le développement des nanoparticules permet aujourd'hui de proposer une thérapie ciblée, dont l'efficacité d'action et la diminution des effets secondaires sont supérieures à la chimiothérapie conventionnelle.

Ces thérapeutiques nouvelles se basent sur la capacité de délivrance et de ciblage ainsi que sur l'exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules. Dans ce contexte, certains produits sont d'ores et déjà en phase d'essais cliniques sur l'homme.

A ce jour, il reste difficile de se prononcer quant à l'innocuité de ces éléments. D'autres travaux au cas par cas sont indispensables afin de clarifier leur impact sur la santé des hommes en raison de leur multiplicité et des différentes voies d'exposition possibles. L'étude du devenir des nanoparticules dans notre organisme (toxicocinétique) et de leurs effets cellulaires (stress oxydatif, cytotoxicité, génotoxicité) est essentielle afin de garantir leur sécurité d'utilisation.

Dans notre analyse bibliographique, nous avons mis l'accent sur les liposomes, ces vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre se veulent donc intéressantes dans la mesure où elles présentent une évolution significative dans la lutte contre le cancer. Ces nanovecteurs innovants touchent uniquement les cellules malades, ainsi on peut envisager d'administrer des doses plus conséquentes et plus adaptées à la tumeur.

Une nouvelle approche anticancéreuse a été envisagée qui permet de pallier aux inconvénients des traitements habituels il s'agit de la thérapie photodynamique anticancéreuse basée sur l'utilisation de photosensibilisateurs qui deviennent phototoxiques en cas d'exposition lumineuse détruisant ainsi la cellule cancéreuse par une espèce réactive toxique produite au cours de ce processus.



*Résumés*

## RESUME

**Titre :** Systèmes vectorisés nanoparticulaire et place des liposomes dans le traitement anticancéreux

**Auteur :** HIND NAJI

**Mots clés :** Cancer, Système de vectorisation, nanoparticules, liposomes

La lutte contre le cancer est devenue un enjeu majeur aussi bien d'un point de vue humain qu'économique. De nos jours on note une variété remarquable des techniques de traitement du cancer. La chirurgie associée à la radiothérapie ou à la chimiothérapie demeure un des moyens les plus utilisés. Cependant ces méthodes de traitement utilisent le plus souvent des molécules possédant une toxicité élevée. De plus au niveau des tumeurs et surtout des métastases difficilement accessibles, des réactions secondaires sérieuses peuvent être observées lors de ces traitements.

Le développement des nanotechnologies offre aujourd'hui des outils minuscules, dont les propriétés exceptionnelles permettent d'envisager des applications pointues en nanomédecine : élaboration de traitements plus sûrs et possibilité de ciblage thérapeutique en font des applications prometteuses en cancérologie.

En fait ces systèmes vectorisés nanoparticulaire présentent plusieurs avantages tels que la protection des médicaments contre les dégradations dans l'organisme, l'amélioration de l'absorption des médicaments dans les tumeurs et les cellules cancéreuses elles-mêmes, le meilleur contrôle de la distribution des médicaments dans les tissus au cours du temps ainsi qu'une absence d'interactions des principes actifs avec les cellules saines.

Parmi ces systèmes les liposomes ont été utilisés comme vecteurs de médicaments. Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Les médicaments encapsulés au sein des liposomes vont révolutionner les techniques de chimiothérapie, en permettant un dosage précis et adapté à chaque type de patient, et supprimant les effets indésirables.

Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations.

## SUMMARY:

**Title:** Vectorized nanoparticle systems and instead of liposomes in cancer treatment

**Author:** HIND NAJI

**Keywords:** Cancer, vectoring system, nanoparticles, liposomes

The fight against cancer has become a major issue from both a human and economic point of view. Nowadays there is a remarkable variety of cancer treatment techniques. Surgery with radiotherapy or chemotherapy remains one of the most used means. However these treatment methods mostly use molecules with high toxicity. Also in tumors and especially inaccessible metastases, serious side reactions can be observed when these treatments.

The development of nanotechnology today offers tiny tools including the unique properties allow to consider challenging applications in nanomedicine: development of safer treatments and possible therapeutic targeting make promising applications in oncology.

These vectorized nanoparticle systems have several advantages such as protection against damage of drugs in the body, improving the absorption of drugs in tumors and cancer cells themselves, the best control of the distribution of drug in the tissues over time as well as a lack of interaction of the active ingredients with the healthy cells.

Among these systems the liposomes have been used as drug carriers. These are spherical vesicles of several tens to several thousand nm in diameter. These vesicles are composed of one or more lipid bilayers which allow (s) for separating an intravesicular medium from an external environment. The encapsulated drugs in liposomes will revolutionize chemotherapy techniques, allowing accurate dosing and adapted to each type of patient and removing unwanted effects.

However, liposomes also have some limitations.

## ملخص:

**العنوان:** أنظمة توجيه الجسيمات متناهية الصغر و مكانة الجسيمات الشحمية في علاج السرطان

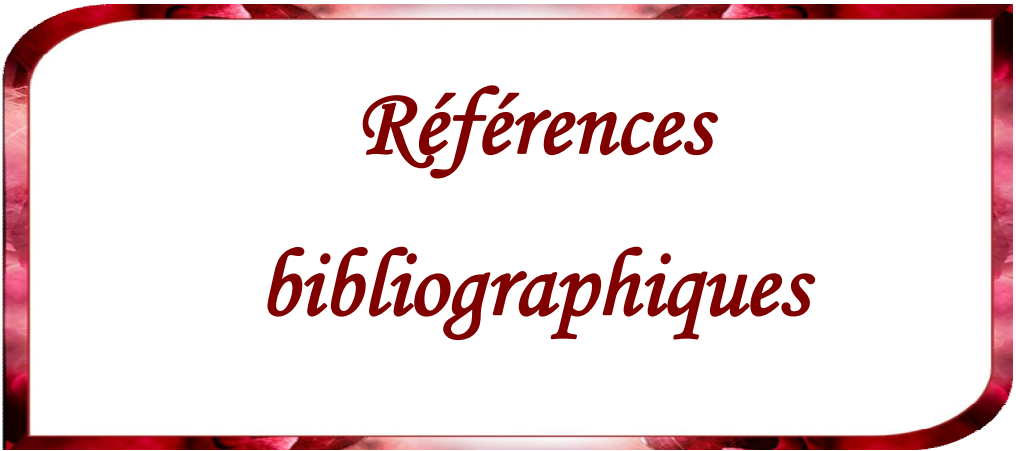
**الكاتبة:** هند ناجي

**الكلمات الرئيسية:** السرطان، أنظمة التوجيه، جسيمات متناهية الصغر، جسيمات شحمية أصبحت مكافحة السرطان من القضايا الرئيسية من الناحية الإنسانية و الاقتصادية. في الوقت الحاضر هناك مجموعة متنوعة من التقنيات لعلاج السرطان. الجراحة مع العلاج الإشعاعي أو العلاج الكيميائي لا تزال واحدة من أكثر الوسائل استخداما. غير أن أساليب العلاج هاته تستخدم في الغالب جزيئات عالية السمية، أكثر من هذا يمكن ملاحظة على مستوى الأورام و خصوصا الانبثاث التي يتعذر الوصول إليها تفاعلات جانبية خطيرة إثر استعمال هذه العلاجات.

