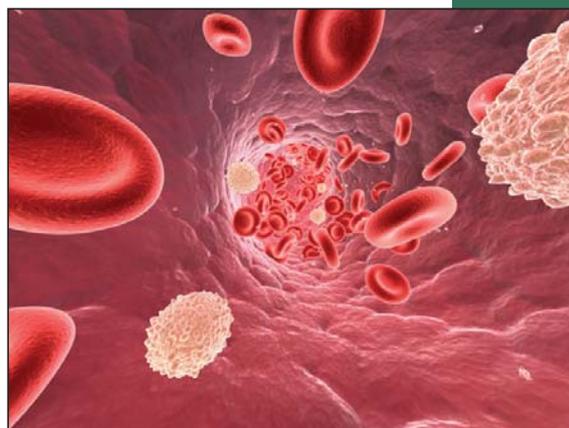


Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères

Lors de l'introduction d'un médicament dans l'organisme, le principe actif rencontre des barrières naturelles qui peuvent limiter son efficacité (Figure 1). C'est ainsi que de nombreuses molécules peinent à traverser les membranes cellulaires, car elles sont trop hydrophiles ou ont un poids moléculaire trop élevé. Cela pose problème lorsque la cible du médicament se trouve à l'intérieur de la cellule. D'autres molécules, en particulier celles issues de biotechnologies, (peptides, fragments d'ADN...) sont très instables en milieu biologique car elles sont rapidement métabolisées par l'organisme, armé de ses enzymes et de nombreux systèmes de défense (anticorps...). Par ailleurs, lors de son administration, un médicament est distribué au niveau des différents tissus et cellules en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, lesquelles ne sont pas toujours maîtrisées. Au lieu d'exercer sa fonction thérapeutique de manière ciblée, le médicament peut produire des effets toxiques

imprévus, ce qui limite son **index thérapeutique** (avec pour conséquence une activité faible ou insuffisante et une toxicité plus importante). Enfin, on observe de plus en plus de phénomènes de résistance, en particulier envers de nouvelles molécules, qui sont parfois trop spécifiques vis-à-vis d'une voie de signalisation.

Ainsi, un médicament administré sous une forme **galénique** traditionnelle se heurte à de multiples barrières physiologiques ; et il n'est pas garanti qu'il atteigne bien sa cible. Pour pallier à ces difficultés, une nouvelle approche consiste à associer le principe actif à un **nanovecteur**, dont la taille est de l'ordre de la



Patrick couvreur Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères

Figure 1

Lorsqu'un médicament est administré, il entre dans la circulation sanguine et doit atteindre les tissus visés pour exercer son action thérapeutique : un parcours du combattant !

centaine de nanomètres (soit dix à cent fois plus petit qu'une cellule vivante), et dont le rôle est d'**encapsuler et de véhiculer** efficacement ce principe actif vers sa cible (**Figure 2**). À cette fin, la chimie va pouvoir user de sa créativité pour équiper les nanovecteurs d'un certain nombre de fonctionnalités, à l'aide de traitements chimiques de leur surface.

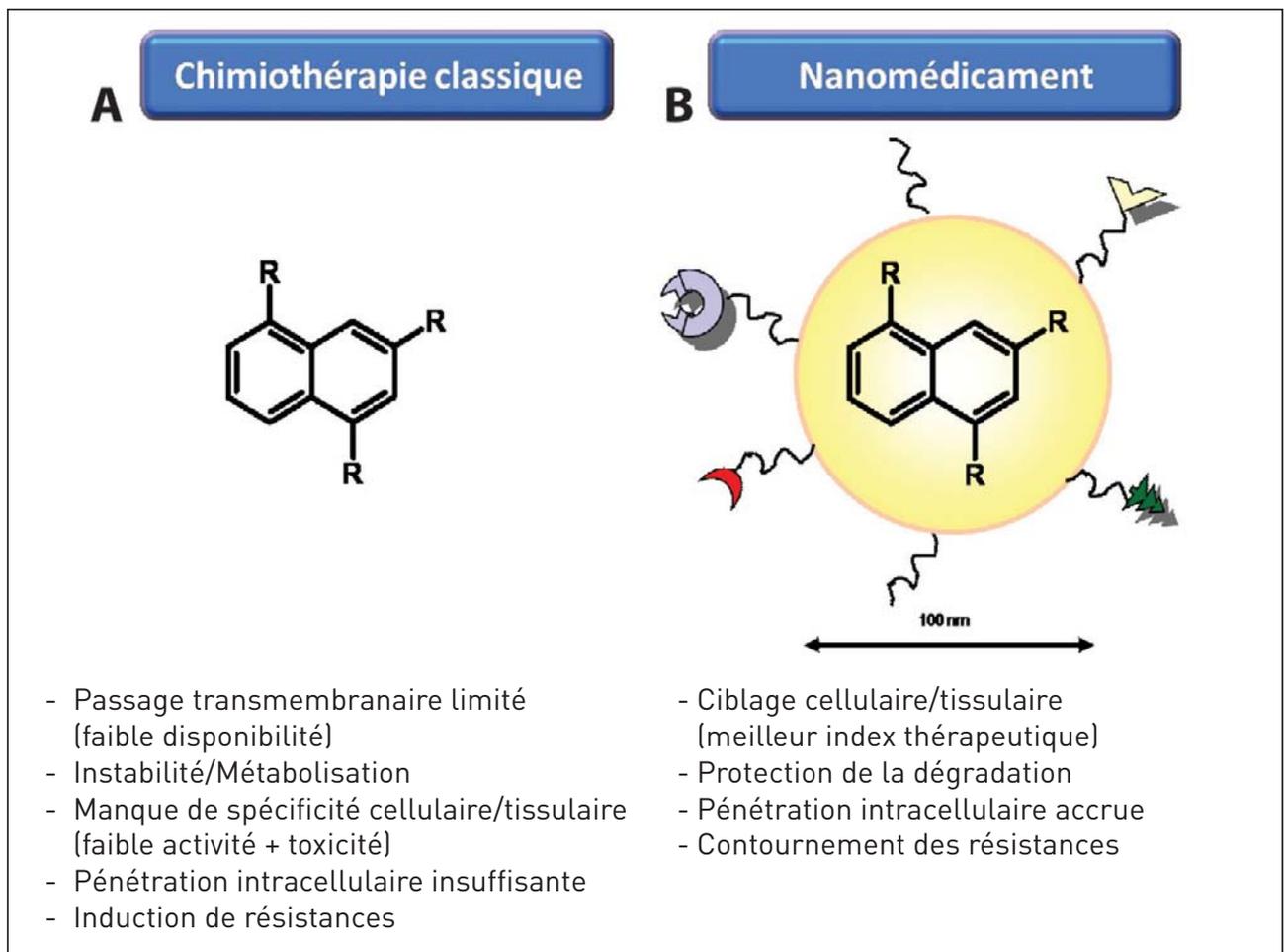
cipés actifs de la dégradation, dans le cas où ils y sont sensibles. D'autre part, elle peut permettre d'**améliorer le ciblage**, soit au niveau tissulaire, soit au niveau cellulaire. Ce dernier cas peut être favorisé grâce à la fonctionnalisation chimique de la surface des nanovecteurs, ou tout simplement parce qu'ils seront captés dans les cellules *via* des mécanismes d'**endocytose**. Ils pourront ainsi pénétrer dans les cellules et y concentrer les molécules de principe actif alors que, seules, celles-ci ne s'y accumuleraient pas spontanément. Enfin, il est possible d'utiliser cette approche de la vectorisation pour **contourner des résistances aux médicaments**.

Figure 2

Des nanovecteurs pour encapsuler les médicaments...
 A. Un principe actif libre ;
 B. Ce principe actif est encapsulé dans un nanovecteur équipé de fonctionnalités : c'est un nanomédicament.

Dans l'objectif d'améliorer l'efficacité des médicaments, on utilise des nanovecteurs pour encapsuler les principes actifs et les véhiculer vers leurs cibles.

D'une part, l'encapsulation permet de **protéger les prin-**



Nous allons montrer au travers d'exemples dans le cadre de la lutte contre le cancer et de la thérapie génique, comment il est possible d'améliorer l'activité, voire de réduire la toxicité des molécules, lorsqu'elles sont transportées et vectorisées sous forme de *nanomédicaments*.

1 Nanomédicaments et cancer

1.1. Les nanomédicaments de première génération pour mieux traiter le cancer du foie

1.1.1. Améliorer l'efficacité et diminuer la toxicité du médicament

À l'heure actuelle, on dispose d'un arsenal relativement vaste de nanovecteurs pour administrer des médicaments : liposomes, nanoparticules polymères, nanoparticules sous forme d'oxyde de fer, micelles, etc. Tous ces vecteurs n'ayant subi aucune modification chimique de leur surface sont qualifiés de **vecteurs de première génération (Figure 3)**.

On observe que lors de leur administration par voie intraveineuse à un animal, ces vecteurs de première

génération 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 les nanovecteurs : cela explique pourquoi les nanovecteurs de première génération se concentrent rapidement au niveau hépatique.

