



HAL
open science

Les liposomes en thérapie orale et parentérale

Annabelle Chastagnier

► **To cite this version:**

Annabelle Chastagnier. Les liposomes en thérapie orale et parentérale. Sciences pharmaceutiques. 1998. dumas-01651779

HAL Id: dumas-01651779

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01651779>

Submitted on 29 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 1998

1998

7035

LES LIPOSOMES EN THERAPIE ORALE ET PARENTERALE

**THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE**

DIPLOME D'ETAT

CHASTAGNIER Annabelle

[Données à caractère personnel]

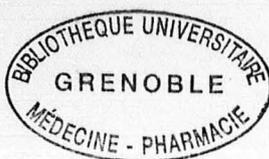
Thèse soutenue le 29 juillet 1998

A 18 heures

Devant le jury composé de :

Mademoiselle le Professeur R. STEIMAN
Mademoiselle P. GUIRAUD maître de conférences
Monsieur D. BROQUET

Président du jury
Docteur en pharmacie
Pharmacien



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 1998

**LES LIPOSOMES
EN THERAPIE ORALE ET PARENTERALE**

**THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE**

DIPLOME D'ETAT

CHASTAGNIER Annabelle

[Données à caractère personnel]

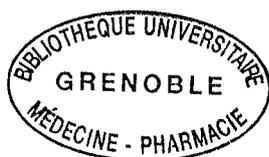
Thèse soutenue le 29 juillet 1998

A 18 heures

Devant le jury composé de :

Mademoiselle le Professeur R. STEIMAN
Mademoiselle P. GUIRAUD maître de conférences
Monsieur D. BROQUET

Président du jury
Docteur en pharmacie
Pharmacien



A NOTRE PRESIDENT,

MADemoiselle LE PROFESSEUR R. STEIMAN,

*qui nous a guidé dans la réalisation de ce travail.
Qu'il trouve ici l'expression de notre infinie reconnaissance pour tous
les conseils et toute la bienveillante sollicitude qu'il ne cessa de nous
témoigner.*

A MADemoiselle P. GUIRAUD,

*qui a bien voulu être notre juge, témoignage de notre profond respect
et de notre reconnaissance.*

A MONSIEUR D. BROQUET ,

*pour son aimable participation au jury de cette thèse.
Au plaisir que j'ai eu, en faisant mon stage de 6^{ème} année, au sein de
son officine. En témoignage de ma considération.*

A MES PARENTS ,

pour vous qui m'avez encouragé tout au long de mes études et pour qui j'ai une grande estime, merci.

A MA SŒUR, VIRGINIE ET A MON FRERE, JEROME,

*en souvenir des bons moments passés ensemble.
L'éloignement géographique ne brisera pas l'amitié fraternelle qui nous unit.*

A MON BEAU FRERE, JACQUES et au petit NICOLAS,

qui vont bientôt accueillir la petite petite GARANCE.

A MA BELLE SŒUR, KAREN,

et à son côté plutôt anglais !

A TOUTE MA FAMILLE,

plus ou moins éloignée, j'ai toujours beaucoup de plaisir à vous voir.

A COLETTE.

A TOUS MES AMIS ET A TOUTE LA PHARMACIE ST JEAN,

trop nombreux pour que je vous cite tous sans peur d'en oublier un, mais je vous ai tous dans mon cœur.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté M. le Professeur A. FAVIER
Vice Doyen M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

AGNIUS-DELORD	Claudine	Physique Pharmacie
ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
ROCHAT	Jacques	Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

INTRODUCTION	10
I. LA MICROENCAPSULATION, QUELQUES GENERALITES	12
I.1. Historique	12
I.2. Définition	15
I.3. Classification	16
I.4. Les domaines d'application	18
II. ASPECTS TECHNIQUES	18
II.1. Propriétés des systèmes phospholipides / eau	18
II.1.1. Structure des phospholipides (PL) (phosphatides ou glycérophosphatides).....	18
II.1.2. Les mouvements d'un phospholipide dans une membrane....	19
II.2. Formulation des liposomes	20
II.2.1. Matières premières.....	20
II.2.1.1. <i>Les phospholipides</i>	21
II.2.1.2. <i>Le cholestérol</i>	23
II.2.1.3. <i>Les agents antioxydants</i>	23
II.2.2. Méthodes de préparation des liposomes.....	24
II.2.2.1. <i>Méthode de préparation par rupture de prébicouches, obtenues après dispersion des phospholipides</i>	25
II.2.2.2. <i>Presse de French</i>	26
II.2.2.3. <i>Préparation de liposomes par dialyse : 'vesisette'</i>	26
II.2.2.4. <i>Préparation de liposomes par injection</i>	27
II.2.2.5. <i>Evaporation en phase inversée : REV</i>	27
II.2.2.6. <i>Méthode d'obtention des liposomes par congélation/décon- gélation</i>	28
II.2.2.7. <i>Avantages et inconvénients de ces différentes méthodes</i>	33

II.3. Méthodes de contrôle.....	34
II.3.1. Pureté, stabilité chimique et dosage des lipides.....	34
II.3.2. Taux d'encapsulation.....	34
II.3.3. Analyses granulométriques.....	36
II.3.4. La stabilité.....	37
III.SEPARATION DU TYPE ET DE LA TAILLE SOUHAITES.....	40
III.1. Sélection.....	40
III.1.1. Chromatographie d'exclusion.....	40
III.1.2. Centrifugation.....	42
III.1.3. Dialyse.....	43
III.2. Calibration.....	43
IV.SEPARATION DE LA FRACTION DE PRINCIPE ACTIF NON ENCAPSULEE.....	44
IV.1. Chromatographie d'exclusion.....	44
IV.2. Chromatographie d'exclusion-diffusion.....	45
IV.3. La dialyse.....	46
IV.4. La centrifugation.....	46
V.CONSERVATION.....	47
VI.MODE D'ADMINISTRATION EN VUE D'UNE ACTIVITE SYSTEMIQUE.....	48
VI.1. Voies parentérales.....	49
VI.2. Voie orale.....	50

VII. EXTRAVASATION DES LIPOSOMES.....	51
VII.1. Fenestrations naturelles.....	51
VII.2. Fenestration « occasionnelles ».....	54
VII.2.1. Site inflammatoire.....	55
VII.2.2. Endothélium défectueux des tumeurs malignes.....	55
VII.3. Protéines P.....	56
VIII. INJECTION D'UN LIPOSOME PAR VOIE PARENTERALE.....	57
VIII.1. Interactions avec les composants du sang.....	57
VIII.1.1. Lipoprotéines.....	58
VIII.1.2. Technique du taxi.....	58
VIII.2. Interactions avec le système phago-mononucléé.....	58
VIII.3. Interaction possible avec des cellules parenchymateuses du foie.....	59
VIII.4. Interaction cellulaire.....	60
IX. LES LIPOSOMES A LIBERATION SPECIFIQUE.....	63
IX.1. Liposomes thermo-sensibles.....	63
IX.2. Liposomes pH-sensibles.....	64
IX.3. Liposomes fusogènes.....	64
X. LES LIPOSOMES PILOTABLES.....	65
XI. LES LIPOSOMES AUTO-PILOTES.....	65

APPROCHE MEDICALE.....	67
I. PRESENTATION.....	68
II. POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUES DES LIPOSOMES.....	71
II.1. Influence sur la distribution.....	71
II.2. Influence sur l'absorption et l'élimination.....	74
III. LE LIPOSOME EN TANT QUE VECTEUR.....	75
IV. EXEMPLES D'APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.....	77
IV.1. Transferts de principes actifs.....	77
IV.1.1 Les antifongiques.....	77
<i>IV.1.1.1. Généralités.....</i>	<i>78</i>
<i>IV.1.1.2. Caractéristiques des antifongiques liposomiaux.....</i>	<i>80</i>
<i>IV.1.1.3. Essais internationaux multicentriques.....</i>	<i>82</i>
IV.1.2. Les antibiotiques.....	83
IV.1.3. Les antitumoraux.....	85
IV.1.4. La Dopamine.....	86
IV.1.5. Un antiviral.....	87
IV.1.6 La vaccination.....	89
IV.2. Transfert d'ADN et de gènes par les liposomes.....	90
IV.2.1. Généralités.....	91

IV.2.2 Applications aux cancers.....	98
IV.2.2.1. Exemple d'une tumeur maligne du cerveau.....	99
IV.2.2.2. Exemple des cancers ovariens et du sein.....	103
IV.2.2.3. Exemples de tumeurs hépatiques.....	105
IV.2.3. Correction d'anomalies génétiques par thérapie génique...	110
IV.2.3.1. Correction au niveau du système nerveux central (SNC)	110
IV.2.3.2. Correction au niveau des yeux.....	112
IV.2.3.3. Correction au niveau des poumons.....	114
IV.2.3.4. Correction de l'hypertension artérielle.....	118
CONCLUSION.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	121
LE SERMENT DES APOTHICAIRES.....	129
RESUME.....	130

INTRODUCTION

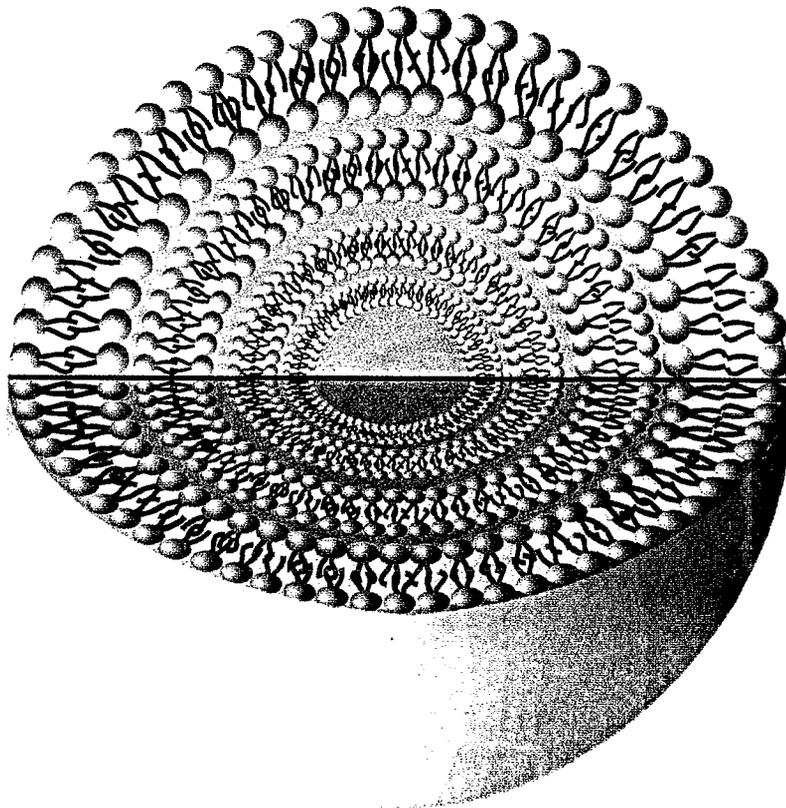
Les liposomes sont des vésicules de phospholipides artificiels découvertes par Bangham dans les années soixantes (figure n° 1) ; depuis leur première apparition sur la scène scientifique, ils font l'objet d'un nombre considérable de travaux visant à mettre en évidence et à promouvoir leurs potentialités thérapeutiques en tant que vecteurs de molécules médicamenteuses.

Il convient de préciser que dans ce travail, nous ne traitons ni les études concernant la cosmétologie ni celles de la dermatologie des liposomes. Sujet ayant été traité le 10 juillet 1998 par Sabine Alzas.

Dans une première partie nous envisageons successivement, les données théoriques et expérimentales.

Dans une deuxième partie nous abordons les différentes études de l'utilisation des liposomes dans de nombreuses pathologies.

L'ensemble de ces études démontrent-elles l'intérêt des liposomes, au niveau du ciblage, de la toxicité et de l'efficacité, par rapport au médicament non véhiculé par les liposomes ? c'est ce que nous allons voir dans cette thèse.



Vue tridimensionnelle d'un liposome, Koch, 1997.

figure n° 1

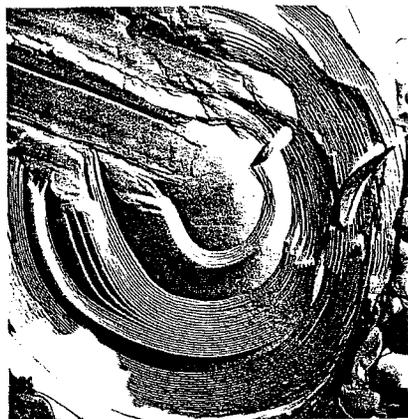
I. LA MICROENCAPSULATION, QUELQUES GENERALITES

Cette microencapsulation représente une réalité thérapeutique, il existe déjà des produits qui ont leur AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). L'OREAL et DIOR réalisent la première formulation de liposomes après trente ans d'efforts et de recherches, avec des investissements énormes, mais il reste encore à résoudre certains problèmes technologiques et à mieux connaître leur devenir *in vivo*.

I.1. Historique

Le concept de liposome est apparu au début des années 1960 avec les travaux de microscopie électronique effectués par Bangham.

Il fut le premier à montrer, à l'aide de lécithine d'œuf, que des phospholipides purifiés se réorganisent spontanément en présence d'eau, pour former ce qu'il dénomme alors, des « sphérulites » (figure n° 2).



SPHERULITE en microscopie électronique en cryofracture, Koch, 1997.
figure n° 2

Ces structures, plus connues maintenant sous le nom de liposomes, sont le résultat de l'arrangement de composés amphiphiles qui s'organisent en bicouches concentriques, séparées par le milieu aqueux.

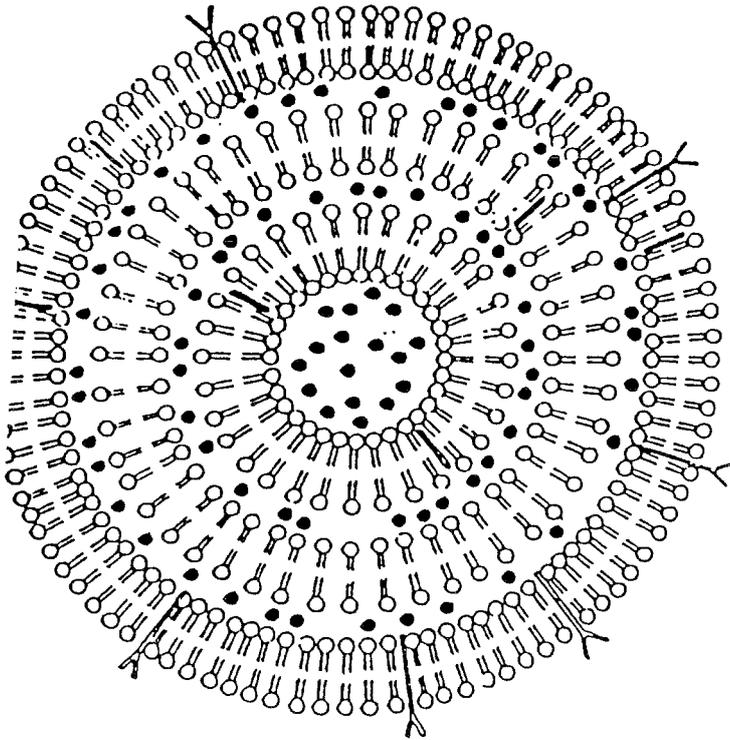
La similitude de constitution entre une telle bicouche lipidique et une membrane cellulaire naturelle fut rapidement utilisée pour étudier différentes propriétés de la membrane cellulaire :

- perméabilité,
- potentiel de membrane,
- mécanisme d'action des anesthésiques locaux,
- reconstitution de systèmes lipides-protéines complexes permettant d'étudier isolément une fonction spécifique de la membrane.

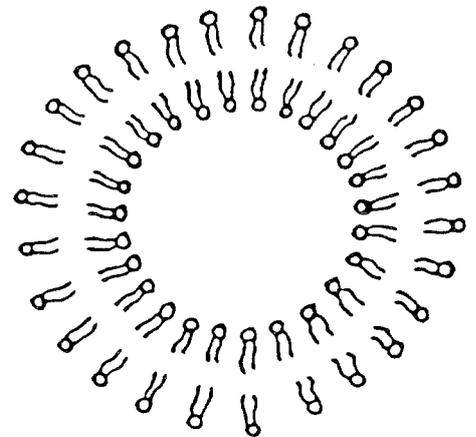
Par ailleurs, dès que l'on a pris conscience de l'intérêt de leur compartiment aqueux, complètement isolé du milieu extérieur par la bicouche lipidique, les liposomes ont été considérés comme des vecteurs potentiels de molécules (Vidal, 1993). C'est à cet aspect, générateur d'applications dans de nombreuses disciplines telles que la pharmacologie, la biologie cellulaire et la biochimie moléculaire, que nous nous intéressons ici.

Les premières expériences utilisant les liposomes à des fins biomédicales sont performantes dans des systèmes *in vitro*. A ce stade le problème n'est pas suffisamment étudié. En même temps, au début de 1970 la première expérience réalisée *in vivo*, avec les liposomes montre que ceux-ci sont facilement détruits dans la circulation, avec perte de leur contenu. Plus tard, on observe que les enzymes sanguines, comme les phospholipidacylhydrolases et les phospholipidacyltransferases, sont responsables de la dégradation des phospholipides liposomiaux et on essaie alors d'obtenir des liposomes plus stables à partir d'analogues de phospholipides non hydrolysables. Cependant les dérivés de phospholipides artificiels présentent des effets toxiques chez les animaux utilisés ; cet inconvénient est atténué par l'utilisation d'un revêtement qui isole les liposomes du milieu environnant.

La structure vésiculaire est formée de micromembranes, composée d'une architecture d'aspect sphérique mono ou multilamellaire (figure n° 3).



- Schéma d'un liposome multilamellaire

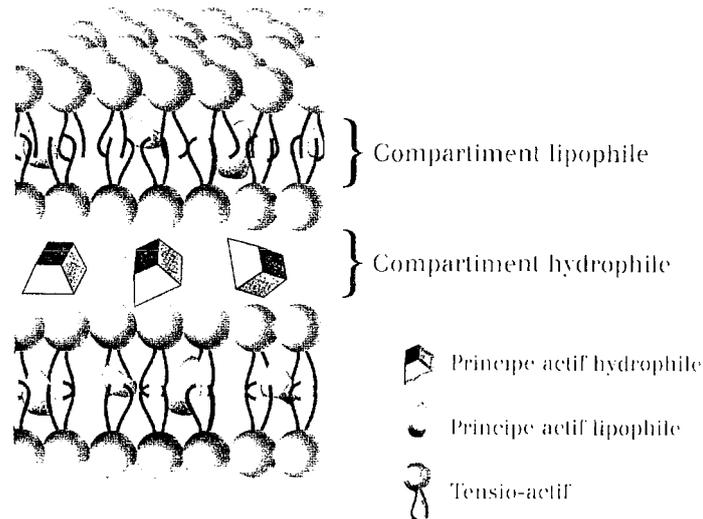


- Schéma d'un liposome unilamellaire

Diamètre 25 à 50 nm

figure n° 3

En ce qui concerne les caractères physico-chimiques où se situe le principe actif (PA) au niveau du liposome ?



Détail des bicouches et de l'encapsulation des principes actifs, Koch, 1997.
figure n° 4

Selon les types de liposome (figure n° 4) :

- dans l'espace interne aqueux (de 20 nm à 1 μ m de diamètre) et l'espace intermembranaire si le principe actif est **hydrosoluble**,
- un peu partout s'il est **amphiphile**,
- dans la matrice hydrophobe s'il est **liposoluble**.

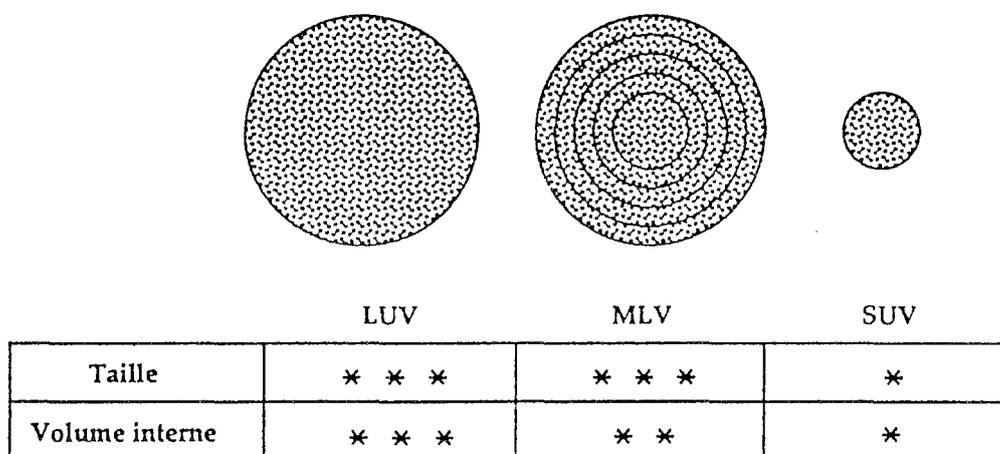
I.2. Définition

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques bilamellaires. Leur capacité à piéger l'eau et les solutés à l'intérieur de la bicouche lipidique en fait de bons modèles, non seulement pour les études de perméabilité membranaire, mais aussi pour le transport de molécules à visée thérapeutique. De nombreuses techniques sont proposées pour préparer les liposomes à partir de composés amphiphiles tels que les phospholipides (Puisieux et Delattre, 1985).

I.3. Classification

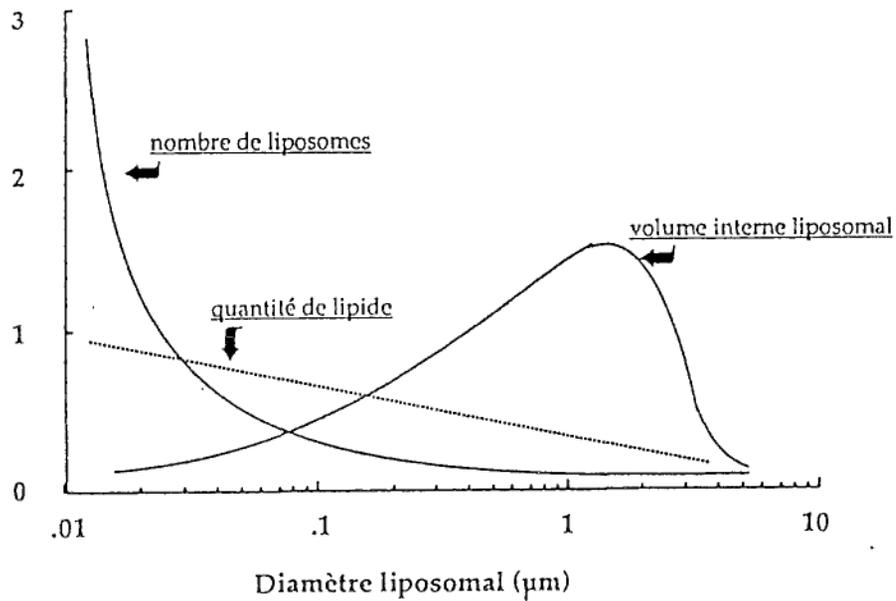
Il existe plusieurs techniques de fabrication des liposomes qui produisent plusieurs types de vésicules différentes par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Selon la méthode utilisée, il est possible d'obtenir (figure n° 5-6, Tableau I) :

- des liposomes multilamellaires M.L.V.,
- des petits liposomes unilamellaires S.U.V.,
- des gros liposomes unilamellaires L.U.V.,
- des liposomes obtenus par évaporation en phase inversée R.E.V. (Fattal *et al*, 1993).



Comparaison schématique de la taille et du volume interne en fonction du type de liposome. LUV : large unilamellar vesicle ; MLV : multilamellar vesicle ; SUV : small unilamellar vesicle.

figure n° 5

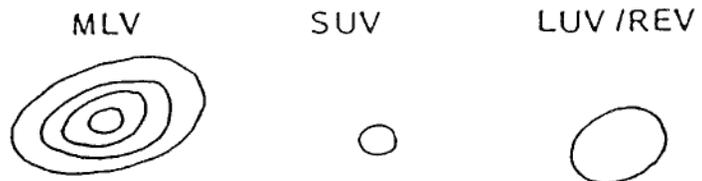


Distributions de la quantité de lipide et du volume interne d'une préparation de liposomes unilamellaire, en fonction de la taille des vésicules.

On représente dans cette figure une population de vésicules unilamellaires formées à partir d'une suspension de liposomes multilamellaires : la distribution du nombre de vésicules s'effectue de manière exponentielle vers les diamètres les plus faibles. Bien que 80 % des vésicules aient un rayon inférieur à 0,2 µm, 80 % du volume total encapsulé correspond à des liposomes de taille supérieure.

(Vidal, 1993)
figure n° 6

Dans le tableau I, sont indiquées quelques ordres de grandeur concernant les liposomes.



	MLV	SUV	LUV /REV
Diamètre (nm)	400 à 3500	20 à 50	200 à 1000
Volume aqueux (µl/mg)	4,1	0,5	13,7
Encapsulation (%)	5 à 15	0,5 à 1	35 à 65

Classification des liposomes :
Tableau I

I.4. Les domaines d'application

Il sont très nombreux et variés tel que :

- l'agro-alimentaire (affinage de fromage).
- la physiologie (échanges).
- la cosmétologie.
- la dermatologie.
- la thérapeutique.

II. ASPECTS TECHNIQUES

II.1. Propriétés des systèmes phospholipides / eau

II.1.1. Structure des phospholipides (PL) (phosphatides ou glycérophosphatides).

Ils résultent de l'estérification du glycérol par deux acides gras et par l'acide phosphorique. Ce sont des dérivés amphiphiles qui possèdent une extrémité polaire formée par un alcool, de l'acide phosphorique et du glycérol et une extrémité apolaire constituée de deux chaînes aliphatiques, caractérisées par leur longueur et leur degré d'insaturation.

Lorsque l'on place des phospholipides en présence d'un excès d'eau, les chaînes aliphatiques se mettent en surface coté air, et les têtes polaires entrent en contact avec l'eau, cela forme un film.

Cette aptitude à s'arranger dans un excès d'eau sous forme de film lamellaire caractérise ces lipides.

II.1.2. Les mouvements d'un phospholipide dans une membrane

Ces mouvements lui permettent :

- la rotation autour d'un axe perpendiculaire à la membrane,
- le « flip-flop » intervient dans certaines membranes biologiques, telle que celle du reticulum endoplasmique, grâce à des protéines d'échange des phospholipides qui catalysent un mouvement rapide de bascule des phospholipides de leur monocouche d'origine vers la monocouche opposée,
- la diffusion latérale,

Tous ces mouvements participent à la dynamique du système. Chacun a sa propre vitesse, cela confère des propriétés différentes. Le passage d'un état à un autre se fait par transfert de phase.

Les phospholipides sont lyotropes (teneur en eau) et thermotropes. La température de transition de phase pour un système donné dépend :

- du pH,
- de la force ionique,
- de la présence de cations.

Donc pour caractériser un phospholipide, on fait un diagramme de phase. Le changement de phase varie en fonction de la teneur en lipides.

Un phospholipide occupe un volume avec un arrangement dans l'espace : Les facteurs de forme sont essentiels, car ils induisent le «molecular packing», qui donne une bonne stabilité.

Il faut donc jouer sur la composition des phospholipides.

II.2. Formulation des liposomes

Pour la formulation des liposomes, plusieurs constituants et de nombreuses méthodes de préparations peuvent être utilisés.

II.2.1. Matières premières

Généralement, la membrane des liposomes est composée d'un mélange de substances lipidiques, le Tableau II en donne les principaux constituants.

	CONSTITUANT PRINCIPAL	CONSTITUANT SECONDAIRE
LIPIDES AMPHIPHILES IONIQUES	PHOSPHATIDYL CHOLINE LECITHINE HYDROGENEE GLYCYL CERAMIDES Phosphatidyl éthanolamine Phosphatidyl sérine FRACTIONS spéciales de PHOSPHOLIPIDES	CHOLESTEROL A.D.S. non ioniques CHOLESTEROL CHOLESTEROL
LIPIDES AMPHIPHILES NON IONQUES (NISOSOMES)	Dérivés POLYGLYCEROLÉS en C12-C18 saturé ramifié ou non ou Stérois + OSES ou Glycérol	A.D.S. ioniques CHOLESTEROL

Vésicules sphériques à bicouches lipidiques entourant un cœur aqueux.

Tableau II

II.2.1.1. Les phospholipides

Les phospholipides qui entrent dans la composition des liposomes sont soit des glycerophospholipides d'origine naturelle ou synthétique, saturés ou insaturés, soit des sphingolipides (Tableau III). (Fattal *et al*, 1993).

LIPIDE	ABRÉVIATION GLOBALE	CHARGE	Tc MOLÉCULAIRE	POIDS
Lipides naturels neutres				
Phosphatidylcholine de jaune d'œuf	EPC	0	- 15 à - 7	780
Phosphatidylcholine de soja	SjPC	0	- 15 à - 7	780
Sphingomyéline de cerveau de bovin	SPM	0	32	730
Lipides synthétiques neutres				
Dilauryloyl phosphatidylcholine	DLPC	0	- 1,8	640
Dimyristoyl phosphatidylcholine	DMPC	0	23	696
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	DPPC	0	41	752
Distéaroyl phosphatidylcholine	DSPC	0	58	808
Dioleoyl phosphatidylcholine	DOPC	0	- 22	804
Dimyristoyl phosphatidyléthanolamine	DMPE	0	40	635
Dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine	DPPE	0	60	692
Distéaroyl phosphatidyléthanolamine	DSPE	0	74	748
Dioleoyl phosphatidyléthanolamine	DOPE	0	- 16	744
1-Myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine	MPPC	0	27	724
1-Palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine	PMPC	0	35	724
1-Stéaroyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine	SPPC	0	45	780
1-Palmitoyl-2-stéaroyl phosphatidylcholine	PSPC	0	44	780
Lipides naturels chargés négativement				
Phosphatidylsérine de cerveau de bovin	PS	- 1	6 à 8	800
Lipides synthétiques chargés négativement				
Dimyristoyl phosphatidylglycérol	DMPG	- 1	23	666
Dipalmitoyl phosphatidylglycérol	DPPG	- 1	41	722
Distéaroyl phosphatidylglycérol	DSPG	- 1	55	779
Dioleoyl phosphatidylglycérol	DOPG	- 1	- 18	775
Dimyristoyl acide phosphatidique	DMPA	- 1 ^a	51	592
Dimyristoyl acide phosphatidique	DMPA	- 2 ^b	45	592
Dipalmitoyl acide phosphatidique	DPPA	- 1 ^c	67	648
Dipalmitoyl acide phosphatidique	DPPA	- 2 ^d	58	648
Dipalmitoyl phosphatidylsérine	DPPS	- 1	51	735
Dicetylphosphate	DCP	- 1	-	546
Lipides chargés positivement				
Stéarylamine	SA	+ 1	-	269

a : pH = 6,0 ; b : pH = 9,0 ; c : pH = 6,5 ; d : pH = 9,1.