مكن تطوير النانوتكنولوجيا اليوم من تقديم ادوات دقيقة بما في ذلك خصائص فريدة من نوعها تتيح النظر في الطلبات الأكثر تحديا في الطب الجسيمي: تطوير علاجات أكثر أمانا وإمكانية الاستهداف العلاجي جعل منها تطبيقات واعدة في علاج الأورام.

أنظمة توجيه الجسيمات المتناهية الصغر هاته لديها العديد من المزايا مثل حماية الأدوية من الانحطاط داخل الجسم، تحسين امتصاص الأدوية من طرف الأورام و الخلايا السرطانية نفسها، مراقبة مثلى لتوزيع الأدوية داخل الأنسجة مع مرور الوقت فضلا عن عدم وجود تفاعل المكونات النشطة مع الخلايا السليمة. ومن بين هذه النظم تم استخدام الجسيمات الشحمية كناقلات للأدوية. هذه الحويصلات الكروية التي يتراوح قطرها من عدة عشرات إلى عدة آلاف نانومتر. و تتكون هذه الأخيرة من طبقة أو عدة طبقات ثنائية الدهون التي تسمح من فصل ما بداخل الحويصلة من الوسط الخارجي.

الأدوية المغلقة داخل الجسيمات الشحمية سوف تثير ثورة في تقنيات العلاج الكيميائي ببيئتها الحصول جرعات تتكيف مع نوع كل مريض و إزالة الآثار الغير مرغوب فيها. ومع ذلك فإن للجسيمات الشحمية بعض القيود.



*Références  
bibliographiques*

- [1] **Lowenser SW, Cissero E, Ewan G.** Intrinsic tumour mechanism. 2009 Nov 18; 4(715):307-15.
- [2] **Hanahan, D.; Weinberg, R. A.** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100, 57-70.
- [3] **Cryns V, Byun Y, Rana A, Mellor H, Lustig K, Ghanem L, Parker P, Kirschner M. and Yuan J.** (1997). Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy. *J Biol Chem* 272, 29449-53.
- [4] **De Laurenzi, V and Melino, G.** (2000). The little devil of death. *Nature* 406, 135-36  
**Delon, J., Gregoire, C., Malissen, B., Darche, S., Lemaitre, F., Kourilsky, P., Abastado, J. P., and Trautmann, A.** (1998). CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* 9, 467-73.
- [5] **Cryns V, Bergeron, Zhu H, Li H, and Yuan J.** (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly (ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem* 271, 31277-82.
- [6] **Griffioen, A. W.; Molema, G.** Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 237-268.
- [7] **Folkman, J.** Tumor angiogenesis. In : *The Molecular Basis of Cancer* Editors : **Mendelson, J.; Howley, P.M.; Israel, M.A.; Liotta, L.A.** Philadelphia Saunders 1995, 206-232.
- [8] **Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J.** Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324, 1-8.
- [9] **Zhang, L.; Conejo-Garcia, J. R.; Katsaros, D.; et al.** Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 203-213.

- [10] **Weidner, N.** Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* 1995, 147, 9-19.
- [11] **Takahashi, Y.; Kitadai, Y.; Bucana, C. D.; Cleary, K. R.; Ellis, L. M.** Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995, 55, 3964-3968.
- [12] [http://www.umvf.univnantes.franatomie/pathologieenseignement/anapath\\_8sitehtmlcours.pdf](http://www.umvf.univnantes.franatomie/pathologieenseignement/anapath_8sitehtmlcours.pdf)
- [13] **Brognard J, Clark A.S, Dennis P.A.** (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Research*, 61, 3986-3997. Brooks, K.R., To, K., Moore Joshi, M.B., Conlon, D.H., Herndon Ii, J.E., D'Amico, T.A.
- [14] **Harpole Jr, D.H., Smythe, W.R. & Daniel, T.M.** (2003). Measurement of chemoresistance markers in patients with stage III non-small cell lung cancer: A novel approach for patient selection. *Annals of Thoracic Surgery*, 76, 187-193.
- [15] **Chang, S.C., Tucker, T., Thorogood, N.P. & Brown, C.J.** (2006). *Frontiers in Bioscience*, 11, 852-866.
- [16] [http://www.universalis.fr/encyclopedie/oncogenese-cancerogenese\\_carcinogenese/3-activation-de-proto-oncogenes-en-oncogenes-dans-les-tumeurs/#c](http://www.universalis.fr/encyclopedie/oncogenese-cancerogenese_carcinogenese/3-activation-de-proto-oncogenes-en-oncogenes-dans-les-tumeurs/#c) 10
- [17] [http://www.universalis.fr/encyclopedie/oncogenese-cancerogenese\\_carcinogebese/3-activation-de-proto-oncogenes-en-oncogenes-dans-les-tumeurs/#c](http://www.universalis.fr/encyclopedie/oncogenese-cancerogenese_carcinogebese/3-activation-de-proto-oncogenes-en-oncogenes-dans-les-tumeurs/#c) 10
- [18] **Brown, J.M. & Attardi, L.D.** (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5, 231-237.
- [19] <http://www.chufes.ma/amirf/Cours/biologie/42.pdf>

- [20] **Delaval, K. & Feil, R.** (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development*, 14, 188-195.
- [21] **Furuno, M., Pang, K.C., Ninomiya, N., Fukuda, S., Frith, M.C., Bult, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Mattick, J.S. & Suzuki, H.** (2006). Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 2, 537-553.
- [22] **Field, R.W.** (2001). A review of residential radon case-control epidemiologic studies performed in the United States. *Review of Environmental Health*, 16, 151-167.
- [23] **Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A.** (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.
- [24] ][http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/les-mecanismes-du-cancer\\_1453/c3/221/p5/#xtor=AL-40](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/les-mecanismes-du-cancer_1453/c3/221/p5/#xtor=AL-40)
- [25] **Mayer, A.M. & Hamann, M.T.** (2004). Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antitumoral, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol (NY)*, 6, 37-52.
- [26] ][http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/les-mecanismes-du-cancer\\_1453/c3/221/p5/#xtor=AL-40](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/les-mecanismes-du-cancer_1453/c3/221/p5/#xtor=AL-40)
- [27] **Khuder, S.A. & Mutgi, A.B.** (2001). Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest*, 120, 1577-1583. *Toxicology and Pharmacology*, 22, 97-103. Mori, S., Ito, G., Usami, N., Shimokata, K., Sekido, Y., Yoshioka, H., Ueda, Y., Kodama