Les nanovecteurs de première génération se retrouvent principalement au niveau du foie, car ils sont reconnus par ses macrophages grâce aux opsonines qui s'adsorbent à leur surface.

Bien que cela puisse être considéré comme un inconvénient, on peut aussi en tirer avantage. En effet, ces systèmes constituent

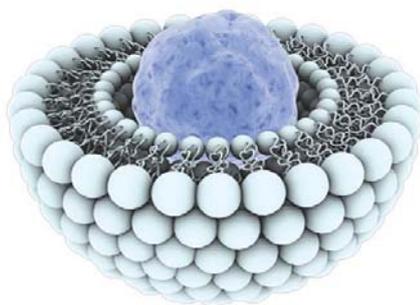
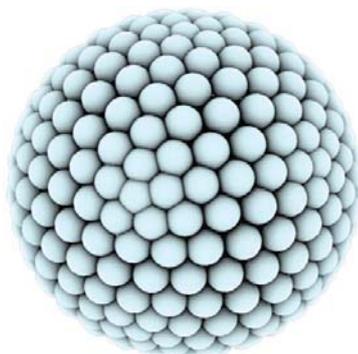


Figure 3

Liposome simple, vecteur de médicament de première génération, dont la cible principale est le système réticulo-endothélial. Le liposome est une vésicule biodégradable constituée d'une double couche de phospholipides et d'un compartiment aqueux. Le principe actif est encapsulé dans la phase aqueuse quand il est hydrophile et dans la bicouche quand il est lipophile. La structure phospholipidique du liposome est proche de celle de la membrane de la cellule : on dit qu'il est biomimétique. Un liposome est environ 70 fois plus petit qu'un globule rouge. Sa taille varie entre 100 et 300 nm.

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'une nanomatrice conçue à partir d'un polymère, le poly(alkylcyanoacrylate) (sa synthèse est présentée **Figure 4A**). Ce polymère, déjà largement utilisé comme colle chirurgicale¹, 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 (**Figure 4C**) [1]. 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

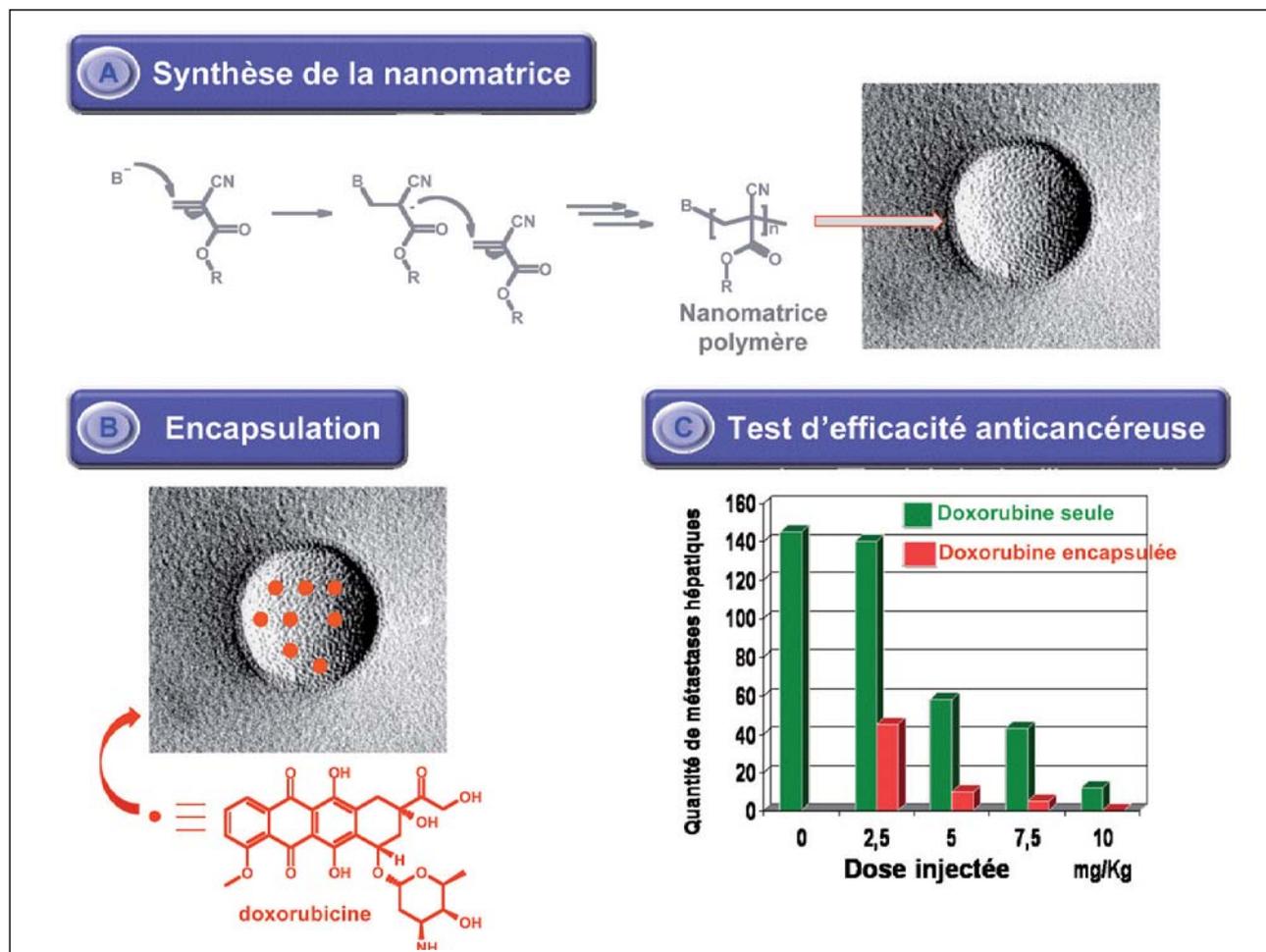
meurent, non pas de leur tumeur, mais de la toxicité cardiaque du produit. On retrouve ici tout le problème du traitement du cancer par de petites molécules : la « fenêtre de tir » est extrêmement étroite entre la dose pharmacologiquement active et la dose toxique. En revanche, si l'on encapsule la doxorubicine (**Figure 4B**), 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.

C'est ainsi qu'un nanomédicament de première génération à base de doxorubicine est entré fin 2006 en phase II/III d'essais cliniques pour le traitement du cancer primitif du foie.

1.1.2. Réduire la résistance aux médicaments

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

1. Une colle chirurgicale est un adhésif tissulaire possédant des propriétés hémostatiques, qui peut réduire le nombre de points de sutures.



résistance multidrogue². 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 « detoxifie » (Figure 5).

Le raisonnement consiste alors à se dire que, si l'on enrobe ce médicament anticancéreux dans une nanomatrice 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.

En collaboration avec le laboratoire de C. Trépo (INSERM, Lyon), nous avons montré l'efficacité de cette approche dans un hépatocarcinome humain présentant la résistance multidrogue. Lorsque ces cellules cancéreuses ont été incubées avec des concentrations croissantes de doxorubicine seule, pratiquement

Figure 4

A. Une nanoparticule de poly(alkylcyanoacrylate) est préparée par polymérisation anionique.

B. Cette nanoparticule est utilisée comme nanomatrice pour vectoriser la doxorubicine vers les métastases du foie.

C. On constate que l'efficacité du traitement avec un tel nanovecteur (en rouge) est améliorée par rapport à un traitement à la doxorubicine seule (en vert).

2. La résistance multidrogue présentée par des cellules cancéreuses est une résistance dont le mécanisme n'est pas spécifique à un médicament donné.