Propriétés des phospholipides entrant dans la composition des liposomes.

Tableau III

L'addition de phospholipides chargés négativement ou positivement (10 à 20 mol %) permet de limiter les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles.

Les phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes doivent être très purs (pureté supérieure à 99 %), ils doivent être exempts de lysophosphatidylcholine (lysoPC), dont la présence augmente considérablement la perméabilité des membranes des phospholipides.

Les phospholipides insaturés sont des molécules que l'on doit manipuler avec précaution ; en effet l'oxydation en présence de l'oxygène de l'air, peut donner des composés toxiques.

Ils doivent être conservés sous leur forme solide ou en solution à -20°C ou à -70°C, en présence d'azote ou d'argon. Les solutions doivent être conditionnées dans des tubes scellés de façon hermétique ou dans des ampoules injectables, à l'abri de la lumière (Fattal *et al*, 1993).

- Phospholipides naturels :

Les phospholipides naturels peuvent être extraits de lécithine d'œuf ou de soja et sont caractérisés par leurs différents degrés de pureté.

Les industries qui produisent des lécithines naturelles sont :

LUCAS MEYER, STERN, LIPOÏDE

Elles en produisent ~ 10 kg / an (ce qui est assez peu).

Ces phospholipides naturels sont chers et instables, ils subissent des dégradations enzymatiques, des insaturations et des peroxydations.

- Phospholipides synthétiques :

Ce sont des produits stables, bien purs car les chaînes sont toujours les mêmes. Leur polarité est différente avec des charges de surfaces souvent différentes.

Ex : Dipalmétylphosphatidylcholine

- Phospholipides complexes :

Pour stabiliser les phospholipides, on peut greffer différents composés aux phospholipides tel que des stérols (Ex : Métacytostérols), des tensioactifs non anioniques (chez L'OREAL) ou préfluorés, des groupements chimiques par branchement sur des liposomes préformés et des acides.

Il est possible de travailler sur des structures qui ont des caractéristiques cristallines très différentes.

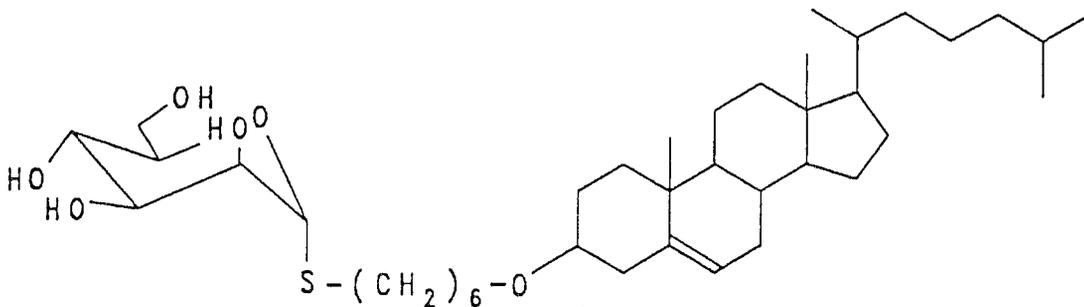
Le recouvrement des liposomes par des polymères entraîne une stabilité dans le liquide biologique.

Les liposomes synthétiques, formés de bicouches, doivent être acceptés par l'organisme. Les membranes de nos cellules, possèdent leur propre système de dégradation, qui va se trouver en contact avec les liposomes. Une fois cette dernière étape réalisée aucune toxicité ne doit en résulter.

II.2.1.2. Le cholestérol

Ses propriétés hydrophobes permettent l'incorporation de ligands dans les liposomes (Fattal *et al*, 1993), (figure n° 7).

Le cholestérol, ajouté dans une proportion de 30 mol %, améliore la stabilité *in vitro* et *in vivo* des liposomes.



Dérivé du 1-thio- α -D-mannose couplé à une ancre hydrophobe : le cholestérol. Cette molécule constitue un exemple de dérivé hydrophobe d'un sucre, obtenu par synthèse chimique. Il permet la mise en place, à la surface de liposomes, de résidus glycosylés.

(Schuber et Frisch, 1993).

figure n° 7

II.2.1.3. Les agents antioxydants

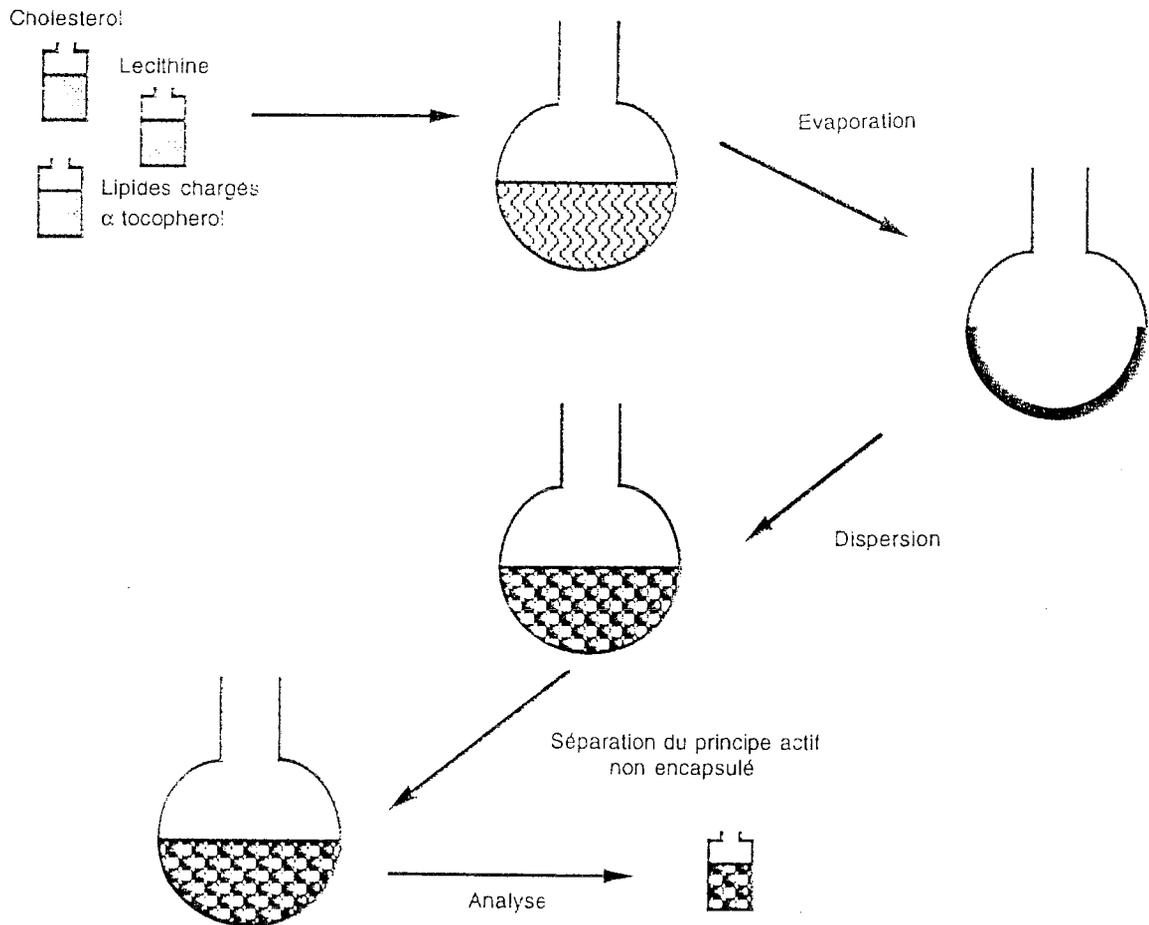
Ils sont utilisés pour réduire les phénomènes d'oxydation des liaisons insaturées des chaînes acylées des phospholipides.

Exemple : l' α -tocophérol, le BHT (butylhydroxytoluène), ou le BHA (butylhydroxyanisole).

Lors de la préparation de liposomes, il est indispensable de fixer au préalable un certain nombre de paramètres, tels que le rapport molaire des différents constituants lipidiques, la concentration finale en lipides dans la suspension ainsi que le volume final de la suspension. Ces paramètres permettent, connaissant le poids moléculaire de chacun des composés (Tableau III), de calculer les quantités de lipides à utiliser pour la préparation. Les lipides en solution, sont prélevés à l'aide d'une pipette ou d'une seringue en verre (Fattal *et al*, 1993).

II.2.2.Méthodes de préparation des liposomes (figure n° 8)

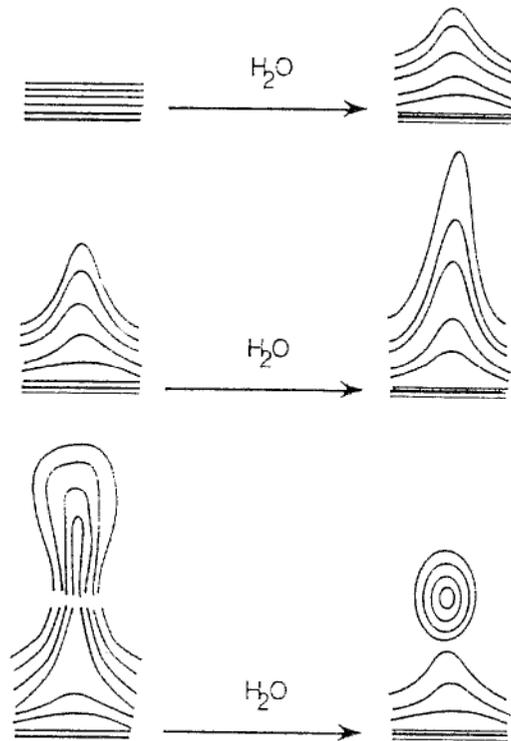
Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules différentes, par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation.



Etapas communes à toutes les méthodes de préparation des liposomes.

figure n° 8

Selon la méthode utilisée, il est possible d'obtenir des vésicules de type multi, oligo ou unilamellaires. Les liposomes multi ou oligolamellaires (MLV ou OLV « multi ou oligolamellar vesicles ») (figure n° 9) ont un diamètre moyen qui varie généralement de 400 nm à quelques μ m. Les liposomes unilamellaires peuvent être de grande taille (LUV ou « large unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen allant de 80 nm à 1 μ m ou de petite taille (SUV ou « small unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen variant de 20 à 80 nm (Fattal *et al*, 1993).



Mécanisme de formation des liposomes MLV.

figure n° 9

Les phospholipides dans l'eau, après incubation suffisante et à température adéquate, forment des lamelles.

Les lamelles vésiculées représentent un apport de membrane seulement mécanique et non fonctionnel.

Un autre procédé utilise le changement des conditions de solubilité des phospholipides.

II.2.2.1. Méthode de préparation par rupture de prébicouches, obtenues après dispersion des phospholipides.

Pour l'obtention des liposomes, les phospholipides sont soumis à plusieurs étapes :

- la dissolution,
- l'évaporation,
- et l'ajout de phase aqueuse (hydratation pour donner des lamelles).

Ils sont ensuite mis dans une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve une sonde à ultra-sons. Cette sonde pose un problème, car les liposomes sont des systèmes fragiles.

II.2.2.2. Presse de French

Cette technique utilise le phénomène d'extrusion des liposomes.

Hamilton et Guo en 1984 ont été les premiers à utiliser une cellule French pour extruder des liposomes MLV.

La cassure de la solution aqueuse sous forte pression donne des vésicules par extrusion. Cette méthode est simple et reproductible. Elle n'est pas limitée par le volume utilisé et permet de produire industriellement des liposomes. Comparée aux ultrasons, elle n'est pas agressive vis-à-vis des principes actifs fragiles. Toutefois, il est important de laisser refroidir la cellule entre deux passages pour éviter que des élévations de température ne viennent dénaturer les phospholipides (Fattal *et al*, 1993).

Cf. " the extruder " avec une atmosphère contrôlée sous N₂ (azote) où la taille des pores du film donne le diamètre des liposomes (2 μ si on veut des liposomes de 2 μ).

Ce système présente cependant une limite, qui est la difficulté d'encapsuler le principe actif dans une sphère ($\frac{4}{3} \pi R^3$), sans perte de produit.

II.2.2.3. Préparation de liposomes par dialyse : 'vesisette'.

Le principe de cette méthode de préparation est le suivant : dialyse tangentielle d'un mélange ternaire [PL + TA + H₂O], puis ajout de TA (Tensio Actif) : soit des sels biliaires, soit des alkyl glycosides synthétiques. De cette façon on obtient des micelles mixtes. Grâce au TA, la dialyse tangentielle peut s'effectuer, ainsi le système évolue vers la formation de liposomes.

Dans le cadre d'une étude sur les interactions des principes actifs avec les lipides, des liposomes immobilisés dans le Sépharose 2B sont mis en œuvre. Les liposomes (lécithine de soja ou lécithine de soja plus 2 ou 5 % de cétylphosphate de sodium) sont immobilisés dans le gel d'agarose par la méthode de dialyse. Ils sont employés comme phase stationnaire dans des colonnes de chromatographie pour vingt-trois molécules bioactives présentant des propriétés physico-chimiques et des activités thérapeutiques différentes. Les phases stationnaires peuvent être préparées de façon reproductible et sont stables pendant plusieurs passages en chromatographies.

La rétention des principes actifs sur ces colonnes est fonction du coefficient de distribution. Les différences dans le relargage des principes actifs est fonction des interactions intervenant avec les constituants des vésicules lipidiques : les résultats indiquent que, sur les colonnes renfermant des liposomes de lécithine, la rétention des principes actifs est due en priorité aux interactions hydrophobes, tandis qu'avec les vésicules de cétylphosphate de so-

dium/lécithine, la présence de surfaces chargées permet aux principes actifs de créer des liaisons ioniques avec les constituants de la double couche (Pattarino *et al*, 1997).

II.2.2.4. Préparation de liposomes par injection

Une solution alcoolique de lipides, diluée dans de l'eau chaude produit spontanément des liposomes de petite taille et unilamellaires. Le diamètre des liposomes dépend de la vitesse d'injection de la solution éthanolique, (si elle est rapide, le diamètre moyen est de 27 nm et si elle est lente, le diamètre est supérieur à 120 nm), de la vitesse d'agitation (quand elle est rapide cela réduit la polydispersivité), ainsi que de la concentration en phospholipides dans l'éthanol (le diamètre varie linéairement). L'éthanol peut être éliminé par dialyse ou par filtration sur gel de Sephadex G50. La faible quantité de lipides utilisés entraîne peu d'encapsulation.

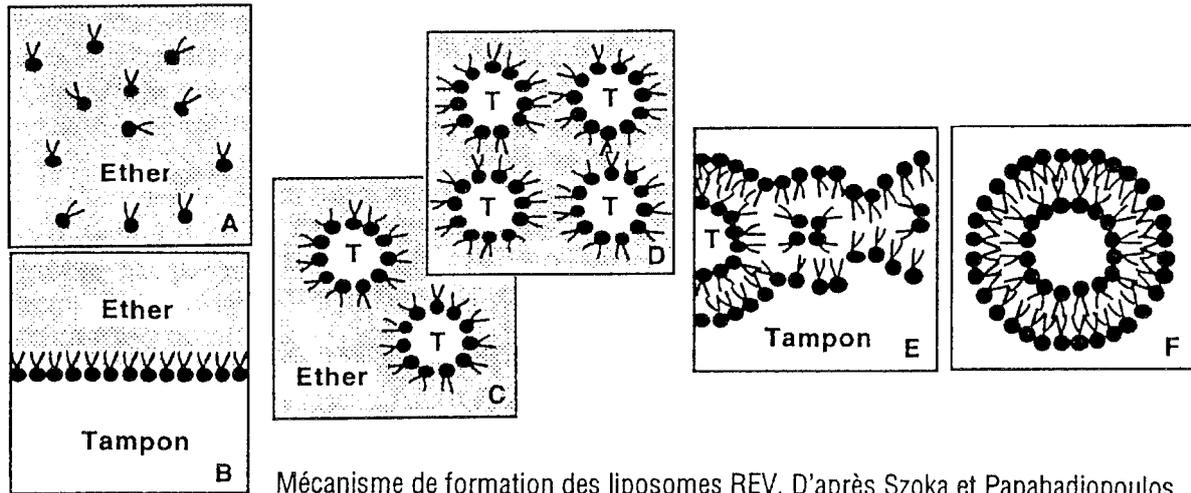
L'intérêt de cette méthode est de produire des quantités semi-industrielles de liposomes (Fattal *et al*, 1993).

II.2.2.5. Evaporation en phase inversée : REV.

Cette méthode consiste en une dissolution des vésicules dans une phase organique (solution éthanolique), puis ajout de phase aqueuse pour obtenir des liposomes.

Afin d'améliorer le rendement d'encapsulation des liposomes, Szoka et Papahadjopoulos en 1978 (figure n° 10) ont mis au point une méthode de préparation, dite d'évaporation en phase inversée, qui permet de préparer des liposomes LUV comportant une grande cavité aqueuse. Dans ce procédé, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tel que l'éther éthylique ou l'éther propylique (figure n° 10 A). La phase aqueuse est ensuite ajoutée à la phase organique. A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface des deux phases non miscibles (figure n° 10 B). Après action des ultrasons, pendant 5 minutes, une émulsion Eau/Huile se forme dans laquelle les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inverses entourant des compartiments aqueux (figure n° 10 C). La réussite de cette émulsion est une condition fondamentale pour l'obtention de liposomes unilamellaires avec des taux d'encapsulation importants. L'élimination du solvant par évaporation sous pression réduite (200-400 mmHg) conduit au rapprochement des micelles inverses (figure n° 10 D) puis à la formation d'un gel (figure n° 10 E). Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage (700 mmHg) afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel.

Cette rupture permet le rapprochement des monocouches pour former les bicouches des liposomes (figure n° 10 F). L'éther est alors évaporé jusqu'à disparition totale du solvant. Les vésicules ainsi obtenues sont unilamellaires avec un diamètre moyen de 0,5 μm . (Fattal *et al*, 1993).



Mécanisme de formation des liposomes REV. D'après Szoka et Papahadjopoulos
figure n° 10

II.2.2.6. Méthode d'obtention des liposomes par congélation/décongélation (figures n° 11-12).

Une suspension de phospholipides hydratés dans l'azote liquide, réchauffée et homogénéisée plusieurs fois, produit des liposomes. Cette préparation est faisable en industrie, leur stabilité dépendra de leur contenu.

Des liposomes sont congelés/décongelés puis lyophilisés et ensuite réhydratés, le contrôle granulométrique qu'ils subissent donne les informations suivantes : les phospholipides et les additifs, doivent être choisis convenablement afin d'éviter une augmentation de taille des liposomes, qui peut se produire au cours de la lyophilisation. On sélectionnera le sucre (polymère hydrosoluble), un acide aminé et une protéine.

Le thréhalose et l'alcool polyvinylique se sont révélés les plus aptes à prévenir les problèmes. Il est important de les ajouter dans les formules avant la congélation/décongélation pour la préparation des gros liposomes multilamellaires, afin qu'ils exercent efficacement leurs propriétés cryoprotectrices.

L'agrégation des vésicules, observée après analyse granulométrique des liposomes lyophilisés et réhydratés, est évitée par la coformulation avec du dicétylphosphate, bien que cette coformulation rende le contrôle granulométrique délicat (Kawashima *et al*, 1992).

La technique de cryofracture et cryodécapage s'effectuent par quatre étapes essentielles :

— la congélation de l'échantillon est l'étape clé. Elle doit être aussi rapide que possible pour éviter toute réorganisation moléculaire. Pour éviter, ou du moins minimiser les déformations de structure entraînées par la formation de cristaux de glace, on peut prétraiter les échantillons par des cryoprotecteurs comme le glycol ;

— la fracture est effectuée par un couteau, sur une platine porte objet refroidie dans une enceinte sous vide ;

— le décapage, qui est en fait une étape facultative, est effectuée en laissant se sublimer une partie de la glace de l'échantillon. Ceci a pour but de découvrir des parties de l'échantillon situées sous le plan de fracture ;

— la formation de la réplique de la surface exposée (avant ou après décapage) est obtenue par ombrage d'un métal lourd comme le platine, puis par dépôt d'une fine couche de carbone afin de rigidifier la réplique.

Cette technique permet d'obtenir des images de vésicules dont la forme sphérique est bien conservée, facilitant la détermination du diamètre (Vidal, 1993).

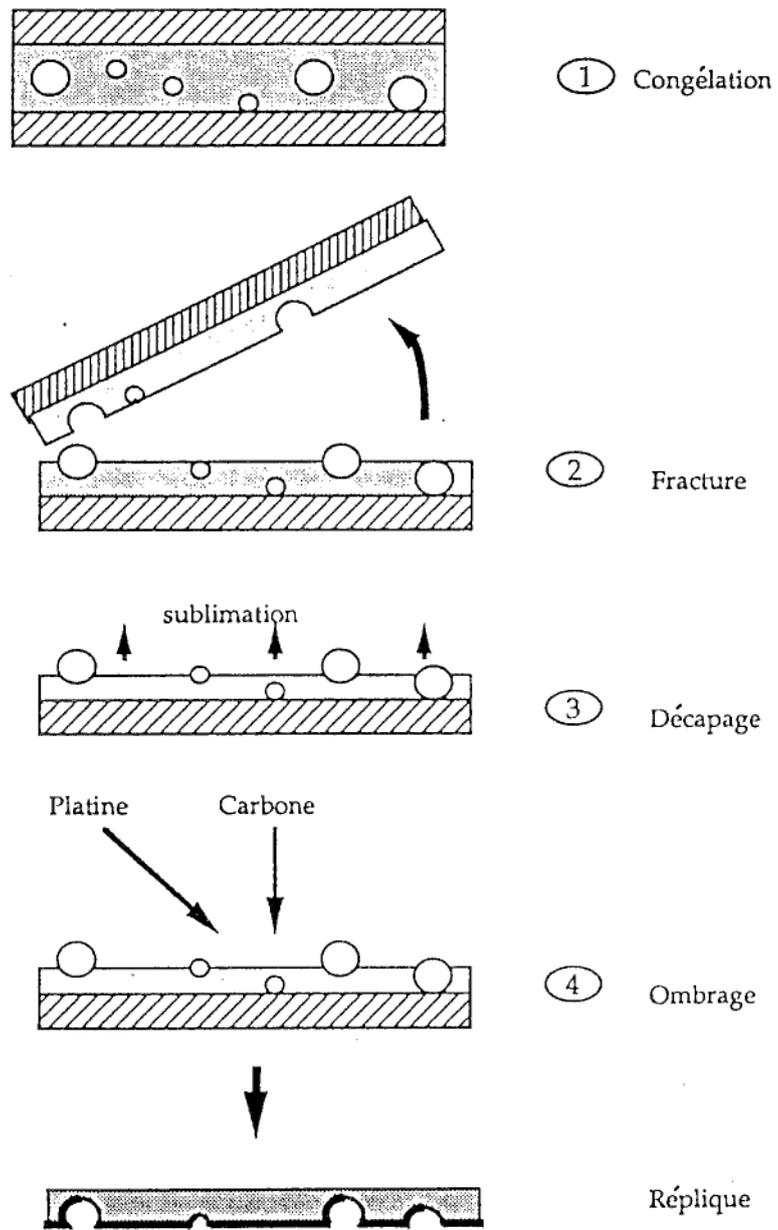
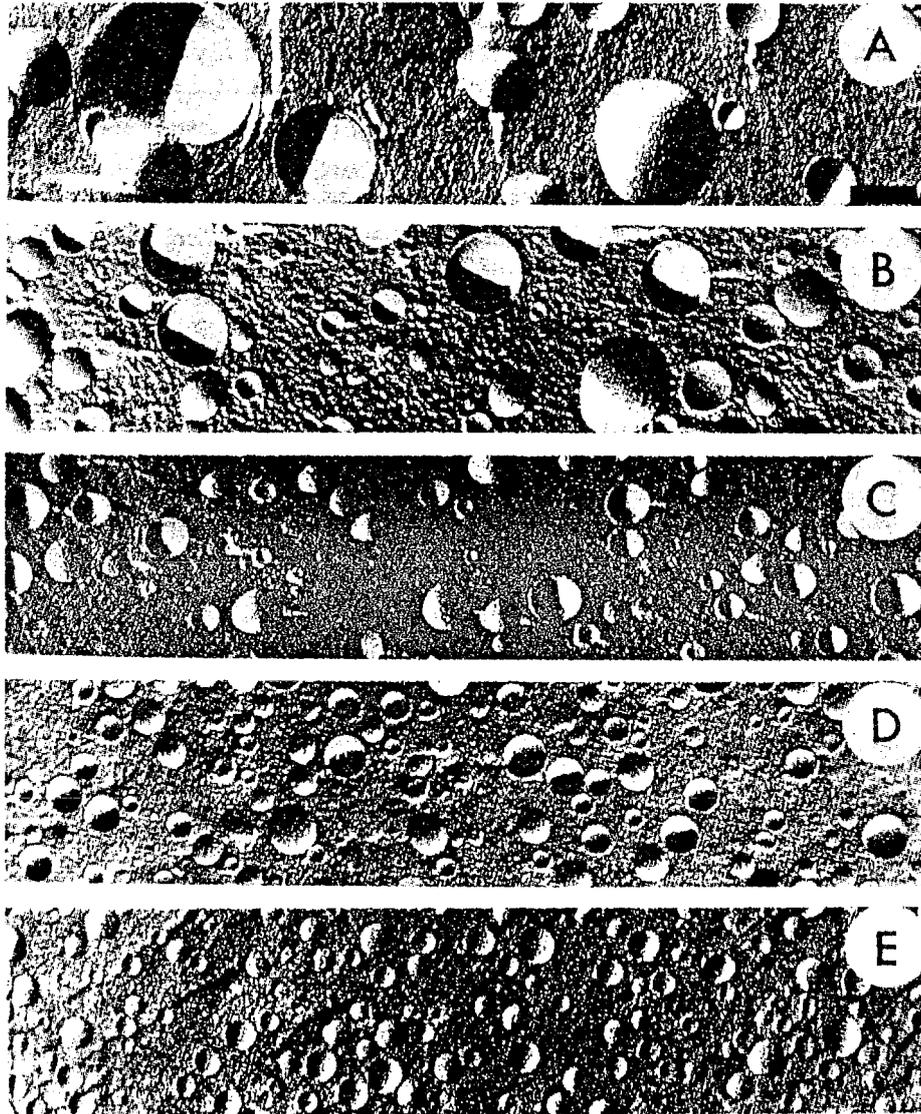


Schéma du principe de la technique de cryofracture.

figure n° 11

Suite au schéma de la figure n° 11, la figure n° 12 illustre la même méthode mais vue au microscope électronique après un calibrage des liposomes par des membranes de taille de pores différents.



Photographies de microscopie électronique (cryofracture) de préparations de liposomes obtenues par congélation, décongélation de MLV et passages à travers des membranes de taille de pores différents. Taille des pores : 400 nm (A), 200 nm (B), 100 nm (C), 50 nm (D), 30 nm (E). La barre en (A) représente 150 nm. D'après Mayer et coll.

(Vidal, 1993)
figure n° 12

Donc, les méthodes de préparation sont nombreuses et aboutissent à des vésicules différentes quant à leurs caractéristiques physico-chimiques (Tableau IV)

**PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES
DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRÉPARATION DES LIPOSOMES**

MÉTHODE DE PRÉPARATION	STRUCTURE	DIAMÈTRE (μm)	VOLUME D'ENCAP- SULATION $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ DE LIPIDES	EFFICACITÉ D'ENCAP- SULATION (%)	RÉFÉRENCES
Hydratation d'un film phospholipidique	MLV		0,5	1,8-8,5	[33]
		0,05-30	3	6	[13]
		0,4-5	4,1	5-15	[38]
		1,0	1,4-1,8	9-27	[60]
Ultrasons de MLV	SUV	0,02-0,05	0,2-1,5	0,1-1,0	[82]
Extrusion de MLV avec la presse de French	SUV	0,02-0,08	0,2-1,5	5-25	[37]
Extrusion de MLV sur filtres de polycarbonate 0,1 μm de 1 à 0,2 μm	SUV	0,06-1	1-3	5-30	[21]
	MLV	0,05-2	1,8-3,7	15-60	[60]
Microfluidisation	SUV	< 0,1	0,7-1,0	5-78	[51]
Injection d'éthanol	SUV	0,03		0,5	[7]
		0,12	0,4-1,5		[35]
Evaporation en phase inverse	LUV	0,1-1,0	11-7	30-68	[81]
Infusion d'éther	LUV	0,05-0,25	13-25	2	[14]
Lyophilisation/ Réhydratation	MLV	0,02-2		26-72	[33]
Congélation/ Décongélation (SUV)	LUV	0,09		25-30	[68]
Congélation/ Décongélation (MLV)	MLV		2-5	31-89	[50]
Elimination de détergent	LUV	0,6		12	[30]
		0,1	2,4	12	[15]
		1	35	45-50	[66]
		0,04-0,18	1,75-2,4		[87]
		0,2-0,3	6-7,4	22	[53]
	SUV	0,037	0,47		[9]

Tableau IV

II.2.2.7. Avantages et inconvénients de ces différentes méthodes

Au cours des dernières années, les études cliniques réalisées avec des molécules actives vectorisées, conduisent au développement d'un certain nombre de méthodes adaptées à une fabrication industrielle (Fattal *et al*, 1993).