- [28] **Giaccone, G., Herbst, R.S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., Natale, R.B., Schiller, J.H., Von Pawel, J., Pluzanska, A., Gatzemeier, U., Grous, J.Ochs, J.S., Averbuch, S.D., Wolf, M.K., Rennie, P., Fandi, A. & Johnson, D.H.**(2004). Gefitinibin combination with gemcitabine and cisplatin in advanced nonsmall-cell lung cancer: A phase III trial - INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 777-784.
- [29] National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov>
- [30] **Pronzato P, Rondini M.** (2005) Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol.* 80-84.
- [31] **Piccart M, Dochy E, Cardoso F.** (2003) News in the medical treatment of breast cancer. *Bull Cancer.* 90(1):46-52.
- [32] **Osterlind A.** Epidemiology on malignant melanoma in Europe. *Acta Oncol* 1992;31:903–8.
- [33] **Merimsky O, Shenfeld Y, Baharv E, Altomonte M, Chaitchik S, Maio M, et al.** Melanoma-associated hypopigmentation: where are the antibodies. *Am J Clin Oncol* 1996;19(6):613–8.
- [34] **Hill GJ, Moss SE, Golomb FM, Fletcher WS, Minton JP, Krementz ET.** DTIC and combination therapy for melanoma: III DTIC (NSC 45388) surgical adjuvant COG protocol 7040. *Cancer* 1981;47:2556–62.
- [35] **Rosenberg SA, Longo DL, Lotze MT.** Principles and application of biology therapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer, principles and practice of Oncology*. Philadelphia: JB Lippincort Company. p. 301–47.450 N. Penel, J. Bonnetterre / *La revue de médecine interne* 24 (2012) 443–451.
- [36] **Porgador, A., Bannerji, R., Watanabe, Y. et al.** (1993). Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN-gamma gene inserted tumor cells. *J. Immunol.* 150, 1458–1470, 1993.

- [37] **Townsend, S. E., and Allison, J. P.** (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259, 368–370.
- [38] **Plautz, G. E., Yang, Z. Y., Wu, B. Y. et al.** (1993). Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 4645–4649.
- [39] **Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y. et al.** (1993). Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11307–11311.
- [40] **Behr TM, Behe M, Worman B.** Trastuzumab and breast cancer. Letter to the editor. *N Eng J Med* 2001;345: 996.
- [41] **Ravdin PM, Chamness GC.** The c-erbB2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer : a paradigm for the development of other molecular markers. *Gene* 1995;159:19–27.
- [42] **Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al.** Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002;20:1215–21.
- [43] **Strasser F, Betticher DC, Suter TM.** Trastuzumab and breast cancer. Letter to the editor. *N Eng J Med* 2001;345:995–6.
- [44] **Behr TM, Griesinger F, Riggert J.** High-dose myeloablative radioimmunotherapy of mantle cell non-Hodgkin lymphoma with iodine-131 chimeric anti-CD20 antibody C2B8 and autologous stem cell support. Result of a pilot study. *Cancer* 2002;94:1363–72.
- [45] **Bienvenu J, Chvetzoff R, Salles G, Balter C, Tilly H, Herbrecht R, et al.** Tumor necrosis factor alpha release is a major biological event associated with rituximab treatment. *Hematol* 2001;2:378–84.
- [46] **Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M.** Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol* 2002;29:105–12.

- [47] **Grillo-Lopez AJ, Dallaire BK, McClure A.** Monoclonal antibodies: a new era in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol* 2001; 2:301–11.
- [48] **Couvreur, P.** « [Drug vectorization or how to modulate tissular and cellular distribution of biologically active compounds] ». *Annales pharmaceutiques françaises* 59, no 4 (juillet 2001).
- [49] **Folkman J, Long DM.** (1964) the use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *J Surg Res.* 4: 139-42.
- [50] **Hoffman AS.** (2008) The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J Control Release.* 132(3): 153-63.
- [51] **I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur.** «Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, 54(5): p.631-651.
- [52] **Bae, Y. H. & Park, K.** Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release* **153**, 198-205 (2011).
- [53] **Maeda, H.** « The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting ». *Advances in enzyme regulation* 41 (2001): 189-207.
- [54] **Matsumura, Yasuhiro, et Hiroshi Maeda.** « A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs ». *Cancer Research* 46, no 12 Part 1 (janvier 12, 1986): 6387- 6392.
- [55] **Hobbs, Susan K., Wayne L. Monsky, Fan Yuan, W. Gregory Roberts, Linda Griffith, Vladimir P. Torchilin, et Rakesh K. Jain.** « Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no 8 (avril 14, 1998): 4607- 4612).

- [56] **Iyer, Arun K., Greish Khaled, Jun Fang, et Hiroshi Maeda.** « Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting ». *Drug Discovery Today* 11, no17- 18 (septembre 2006): 812- 818.
- [57] **Gullotti E, Yeo. (2009)** Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Mol Pharm.* 6(4): 1041-51.
- [58] *Definition of a nanomaterial, Journal officiel de la commission de l'Union Européenne*,18/11/2011.
- [59] **Vauthier, C. & Couvreur, P.** Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. (2008).
- [60] **Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D. & Golomb, G.** A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **133**, 90–95 (2009).
- [61] **Hillaireau, H. & Couvreur, P.** Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
- [62] **Jeon, S. ., Lee, J. ., Andrade, J. . & De Gennes, P. .** Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science* **142**, 149–158(1991).
- [63] **Moghimi, S. M. & Szebeni, J.** Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, 463–478(2003).
- [64] **Chen, V. M. and Y.** Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **5**,561–573 (2006).
- [65] **Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. & Shin, D. M.** Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* **5**, 1909–1917 (2006).

- [66] **Suh, W. H., Suh, Y.-H. & Stucky, G. D.** Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences. *Nano Today* **4**, 27–36 (2009).
- [67] **mittal, V. V., Patel, S. J. & Sheth, S. K.** Development and characterization of folate targeted nanoparticle drug delivery system. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1**, 1–12 (2010).
- [68] **Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. & Kristl, J.** Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release* **120**, 18–26 (2007).
- [69] **Zhang, N., Chittapuso, C., Ampassavate, C., Siahaan, T. J. & Berkland, C.** PLGA Nanoparticle-Peptide Conjugate Effectively Targets Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1. *Bioconjug Chem* **19**, 145–152 (2008).
- [70] **M. Ferrari,** *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.* Nature Reviews Cancer, 2005, 5, 161–71.
- [71] **Koppel, D. E. (1972)** Analyse de la multidispersion macromoléculaire en spectroscopie de corrélation d'intensité : La méthode de Cumulants. *J. Chim. Phys.* **57**: 4814-20.
- [72] **Lu F, Wu SH, Hung Y, Mou CY. (2009)** Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small.* **5(12)**: 1408-13.
- [73] **Lee H, Fonge H, Hoang B, Reilly RM, Allen C. (2010)** The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* **7(4)**: 1195-208.
- [74] **Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. (2008)** Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* **5(4)**: 505-15.
- [75] **Igarashi E. (2008)** Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. *Toxicol Appl Pharmacol.* **229(1)**: 121-34.