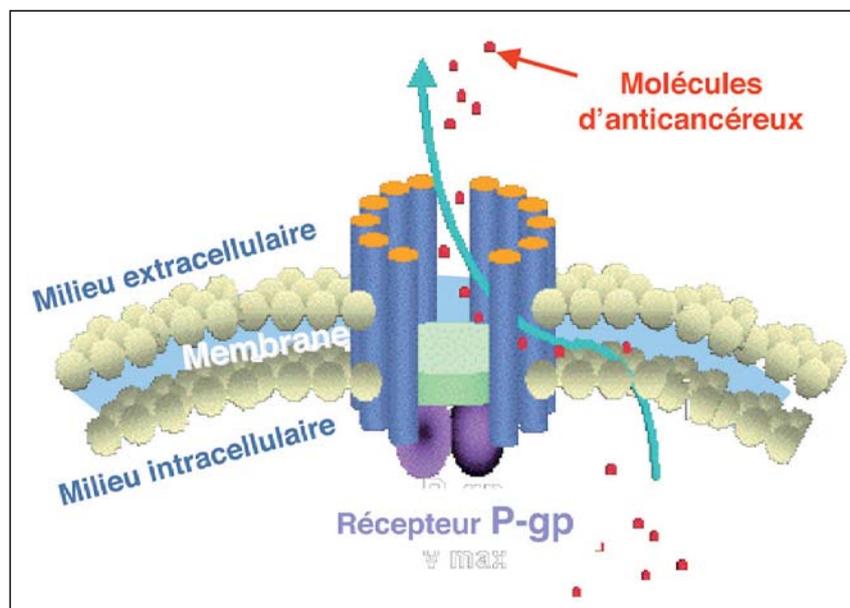


Figure 5

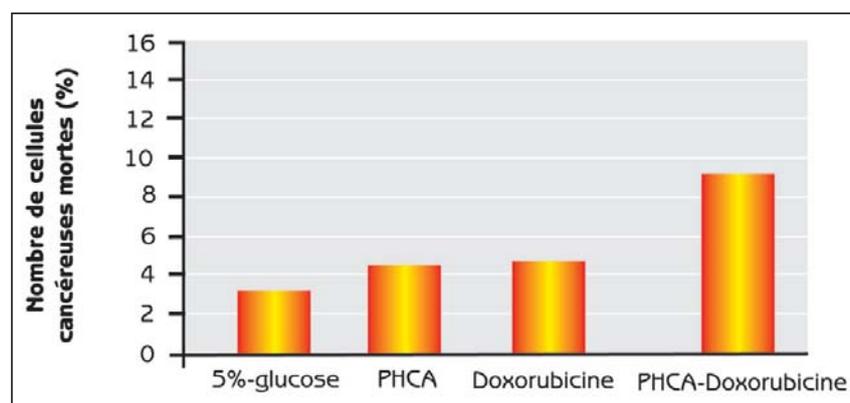
Quand une cellule cancéreuse résiste aux anticancéreux qu'on lui a injectés. Ici, la cellule cancéreuse possède dans sa membrane une glycoprotéine P-gp qui expulse le médicament anticancéreux vers l'extérieur. Il s'agit d'un mécanisme de défense naturelle des cellules cancéreuses.

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 [2]. Les mesures (Figure 6) ont montré que seules les nanoparticules 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 6

Résultat des tests menés *in vivo* sur des souris transgéniques porteuses d'un hépatocarcinome multirésistant. Le nombre de cellules cancéreuses a été mesuré par comptage histologique [d'après [2]].



Ces exemples montrent que les nanomédicaments peuvent, dans certaines circonstances, permettre de contourner des mécanismes de résistance naturelle des cellules aux médicaments.

Néanmoins, les résultats précédents ne concernent que des pathologies tumorales localisées dans le foie. Il est donc intéressant de savoir si l'activité anticancéreuse peut être étendue à d'autres organes.

1.2. Contourner les défenses du foie pour cibler d'autres organes : les nanovecteurs de deuxième génération

Comme expliqué précédemment, les opsonines qui viennent se fixer sur la surface des nanovecteurs 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 nanovecteurs dits de **deuxième génération**. Ils sont également dits « furtifs » car ils ne sont pas reconnus par le foie (plus précisément par les cellules de Kupffer du système réticulo-endothélial) et ne vont pas s'y concentrer.

Afin de véhiculer des médicaments vers d'autres organes que le foie, un nanovecteur a été développé à partir du polymère biodégradable précédemment utilisé pour

les nanovecteurs de première génération, mais auquel ont été greffées des chaînes de polyéthylène glycol PEG (**Figure 7A**). On obtient ainsi un nanovecteur de deuxième génération dit « PEGylé » (**Figure 7B**).

Les nanovecteurs de deuxième génération ne sont pas reconnus par le foie et peuvent circuler plus longtemps dans le sang pour atteindre d'autres organes.

Au cours d'expériences comparatives, on observe qu'après injection intraveineuse de nanoparticules non PEGylées, celles-ci disparaissent de façon extrêmement rapide et massive du compartiment sanguin : elles sont captées par le foie. Au contraire, les nanoparticules PEGylées 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 (**Figure 7C**). 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 aux nanoparticules 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. Cet effet est appelé effet EPR (« *enhanced permeability and retention effect* ») [3]. 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 (**Figure 7D**).

L'effet « EPR » a par exemple été observé dans le cas du cancer du cerveau chez le rat, (**gliome** cérébral 9L). Lorsque l'on introduit des nanoparticules PEGylées 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 nanomédicaments 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.

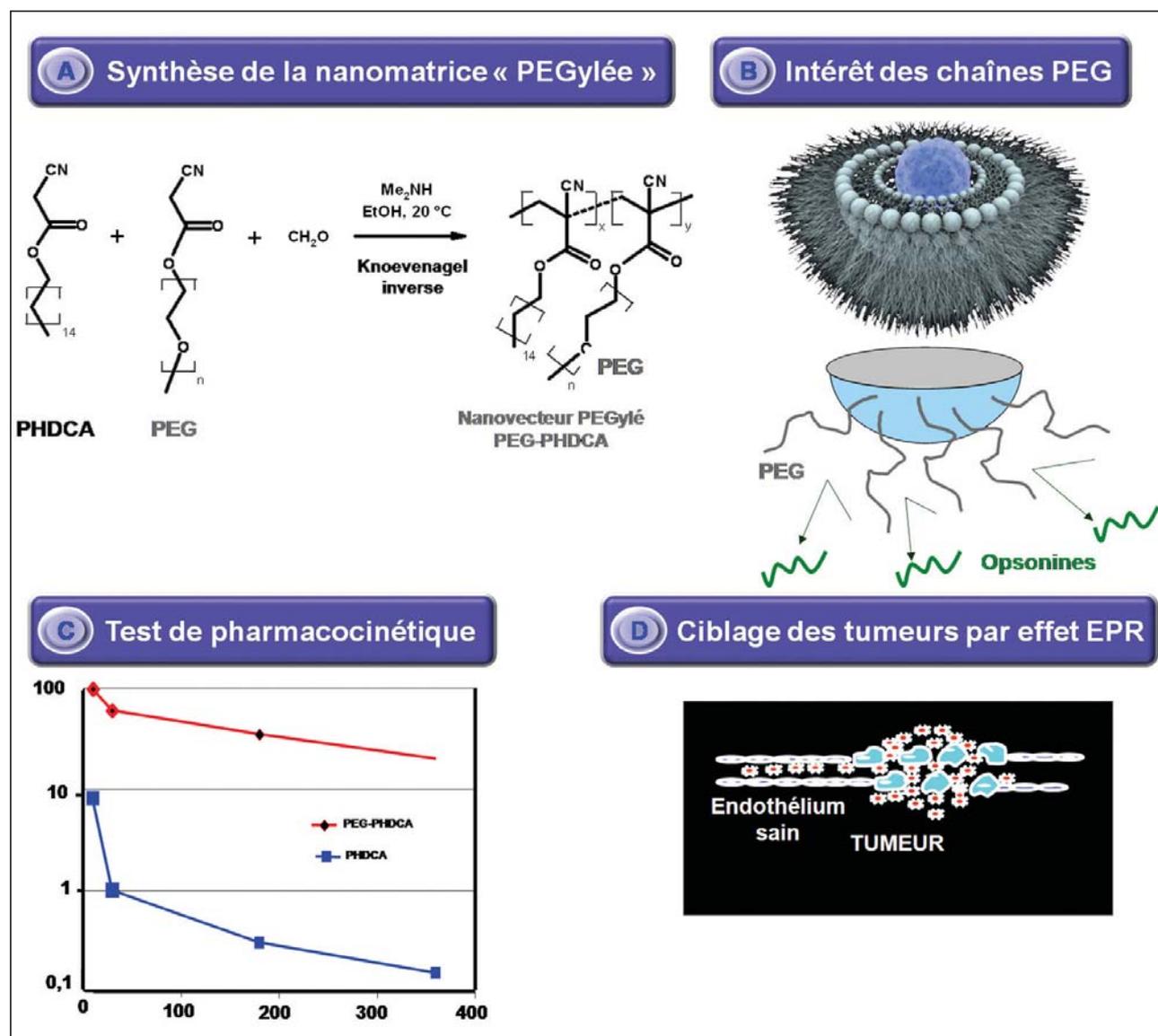


Figure 7

- A. À partir du polymère biodégradable poly(hexadecylcyanoacétate) (PHDCA), un copolymère a été développé par copolymérisation avec du poly(éthylène glycolcyanoacétate) en présence de formol, grâce à une réaction de Knoevenagel inverse.
- B. On obtient ainsi un copolymère amphiphile qui, placé dans l'eau, s'auto-organise avec les parties hydrophiles de polyéthylène glycol (PEG) en surface du vecteur, la partie hydrophobe à l'intérieur étant formée des chaînes de PHDCA et dans laquelle il est possible de piéger le médicament. © CNRS Photothèque/Sagascience/Caillaud François. UMR8612 – Physico-chimie, pharmacotechnie, Biopharmacie – Châtenay-Malabry.
- C. Le copolymère PEG-PHDCA (courbe rouge) reste plus longtemps dans la circulation sanguine par rapport aux nanoparticules non « PEGylées » (courbe bleue).
- D. L'effet « EPR » : au niveau des vaisseaux sanguins sains, le nanovecteur ne peut pas pénétrer, alors qu'au niveau d'une tumeur, la réaction inflammatoire qui s'y est produite augmente la perméabilité du vaisseau, entraînant une concentration du nanovecteur, ciblée au niveau de la tumeur.