MÉTHODE DE PRÉPARATION	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Hydratation d'un film phospholipidique	Simple, rapide.	Faibles taux d'encapsulation. Taille hétérogène. Inadaptée à la production industrielle.
Ultrasons	Petites vésicules de taille homogène.	Faibles taux d'encapsulation. Contamination par des particules de métal. Production d'aérosol pouvant être toxique pour le manipulateur. Uniquement pour de petits volumes. Nécessite la préparation préalable de liposomes MLV.
Extrusion avec la presse de French	Simple, reproductible, non agressive. Permet d'utiliser des concentrations en lipides élevées. Permet d'obtenir des taux d'encapsulation élevés. Adaptée à la production industrielle.	Coût et maintenance de l'appareil. Nécessite la préparation préalable de liposomes MLV. Volumes d'encapsulation faibles.
Extrusion sur filtres de polycarbonate	Rapide et reproductible. Taille des liposomes homogène. Permet d'utiliser des concentrations en lipides élevées. Permet d'obtenir des taux d'encapsulation élevés. Méthode non agressive. Permet de produire des liposomes de différentes tailles selon le filtre utilisé.	Nécessite la préparation préalable de liposomes MLV. Uniquement pour de petits volumes.
Microfluidisation	Permet d'obtenir des taux d'encapsulation élevés. Adaptée à la production industrielle.	Coût et maintenance de l'appareil. Nécessite la préparation préalable de liposomes MLV.
Injection d'une solution éthanolique	Taille des liposomes homogène. Simple, rapide. Adaptée à la production industrielle.	Faible taux d'encapsulation.
Evaporation en phase inverse	Volume et taux d'encapsulation élevés	Matériaux exposés aux ultrasons et aux solvants. Technique complexe. Inadaptée à la production industrielle.

Avantages et inconvénients des méthodes de préparations des liposomes

Tableau V

II.3. Méthodes de contrôle

Elles s'intéressent à la pureté et à la stabilité chimique des lipides, de même qu'à leur dosage. Elles contrôlent le taux d'encapsulation des molécules actives et comportent les analyses granulométriques.

II.3.1. Pureté, stabilité chimique et dosage des lipides

Cela comprend différents aspects :

- la stabilité chimique des liposomes,
- le maintien de dimension des vésicules,
- le maintien de la structure des vésicules,
- la rétention des composés piégés,
- l'influence éventuelle des liquides biologiques sur l'intégrité et la perméabilité des liposomes.

Des changements minimes de la composition lipidique peuvent, en effet, entraîner des modifications des propriétés des vésicules lipidiques pouvant être préjudiciables à la thérapeutique recherchée (Puisieux et Delattre, 1985).

II.3.2. Taux d'encapsulation

Il est évalué en % de produit effectivement présent dans les liposomes par rapport à la concentration initiale.

L'encapsulation d'une molécule dépend beaucoup de ses propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...). On peut très schématiquement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules : dans le compartiment aqueux pour les substances hydrosolubles et dans les bicouques lipidiques pour les substances liposolubles.

Le % d'encapsulation (ou taux d'encapsulation) peut s'appliquer pour les deux types d'association. Il est défini par la proportion de molécules associées aux vésicules par rapport à la quantité initialement présente. Cette mesure est donc nécessairement effectuée après avoir éliminé la molécule non encapsulée.

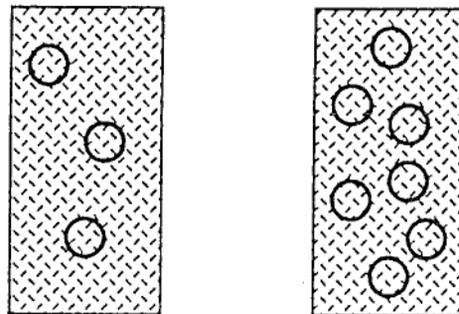
Pour une concentration initiale donnée, il est évident que ce % d'encapsulation va être d'autant plus élevé que la quantité de lipide sera grande, alors que la quantité de molécules encapsulées par vésicule est identique. C'est pour cela que, dans la mesure du possible, il est préférable de rapporter l'encapsulation à la quantité de lipides.

On peut également rechercher le volume d'encapsulation.

L'encapsulation pondérée, c'est à dire la quantité de molécules encapsulées, est rapportée à la quantité de lipides ; les unités qui définissent ces deux quantités restent au choix de l'expérimentateur. Il y a plusieurs possibilités pour quantifier l'encapsulation d'une molécule dans des vésicules, la plus simple est d'utiliser un de ces analogues radiomarqués. Dans ce cas, le comptage de la radioactivité et le dosage des phospholipides d'un échantillon permettent de déterminer l'encapsulation pondérée (figure n° 13). Cette méthode très simple est notamment utilisée pour mesurer l'encapsulation d'acides nucléiques (Heywood *et al*, 1984).

Une autre possibilité consiste à étudier une caractéristique de la molécule, initialement encapsulée, après son relargage des vésicules. On peut par exemple doser l'activité biologique de la molécule après lyse des vésicules par un détergent ou mesurer l'absorbance d'un composé après dissolution des liposomes par un solvant.

Dans le cas d'une petite molécule hydrosoluble, n'interagissant pas avec les bicouches lipidiques, on peut déduire de l'encapsulation pondérée une autre expression qui définit plus la vésicule elle-même que son contenu : le volume aqueux interne (Vidal, 1993).



Concentration lipidique	*	* * *
Pourcentage d'encapsulation	*	* * *
Encapsulation pondérée	*	*

Représentation schématique de la comparaison du % d'encapsulation et de l'encapsulation pondérée en fonction de la concentration lipidique, à concentration de soluté constante.

figure n° 13

L'encapsulation dite active, consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes préformés. Les molécules diffusent à travers la membrane et se retrouvent piégées à l'intérieur des liposomes. Plusieurs méthodes d'encapsulation active sont décrites (Mayer *et al*, 1986a).

La première consiste à réaliser un gradient de pH dans lequel le pH intraliposomal est rendu acide alors que le milieu extraliposomal conserve un pH neutre. Toutes les substances qui diffusent à travers la membrane et qui s'ionisent à pH acide (par exemple les bases faibles) sont piégées dans la cavité aqueuse. Le gradient de pH est réalisé en encapsulant dans les liposomes un tampon acide, non diffusible (tampon glutamate). Après l'encapsulation, le milieu extérieur est remplacé par un tampon iso-osmolaire de pH 7,0. Cette technique est utilisée pour encapsuler de nombreuses substances (Chakrabati *et al*, 1992 et Madden *et al*, 1990). Elle permet d'atteindre des pourcentages d'encapsulation très variables d'une substance à l'autre. Pour certains cations lipophiles ou amphiphiles, il est possible d'obtenir des taux de 90 %.

Une autre technique consiste à créer un gradient de potentiel en encapsulant dans les liposomes des ions K^+ et en introduisant dans la membrane un ionophore sélectif pour le K^+ , la valinomycine. L'efflux de K^+ à travers l'ionophore s'effectue ensuite en échange d'un cation (Bally *et al*, 1985). Les taux d'encapsulation obtenus par cette méthode sont analogues à ceux observés avec un gradient de pH.

Enfin récemment, une autre méthode d'encapsulation active est décrite par Schubert *et al*, 1991, et consiste à introduire, pendant quelques minutes, dans la membrane, un détergent (le cholate de sodium ou l'octylglucopyranoside) capable de former des pores transitoires laissant diffuser les substances du milieu extérieur vers la cavité aqueuse. Les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 50 % (Fattal *et al*, 1993)

II.3.3. Analyses granulométriques

Il y a différentes techniques pour caractériser et sélectionner des petits liposomes ($<1 \mu$) : — la centrifugation analytique,

— le microscope électronique (ME) : qui permet par une méthode de coloration négative, ou de cryofracture, d'observer les liposomes,

— la technique de diffusion à la lumière ($h\nu$) a deux avantages, elle entraîne un coût moindre et surtout ne détruit pas l'échantillon.

Le microscope électronique donne la morphologie et la structure, il révèle le nombre de lamelles et les défauts structuraux.

La cryofracture peut être imagée par un coup de marteau dans un glaçon, soit on est dans le grand diamètre du grain, soit pas, les taux statistiques interviennent ici.

La diffusion élastique de la lumière réalisée dans un liquide, a un mouvement Brownien, résumé par la formule du taux de diffusion :

$$D = K_0 T / 3 \pi \eta d$$

si d est petit, le mouvement est rapide, si d est grand, le mouvement est lent et cela donne des signaux différents.

La conversion du signal par autocorrélation avec des taux mathématiques donne la taille des particules.

Ce liposome en forme de fuseau tourne jusqu'à ce que sa sphère équivalente soit définie.

La microfluidisation consiste à produire deux flux, sous haute pression et en sens inverse ce qui réduit la taille des vésicules jusqu'à la taille souhaitée.

II.3.4. La stabilité

Il est évident que les lipides qui entrent dans la composition des vésicules sont de la plus haute importance pour les propriétés des liposomes.

Cette composition lipidique confère à la membrane liposomale des caractéristiques propres telles que son état de fluidité ou sa charge en surface, qui elles-mêmes, influencent certaines propriétés des liposomes, comme par exemple :

- l'efficacité d'encapsulation,
- la perméabilité du composé encapsulé,
- la stabilité des vésicules dans le compartiment sanguin,
- les interactions des liposomes avec les cellules...

Le choix des lipides est donc primordial, et dépend beaucoup du but recherché. Le propos n'est pas ici de guider ce choix en faisant un inventaire de tout ce qui est publié sur ce sujet dans la littérature. Il faut simplement souligner qu'il convient de vérifier la pureté des composants lipidiques avant et après la formation des vésicules.

En effet, des phénomènes de dégradation et de peroxydation sont susceptibles de se produire, en fonction des méthodes de préparation utilisées et des lipides employés. Ceci pourra être effectué par les techniques habituelles d'analyse de lipides (chromatographie en couche mince, chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide haute pression...) (Vidal, 1993)

Pour mieux comprendre le phénomène de perméabilité membranaire des liposomes, nous allons analyser l'expérience qui utilise la 6-Carboxyfluorescéine (6-CF) :

L'addition d'un groupe carboxyle supplémentaire rend la molécule plus polaire et moins susceptible de traverser les membranes liposomales. La 6-CF est généralement encapsulée dans les liposomes à des concentrations où sa fluorescence est considérablement diminuée. Cette diminution est de 10, 60 et 95 % respectivement à des concentrations de 1, 10, et 100 mM.

D'un point de vue pratique, les liposomes sont généralement préparés dans la solution de 6-CF à des concentrations où la réduction de fluorescence est importante. La 6-CF non-encapsulée est alors généralement éliminée par une ou deux filtrations de ces liposomes sur gel (Sephadex G25 ou G75). Seule la première fraction éluée qui contient les liposomes non pollués par la 6-CF externe est utilisée pour les expériences ultérieures.

La mesure de la variation de fluorescence ou d'une tierce substance, ajoutée dans la solution, en fonction du temps, constitue une méthode très sensible de mesure de la perméabilité membranaire.

La fluorescence des liposomes contenant la 6-CF est stable aux $\text{pH} > 6$; aux pH inférieurs, il apparaît la forme protonée de la 6-CF, cela apporte une augmentation de la perméabilité et du pouvoir amphiphile.

La sensibilité de la 6-CF est telle qu'elle est utilisée comme sonde de pH intracellulaire. Barbet suggère l'emploi de polysulfonates, tels que le « jaune lucifer » (lucifer yellow) pour palier à cette limitation de l'utilisation de la 6-CF aux faibles pH (Ollivon et Paternostre, 1993).

Le Tableau VI fait le récapitulatif des caractéristiques des liposomes.

CARACTERISTIQUES DES LIPOSOMES

	TAILLE	ENCAPSULATION	PERMEABILITE
MLV	1 μ m	Bonne:5 à 15 %	Faible : bonne rétention du P.A.
LUV	200 nm	Bonne:35 à 65 %	Faible pour les macromol. aqueuses
SUV	20 nm	Faible:0,5 à 1 %	Forte : Fuite du P.A. aisée

LIPIDES IONIQUES

CHOLESTEROL

→ VESICULES CHARGÉES → ADSORPTION

→ Contrôle de la FLUIDITE MEMBRANAIRE

LIPIDES NON IONIQUES

→ CONTROLE DE L'AUTOOXYDATION

→ CONTROLE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE

Tableau VI

III. SEPARATION DU TYPE ET DE LA TAILLE SOUHAITES

L'homogénéité en taille d'une préparation de liposomes peut s'obtenir de deux manières. Soit par sélection d'une population à partir d'une préparation hétérogène, soit par calibration lors de la fabrication.

III.1. Sélection

Trois types de méthodes peuvent être utilisées : la chromatographie d'exclusion, la centrifugation et la dialyse.

III.1.1. Chromatographie d'exclusion

Ce moyen est généralement utilisé lors de la préparation de vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV : Small Unilamellar Vesicle) à partir de vésicules multilamellaires (MLV : Multilamellar Vesicle), afin d'éliminer les liposomes résiduels de grandes tailles. Ceci peut être effectué sur colonne de Sépharose 2B ou 4B (Pharmacia), ou avec d'autres gels d'exclusion équivalents (2 à 4 % agarose de BioRad) (figure n° 14).

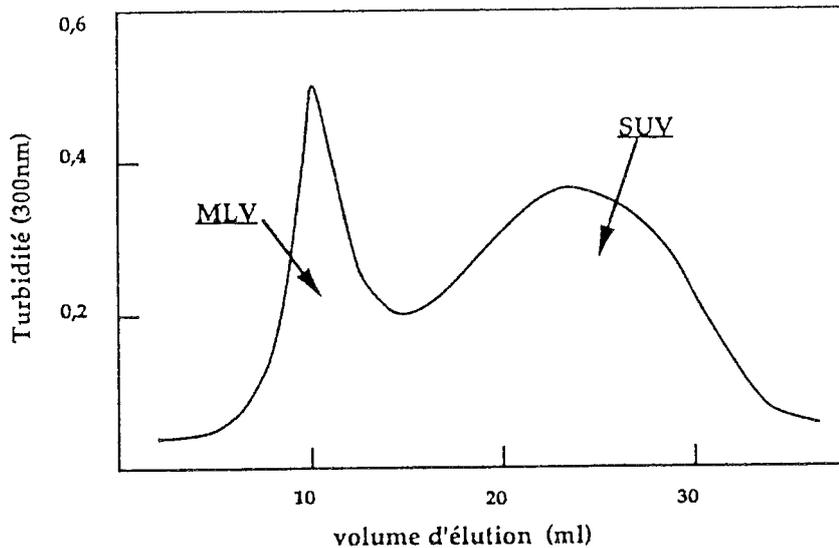
Les petites vésicules sont incluses dans le volume du gel, alors que les liposomes de grande taille sont élués dans le volume mort. Il est cependant important de noter que cette méthode présente un certain nombre de désavantages :

- ce n'est pas une méthode préparative, de par le volume de suspension liposomale qu'il est possible de traiter,
- c'est une méthode qui entraîne une dilution notable de l'échantillon traité,
- cette méthode est relativement longue.

De plus, une perte non négligeable de matériel peut se produire, en effet, les vésicules de très grande taille (1 à 3 μm de diamètre) ne peuvent pas pénétrer dans la plupart des gels et sont retenues en sommet de colonne.

De même, des interactions entre les billes de gel et la membrane des vésicules peuvent entraîner une perte de lipides. Ceci peut être évité, ou du moins diminué, en pré-saturant la colonne par des lipides (lécithine d'œuf...).

On peut donc préférer à la chromatographie d'exclusion, une méthode qui ne présente pas ces défauts : la centrifugation.



Profil d'éluion d'une préparation de liposomes formés par ultrasons à partir d'une suspension de MLV.
Colonne Sépharose 4B (2,5 x 50 cm).

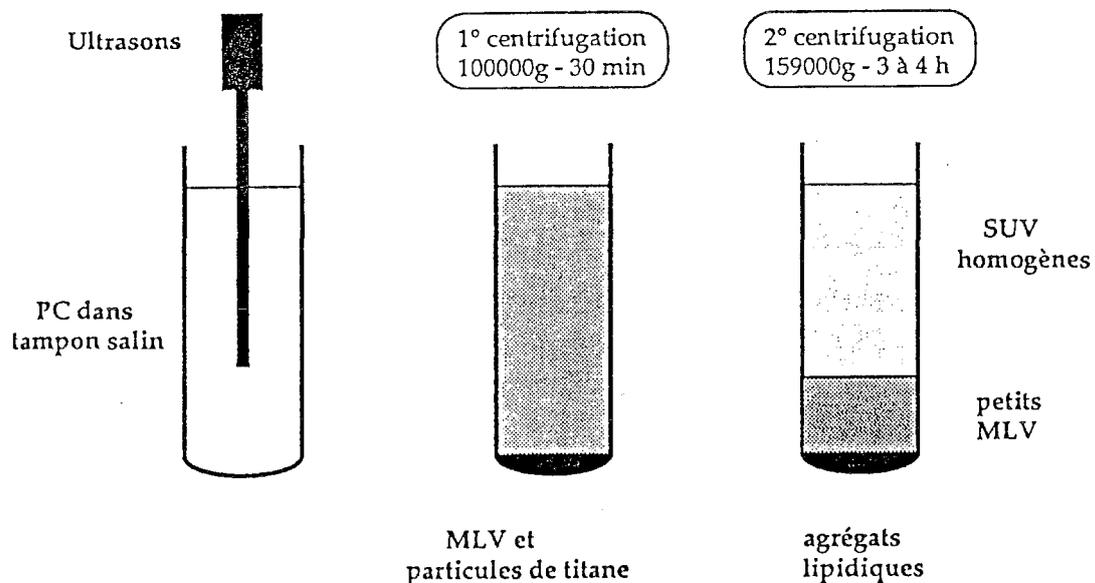
figure n° 14
(Vidal, 1993)

III.1.2. Centrifugation

La densité de la bicouche de phosphatidylcholine extraite d'œuf est de 1,0135 g/ml. Cette valeur augmente avec l'incorporation de cholestérol (50 % de cholestérol : $d = 1,0142$ g/ml).

Des SUV dans une solution aqueuse de type tampon physiologique (densité de l'ordre de 1,0050 g/ml), peuvent être sédimentés par ultracentrifugation à 200 000 g pendant 10 à 20 heures, alors que des MLV sédimentent beaucoup plus rapidement, 1 heure à 100 000 g peut suffire. La méthode de Barenholz (figure n° 15) permet à partir d'une suspension de liposomes préparés par ultrasons, par une première centrifugation (100 000 g, 30 min) d'éliminer les MLV et les particules de titane (provenant de la sonde à ultrasons), puis par une seconde centrifugation (159 000 g, 3 à 4 h) d'obtenir une population homogène de SUV.

La méthode est reproductible si les conditions de centrifugation, elles-mêmes fonction de la composition lipidique des vésicules et de l'osmolarité du tampon, sont parfaitement déterminées.



Représentation schématique de la méthode de Barenholz permettant d'obtenir une préparation homogène de SUV.

figure n° 15

III.1.3. Dialyse

Cette méthode consiste à éliminer, d'une suspension de liposomes hétérogènes en taille, les vésicules d'un diamètre inférieur à celui des pores des membranes utilisées. C'est une méthode très séduisante puisqu'elle permet d'obtenir de manière douce, simple et reproductible, une préparation homogène de vésicules dont le diamètre inférieur aura été fixé. En pratique, son utilisation est peu répandue à cause de la faible surface occupée par les pores et de la lenteur de la diffusion des particules telles que les vésicules ; l'opération peut durer plusieurs jours. Ces membranes, généralement en polycarbonate, sont en fait utilisées pour calibrer les liposomes lors de leur fabrication.

III.2. Calibration

La calibration s'effectue lors de la préparation des liposomes, en les forçant, sous pression d'azote, à traverser une membrane dont les pores ont un diamètre très précis et parfaitement déterminé. Les vésicules de diamètre plus petit que les pores vont évidemment traverser la membrane, de même que les liposomes de taille légèrement plus grande, par déformation de la bicouche lipidique. Les vésicules beaucoup plus grosses que les pores vont être fragmentées et les lipides vont se réorganiser en vésicules plus petites. Après plusieurs passages, on obtient une population très homogène, de diamètre sensiblement égal au diamètre des pores de la membrane de polycarbonate, bien qu'il n'y ait pas de corrélation stricte entre la taille des pores des membranes et le diamètre des vésicules produites. Cette méthode s'effectue avec des pressions d'azote beaucoup plus faibles que celles requises pour la presse de French, le type d'appareil utilisé est similaire à ceux employés pour d'autres systèmes de filtration à travers des membranes (Amicon, Millipore,...).

Cette technique peut être utilisée aussi bien à partir de MLV que de LUV. Il convient néanmoins de garder à l'esprit, que durant le processus d'extrusion, des vésicules sont fragmentées et reformées, et donc leur contenu est mélangé avec le milieu dans lequel elles sont suspendues. Autrement dit, pour obtenir l'encapsulation maximale d'un composé hydrophile, celui-ci doit être présent dans le milieu de suspension. Une méthode associant la congélation-décongélation et la technique d'extrusion permet d'obtenir des rendements d'encapsulation très élevés. La purification des vésicules vis-à-vis de la molécule non encapsulée est ensuite effectuée par une des méthodes décrites dans le paragraphe suivant (Vidal, 1993).

IV. SEPARATION DE LA FRACTION DE PRINCIPE ACTIF NON ENCAPSULEE (Fattal *et al*, Vidal, 1993)

La dimension des liposomes est fondamentale pour leur pénétration à travers la membrane endogène. Il est donc nécessaire de séparer les molécules non encapsulées. Cela se fait par des techniques fondées sur la différence de taille des composés à séparer.

Cette étape est généralement effectuée lorsque l'on désire quantifier le volume interne des vésicules. Elle n'est cependant pas toujours nécessaire, si l'on peut éliminer la substance non encapsulée. Nous en verrons deux exemples dans le paragraphe suivant. Sa présence est cependant nécessaire lorsque l'on doit effectuer, avec les vésicules, des tests d'activité sur du matériel biologique.

Les liposomes sont, par définition, de plus grande taille que les molécules qu'ils encapsulent. De plus, ils ont un volume aqueux interne, isolé du milieu extérieur par la bicouche membranaire. Une différence de densité entre ces deux milieux pourra être mise à profit pour séparer par centrifugation les vésicules de la molécule non encapsulée.

IV.1. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est la méthode la plus couramment utilisée. Plusieurs raisons à cela :

— Simplicité : c'est une technique très largement décrite, dont le principe est basé sur la taille des molécules à séparer. Les molécules les plus grosses sont exclues des pores des billes de gel et sont donc éluées précocement. Les molécules les plus petites sont retenues dans les pores du gel et sont éluées plus tardivement.

— adaptabilité : elle est due au grand nombre de gels disponibles sur le marché. Ces gels diffèrent par les matériaux les constituant (agarose, sépharose, dextran, polyacrylamide...), le diamètre des billes (granulométrie : fine, moyenne, grosse) et la taille des pores des billes.

Ceci entraîne des caractéristiques (domaine de fractionnement, limite d'exclusion, interactions avec les échantillons...) et des conditions d'utilisation (débit, volume, tampon d'élution...) différentes. Chaque utilisateur peut donc choisir au mieux le type de gel selon ses besoins.

— reproductibilité et aspect quantitatif : ces deux caractéristiques font que cette méthode est non seulement utilisée pour éliminer la substance non encapsulée, mais également pour mesurer la fuite d'un marqueur encapsulé en fonction de différentes conditions (temps, milieu d'incubation, température...). En présence de plasma, cette fuite du marqueur interne est concomitante avec le transfert de phospholipides des vésicules vers les lipoprotéines sériques, notamment les HDL (high density lipoprotein). Ce genre de phénomène peut également être suivi et quantifié par chromatographie d'exclusion.

IV.2. Chromatographie d'exclusion-diffusion

Les gels de Sephadex G50 sont les plus couramment utilisés pour la séparation des substances non encapsulées par chromatographie d'exclusion-diffusion. Il est cependant prudent de sélectionner le diamètre des billes de gel en fonction de la taille des liposomes (moyennes et grosses pour les MLV, petites pour les SUV). Il convient en outre de déposer des liposomes blancs sur la colonne afin de saturer les sites d'adsorption des lipides et d'éviter les pertes. Cette technique a l'inconvénient d'être longue et d'entraîner la dilution des préparations.

IV.3. La dialyse

L'élimination des molécules de faible poids moléculaire peut s'effectuer par dialyse. Cette méthode présente le gros avantage de pouvoir être menée à relativement grande échelle. En effet, les systèmes utilisés en hôpital pour les dialyses rénales permettent de mettre en place une double circulation : la préparation de liposomes circule en circuit fermé dans les fibres creuses de la cartouche de dialyse, à l'aide d'une pompe péristaltique (le volume interne total des fibres peut aller jusqu'à 100 ml), alors qu'un flux continu de tampon de dialyse est sans arrêt en contact avec les fibres à l'aide d'une seconde pompe. Le renouvellement incessant du tampon de dialyse ainsi que la grande surface de membrane (jusqu'à 0,8 m²) de ce genre de système permet également de raccourcir les temps de dialyse.

IV.4. La centrifugation

En raison des différences de densité des composants, il est possible d'utiliser l'ultracentrifugation comme méthode de séparation.

Dans tous les cas, les molécules non encapsulées se retrouvent dans le surnageant. Il importe toutefois de vérifier, lors de la dispersion du culot, que la perméabilité des liposomes n'est pas modifiée.

Les MLV sédimentent rapidement dans des tampons aqueux proches de l'isoosmolarité. Cette propriété est utilisée pour éliminer la molécule non encapsulée (Fidler *et al*, 1980). Cependant, pour les liposomes autres que des MLV, ou bien dans le cas où la densité du milieu d'encapsulation est proche de celle des lipides (lors de l'encapsulation de molécules à forte concentration, ou de composés de forte densité), cette possibilité est exclue. On utilise alors la centrifugation en gradient de densité.

La molécule non encapsulée, n'ayant pas le même coefficient de sédimentation, pourra ainsi être éliminée de la préparation de liposomes. La centrifugation en gradient de densité est très utilisée pour se débarrasser d'acides nucléiques (Fraleigh *et al*, 1980) et de protéines libres (Huang *et al*, 1984).

V. CONSERVATION

Il est indispensable de vérifier la stabilité des liposomes après leur préparation. Les instabilités peuvent être d'origine chimique ou physique et un certain nombre de précautions permettent de les éviter.

Des phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse des phospholipides sont susceptibles de survenir une fois les liposomes préparés. Toutefois, les risques sont mineurs lorsque l'on prend les précautions de conservation et d'utilisation des phospholipides décrites précédemment (voir paragraphe II.3.4. : La stabilité).

Prévention des phénomènes d'agrégation :

Les liposomes doivent être conservés à +4°C sous argon, dans des tubes scellés de manière hermétique. L'agrégation des liposomes est provoquée par des interactions de type Van der Waals. Elle est plus fréquente pour les grands liposomes, dont la surface de contact est plus importante, que pour les petites vésicules. Ce phénomène est inévitable pour les liposomes non chargés, quel que soit le mode de conservation.

Un moyen simple de réduire ce phénomène consiste à ajouter un lipide chargé négativement aux liposomes. Seuls les petits liposomes unilamellaires (< 40 nm) en raison du stress provoqué par la courbure très importante de ces vésicules peuvent fusionner entre 4 °C et 37 °C ; plus la température est basse, plus le phénomène de fusion est observé, il dépend aussi de la composition en phospholipides (saturés de Tc élevée > insaturés).

Enfin, la rétention des produits encapsulés dépend également de leurs propriétés physico-chimiques. C'est ainsi que les molécules lipophiles de haut poids moléculaire ou les molécules hydrophiles ionisées sont mieux retenues (Szoka et Papahadjopoulos, 1980).

Afin d'améliorer la conservation des liposomes, on a essayé de les lyophiliser. La plupart des travaux montrent qu'il est difficile de retrouver l'intégrité des liposomes en terme de taille et de rétention des molécules encapsulées, après reconstitution du lyophilisat. Selon Crowe *et al.*, le tréhalose, utilisé comme cryoprotecteur permet d'obtenir une rétention à 100 % des molécules encapsulées après lyophilisation. Toutefois, il est nécessaire que ce disaccharide soit présent à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules (Fattal *et al.*, 1993).

En 1996, Hofland *et al* remarquent que les lipides cationiques sont stables en présence d'ADN. Ces complexes sont formés par solubilisation de liposomes cationiques, avec 1% d'octylglucoside et un ADN de plasmide lié à un lipide en présence de détergent. La suppression du détergent par dialyse, produit une suspension lipide/ADN, capable de transférer des cellules de culture tissulaire 90 jours après leur formation, sans perte d'activité.

La centrifugation du complexe stable produit un pellet contenant approximativement 90 % d'ADN et 10 % de lipide. La transfection de cellules avec la remise en suspension de pellets et de surnageant, montre que la majorité de l'activité de transfection est dans le pellet et toute la toxicité est dans le surnageant.

VI. MODE D'ADMINISTRATION EN VUE D'UNE ACTIVITE SYSTEMIQUE

Dans l'hypothèse d'une activité pharmaco-thérapeutique s'appuyant sur une distribution par voie systémique, l'administration de liposomes par des voies parentérales (voies intramusculaire, sous-cutanée,...), par des voies non parentérales (voie orale, nasale, rectale, etc.), introduit obligatoirement une phase d'absorption préliminaire à l'arrivée des liposomes, et/ou de leur contenu actif, dans la circulation générale.