- [76] **Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. (2008)** Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm.* 5(4): 487-95.
- [77] **Owens DE 3rd, Peppas NA. (2006)** Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 307(1): 93-102.
- [78] **Qiu Y, Liu Y, Wang L, Xu L, Bai R, Ji Y, Wu X, Zhao Y, Li Y, Chen C. (2010)** Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials.* 31(30): 7606-19.
- [79] **Lee SY, Ferrari M, Decuzzi P. (2009)** Design of bio-mimetic particles with enhanced vascular interaction. *J Biomech.* 42(12): 1885-90.
- [80] **Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. (2009)** Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res.* 26(1): 235-43.
- [81] **Danhier F, Magotteaux N, Ucakar B, Lecouturier N, Brewster M, Pr at V. (2009)** Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm.* 73(2): 230-8.
- [82] **Huh KM, Min HS, Lee SC, Lee HJ, Kim S, Park K. (2008)** A new hydrotropic block copolymer micelle system for aqueous solubilization of paclitaxel. *J Control Release.* 126(2): 122-9.
- [83] **Boulikas T. (2009)** Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs.* 18(8): 1197-218.
- [84] **Perez-Soler R, Khokhar AR. (1992)** Lipophilic cisplatin analogues entrapped in liposomes: role of intraliposomal drug activation in biological activity. *Cancer Res.* 52(22): 6341-7.
- [85] **Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. (2008)** Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(45): 17356-61.

- [86] **Carvalho Júnior AD, Vieira FP, Melo VJ, Lopes MT, Silveira JN, Ramaldes GA, Garnier-Suillerot A, Pereira-Maia EC, Oliveira MC. (2007)** Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz J Med Biol Res.* 40(8): 1149-57.
- [87] **Chen H, Pazicni S, Krett NL, Ahn RW, Penner-Hahn JE, Rosen ST, O'Halloran TV. (2009)** Coencapsulation of arsenic- and platinum-based drugs for targeted cancer treatment. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48(49): 9295-9. targeting, Current Opinion in solid state and material science, 6, 319-327, 2002.
- [88] **Hans M.L., A.M. Lowman,** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, Current Opinion in solid state and material science, 6, 319-327, 2002.
- [89] **Wissing S.A., Kayser O., Mueller R.H.** Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 56, 1257-1272, 2004.
- [90] **M.J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U.F. Schaefer, C.M. Lehr,** Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, *J. Control. Release* 141(2010) p. 85-92.
- [91] **Quaglia, F,** et al. Nanoscopic core-shell drug carriers made of amphiphilic triblock and stardiblock copolymers. *Int. J. Pharmaceut.* 324:1(2006) p. 56-66.
- [92] **Nouvel C.,** Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactide : de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en oeuvre des systèmes de vectorisation particulaires, Thèse Institut Polytechnique de Lorraine (INPL), 2002.
- [93] **Rouzes C.,** Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane: élaboration, propriétés et applications biomédicales, Thèse Institut Polytechnique de Lorraine (INPL), 2001.
- [94] **Long, J, Osmond, D et Vincent, B.** The equilibrium aspects of weak flocculation. *J. Colloid. InterfSci.* 42:33 (1973) p. 545-553.
- [95] **Hans M.L., A.M. Lowman,** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, Current Opinion in solid state and material science, 6, 319-327, 2002.

- [96] **Majeti N.V. Ravi Kumar, N. Kumar, AJ Domb, M. Arora**, Pharmaceutical Polymeric Controlled Drug Delivery Systems, *Advances in Polymer Sciences*, vol 160, 50-61, 2002.
- [97] **Wissing S.A., Kayser O., Mueller R.H.** Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272, 2004.
- [98] **Müller, R. H., Mäder, K. & Gohla, S.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* **50**, 161–177 (2000).
- [99] **Pardeike, J., Hommos, A. & Müller, R. H.** Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* **366**, 170–184 (2009).
- [100] **Küchler, S. et al.** SLN for topical application in skin diseases--characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. *Int J Pharm* **390**, 225–233 (2010).
- [101] <http://formulation.vinensia.com/2011/06/method-of-solid-lipid-nanoparticles-sln.html>.
- [102] **Aji Alex, M. R., Chacko, A. J., Jose, S. & Souto, E. B.** Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *Eur J Pharm Sci* **42**, 11–18 (2011).
- [103] Bio Conjugation of Biodegradable Poly (Lactiglycolic Acid) to Protein, Peptide, And Anti-Cancer Drug an Alternative Pathway for Achieving Controlled Release From Micro- And Nan. *Scribd* at <http://www.scribd.com/doc/31018137/Bio-Conjugation-of-Biodegradable-Poly-Lactiglycolic-Acid-to-Protein-Peptide-And-Anti-Cancer-Drug-an-Alternative-Pathway-for-Achieving-Controlled-R>.
- [104] **C. Kumar**, *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for the Life Sciences*, 2006, 2.
- [105] **Letchford, K., and Burt, H.** (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* **65**, 259-269.

- [106] **Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., and Kwon, G.S.** (2000). Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release* *64*, 43-153.
- [107] **Kabanov, A.V., and Alakhov, V.Y.** (2002). Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* *19*, 1-72.
- [108] **Vauthier, C., Labarre, D., and Ponchel, G.** (2007). Design aspects of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *J Drug Target* *15*, 641-663.
- [109] **Vauthier, C., Labarre, D., and Ponchel, G.** (2007). Design aspects of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *J Drug Target* *15*, 641-663.
- [110] **Nicolas, J., and Couvreur, P.** (2009). Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* *1*, 111-127.
- [111] **Arayne, M.S., and Sultana, N.** (2006). Porous nanoparticles in drug delivery systems. *Pak J Pharm Sci* *19*, 158-169.
- [112] **Asif, M., Arayne, M.S., Sultana, N., and Hussain, F.** (2006). Fabrication of nanoparticles within polymeric pores for controlled release of drug. *Pak J Pharm Sci* *19*, 73-84.
- [113] **Paillard, A., Passirani, C., Saulnier, P., Kroubi, M., Garcion, E., Benoit, J.P., and Betbeder, D.** (2010). Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. *Pharm Res* *27*, 126-133.

- [114] **Horcajada, P., Serre, C., Maurin, G., Ramsahye, N.A., Balas, F., Vallet-Regi, M., Sebban, M., Taulelle, F., and Ferey, G.** (2008). Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled drug delivery. *J Am Chem Soc* **130**, 6774-6780.
- [115] **Grayson, S. M. & Fréchet, J. M.** Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem. Rev.* **101**, 3819–3868 (2001).
- [116] **Tomalia, D. A.** The dendritic state. *Materials Today* **8**, 34–46 (2005).
- [117] **Hawker, C. J. & Frechet, J. M. J.** Control of surface functionality in the synthesis of dendritic macromolecules using the convergent-growth approach. *Macromolecules* **23**, 4726 -4729 (1990).
- [118] **Svenson, S. & Tomalia, D. A.** Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2106–2129 (2005).
- [119] **Jain, S. et al.** Poly propyl ether imine (PETIM) dendrimer: a novel non-toxic dendrimer for sustained drug delivery. *Eur J Med Chem* **45**, 4997–5005 (2010).
- [120] **Jiang, X. et al.** Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials* **32**, 9457–9469 (2011).
- [121] **Bronstein, L. M. & Shifrina, Z. B.** Dendrimers as encapsulating, stabilizing, or directing agents for inorganic nanoparticles. *Chem. Rev.* **111**, 5301–5344 (2011).
- [122] **Lamanna, G. et al.** Dendronized iron oxide nanoparticles for multimodal imaging. *Biomaterials* **32**, 8562–8573 (2011).
- [123] **Wichterle OL, D.** Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960;185:117-8.
- [124] **Hennink WE, van Nostrum CF.** Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:13-36.
- [125] **Cingarapu, S., Yang, Z., Sorensen, C. M. & Klabunde, K. J.** Synthesis of CdSe/ZnS and CdTe/ZnS Quantum Dots: Refined Digestive Ripening. *Journal of Nanomaterials* **2012**, 1–12 (2012).