Des tests ont été menés sur des animaux atteints par cette maladie et auxquels des nanoparticules PEGylées ont été administrées. On a alors observé leur translocalisation importante et massive au niveau des zones où se localise la réaction inflammatoire, c'est-à-dire la moelle épinière et, dans une

moindre mesure, le **colliculi**, le cortex frontal et le cervelet. En revanche, lorsqu'elles ont été injectées à des animaux sains, aucune pénétration au niveau du tissu cérébral n'a été observée.

Ces résultats témoignent une fois de plus d'un bon ciblage des tissus malades par des

nanovecteurs de deuxième génération grâce à l'effet EPR. 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 nanovecteurs de **troisième génération** ont été conçus afin de pouvoir traverser les membranes cellulaires.

1.3. Pénétrer dans les cellules malades : les nanovecteurs de troisième génération

Un nouveau type de nanovecteurs a été conçu pour pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi de véhiculer les médicaments vers des cibles intracellulaires. Ce sont les **nanovecteurs de troisième génération**. Pour cela, on les équipe 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. À l'heure actuelle, les progrès de la biologie ont permis d'identifier les récepteurs auxquels les nanovecteurs doivent être adressés.

Les nanovecteurs de troisième génération permettent de délivrer des principes actifs à l'intérieur des 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 (**Figure 8B**).

Ce phénomène naturel peut être judicieusement utilisé comme moyen de routage pour permettre à des nanoparticules 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 nanoparticules PEGylées, mais dont les bras PEG ont été fonctionnalisés à leurs extrémités par des amines. Celles-ci peuvent alors être couplées avec la fonction acide carboxylique de l'acide folique, *via* une réaction d'amidation (**Figure 8A**). 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 nanovecteurs qui ont une double fonctionnalité : d'une part, du fait des chaînes de PEG, elles repoussent les protéines plasmatiques (opsonines) et restent dans la circulation vasculaire (comme les nanoparticules de deuxième génération) ; d'autre part, l'acide folique est reconnu

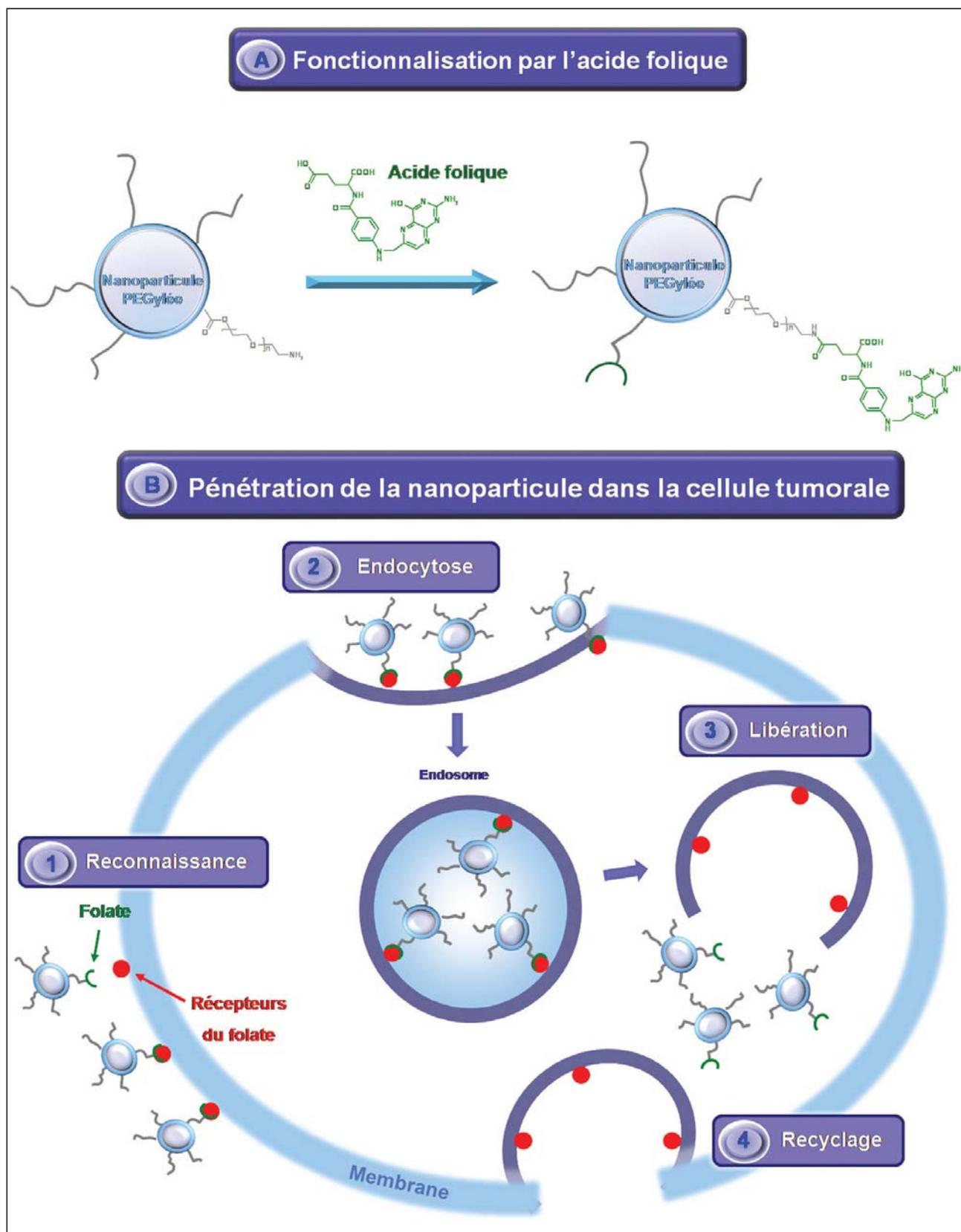


Figure 8

A. Une nanoparticule PEGylée a été fonctionnalisée avec de l'acide folique.
 B. Ainsi dotée d'une « tête chercheuse », la nanoparticule va pouvoir se lier aux récepteurs foliques des membranes tumorales (en rouge), ce qui permet son transfert à l'intérieur de la cellule tumorale via un endosome, qui relargue alors son contenu en principe actif anticancéreux dans le cytoplasme de la cellule.

par le récepteur des cellules tumorales, permettant ainsi le transfert de ces nanovecteurs et de leur contenu dans la cellule, par **endocytose (Figure 8B) [4]**.

2 Nanomédicaments et thérapie génique

2.1. Vectoriser de petits ARN interférents

La thérapie génique au sens large revient à transférer au niveau d'une cellule un gène ou un ADN manquant. Cette technique est très difficile et ne réussira très probablement qu'à long terme. En effet, l'ADN étant une macromolécule, elle doit être bien positionnée par rapport aux pores des noyaux cellulaires pour pouvoir y entrer. Il est avéré qu'avec des **vecteurs non viraux**, quel que soit le moyen utilisé, on ne parvient jamais à intégrer un ADN complet dans le génome de la cellule.

Une approche plus simple et plus facilement réalisable consiste à utiliser de petits fragments, soit des monobrans tels que les oligonucléotides antisens (**voir l'encart « Les ARN interférents : une grande innovation dans la biologie moléculaire » chapitre de C. Giovannangeli**), soit des doubles brins comme les petits ARN interférents ou siRNA³ (« *small interfering*

3. Les siRNA (« **small interfering RNA** ») sont de petits ARN en doubles brins possédant une vingtaine de nucléotides et capables de se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers, de la couper, et ainsi d'empêcher l'expression des gènes qui les engendrent.

RNA »). L'avantage est que la cible de ces molécules, qui est l'ARN messager, ne se situe pas au niveau du noyau, mais au niveau du cytoplasme cellulaire, plus accessible. Cette approche est donc plus facile à mettre au point en utilisant les nanotechnologies.

En thérapie génique, c'est grâce aux nanotechnologies que les chimistes créent des nanovecteurs qui vont agir comme le font les vecteurs viraux pour amener leur matériel (gènes, ARN...) à l'intérieur de la cellule.

