

Nanomédicaments pour le traitement du **Cancer** et des **maladies** du système nerveux

Patrick Couvreur est professeur à l'Institut Galien¹ Paris-Sud, membre de l'Académie des sciences, des technologies, de médecine et de pharmacie, et créateur de deux start-ups, BioAlliance et Medsqual.

L'objectif de ce chapitre est de montrer comment l'utilisation des nanotechnologies peut permettre de vectoriser les médicaments pour mieux traiter des maladies graves, en particulier le cancer et les maladies du système nerveux central.

L'administration d'un médicament sous une forme galénique pharmaceutique conventionnelle présente un certain nombre de limitations et d'inconvénients. Par exemple, certains médicaments ont un passage transmembranaire limité qui conduit à une faible biodisponibilité. Un faible passage transmembranaire veut dire

aussi qu'on peut avoir une pénétration intracellulaire insuffisante, alors que celle-ci est extrêmement importante quand on sait que de nombreux médicaments, et en particulier parmi ceux issus des biotechnologies, agissent sur des cibles intracellulaires.

De plus, un assez grand nombre de molécules issues des biotechnologies sont très rapidement dégradées et métabolisées. Il y a aussi, et c'est le cas dans le domaine du cancer, des molécules peu sélectives, peu spécifiques, avec une distribution cellulaire et tissulaire inadéquate.

Tout cela aboutit à une activité pharmacologique médiocre ou insuffisante, et même parfois à une toxicité importante.

1. www.umr-cnrs8612.u-psud.fr

Enfin, beaucoup de molécules qui sont d'ailleurs extrêmement spécifiques sur une voie de signalisation vont très vite induire des phénomènes de résistance. Nous verrons dans ce chapitre que cela est vrai dans le domaine du cancer, mais c'est aussi vrai dans le domaine des maladies infectieuses².

1 Les nanotechnologies, des outils pour améliorer l'activité pharmacologique

Pour améliorer l'activité pharmacologique, on peut faire de la chimie directement sur la molécule, mais un médicament n'est pas uniquement un principe actif ou une molécule, c'est aussi une forme galénique sur laquelle on peut

2. Voir aussi *La chimie et la santé, au service de l'homme*, chapitre de P. Couvreur, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, R.A. Jacquesy, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2010.

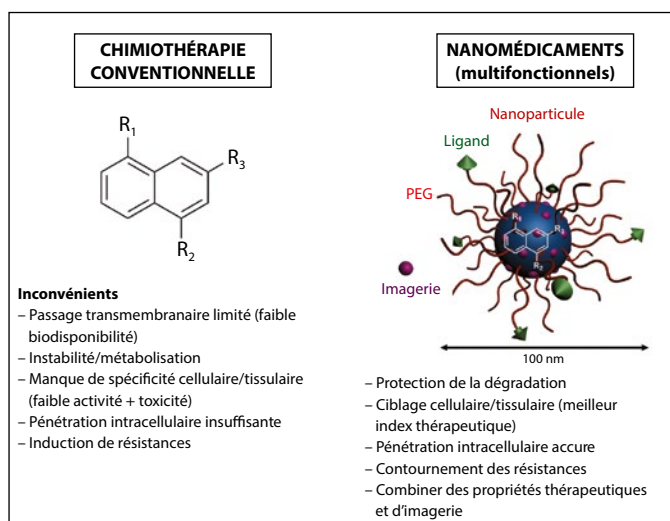
agir, et on peut encapsuler la molécule dans des nano-objets d'une taille comprise entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres. Si l'encapsulation est bien faite, elle protégera le principe actif de la dégradation (*Figure 1*).

Mais la chimie peut jouer un rôle encore plus important car si on réussit à équiper ces nano-objets de ligands sélectifs, on peut alors réaliser un ciblage cellulaire, tissulaire, voire même intracellulaire, et obtenir un meilleur index thérapeutique³, une meilleure sélectivité d'action et éventuellement aussi une pénétration intracellulaire accrue.

3. Index thérapeutique : nombre permettant de mesurer la différence entre la dose susceptible de créer un effet thérapeutique (produisant les effets désirés chez 50 % des individus) et celle créant possiblement la mort (pour 50 % des individus). Plus une substance a un index thérapeutique bas, plus elle est dangereuse.

Figure 1

Un principe actif encapsulé dans une nanoparticule fonctionnalisée en surface offre une multifonctionnalité thérapeutique.



Ensuite, quand la chimie et la biologie se marient, et si l'on connaît bien sur le plan physiopathologique⁴ les mécanismes de résistance, un bon chimiste peut imaginer des nanovecteurs qui délivreront le médicament de manière telle que l'on pourra contourner certains phénomènes de résistance.

Enfin, avec cette même approche nanotechnologique, on peut aussi combiner les propriétés thérapeutiques avec des outils de diagnostic, par exemple en encapsulant un médicament ayant des propriétés d'imagerie. On parlera alors de nanothéranostique⁵, un concept qui ouvre la porte à la médecine personnalisée.

2 L'encapsulation physique dans un polymère biodégradable

Le passage de la découverte en laboratoire d'un nanomédicament efficace aux premiers essais cliniques est un processus très long qui est illustré par différentes nanotechnologies développées au sein de notre équipe de recherche. Ces exemples illustrent quelques-unes des difficultés à résoudre pour développer des nanomédicaments.

2.1. Maîtriser la vitesse de libération du principe actif

Le premier exemple concerne la mise au point

4. Physiopathologique : étude des troubles du fonctionnement de l'organisme lors de maladies ou de ses réactions en présence de corps étrangers.

5. Nanothéranostique : science utilisant les nanotechnologies pour le diagnostic et la thérapie de différentes maladies.

de nanoparticules biodégradables à partir d'un polymère polyalkylcyanoacrylate, l'objectif étant de maîtriser la vitesse de libération du principe actif. Ce travail, débuté il y a déjà longtemps, utilise comme point de départ un monomère utilisé en chirurgie – un cyanoacrylate – qui possède donc un a priori toxicologique relativement favorable. L'intérêt chimique de ce monomère est sa capacité à polymériser dans de l'eau grâce à un mécanisme de polymérisation anionique (**Figure 2**). Cette propriété est intéressante pour les applications pharmaceutiques, pour lesquelles il faut éviter l'utilisation de solvants organiques.

La vitesse de biodégradation de ce polymère, ou plus exactement de bio-érosion, peut aussi être contrôlée. La bio-érosion résulte de l'hydrolyse de la fonction ester (-COOR) latérale, et pour maîtriser cette vitesse de bio-érosion, on peut jouer sur la longueur n de la chaîne alkyle latérale (**Figure 3**). Plus la chaîne alkyle sera longue, plus la biodégradation sera lente et plus la libération du médicament encapsulé sera lente. À partir de ce polymère biodégradable, on peut préparer des nanoparticules qui seront soit des nanosphères (systèmes matriciels), soit des nanocapsules (systèmes réservoirs).

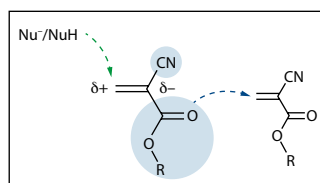
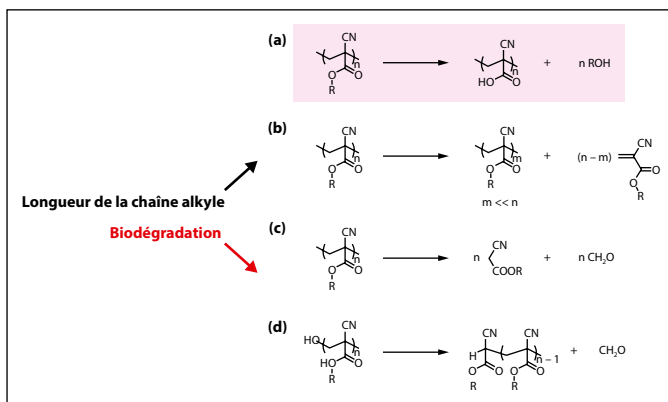


Figure 2

La polymérisation anionique du monomère de cyanoacrylate s'effectue par échange d'électron à partir d'une espèce nucléophile.

Figure 3

Rallonger la chaîne alkyle latérale permet de diminuer la vitesse de biodégradation du polymère et donc maîtriser la vitesse de libération du médicament.



2.2. Principe de vectorisation d'un médicament

Que ce soit des nanosphères ou des nanocapsules, le devenir biologique de ces nano-objets après injection intraveineuse sera le même. Quand elles sont administrées par voie intraveineuse, ces nanoparticules présentent des surfaces d'interaction avec l'organisme qui sont considérables, et celui-ci réagit comme s'il voyait des virus ou des bactéries, ou d'autres particules exogènes, en marquant ces nanoparticules comme étant du « non-soi ». Des protéines plasmatiques appelées *opsonines* (en rouge sur la Figure 4),

s'adsorbent alors sur leur surface.

Au niveau du foie, des macrophages appelés cellules de Kupffer possèdent des récepteurs spécifiques qui reconnaissent ces opsonines, et donc aussi les nanoparticules opsonisées. Le résultat est qu'après injection intraveineuse, ces nanoparticules vont être captées immédiatement par le tissu hépatique, ce qui permet de les utiliser comme des vecteurs de médicaments pour le traitement de pathologies hépatiques sévères.