- [126] **Hatami, F. et al.** InP quantum dots embedded in GaP: Optical properties and carrier dynamics. *Phys. Rev. B* **67**, 085306 (2003).
- [127] **TANG, X., YIN, Z., DU, A., ZHAO, J. & DENY, S.** MOVPE growth of InAs quantum dots for mid-IR applications. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **16**, Supplement 1, s25–s28 (2006).
- [128] **Chandezon, F. & Reiss, P.** Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. *Techniques de l'Ingenieur* 1–15 (2004).
- [129] **Yu, W. W., Chang, E., Drezek, R. & Colvin, V. L.** Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**, 781–786 (2006).
- [130] **Praetner, M. et al.** The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. *Biomaterials* **31**, 6692–6700 (2010).
- [131] **Gopalakrishnan, G. et al.** Multifunctional lipid/quantum dot hybrid nanocontainers for controlled targeting of live cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5478–5483 (2006).
- [132] **Debouttière, P.-J.** Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques. (2006).at <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00194115>
- [133] **Cao, X., Ye, Y. & Liu, S.** Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal Biochem.* **417**, 1–16 (2011).
- [134] **Schmid, G. & Corain, B.** Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. *ChemInform* **34**, no–no (2003).
- [135] **Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M.** Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1307–1315 (2008).

- [136] Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol* **79**, 248–253 (2006).
- [137] Lucas T. Nanotechnologies: Frappes médicales. *L'usine Nouv.* 2011;(3228):40–3.
- [138] C. Alexiou, W. Arnold, R. J. Klein, F. G. Parak, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, A. S. Lubbe, *Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting*, *Cancer Res*, 2000, 60 (23), 6641–6648.
- [139] J. W. Bulte, Y. Hoekstra, R. L. Kamman, R. L. Magin, A. G. Webb, R. W. Briggs, K. G. Go, C.E. Hulstaert, S. Miltenyi, T. H. The, *Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles*, *Magn. Reson. Med*, 1992, 25 (1), 148–157.
- [140] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, *J. Phys. D: Appl. Phys*, 2003, 36, 167–181.
- [141] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*, *AJR* , 1989, 152 (1), 167–173.
- [142] J. Lee, T. Isobe, M. Senna, *Preparation of ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles by precipitation in the presence of PVA at high pH*, *J. Colloid Interface Sci*, 1996, 177 (2), 490–494.
- [143] A. K. Gupta, M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, *Biomaterials*, 2005, 26 (18), 3995–4021.
- [144] P. Reimer, T. Balzer, *Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RESspecific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications*, *Eur. Radiol*, 2003, 13 (6), 1266–1276.
- [145] C. Gruttner, J. Teller, *New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications*, *J. Magn. Magn. Mater*, 1999, 194, 8–15.

- [146] **C. Berry, A. S. G. Curtis**, *Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*, **J. Phys. D Appl. Phys.**, 2003, 36, 198–206.
- [147] **Mou, Y. et al.** In vivo migration of dendritic cells labeled with synthetic superparamagnetic iron oxide. *Int J Nanomedicine* **6**, 2633–2640 (2011).
- [148] **H.W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley**, *C60: Buckminsterfullerene*, *Nature*, 1985, 318, 162–163.
- [149] **E. Osawa**, *C60: Buckminsterfullerene*, *Kagaku*, 1970, 25, 854.
- [150] **D. Koruga, L. Matija, N. Misic, P. Rakin**, *Fullerene C60: properties and possible applications*. **Trans. Tech. Publ. Mat. Sci. Forum**, 1996, 214, 49–56.
- [151] **J.H. Zagal, S. Griveau, K. I. Ozoemena, T. Nyokong, F. Bedioui**, *Carbon nanotubes, phthalocyanines and porphyrins: attractive hybrid materials for electrocatalysis and electroanalysis*, **J Nanosci. Nanotechnol**, 2009, 9 (4), 2201–2214.
- [152] **G. V. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, S. V. Gudkov**, *Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C(60) fullerene nanostructures in vitro and in vivo*, *Radic. Biol. Med*, 2009.
- [153] **Ostiguy C, Roberge B, Woods C, Soucy B**. Les nanoparticules de synthèse: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. R646 IRSST. 2010 p. 159.
- [154] **H. J. Johnston, G. R. Hutchison, F. M. Christensen, K. Aschberger, V. Stone**, *The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity*. *Toxicol. Sci*, 2009.
- [155] **M. Terrones, N. Grobert, J. Olivares, J. P. Zhang, H. Terrones, K. Kordatos, W. K. Hsu, J. P. Hare, P. D. Townsend, K. Prassides, A. K. Cheetham, H. W. Kroto, D. R. M. Walton**, *Controlled production of aligned-nanotube bundles*, *Nature*, 1997, 388 (6637), 52–55.

- [156] **T. Enoki, K. Takai, V. Osipov, M. Baidakova, A. Vul**, *Nanographene and nanodiamond; new members in the nanocarbon family*. **Chem. Asian J**, 2009, 4, 796–804.
- [157] **A. Krueger**, *New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials*, *Chemistry*, 2008, 14 (5), 1382–1390.
- [158] **Simon M.** Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro. 2009. p. 205.
- [159] **Bachelez H, Basset S, Crickx B.** Comprendre la peau. Les grandes fonctions de la peau. *Ann Dermatol Venereol*. 2005;132(8S49-68).
- [160] **Carillo S.** Histologie des voies aériennes supérieures. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 2004. p. 11.
- [161] **Carillo S.** Histologie de l'appareil respiratoire. Voies aériennes profondes. Faculté de médecine Montpellier-Nîmes. 2004. p. 31.
- [162] **Lesné C, Picot A.** Gaz et particules minérales: les voies respiratoires et ses principaux mécanismes de défense. 1998 p. 25.
- [163] **Ostiguy C, Roberge B, Woods C, Soucy B.** Les nanoparticules de synthèse: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. R646 IRSST. 2010 p. 159).
- [164] **Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Al. E.** What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul. Toxicology Pharmacol.* 2007;49:217–28.
- [165] **Witschger O, Fabries J-F.** Particules ultra-fines et santé au travail. 2- Sources et caractérisation de l'exposition. *Cahiers de notes documentaires - INRS*. 2005 p. 177.
- [166] **Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Al. E.** What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul. Toxicology Pharmacol.* 2007;49:217–28.