Dans le cas d'une administration parentérale extravasculaire, le passage dans la circulation générale nécessite le franchissement, dans le sens rétrograde, de la barrière endothéliale, auquel il faut ajouter, pour une administration non parentérale, le franchissement préalable d'une muqueuse épithéliale.

VI.1. Voies parentérales

Les résultats expérimentaux disponibles montrent que, sous réserve d'une stabilité suffisante des vecteurs, l'administration intrapéritonéale (Hwang et Mauk, 1977, Parker *et al*, 1982) et, dans une moindre mesure, l'administration par voie sous-cutanée (Patel *et al*, 1984) permettent, par drainage lymphatique, un certain passage de liposomes intacts dans le sang ; les autres voies d'administration apparaissent pratiquement imperméables au passage de vecteurs intacts.

Dans la mesure où leur passage sanguin demeure négligeable et où leur stabilité structurale le permet, l'administration parentérale extravasculaire de liposomes, en particulier par voie intramusculaire, peut conduire à une mise à disposition lente de leur contenu sous forme libre (Jackson, 1981). Il en est de même après une administration par voie sous-cutanée. Les liposomes jouent, dans ce cas, le rôle d'un réservoir assurant localement une libération progressive et, éventuellement, une protection chimique et enzymatique du principe actif : l'impact essentiel s'exerce donc sur la biodisponibilité, conduisant à une intensité d'absorption majorée et à une vitesse d'absorption réduite.

Indépendamment de l'environnement biologique du site d'administration, la nature du principe actif encapsulé, celle des lipides constitutifs de la paroi et la structure (uni - ou plurilamellaire) des liposomes ont une influence majeure sur les cinétiques de libération. Les mécanismes de libération du principe actif peuvent être, en effet :

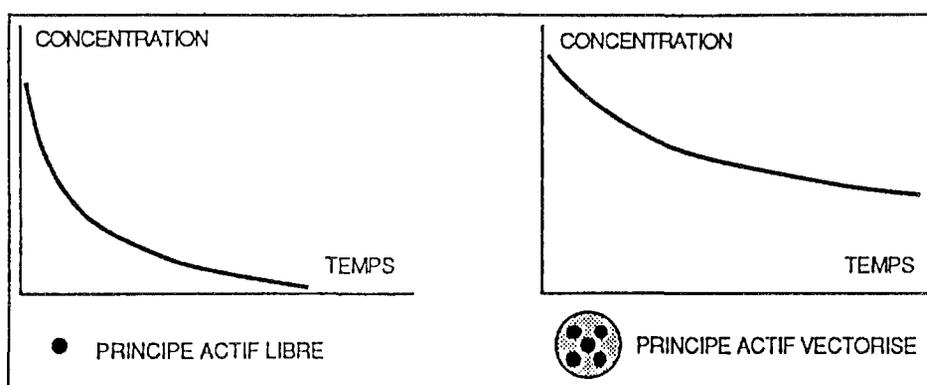
— une diffusion passive au travers des bicouches lipidiques pour une molécule hydrophile de faible poids moléculaire.

— un partage entre les bicouches et les milieux biologiques, pour une molécule lipophile.

— une dégradation enzymatique des bicouches par les lipases ou une altération des bicouches sous l'influence de protéines intra- ou extracellulaires, pour une molécule de haut poids moléculaire. Les conséquences d'une libération prolongée sur les profils chronologiques sanguins d'un principe actif dépendent essentiellement de sa clairance. Sa demi-vie plasmatique n'apparaît sensiblement prolongée, par une administration sous forme liposomiale, que si cette clairance est rapide.

VI.2. Voie orale

En dépit d'un très grand nombre d'études réalisées avec des principes actifs instables en milieu digestif (l'insuline par exemple) ou non absorbés (la d-tubocurarine par exemple), l'administration orale de liposomes se solde par un bilan plutôt négatif, avec, de surcroît, des résultats pharmacologiques souvent erratiques (Woodley, 1986). L'instabilité des liposomes en présence de sels biliaires est la cause essentielle de tels résultats (Rowland et Woodley, 1980). L'intérêt possible de liposomes administrés par voie orale paraît devoir être essentiellement limité à une protection temporaire du principe actif encapsulé, cela uniquement pour des liposomes qui présentent une stabilité suffisante. Du fait de la destruction importante pendant le transit, les doses pharmacologiques acceptables sont souvent insuffisantes, mais cela peut s'avérer positif en ce qui concerne les substances immunogènes (Devissaguet et Puisieux, 1993).



Potentialités thérapeutiques des liposomes administrés par voie parentérale interstitielle (intramusculaire, sous-cutanée,...) ou intracavitaire (intrapéritonéale, intra-articulaire, intrathécale,...). En l'absence d'un réel ciblage, les liposomes se comportent comme des formes à libération (et action) prolongée.

figure n° 16

VII. EXTRAVASATION DES LIPOSOMES

Le passage de la barrière endothéliale par les liposomes est un problème fondamental ; parvenus dans la circulation générale, ces derniers doivent en effet être capables de quitter le lit vasculaire pour atteindre les cellules cibles.

VII.1. Fenestrations naturelles

Composée d'une adventice, d'une média et d'une intima, la paroi des artères et des veines mais également celle des artérioles et des veinules constituent a priori une barrière infranchissable pour les liposomes (figure n°17). La seule extravasation envisageable semble donc se situer au niveau des capillaires dont la paroi, formée d'une monocouche de cellules, autorise les échanges entre le sang et les tissus.

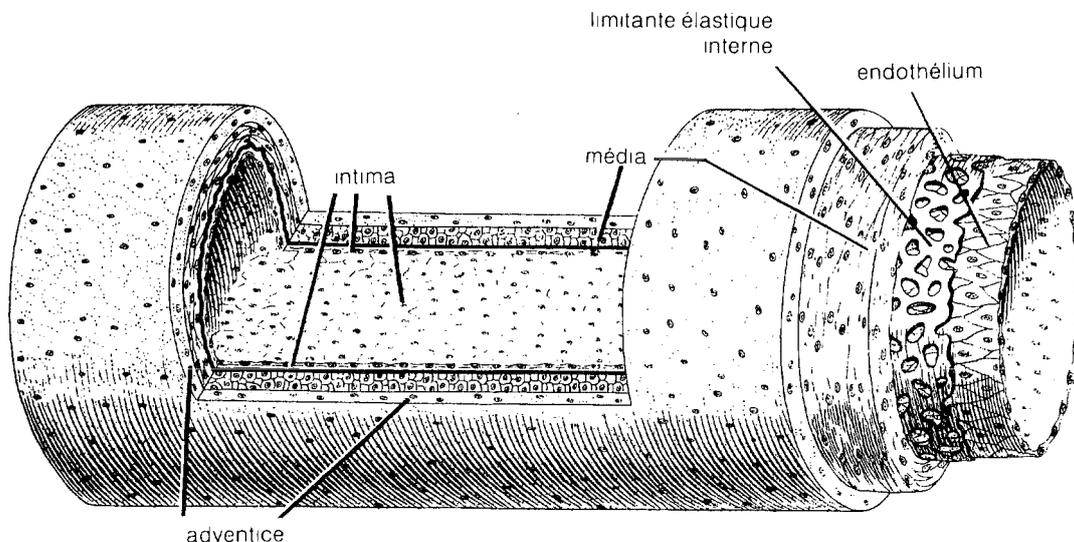


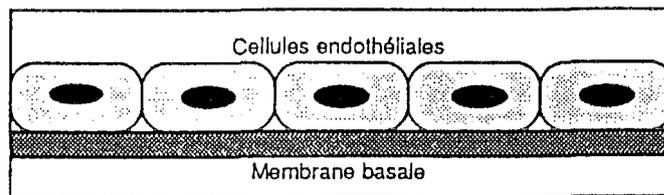
Schéma d'une artère de moyen calibre (artère musculaire) montrant les différentes tuniques. Sur les préparations histologiques de routine les tuniques apparaissent plus épaisses que sur ce schéma. Les travaux expérimentaux suggèrent cependant que ce schéma reproduit fidèlement l'architecture de ce vaisseau tel qu'il se présente in vivo. En effet, après la mort, les vaisseaux se contractent, leurs tuniques devenant plus épaisses et leur lumière plus petite et plissée.

(Junqueira, 1987)
figure n° 17

- Les différents types d'endothélium capillaires :

Les capillaires sanguins, en fonction de l'architecture de la paroi endothéliale et de la membrane basale sous-jacente, sont habituellement classés en trois groupes différents : continus, fenêtrés, discontinus ou sinusoïdaux.

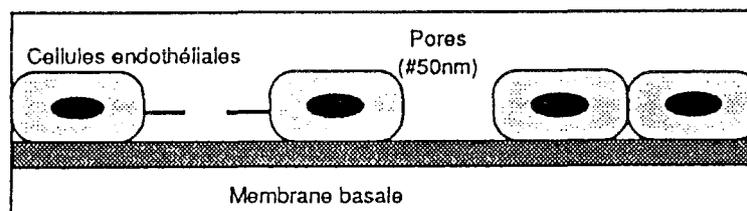
La paroi des endothélium capillaires **continus** (figure n° 18), est constituée d'une monocouche ininterrompue de cellules endothéliales réunies par des jonctions serrées (tight junctions) intercellulaires. Cette monocouche repose sur une membrane basale, elle-même continue, de faible épaisseur. Les cellules endothéliales sont pourvues de nombreuses vésicules de pinocytose, appelées vésicules plasmalemmales, dont le diamètre est de l'ordre de 50 nm.



Structure d'un endothélium capillaire de type continu.

figure n° 18

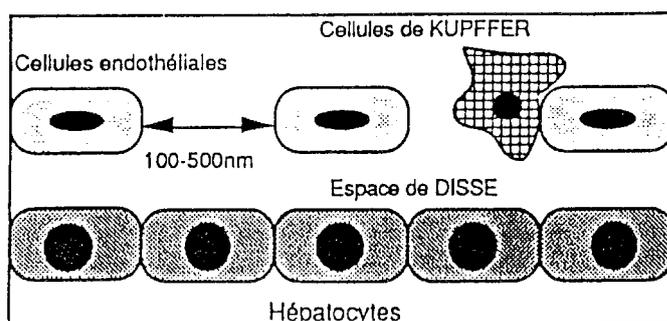
La paroi des endothélium capillaires **fenestrés** (figure n° 19), à la différence de celle des capillaires continus, possède de nombreuses fenestrations ou pores de 30 à 80 nm de diamètre. Comme dans les capillaires continus, les cellules endothéliales des capillaires fenestrés sont pourvues de nombreuses vésicules plasmalemmales.



Structure d'un endothélium capillaire de type fenestré.

figure n° 19

Dans les endothélium capillaires **discontinus** (figure n° 20), la monocouche de cellules endothéliales et la fine membrane basale, de structure discontinue, laissent place à de larges ouvertures de 100 nm et davantage. La membrane basale peut même être absente.



Structure d'un endothélium capillaire de type discontinu (sinusoïdes hépatiques).

figure n° 20

Le Tableau VII indique la localisation dans l'organisme des trois types d'endothélium capillaires.

**LOCALISATION DANS L'ORGANISME
DES TROIS "TYPES" DE CAPILLAIRES**

CONTINUS	FENESTRES	DISCONTINUS "SINUSOIDAUX"
Cerveau	Rein	Foie
Cœur	Intestin grêle	Rate
Poumon	Glandes endocrines	Moelle osseuse
Muscle lisse	Plexus choroïde	Antéhypophyse
Peau		Corticosurrénale
		Parathyroïde

Tableau VII

Ainsi, le cœur, les poumons et le cerveau sont pourvus de capillaires continus, les reins de capillaires fenestrés, le foie, la rate et la moelle osseuse de capillaires discontinus.

Tout cela laisse présager l'inaptitude des liposomes à franchir la paroi des capillaires continus et fenestrés. Cependant, les liposomes unilamellaires, de diamètre égal ou inférieur à 50 nm, pourraient traverser la paroi soit par l'intermédiaire de canaux transendothéliaux soit par un mécanisme de transcytose.

Dans cette deuxième éventualité, les liposomes, après avoir fixé dans la circulation générale un ligand approprié, seraient reconnus par un récepteur spécifique présent sur la face luminale des cellules endothéliales. Cependant, sur le plan quantitatif, ces types de passage sont toutefois de trop faible intensité pour permettre à un médicament encapsulé de produire un effet thérapeutique suffisamment efficace. Par ailleurs, après capture par les monocytes circulants, les liposomes pourraient gagner les organes et les tissus irrigués par des capillaires continus. Cette voie, en quelque sorte indirecte déjà démontrée pour le poumon, pourrait également prendre place dans d'autres tissus ou organes.

Les capillaires discontinus permettent l'extravasation des liposomes à condition que le diamètre de ces derniers soit inférieurs à 100 voir 200 nm : le foie, la rate et la moelle osseuse sont concernés par ce type de passage.

En ce qui concerne l'extravasation des liposomes au niveau des capillaires cérébraux, des résultats très contradictoires sont obtenus. Il n'existe aucune preuve formelle du franchissement de la paroi des capillaires cérébraux par des liposomes intacts. La présence de jonctions extrêmement serrées et du nombre restreint de vésicules plasmalemmales ne sont pas en faveur de ce passage. Certes, comme pour les capillaires continus, un passage par un mécanisme de transcytose ne peut être exclu, mais il est certainement réservé aux liposomes unilamellaires et quantitativement de faible intensité. Cependant, dans certaines conditions bien précises, (ischémie, oedème), conduisant à une modification de la barrière hématoencéphalique, les liposomes semblent pouvoir faciliter la pénétration d'une substance dans le cerveau. C'est du moins ce que semblent démontrer les expériences réalisées avec les liposomes de superoxyde dismutase ou d'ATP (Delatre, 1993).

VII.2. Fenestration « occasionnelles » (Delatre, 1993)

Il existe des circonstances où la perméabilité des capillaires est augmentée (inflammation, tumeur) et où l'intégrité de leur structure est altérée (ischémie). Ces conditions pourraient favoriser le passage transendothélial de liposomes.

VII.2.1. Site inflammatoire

Lorsqu'il y a vasodilatation dans le site inflammatoire, on remarque la sortie des liposomes qui profitent du phénomène d'extravasation de l'eau, ce qui entraîne l'oedème accompagné, de douleur, de rougeur et de chaleur.

Ce phénomène physiologique peut varier dans son installation selon que l'on a affaire à un organe sain ou malade.

Un granulome expérimental est choisi comme modèle d'étude d'un état inflammatoire. Des mesures de radioactivité sont effectuées dans l'exsudat suite à l'administration de sérum albumine bovine radioactive soit sous forme libre soit associée à des liposomes (SUV, MLV). Les résultats obtenus démontrent qu'au niveau de la lésion inflammatoire les capillaires restent imperméables aux vésicules phospholipidiques, même dans les conditions où le passage de macromolécules est fortement augmenté (sous l'action des prostaglandines par exemple).

VII.2.2. Endothélium défectueux des tumeurs malignes

Dans ce cas, tous les échanges sont un peu anarchiques. La fenestration entre les cellules endothéliales, que l'on trouve dans cette néo-vascularisation, permet au liposome de pénétrer dans la tumeur.

Les macrophages absorbent les liposomes ainsi que des déchets, ou éventuellement des champignons, dont l'absorption est une des causes d'affections opportunistes, lorsque les macrophages sont altérés et dégradés.

Les liposomes porteurs d'un principe actif antifongique peuvent être absorbés et détruits par les phospholipases, ce qui entraîne la libération d'amphotéricine B, les champignons qui se trouvent dans le macrophage sont alors détruits.

Enfin le liposome peut entrer dans la cellule maligne et s'y accumuler. On ne sait pas expliquer, à l'heure actuelle, cette affinité pour les cellules malignes.

Des vecteurs tels que les liposomes mais aussi les nanoparticules, les immunotoxines et les anticorps monoclonaux peuvent améliorer le ciblage des médicaments au sein des tumeurs. En effet, les résultats de nombreux travaux suggèrent que la perméabilité vasculaire est augmentée dans les zones tumorales (Jain, 1990 et Poste *et al*, 1984). Cependant, cette propriété est extrêmement variable et dépend étroitement du type de tumeur.

La microcirculation dans les régions tumorales présente la particularité d'être très hétérogène. Elle se caractérise par la présence de plusieurs types de capillaires ; ceux-ci peuvent être continus, fenestrés et sinusoidaux et leur structure est semblable à celle des capillaires des tissus normaux. On note également la présence de canaux sinusoidaux dont le pourtour est constitué presque exclusivement de cellules tumorales. Des capillaires géants dont la lumière peut atteindre 50 micromètres sont trouvés dans les zones de croissance tumorale ; ils sont constitués d'une monocouche de cellules.

VII.3. Protéines P

Nous devons insister sur les limites des médicaments cytostatiques vis-à-vis des cellules malignes, on constate en effet le rejet d'un cytostatique par la protéine P dès sa pénétration dans la cellule cancéreuse. Il faut donc rechercher un autre système d'entrée dans la cellule, ceci est un des buts majeurs de la recherche anticancéreuse ; les liposomes peuvent-ils jouer un rôle ?

Le devenir dans l'organisme des liposomes et des principes actifs encapsulés dépend de très nombreux paramètres, que l'on peut classer en deux groupes principaux :

— *Groupe 1* : les facteurs associés aux caractéristiques physico-chimiques et structurales du vecteur : composition et nombre des bicouches, taille, charge électrique superficielle, influence spécifique du principe actif encapsulé, etc. ;

— *Groupe 2* : les facteurs liés aux caractéristiques physico-chimiques du milieu auquel sont confrontés les liposomes et leur contenu actif : fluides biologiques ou barrières membranaires, milieux intracellulaires, etc.

La voie d'administration joue donc, indépendamment du type de liposome étudié, sur le devenir ultérieur du vecteur et du principe actif qu'il véhicule.

Compte tenu de ses importantes potentialités de distribution, la voie d'administration intraveineuse est le plus souvent retenue pour les études pharmacocinétiques relatives aux liposomes. Il est donc important de préciser les mécanismes d'interaction des liposomes avec les milieux qui seront les premiers rencontrés après une injection directe dans la circulation (Devissaguet et Puisieux, 1993).

VIII. INJECTION D'UN LIPOSOME PAR VOIE PARENTERALE

Dans un premier temps, nous discuterons des interactions avec les composants du sang, puis ensuite, avec le système phago-mononucléé, avec les cellules parenchymateuses du foie et enfin nous traiterons l'interaction cellulaire.

VIII.1. Interactions avec les composants du sang

Après une injection intraveineuse, ou après le passage dans la circulation sanguine à la suite d'une administration extravasculaire, les liposomes sont confrontés aux éléments cellulaires sanguins. En raison de leur abondance numérique les érythrocytes et les plaquettes paraissent les plus concernés a priori ; les monocytes et les neutrophiles possèdent une activité phagocytaire mais sont beaucoup moins bien représentés. L'interaction des liposomes avec des plaquettes est démontrée *in vitro* (Juliano *et al*, 1983), et leur capture par des granulocytes est mise en évidence *in vivo* (Finkelstein *et al*, 1981).

Les conséquences quantitatives de ces interactions cellulaires sur le devenir des liposomes *in vivo* sont inconnues. Certaines cellules ayant endocyté des liposomes sont considérées comme sénescents et, en tant que telles, captées par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM). D'autres, ayant fixé superficiellement ou ayant internalisé des liposomes, peuvent en fonction de leur capacité à quitter le lit vasculaire, véhiculer leur charge vers des sites extravasculaires (Devissaguet et Puisieux, 1993).

VIII.1.1. Lipoprotéines

Les lipoprotéines contenus dans le sang interagissent avec les liposomes, par exemple, les opsonines se fixent sur les liposomes et sont reconnues par le système phagocytant ; ceci va entraîner la dégradation des liposomes.

Les lipoprotéines sont capables d'échanger des phospholipides avec les liposomes.

Ces modifications peuvent nuire au rôle de vecteur attribué aux liposomes.

VIII.1.2. Technique du taxi

Il s'agit de fixer le principe actif sur le liposome qui va le véhiculer à l'endroit désiré, après injection de celui-ci dans l'organisme dans un but thérapeutique précis.

VIII.2. Interactions avec le système phago-mononucléé

Un des obstacles rencontrés par le liposome est le système phago-mononucléé. Les micro-vaisseaux sanguins peuvent, de par leur diamètre, entraîner un arrêt de ces microsomes, mais les liposomes véhiculés dans le sang peuvent aussi être arrêtés dans les organes tels que le foie (cellules de Küpfer), les poumons, la rate et la moelle osseuse. On constate donc une clairance très brève des liposomes du fait de cette phagocytose rapide.

Le fait d'augmenter leur taille ne résout pas le problème, les cellules de Küpffer peuvent aller les chercher dans le sang.

Les interactions avec les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM) constituent l'un des éléments essentiels de la clairance sanguine des liposomes.

Ces cellules correspondent à des localisations anatomiques diverses : monocytes sanguins, cellules de Küpffer des sinusoides hépatiques, macrophages spléniques, cellules mononucléées de la moelle osseuse, cellules dendritiques cutanées, macrophages alvéolaires, péritonéaux, lymphatiques. L'activité physiologique fonctionnelle des cellules du SPM consiste dans l'épuration des cellules sénescents, débris cellulaires, agrégats protéiques, bactéries et virus. Cette activité s'étend, selon des mécanismes de phagocytose non spécifiques, à l'épuration de toute structure colloïdale présente dans l'organisme, incluant donc les liposomes.

L'épuration plasmatique des liposomes par les macrophages est un phénomène généralement très rapide, avec une demi-vie initiale se comptant en minutes après administration de doses non saturantes. De nombreux efforts sont faits pour essayer de ralentir ce processus mais, quelles que soient les approches envisagées, la capture d'une forte proportion des liposomes circulants par les cellules du SPM apparaît inéluctable après une administration intraveineuse.

Les capacités d'interaction des liposomes circulants avec les cellules du système phago-mononucléé sont étroitement dépendantes des caractéristiques du tissu concerné mais aussi de celles des liposomes (Devissaguet et Puisieux, 1993).

VIII.3. Interaction possible avec des cellules parenchymateuses du foie

La capture des liposomes par les cellules parenchymateuses du foie est un processus actif, mais saturable qui dépend de certains paramètres :

- la dose, la taille, la composition ainsi que la charge des liposomes.
- et aussi de l'état pathologique rencontré.

Dans le cas des capillaires sinusoidaux, des informations sur un éventuel passage transendothélial des vésicules phospholipidiques sont obtenues en étudiant *in vivo* le devenir hépatique de SUV ou de MLV injectés par voie intraveineuse.

Après injection de liposomes radioactifs suivie d'un fractionnement cellulaire, Poste *et al*, en 1982 procèdent à une étude ultrastructurale par microscopie électronique et à une analyse de biodistribution. Ils montrent ainsi que la taille des liposomes est un facteur déterminant dans leur interaction avec les cellules hépatiques.

Les MLV sont captés presque exclusivement par les cellules non parenchymateuses (cellules de Küpffer) alors que les SUV peuvent se retrouver intacts dans les cellules parenchymateuses (hépatocytes).

Ces résultats sont en accord avec la présence chez les capillaires sinusoidaux d'ouvertures d'environ 100 nm permettant aux SUV mais non aux MLV d'atteindre les hépatocytes. Il faut signaler qu'un transfert de phospholipides des MLV vers les hépatocytes peut avoir lieu soit à partir du sang par le relais des lipoprotéines de haute densité circulantes, soit à partir des cellules de Küpffer ayant capté ces MLV, et selon un mécanisme encore mal élucidé (Delatre, 1993).

VIII.4. Interaction cellulaire

Les liposomes sont susceptibles d'assurer des fonctions de transport intracellulaire et de stockage. La figure n° 21 schématise un certains nombre d'interactions les plus fréquentes d'un système organisé, ici une cellule animale avec des liposomes (Ollivon et Paternostre, 1993).

ADSORPTION

Elle est facilitée par la charge des vésicules portées par les constituants primaires (les phospholipides) et secondaire (groupements ajoutés).

ENDOCYTOSE

La digestion de la membrane des liposomes par les LYSOSOMES à l'intérieur de la cellule entraîne la libération du principe actif qui est influencée par les charges de la vésicule.

TRANSFERT LIPIDIQUE

Par l'intermédiaire de protéines de surface.
Interaction entre les lipides des liposomes et les lipides membranaires, d'où l'intérêt des LIPOPROTEINES incluses dans la membrane.

FUSION

C'est un phénomène SEDUISANT et SIMPLE mais CONTROVERSE et non démontré qui imagine l'insertion de la membrane du liposome dans la membrane cellulaire.

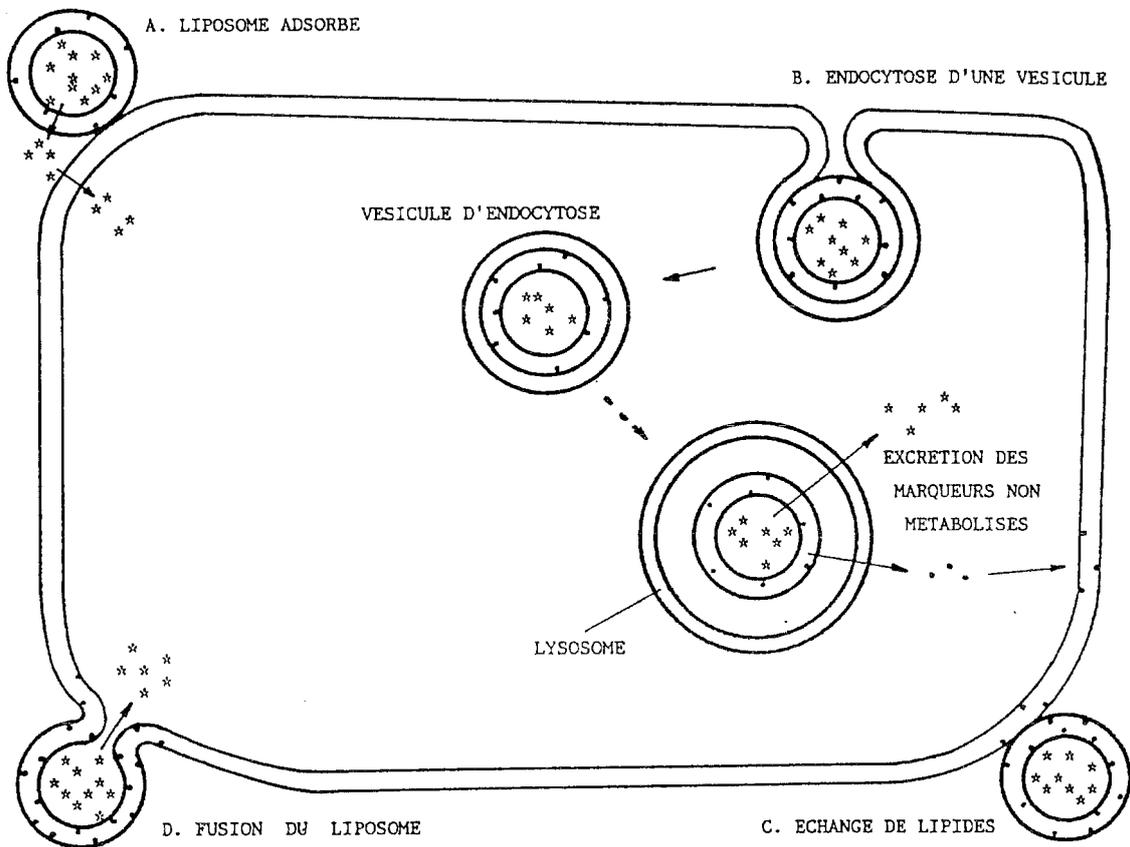
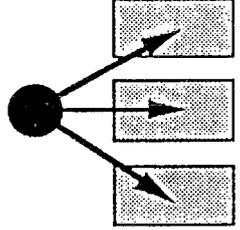
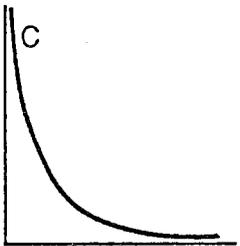
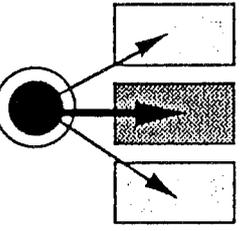
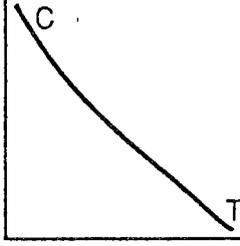


figure n° 21

Le transfert de gène systémique, fournit de nouvelles possibilités pour les analyses des fonctions et de la régulation de gènes *in vivo*, comme la thérapie génique humaine. Le transfert du gène acétyltransférase de chloramphénicol est utilisé pour examiner plusieurs paramètres importants dans l'efficacité des liposomes cationiques lors du transfert **intraveineux** de gènes dans une souris. Ainsi nous démontrons que cette approche peut produire un haut niveau d'expression de gènes biologiquement importants. Spécifiquement, nous estimons qu'il y a une relation étroite, avec le projet d'un vecteur, ayant un niveau d'expression du gène au niveau systémique, et nous comparons le ni-

veau de transfection produit par l'injection intraveineuse d'ADN seul, à l'opposé des complexes ADN-liposomes. Nous trouvons que pour les deux, la position de l'intron hétérologue et l'élément promoteur utilisé dans l'expression du plasmide, affecte significativement le niveau d'expression du gène systémique. Même si, l'injection intraveineuse de l'ADN de plasmide seul transfécte tous les tissus analysés, ceux qui sont amenés par les liposomes sont beaucoup plus efficaces (figure n° 22).

Au cours de ces études, plusieurs paramètres sont explorés, montrant d'une part un effet sur l'efficacité du transfert et de l'expression de gènes systémiques, et d'autre part que les vecteurs, comme les porteurs d'ADN pour le transfert de gènes systémiques, peuvent produire une expression plus efficace et finalement permettent un meilleur traitement pour une grande variété de maladies génétiques (Yong *et al*, 1995).