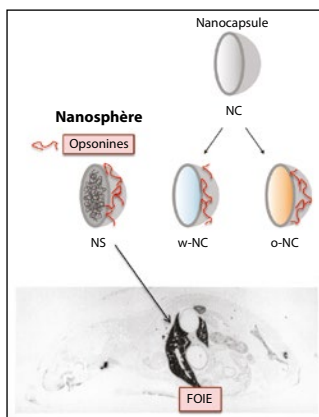
2.3. Application de l'encapsulation d'un principe actif pour le traitement de l'hépatocarcinome résistant

2.3.1. Tests in vitro sur l'hépatocarcinome

Nous avons choisi comme cible l'hépatocarcinome (cancer primitif du foie), qui présente très souvent un phénotype de résistance MDR (« *multidrug resistance* ») aux anticancéreux. Dans de nombreux cas, la résistance des cellules cancéreuses aux anticancéreux

Figure 4

Encapsulation du principe actif dans des nanosphères NS (structure matricielle) ou dans des nanocapsules NC (structure réservoir) et capture par le tissu hépatique après administration intraveineuse.



est due à l'hyperexpression de protéines telles que les Pgp (P-glycoprotéine) et les MRP (« *multidrug resistance proteins* »), qui induisent le flux (en rouge sur la **Figure 5A**) du médicament anticancéreux de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule cancéreuse. C'est en fait un mécanisme de détoxification que la cellule utilise pour lutter contre la chimiothérapie.

Dans l'exemple présenté sur la **Figure 5**, un hépatocarcinome cellulaire humain a été incubé, avec des concentrations croissantes de doxorubicine, un anticancéreux majeur. La **Figure 5B** montre qu'en fait 100 % des cellules tumorales survivent à cause du rôle joué par les protéines d'efflux induisant le phénomène de résistance (courbe Dox).

Au début des années 2000, nous avons eu l'idée d'encapsuler la doxorubicine dans les nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate (PIHCA-Dox) pour la rendre invisible vis-à-vis de la P-glycoprotéine. On constate que l'incubation de concentrations croissantes de doxorubicine, cette fois sous forme de nanoparticules, restaure la sensibilité des cellules tumorales à la doxorubicine (**Figure 5B**). La totalité des cellules cancéreuses sont alors tuées pour des concentrations relativement faibles en doxorubicine nanoencapsulée.

2.3.2. Tests in vivo sur l'hépatocarcinome

L'étape suivante consiste à voir ce qui se passe *in vivo* où les conditions sont très différentes de celles *in vitro* à cause des phénomènes de

métabolisation, d'élimination, d'excrétion et de pharmacocinétique. Un modèle d'hépatocarcinome MDR résistant chez la souris transgénique a été utilisé. Le niveau d'apoptose des cellules tumorales est plus élevé pour les souris qui ont été traitées par la doxorubicine sous forme de nanoparticules comparativement à celles traitées par la doxorubicine sous forme libre (**Figure 6**). On peut même

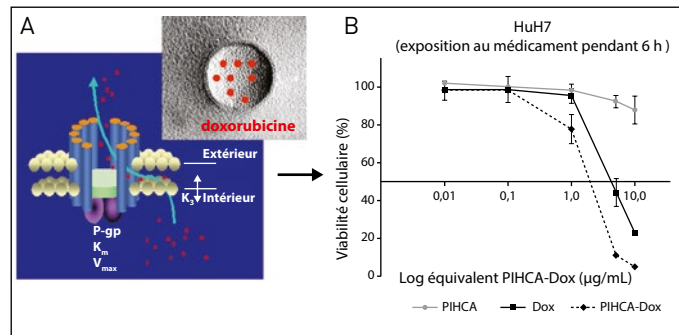


Figure 5

A) L'hyper-expression dans les cellules cancéreuses de protéines d'efflux entraîne une élimination du médicament de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (flux en rouge) ; B) différences entre la quantité de cellules cancéreuses humaines résistant à la doxorubicine seule (Dox) et encapsulée dans des nanoparticules (PIHCA-Dox) en fonction de la concentration d'exposition *in vitro*.

Adapté de Barraud et coll. (2005), *J. of Hepatology*, 42 : 736-743.

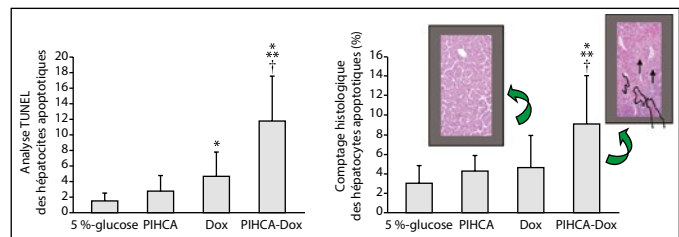


Figure 6

Le taux d'apoptose des cellules tumorales (histologie et analyse TUNEL) est plus élevé après traitement avec la doxorubicine sous forme de nanoparticule (PIHCA-Dox) qu'après traitement avec la doxorubicine sous forme libre.

Adapté de Barraud et coll. (2005), *J. of Hepatology*, 42, 736-743.

remarquer que le niveau d'apoptose⁶ avec la doxorubicine sous forme libre est à peu près le même que le niveau d'apoptose avec une simple solution placebo de glucose 5 % à cause précisément de ce phénomène de résistance.

2.3.3. De la recherche en laboratoire à la clinique

Même quand l'efficacité thérapeutique est documentée (**Figure 7**), un laboratoire universitaire n'a pas les moyens de réaliser les essais cliniques nécessaires à la mise sur le marché du médicament. C'est la raison pour laquelle nous avons créé la start-up BIOALLIANCE (maintenant Onxeo). Dans une première étape, cette société a été localisée dans les laboratoires de l'Université Paris-Sud à Châtenay-Malabry afin de réaliser le lot clinique nécessaire pour pouvoir entreprendre les essais cliniques.

6. Apoptose : processus d'auto-destruction de la cellule génétiquement programmé en réponse à un signal.

Les nanoparticules de doxorubicine sont commercialisées sous le nom de Livatag[®]. La **Figure 7** montre que la tumeur est visiblement nécrosée après quatre semaines de traitement par le Livatag[®]. Après dix-huit mois de traitement, environ 90 % des patients ont survécu, alors que seulement 54 % des patients survivaient quand ils avaient reçu le traitement standard qui était de la chimio-embolisation⁷.

Ces résultats positifs ont permis de passer aux essais cliniques de phase 3, qui est un essai multicentrique, réalisé dans plus de quarante hôpitaux. En raison de sa bonne tolérance, le Livatag[®] a obtenu le statut « fast track »⁸ par la FDA (« Food and Drug Administration »), qui permet de faciliter et d'accélérer le développement du médicament. Aucun effet secondaire important n'a été observé en phase 3, même chez certains patients traités pendant un an avec des chimiothérapies répétées.

Le développement d'un nouveau médicament est toujours



IRM de base



IRM : 4 semaines après traitement montrant la nécrose de la tumeur

Taux de survie à 18 mois pour les patients traités par les nanoparticules de doxorubicine (Livatag[®]) est de 89 % ; il est de 54 % pour les patients du bras contrôle (traitement standard par chimioembolisation)

Phase III : essai multicentrique (40 hôpitaux)

- Livatag[®] obtient le statut « Fast track » de la FDA
- Le Livatag[®] montre une excellente tolérance y.c. chez les patients traités pendant les périodes les plus longues (jusqu'à 1 an)
- Cependant, à ce stade de l'étude, le Livatag[®] présente une courbe de survie superposable à celle du bras contrôle (le meilleur traitement actuel est la multithérapie à base d'oxaliplatine, gemcitabine et inhibiteurs de tyrosine kinase)

7. Chimio-embolisation : traitement contre le cancer du foie appliqué directement au niveau de la tumeur. Il s'agit d'injecter une dose très concentrée de chimiothérapie directement dans la tumeur, sans exposer le reste du corps aux effets de ces médicaments. Le processus bloque l'apport de sang à la tumeur, la privant d'oxygène et de nutriments.

8. Fast Track : désignation deservie par la Food and Drug Administration (FDA) à un médicament expérimental pour accélérer la phase d'étude afin de faciliter le développement de médicaments qui traitent une maladie grave et répondent à un besoin médical non satisfait.

Figure 7

Efficacité thérapeutique des nanoparticules de doxorubicine (Livatag[®]) : la tumeur est visiblement nécrosée après quatre semaines de traitements.

très difficile pour une start-up parce que, d'une part, cela nécessite beaucoup de temps et des financements à trouver, et que d'autre part, pendant ce temps, le traitement contrôle évolue. Dans le cas du Livatag[®], le bras contrôle était la chimio-embolisation en phase 2 mais une multi-thérapie en phase 3. Et malheureusement, le Livatag[®] présente une courbe de survie exactement superposable mais pas améliorée par rapport au traitement par multi-thérapie⁹.

2.4. Application de l'encapsulation pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

L'intérêt de l'encapsulation du principe actif pour d'autres pathologies que les pathologies hépatiques a été étudié. Le principe de base repose toujours sur l'utilisation d'un cœur à base d'un polymère biodégradable.

Quand le tissu hépatique n'est pas la cible, il faut éviter l'opsonisation¹⁰, et pour cela faire de la chimie de surface et greffer des polyéthylènes glycols (PEG) qui, par répulsion stérique, empêcheront les opsonines de s'adsorber à la surface des nanoparticules.

Celles-ci peuvent alors séjourner plus longtemps dans la circulation générale. Ils sont dits «furtifs» car non reconnus par le système réticulo-endothélial.

En général, les études précliniques montrent une augmentation de la perméabilité au niveau de la vascularisation tumorale, ce qui permet à ces nanoparticules recouvertes de PEG de diffuser spécifiquement au niveau de l'espace tumoral. C'est ce que l'on appelle l'effet EPR («*Enhanced Permeability and Retention Effect*»). Ces nanovecteurs, qui se caractérisent par une résidence sanguine accrue et une capacité d'extravasation sélective au niveau de l'endothélium tumoral, sont aussi appelés «nanovecteurs de deuxième génération».