L'exemple du carcinome papillaire de la thyroïde (maladie de Tchernobyl) est intéressant car la biologie moléculaire de cette pathologie est bien connue. En effet, on sait que les cellules deviennent cancéreuses en raison de la fusion de deux gènes : le gène *ret* et le gène *H4*. Chez un individu sain, ces deux gènes sont normalement positionnés sur deux chromosomes différents, alors que chez les individus porteurs du carcinome papillaire de la thyroïde, on observe une fusion de ces deux gènes sur un même chromosome. Des expériences réalisées sur des cellules **fibroblastiques** 3T3 (chez la souris) ont montré que l'introduction des gènes fusionnés *ret* et *H4* dans ces modèles de cellules induit la production d'une protéine **chimère**, *ret/PTC1*, responsable de la cancérisation. Dès lors, la jonction entre les deux gènes, appelée « oncogène

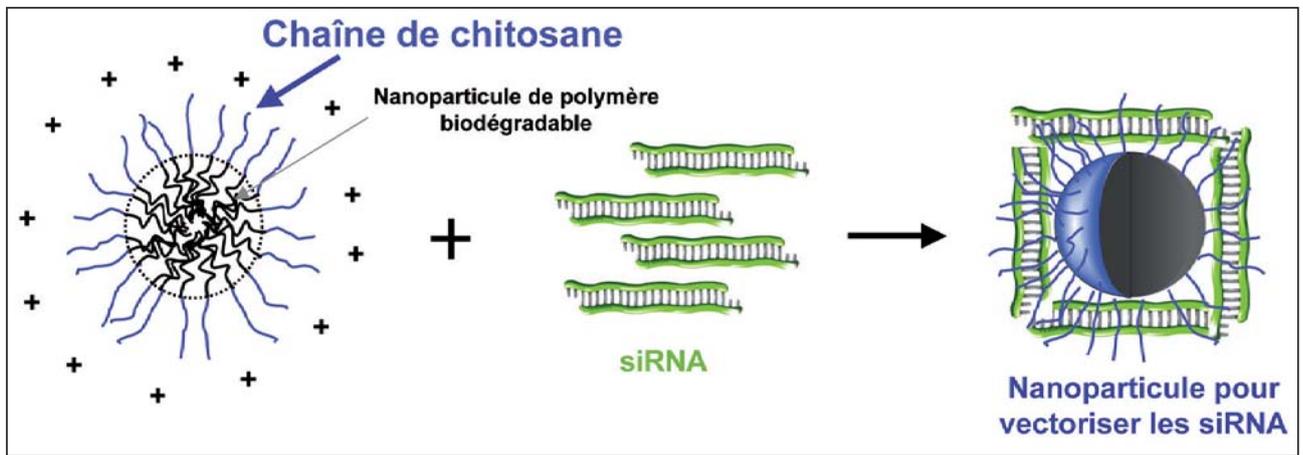


Figure 9

À une nanoparticule de polymère biodégradable ont été greffées des chaînes de chitosane (bleu), portant des charges positives. Ces dernières permettent ensuite de fixer un grand nombre de doubles brins de siRNA (en vert), prêts à être véhiculés vers l'ARN-cible, à l'intérieur d'une cellule.

Figure 10

Schéma de l'oncogène de jonction (la cible) et des siRNA prêts à être injectés dans la cellule.

A. Les gènes *ret* et *H4* présents dans une tumeur (carcinome papillaire de la thyroïde) sont fusionnés. La cible de la thérapie génique est la séquence de jonction entre ces gènes.

B. On a synthétisé un siRNA #5 capable de s'associer à cette séquence de jonction. Rappelons que l'association d'un siARN avec une séquence de gènes s'effectue grâce à l'association de paires de bases complémentaires C-G et A-U

de jonction», est une cible thérapeutique unique pour faire de la vectorisation, soit d'oligonucléotides anti-sens, soit d'ARN interférents comme le siRNA. Pour cela, il est nécessaire de développer des technologies de vectorisation adaptées, et ce, en utilisant les outils de la chimie.

Ainsi il a été développé voici quelques années une technique permettant de recouvrir des nanoparticules de polymères biodégradables (voir les paragraphes 1.1 et 1.2) par tous types de chaînes de polysaccharides. Un exemple choisi pour la vectorisation des siRNA est le chitosane, un polysaccharide naturel

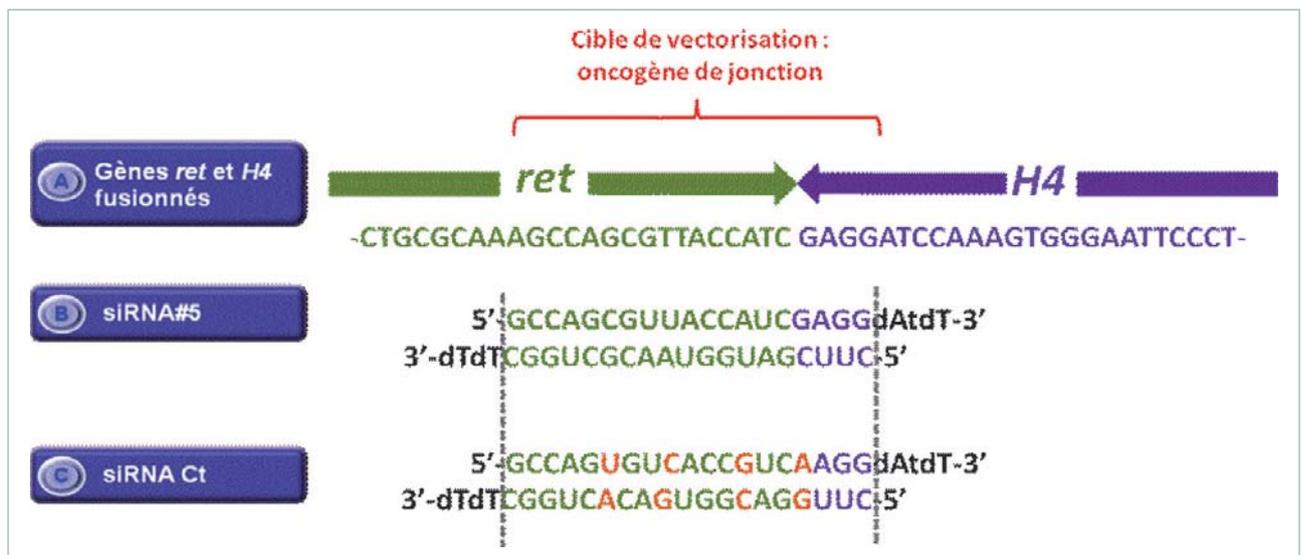
comportant des charges positives, et qui a été utilisé pour synthétiser des nanoparticules de 20 à 100 nanomètres. À ces nouveaux nanovecteurs ont alors été fixées des quantités importantes de siRNA, grâce aux charges positives du chitosane qui forment avec les charges négatives des siRNA des paires d'ions [5] (Figure 9).

Afin de tester l'efficacité de ces nanoparticules de chitosane pour vectoriser des siRNA, des tests ont été effectués sur des cellules tumorales qui ont été greffées à des souris par voie sous-cutanée. Rappelons que la cible de la thérapie est la jonction entre

(l'uracile U étant l'équivalent pour l'ARN de la thymine pour l'ADN).

C. Un siRNA de contrôle a également été synthétisé et ne

peut pas s'associer à la séquence de jonction, car quatre bases (orange) ne peuvent s'apparier à celles de la cible.



les deux gènes *ret* et *H4*, dont les séquences sont données **Figure 10**. Il a été synthétisé à la fois un siRNA (siRNA #5) théoriquement capable de s'associer à l'oncogène de jonction par complémentarité des bases (effet antisens), et un siRNA de contrôle (siRNA Ct), qui possède quatre bases qui ne reconnaissent pas ou ne « collent » pas avec la séquence-cible au niveau de l'oncogène de jonction [5].

L'évolution de la tumeur a ensuite été observée chez les animaux traités par une simple solution de NaCl (0,9 %), et chez ceux ayant reçu cinq injections de siRNA sous forme libre. Il n'a alors été observé aucun effet en termes d'inhibition de la croissance tumorale, bien que ce siRNA soit bien orienté contre la séquence de l'oncogène de jonction. En revanche,

ce même siRNA associé aux nanoparticules de chitosane provoque une inhibition significative de l'évolution de la masse tumorale (**Figure 11A**).

Pour montrer que cette inhibition du cancer est bien due à une reconnaissance de l'oncogène de jonction par siRNA, on a injecté le siRNA contrôle, encapsulé dans le même nanovecteur et, dans ce cas, aucun effet antisens n'a été observé.

Ces résultats mettent en évidence deux conditions requises pour bien toucher la cible avec les siRNA : posséder la bonne séquence de bases dans l'ARN interférent, sans quoi l'action serait nulle ; et avoir une forme galénique qui soit capable de favoriser la pénétration intracellulaire, et surtout de protéger ces ARN interférants de la dégradation...

Figure 11

Le siRNA libre ne permet pas d'inhiber la croissance tumorale (tumeur encore présente chez la souris), alors que vectorisés par les nanoparticules de chitosane, on observe une disparition des masses tumorales. Les analyses des tissus in vivo par gel de Northern-blots montrent que l'injection de siRNA sous forme de nanoparticules permet de retrouver du siRNA intact au niveau de la tumeur après un et deux jours [5].