	CONCENTRATION DU PRINCIPE ACTIF DANS LES SITES CIBLES ACCESSIBLES	DETOURNEMENT DU PRINCIPE ACTIF DE CERTAINS ORGANES	MAINTIEN PROLONGE DE CONCENTRATIONS SUPERIEURES
PRINCIPE ACTIF LIBRE			
PRINCIPE ACTIF VECTORISE			
EXEMPLES	MACROPHAGES, TISSUS IRRIGUES PAR DES CAPILLAIRES A ENDOTHELIUM DISCONTINU	COEUR, REINS	PRINCIPES ACTIFS A CLAIRANCE ELEVEE ET DEMI-VIE COURTE

Potentialités thérapeutiques des liposomes administrés par voie intraveineuse.

(Devissaguet et Puisieux, 1993)

figure n° 22

IX. LES LIPOSOMES A LIBERATION SPECIFIQUE

Il s'agit de liposomes conçus pour délivrer spécifiquement leur contenu le plus près possible d'un site donné, en mettant à profit une caractéristique particulière de ce dernier. A ce groupe appartiennent les liposomes thermosensibles, les liposomes pH-sensibles, ainsi que les liposomes fusogènes, dont la paroi est conçue pour fusionner avec la membrane de certaines cellules ou la membrane d'organites cellulaires.

IX.1. Liposomes thermo-sensibles

Les liposomes thermo-sensibles font l'objet de recherches principalement dans le domaine de la thérapie des cancers. Leur conception utilise le fait que la libération du contenu est maximale à la température de transition (T_c) du système vésiculaire. La stratégie consiste alors :

- a) à utiliser des liposomes de T_c supérieure à la température physiologique (par exemple $42\text{ }^\circ\text{C}$) ;
- b) à porter spécifiquement la cible (par exemple la tumeur visée) à cette température. Des résultats intéressants sont obtenus chez l'animal avec des liposomes thermo-sensibles de cisplatine ou de méthotrexate. Par ailleurs *in vitro*, on démontre la cytotoxicité de liposomes thermo-sensibles de doxorubicine vis-à-vis de cellules tumorales humaines Hela S3.

L'approche des liposomes thermo-sensibles, fondée sur une libération sélective au niveau de la cible, permet au système d'être efficace sans qu'il lui soit nécessaire de pénétrer à l'état intact au sein du tissu visé. Elle implique, en revanche, une connaissance exacte de la localisation de la cible et paraît ainsi incapable de résoudre le problème habituellement posé, dans le traitement des cancers, par l'éradication des métastases.

IX.2. Liposomes pH-sensibles

Les liposomes pH-sensibles sont préparés à partir de phospholipides particuliers : la N-palmitoylhomocystéine (PHC), le cholestérylhémisuccinate (CHEMS), l'acide oléique (AO), et la N-succinyldioléylphosphatidyl-éthanolamine (SOPE). Deux objectifs peuvent être envisagés :

- a) au niveau tissulaire, libération sélective de principes actifs dans certains tissus pathologiques caractérisés par un pH différent de celui des tissus normaux : par exemple, sites faisant l'objet d'une inflammation ou d'une infection ($\text{pH} < 7$) ;
- b) au niveau cellulaire, déstabilisation rapide des liposomes après endocytose, permettant au principe actif d'être libéré et de passer dans le compartiment cytoplasmique avant d'arriver au contact des enzymes lysosomales.

Utile pour des principes actifs sensibles à des enzymes (peptides, protéines), cette stratégie implique la conception de liposomes capables, après endocytose, de laisser fuir le principe actif au pH des compartiments prélysosomiaux ($\text{pH} 5-6,5$). Des résultats intéressants sont obtenus avec des liposomes contenant des immunomodulateurs peptidiques, l'interféron et le muramyldipeptide. L'activation des macrophages est nettement plus marquée, *in vitro*, lorsque les immunomodulateurs sont encapsulés dans des liposomes sensibles à pH voisin de 7 (libérant ainsi leur principe actif avant le stade lysosomal), plutôt qu'encapsulés dans des vésicules sensibles à pH 4 (libérant ainsi leur principe actif en milieu lysosomal).

IX.3. Liposomes fusogènes

Les liposomes fusogènes, comme les liposomes pH sensibles, ont pour objectif d'éviter au principe actif le contact avec les enzymes lysosomales. Ils sont conçus pour que leur paroi fusionne soit avec la membrane des cellules cibles, soit avec celle des compartiments prélysosomiaux (endosomes). D'intéressants résultats sont attendus, par exemple, dans le domaine de la vectorisation des oligo - et des polynucléotides (amélioration de la stabilité *in vivo* et de la pénétration intracellulaire).

X. LES LIPOSOMES PILOTABLES

A ce groupe appartiennent les liposomes magnétiques. Contenant du Fe_3O_4 , ces systèmes peuvent être guidés vers une cible (tumeur) à l'aide d'un aimant externe.

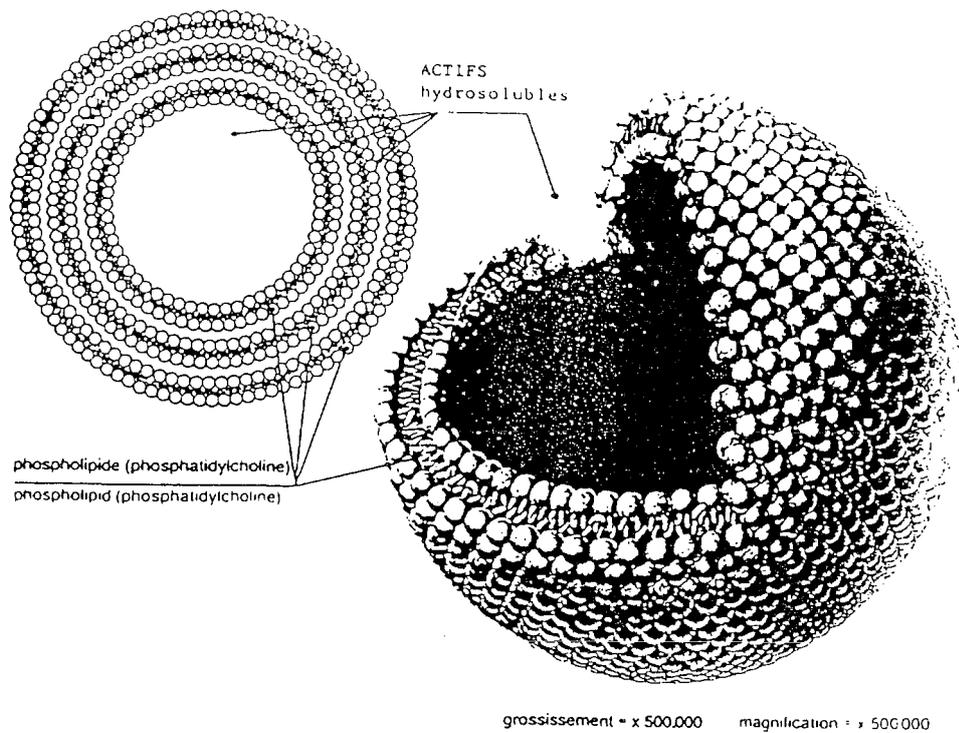
XI. LES LIPOSOMES AUTO-PILOTÉS

Il s'agit de liposomes pourvus d'un ligand (anticorps ou tout autre ligand capable de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec la cible visée). De plus, certains systèmes sont conçus pour assurer une libération spécifique de leur contenu au niveau de la cible : immunoliposomes pH-sensibles et/ou fusogènes.

Malgré des limites maintenant bien identifiées (incapacité à franchir certaines barrières, notamment l'endothélium vasculaire, capture rapide par le SPM, internalisation aléatoire du contenu après interaction avec les cellules cibles, antigénicité éventuelle des ligands protéiques, et dans le cas des anticorps et du cancer, une hétérogénéité antigénique certaine des cellules tumorales et la possibilité de réactions croisées avec les cellules normales), les systèmes autopilotés continuent à offrir d'intéressantes perspectives.

Celles-ci ne peuvent évidemment concerner que des cibles accessibles à ces systèmes et passent naturellement par le choix d'une voie d'administration appropriée. Parmi les systèmes récemment décrits, nous pouvons mentionner, par exemple pour une voie intracavitaire, des immunoliposomes de doxorubicine à administrer par voie intrapéritonéale dans le traitement de carcinomes ovariens et, pour la voie systémique, des liposomes de méthotrexate conçus pour cibler les antigènes CD4 et CD7 (Devissaguet et Puisieux, 1993).

La figure n° 23 illustre le liposome en trois dimension et nous permet de faire la transition entre le liposome structural et son rôle dans l'approche médicale qui fait l'objet de notre deuxième partie.



Représentation schématique d'un liposome
figure n° 23

APPROCHE MEDICALE

I. PRESENTATION

La compréhension des mécanismes moléculaires est essentielle dans le traitement des maladies : « Primum non NOCERE » nous rappelle l'adage bien connu « d'abord ne pas nuire ».

On ne recherche en premier lieu, que l'action favorable des médicaments sur les maladies traitées, en éliminant si possible la plupart des effets indésirables sur les tissus et les organes sains.

Des recherches de composés actifs se sont développées, afin de donner aux thérapeutes le choix du médicament qui aura une action sélective sur les organes ou les micro-organismes appropriés. La « spécificité » de la molécule n'est pas basée seulement sur l'accumulation sélective au niveau de l'organe cible, normalement il y en a plus ou moins dans tout l'organisme et c'est seulement son activité qui est maximale au niveau de la zone affectée.

En somme, pour atteindre cette zone, la molécule doit traverser d'autres organes, cellules, compartiments intracellulaires, etc. , où elle peut être partiellement inactivée.

En conséquence, pour atteindre une assez grande concentration thérapeutique locale du médicament, on doit l'administrer en grande quantité, la majorité étant perdue dans les tissus sains périphériques. Même si le médicament n'entraîne pas de complications, la perte de préparation protéique hautement antigéniques contenue dans les liposomes en thérapie génique, a un effet négatif général, développé graduellement dans l'organisme. Pour éviter ces complications, de nouvelles méthodes d'administration sont développées. Le thérapeute essaie d'intervenir *in situ*, mais ces méthodes utilisées par exemple en cardiologie sont délicates et pénibles pour le patient. Elles permettent cependant de véhiculer des enzymes thrombolytiques dans l'artère coronaire pour dissoudre le caillot indésirable.

La solution idéale de ce problème semble être la molécule qui atteint la cible, molécule dont la propriété est de s'accumuler dans l'organe affecté ; on recherche une solution rapide, sélective et quantitative, indépendamment du lieu et de la méthode d'administration. La concentration locale du médicament dans l'organe cible, doit être élevée et faible au niveau des autres organes pour éviter les réactions indésirables.

Les avantages de cette forme médicamenteuse sont nombreux :

- simplification des méthodes d'administration,
- décroissance drastique quantitative du médicament,
- possibilité d'augmenter localement la concentration thérapeutique du médicament.

Le concept hypothétique de « magic bullet », datant de 100 ans, parlait déjà des idées générales concernant le médicament destiné à une cible précise. Le terme utilisé à l'époque n'était pas bien entendu « liposome », mais tout simplement « sphère » (qui devint ensuite « sphérulite »...).

Ces « sphères » pour trouver leur lieu d'affectation dans l'organisme et le traiter, au tout début du concept devaient avoir deux propriétés :

- a) reconnaître la cible,
- b) avoir une action thérapeutique performante.

Ceci correspond au concept actuel du médicament vectorisé sous forme de liposome.

Pour ce faire, le médicament doit posséder les trois caractéristiques suivantes :

- a) rejoindre la cible,
- b) utiliser un transfert fiable (vecteur),
- c) contenir un principe actif efficace.

Le choix et la reconnaissance de la cible peut se faire à trois niveaux différents :

- a) sur un organe entier,
- b) sur des cellules spécifiques caractéristiques de l'organe cible,
- c) sur certains composants chimiques de ces cellules.

Par exemple, dans le foie il serait intéressant que le liposome distingue les cellules de Küpffer des hépatocytes, distinction qui peut se faire au niveau des récepteurs cellulaires, cette recherche intéressante concerne les maladies métaboliques de certaines cellules.

Les progrès à réaliser dans ce domaine touchent de très près les disciplines suivantes : médecine, chimie, physique, biochimie, pharmacologie et immunologie.

Les différents systèmes de médicaments vectorisés agissent de plusieurs façons :

- application directe,
- cible physique,
- cible magnétique,
- médicament immobilisé, systèmes de libération prolongée,
- molécules vecteurs,
- polymères activés pharmacologiques,
- systèmes de microréservoir.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux liposomes comme transporteurs de médicaments.

De nombreux scientifiques classent les liposomes parmi les transporteurs de médicaments idéaux, ils sont biologiquement inertes et complètement biodégradables ; en général, ils ne sont ni toxiques, ni antigéniques, ni pyrogènes.

Leurs phospholipides peuvent être utilisés comme composants de membranes biologiques ; ces composants inclus dans les liposomes sont protégés plus particulièrement de l'action des enzymes ou inhibiteurs ; les liposomes offrent une opportunité unique pour introduire un médicament dans les cellules. Ils interagissent avec les cellules par fusion ou endocytose ; et pratiquement tous les médicaments peuvent être inclus dans les liposomes.

Les médicaments hydrosolubles sont capturés par l'espace hydrophile de la membrane du liposome.

Actuellement, il existe de nombreux exemples d'incorporation de différents médicaments (incluant les enzymes, les hormones, les vitamines, les antibiotiques, les agents cytostatiques, etc.) dans les liposomes.

Il est important de remarquer, que les liposomes, indépendamment de leur taille, leur charge ou la composition de leurs phospholipides, en administration intraveineuse, sont rapidement remis en circulation (50 à 80% pendant les 20 à 40 min., surtout pour les grands liposomes), principalement par les cellules du système réticuloendothélial et surtout par le foie, pouvant entraver leur utilisation pratique. Cette propriété peut compliquer l'administration des médicaments protéiques dans des liposomes, surtout les injections sous-cutanées ou intramusculaires.

Par ailleurs, la propriété mentionnée précédemment ouvre de nouvelles voies d'utilisation pour les liposomes, comme potentiel d'adjuvant immunologique, en médecine (Vladimir et Torchilin, 1984).

Un principe actif suit, *in vivo*, trois processus essentiels : absorption, distribution, élimination (ces deux derniers étant seuls représentés après une administration intravasculaire). Chacun de ces événements met en jeu des transferts de masse et exerce une influence sur les concentrations de principe actif obtenues au sein des différents tissus, en particulier les tissus concernés par l'activité pharmacologique spécifique faisant référence aux aspects, non seulement quantitatifs mais aussi cinétiques, du devenir *in vivo*. Ces paramètres sont : la biodisponibilité (intensité et vitesse) pour l'absorption, le volume de distribution et les constantes de vitesse d'échange (sang vers tissus et/ou organes, et réciproquement) pour la distribution, la clairance et la demi-vie biologique en ce qui concerne l'élimination (Devissaguet et Puisieux, 1993).

II. POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUES DES LIPOSOMES

L'intérêt majeur des liposomes, mais aussi d'autres formes colloïdales analogues (nanoparticules et nanocapsules polymères en particulier, émulsions à un moindre degré), est qu'ils permettent d'envisager une influence de la forme galénique, non plus sur la seule étape d'absorption, mais aussi et surtout sur celle de distribution et, dans certains cas, sur celle d'élimination.

II.1. Influence sur la distribution

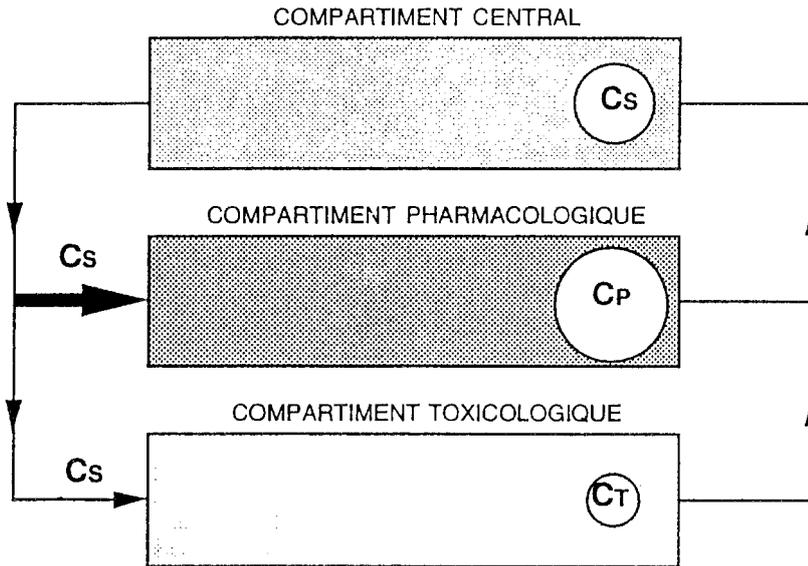
Les propriétés physico-chimiques d'un principe actif sont masquées par son encapsulation dans un liposome, du moins tant que la structure du vecteur demeure intacte ou qu'une fuite de la molécule vers le milieu environnant est évitée. Ainsi, la distribution intracorporelle de ce principe actif ne dépend plus de ses caractéristiques propres, mais de celles de son vecteur.

Il convient de souligner que le ciblage d'un principe actif vectorisé peut résulter, soit de la distribution spécifique du vecteur, soit de la libération sélective au sein de la cible, du contenu d'un vecteur ne bénéficiant pas, par lui-même, d'une distribution spécifique (figures n° 24, 25, 26).

Le devenir des liposomes dans l'organisme peut donc influencer, au moins momentanément et partiellement, celui des molécules qu'ils véhiculent. Il est clair que le vecteur doit, à un moment ou à un autre, délivrer son contenu sous une forme disponible en vue d'un effet pharmacologique.

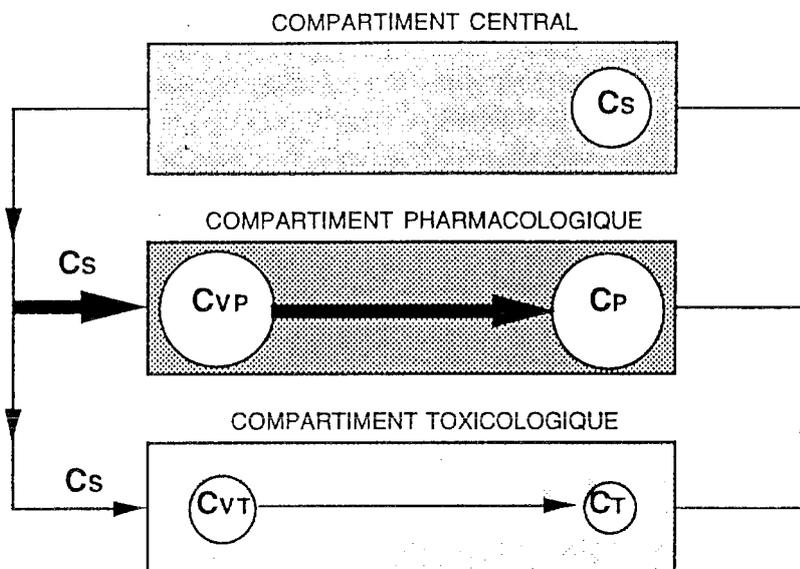
La molécule ne peut, en effet, exercer son activité que si elle est libre et capable de se fixer à un récepteur biologique. A partir du moment, où le principe actif est libéré par le vecteur, son devenir *in vivo* redevient celui imposé par ses propres caractéristiques physico-chimiques.

Du point de vue pharmaco-thérapeutique, la modulation de la distribution d'un principe actif constitue l'intérêt essentiel des liposomes, cependant les autres aspects du devenir *in vivo* (absorption et élimination) peuvent également être modifiés par une encapsulation dans ces vecteurs.



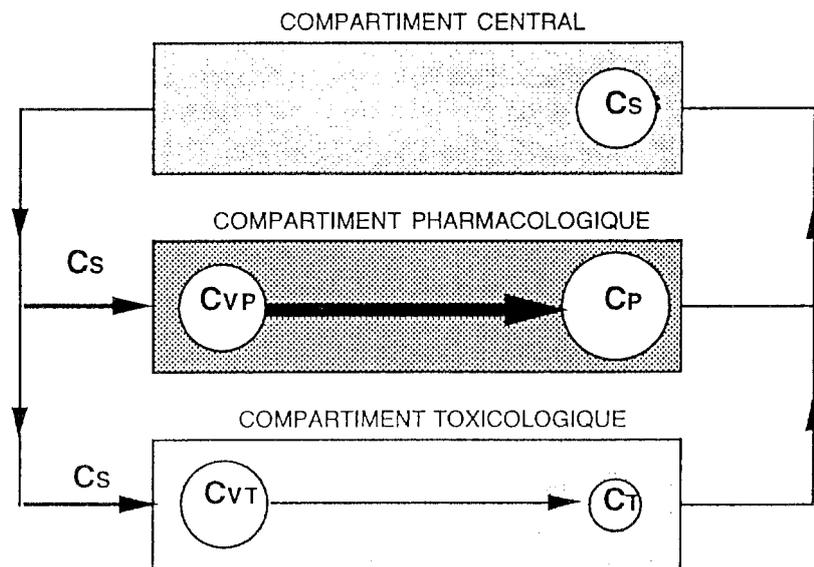
Modèle pharmacocinétique de distribution d'un principe actif administré sous forme libre. Les concentrations de principe actif dans les compartiments pharmacologique (C_p) et toxicologique (C_T) dépendent des seules propriétés physico-chimiques de la molécule, qui conditionnent ses affinités tissulaires (C_s = concentrations sanguines).

figure n° 24



Modèle pharmacocinétique de distribution d'un principe actif administré sous forme vectorisée. Les concentrations de principe actif dans les compartiments pharmacologique (C_p) et toxicologique (C_T), dépendent des concentrations du vecteur (C_{vp} et C_{vt} respectivement), elles-mêmes liées aux propriétés physico-chimiques de celui-ci, qui conditionnent ses affinités tissulaires (C_s = concentrations sanguines).

figure n° 25



Modèle pharmacocinétique de distribution d'un principe actif associé à un vecteur présentant un mécanisme de libération spécifique. Les concentrations de principe actif libre dans les compartiments pharmacologique (C_P) et toxicologique (C_T), dépendent de sa libération sélective par le vecteur et sont indépendantes des concentrations de celui-ci (C_{VP} et C_{VT} respectivement). C_{VP} et C_{VT} sont liées aux propriétés physico-chimiques du vecteur (C_s = concentrations sanguines).

figure n° 26

II.2. Influence sur l'absorption et l'élimination

Du fait de leur nature vésiculaire, les liposomes peuvent protéger le principe actif d'une dégradation chimique ou enzymatique et assurer ainsi une meilleure stabilité dans certains environnements biologiques.

Cette stabilité renforcée conduit, au moins localement, à un maintien prolongé de concentrations plus élevées en principe actif. Ceci peut contribuer de manière significative à l'amélioration de l'activité par rapport à une administration de la molécule libre.

Absorption :

On recherche une stabilisation du principe actif au contact des milieux biologiques du site d'administration ainsi qu'une biodisponibilité sur un plan non seulement quantitatif mais également cinétique, du fait de la possibilité d'une libération prolongée de la molécule par les vecteurs. En ce qui concerne l'administration par voie orale, les résultats obtenus sont le plus souvent inférieurs aux espoirs des expérimentateurs en raison d'une stabilité très insuffisante des liposomes en milieu digestif, et plus particulièrement de leur extrême sensibilité aux sels biliaires. Au contraire, l'administration par voie intramusculaire ou sous-cutanée de principes actifs vectorisés par des liposomes a souvent conduit à une augmentation importante de la biodisponibilité, associée à une activité thérapeutique plus prolongée que celle observée après administration de la molécule libre.

Élimination :

La protection d'une molécule encapsulée vis-à-vis des enzymes responsables des réactions de biotransformations permet de réduire l'efficacité de ces mécanismes et de ralentir la vitesse d'élimination, maintenant ainsi plus longtemps des concentrations plus élevées du principe actif. D'un point de vue pharmacologique, de tels résultats correspondent à une réduction de la clairance plasmatique totale et à une majoration de la demi-vie biologique.

D'un point de vue thérapeutique, ces modifications pharmacocinétiques peuvent s'avérer très positives, car elles sont susceptibles de conduire à une activité majorée et prolongée.

Ainsi, quel qu'en soit le mécanisme, mais à la condition que les effets indésirables ou toxiques ne suivent pas une évolution parallèle aux effets favorables, l'administration d'un principe actif sous forme liposomiale peut conduire, à dose égale, à une amélioration de son index thérapeutique (Devissaguet et Pui-sieux, 1993).

III. LE LIPOSOME EN TANT QUE VECTEUR

Les liposomes utilisés comme mécanisme de transport permettent :

- de cibler la pathologie,
- de diminuer les interactions avec les tissus sains,
- de diminuer les interactions avec les autres produits,
- enfin de diminuer l'apparition des effets indésirables.

Tout cela pour amener un principe actif à la cible pathologique.

Ex : dans le cancer d'un organe solide, il faut faire circuler le liposome pour avoir le maximum de chances de rencontrer la tumeur.

Ex : lors d'une infection aussi.

Une voie importante de la recherche en pharmacie galénique est celle de la vectorisation des principes actifs.

Selon Puisieux et Delattre, en 1985, « la vectorisation » peut être considérée comme une opération visant à moduler et, si possible, à maîtriser totalement la distribution d'un principe actif dans l'organisme en l'associant à un système approprié appelé *vecteur* de la substance considérée.

Le principe général de la vectorisation consiste à rendre la distribution de la substance dans l'organisme aussi indépendante que possible des propriétés du principe actif et à la soumettre aux propriétés d'un vecteur convenablement choisi, en fonction de la cible à atteindre.

Actuellement les différentes études portent sur :

a) Les vecteurs de première génération

Dans ce groupe, figurent les microsphères qui contiennent une substance anti-tumorale et qui, introduites par voie intra-artérielle, à proximité de la tumeur, libèrent progressivement leur contenu (taille environ : 200 μm).

b) Les vecteurs de deuxième génération

Ceux-ci sont de taille colloïdale (moins de 1 μm) et peuvent atteindre la cible. Dans ce groupe figurent des nanosphères (50 à 1000 nm), ainsi que des *liposomes* (50 à 3500 nm).

c) Les vecteurs de troisième génération

La recherche s'oriente actuellement vers des vecteurs capables de reconnaître leur cible. A ce groupe appartiennent des nanosphères et des liposomes pilotés par exemple par un anticorps monoclonal.

Les objectifs de ces recherches très prometteuses qui vont ouvrir un nouveau chapitre de la Pharmacie galénique, sont :

- La protection de la molécule active entre le site d'administration et la cible,
- l'amélioration du franchissement des barrières physiologiques de certaines molécules,
- et l'accroissement de la spécificité des vecteurs pour la cible visée (Le Hir, 1997).

Afin d'avoir un système de médicament plus efficace, simple et technologique, nous suggérons la création de médicaments orientés, conjugués, capables de s'accrocher simultanément avec différents composants antigéniques de la cible via des anticorps spécifiques.

Cela suppose que la thérapie ciblée devra inclure une administration séquentielle de la préparation d'anticorps modifiés (ou d'autres vecteurs spécifiques) contre les différents composants de tissus affectés.

Les liposomes en immunologie présentent plusieurs avantages :

1. Ils ne requièrent pas l'utilisation de méthodes chimiques complexes d'immobilisation de vecteur (anticorps) sur les médicaments ou sur les transporteurs. La molécule « pont » (jouant le rôle d'intermédiaire) peut être obtenue facilement par simple modification chimique.
2. Grâce aux liposomes nous pouvons obtenir des anticorps libres une fois qu'ils sont déversés vers leur cible. On pourra utiliser des liposomes ayant une grande demi-vie de circulation.
3. D'un point de vue technologique, le système semble être acceptable. Ces composants, vecteurs, molécules « ponts » et médicaments peuvent être préparés facilement en forme individuelle et peuvent être stockés séparément pendant longtemps.
4. L'approche est presque universelle et peut être appliquée à tous les transporteurs (polymères, liposomes, érythrocytes) et toutes les molécules vecteurs.
5. Pour de nouveaux couples d'affinités, d'autres recherches peuvent probablement produire des systèmes, beaucoup plus efficaces que le système décrit ici (Vladimir *et al*, 1987).

IV. EXEMPLES D'APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

L'utilisation des liposomes en thérapeutique est envisagée depuis une vingtaine d'années. De très nombreuses investigations sont réalisées chez l'animal dans le cadre du transfert de principe actif et d'ADN (Acide Désoxy-riboNucléique).

IV.1. Transferts de principes actifs

IV.1.1 Les antifongiques

Les patients qui souffrent de maladies hématologiques ou d'immunodéficiences développent fréquemment des infections fongiques disséminées avec une localisation fréquente au niveau des organes du système réticulo-endothélial. L'amphotéricine B est utilisée, depuis plus de trente ans, et reste le médicament antifongique le plus efficace dans ces indications. L'utilisation des liposomes comme vecteur d'amphotéricine B est une stratégie d'autant plus cohérente que la distribution tissulaire des liposomes concerne le foie, la rate et les poumons qui sont riches en macrophages et qui constituent donc la cible tissulaire la plus fréquente des infections fongiques systémiques (Couvreur, 1993).

En thérapeutique parentérale et non cosmétique, on utilise les spécialités suivantes :

- daunoxome ® : Première forme liposomale ayant eu une AMM.
- ambisome ® : En ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation)
- mikasome ®

IV.1.1.1. Généralités

Les caractéristiques du principe actif jouent un rôle important dans son intégration aux liposomes.

- Suivant les caractéristiques physico-chimiques du produit :

- amphotéricine B dans la bicouche
- amikacine à l'intérieure dans la phase aqueuse.

- Encapsulation :

- amphotéricine B : enchâssée dans la bicouche lipidique,
- mikasone : encapsulation passive,
- daunorubicine : suivant le pH.