- [167] **Buzea C, Pacheco II, Robbie K.** Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17–R71.
- [168] **Florence AT.** Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug Discov. Today Technol.* 2005;2(1):75–81.
- [169] **Delie F.** Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998;34:221–33.
- [170] **Chadhry Q, Scotter M, Blackburn J, Al. E.** Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit. Contam.* 2008;25(3):241–58.
- [171] **Florence AT.** The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm. Res.* 1997;14(3):259–66.
- [172] **M. Elsabahy, K. L. Wooley,** *Chem. Soc. Rev.* **2012.**
- [173] **I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur,** *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002, 54,** 631-651.
- [174] **P. Artursson, I. Sjöholm,** *Int. J. Pharm.* **1986, 32,** 165-170.
- [175] **G. Borchard, J. Kreuter,** *J. Drug Targeting* **1993, 1,** 15-19.
- [176] **M. Hector,** *Rheum. Dis. Clin. N. Am* **2004, 30,** 1-18.
- [177] **J. A. Barreto, W. O' Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, L. Spiccia,** *Adv. Mater.* **2011, 23,** H18-H40.
- [178] **H. Chen, S. Kim, W. He, H. Wang, P. S. Low, K. Park, J. X. Cheng,** *Langmuir* **2008, 24,** 5213-5217.
- [179] **A. E. Felber, B. Castagner, M. Elsabahy, G. F. Deleavey, M. J. Damha, J. C. Leroux,** *J. Controlled Release* **2011, 152,** 159-167.
- [180] **A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, J. P. Benoit,** *J. Biomed. Mater. Res. ,Part A* **2006, 78A,** 620-628.
- [181] **T. G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig,** *Nano Today* **2011, 6,** 176-185.
- [182] **J. Wang, J. D. Byrne, M. E. Napier, J. M. DeSimone,** *Small* **2011, 7,** 1919-1931.

- [183] **F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen**, *Small* **2011**, *7*, 1322-1337.
- [184] **P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil**, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428-437.
- [185] **D. E. Owens III, N. A. Peppas**, *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93-102.
- [186] **D. Bazile, C. Prud'homme, M. T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard**, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 493-498 .
- [187] **R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller**, *Colloids Surf. , B* **2000**, *18*, 301-313.
- [188] **H. Maeda, L. W. Seymour, Y. Miyamoto**, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 351-362.
- [189] **P. P. Adisshaiah, J. B. Hall, S. E. McNeil**, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 99 112.
- [190] **Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel**, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005. **1**(3): p. 193-212
- [191] **Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Al. E.** What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul. Toxicology Pharmacol.* 2007;**49**:217–28.
- [192] **Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, et al.** Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2007;**25**(10):1165–70.
- [193] **Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, et al.** Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part. Fibre Toxicol.* 2011;**8**:10.
- [194] **Li, L.Y., et al.,** *A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-FLK-1 antibody coated Y-90-labeled nanoparticles*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004. **58**(4): p. 1215-1227.

- [195] **Ito, A.**, et al., *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005. **100**(1): p. 1-11.
- [196] **Wust, P.**, et al., *Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - feasibility, tolerance and achieved temperatures*. International Journal of Hyperthermia, 2006. **22**(8): p. 673-685.
- [197] **Wilson, B.C.** and **M.S. Patterson**, *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*. Physics in Medicine and Biology, 2008. **53**(9): p. R61-R109.
- [198] **Kopelman, R.**, et al., *Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **293**(1): p. 404-410.
- [199] [199] **Vargas, A.**, et al., *Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos*. International Journal of **286**(1-2): p. 131-145.
- [200] **Morris MC**. Cancer et nanotechnologie. Innovation en diagnostic, vectorisation et thérapeutique. Rayonnem. du CNRS. 2012;58.
- [201] **Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S**, et al. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. J. Control. Release. 2000;64(1-3):143–53.
- [202] **Naz S, Quadir I, Ali M, Al. E**. Nanotechnology for imaging and drug delivery in cancer. J.Chem.Soc.Pak. 2012;34(1):107–11.
- [203] **Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ**. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. J. Am. Chem. Soc. 2009;131(41):14652–3.
- [204] **Smith L, Kuncic Z, Ostrikov K, Kumar S**. Nanoparticles in cancer imaging and therapy. J.Nanomater. 2012;2012:7.

- [205] Nanobiotix. Nanobiotix reçoit l'autorisation de l'ANSM pour démarrer un nouvel essai clinique avec son produit leader NBTXR3: <http://www.nanobiotix.com/fr/news/release/nanobiotix-recoit-lautorisation-de-lansm-pour-demarrer-un-nouvel-essai-clinique-avec-son-produit-leader-nbtxr3/>).
- [206] **Navedul H, Rafallah R. K, Parvez N, Yadav S, Al. E.** Nanotechnology in Cancer Therapy: A Review. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010;2(161-168).
- [207] **B a n g h a m A D.**, Standish M M., Wa t k i n s J C. (1965). D i f f u s i o n of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, p. 238–252.
- [208] **R. Podlipec and J. Strancar**, Interaction of liposomes on endothelial cells, University of Ljubljana, Slovenia. (2010).
- [209] **M. Brandl**, Liposomes as drug carriers: a technological approach, *Biotechnology annual review.* 7 (2001) 59-85.
- [210] **J. Delattre, P. Couvreur, F. Puisieux, J.-R. Philippot and F. Schuber**, *Les Liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, L. é. INSERM, **1993**, p. 266.
- [211] [231] **C. Tanford**, The Hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes, Wiley.(1980).
- [212] **Verumi S, Rhodes C.T.** Préparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70 (1995) 95-111.
- [213] **Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G.** Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: Studies with poly(ethylene glycol) - coated vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1062 (1991) 77-82.
- [214] **Srinath P, Diwan P.V.** Stealth liposomes, an overview. *Indian Journal of Pharmacology* 26 (1994) 179-184.

- [215] **Zalipsky S.** Polyethylene glycol-lipid conjugates. *in: Lasic D, Martin F. Stealth Liposomes, CRC Press Inc (1995a) 93-102.*
- [216] **Davis FF. (2002)** the origin of peganology. *Advanced Drug Delivery Reviews. 54:* 457-458.
- [217] **Harris JM, Chess RB. (2003)** Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov. 2(3):* 214-21.
- [218] **Stolnik SE, Dunn, M.C. Garnett, M.C. Davies, A.G.A. Coombes, D.C. Taylor, M.P. Irving, S.C. Purkiss, T.F. Tadros, S.S. Davis and L. Illum. (1994)** Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm. Res. 11:* 1800-08.
- [219] **Owens DE, Peppas NA. (2006)** Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm. 307(1):* 93-102.
- [220] **Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, Deliconstantinos G, Rigatos S, Darli E, Viliotou V, Stathopoulos JG. (2005)** Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. *Oncol Rep. 13(4):* 589-95.
- [221] **Hong RL, Huang CJ, Tseng YL, Pang VF, Chen ST, Liu JJ, Chang FH. (1999)** Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin Cancer Res. 5(11):* 3645-52.
- [222] **Martin F.J.,** Stealth Liposome technology: an overview. Doxil Clinical Series. 1996; v.1, n° 1 : 1-8.
- [223] **Barbet J.** Immunoliposomes. *In: Liposomes, New systems and new trend in their applications; Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet J-P. Editions de Santé (1995) 159-191.*
- [224] **Storm G, Crommelin D.J.A.** Liposomes : Quo vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today 1 (1998) 19-31.*