Mais il est aussi possible de greffer des ligands à l'extrémité des chaînes de polyéthylène glycol – par exemple la biotine. Ces ligands peuvent alors reconnaître sélectivement certaines cellules tumorales (en vert sur la **Figure 8**). Ces nanovecteurs peuvent être considérés comme des «vecteurs de troisième génération».

La biotine et l'avidine (ou la streptavidine) ayant une constante d'affinité très importante, il est alors possible de décorer les nanoparticules préalablement «biotinylées» avec des anticorps monoclonaux. Dans le cadre du projet européen «*Nanotechnology for Alzheimer Disease*» (NAD), nous avons ainsi développé des immunonanoparticules capables de cibler le peptide Ab, un marqueur de la maladie d'Alzheimer (**Figure 8**).

9. Pour plus de détails, voir www.onxeo.com/en/nos-produits/orphelins-oncologie/#tabs-1-3

10. Opsonisation : processus biochimique par lequel une molécule d'opsonine recouvre la membrane d'une cellule cible (une bactérie ou une cellule du corps infectée par un agent pathogène) pour favoriser sa phagocytose par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines.

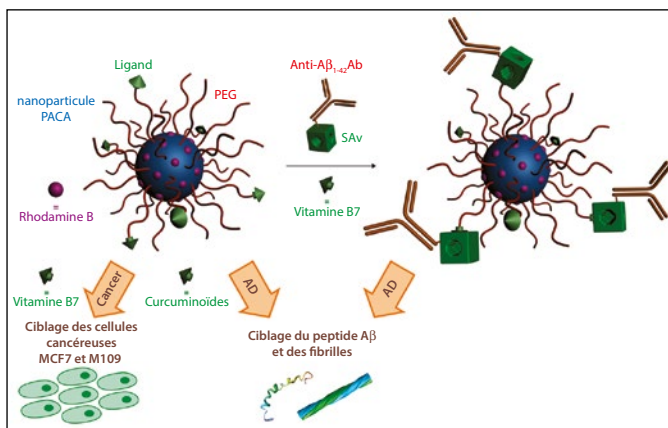


Figure 8

Fonctionnalisation de nanoparticules à l'aide de petits ligands (biotine et curcuminoïdes) et d'un anticorps monoclonal Anti-Ab.

Source : Adapté avec la permission de Le Droumaguet et coll. ACS Nano, 6 : 5866-5879. Copyright (2012), American Chemical Society.

2.5. Le marquage des nanoparticules : un outil de suivi

Afin d'étudier le trafic intracellulaire de ces nanoparticules, il est possible par différentes approches chimiques de les marquer à la fluorescence, ce qui permet leur suivi, notamment lorsque les cellules se divisent (Figure 9). On peut aussi les associer à des

quantum dots¹¹ pour suivre la biodistribution de ces particules sur l'animal vivant.

À titre d'illustration, nous avons utilisé des cellules MCF7 (lignée tumorale de cancer du sein humain) qui, comme d'autres cellules tumorales, possèdent de nombreux récepteurs de la biotine. Comme on le voit sur la Figure 10B, les nanoparticules « biotinylées » (c'est-à-dire portant le ligand biotine au bout de certaines chaînes de PEG) ont été marquées par un fluorophore rouge (la rhodamine), tandis que la cellule tumorale a été marquée en vert, les noyaux étant colorés en bleu.

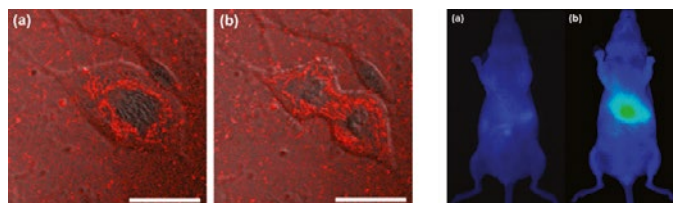


Figure 9

Le marquage des nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate par un fluorophore rouge (rhodamine) permet de suivre le devenir intracellulaire de celles-ci (gauche). L'encapsulation de quantum dots dans les nanoparticules permet de visualiser leur distribution chez l'animal vivant.

Adapté de J. Nicolas et coll. (2011), Soft Matter, 7 : 6187 ; D. Brambilla et coll. (2010). ChemComm, 46 : 2602-2604.

11. Quantum dot ou boîte quantique : petite particule semi-conductrice de quelques nanomètres dont la taille engendre une modification des propriétés optiques et électroniques. Beaucoup émettent par exemple de la lumière à une fréquence spécifique suite à une stimulation.

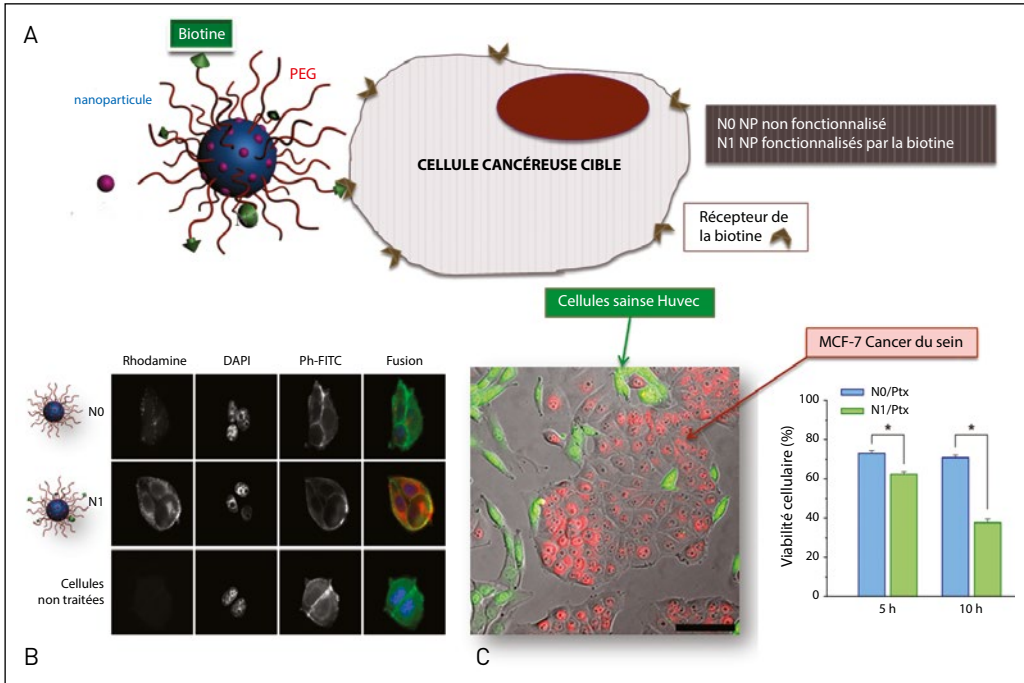


Figure 10

A) Reconnaissance de la biotine en bout de chaîne des polyéthylènes glycols (PEG) des nanoparticules (NP) par les récepteurs des cellules cancéreuses ; B) les nanoparticules sont marquées en rouge, les cellules cancéreuses cibles sont marquées en vert ; les cellules tumorales sélectivement reconnues par les nanoparticules fonctionnalisées par la biotine deviennent rouge ; C) lorsqu'une co-culture de cellules saines (HUVEC marquées en vert) et de cellules tumorales (MCF-7) non marquées est incubée avec les nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate (marquées en rouge par la rhodamine), seules les cellules cancéreuses deviennent rouge, ce qui démontre la grande sélectivité des nanoparticules biotinylées.

Adapté de Le Droumaguet et coll. (2012), ACS Nano, 6 : 5866-5879.

On voit que lorsque les nanoparticules biotinylées (marquées rouge) reconnaissent les cellules tumorales, ces cellules qui étaient vertes deviennent rouges, ce qui démontre le ciblage spécifique des cellules cancéreuses grâce à la biotine (Figure 10C). Pour vérifier que cette reconnaissance spécifique de la nanoparticule est vraiment due à la biotine, la même expérience est réalisée cette fois en l'absence de biotine greffée à l'extrémité des chaînes de PEG : dans ce

cas les cellules cancéreuses restent vertes, c'est donc bien la biotine qui a reconnu le récepteur (Figure 10A).

Le récepteur de la biotine est hyperexprimé sur les cellules tumorales mais il y en a aussi chez les cellules saines. Donc pour étudier la sélectivité, une co-culture a été réalisée avec des cellules normales marquées cette fois-ci en vert et des cellules tumorales non marquées. L'ensemble est incubé avec les nanoparticules fluorescentes rouges. Les nanoparticules vont

reconnaître uniquement les cellules tumorales qui apparaissent en rouge et pas les cellules normales qui autrement seraient devenues jaunes en raison de la superposition du vert et du rouge (**Figure 10**).

2.6. Les limites de la vectorisation par l'encapsulation physique

Le nombre de nanomédicaments ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché est relativement limité. Il y en a également peu qui ont atteint une phase clinique avancée (phase 3). C'est globalement peu et cela signifie qu'il y a un certain nombre de limitations dans l'utilisation des nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments.

Le premier obstacle est ce que l'on appelle le « *burst release* ». L'encapsulation des molécules anticancéreuses dans un nanovecteur n'est pas optimale. En effet, pour des raisons thermodynamiques une fraction du principe actif est adsorbée en surface et non pas réellement encapsulée. Cette fraction est libérée immédiatement et de manière incontrôlée quand on injecte le nanomédicament par voie intraveineuse dans la circulation générale, et donc cette fraction du médicament n'est pas vectorisée.