- Acides gras saturés les plus connus :

- Ex : acide arachidonique,
- ils ont une grande influence sur la stabilité.
- la structure T (configuration plus stable) augmente la durée de la date de péremption.
- NEXSTAR suit les bonnes pratiques de fabrication :
 - . Formation du personnel,
 - . Stérilisation,
 - . Matériel de contrôle.

La société Vestar a commencé la commercialisation de liposomes d'amphotéricine (sous le nom d'ambisome®), fin 1989 aux USA et dans quatre pays européens. Les revenus de l'ambisome® sont évalués à 372 000 dollars pour le premier trimestre 1990 (Couvreur, 1993).

- Les tests sur les composants sont décrits dans les monographies.

- Tests sur les composants :

a) L'amphotéricine B est insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants.

Mais mise en contact avec le DSPG (phospholipase), il se crée des liaisons ioniques qui sont solubles.

L'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre, de cathéters intraveineux et de thérapeutiques immunodépressives (chimiothérapie chez les cancéreux, cyclosporine chez les transplantés) a conduit au développement de mycoses cosmopolites (candidoses, aspergilloses, cryptococcoses) ou de mycoses tropicales d'importation (histoplasmoses, coccidiomycoses, paracoccidiomycoses, blastomycoses).

On note également, chez les malades du SIDA, l'apparition fréquente de cryptococcoses et d'histoplasmoses d'évolution rapidement fatale, et celle d'un syndrome de candidoses graves chez les toxicomanes.

Le traitement majeur est la perfusion intraveineuse d'amphotéricine B, mais ce médicament est à l'origine de nombreux effets indésirables (fièvre, frissons, hypotension, anémie normocytaire, hypokaliémie) et, surtout, d'une toxicité rénale pouvant nécessiter l'arrêt du traitement.

Les avantages éventuels d'une encapsulation de l'amphotéricine B dans des liposomes sont étudiés *in vitro*, et *in vivo*, plusieurs essais cliniques sont réalisés et ont conduit à la commercialisation de cette forme dans certains pays (Devissaguet et Puisieux, 1993).

Traitement des infections fongiques par l'amphotéricine B :

Les patients qui souffrent de maladies hématologiques ou d'immunodéficiences développent fréquemment des infections fongiques disséminées avec une localisation fréquente au niveau des organes du système réticulo-endothélial.

L'amphotéricine B est utilisée, depuis plus de trente ans, dans ces indications, bien que son administration par voie intraveineuse se heurte au problème des effets indésirables aigus et chroniques : dysfonctionnement tubulaire rénal, toxicité au niveau du système nerveux central, fièvre et frissons.

Bien que de nouveaux médicaments antifongiques soient développés, aucun ne semble aussi efficace que l'amphotéricine B dans ces indications. Une stratégie alternative consiste à utiliser les liposomes comme vecteurs d'amphotéricine B.

Très récemment, une série d'essais cliniques ont été réalisés avec l'ambisome® qui est une préparation d'amphotéricine B encapsulée dans de petits liposomes unilamellaires. Cette formulation peut être conservée sous une forme lyophilisée. A l'occasion d'une étude portant sur 126 patients, on a pu montrer que l'ambisome® est efficace dans la majorité des cas d'infections fongiques profondes ou superficielles.

Une autre étude démontre que cette préparation est beaucoup mieux tolérée lors de l'administration que les formes traditionnelles d'amphotéricine B. Des résultats encourageants sont également enregistrés avec des patients atteints de cryptococcose méningée associée au SIDA (Coker *et al*, 1991).

L'ensemble des données cliniques collectées avec les liposomes d'amphotéricine B montre donc clairement que cette forme permet de réduire de manière très significative la toxicité aiguë et chronique du médicament. Certains essais suggèrent, même, que la drogue pourrait être plus active sous forme liposomiale, d'autres indiquent, tout au plus, une activité comparable à l'amphotéricine libre. L'ensemble de ces données permet de conclure à un accroissement de l'index thérapeutique du médicament lorsqu'il est administré sous forme de liposomes (Couvreur, 1993).

b) Le daunoxome® avec comme DCI (Dénomination Commune Internationale) la doxorubicine est un agent anticancéreux majeur, particulièrement actif dans un très grand nombre de carcinomes. Cependant, l'efficacité de cet agent est partiellement limitée par l'apparition de cardiomyopathies dose-dépendantes. C'est pourquoi, plusieurs essais cliniques sont réalisés avec des liposomes de doxorubicine en vue de réduire la capture de cet agent anticancéreux par le tissu cardiaque. L'ensemble de ces essais cliniques suggère que la toxicité de la doxorubicine est diminuée de manière significative lorsque ce médicament est administré par voie intravasculaire, sous forme de liposomes. En revanche, si l'activité antitumorale de la doxorubicine est préservée, l'association à des liposomes ne semble pas, par contre, améliorer l'efficacité de la drogue (Couvreur, 1993).

IV.1.1.2. Caractéristiques des antifongiques liposomiaux

a) L'amphotéricine B liposomale :

— entraîne la diminution de la toxicité rénale, ceci est dû au fait que l'amphotéricine B passe au travers du rein, est réabsorbée par les cellules du tube distal et que la destruction des cellules du tube distal est dose dépendante. Au début cette toxicité est réversible, mais peu à peu, plus l'accumulation est augmentée, plus elle devient irréversible. Avec l'amphotéricine B dans les liposomes, il n'y a pas de passage par le glomérule rénal, ni de réabsorption par le tube distal, donc pas de toxicité. C'est un grand avantage lorsqu'il y a une insuffisance rénale.

— On observe la diminution de la réaction allergisante, car il n'y a pas d'interaction de l'amphotéricine B avec les cellules humaines, ni de liaison avec CHO.

Remarque : Rare allergie aux liposomes.

— enfin, on note la diminution du risque d'hémolyse car l'amphotéricine B n'interagit pas avec le CHO du globule rouge.

b) La daunorubicine liposomale :

On peut remarquer quatre avantages :

— une longue $\frac{1}{2}$ vie.

— une diminution de la cardiotoxicité (Dose maximale cumulée = 750 mg/m² pour toutes les anthracyclines, on peut traiter avec plus de 2 g sans cardiotoxicité pour la plupart des patients, donc on suit quand même la fonction cardiaque).

— une diminution des symptômes liés à l'interaction des principes cytostatiques avec les cellules saines.

— une diminution de la nécrose tissulaire provoquée par la daunorubicine en cas d'extravation accidentelle.

c) L'amikacine liposomale :

Nous pouvons constater une diminution de la toxicité rénale (toxicité pour les cellules proximales, mais les liposomes ne passent pas par le glomérule, donc il n'y a pas de réabsorption, et par conséquent, pas de toxicité.

La diminution de l'autotoxicité est difficile à prouver chez l'animal, en plus, l'animal meurt souvent d'autre toxicité avant de montrer cette autotoxicité,

Pour l'instant, on ne peut pas faire les essais cliniques.

Il est important d'éviter les interactions, dans le sang avec les globules rouges, et dans les différents organes comme, le rein, le cœur, les cellules gastriques et le système réticulo-endothélial.

L'ambisome ® est utilisé à la place de l'amphotéricine B chez les patients neutropéniques avec une fièvre d'origine inconnue. La fièvre, provient en général de bactéries ou d'infection quelconque, mais elle peut être due à une mycose profonde. La preuve de cette mycose est faite par une biopsie, une ponction de LCR ou un lavage de bronches alvéolaires suivi d'une culture, d'une semaine à 15 jours.

Tant qu'il n'y a pas de confirmation, la fièvre reste d'origine inconnue.

IV.1.1.3. Essais internationaux multicentriques

Ces essais sont réalisés au niveau de trois groupes :

- . amphotéricine B 1 mg / kg / j,
- . ambisome ® 1 mg / kg / j,
- . ambisome ® 3 mg / kg / j.

Le but des essais multicentriques est de comparer la tolérance du produit par les patients. Ils sont traités jusqu'à disparition des symptômes, une augmentation du nombre de neutrophiles supérieur à 500 neutrophiles/mm³, une absence de fièvre pendant trois jours consécutifs et sur demande de la personne participant à l'essai clinique, l'arrêt des effets indésirables.

Ces produits demandent une surveillance particulière au niveau :

- de la NEPHROTOXICITE, qui est définie par une augmentation de 100 % de la créatinine sérique de base (on utilise la créatinine seul car ce produit est le seul excrété par le rein et réabsorbé par la suite), quand la créatinine est double dans le sang, la capacité d'élimination est diminuée de la moitié.
- des TRANSAMINASES / PHOSPHATASES ALKALINES,
- de la BILIRUBINE,
- de l'HYPONATREMIE,
- de l'HYPOKALIEMIE (qui est difficile à traiter car elle entraîne la mort par problèmes cardiaques).

De plus, il faut faire particulièrement attention au foie, qui est un lieu de métallisation et un organe très irrigué (cellules de Küppfer).

Les effets indésirables sont très diminués avec l'ambisome par rapport à l'amphotéricine B.

Même avec 3 mg / kg d'ambisome, les effets indésirables sont très inférieurs à ceux de l'amphotéricine B à 1 mg / kg.

Le risque de néphrotoxicité est presque nul avec l'ambisome, mais il y a souvent d'autres médicaments administrés en même temps, donc il faut surveiller la fonction rénale.

Les enfants ont une capacité de régénération de la fonction rénale supérieure à celle de l'adulte.

La durée du traitement est de : 5 à 7 jours chez l'enfant,
15 à 25 jours chez l'adulte.

La différence d'efficacité entre l'amphotéricine B et l'ambisome 1 mg est très faible chez l'adulte. Il existe une différence chez l'enfant mais ce n'est pas le but de l'étude. Chez l'enfant l'amphotéricine B augmente la sécurité, donc on utilise l'ambisome que si l'amphotéricine B ne peut plus être administrée.

En cas de méningite à cryptocoque, pour le SIDA, il faut utiliser l'amphotéricine B, mais il existe toujours des problèmes de toxicité rénale. Donc essayer l'ambisome, la durée du traitement est moins longue, de même chez l'enfant et cela donne moins d'effets indésirables. Les précautions à prendre avec l'ambisome sont : l'association avec d'autres médicaments néphrotoxiques et faire le monitoring de la fonction rénale.

IV.1.2. Les antibiotiques

Le complexe *Mycobacterium avium-m intracellulare* MAC est la cause la plus fréquente d'infection bactérienne opportuniste chez les patients atteints du SIDA. Les études précédentes montrent que les aminoglycosides encapsulés dans les liposomes sont très efficaces dans le traitement des infections de MAC chez la souris. Düzgünes *et al*, étudient l'efficacité de la sparfloxacine fluoroquinolone, dans le traitement de l'infection MAC, dans les cellules de macrophage J774 de souris. La sparfloxacine étant encapsulée dans la membrane de liposomes multilamellaires de phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine-cholestérol (1 : 1 : 1 rapport molaire). Les macrophages infectés par MAC sont traités pour chacun, pendant 24 h ou 4 jours avec la sparfloxacine libre ou encapsulée dans les liposomes. Le traitement avec la sparfloxacine libre ou encapsulée dans les liposomes (6 µg/ml) pendant 24 h produit une réduction de l'indice de croissance respectivement de 25 et 30 % par rapport au témoin non traité. Quand les cultures sont traitées pendant 4 jours, la sparfloxacine libre réduit l'indice de croissance de 6 % par rapport au témoin non traité, tandis que la sparfloxacine encapsulée dans les liposomes le réduit de 8 % par rapport au témoin.

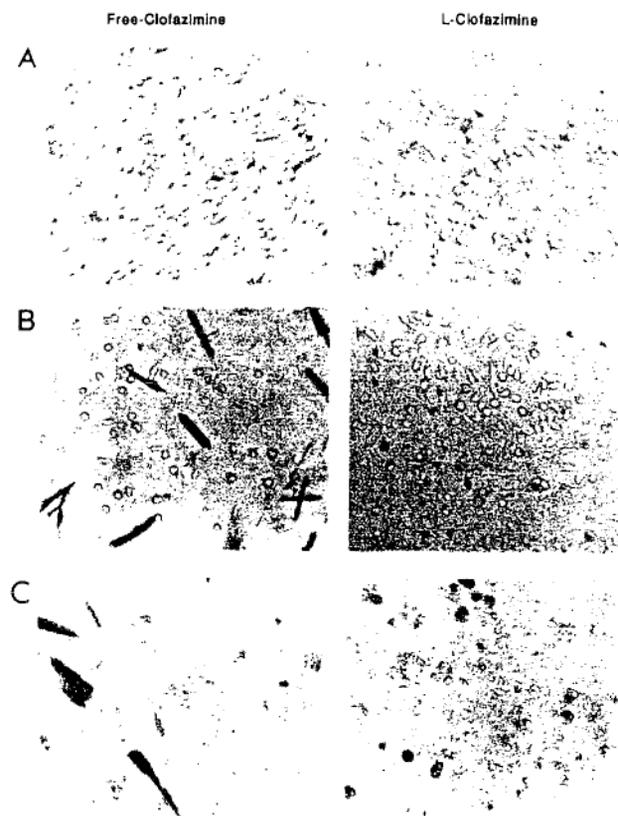
Les résultats indiquent que la sparfloxacine libre et encapsulée ont un effet presque égal contre MAC dans les macrophages en culture. En analogie avec les aminoglycosides, la sparfloxacine encapsulée dans les liposomes a une efficacité améliorée contre l'infection *in vivo* de MAC, due à son habileté à localiser le système de phagocyte mononucléaire (réticulo-endothéliale). Néanmoins, les facteurs additionnels, tel que la stabilité de la sparfloxacine, dans les liposomes, pendant la circulation dans le flot sanguin, peuvent influencer l'efficacité de la sparfloxacine liposomale *in vivo* (Düzgünes *et al*, 1996).

Donc l'efficacité thérapeutique de n'importe quelle molécule médicamenteuse, dépend de la sévérité de l'infection et du temps de traitement effectué dans le modèle expérimental particulier. Une grande quantité de bacilles est utilisée pour infecter des souris beiges et après une longue période avant de commencer le traitement, jusqu'à ce que l'infection soit disséminée et ait atteint tout l'organisme.

Ces caractéristiques, font que ce modèle peut être assimilé, au modèle de dissémination chronique de l'infection par MAC, ressemblant à la situation vue chez les patients atteints du SIDA. Si un médicament est efficace sur plusieurs modèles d'infection, comme ce qui est observé ici, on pourrait montrer l'efficacité de modèles avec une infection plus faible.

Dans cette étude, une réponse thérapeutique efficace est obtenue avec un seul médicament contre l'infection MAC, même si le traitement commence après que l'infection soit disséminée et bien établie. Donc, la clonazimine liposomale peut être utilisée comme agent thérapeutique efficace pour le traitement des infections disséminées de MAC (Reeta, 1996).

La figure n° 27 montre l'efficacité de la clofazimine liposomale (L-clofazimine) par rapport à la clofazimine libre.



Morphology of macrophages treated with free or liposomal clofazimine (L-clofazimine). Monolayers were treated with free or liposomal drugs at 2 µg/ml (A), 12 µg/ml (B), or 100 µg/ml (C) and were washed after overnight incubation. Photographs were taken under a light microscope. Magnification, $\times 17$.

figure n° 27

IV.1.3. Les antitumoraux

Le sarcome de Kaposi est une tumeur maligne de la paroi des vaisseaux sanguins ; il représente la tumeur la plus commune chez les patients atteints du virus immunodéficient humain (VIH).

Cette tumeur est en augmentation suite à l'apparition du SIDA, mais avec un profil un peu différent.

Le syndrome de Kaposi avancé se manifeste sous formes de taches brunes, d'œdèmes douloureux, d'atteinte pulmonaire et gastro-intestinale.

Le but des liposomes est d'augmenter l'efficacité et de diminuer la toxicité du traitement.

La dauxorubicine ajoutée aux liposomes donne le daunoxome ®.

Avec un traitement adapté, on peut avoir deux types de réponse :

- une réponse complète : le patient guéri, après au moins 4 semaines,
- une réponse partielle : on a une diminution des lésions de 50 %.

Une étude faite sur des patients atteints du syndrome de Kaposi compare les traitements avec :

- le daunoxome ® (dauxorubicine + liposome) et
- le **ABV** (adriamycine = dauxorubicine).

Il faut comparer les patients de deux groupes ayant des lésions cutanées et pulmonaires, dont l'espérance de vie sans traitement est de 2 mois.

La mesure de la diminution des L4 T avec CD4 est < 100, ce qui révèle un mauvais pronostic.

Après traitement, les résultats sont les suivants :

- élément comparable : peu de différence de survie entre les deux groupes,
- effets indésirables : moins de neutropénie avec le daunoxome ®.
- qualité de vie meilleure avec le daunoxome ® :
 - . moins de perte de poids,
 - . moins de problème de la fonction cardiaque,
 - . moins d'alopecie,
 - . mais un peu plus d'infection pulmonaire avec le daunoxome ® (peu significatif, mais à suivre de près).
- élément à peu près identique à l'ABV : la sécurité.

C'est le traitement de choix du SIDA et du syndrome de Kaposi.

(Amantea *et al*, 1997, Northfelt *et al*, 1996).

Des travaux sont aussi réalisés sur le cancer du sein, la leucémie, le lymphome, et le sarcome.

IV.1.4. La Dopamine

Le syndrome de Parkinson (PS) est causé par une décroissance nette de la concentration en dopamine dans le striatum, entraînant des dommages dans la substance noire. La dopamine ne traverse pas la barrière hématoencéphalique ; pour cela son précurseur, la L-Dopa, est utilisé en pratique médicale pour le traitement du PS. Cependant, avec la progression de la maladie, le traitement avec la L-Dopa induit de nombreuses réactions défavorables et son administration à doses élevées, entraîne des complications psychotiques et neurologiques.

Même si un progrès considérable a été accompli dans le traitement des parkinsoniens avec des médicaments dopaminergiques, il est important de trouver des médicaments encore plus efficaces et durables sans effet indésirable. Il est démontré que l'encapsulation dans des liposomes protège les médicaments contre la dégradation, et augmente leur efficacité thérapeutique à des doses plus faibles. Donc les liposomes peuvent fournir un transport plus efficace de L-Dopa dans le cerveau, permet d'augmenter sa concentration dans le système striatonigré et réduit ses effets indésirables. Dans cette étude nous comparons l'effet de la L-Dopa encapsulée dans de petits liposomes monolamellaires (SML) avec la L-Dopa libre sur le développement du PS chez la souris.

Les liposomes avec la L-Dopa inhibent complètement les manifestations cliniques du PS à la 5^{ème} h après l'injection. Au contraire, l'administration de L-Dopa libre produit aucun effet appréciable sur le PS : après 3 h.

On peut noter qu'une seule injection de SML avec la L-Dopa, contrairement à la L-Dopa libre, n'a pas d'effet sur la gravité du PS, car la L-Dopa enfermée dans les SML saturent graduellement les structures striatonigrées en s'accumulant dans le cerveau. La prolongation des effets des SML contenant la L-Dopa semble être due à la circulation plus longue de ces liposomes dans le système sanguin.

Chez les animaux ayant le PS, des SML peuvent faciliter la délivrance de la L-Dopa au cerveau et son accumulation dans les structures striatonigrées. L'encapsulation dans les liposomes de quelques anticonvulsivants (GABA, superoxyde dismutase, et l'acide valproïque) augmentent leur efficacité thérapeutique chez les rats. Cependant, les mécanismes par lesquels les liposomes transportent les médicaments à travers la barrière hématoencéphalique restent inconnus. Il est rapporté que les liposomes de 300 nm de diamètre constitués de cholestérol et de phosphatidylserine traversent la barrière hématoencéphalique après administration intraveineuse. Le diamètre des liposomes utilisés dans cette étude est de 60-80 nm, estimé par corrélation en spectroscopie au laser.

Ainsi, les liposomes contenant la L-Dopa suppriment la manifestation clinique du syndrome de Parkinson plus efficacement que la L-Dopa libre, sachant qu'il traverse la barrière hématoencéphalique, ils fournissent une saturation efficace des structures striatonigrées, avec la L-Dopa (Kucheryanu *et al*, 1997).

IV.1.5. Un antiviral

Le cytomegalovirus (CMV) rétinien est la cause la plus commune d'infection de la rétine et de cécité chez les patients ayant le SIDA. Il survient chez 30 % des personnes ayant une profonde immunosuppression. Deux médicaments antiviraux, le ganciclovir et le foscarnet, sont utilisables pour le traitement du CMV rétinien. Les deux sont associés à des toxicités systémiques significatives qui représentent la dose limitante.

La résistance antivirale au ganciclovir ou au foscarnet est rapportée chez 8 % des patients. Ils sont tous les deux des médicaments virostatiques.

En somme les patients, qui développent une résistance rétinienne en clinique, ont une maladie progressive et peuvent perdre la vue même s'ils reçoivent un traitement. Etant donné les résultats, un intérêt significatif existe dans l'utilisation d'administration locale de médicaments antiviraux pour le traitement de cette maladie.

Par la suite, Kuppermann *et al*, étudient la durée d'action de l'injection de 100 µg de cidofovir libre en prévention rétinienne dans nos modèles de lapins : l'effet inhibiteur des derniers 21 à 30 jours, sont ~ 10 fois plus grand que l'effet de 200 µg de ganciclovir libre. Etant donné que le cidofovir est plus soluble dans l'eau et polaire à pH neutre par rapport au ganciclovir ou au foscarnet, il est particulièrement adéquat pour l'encapsulation de liposome. Le but de cette étude est de déterminer la durée de l'effet d'une injection intravitréale de 100 µg de cidofovir encapsulé dans des liposomes pour la prévention et le traitement de l'herpès rétinien non létal chez les lapins.

Le cidofovir libre (non encapsulé dans les liposomes) est un agent antiviral puissant et relativement à longue action, quand il est injecté intravitréalement à sa dose maximale non toxique (100 µg chez les lapins et 20 µg chez les humains). L'étude des lapins montre que le composé a une durée d'action 10 fois supérieure à celle du ganciclovir dans le modèle HVS-1 (Herpes Simplex Virus type 1) de la focale rétinienne. Des doses intravitréales plus grandes de médicaments non liés, apparaissent comme étant toxiques pour l'humain.

L'action longue (supérieure à 120 jours) de cidofovir encapsulé dans les liposomes a un effet protecteur contre la réplication d'HSV-1 dans l'œil, cela est dû au faible taux de libération du système liposome multivésiculaire. Une étude récente montre que des doses très élevées (1000 µg) de cidofovir encapsulé dans des liposomes préviennent un développement rétinien d'HIV-1 dans ce même modèle pendant 170-240 jours. Cependant, cette dose élevée doit être une limite pertinente, parce qu'il y a une toxicité chez l'humain et les lapins à des doses respectives : > 20 et 100 µg ; cela peut atteindre les niveaux toxiques des médicaments même si quelques liposomes se révèlent instables.

Par conséquent, cette étude est faite pour mesurer l'effet d'une dose plus appropriée et non toxique de cidofovir encapsulé dans les liposomes. La formulation des liposomes apparaît comme ayant prolongé l'effet antiviral démontré précédemment de cidofovir de < 1 mois à ≤ 4 mois pour les animaux pour une même dose intravitréale (100 µg).

Après sa libération par le liposome, le médicament semble lui aussi, avoir une action relativement longue due aux métabolites intracellulaires de longue action. Le cidofovir est 50 fois plus actif contre le CMV humain, que contre HVS-1, et actuellement il semble plus prometteur que dans nos études utilisant le modèle HVS-1.

Il faut remarquer que les modèles utilisent une prophylaxie paradigme (ensemble des sujets d'une même classe pouvant être substitués l'un à l'autre), étant plus efficace avec une moins grande quantité de médicament. La prophylaxie paradigme est nécessaire parce que la progression rétinienne est trop rapide dans notre modèle, pour évaluer la durée d'action du traitement des médicaments antiviraux. Néanmoins, la prophylaxie paradigme est testée précédemment avec le ganciclovir et le cidofovir. Le cidofovir est de loin supérieur. Comme tel, l'utilisation de cidofovir encapsulé dans les liposomes, résulte en une thérapie intravitréale de longue action contre le CMV rétinien, et peut être administré dans un cadre d'étude.

La signification visuelle du complexe médicament-liposome est évaluée, dans une étude humaine avec le ganciclovir encapsulé dans des liposomes. La formulation liposomale est bien tolérée chez l'humain. La thérapie intravitréale de cidofovir encapsulé dans des liposomes, semble être un ajout précieux à la thérapie systémique, en particulier chez les patients intolérants au traitement systémique ou qui démontrent cliniquement une résistance rétinienne (Kuppermann *et al*, 1996).

IV.1.6 La vaccination

De nombreux modèles expérimentaux montrent que l'immunisation avec la glutathion S-transférase de *Schistosoma mansoni* (Sm 28 GST) peut induire une immunité protectrice contre ce parasite. Cette immunité est apparentée à la production d'anticorps de type Th2 contre l'antigène de souris et humain. Ce travail décrit le développement d'un protocole d'immunisation mucosale avec des liposomes conçus pour promouvoir la production d'anticorps spécifiques d'isotypes, apparentés à une réponse immune Th2. Les liposomes sont multilamellaires et composés de mélanges phospholipides synthétiques variés. Le vecteur liposome est utilisé pour transporter l'antigène Sm 28 GST à l'intestin associé au tissu lymphoïde.

L'association de l'antigène Sm 28 GST avec les liposomes, contenant des mélanges de lipides différents est étudiée. Le degré d'interaction de l'antigène augmente avec la longueur de chaîne hydrocarbonée des lipides utilisés. Il est démontré que des protéines sont présentes sur les membranes intérieures et extérieures des vésicules de liposomes. Il est aussi montré que les épitopes majeurs de Sm 28 GST, sont accessibles aux anticorps spécifiques ; cela confirme les principales caractéristiques de l'antigène.

En outre, l'activité enzymatique du complexe protéine/liposome est aussi démontrée, indiquant la conservation de la structure tertiaire de la protéine. Un complexe Sm28GST/liposome optimal est établi et administré oralement aux souris. Ce traitement résulte en une réponse mucosale et immune systémique de l'antigène Sm28GST. Nous démontrons cela par la détection d'IgA spécifique dans les intestins lavés et IgG1 spécifique, IgG2b dans sera. L'immunisation par le complexe Sm28GST/liposome, suivie du challenge avec le parasite montre que, Sm28GST donné oralement dans ces conditions, porte l'activité protectrice.

Ces derniers résultats ouvrent la possibilité d'une vaccination mucosale contre les schistosomiasés (Ivanoff *et al*, 1996).

IV.2. Transfert d'ADN et de gènes par les liposomes

La communauté scientifique est vivement intéressée par la recherche de correction des désordres humains par la thérapie génique. Le développement de vecteurs à délivrance convenable pour le transfert de gène *in vivo*, est une condition pour l'application clinique de la thérapie génique.

La thérapie génique peut se définir comme l'utilisation d'ADN en tant que médicament, c'est-à-dire comme introduction délibérée au moyen d'une navette (vecteur) d'ADN dans les cellules (cellules cibles) d'un patient pour les traiter.

Le liposome fusogène fixé sur le virus Sandai, constitue un système unique libérant de façon efficace son contenu dans les cellules animales *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude nous caractérisons le liposome fusogène unilamellaire comme vecteur de transfert génique, en comparaison au complexe ADN-lipide cationique.

Le liposome fusogène transfère les gènes efficacement dans des cellules cultivées pendant une incubation de 10 minutes seulement alors que le complexe ADN-lipide cationique doit rester 30 minutes en contact pour atteindre le même niveau d'expression génique. Le liposome fusogène est aussi beaucoup moins cytotoxique que le complexe ADN-lipide cationique ; mis à part ces conditions, le niveau d'expression génique a des résultats identiques.

En somme, le liposome fusogène maintient 70 % d'activité de transfection, en présence de 40 % de sérum foetal de veau, tandis que le complexe ADN-lipide cationique perd presque la totalité de son activité en présence de 5 % de sérum foetal de veau. De plus, le liposome fusogène peut introduire et exprimer le gène luciférase dans des cellules de tumeur d'ascite de souris *in vivo*, tandis que le complexe ADN-lipide cationique ne le peut pas à des concentrations d'ADN aussi élevées.

En conclusion, le liposome fusogène unilamellaire est le seul vecteur, non viral, efficace pour le transfert de gène *in vitro* et *in vivo* (Hiroyuki *et al*, 1996).

IV.2.1. Généralités

Il existe plusieurs vecteurs biologiques (viraux) hautement efficaces, incluant les rétrovirus recombinants, les adénovirus et les virus adéno-associés utilisables, mais ils subissent l'immunogénicité, la toxicité, le manque de spécificité tissulaire, la difficulté dans une large balance de production et le risque potentiel de mutations, induisant des mutations cancéreuses et/ou générant des particules par recombinaison.

Pour cette raison les vecteurs synthétiques, comme les liposomes, sont devenus une alternative intéressante due à leur manque d'immunogénicité et à leur restriction pour porter l'ADN. Les cibles potentielles des tissus spécifiques sont assez sûres et relativement faciles à transposer à grande échelle de production.

Les deux vecteurs liposomiaux, cationiques et anioniques sont évalués pour la délivrance d'ADN. Les liposomes cationiques, développés en premier par Felgner *et al.* en 1987, forment des complexes légèrement cationiques avec les charges négatives des molécules d'ADN. Ils peuvent être pris par les cellules via l'interaction de charge. L'inconvénient des vecteurs liposomes cationiques, sont les exigences des lipides cationiques non naturels, la condensation d'ADN suboptimale, la cytotoxicité, l'efficacité limitée, le manque de spécificité tissulaire, la taille relativement grande des particules et l'incompatibilité potentielle avec l'environnement biologique, qui est riche en macromolécules chargées négativement, composants de la matrice extracellulaires, lipoprotéines et cellules.