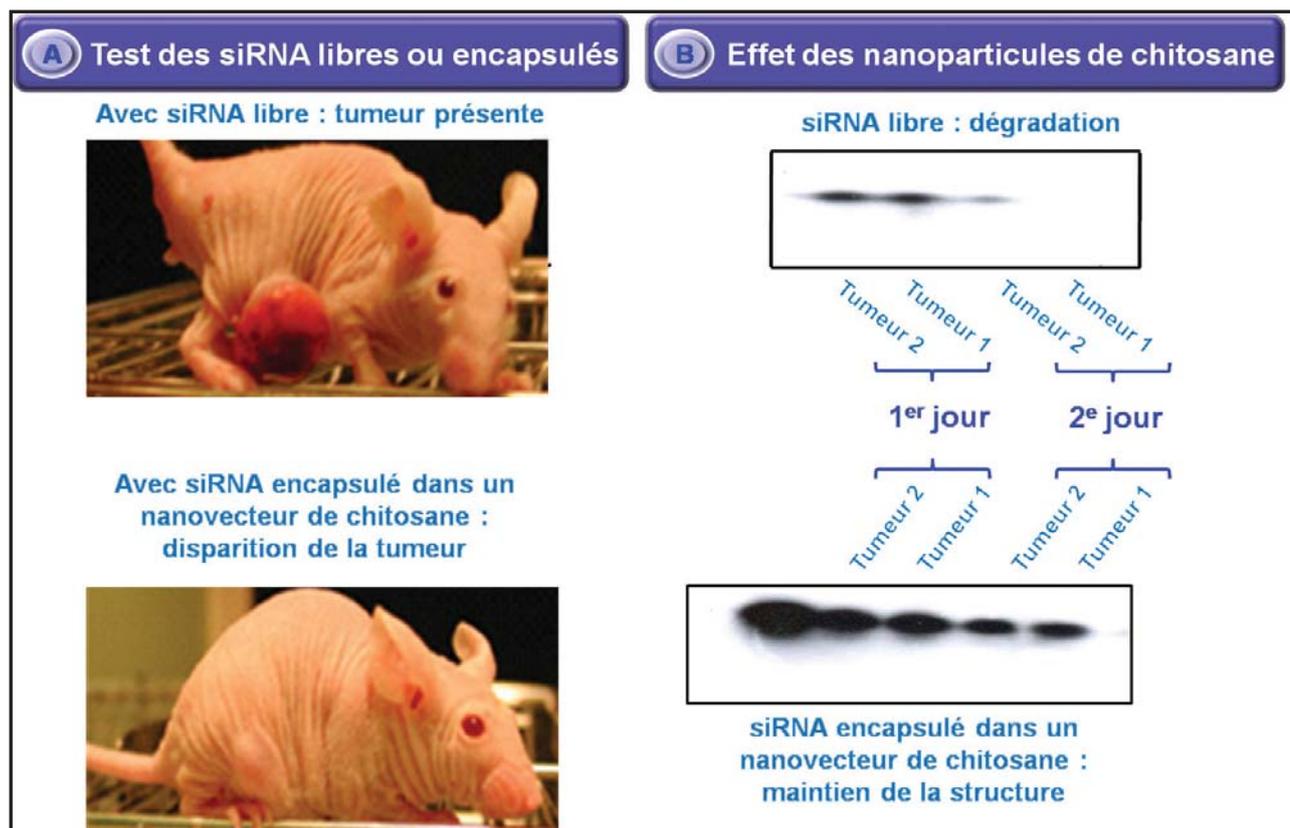
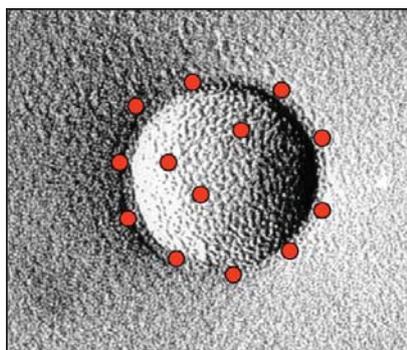


Figure 12

On ne parvient pas toujours à encapsuler la totalité du principe actif (en rouge) dans le nanovecteur : une partie reste adsorbée en surface et sa libération dans l'organisme devient incontrôlée.



En effet, une question importante demeure : ces ARN sont-ils effectivement protégés de la dégradation ? Des biopsies effectuées au niveau des animaux traités par le siRNA libre ou par le siRNA encapsulé ont permis de confirmer cette protection. On voit en effet que la structure du siRNA est maintenue lorsqu'il est vectorisé, à la fois un et deux jours après l'injection, ce qui n'est pas le cas avec le siRNA libre (**Figure 11B**).

Les nombreux exemples décrits montrent que de grands progrès ont été faits au cours de cette dernière décennie dans le développement de nanovecteurs plus efficaces pour l'administration des médicaments : au niveau tissulaire, cellulaire, en contournant les barrières cellulaires, les défenses du foie et les résistances aux médicaments.

2.2. La technologie de vectorisation rencontre des limites

Malgré les grands progrès réalisés, un certain nombre de verrous technologiques très importants demeurent. Si tout se passait comme prévu, le principe actif serait bien piégé à l'intérieur d'une nanoparticule pour être vectorisé. En réalité, une fraction du médicament est effectivement encapsulée, mais une autre, parfois plus importante, va s'adsorber en surface (**Figure 12**). En conséquence, lorsque l'on va administrer cet ensemble par voie intraveineuse, il y aura une libération immédiate et totalement incontrôlée du principe actif.

Un autre inconvénient, probablement plus important, et qui limite d'autant plus les possibilités de ces technologies est le taux de charge. En effet, il est important de pouvoir estimer quel poids de médicament il est possible d'introduire par rapport au poids du vecteur. Bien souvent, il s'avère que la valeur de 8 % est très satisfaisante, alors qu'il est souvent difficile de dépasser les 1 ou 2 %. Cette limitation pose un problème important puisqu'alors, soit la quantité de médicament injectée est insuffisante, et donc l'efficacité est faible, soit il va être nécessaire d'administrer des grandes quantités de matériel vecteur, ce qui provoquera l'apparition d'effets secondaires, en particulier liés à la toxicité par accumulation intracellulaire de matériel polymère.

Un gros travail reste donc à faire par les chimistes, pour développer des nanotechnologies qui résoudront ces deux problèmes, en particulier celui du taux de charge, afin de pouvoir améliorer l'index thérapeutique des médicaments et éventuellement de contourner des phénomènes de résistance.

Dans ce but, de nouvelles nanotechnologies ont été développées récemment pour pallier à ces verrous rencontrés avec les nanovecteurs : c'est la squalénisation.

3 La nanotechnologie de la squalénisation : une révolution

3.1. Des médicaments qui s'auto-organisent en nanoparticules

De nombreuses molécules de la famille des analogues nucléosidiques ont un énorme potentiel, à la fois dans le domaine du cancer (comme la gemcitabine ou la cytarabine), mais aussi dans le traitement de maladies virales comme le VIH (par exemple l'AZT). Pourtant, toutes ces molécules sont rapidement métabolisées et ne restent pas longtemps dans le sang : les taux plasmatiques diminuent rapidement après administration. De plus, elles ont le défaut d'être plus ou moins hydrophiles donc elles diffusent mal à travers les barrières biologiques qui sont hydrophobes, et en particulier à l'intérieur de la cellule où se trouvent justement leurs cibles. Enfin, elles induisent pratiquement toutes des résistances dont les mécanismes sont divers.

L'idée a été de rendre ces molécules lipophiles pour permettre une meilleure pénétration intracellulaire et pour les protéger de la métabolisation par l'organisme (dans le **chapitre de D. Mansuy** est expliqué le mécanisme général de métabolisation des médicaments). Pour cela, elles ont été associées au squalène, un lipide présent en grande quantité dans l'huile du foie des requins, d'où son nom. Précurseur du cholestérol, il existe aussi chez les humains. Son intérêt est que, pour être cyclisé en lanostérol puis en

cholestérol, il doit adopter en milieu aqueux une conformation moléculaire particulièrement ramassée pour rentrer dans la poche hydrophobe de l'enzyme qui va induire sa cyclisation. Ainsi, il a été imaginé qu'en couplant le squalène aux analogues nucléosidiques, il serait possible de former des systèmes nanoparticulaires injectables.

Cela a été réalisé avec la gemcitabine : cet anticancéreux a été associé au squalène, par réaction entre sa fonction amine et l'acide squalénique [6] (**Figure 13**). Le choix de la fonction amine comme site de greffage du squalène n'est pas anodin. On sait en effet que quand elle est administrée seule, la gemcitabine est métabolisée par l'organisme *via* une réaction de désamination qui la transforme en un métabolite totalement inactif. En greffant le squalène au niveau de cette fonction sensible, on protège la gemcitabine de la dégradation, ce qui lui permet de séjourner plus longtemps dans la circulation sanguine.

La molécule résultante, une fois placée dans de l'eau, s'est spontanément auto-organisée en formant des systèmes nanoparticulaires d'une centaine de nanomètres... Et en calculant le poids moléculaire du squalène par rapport à celui de la gemcitabine, on observe que l'on atteint l'équivalent d'un taux de charge non plus de 8 %, mais de 50 %... ce qui revient à encapsuler dans une nanomatrice la moitié de son poids moléculaire en principe actif ; à la différence qu'ici, principe actif et constituant de la nanomatrice

Figure 13

La squalénisation de la gemcitabine : on fait réagir l'anticancéreux gemcitabine avec l'acide squalénique et l'on obtient des molécules de gemcitabine-squalène. Lorsqu'on les met dans l'eau, elles se mettent à s'auto-organiser en colonnes parallèles, où la partie principe actif (gemcitabine) est orientée vers l'intérieur. La « coque » extérieure est constituée par les chaînes de squalène. L'ensemble de ces nanoparticules de 100 à 150 nm de diamètre est observable par microscopie électronique.

(squalène) forment la même molécule !

Suite à ce résultat encourageant, le concept de « squalénisation » a été appliqué à d'autres types d'analogues nucléosidiques que la gemcitabine, et en greffant le squalène à d'autres sites de la molécule. Cela a été réalisé notamment avec l'anti-VIH AZT. Même succès obtenu : on observe des nanoparticules qui se forment d'elles-mêmes, atteignant des diamètres de 100 à 150 nanomètres !