La seconde limitation, probablement encore plus importante, est le « *Drug Loading* », ou taux d'encapsulation, qui mesure le poids en médicament par rapport aux poids en matériel transporteur exprimés en %. Ce taux d'encapsulation est faible en général : 5 % pour la doxorubicine encapsulée dans les nanoparticules de

polyalkylcyanoacrylate, mais pour de nombreux principes actifs, il est même inférieur à 1 %. L'utilisation des nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments ne peut donc s'appliquer qu'à des molécules qui sont très actives à très faibles doses, ce qui est typiquement le cas des anticancéreux, c'est aussi pour cette raison que beaucoup d'applications relèvent du domaine du cancer.

Il est par ailleurs difficile d'augmenter les doses, car par exemple avec un taux d'encapsulation de 1 %, chaque fois qu'on injectera 1 mg de principe actif en plus, on devra en même temps administrer 100 mg de matériel transporteur (polymères ou lipides). Et comme tous ces nanovecteurs pénètrent dans les cellules, on est très vite confronté à un problème toxicologique majeur.

3 L'encapsulation chimique par le squalène

3.1. De l'encapsulation physique à l'encapsulation chimique

Charger des médicaments dans des nanotechnologies fait intervenir des phénomènes physiques (adsorption, piégeage, encapsulation, etc.), ce qui explique les obstacles mentionnés plus haut (« *burst release* » et « *drug loading* » limité). Nous avons eu l'idée de passer du paradigme de l'encapsulation physique à celui de l'encapsulation chimique : il s'agit de faire de la chimie à la place de la physique (**Figure 11**).

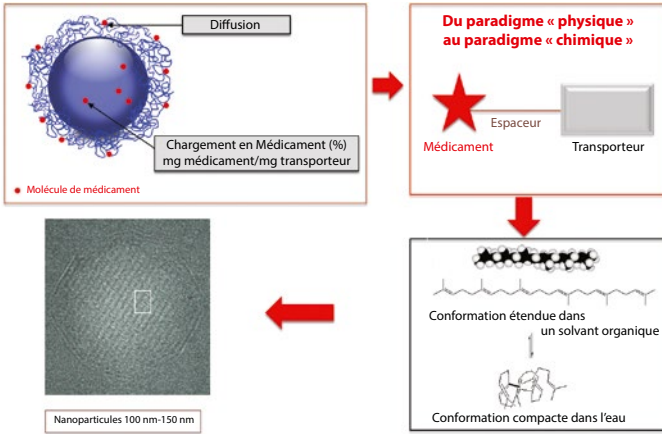


Figure 11

Les limites de l'utilisation des nanomédicaments pourraient être contournées en remplaçant l'encapsulation physique par l'encapsulation chimique.

L'idée est de coupler une molécule de transporteur par un lien chimique avec une molécule de médicament afin d'augmenter le « taux d'encapsulation ». Un bon chimiste peut même concevoir le lien chimique de manière à ce qu'il soit hydrolysé sélectivement, par exemple, dans les cellules tumorales. Mais il faut trouver un transporteur qui soit capable, en milieu aqueux, de former des nanoparticules. Et c'est ce que le squalène est capable de faire (**Figure 11**).

sous forme de nanoparticules d'une taille comprise généralement entre 100 et 200 nm. Il s'agit d'une véritable plateforme puisque l'on peut appliquer cette technique dite de « squalénisation » à toute une série de molécules, notamment à des petites molécules anticancéreuses

3.2. L'encapsulation chimique par le squalène et ses applications

Le squalène est un précurseur de la biosynthèse du cholestérol chez les mammifères et chez l'homme. Ce lipide est extraordinaire parce qu'il adopte, comme on le voit sur la **Figure 12**, une conformation moléculaire extrêmement compacte. C'est cette propriété unique qui a été mise à profit pour le coupler à différents principes actifs.

Dans l'eau, ces bioconjugués squalénés s'auto-assemblent

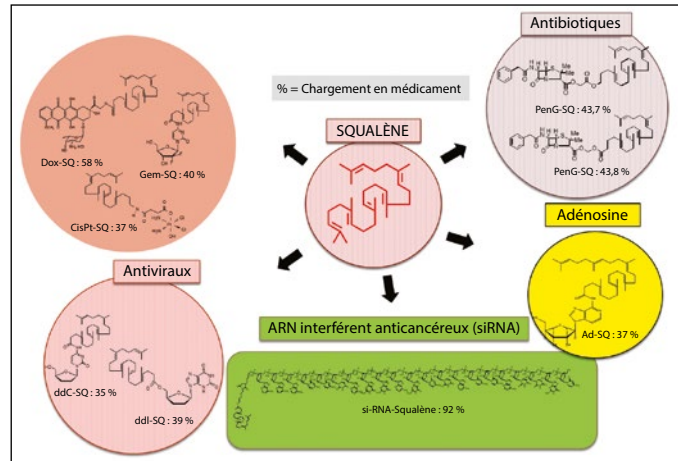


Figure 12

La molécule de squalène peut être couplée à un grand nombre de principes actifs. C'est un transporteur moléculaire capable de s'auto-organiser sous forme de nanoparticule en milieu aqueux. Le choix du bras espaceur entre le squalène et le principe actif permet de déclencher la libération du médicament au niveau de la cellule cible.

(doxorubicine, gemcitabine, cisplatine), et obtenir des pouvoirs de charge (taux d'encapsulation) pouvant atteindre, par exemple, pour la doxorubicine, 58 % ; cela dépend évidemment du rapport entre poids moléculaire du principe actif et le poids moléculaire du squalène.

Le squalène peut aussi être couplé à des antibiotiques ou à des médicaments antiviraux en vue de traiter des infections intracellulaires résistantes. À nouveau, les bioconjugués obtenus forment systématiquement des nanoparticules en milieu aqueux.

La petite molécule de squalène peut même être couplée à de petits ARN interférents, des biomolécules très hydrophiles. Et même si le poids moléculaire de ces acides nucléiques est très élevé, la petite molécule de squalène suffit pour conduire à une auto-organisation sous forme de nanoparticule. Il existe aussi des applications dans le domaine des neurosciences, notamment avec l'adénosine.

3.2.1. Exemple de la gemcitabine

La gemcitabine est un anticancéreux majeur avec une fonction aminée qui, couplée à l'acide squalénique, conduit au bioconjugué squalène-gemcitabine. Dans l'eau, ce bioconjugué s'auto-organise pour former des nanoparticules (**Figure 13A**). La cryomicroscopie et les études de diffraction des rayons X montrent une organisation supramoléculaire (**Figure 13B**) sous forme de phase hexagonale inverse, ce qui a été confirmé par modélisation moléculaire. Ces nanoparticules ont été utilisées pour traiter différents modèles tumoraux précliniques : l'exemple de cellules leucémique greffées par voie sous-cutanée chez la souris est présenté dans la **Figure 13C**. Le traitement par voie intraveineuse avec la gemcitabine sous forme libre est sans effet, alors que la même dose de l'anticancéreux administré sous forme de gemcitabine-squalène inhibe totalement la croissance tumorale (**Figure 13C**).

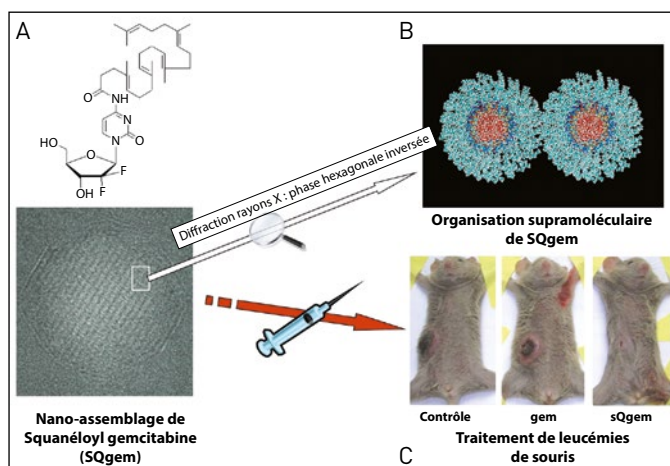


Figure 13

Structure supramoléculaire du bioconjugué squalène-gemcitabine permettant une meilleure efficacité sur la tumeur pour une même quantité d'anticancéreux.

Adapté de Couvreur et coll. (2008). *Small*, 4 : 247-253.

3.2.2. Exemple de la doxorubicine

L'exemple d'un autre anticancéreux, la doxorubicine, est encore plus intéressant. Le squalène chimiquement couplé à la doxorubicine forme des particules d'une centaine de nanomètres mais qui apparaissent en cryomicroscopie comme des objets allongés formant des structures « train-boucle » (Figure 14).

Quand elles sont injectées par voie intraveineuse, ces nanoparticules restent présentes très longtemps dans la circulation générale, comme on le voit sur la courbe verte de la Figure 15, avec une pharmacocinétique très différente de celle de la doxorubicine (en rouge) injectée sous forme libre.

Nous avons pu montrer que c'est parce que ces nanoparticules de forme allongée sont alignées dans le sens du flux de la circulation sanguine qu'elles ne sont pas reconnues par les macrophages du foie que sont les cellules de Kupffer, ce qui explique la pharmacocinétique différente.

La biodistribution est aussi modifiée. On observe notamment une diminution considérable de la concentration de la doxorubicine sous forme de nanoparticules au niveau du tissu cardiaque, ce qui est intéressant car pour beaucoup d'anticancéreux, en particulier pour la doxorubicine, la toxicité cardiaque est la principale toxicité, même à long terme, ce qui représente un problème notamment pour les patients ayant été traités très jeunes avec des chimiothérapies (Figure 16B).