- [225] **Woodle M.C.** Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 249-265.
- [226] **Kirby C. and Gregoriadis G.** "Liposomes". The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. Ed E Mathiowitz, 1999.
- [227] New R.R.C., Liposomes - A practical approach. ed. **Rickwood D., Hames B.M.** (1990), New York: IRL Press, Oxford University Press.
- [228] **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.
- [229] **Scherphof GL.** In vivo behavior of liposomes: Interactions with the mononuclear phagocyte system and implications for drug targeting. In: Juliano RL, ed. Targeted Drug Delivery. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1991:285-327.
- [230] **Patel HM, Russell NJ.** Liposomes: from membrane model to therapeutic applications. Introductory remarks. *Biochem Soc Trans* 1988;16:909-10.
- [231] **Desmukh DS, Bear WD, Brockerhoff H.** Can intact liposomes be adsorbed in the gut? *Life Sci* 1981;28:239-42.
- [232] **Omri A, Beaulac C, Bouhajib M, Montplaisir S, Sharkawi M, Lagacé J.** Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1090-5.
- [233] **Padmanabhan RV, Gudapaty R, Liener IE, Schwartz BA, Hoidal JR.** Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:164-7.
- [234] **Liu FY, Shao Z, Kildsig D, Mitra AK.** Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm Res* 1993;10:228-32.

- [235] **Taylor KMG, Farr SJ.** Liposomes for drug delivery to the respiratory tract. *Drug Dev Ind Pharm* 1993;19:123-42.
- [236] **Gregoriadis G.** Overview of liposomes. *J Antimicrob Chemother* 1991;28(Suppl B):39-48.
- [237] **Harashima H, Kiwada H.** Liposomal targeting and drug delivery:kinetic consideration. *Adv Drug Del Rev* 1996;19:425-44.
- [238] [258] **Gregoriadis G.** Liposomes for drugs and vaccines. *Trends Biotechnol* 1985;3:235-41.
- [239] **Roerdink F, Dijkstra J, Hartman G, Bolscher B, Scherphof G.** The involvement of parenchymal, Kupffer and endothelial liver cells in hepatic uptake of intravenously injected liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1981;677:79-89.
- [240] **Taylor KMG, Newton JM.** Liposomes as a vehicle for drug delivery. *Br J Hosp Med* 1994;51:55-60.
- [241] **Patel H.M.** Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 n°1 (1992) 39-90.*
- [242] **Bonte F, Juliano R.L.** Interactions of liposomes with serum proteins.*Chemistry and Physics of Lipids 40 (1986) 359-372.*
- [243] **Liu D.** Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver. *AdvancedDrug Delivery Reviews 24 (1997) 201-213).*
- [244] **Gregoriadis G, Meehan A.** Interaction of antibody – bearing small unilamellar liposomes with antigen – coated cells . *Journal of Biochemistry 200 (1981) 211-216.*
- [245] **Weinstein J.N, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R, Hugins W.A.** Liposome-cell interaction : Transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science 195 (1977) 489-492.*

- [246] **Szoka F.C, Jacobson K, Papahadjopoulos D.** The use of aqueous markers to determine the mechanism of interaction between phospholipid vesicles and cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 551 (1989) 295-303.
- [247] **Hwang K.J, Padki M.M, Chow D.D, Essien H.E, Lai J.Y, Beaumier P.L.** Uptake of small liposomes by non - reticuloendothelial tissues. *Biochimica and Biophysica Acta* 901 (1987) 88-96.
- [248] **Gabizon A, Goren D, Horowitz A.T, Tzemach D, Lossos A, Siegal T.** Long – circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy : a review of biodistribution studies in tumor – bearing animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 337-344.
- [249] <http://www.univ-montp1.fr> d’après Devoisselle et Soulié-Bégu, 2001.
- [250] **Chiannikulchai N., Ammoury N., Caillou B., Devissaguet J.P., Couvreur P.** (1990). Hepatic tissue distribution of doxorubicinloaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol* 26 : 122-126.
- [251] **Barraud L., Merle P., Soma E., Lefrançois L., Guerret S., Chevallier M., Dubernet C., Couvreur P., Trépo C., Vitvitski L.** (2005). Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Hepathology*,42 : 736-743.
- [252] Monographies de Ambisome", Abelcel", Viraferonpeg", Pegasys", DaunoXome", Depocyte", Myocel", Caelyx", Oncaspa", Neulasta" et Somavert".
- [253] Dictionnaire Vidal et site [www.vidalpro.net](http://www.vidalpro.net).
- [254] Doxorubicine liposomale (Myocel"), La Revue Prescrire. 2003 ; 23 (236) : 99-101.
- [255] **Gabizon A., Catane R. and aI.,** Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Research*. 1994; 15: 987-992.

- [256] Doxorubicine liposomale (Caelyx"). La Revue Prescrire. 2001 ; 21 (221) : 658-659.]
- [257] **Allen TM.** Interactions of liposomes and other drug carriers with the mononuclear phagocyte system. In Gregoriadis G, ed. *Liposomes as Drug Carriers*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988:37-50.
- [258] **Mantovani P, Pepeu G, Amaducci L.** Investigations into the relationship between phospholipids and brain acetylcholine. *Adv Exp Med Biol* 1976;72:285-92.
- [259] **Toffano G, Leon A, Mazzari S, Savioni G, Teolato S, Orlando P.** Modification of noradrenergic hypothalamic system in rat injected with phosphatidylserine liposomes. *Life Sci* 1978;23:1093-102.
- [260] **Zbinden G, Wunderli-Allenspach H, Grimm L.** Assessment of thrombogenic potential of liposomes. *Toxicology* 1989;54:273-80.
- [261] **Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA, Moretti ES.** Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents. *J Lab Clin Med* 1974;83:640-5.
- [262] **Allen TM, Murray L, MacKeigan S, Shah M.** Chronic liposome administration in mice: effects on reticuloendothelial function and tissue distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;229:267-75.
- [263] [283] **Sculier JP, Coune A, Meunier F, et al.** Pilot study of amphotericin B entrapped in sonicated liposomes in cancer patients with fungal infections. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:527-38.
- [264] **Sugisaki, K.; Usui, T.; Nishiyama, N.; Jang, W. D.; Yanagi, Y.; Yamagami, S.;Amano, S.; Kataoka, K.,** Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **2008**, 49 (3), 894-899.
- [265] **Ochsner, M.,** Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, 39 (1), 1-18.