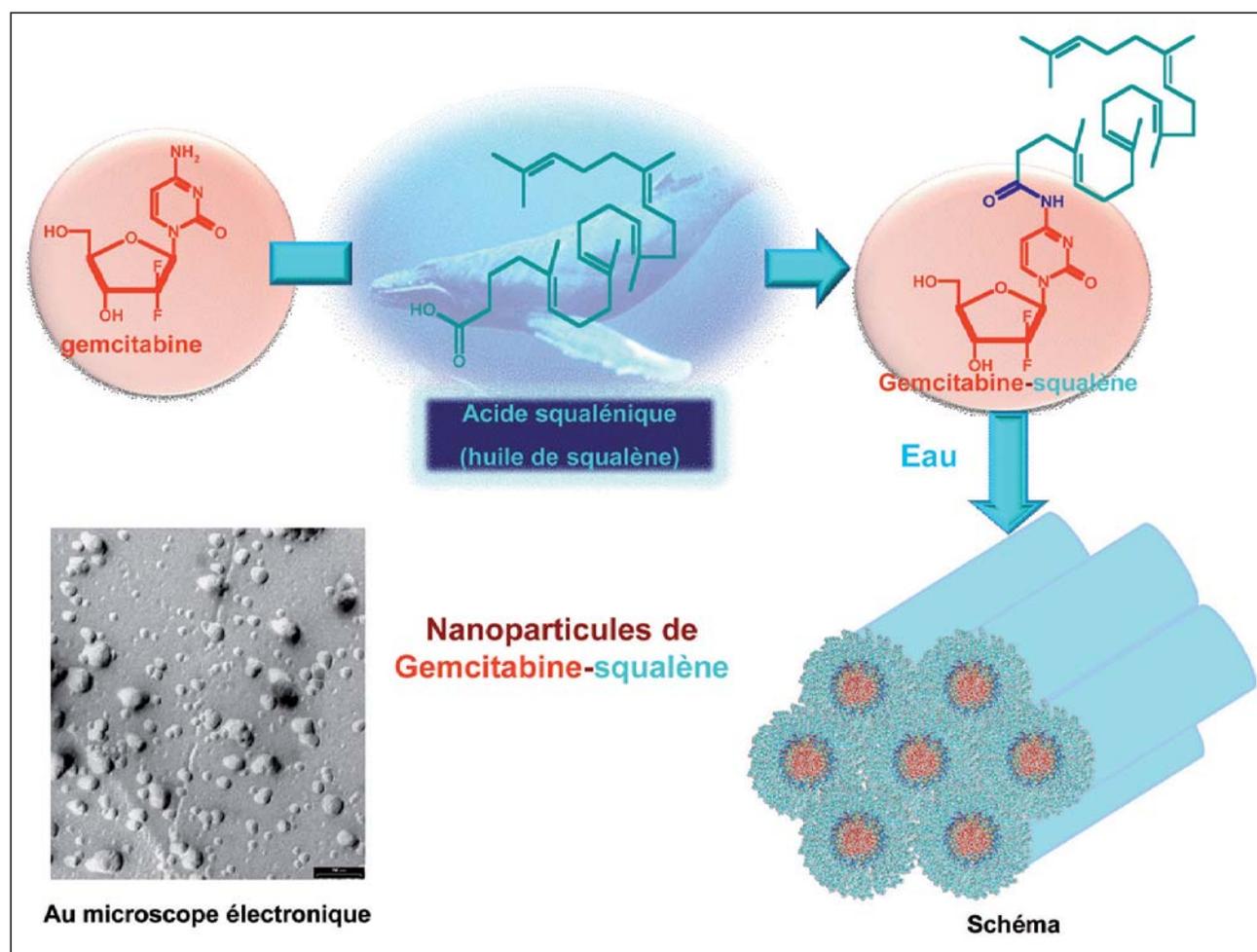
Des études approfondies, réalisées grâce à une technique de **diffraction** de rayons X aux petits angles, combinée à de la **modélisation moléculaire**, ont permis de mettre en évidence une structuration des nanoparticules

sous forme de colonnes, en formant des phases hexagonales [6] (Figure 13).

3.2. Les nanomédicaments squalénisés : quelle efficacité ?

3.2.1. Nanomédicaments et cancer

Du point de vue pharmacologique, l'activité de ces nouveaux médicaments a été testée sur un modèle relativement agressif de tumeur expérimentale, la leucémie de murine L-1210 [8]. Dans ces expériences, les cellules cancéreuses ont été injectées par voie intraveineuse aux souris, puis elles ont été traitées par la même voie, dans différentes conditions.



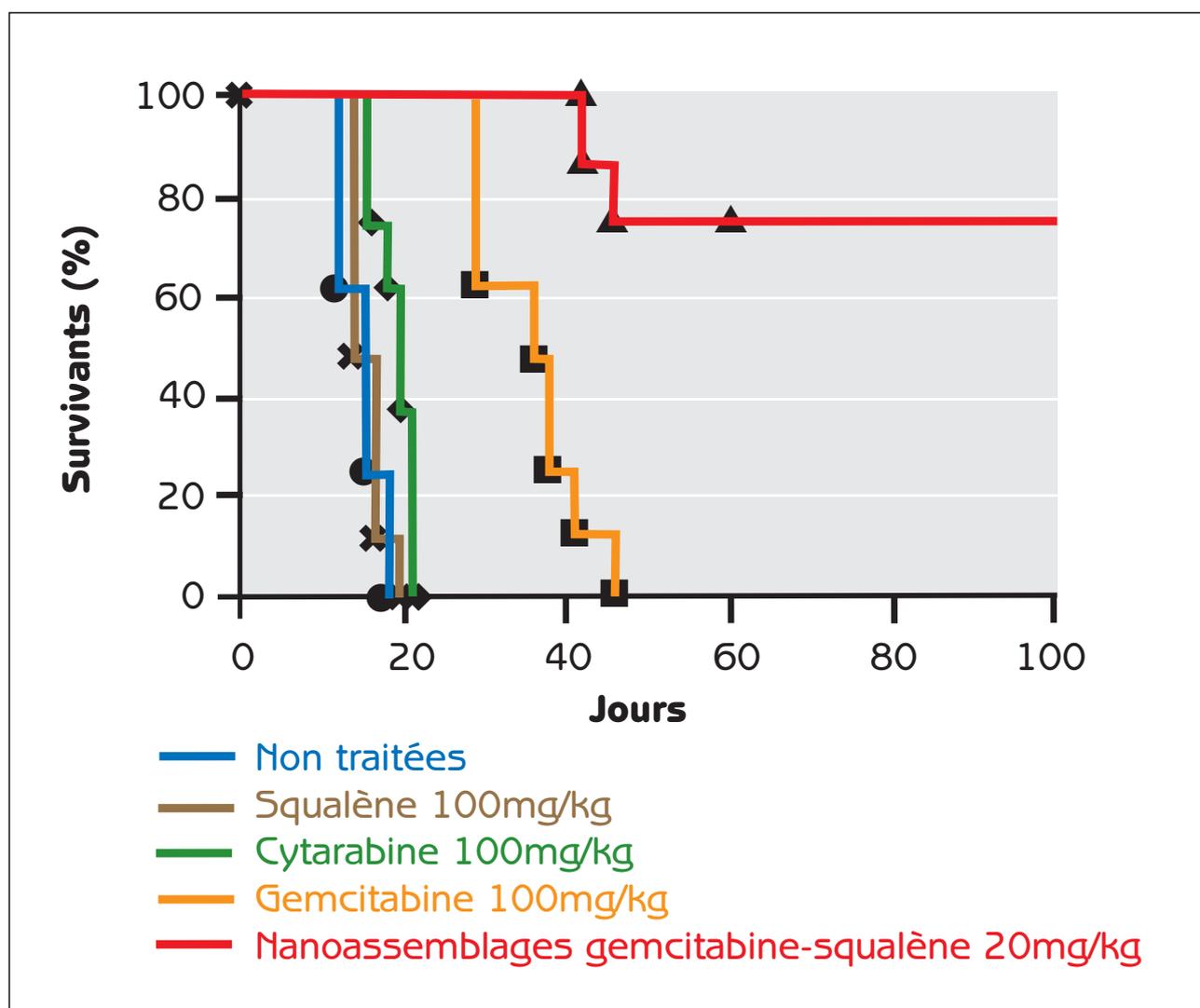
Les souris non traitées meurent au bout de vingt jours, et l'on voit bien que cette leucémie est très agressive (en bleu sur la **Figure 14**). Les cellules cancéreuses vont disséminer extrêmement rapidement au niveau des organes profonds et induire des métastases ; très vite les souris vont perdre du poids et toutes vont mourir moins de vingt jours après la greffe des cellules tumorales. Au contraire, pour les souris traitées par la gemcitabine libre à la dose de 100 mg/kg (en violet) qui est la dose maximale tolérée, on observe que le médicament a une activité puisque la survie des souris

est prolongée en moyenne de 50 %. Cependant, elles ne sont pas guéries puisqu'aucun survivant à long terme n'est observé et qu'après 45 jours toutes finissent par mourir. Il est bien évident que les particules de squalène injectées seules n'ont aucun effet. En revanche, les particules de gemcitabine-squalène injectées à une dose cinq fois moindre que la gemcitabine libre conduisent (en rouge) à 75 % de survivants à long terme, c'est-à-dire des souris guéries.