Pour améliorer la condensation d'ADN, Gao et Huang désignent un complexe ternaire ADN-polylysine-liposome cationique (LPDI) constitué du corps condensé d'ADN/polylysine et de l'enveloppe lipidique cationique. Ces particules ont une plus grande activité de transfection que les complexes de liposomes ADN-cationique, mais elles exigent la suppression d'excès en lipides cationiques pour une activité optimale.

Les liposomes anioniques, à pH sensible, sont aussi montrés comme médiateur de gène de transfert, mais souffrent d'une faible efficacité d'encapsulation due à leur grande taille et à la charge négative d'ADN non condensé. L'encapsulation passive d'ADN, dans les liposomes anioniques, requiert habituellement l'utilisation de fortes concentrations de lipides, pour augmenter « le volume de prise au piège », qui entraîne la génération d'une quantité excessive de liposomes vides.

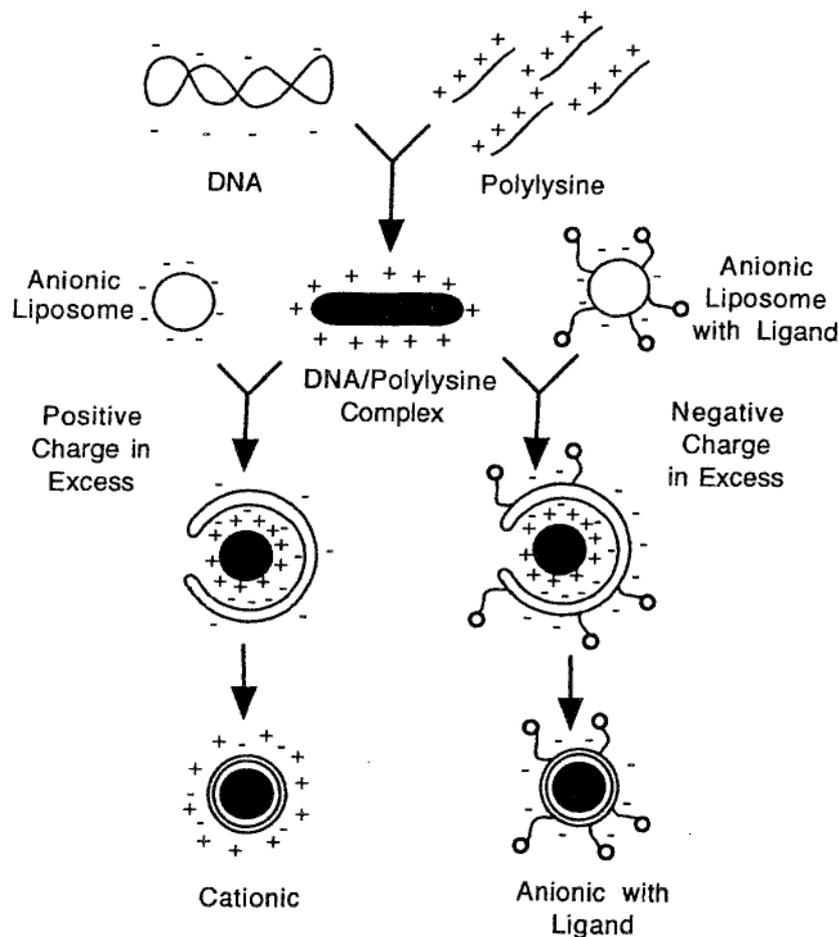
Néanmoins l'efficacité de prise au piège, dépasse rarement les 20 %.

De plus, les traitements communément utilisés pour édifier l'encapsulation de liposomes ou réduire la taille des particules comme la répétition des cycles gel-dégel, l'extrusion de membrane de polycarbonate et la sonication, peuvent mener à de sévères dommages d'ADN.

Un autre point important, dans le développement des vecteurs de la thérapie génique, est la cible des tissus spécifiques. De nombreux ligands cibles sont examinés, pour les liposomes contenant du folate.

Les récepteurs de folate sont récemment identifiés, comme marqueurs de tumeur, surtout parmi les carcinomes ovariens. Les folates, conservent leur affinité pour les récepteurs, quand ils sont dérivés via leur groupe γ carboxyl. Les macromolécules de folate conjuguées et les liposomes montrent qu'ils peuvent être pris spécifiquement par des cellules cancéreuses cultivées, par leur récepteur, comme les dérivés de xénographes, implantés des cellules cancéreuses humaines *in vivo*. Comme un ligand de faible poids moléculaire, l'acide folique ($M_r=441$) a l'avantage d'être stable et non immunogénique à son homologue protéique tel que les anticorps monoclonaux et garde une affinité aux récepteurs relativement élevée.

Les liposomes à folate sont utilisés avec succès dans les cellules cancéreuses spécifiques délivrés dans les médicaments anticancéreux et les oligodeoxynucleotides antisens *in vitro*. Aussi, les complexes ADN-polylysine dérivé de folate, combinés avec des adénovirus inactivés montrent leur rôle d'intermédiaire dans la transfection des cellules cancéreuses. Dans cet article, le vecteur utilisé est celui dont l'ADN condensé de polylysine, est pris au piège dans des liposomes anioniques à folates, via l'interaction de charge. Dû à la similitude structurale des LPDI, ce nouveau vecteur est appelé LPDII (liposome contenant de l'ADN condensé de polycations). LPDII se différencie de LPDI par ces lipides anioniques, avec l'utilisation de lipides cationiques. La description de « liposome englobant » est basé sur l'information structurale, provenant des monographies d'électrons de LPDII présentés dans cet article (figure n° 28).



Possible mechanism for the formation of LPDII. The targeting ligand in the current study is folate.

figure n° 28

Ce nouveau vecteur d'ADN, est plus efficace et moins cytotoxique, comparé aux liposomes cationiques conventionnels. Lee et Huang évaluent les effets du rapport lipide/ADN, la composition de lipide, l'excès de ligand libre et l'expression des récepteurs de folates sur l'efficacité de transfection de LPDII. Ils examinent aussi la structure de LPDII au microscope électronique. Les avantages potentiels de LPDII comme vecteur de thérapie génique sont discutables.

Un vecteur de transfection autoassemblé est développé dans lequel les complexes ADN-polylysine hautement condensés, sont incorporés dans les liposomes anioniques de folates. Nous trouvons que ces vecteurs sont plus actifs pour la transfection et moins cytotoxiques.

Contrairement aux complexes de liposomes cationiques d'ADN, qui subit une lente agrégation pendant son stockage, ces nouveaux vecteurs ont une taille

plus petite (~70-80 nm) et ne sont pas enclins à l'agrégation quand ils portent une charge nette. Dépendant du rapport lipide/ADN, qu'ils soient cationiques (à faible rapport lipide/ADN) ou anioniques (à haut rapport lipide/ADN), les particules de LPDII peuvent être produites. Les particules cationiques ont une transfection très active, mais ne sont pas spécifiques aux tissus.

Néanmoins, elles peuvent être utiles, comme ampoule vecteur de transfection non spécifique de haute efficacité. L'efficacité de l'activité de transfection avec récepteur, dépendant des particules LPDII anioniques, qui font d'elles des candidates possibles, pour la délivrance de gènes, dans des tissus spécifiques. Les exigences pour l'expression des récepteurs de folates et de la composition en lipide pH sensible suggèrent fortement les rôles du récepteur et de l'endocytose dans la transfection de LPDII. Comme les particules LPDI développées par Gao et Huang, les LPDIIs sont des particules sphériques compactes, avec un noyau d'ADN hautement condensé. Sur ces particules, la couche lipidique n'est pas un simple stabilisateur de structure et un protecteur d'ADN contre les nucléases, mais confère aussi une perturbation à l'activité endosomale et offre un site d'attache pour le ligand.

Contrairement à LPDI, LPDII chargé négativement est dirigeable et ne requiert pas d'étapes compliquées de purification ou d'utilisation de lipides cationiques dans sa composition. Le projet des particules de LPDII élimine les problèmes potentiels associés aux vecteurs d'ADN liposomal anionique traditionnels, tels que la faible efficacité d'encapsulation et la génération de liposomes vides en surplus.

Depuis que les lipides cationiques non naturels sont requis, que les rapports lipides/ADN sont élevés, et que l'ensemble des charges des particules sont anioniques, les particules LPDII semblent être un peu plus biocompatible *in vivo*, comparé aux vecteurs d'ADN chargés positivement.

Pris ensemble, avec leur taille compacte, la stabilité et l'activité de transfection élevée, il semble que les particules LPDII peuvent potentiellement être utilisées, pour la délivrance d'ADN dans des tissus spécifiques *in vivo* (Lee et Huang, 1996).

Autre méthode de délivrance de gène par les liposomes.

Les lipides polycationiques peuvent être mélangés à l'ADN de plasmide pour former les structures de liposomes qui pourront fusionner avec la membrane des cellules cibles et de cette façon permettre la délivrance de gène. Plusieurs préparations de lipides sont formulées pour cette application, incluant des mélanges de dioléyle phosphatidyléthanolamine (DOPE) avec DOTMA (lipofectine), DOSPA (lipofectamine), DDAB (lipofectace), Dogs (transfectam), DOTAP, DMRIE, et DC-cholestérol.

Cette approche peut produire une transfection d'efficacité très élevée *in vitro*, et peut aussi être utilisée pour le transfert direct de gène *in vivo*. L'ADN de plasmide est délivré aux explants de tumeur, dans une souris syngénétique, en injectant le nodule de tumeur avec des complexes liposome/ADN, achevant une transfection transitoire efficace d'à peu près 1 à 10 %.

Un avantage particulier de cette approche est la facilité de préparation des complexes ADN/liposome, la stabilité de ses composants individuels, et la versatilité pour transférer de nombreux type de tumeurs. Le complexe liposome/ADN peut être injecté directement dans un nodule de tumeur palpable. Alternativement, les masses tumorales viscérales peuvent être instillées directement avec les complexes liposome/ADN, en utilisant les procédures radiologiques, telles que l'évaluation par tomодensitométrie axiale, pour identifier l'emplacement de la tumeur et pour assister son injection percutanée. Des approches alternatives incluent l'utilisation de bronchoscopie, cystoscopie, ou d'endoscopie en injectant directement les complexes liposome/ADN dans les masses de tumeurs visualisés. Les complexes liposome/ADN sont non immunogéniques, ont une toxicité systémique minimale, et peuvent être administrés très souvent pour le même patient, avec des attentes équivalentes à l'efficacité du transfert de gène.

Les complexes liposome/DNA administrés en intraveineuse, peuvent aussi délivrer les vecteurs de plasmide, dans de multiples types tissulaires. En 1983, Nicolau *et al* injectent à des rats, en intraveineuse, avec un vecteur plasmide codé, un complexe de préproinsuline I, avec des liposomes composés de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, et de cholestérol.

Dans cette étude, les liposomes marqués par radioactivité montrent qu'ils sont pris spécifiquement par le foie et la rate, et 6 heures après l'injection, les animaux traités montrent, une diminution de glucose dans le sérum et une augmentation dans le foie, et expérimentent aussi les niveaux d'insuline splénique par rapport aux animaux témoins. Plus récemment, Zhu et Debs montrent l'expression de gène, dans divers types tissulaires, incluant le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, suivant l'administration intraveineuse de chloramphénicol acétyltransférase rapporté aux complexes plasmides avec les liposomes composés de lipides DOTMA et DOPE.

L'expression de gène est détectée pendant plus de 9 semaines après le transfert de gène. Cette délivrance de gène prolongée, incite l'utiliser d'une administration intraveineuse des complexes liposome/ADN, pour introduire les gènes cibles dans de multiples centres de maladies métastatiques. Un rapport préliminaire, utilisant un modèle xénogénétique du cancer du sein humain mutant p53, suggère que l'administration intraveineuse des complexes liposome/ADN codant le p53 type sauvage, peut réduire la taille des explants de tumeurs primaires et diminue le développement des maladies métastatiques des poumons.

Cependant, les formulations courantes de liposome ne ciblent pas spécifiquement les cellules de la tumeur pour le transfert de gène, et les tissus normaux sont aussi transfectés, des toxicités significatives pouvant en résulter. Mais il est possible d'utiliser des éléments de contrôles transcriptionnels pour exprimer de préférence le gène cible dans les cellules cancéreuses.

Plusieurs modèles précliniques montrent une réponse antitumeur, quand les vecteurs plasmides sont transférés directement dans des explants de tumeurs établis dans des souris syngéniques.

De plus cette activité antitumeur correspond à une ligné cellulaire spécifique.

Ces découvertes suggèrent que, l'expression des antigènes d'histocompatibilité de classe I, étrangers aux cellules cancéreuses, résulte en une reconnaissance, jusque là non reconnue, des antigènes associés à la tumeur par les cellules cytotoxiques T. Ces hypothèses comptent, pour l'observation de l'élimination efficace de la tumeur et le prolongement de survie, même si un pourcentage modeste de cellules cancéreuses sont transfectées transitoirement, suivant l'inoculation directe de tumeur par les complexes liposomes/ADN.

Dans une étude pilote de l'université du Michigan, Nabel *et al* étendent leur modèle préclinique à un protocole de thérapie génique de cancer clinique, en évaluant le transfert de gène par liposome de plasmides codant HLA-B7 chez des patients avec un mélanome métastatique.

Dans ces études, les complexes liposomes/ADN sont injectés directement en sous-cutané, ganglionnaire et dans les masses viscérales, et l'un des premiers groupe de cinq patients évalué, montre une réponse encourageante. Ces découvertes mènent à plusieurs essais actifs, évaluant l'expression d'un plasmide bicistronique codant HLA-B7 et beta-2-microglobuline chez les patients avec un cancer métastatique du colon, rénal, et de mélanome. Dans ces essais, l'ADN de plasmide, complexé avec les liposomes composé de lipides DMRIE et DOPE, sont directement injectés dans les masses cancéreuses. Dans les rapports précédents, l'expression du gène HLA-B7 est observée dans des biopsies de spécimens de tumeurs après le transfert de gène. Ces essais cliniques sont actuellement en progrès, et les données concernant, la génération des cellules T de l'immunité aux cellules cibles HLA-B7, les réponses de la tumeur, la survie, et les toxicités du traitement sont actuellement en cours. Utilisant une stratégie similaire, les plasmides codant l'ADNc IL-2 humain sont directement transférés aux cellules cancéreuses *in vivo*, chez les patients avec un cancer avancé ou un cancer au poumon de petite cellule en attente, pour stimuler l'immunité antitumeur des cellules T.

Les thérapies géniques cliniques de cancers ont été initiées très récemment, et les résultats sont actuellement préliminaires. A présent, le système de délivrance optimal, le vecteur d'expression, et les gènes cibles pour un type de tumeur donné sont entièrement inconnus. La réussite de ces modalités, dépend de l'habileté à exprimer le gène thérapeutique intéressant à des niveaux élevés, et de la capacité à cibler la cellule cancéreuse pour la délivrance du gène, minimisant les toxicités.

Concernant la sécurité modifiée, les vecteurs de plasmide répliquants, avec les complexes à récepteurs, peuvent produire une technologie de thérapie génique qui cible sélectivement les cellules cancéreuses pour maintenir un niveau d'expression de gène élevé. De plus, l'incorporation de tissus spécifiques et les promoteurs induits dans le vecteur désigné, contrôlent davantage l'expression du vecteur et l'assistent en le limitant aux cellules cancéreuses pour cibler l'expression du gène. Le contrôle de la transcription des éléments peut aussi être utilisé pour réguler le nombre de copies de répllication des plasmides épisomales dans les cellules cancéreuses ; de cette façon, il permet de contrôler l'expression du gène à un niveau élevé.

La thérapie génique a un impact plus fort chez un patient en vie, quand on lui administre un adjuvant, et quand l'essentiel de la tumeur est à un niveau minimum. C'est particulièrement important pour les approches de la thérapie génique, cela stimule le système immunitaire qui éliminera les cellules cancéreuses.

Actuellement, les essais cliniques utilisent la thérapie génique chez des patients avec un cancer métastatique ou avec des tumeurs ayant un sombre pronostic basé sur la croissance de tumeur locale, comme le glioblastome multiforme.

Certains essais actuels nécessitent des analyses minutieuses, pour développer les études de seconde génération ciblant des groupes à haut risques, ayant une charge tumorale plus faible, comme les patients avec un cancer du sein de stade II ayant plus de 10 ganglions axillaires positifs, ou des patients avec un cancer du colon, de la vessie, et des poumons ayant pour complication des ganglions locaux positifs.

Les gènes cibles optimaux à donner à un type de cellules cancéreuses sont inconnus. A présent, les thérapies géniques du cancer, sont focalisées sur l'introduction de gènes dans les cellules cancéreuses, pour moduler le système immunitaire, pour obtenir l'immunité antitumeur, induisant la sensibilité d'une administration de médicament exogène, en bloquant l'expression de l'oncogène, ou en supprimant la production du gène qui exprime la tumeur de type sauvage.

Il est anticipé de dire que le succès de l'un de ces gène ciblé, dépende du type de transfert de gène et des technologies d'expression utilisées. Néanmoins, ce potentiel existe pour sélectionner les gènes ciblés, spécifiques de patients, ba-

sés sur une caractéristique de génétique moléculaire, de mutations géniques et immunologique déterminants de l'immunogénicité. La promesse de thérapie génique du cancer s'achèvera quand les analyses de tumeurs spécifiques seront réalisées ; autrement, la thérapie génique va rester un traitement empirique sans stratégies viables pour prévoir la réussite ou l'échec d'une thérapie donnée pour un individu spécifique avec un cancer (Cooper, 1996).

IV.2.2 Applications aux cancers

Actuellement, la thérapie génique humaine est une réalité. Après une dizaine d'années d'expectative, la capacité technique d'isolement et de purification de gènes humains a rapidement conduit aux thérapies géniques. Le premier essai réalisé par une clinique US, en mai 1989, utilise un vecteur rétroviral portant un gène marqueur bactérien. Les trois années suivantes, il y a une explosion de tests cliniques, à la fois pour continuer à utiliser les capacités des marqueurs cellulaires du gène de transfert, et pour explorer les thérapies actuelles dans les maladies génétiques et le cancer.

L'approche finale de la thérapie génique commence par des essais humains différents de tous les transferts de gènes précédents et des protocoles thérapeutiques. L'utilisation d'un système vecteur non rétroviral est utilisé *in vivo* et suit le parcours des vecteurs délivrés. Le but est de transférer dans les cellules cancéreuses de patients le gène antigène d'histocompatibilité majeur de classe I (HLA-B7) qui normalement n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses. Le vecteur, directement injecté dans les masses cancéreuses, est une préparation d'ADN encapsulé dans des liposomes (contenant l'ADN et les signaux nécessaires pour son expression). Ce protocole trouve les issues de transfert de gène dans d'autres cellules en plus des cellules cancéreuses et il rend possible la manipulation d'une lignée de germes. Le protocole est restreint aux patients ayant un cancer en phase terminale au-delà de l'âge de procréation, il a débuté au printemps 1992 à Ann Arbor, Michigan (Tolstoshev, 1993).

Considérations préliminaires de l'application en chimiothérapie anticancéreuse.

L'application de la vectorisation au traitement du cancer est un objectif complexe car sa réussite dépend de différents facteurs et, en particulier, des caractéristiques du tissu cancéreux, de la nature de l'agent antinéoplasique et des paramètres physico-chimiques du vecteur.

En pratique, le traitement des cancers est compliqué par de nombreux facteurs tels que l'existence de sub-populations de cellules néoplasiques au sein d'une même tumeur qui diffèrent quant à leur morphologie, leur taux de croissance, leur capacité de dissémination métastatique ou leurs caractéristiques immunologiques. De plus, le flux sanguin, le taux de perfusion de la masse tumorale ainsi que la perméabilité de l'endothélium vasculaire sont autant de facteurs incontrôlables, imprévisibles et qui rendent très difficile les possibilités de prédiction de l'efficacité d'un schéma chimiothérapeutique (Couvreur, 1993).

Plusieurs exemples concernant l'application des liposomes aux cancers vont être exposés ici.

IV.2.2.1. Exemple d'une tumeur maligne du cerveau

Le transfert du gène suppresseur de tumeur dans des cellules d'une tumeur maligne du cerveau, semble être une nouvelle approche prometteuse pour la thérapie de gliome malin.

Une injection directe d'ADN de plasmide dans les liposomes cationiques est une alternative intéressante comme système viral de délivrance de gène. Contrairement aux vecteurs viraux, les complexes ADN-liposomes ne sont pas infectieux, ni immunogéniques et montrent moins de toxicité *in vivo*.

Même si le transfert de gène par les vecteurs viraux est plus efficace qu'avec les liposomes cationiques, l'inefficacité relative de la transfection d'ADN de plasmides peut être résolue en augmentant la dose par infusion chronique à travers une minipompe, avec des cycles de traitement multiples et/ou en améliorant la formulation ADN/liposome.

Une surexpression du gène sauvage type p53 (wtp53) dans les cellules mutantes p53, montre une induction d'apoptose et un arrêt de croissance dans les lignées cellulaires et chez les patients. L'expression du type sauvage p53 dans la suppression de cellules cancéreuses en plus d'un type sauvage endogène a été étudiée. P53 est uniquement montré comme inducteur d'arrêt de croissance *in vitro* des cellules contenant le type sauvage p53. Dans un modèle de tumeur subcutanée, l'expression exogène du type sauvage p53 dans ces cellules cancéreuses, aboutit à une réduction de croissance de la tumeur.

Le mécanisme fonctionnel du gène de type sauvage p53 *in vivo* sur les cellules endogènes n'est pas élucidé. Une injection directe du complexe liposome-wtp53 est réalisée dans une cavité de cellules glioblastomales endogènes du type sauvage p53 (situation clinique habituelle après une décompression chirurgicale de glioblastes).



Le DMRIE/DOPE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium bromide / dioléoylphosphatidyl éthanolamine) est utilisé pour transférer le gène humain wtp53 dans le Glioblastoma endogène sauvage p53 établi *in vivo*. DMRIE/DOPE est un liposome cationique monovalent.

Le transfert de matériel complexe d'ADN par DMRIE/DOPE se fait avec succès dans le cas du mélanome, du cancer du colon et du cancer rénal. Les résultats montrent que le gène wtp53 peut être transféré avec succès chez le rat RT-2 GBM *in vivo* en utilisant le liposome porteur de DMRIE/DOPE.

L'expression du transgène p53 induit la suppression de tumeur *in vivo* et prolonge la survie. Nous déterminons aussi que le mécanisme de suppression de la tumeur *in vivo* est due a une nécrose.

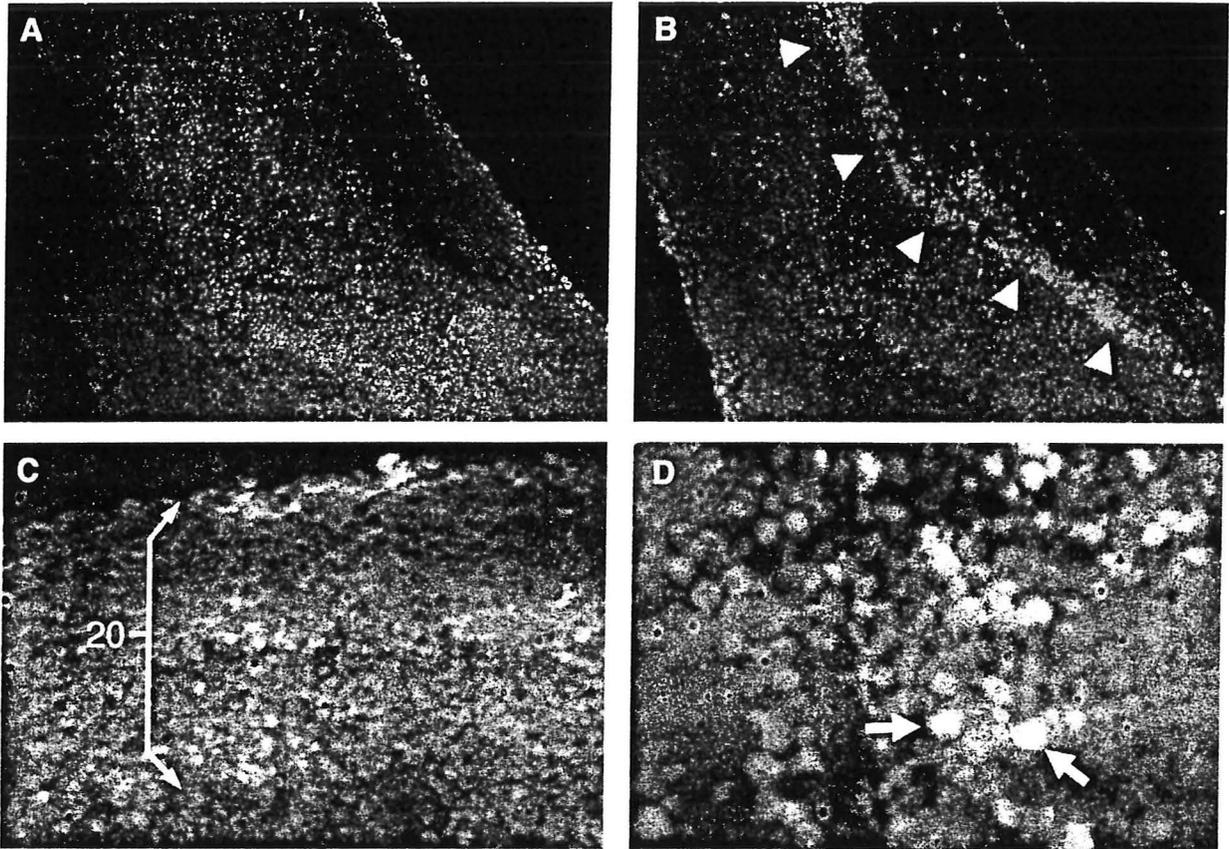
a) *Pénétration du complexe DMRIE/DOPE + l'ADN de plasmide dans le Glioblastoma in vivo.* Le modèle de tumeur RT-2 intrapéritonéale (i.p.) est établi sur des souris nues pour déterminer si les complexes liposome + ADN pénètrent et transfectent ces tumeurs RT-2 *in vivo* par la méthode d'injection intracavitaire.

Dernièrement, trente couches de cellules sont détectées sur la surface du péritoine, surtout sur le diaphragme, 5 jours après l'injection i.p. de cellules cancéreuses chez la souris nude.

La pénétration de liposome + l'ADN de plasmide, est démontrée par microscopie immunofluorescente. L'intensité de rhodamine intracellulaire est retrouvée jusqu'à une profondeur de 20 couches cellulaires cancéreuses, après une seule injection intrapéritonéale du complexe liposome + ADN (figure n° 29 B-C voir les flèches). Le complexe liposome marqué de rhodamine + d'ADN, est trouvé dans les cellules en quantité variable. Certaines cellules n'ont qu'un ou deux spots de rhodamine.

Certaines cellules ont une intensité de rhodamine distribuée de façon intense et régulière suggérant que les complexes de liposomes + ADN sont plus attachés à la surface des cellules cancéreuses.

De plus, un colorant Hoechst sur la même section montre que la morphologie du tissu reste normale au voisinage de la fluorescence de rhodamine, suggérant l'effet non toxique de DMRIE/DOPE.



Penetration of DMRIE/DOPE + plasmid DNA complexes in glioblastoma. RT-2 tumor established on the peritoneal surface of the nude mouse was injected i.p. with rhodamine labeled DMRIE/DOPE + 100 μ g of PLRNL complexes. (A) In vivo RT-2 tumor structure using the Hoechst stain. (B) Rhodamine fluorescence in the tumor (100X). Note the strong fluorescent activity forming a zone across the tumor (arrowhead). (C) Higher power (200X) view of the RT-2 tumor with rhodamine fluorescence. Note that the rhodamine intensity can be detected at least twenty cell layers into the tumor. (D) Presence of rhodamine fluorescence in the tumor cells at 625X. Note that all the rhodamine fluorescence is located in the cells. Arrows show two tumor cells with high fluorescent activity.

figure n° 29

b) *DMRIE/DOPE porté par le gène sauvage de type p53 induit l'expression transgénique et la nécrose de la tumeur.*

La tumeur RT-2 est de nature agressive. La souris nude porte la tumeur, cinq jours après l'injection initiale de cellules cancéreuses, et va faire l'objet du traitement par p53 + liposome ou vecteur + liposome.

La délivrance intracavitaire de 100 μ g de *wyp53RNL* + DMRIE/DOPE entraîne une nécrose significative et une forte expression de protéine humaine p53 dans les tumeurs.

Les nécroses peuvent être attribuées à l'expression du gène sauvage p53 car le vecteur transférant les tumeurs n'est pas nécrosé.

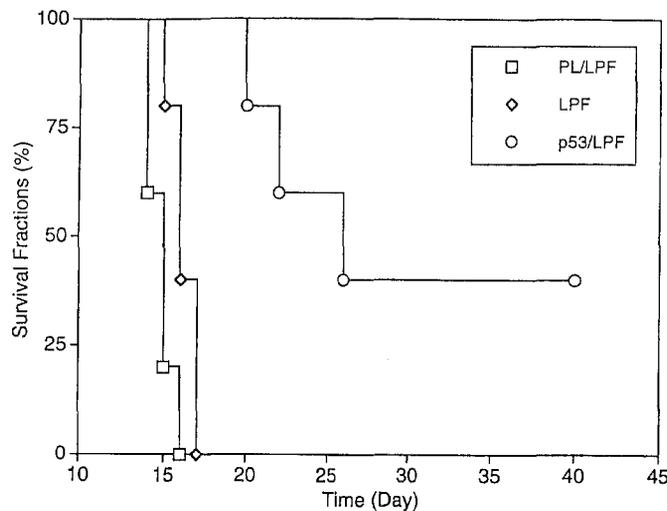
La stabilité de p53, en terme d'intégration est très étudié, son expression et la suppression de croissance de la tumeur, demeure.