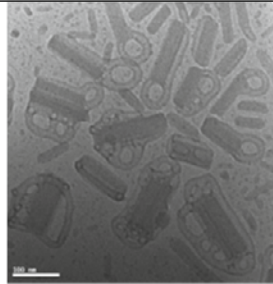
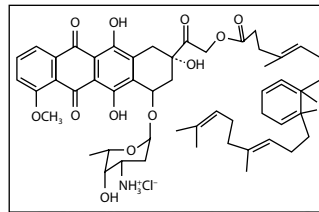


Figure 14

Structure en train-boucle de la doxorubicine couplée au squalène. Adapté de Maksimenko et coll. (2014). PNAS, 111(2) : E217-E226.

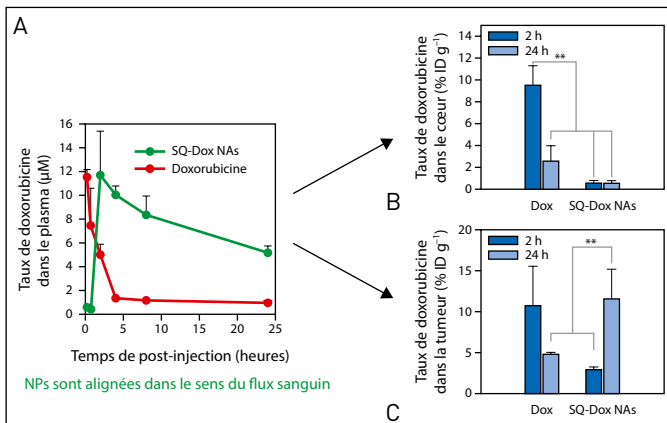


Figure 15

Le bioconjugué doxorubicine-squalène séjourne plus longtemps dans la circulation générale (courbe verte) que la doxorubicine libre (courbe rouge) (A) avant d'atteindre le tissu cible (la tumeur) (C).

Adapté de Maksimenko et coll. (2014). PNAS, 111(2) : E217-E226.

De plus, après 24h, on observe une augmentation considérable de la concentration en doxorubicine au niveau des tumeurs lorsqu'on l'injecte sous forme de nanoparticules (Figure 16C).

L'emploi de nanotechnologies devrait donc réduire la toxicité cardiaque de l'anticancéreux tout en augmentant son activité. C'est ce qui a été observé grâce à des tests réalisés sur un modèle de rats hypertendus. Si on leur injecte chaque semaine une dose de 1 mg par kilo de doxorubicine sous forme libre, on observe (en rouge sur la Figure 16C) une augmentation considérable de la troponine, qui est un marqueur de la souffrance cardiaque, et signe donc une forte toxicité. Des biopsies réalisées en fin d'expérience montrent d'ailleurs la présence de cardiocytes¹² avec de très grosses vacuoles.

12. Cardiocyte : cellule contractile (myocyte) du cœur.

Quand les mêmes doses, et même des doses doubles de doxorubicine, sont administrées sous forme de nanoparticules, on supprime totalement l'augmentation anormale de la troponine, dont le niveau reste équivalent à celui des rats traités par une simple solution de NaCl à 9/1000 (Figure 16C). D'autre part, l'histologie¹³ du tissu cardiaque après biopsie reste tout à fait normale. La vectorisation par le bioconjugué doxorubicine-squalène a donc effectivement diminué la toxicité, ce qui est très important en cancérologie parce qu'une meilleure tolérance permet l'injection de doses plus importantes avec comme corollaire une augmentation de l'activité anticancéreuse.

13. Histologie : étude des tissus biologiques faisant intervenir des disciplines telles que biologie cellulaire, anatomie, biochimie et physiologie.

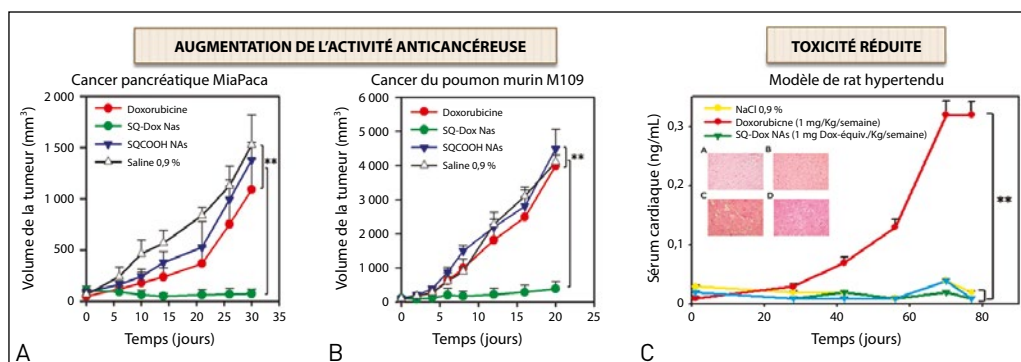


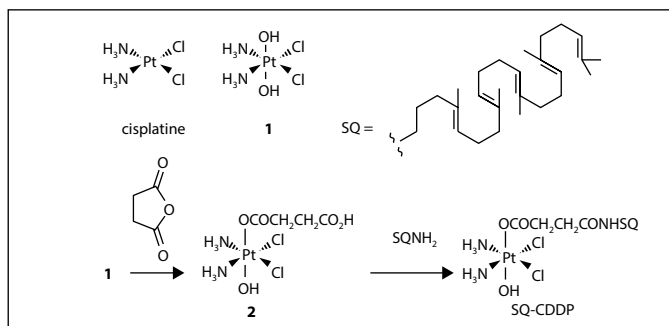
Figure 16

La croissance des tumeurs n'est inhibée que par les nanoparticules du bioconjugué doxorubicine-squalène : A) modèle de cancer humain du pancréas ; B) modèle du cancer du poumon ; C) réduction de la production de troponine (marqueur de toxicité cardiaque) quand la doxorubicine est injectée sous forme de nanoparticules squalénées.

C'est ce qui a été effectivement observé sur deux modèles précliniques, un modèle humain pancréatique greffé chez la souris immunodéprimée et un adénocarcinome pulmonaire murin. Sur la **Figure 16B**, la courbe noire correspond à la croissance tumorale chez les animaux non traités. La courbe rouge est celle des animaux traités avec la doxorubicine sous forme libre pour lesquels la tumeur apparaît résistante à la doxorubicine. Quand les animaux sont traités par les nanoparticules squalénées, la croissance tumorale est totalement inhibée, démontrant ainsi une augmentation de l'activité anticancéreuse.

3.2.3. Exemple du cisplatine

Le cisplatine est une molécule anticancéreuse très utilisée qui a également été couplée au squalène (**Figure 17**). Quand on incubé le cisplatine avec des



cellules tumorales (en vert sur la **Figure 18A**), la pénétration cellulaire est faible, et il en est de même pour la platination de l'ADN (courbe verte de la **Figure 18C**). Au contraire, on observe que la pénétration intracellulaire et la platination de l'ADN augmentent considérablement lorsque le cisplatine est incubé sous forme de nanoparticule squalénée (courbes rouges). Ces résultats sont confirmés par les images de microscopie confocale (**Figure 18D** et 18E).

Figure 17

Structure du couplage du cisplatine avec le squalène pour former des nanoparticules.

Source : Kotelevets et coll. (2017). Cancer Research : 77, 2964-2975.

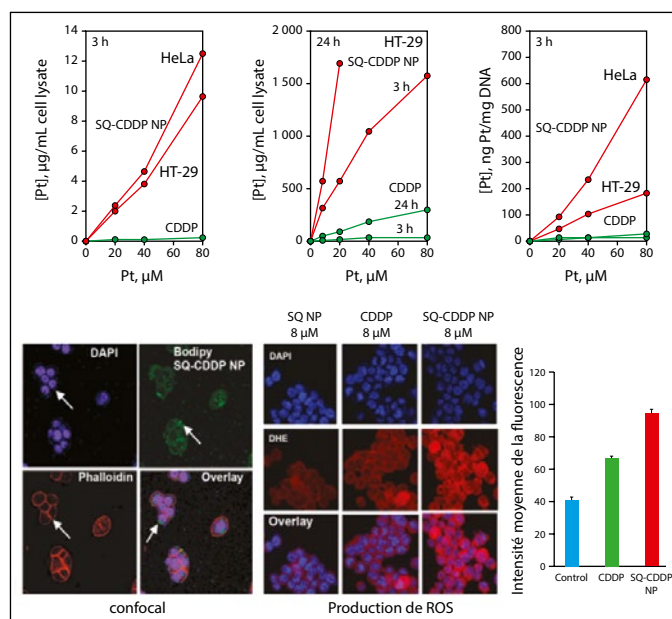


Figure 18

Sous forme de nanoparticule, le cisplatine entre dans les cellules (A,B, D) et agit sur l'ADN de manière beaucoup plus importante que lorsque l'anticancéreux est incubé sous forme libre (C).

De plus, les nanoparticules de cisplatine-squalène augmentent de manière spectaculaire la production de radicaux libres oxygénés (ROS, « reactive oxygen species ») (E).

Source : Kotelevets et coll. (2017). Cancer Research : 77, 2964-2975.