Ensuite il fallait s'assurer que la technologie de squalénisation fonctionnait sur des tumeurs localisées. Pour cela,

Figure 14

Résultats des tests sur la leucémie murine L-1210 [8].



les cellules cancéreuses ont été injectées par voie sous-cutanée et l'évolution des tumeurs a été suivie.

Tout d'abord pour les souris non traitées, le volume tumoral croît de manière très rapide, en concordance avec les observations précédentes. L'évolution tumorale a ensuite été étudiée pour les souris traitées à la gemcitabine (à la dose de 100 mg/kg) et il apparaît que la tumeur est résistante à ce médicament. En effet, aucune différence de la croissance tumorale n'est observée par rapport aux souris non traitées, alors que l'on est à la dose maximale tolérée.

Inversement, les souris traitées par voie intraveineuse par les nanoparticules de gemcitabine-squalène (en rouge) subissent dans un premier temps une diminution de la masse tumorale, et après dix jours, la tumeur disparaît [7] (Figure 15).

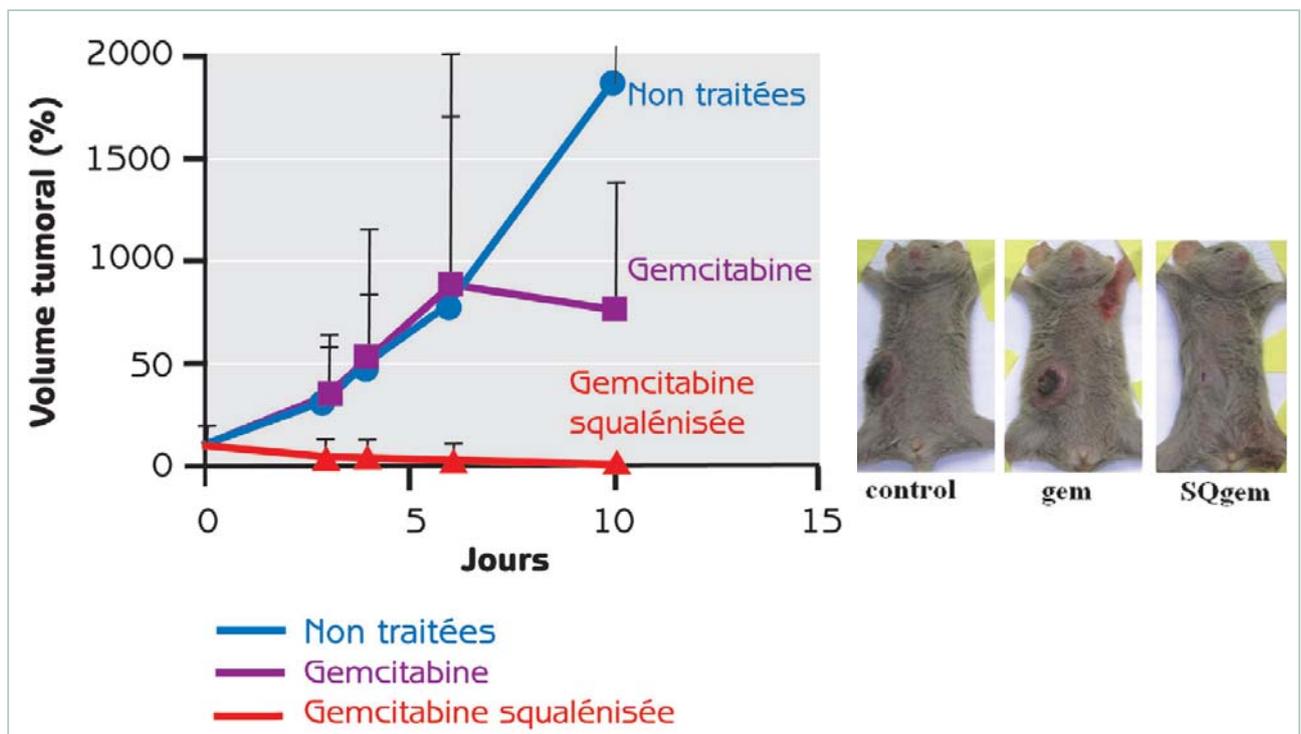
3.2.2. Nanomédicaments et sida

La technologie des nanomédicaments squalénisés a également fait ses preuves dans le domaine du sida. Par exemple, un médicament anti-VIH, la didanosine (ddl), a été squalénisé et le nanomédicament ainsi obtenu a été testé sur des lymphocytes humains originaires de trois donneurs différents et infectés par le VIH. Sur une souche sensible, on observe que les nanoparticules de ddl-squalène sont quatre fois plus efficaces comparativement à la ddl incubée sous forme libre.

Plus intéressante encore est l'observation qui a été faite avec des souches résistantes de VIH, en particulier la souche 146, pour laquelle l'incubation de la ddl sous forme de nanoparticules squalénisées conduit à une efficacité dix fois plus importante que la ddl sous forme libre.

Figure 15

Résultats des traitements par la gemcitabine libre ou squalénisée sur le volume tumoral.



La médecine de demain ne peut plus se passer d'une association pluridisciplinaire

Les nanomédicaments constituent une nouvelle forme prometteuse de médicaments. Une « première génération » de nanomédicaments anticancéreux à base de doxorubicine sera peut-être bientôt sur le marché. Il se prépare au laboratoire des nanovecteurs de « deuxième génération » capables d'acheminer avec précision des principes actifs vers les régions atteintes ; mais aussi des nanovecteurs de « troisième génération » capables de cibler spécifiquement des récepteurs des cellules malades ; et enfin des nanoparticules squalénisées pouvant traiter des maladies variées... un bon nombre ont montré leur efficacité au stade expérimental sur des animaux malades. Qu'en sera-t-il de leur application en médecine humaine ?

Force est de constater que les remarquables progrès de la nanomédecine résultent d'une approche résolument transdisciplinaire associant biologie moléculaire et cellulaire, génomique, pharmacologie, galénique, chimie et physique. Dans cette approche particulière de la nanovectorisation, on ne peut s'empêcher de penser à une citation de Saint Augustin : « La manière de donner est au moins aussi importante que ce que l'on donne ». La contribution de la chimie à ces nouveaux médicaments est très importante, mais la galénique, discipline associée à la chimie, a également un rôle très important dans ce domaine et ne doit pas être oubliée.

Bibliographie

- [1] Chiannilkulchai N., Ammoury N., Caillou B., Devissaguet J.P., Couvreur P. (1990). Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **26** : 122-126.
- [2] 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. Hepatology*, **42** : 736-743.
- [3] Peracchia M.T., Fattal E., Desmaële D., Besnard M., Noel J.P., Gomis J.M., Appel M., D'Angelo J., Couvreur P. (1999). Stealth (R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control. Release*, **60** : 121-128.
- [4] Stella B., Arpicco S., Peracchia M.T., Desmaële D., Hoebeke J., Renoir M., D'Angelo J., Cattel L., Couvreur P. (2000). Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J. Pharm. Sci.*, **89** : 1452-1464.
- [5] De Martimprey H., Bertrand J.-R., Fusco A., Santoro M., Couvreur P., Vauthier C., Malvy C. (2008). siRNA nanoformulation against the Ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an *in vivo* model of papillary thyroid carcinoma. *Nucl. Ac. Res.*, **36** : 1093-1094.
- [6] a) Couvreur P., Stella B., Reddy L.H., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir J.-M., Cattel L. (2006). Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano letters*, **11** : 2544-2548 ; b) Couvreur P., Harivardhan Reddy L., Mangenot S., Poupaert J.H., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Pili B., Bourgaux C., Amenitsch H., Ollivon M. (2008). Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small*, **4** : 247-253.
- [7] Reddy L.H., Renoir J.M., Marsaud V., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P. (2009). Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor. *Molecular Pharmaceutics*, **6** : 1526-1535.
- [8] a) Harivardhan Reddy L., Khoury H., Paci A., Deroussent A., Ferreira H., Dubernet C., Declèves X., Besnard M., Chacun H., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Rousseau B., Laugier C., Cintrat J.-C., Vassal G., Couvreur P. (2007). Squalenoylation favorably modifies the *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution of gemcitabine in mice. *J. Control. Rel.* **124** : 20-27 ; b) Harivardhan Reddy L., Marque P.-E., Dubernet C., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P. (2008). Preclinical toxicology (subacute and acute) and efficacy of a new squalenoyl gemcitabine anticancer nanomedicine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325** : 484-490.

Crédits photographiques

- Fig. 3 et 7 (nanoparticule) :
CNRS Photothèque/Sagas-
science/Caillaud François,

UMR 8612 – Physico-Chimie,
Pharmacotechnie, Biophar-
macie – Châtenay-Malabry.