- [266] **T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng**, Photodynamic therapy, *J Natl Cancer Inst* 90 (1998) 889-905.
- [267] **M.J. Davies**, Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen, *Photochem Photobiol Sci* 3 (2004) 17-25.
- [268] **I.E. Kochevar, M.C. Lynch, S. Zhuang, C.R. Lambert**, Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells, *Photochem Photobiol* 72 (2000) 548-553.
- [269] **Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I.**, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology* **2004**, 5 (8), 497-508.
- [270] **Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R.**, Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, 2 (2), 91-106.
- [271] **Wyld, L.; Reed, M. W. R.; Brown, N. J.**, Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *British Journal of Cancer* **2001**, 84 (10), 1384-1386.
- [272] **Parkin, D. M.**, The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer* **2006**, 118 (12), 3030-3044.
- [273] **Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R.**, The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and Therapeutics* **2001**, 92 (1), 57-70
- [274] **Bratton, S. B.; Walker, G.; Srinivasula, S. M.; Sun, X. M.; Butterworth, M.; Alnemri, E. S.; Cohen, G. M.**, Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO Journal* **2001**, 20 (5), 998-1009.
- [275] **Green, D. R.**, Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell* **2005**, 121 (5), 671-674.

- [276] **Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E.**, Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**, *359* (6398),843-845.
- [277] **Folkman, J.; Shing, Y.**, Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (16),10931-10934
- [278] **Abels, C.**, Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical and Photobiological Sciences* **2004**, *3* (8), 765-771.
- [279] **Casas, A.; Venosa, G. D.; Vanzulli, S.; Perotti, C.; Mamome, L.; Rodriguez, L.; Simian, M.; Juarranz, A.; Pontiggia, O.; Hasan, T.; Battle, A.**, Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Letters* **2008**, *271* (2), 342-351.
- [280] **Korbelik, M.; Parkins, C. S.; Shibuya, H.; Cecic, I.; Stratford, M. R. L.; Chaplin, D. J.**, Nitric oxide production by tumour tissue: Impact on the response to photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* **2000**, *82* (11), 1835-1843.
- [281] **Henderson, B. W.; Dougherty, T. J.**, How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *55* (1), 145-157.
- [282] **A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, A.T. Byrne**, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* *85* (2009) 1053-1074.
- [283] **R.L. Lipson, E.J. Baldes**, The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative, *Arch Dermatol* *82* (1960) 508-516.
- [284] **T.J. Dougherty, T.S. Mang**, Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component, *Photochem Photobiol* *46* (1987) 67-70.
- [285] **Rosenberg, S. A.**, A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* **1999**, *10* (3), 281-287.

- [286] **Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.;Guillemin, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M.**, The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *40* (11), 1111-1122.
- [287] **Mathupala, S. P.; Rempel, A.; Pedersen, P. L.**, Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: A remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for Type II hexokinase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **1997**, *29* (4), 339-443.
- [288] **Csik, G.; Balog, E.; Voszka, I.; Tölgyesi, F.; Oulmi, D.; Maillard, P.; Momenteau, M.**,Glycosylated derivatives of tetraphenyl porphyrin: Photophysical characterization, selfaggregation and membrane binding. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, *44* (3), 216-224.
- [289] **Zhang, M.; Zhang, Z.; Blessington, D.; Li, H.; Busch, T. M.; Madrak, V.; Miles, J.; Chance, B.; Glickson, J. D.; Zheng, G.**, Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: A new photosensitizer targeting glucose transporters. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (4), 709-714.
- [290] **Fong, L.; Hou, Y.; Rivas, A.; Benike, C.; Yuen, A.; Fisher, G. A.; Davis, M. M.;Engleman, E. G.**, Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98* (15), 8809-8814.
- [291] **Leamon, C. P.; Reddy, J. A.**, Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (8), 1127-1141.
- [292] **Solban, N.; Rizvi, I.; Hasan, T.**, Targeted photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, *38* (5), 522-531.
- [293] **F. Postigo, M. Mora, M.A. De Madariaga, S. Nonell, M.L. Sagrista**, Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements, *Int J Pharm* **278** (2004) 239-254.

- [294] **A.M. Garcia, E. Alarcon, M. Munoz, J.C. Scaiano, A.M. Edwards, E. Lissi**, Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes, *Photochem Photobiol Sci* 10 (2011) 507-514.
- [295] **T. Kosobe, E. Moriyama, Y. Tokuoka, N. Kawashima**, Size and surface charge effect of 5-aminolevulinic acid-containing liposomes on photodynamic therapy for cultivated cancer cells, *Drug Dev Ind Pharm* 31 (2005) 623-629.
- [296] **M. Nisnevitch, F. Nakonechny, Y. Nitzan**, Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers, *Bioorg Khim* 36 (2010) 396-402.
- [297] **C.S. Jin, G. Zheng**, Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery, *Lasers Surg Med* 43 (2011) 734-748.
- [298] **E.A. Leite, A.M. Lana, A.D. Junior, L.G. Coelho, M.C. De Oliveira**, Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice, *J Biomed Nanotechnol* 8 (2012) 229-239.
- [299] **G.J. Charrois, T.M. Allen**, Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity, *Biochim Biophys Acta* 1609 (2003) 102-108.
- [300] **T.L. Andresen, D.H. Thompson, T. Kaasgaard**, Enzyme-triggered nanomedicine: drug release strategies in cancer therapy, *Mol Membr Biol* 27 (2010) 353-363.
- [301] **A. Yavlovich, B. Smith, K. Gupta, R. Blumenthal, A. Puri**, Light-sensitive lipid-based nanoparticles for drug delivery: design principles and future considerations for biological applications, *Mol Membr Biol* 27 (2010) 364-381.
- [302] **L.A. Tai, Y.C. Wang, C.S. Yang**, Heat-activated sustaining nitric oxide release from zwitterionic diazeniumdiolate loaded in thermo-sensitive liposomes, *Nitric Oxide* 23 (2010) 60-64.

- [303] **S.L. Gosangari, K.L. Watkin**, Enhanced release of anticancer agents from nanoliposomes in response to diagnostic ultrasound energy levels, *Pharm Dev Technol* 17 (2012) 383-388.
- [304] **A.R. Tall, I. Tabas, K.J. Williams**, Lipoprotein-liposome interactions, *Methods Enzymol* 128 (1986) 647-657.
- [305] **T. Ishida, H. Harashima, H. Kiwada**, Liposome clearance, *Biosci Rep* 22 (2002) 197-224.

## *Serment de Galien*

*Je jure en présence des maîtres de cette faculté :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

## قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

### أقسم بالله العظيم

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوماً وفيًا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزول مهنتي بوزع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو احتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

والله على ما أقول شهيد

جامعة محمد الخامس - الرباط  
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 01

سنة: 2015

## أنظمة توجيه الجسيمات متناهية الصغر ومكانة الجسيمات الشحمية في علاج السرطان

### أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم: .....

من طرفه

الآنسة: هند ناجي

المزدادة في: 22 يوليوز 1990 بالرباط

### لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: السرطان - أنظمة التوجيه - جسيمات متناهية الصغر - جسيمات شحمية.

#### تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد: ميمون زوهدي  
أستاذ في علم الأحياء الدقيقة  
السيد: عبد القادر لعتريس  
أستاذ في الصيدلة الغالينية  
السيدة: سعيدة طلال  
أستاذة في الكيمياء الحيوية  
السيدة: سكينه الحمزاوي  
أستاذة في علم الأحياء الدقيقة  
السيد: عبد القادر بلمكي  
أستاذ في علم الدم