3.3. Comment les nanoparticules squalénées atteignent-elles les cellules tumorales ?

Comment expliquer l'origine de l'affinité des nanoparticules pour les cellules tumorales alors qu'elles n'ont pas de ligands spécifiques pour les reconnaître ? La membrane des cellules tumorales se caractérise souvent par l'hyper-expression de récepteurs aux LDL. Ceux-ci permettent aux cellules cancéreuses de capter les lipides et, en particulier, le cholestérol dont elles ont besoin pour créer de la membrane et se multiplier. D'ailleurs, les patients cancéreux ont souvent un faible taux de cholestérol circulant. Or, le squalène a une structure chimique très proche de celui-ci dont il est le précurseur, et nous avons émis l'hypothèse qu'après administration intraveineuse, les nanoparticules squalénées se déstructureraient rapidement, favorisant ainsi l'insertion des bioconjugués au sein des LDL, qui sont ensuite eux-mêmes reconnus par les récepteurs

aux LDL situés à la surface des cellules cancéreuses. En d'autres termes, le squalène utilise les LDL comme vecteurs « indirects » pour le ciblage des tumeurs (**Figure 19**).

Nous avons vérifié cette hypothèse par une expérience *in vitro* assez simple dans laquelle du sang humain a été incubé avec des nanoparticules de gemcitabine-squalène marquées radioactivement. Cela a permis d'étudier la distribution sanguine du bioconjugué entre les LDL, les VLDL, les HDL, l'albumine, les débris cellulaires et la phase aqueuse. Une fraction extrêmement importante de la gemcitabine squalénée se retrouve dans les LDL (**Figure 20A**), alors la gemcitabine incubée sous forme libre avec le sang humain présente une biodistribution sanguine totalement différente et se localise au niveau de la phase aqueuse (**Figure 20B**).

Ces résultats ont été complétés par une étude *in vivo* chez le rat. Il est à noter que

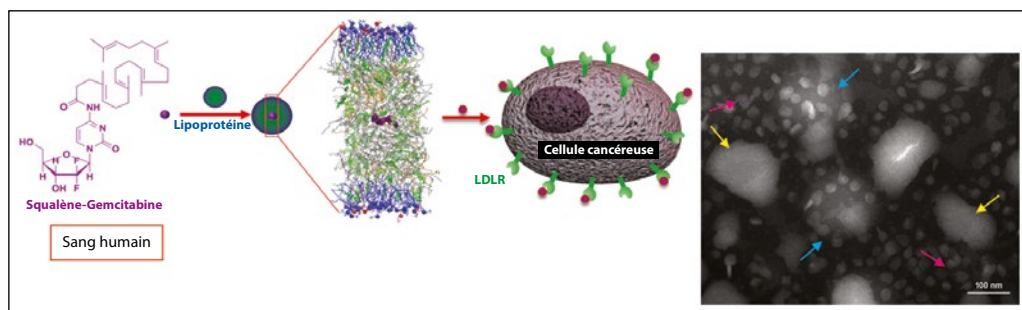


Figure 19

Mécanisme de reconnaissance du bioconjugué de gemcitabine-squalène par les récepteurs LDL en surface des cellules cancéreuses. À droite, une image en microscopie électronique à transmission montrant la déstructuration des nanoparticules de gemcitabine-squalène et leur interaction avec les LDL *in vitro*.

Adapté de Sobot et coll. (2017). *Nature Comm*, 8 : 15678.

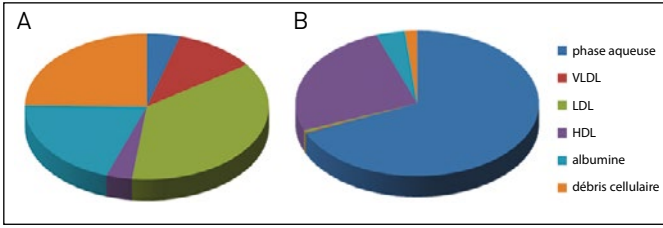


Figure 20

Distribution de la gemcitabine marquée radioactivement après incubation avec du sang humain : A) sous forme squalénée ; B) sous forme libre.

Source : Sobot et coll. (2017). Nature Comm, 8 : 15678.

chez les rongeurs, les transporteurs de cholestérol sont, contrairement à l'homme, les HDL. Le rat a, en effet, très peu de LDL. Après injection de la gemcitabine-squalène à ces animaux de laboratoire, nous avons séparé les VLDL, HDL, LDL, ainsi que la fraction non lipoprotéique, et nous avons mesuré la radioactivité dans ces différentes fractions. La **Figure 21A** montre que la radioactivité (c'est-à-dire la gemcitabine squalénée) est clairement retrouvée au niveau de la fraction HDL et qu'elle se superpose parfaitement avec la distribution du cholestérol (courbe bleue).

La même expérience menée avec des nanoparticules d'adénosine-squalène donne lieu à la même répartition en faveur des HDL (**Figure 21B**).

Nous avons ensuite étudié la manière dont les récepteurs LDL interagissent avec ces nanoparticules squalénées. Plus les récepteurs aux LDL sont nombreux à la surface de la cellule tumorale, plus le principe actif pénètre bien à l'intérieur de la cellule, les cellules MDA-MB exprimant beaucoup plus les récepteurs aux LDL que les cellules MCF-7.

En conclusion, comme la capture des LDL est fortement augmentée dans les cellules néoplasiques en division, l'approche suivie peut avoir des implications importantes pour le traitement du cancer. D'ailleurs, des travaux plus anciens avaient déjà envisagé de prélever des LDL pour y incorporer des molécules anticancéreuses. Mais ces

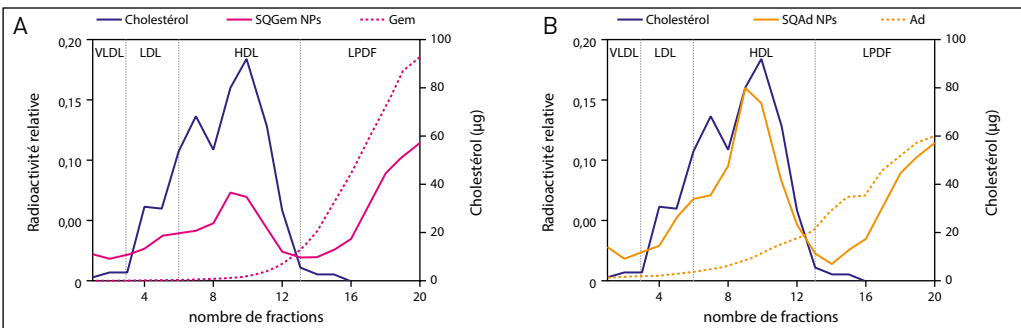


Figure 21

La distribution de la radioactivité montre que les dérivés squalénés (A : SQGem NPs et B : SQAd NPs) se concentrent dans les HDL. Leur distribution se superpose parfaitement à celle du cholestérol.

Source : Sobot et coll. (2017). Nature Comm, 8 : 15678.

approches ont été abandonnées en raison de la complexité des méthodologies mises en œuvre pour l'isolation des LDL à partir des donneurs, des problèmes liés à leur conservation (c'est-à-dire l'agrégation, la dégradation, etc.), et de la difficulté d'y incorporer des médicaments. En provoquant l'insertion de médicaments *in situ*, directement dans les LDL circulants, la stratégie de « squalénisation » a permis de résoudre ce problème et de proposer le nouveau concept de « vectorisation indirecte » de médicaments.

3.4. Application au traitement des maladies du système nerveux central

L'adénosine est un neurotransmetteur et un neuromodulateur qui devrait avoir une activité pharmacologique dans le traitement des maladies du système nerveux central. Mais ce n'est malheureusement pas le cas, pour deux raisons :

- l'adénosine est très rapidement métabolisée après administration intraveineuse : son temps de demi-vie plasmatique n'est que de 10 secondes ;

- c'est une molécule très hydrophile qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique¹⁴.

Afin d'éviter la métabolisation rapide de l'adénosine par déamination en inosine, nous avons couplé l'adénosine au squalène au niveau de sa fonction aminée (Figure 22). En milieu aqueux, ce bioconjugué forme à nouveau des nanoparticules, cette fois-ci sphériques, et l'analyse par diffraction des rayons X montre une structure en éponge.

L'activité de ces nanoparticules d'adénosine squalénée a été testée sur un modèle animal de trauma de la moelle épinière. Les animaux traités par l'adénosine sous forme libre (en rouge dans la Figure 23A) ne voient pas apparaître d'amélioration de leur score locomoteur et restent paralysés des pattes postérieures pendant toute la durée de l'expérience, exactement comme les animaux contrôles non traités

14. Barrière hémato-encéphalique : barrière physiologique présente dans le cerveau entre la circulation sanguine et le système nerveux central. Elle protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang.

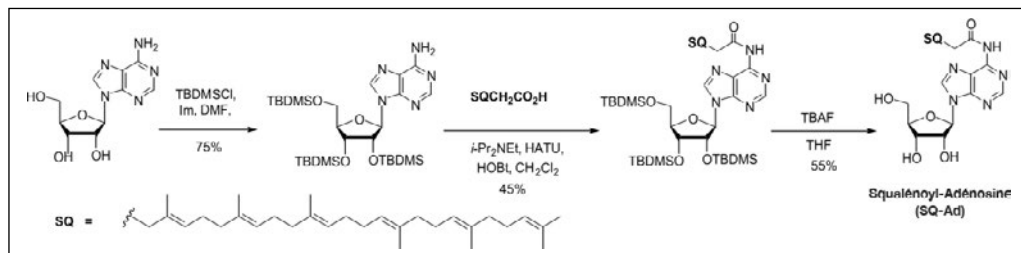


Figure 22

Synthèse du bioconjugué d'adénosine-squalène.

(en noir dans la **Figure 23A**). En revanche, le traitement par l'adénosine-squalène (en jaune dans la **Figure 23A**) permet une récupération relativement rapide : après trois jours, les animaux retrouvent une capacité de marche normale, et après dix-huit jours ils ont récupéré la totalité du score locomoteur.

Des biopsies réalisées au niveau du trauma montrent que les axones¹⁵ ont subi beaucoup de dommages.

15. Axone : prolongement du neurone qui conduit le signal électrique du corps cellulaire vers les zones synaptiques.

Chez les animaux traités par les nanoparticules d'adénosine-squalène, il y a beaucoup moins d'axones lésés.

L'efficacité pharmacologique des nanoparticules adénosine-squalène a également été testée sur un modèle expérimental d'ischémie cérébrale¹⁶. Le protocole du test consiste à insérer un filament dans une des carotides de la souris en vue d'induire une

16. Ischémie cérébrale : processus d'arrêt de l'apport de sang artériel au niveau du cerveau. Elle est responsable de lésions cérébrales irréversibles en cas d'interruption prolongée, ce qui nécessite une prise en charge en urgence.

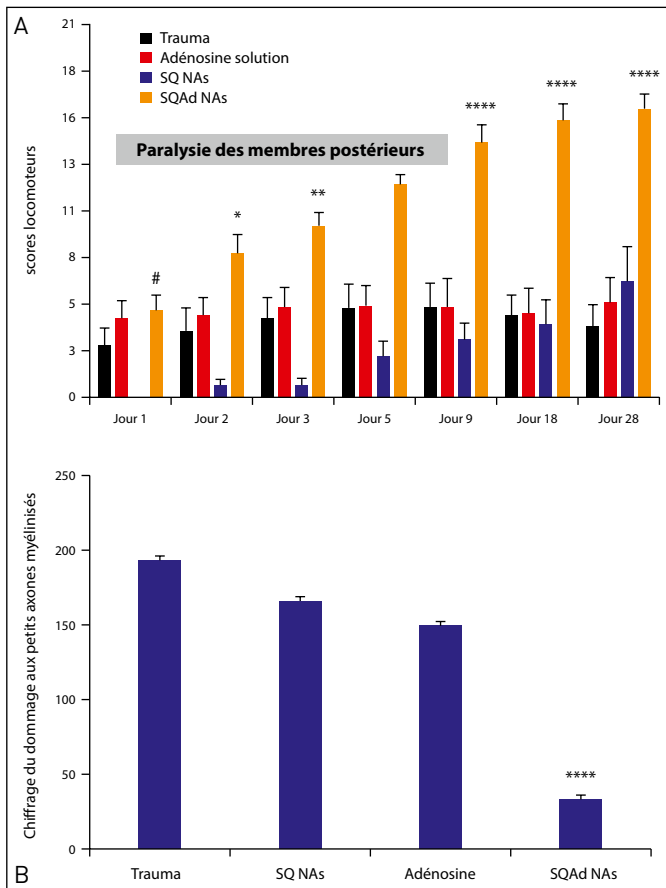


Figure 23

A) Récupération locomotrice observée après traitement par les nanoparticules adénosine-squalène (SqAd NAs), par des nanoparticules de squalène seul (Sq NAs), par l'adénosine libre (Ad) comparativement aux animaux non traités (trauma) ; B) les biopsies effectuées montrent que l'adénosine-squalène préserve leurs structures et réduit les dommages.

Source : Gaudin et coll. (2014). *Nature Nanotechnology*, 9 : 1054.

zone ischémisée dont on peut mesurer le volume. Quand ces animaux sont traités par l'adénosine sous forme libre, le volume de la zone ischémisée n'est pas réduit par rapport aux animaux contrôles non traités (**Figure 24A**). Après administration de nanoparticules d'adénosine-squalène à la dose de 7,5 mg/kg ou de 15 mg/kg avant ischémie ou avec une dose de 15 mg/kg après ischémie à la reperfusion, la zone ischémisée est fortement réduite (**Figure 24A**), ce qui se traduit par une amélioration considérable du déficit neurologique des animaux (**Figure 24B**).

Il faut noter que dans l'ischémie cérébrale, toute une série de microcapillaires cérébraux sont embolisés par

des érythrocytes et des plaquettes, ce qui rend souvent la re-perfusion inefficace en clinique. Il a été observé chez l'animal que le traitement par les nanoparticules d'adénosine-squalène réduit considérablement le nombre de petits vaisseaux ischémisés, ce qui conduit à un effet neuroprotecteur accompagné d'une reperfusion plus efficace.

Nous avons émis l'hypothèse que l'effet thérapeutique des nanoparticules d'adénosine-squalène pouvait s'expliquer par :

- la protection de l'adénosine de la métabolisation rapide ;
- la lipophilisation par le squalène, permettant le passage à travers la barrière hémato-encéphalique.

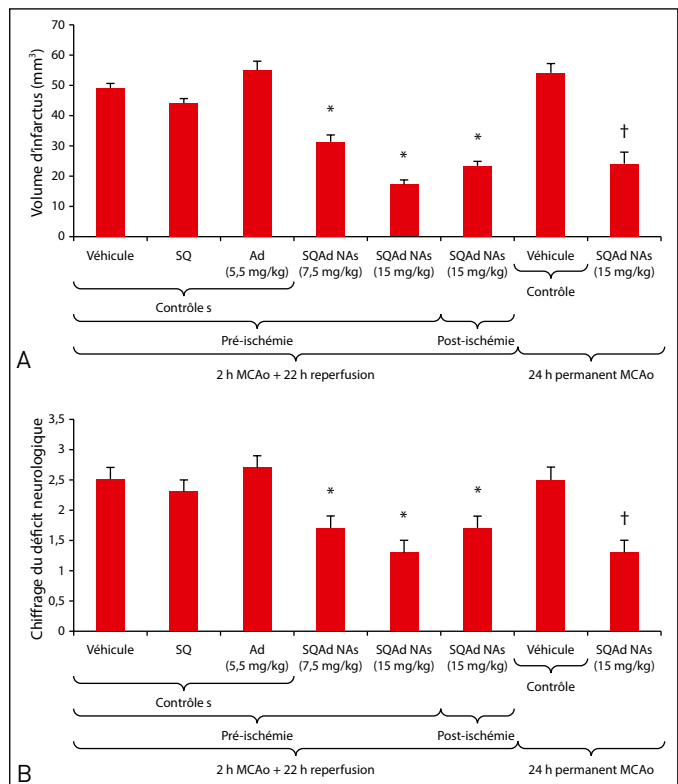


Figure 24

A) Une réduction du volume de l'ischémie cérébrale est obtenue après traitement par les nanoparticules d'adénosine-squalène (SQAd NAs) alors que le traitement par l'adénosine libre (Ad) n'a aucun effet ; B) les nanoparticules d'adénosine-squalène réduisent le déficit neurologique de manière plus importante que l'adénosine sous forme libre.

Source : Gaudin et coll. (2014). *Nature Nanotechnology*, 9 : 1054.

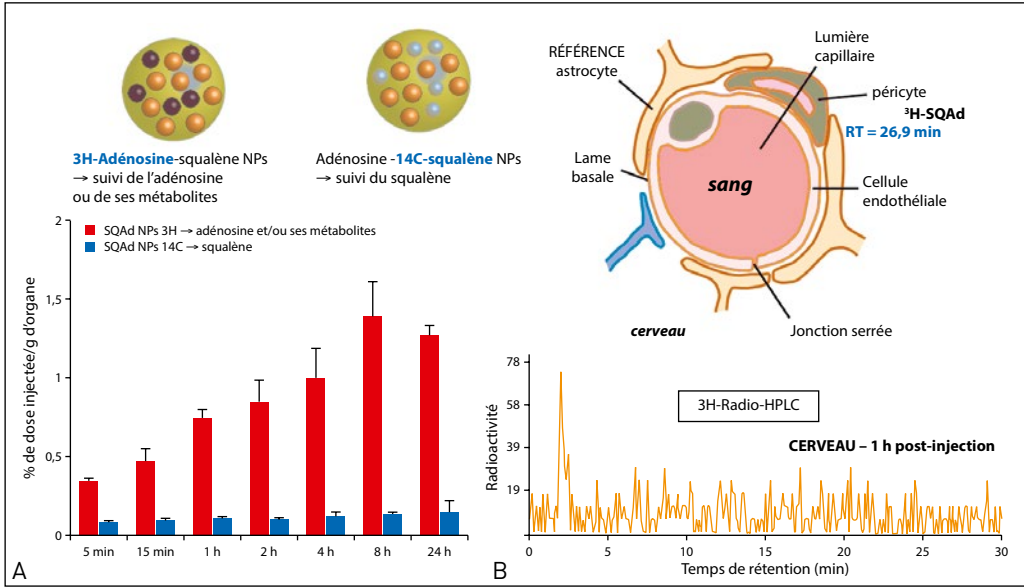


Figure 25

L'adénosine-squalène ne diffuse pas au sein du parenchyme cérébral, à travers la barrière hémato-encéphalique : A) étude des concentrations cérébrales en tritium (rouge, correspondant au marquage de l'adénosine au sein du bioconjugué d'adénosine-squalène) et en carbone 14 (bleu, correspondant au squalène au sein du bioconjugué d'adénosine-squalène) ; B) une étude par radio-HPLC montre l'absence d'adénosine au niveau cérébral.

Source : Gaudin et coll. (2014). *Nature Nanotechnology*, 9 : 1054.

Pour cela, nous avons marqué radioactivement les nanoparticules de la manière suivante avant de les injecter aux animaux : la partie squalène a été marquée au carbone 14 et la partie adénosine au tritium. Cette méthodologie a permis de suivre la biodistribution des nanoparticules au niveau cérébral.

La **Figure 25A** montre l'absence de diffusion du carbone 14 au niveau cérébral tandis que le taux de tritium reste également faible et ne signe pas la présence d'adénosine (étude en radio-HPLC réalisée en collaboration avec le CEA). Comment expliquer alors les effets pharmacologiques observés ?

L'étude pharmacocinétique a montré qu'après injection

intraveineuse des nanoparticules, une importante concentration d'adénosine-squalène est retrouvée au niveau du torrent circulatoire pendant au moins 60 minutes, ce qui n'est pas le cas quand on injecte l'adénosine sous forme libre, qui est immédiatement métabolisée (**Figure 26**).

Or, l'adénosine est une molécule qui a plusieurs types de récepteurs, A1, A2A, A2B et A3 ; certains de ces récepteurs, notamment le récepteur A2B, sont localisés le long de l'endothélium vasculaire¹⁷ et induisent une relaxation des

17. Endothélium vasculaire : couche cellulaire la plus interne des vaisseaux sanguins, celle en contact avec le sang.

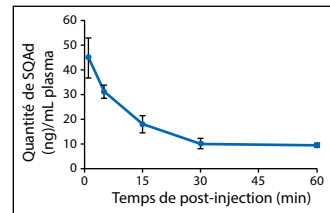


Figure 26

Concentrations plasmatiques d'adénosine-squalène après injection intraveineuse.

Source : Gaudin et coll. (2014). *Nature Nanotechnology*, 9 : 1054.

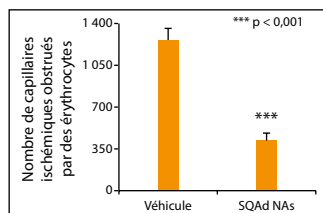


Figure 27

Réduction du nombre de capillaires ischémiques après traitement par les nanoparticules d'adénosine-squalène.

Source : Gaudin et coll. (2014). *Nature Nanotechnology*, 9 : 1054.

vaisseaux en présence d'adénosine. C'est probablement par ce biais, en maintenant des concentrations plasmatiques élevées, que s'effectue l'effet neuroprotecteur des nanoparticules d'adénosine-squalène sur la microcirculation cérébrale (Figure 27).

Il est intéressant de noter que dans le domaine de la nanomédecine, de nombreux chercheurs essaient de développer des nanoparticules qui sont fonctionnalisées avec, par exemple, de la transferrine ou des anticorps monoclonaux en vue de passer la barrière hémato-encéphalique et délivrer leur contenu médicamenteux au niveau cérébral. Les résultats de ce travail sont intéressants puisqu'ils montrent qu'il est possible d'induire une activité pharmacologique cérébrale, en dépit d'un principe actif qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, simplement

en agissant sur des récepteurs périphériques. C'est un message important pour le traitement de certaines maladies neurologiques car il est plus facile de cibler des récepteurs périphériques que de passer la barrière hématoencéphalique.

4 Les nanoMOFs : une nouvelle forme d'encapsulation

Gérard Férey et Christian Serre ont développé des matériaux hybrides organiques/inorganiques absolument fantastiques qui se caractérisent par une porosité très élevée. Par exemple avec des clusters d'oxyde de fer complexés à des diacides, on peut aussi contrôler le volume et la dimension des pores (Figure 28).

En collaboration avec cette équipe, nous avons développé une forme nanoparticulaire de

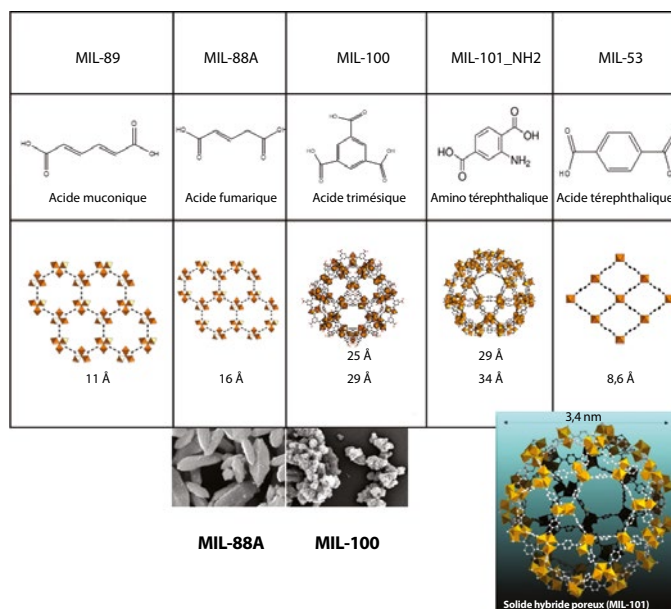


Figure 28

Utilisation de nanoparticules hybrides organiques-inorganiques (NanoMOFs) pour encapsuler des principes actifs et faire de l'imagerie.

Adapté de Horcajada et coll. (2010). *Nature Materials*, 9 : 172-178.

ces matériaux, les nanoMOFs, dont la dimension des pores peut être parfaitement adaptée à la molécule à encapsuler.

Par exemple, le Busulfan, une molécule très utilisée en pédiatrie oncologique, induit malheureusement, dans certains cas, une maladie hépatique veino-occlusive. Elle résulte de la tendance de cette molécule à cristalliser.

L'encapsulation du busulfan dans les pores des nanoMOFs sépare chaque molécule de sa voisine et empêche tout phénomène de cristallisation. Il a ainsi été possible d'encapsuler des quantités de busulfan pouvant aller jusqu'à 25 % par rapport à la masse de ce matériel hybride hyperporeux. Cette technologie a donc permis d'encapsuler une molécule qu'il était impossible d'encapsuler dans des nanovecteurs classiques (liposomes, nanoparticules ou micelles polymères).

De plus, grâce à la présence des oxydes de fer, il est possible de faire de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et d'étudier ainsi la biodistribution de ces nanoparticules *in vivo*. Les nanoMOFs représentent donc une classe d'agents « théragnostiques » puisque dans la même particule on associe un médicament anticancéreux, c'est la partie théra, et qu'on peut faire de l'imagerie et donc éventuellement du diagnostic, c'est la partie -gnostique. Cette approche ouvre donc la

voie à la médecine personnalisée.

Par ailleurs, ces nanoMOFs sont sensibles au pH : très stables en milieu acide, ils forment des microagrégats à pH 7, ce qui constitue un inconvénient pour l'administration par voie intraveineuse. Heureusement, ce phénomène d'agrégation est totalement réversible.

Quand les microagrégats de nanoMOFs se forment dans la circulation sanguine, ils s'accumulent immédiatement au niveau du filtre pulmonaire. C'est ce qui a été observé quand on encapsule de la gemcitabine-monophosphate dans des nanoMOFs, une concentration considérable apparaît au niveau pulmonaire, alors que ce n'est pas du tout le cas après injection de la gemcitabine-monophosphate sous forme libre. Il a toutefois été observé que ces phénomènes d'agrégation sont transitoires et réversibles. Ils disparaissent après 4 h et n'induisent pas de processus inflammatoires irréversibles.

Les nanoMOFs chargés en gemcitabine monophosphate ont ensuite été testés sur un modèle expérimental de métastases pulmonaires (le Lewis lung carcinome). Contrairement au traitement avec le cytostatique administré sous forme libre, ils induisent une diminution considérable du nombre de métastases grâce au ciblage du tissu pulmonaire.

Le futur de l'encapsulation

En conclusion, les grands défis du « *drug delivery* » sont les suivants :

- le développement de nanovecteurs avec des taux de charges en médicament élevés et capables de libérer le principe actif de façon contrôlée par la cellule ou par le tissu cible ;
- la conception d'approches nouvelles susceptibles d'augmenter la concentration du médicament vectorisé dans les tissus cibles (par exemple les tumeurs). L'effet de perméabilité et de rétention accrue (effet EPR) au niveau des tissus inflammatoires, des tissus infectés ou des tumeurs peut être mis à profit, mais cet effet est malheureusement très variable d'un patient à l'autre et selon le stade évolutif de la tumeur. Il faut donc probablement faire de la médecine de précision et choisir les patients pouvant bénéficier efficacement du traitement par la nanomédecine en fonction de la réalité de l'effet EPR. Pour cela, les patients pourraient être pré-traités par des nanotechnologies possédant un marqueur d'imagerie de manière à pouvoir prédire l'accessibilité de la tumeur au nanomédicament anticancéreux ;
- l'utilisation des nanotechnologies pour contourner les mécanismes de résistance. Plusieurs exemples concernant l'oncologie ont été traités dans ce chapitre. Ils illustrent la nécessité de bien connaître les bases physiopathologiques des mécanismes de résistance pour pouvoir les contourner à l'aide de nanovecteurs. Mais il y a aussi des applications potentielles dans le domaine des maladies infectieuses résistantes, notamment lorsqu'elles sont intracellulaires, et probablement aussi des applications dans certaines maladies du système nerveux central, notamment la dépression ;

– le développement de nanovecteurs sensibles à un stimulus endogène (diminution du pH dans certaines tumeurs, sensibilité à des enzymes, influence du potentiel redox, etc.) ou exogène (champ magnétique, champ électrique, lumière, ultrasons, etc.) devrait permettre d'avoir des nanomédicaments encore plus spécifiques.

Ce chapitre a illustré l'importance d'une recherche pluridisciplinaire pour la mise au point de nanomédicaments efficaces. Mais la chimie y occupe une place centrale : les couplages du squalène avec toute une série de molécules relèvent de la chimie comme aussi la conception de matériaux (polymères) biodégradables et biocompatibles. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules relève quant à elle de la chimie de bioconjugaison. Mais l'implication de biologistes moléculaires et cellulaires et de pharmacologues est également indispensable, comme l'ont montré les exemples d'application en oncologie ou dans le domaine des neurosciences.