Plus de 50 % des cellules infectées par des explants de tumeur expriment la protéine humaine p53.

c) *Les injections du complexe DMRIE/DOPE + wtp53 de plasmide augmentent le temps de survie des souris nudes avec un Glioblastoma.*

Afin de déterminer si la transfection de DMRIE/DOPE et l'expression du gène p53 dans les tumeurs RT-2 *in vivo* sont bénéfiques à l'hôte, de longs essais de survie sont mis en œuvre. Les rats sont traités avec les complexes liposome + ADN, 5 jours après l'implantation de la tumeur RT-2. Les injections i.p. quotidiennes de DMRIE/DOPE + 100 µg wtp53RNL dans la solution de Ringer lactate sont réalisées pendant 5 jours. Le groupe témoin reçoit quotidiennement, pendant 5 jours, des injections de DMRIE/DOPE ou de vecteur + DMRIE/DOPE.

La figure n° 30 compare le temps de survie des animaux portant la tumeur et recevant DMRIE/DOPE, avec le vecteur + DMRIE/DOPE et p53 + DMRIE/DOPE. Les vecteurs et les liposomes témoins, ne montrent pas de différence statistique pour les temps de survie. La moyenne de survie est de 15 jours, après l'implantation de la tumeur. Une augmentation significative de leur survie se constate après la délivrance intracavitaire de gène p53/liposome. Les rats traités avec le gène p53 commencent à mourir 20 jours après l'implantation de la tumeur. Et 40 % des animaux sont vivants après 40 jours. Les résultats montrent l'effet bénéfique, de la transfection de p53 par DMRIE/DOPE, chez les rats porteurs de Glioblastoma par voie intracavitaire. Le modèle de tumeur intrapéritonéale RT-2, proche du site postopératoire, est vu chez des patients venant de subir la suppression totale de glioblastome.



Survival curves of Nude mice with glioblastoma after direct lipofection *in vivo*. Nude mice harboring RT-2 intraperitoneal tumors at day 5 after implantation were subjected to 5 consecutive daily injections of DMRIE/DOPE, DMRIE/DOPE + 100 µg Vector PL, or DMRIE/DOPE + 100 µg wtp53RNL (charge molar ratio 0.7 : 1). Long term survival curves were plotted to determine the effects of p53 tumor suppressor gene transfection.

figure n° 30

Les glioblastomes humains montrent une invasion microscopique résiduelle et une infiltration encerclant le tissu cérébral. De même, l'efficacité de transfection et d'expression du gène p53, utilisant les liposomes comme porteur dans les cellules cancéreuses, est inférieure (30 %) comparé aux adénovirus (90 %).

Cette étude indique, qu'elle est suffisante pour prolonger l'effet de survie. Pour atteindre des effets thérapeutiques chez les patients, une augmentation de la capacité du gène, porté par le complexe liposome + ADN et une augmentation de la pénétration de ce complexe dans la tumeur résiduelle encerclant le cerveau est nécessaire. Une capacité de transport plus élevée peut être atteinte, par sonication du complexe liposome-ADN, avec des concentrations d'ADN élevées (>1 µg/µl) ou en utilisant des histones condensés d'ADN de plasmide, car les formulations actuelles contiennent au maximum 0.4 µg/µl du complexe, liposome + ADN, sans former d'agrégats. L'accroissement de pénétration de la tumeur et l'encerclement des tissus, peuvent s'accomplir en utilisant différents adjuvants, comme une solution élevée en dextrose, de manitol ou d'autres solutions hypertoniques, à la place de la solution de Ringer lactate (adjuvant standard).

Il est aussi possible de faire une infusion constante du complexe gène/liposome avec une minipompe sous pression dans la tumeur résiduelle, avec le patient alité pendant de nombreux jours pour augmenter la pénétration.

D'autres options pour une plus grande efficacité de suppression de tumeur, comme le transfert de gène du rétrovirus de haut niveau ou des cellules gliales avec un ligand spécifique conjugué aux liposomes (immunoliposomes), représentent aussi des alternatives viables (Hsiao *et al*, 1997).

IV.2.2.2. Exemple des cancers ovariens et du sein.

Les données pour la surveillance, l'épidémiologie et les résultats finaux (SEER) du programme indiquent que les cancers ovariens et du sein restent une cause majeure de décès pour les femmes au USA.

Par conséquent, il y a un besoin urgent de développer de nouveaux agents anticancéreux pour ces types de cancers. Dans cet article, nous revoyons le rôle expérimental évident du gène HER-2/*neu* dans les cancers humains et résumons nos récentes approches sur la thérapie génique du cancer ciblant HER-2/*neu*.

a) *Amplification/surexpression du gène humain HER-2/*neu* trouvé fréquemment dans les cancers humains.*

Contrairement au rat, l'oncogène *neu* qui est activé par un simple point de mutation, le gène humain HER-2/*neu* est activé par surexpression des cancers humains. Amplification/surexpression du gène HER-2/*neu* est trouvé en pre-

mier (dans approximativement 30 % des tissus cancéreux) dans le cancer du sein humain et ensuite dans le cancer ovarien.

Plusieurs rapports révèlent que le taux de survie en général et le temps de rechute pour les patientes avec un cancer du sein et ovarien avec la surexpression de HER-2/*neu* est nettement plus court que les patientes sans surexpression de HER-2/*neu* ; cela suggère que la surexpression de HER-2/*neu* peut être utilisée comme un facteur de pronostic. Quoique certaines études ne soient pas d'accord sur le fait que la surexpression de HER-2/*neu* soit un mauvais pronostic pour le cancer du sein, toutes les études sur le cancer ovarien sont d'accord que la surexpression de HER-2/*neu* correspond à un taux de survie plus court.

Ainsi, amplification/surexpression du gène HER-2/*neu* est trouvé plus tard comme étant associé au cancer des poumons, du tractus gastro-intestinal et de l'utérus. Par conséquent, la surexpression de HER-2/*neu* peut être une cause importante de plusieurs types de cancers humains.

b) *La thérapie génique de surexpression de HER-2/*neu* des cancers ovariens, utilise des liposomes cationiques pour délivrer l'ADN*

Le carcinome ovarien, est la tumeur la plus létale du tractus génital féminin.

Nous utilisons un liposome cationique réactif pour l'introduction d'ADN codant *E1a* dans les cellules cancéreuses. Le dérivé cationique de cholestérol, DC-Chol, est utilisé pour préparer les liposomes microfluidisés avec le dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), et le DC-Chol à un rapport molaire DOPE de 6 :4.

Dans la culture cellulaire, ce liposome réactif facilite l'efficacité de transfection de l'ADN dans les cellules, de plus il est moins toxique que les réactifs disponibles commercialement.

Ces études sur souris démontrent que l'introduction de l'ADN *E1A* ou d'antigène SV40 large T mutant, peut en effet retarder la croissance des cancers ovariens qui surexprime HER-2/*neu* et ainsi prolonge la survie des souris. Le but est d'augmenter l'efficacité du transfert d'ADN dans les cellules cancéreuses. De plus, Hung *et al* explorent la possibilité de cibler spécifiquement le transporteur aux cellules cancéreuses, qui surexprime HER-2/*neu*, sans affecter les autres cellules de l'animal.

Depuis que nous savons que la surexpression de HER-2/*neu* est aussi impliquée dans d'autres types de cancers, des protocoles sont établis pour étendre ces observations dans le modèle du cancer ovarien aux cancers d'autres types. Ainsi, *E1a* ou la thérapie génique, du mutant large T pour les cancers surexprimés HER-2/*neu*, peut être utilisé comme une thérapie viable pour les patients atteints de cancer, dans le futur (Hung *et al*, 1995).

IV.2.2.3. Exemples de tumeurs hépatiques

— Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est l'un des plus courants de toutes les malignités. Sur l'ensemble du monde, l'HCC est la seconde forme de cancer la plus commune, principalement due à sa grande incidence en Afrique et en Asie.

La mortalité suite à cette maladie est encore très élevée. Les thérapeutiques conventionnelles comprennent le tamoxifène, l'interféron et la thérapie standard (i.e. doxorubicine), cependant leur succès est limité. Ainsi, beaucoup de nouvelles approches sont continuellement mises en investigation, incluant l'immunothérapie et récemment la thérapie génique. La dernière incluse est l'utilisation des gènes « suicide » non mammifère, plus précisément les gènes encodant le gène thymidine kinase du virus de l'herpès simplexe (HSV tk).

Depuis que le gène HSV tk est cloné par Colbère-Garapin *et al*, ces applications ont été considérablement développées.

Comme un gène suicide, il est devenu l'un des principaux outils pour la thérapie génique du cancer. Les études avec le gène HSV tk utilisent le ganciclovir (GCV) comme substrat, à cause de sa spécificité apparente supérieure par rapport aux autres médicaments, comme l'acyclovir ou la thymine 1- β -D- arabinofuranosyl (araT). HSV tk peut phosphoryler efficacement GCV dans les triphosphates toxiques qui interfèrent avec les synthèses d'ADN, menant à la mort des cellules transfectées. Il est démontré, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que les cellules cancéreuses HSV tk négatives peuvent être tuées, étant à proximité des cellules cancéreuses HSV tk positives exposées au GCV. Le mécanisme soulignant ce « bystander effect » n'est pas entièrement élucidé, mais inclut le transfert de phosphate GCV dans les cellules HSV tk négatives.

Ces systèmes impliquent la diffusion de métabolites toxiques, à travers les jonctions gap des cellules cancéreuses voisines et la recapture des vésicules apoptotiques libérées par le gène HSV tk tuant les cellules transfectées. Le gène HSV tk lui-même peut influencer l'effet « bystander ». Comme démontré récemment, le meilleur effet « bystander » est obtenu dans les cellules exprimant le plus haut niveau d'enzymes HSV tk . De plus, la réponse immunitaire de l'hôte, joue un rôle important dans cette élimination. Le développement de cette immunité antitumeur, est montré *in vivo*, suivant la transfection, soit de la cytosine désaminase ou du gène HSV tk . Les cellules CD8 $^+$ T et les macrophages apparaissent, comme étant des cellules effectrices impliquées, après la transduction cellulaire, à ces deux gènes suicides.

Le transfert de gène ciblant le foie est performant chez les rongeurs quand on utilise les complexes protéines-ADN, l'ADN dénudé, les vecteurs d'adénovirus, les vecteurs rétroviraux et les systèmes liposomes-ADN. Les complexes liposomes-ADN offrent en parallèle, un système de délivrance de gène, en contraste avec des rétrovirus.

Les liposomes sont capables d'insérer des fragments d'ADN sur toute la longueur du chromosome, ils peuvent être produits en grande quantité et ont le potentiel d'atteindre les cibles spécifiques de cellules. Malgré ces avantages, l'utilisation des complexes liposomes-ADN, pour la délivrance de gène *in vivo*, n'est pas sans risque, théoriquement.

En effet, les travaux précédents démontrent que les ADN de plasmides sont libérés par les liposomes, vecteurs pouvant se localiser au-delà du site de la tumeur. Le but de cette étude est d'optimiser un système de délivrance non viral, utilisant le liposome le plus efficace et le plus puissant, avec un plasmide-*HSVtk* contenant soit une simple copie du gène *HSVtk* (pAG0) soit une copie double du gène *HSVtk* (pYED11). Pour évaluer l'efficacité de la combinaison liposome-plasmide, cette étude analyse *in vitro* la sensibilité du ganglioside (GCV), conférée aux deux lignées de cellules hépatothocarcinomaux (Hepa 1-6 et Hepa G-2). Pour optimiser les conditions de transfection et délivrer le plus grand nombre de copies de gènes *HSVtk*, il est possible d'augmenter l'expression du gène *HSVtk* dans les lignées cellulaires. A l'exposition de GCV, l'augmentation de production de GCV phosphorylé mène à une accentuation de la mort des cellules cancéreuses.

Les principales propriétés qui doivent être retenues sont, la précision et l'efficacité de ce système.

L'achèvement efficace de la transfection dans notre étude utilise les complexes liposome-ADN pour que la transfection transitoire ne soit pas égale à celle faite par les adénovirus ou les vecteurs rétroviraux d'ADN, cependant, les avantages majeurs de ce système de vecteur sont : (1) l'absence de délivrance d'ADN ; (2) la rapidité et le coût réduit de la préparation en grande quantité ; (3) une toxicité minimale et moins d'antigénicité qu'avec la délivrance des vecteurs d'ADN viraux. Comparé à la transfection des ARN transcrits, l'utilisation de l'ADN pour la thérapie génique, peut être considérée comme un avantage dans un essai clinique.

Néanmoins, on peut noter que les cellules transfectées avec l'ARN transcrit, sont moins sensibles qu'avec le traitement GCV, comme démontré dans les études précédentes. De plus, la transfection avec les complexes liposomes-ADN, permet une expression plus prolongée d'un gène étranger comparé à la transfection des complexes liposomes-ARN. Ainsi, l'utilisation d'ADN de plasmide, surtout les plasmides contenant deux copies du gène *HSVtk*, sont plus efficace et cette efficacité augmente quand le DOTAP utilisé comme liposome vecteur.

L'association de ces deux facteurs permet l'utilisation d'une concentration de GCV aussi faible que possible pour le traitement de post-transfection. Les expériences *in vivo* sont réalisées dans le laboratoire en vue de confirmer celles obtenues *in vitro* (Ghoumari *et al*, 1996).

— En biotechnologie, il y a une recherche de plus en plus intense sur les méthodes de délivrance des acides nucléiques. Ils sont construits à la fois dans les cellules procaryotiques et eucaryotiques sous une forme qui préserve la fonction du matériel génétique exogène. De nombreuses techniques sont utilisées *in vitro* pour l'introduction de matériel génétique dans les cellules, mais toutes, font face aux questions ouvertes telles que la cytotoxicité et la délivrance insuffisante d'ADN. Même si, aucune technique n'a prouvé sa valeur universelle pour le transfert de gène *in vivo*.

Les liposomes largement étudiés comme porteurs de médicaments, sont maintenant des candidats prometteurs en tant que vecteur de transfert génique. Cependant, on peut noter que ces liposomes contiennent des lipides cationiques et forment des complexes avec l'ADN adsorbé exclusivement à la surface. Si l'ADN pouvait être encapsulé dans la phase interne des liposomes et être protégé de la digestion en phase extérieure par les nucléases, cela apporterait un grand avantage pour son utilisation *in vivo*. L'autre approche importante dans la thérapie génique est de donner la capacité ciblante aux vecteurs liposomes, pour délivrer un gène intéressant, à des types de cellules et des tissus spécifiques.

Les récepteurs spécifiques pour un sucre avec la configuration galacto., AGPR, se trouve présent sur la membrane plasmique des hépatocytes de mammifères. L'asialofetaine (AF) est une glycoprotéine ayant des chaînes de sucres terminées par trois antennes de galactose, elle est une excellente molécule de ligand sélectif reconnue par l'AGPR de rongeurs et les hépatocytes humains. La recapture sélective des liposomes marqués AF par les hépatocytes *in vivo* et *in vitro* est déjà prouvée.

Dans cette étude, l'ADN pSV2CAT de plasmide (5kb) est encapsulé avec succès dans la phase interne du liposome-AF, contenant un lipide cationique dans sa membrane. Le liposome-AF est un vecteur avantageux pour le transfert de gène fait par AGPR, ceci est évalué et confirmé *in vitro* avec la ligné cellulaire d'hépatoblastome humain, HepG2.

a) *L'encapsulation d'ADN de plasmide pSV2CAT dans le liposome-AF.*

Les liposomes-AF chargés positivement sont préparés par une combinaison tandem, de détergents et de méthode gèle-dégèle adéquates. L'avantage majeur de cette procédure est que l'ADN n'est soumis à aucune sonication ; pendant son encapsulation, parce qu'il est tout d'abord préparé vide. Le liposome subit la sonication avant son mélange avec l'ADN. De nombreuses méthodes précédentes de préparation de liposome, impliquent une étape de sonication, même avec un faible pouvoir de sonication, il se produit une dégradation significative de l'ADN.

Il est rapporté que les liposomes contiennent une dérivation de Chol cationique ayant un long bras spatial, Chol-3 β - oxysuccinamidoethylenediméthylamine, favorable à l'interaction avec l'ADN.

Pour distinguer l'ADN encapsulé dans la phase interne de liposome-AF de son absorption sur la surface externe, le liposome-AF-pSV2CAT est incubé avec la **Dnase I** (désoxyribonucléase, 50 µg/ml) à 37°C pendant 30 min. Sous ces conditions, l'ADN sur la surface externe est digérée.

Ces résultats montrent qu'à peu près les deux tiers de l'association avec l'ADN, sont encapsulés dans la phase interne du liposome-AF. Une encapsulation élevée, d'ADN n'est efficace avec aucun autre liposome composé de lipide et aucune autre méthode de préparation.

Les cycles de sonication et de gèle-dégèle, sont eux aussi, cruciaux pour augmenter l'encapsulation de l'ADN dans le liposome-AF. La valeur maximale est atteinte en 5 min. de sonication et deux cycles de gèle-dégèle. Il est aussi remarqué qu'une congélation rapide et un dégel lent favorisent l'agrégation et la fusion des membranes lipidiques. La répétition de ce cycle génère des « trous » transitoires sur la membrane, au lieu où l'ADN a pénétré dans la phase aqueuse interne des liposomes.

L'encapsulation de l'ADN dans les liposomes-AF est cruciale pour protéger l'ADN de la digestion par les nucléases dans la circulation sanguine et pour délivrer les molécules d'ADN au site cible *in vivo*. Une dégradation complète s'observe en moins de 3 min. après une injection intraveineuse d'ADN nu de plasmide de rats.

b) *La capture de liposomes-AF par les cellules HepG2*

Pour estimer la capture cellulaire (la somme de lien et d'incorporation) des liposomes, les cellules HepG2 sont incubées avec le liposome-AF contenant [14C] Chol-oléate dans les couches de lipides ou [3H] inuline dans la couche aqueuse. [14C] Chol-oléate est largement utilisé comme phase lipidique marqueur de liposomes, parce qu'ils ne sont pas échangés avec les lipides des membranes cellulaires et ils signalent la capture des liposomes. La capture des liposomes-AF augmente avec le temps et atteint à peu près 50 % en 18 h. La radioactivité de [3H] inuline, exposé presque le même temps, que [14C] Chol-oléate, suggère que les liposomes-AF sont capturés par les cellules HepG2 préservant leurs formes intactes.

Les liposomes-AF sont reconnus comme des porteurs spécifiques avec les caractéristiques d'affinité élevée pour les cellules de foie isolées ou la ligne de cellule d'hépatoblastome cultivé *in vitro*, et de cellules parenchymateuses de foie *in vivo*.

Il est bien connu qu'il y a une grande quantité d'AGPR sur la surface des hépatocytes, et les résidus de galactose tri-antenne de liposomes-AF sont reconnus par l'AGPR et incorporés dans les cellules par le mécanisme appelé « l'endocytose avec récepteurs ». La capture de liposomes-AF décroît à peu près d'un cinquième, par l'addition excessive du compétiteur AF libre.

Les résultats indiquent que le processus de capture des liposome-AF par les cellules HepG2 se fait par voie endocytosique grâce à AGPR.

c) *La transfection aux cellules HepG2 par AF-liposome-pSV2CAT*

Depuis que l'ADN pSV2CAT de plasmide, est construit en utilisant les éléments régulateurs de transcription de SV40, puis couplés avec la séquence de codage du gène *cat* bactérien, il peut être utilisé comme un marqueur convenant à la transfection des cellules.

Le contenu des vésicules est transporté jusqu'aux lysosomes, ce qui limitent la quantité d'ADN transfectée dans le noyau. Cependant, l'activité de CAT qui est attribué au gène d'expression dans le cytoplasme de cellules HepG2 transfectées par AF-liposome-pSV2CAT, observée dans ces expériences, indique que quelques fractions d'ADN introduites peuvent échapper à la dégradation par voie endocytosique.

L'ADN pSV2CAT de plasmide encapsulé dans les liposome-AF est complètement protégé de la digestion par les Désoxyribonucléases. L'ADN est introduit efficacement et exprimées dans les cellules HepG2.

d) *Les effets des liposome-AF encapsulant l'EDTA, sur l'efficacité de transfection par AGPR.*

L'efficacité de transfection par les liposome-AF via AGPR dans les cellules HepG2 est augmenté par le prétraitement avec EDTA encapsulé dans les liposome-AF

Dans le système vecteur de liposome présent, l'ADN encapsulé est protégé de l'attaque de certains facteurs biologiques environnementaux grâce à la bicouche lipidique des liposomes, et ces liposome transforment successivement les cellules spécifiques par l'intermédiaire de récepteurs.

Par conséquent, l'ADN encapsulé dans les liposome-AF est délivré sélectivement aux cellules hépatiques et au tissu après une administration parentérale.

(Hara *et al*, 1995).

IV.2.3. Correction d'anomalies génétiques par thérapie géniques

Dans cette partie nous allons voir cinq articles pour illustrer ce sujet.

IV.2.3.1. Correction au niveau du système nerveux central (SNC)

L'utilisation des oligonucléotides antisens (ODN), dans une stratégie de blocage sélectif d'expression de gènes spécifiques, représente une importante innovation dans la biologie cellulaire et dans la recherche thérapeutique. Cependant, l'efficacité d'ODN est limitée dans la recapture cellulaire et manque de stabilité due à la dégradation des nucléases. Ainsi, l'ODN inchangé atteint de faibles concentrations et possède une très courte demi-vie dans les cellules. Ces problèmes restreignent l'utilisation de l'ODN antisens *in vitro* et *in vivo*. En modifiant la structure fondamentale d'ODN, par exemple, avec les résidus de phosphorothioate, cela augmente la résistance de l'ODN contre les nucléases.

Cependant, une dégradation intracellulaire significative s'effectue toujours par voie lysosomale. Précédemment, nous rapportons que l'incorporation du virus Sendai inactivé [Virus Hémagglutinant du Japon (HVJ)], dans les liposomes est une méthode efficace, pour le transfert d'ODN antisense, dans les vaisseaux sanguins de l'épithélium. L'enveloppe virale d'HVJ favorise la fusion cellulaire et de ce fait facilite la recapture cellulaire de l'ADN de plasmide et d'ODN antisens, évitant les dégradations par endocytose et lysosomale. L'application potentielle de cette méthode, par la délivrance de gène dans le système nerveux centrale (SNC), est démontrée.

Pour clarifier l'utilisation potentielle d'ODN antisens, délivré pour la thérapie génique du SNC, utilisant le liposome HVJ comme méthode de délivrance, Ces travaux étudient l'efficacité de la recapture d'ODN marqué à l'isocyanate (FITC) fluoresceine et de l'accumulation dans les cellules cérébroïdes *in vitro* et dans le tissu cérébral *in vivo*. Dans cette étude, la demi-vie d'ODN est prolongée dans les cellules cérébelleuses, aussi bien nucléaire, que dans le tissu du cerveau, par l'utilisation de la méthode du liposome HVJ par rapport à la méthode d'ODN sans le liposomes HVJ.

L'augmentation du marquage d'ODN stabilisé, est aussi confirmé par la mesure de fluorescence. La transfection d'ODN marqué de FITC, par la méthode du liposome HVJ, résulte en une augmentation significative de fluorescence dans le cervelet frontal et postérieur, comparé à l'ODN sans le vecteur de liposome complet, 5 jours après la transfection. De façon intéressante, la

fluorescence notable, peut être aussi détectée, dans le tronc cérébrale et le cervelet, qui sont très loin des ventricules du cerveau, tandis que la fluorescence est difficilement détectable par le transfert d'ODN sans le vecteur de liposome HVJ.

Cette étude démontre pour la première fois que la méthode du liposome HVJ prolonge la demi-vie d'ODN et augmente la translocation d'ODN dans le noyau des cellules neuronales *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'administration ICV (Infusion dans le CérébroVentricule latéral) d'ODN marqué au FITC, avec le liposome HVJ, produit une plus grande distribution d'ODN dans le SNC *in vivo*, qu'une administration d'ODN seul.

L'utilisation d'ODN comme antisens ou « leurre », bloque les facteurs nucléaires, dans la région du promoteur des gènes cibles, c'est très intéressant dans le domaine de la thérapie génique.

A côté de la thérapie génique, la méthode d'antisens est un outil innovateur et attractif pour bloquer la transcription ou la traduction des gènes spécifiques. Cependant, l'application directe d'ODN nu, a des limitations méthodologiques :

- a) la faible recapture cellulaire due à l'harnachement des endosomes et la dégradation lysosomale,
- b) le manque d'une méthode de délivrance qui convienne avec la spécificité cellulaire,
- c) l'exigence d'une grande quantité d'ODN et
- d) la valeur résultante. En effet, Cette étude démontre que l'ODN marqué à FITC nu, est pris et localisé dans les compartiments cellulaires nucléaires ou non.

De nombreuses investigations développent des méthodes de libération cellulaires, comme les lipides cationiques, pour améliorer l'efficacité de la recapture d'ODN antisens dans les cellules. Cependant, ces méthodes utilisent la délivrance d'ODN relié au récepteur et par conséquent, restent confrontées au problème de la dégradation endocytaire lysosomale.

Au contraire, ODN et le liposome HVJ sont directement transfectés dans le cytoplasme et bougent rapidement dans le noyau.

Nous trouvons que la méthode du liposome HVJ augmente la stabilité d'ODN marqué au FITC dans les cellules granulaires, permettant ainsi la détection pendant 2 semaines. De similaires prolongations de demi-vie d'ODN sont aussi observées dans des études *in vivo* utilisant la méthode du liposome HVJ. De plus, la méthode du liposome HVJ augmente la surface de recapture cellulaire après une injection directe dans l'hypothalamus ou une administration ICV.

Donc, la méthode du liposome HVJ utilise un mécanisme de fusion membranaire de cellule qui évite la recapture endocytosique, résultant en une accumulation rapide d'ODN à de forte concentration dans le noyau. Les découvertes précédentes montrent qu'HVJ favorise la fusion des liposomes avec les cellu-

les vasculaires et la délivrance d'ODN intracellulaire. Les données des études de microinjection précédentes montrent qu'ODN peut entrer immédiatement du cytoplasme dans le noyau (en 30 s) via une diffusion passive, ODN peut transloquer du cytoplasme au noyau après être entré dans le cytoplasme via la fusion membranaire cellulaire avec la membrane du liposome grâce à HVJ. Dans cette étude cinétique, l'ODN marqué au FITC non modifié dans le SNC est utilisé.

Les expérimentations reportées dans cette étude montrent, qu'ODN marqué au FITC, est transféré avec succès dans les cellules neuronales *in vitro* et *in vivo*, par l'utilisation d'une méthode de liposome HVJ très efficace, qui augmente la recapture d'ODN enveloppé dans les liposomes avec HVJ inactivé.

En somme, cette méthode prolonge la demi-vie d'ODN et augmente la translocation d'ODN dans le noyau des cellules neuronales. Pour la première fois, il est démontré que la méthode de liposome HVJ est prometteuse pour la délivrance d'ODN comme stratégie dans la thérapie génique du SNC. D'autres travaux sont requis, pour développer un système de délivrance, de médicament qui peut traverser la barrière hématoencéphalique (Yamada *et al*, 1996).

IV.2.3.2. Correction au niveau des yeux

Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont causées par des mutations de gènes exprimés dans la rétine. Le transfert de gène dans les cellules rétiniennes, serait un traitement de choix pour stopper la progression dégénérative rétinienne et restaurer ses fonctions. Cependant, les tissus intraoculaires de la rétine, ne peuvent être approchés que par des interventions chirurgicales compliquées ; comme mettre le gène dans l'espace subrétinien.

Dans cette étude, trois liposomes de différentes sortes, portant un vecteur d'expression de plasmide sur le gène beta-galactosidase, sont mis en application topique par une goutte oculaire, sur la surface oculaire de rat. Les liposomes utilisés sont : le liposome constitué de TMAG (N - (alpha-triméthylammonioacétyl) - didodecyl - D - glutamate), de DLPC (dilauroyl-phosphatidylcholine), et de DOPE (dioléoyl-phosphatidyléthanolamine) dans un rapport molaire de 2 :1 :4, le liposome de DDAB (diméthyl-dioctadecylammonium bromide) et de DOPE dans un rapport molaire de 1 :12,5, et le liposome de DC-cholestérol (3-beta[N-(N',N'-ddiméthylaminoéthane)-carboyl]cholestérol) et DOPE dans un rapport molaire de 1 :2.

Les liposomes spécifiques appliqués en goutte oculaire peuvent transférer le gène aux tissus intraoculaires dans les cellules ganglionnaires de rétines, facilement et sans intervention, cela facilite le développement de la thérapie génique pour les dystrophies rétiniennes héréditaires.

L'expression du gène est détectée par une réaction enzymatique colorée dans les cellules ganglionnaires rétiniennes, un jour, une semaine et un mois après l'instillation à la fois du liposome, TMAG et DC-cholestérol. Par contre le liposome DDAB ne peut pas transférer le gène à la rétine. Les niveaux d'expression restent stables de un jour à une semaine après l'instillation, mais décroissent après un mois. L'expression n'est pas trouvée dans d'autres zones, excepté sur la surface oculaire incluant les cellules conjonctivales et épithéliales de la cornée.

L'instillation d'ADN de plasmide seul ou de liposomes sans ADN, comme contrôle, ne donne aucune expression du gène.

Les cellules inflammatoires sont totalement absentes des tissus intraoculaires, incluant la rétine. L'activité de la bêta-galactosidase endogène n'est pas détectée dans la rétine.

La voie usuelle de transfert de gène dans la rétine est l'espace subrétinien par l'intermédiaire d'une fenêtre sclérotique excisée par chirurgie. Les vaisseaux sanguins de toute la choroïde doivent être percés pour atteindre l'espace subrétinien et par conséquent, le risque hémorragique est grand.

Une autre voie d'apport du gène dans la rétine est de ponctuer la sclérotique antérieure, en dehors de l'air correspondant à la partie plane du corps ciliaire et d'atteindre la rétine par une aiguille traversant le corps vitreux comme pour la chirurgie du corps vitreux. Nous démontrons que les gènes portés par les liposomes peuvent être transférés dans les cellules ganglionnaires de rétines, aussi à travers le corps vitreux. Cependant, ces méthodes causent naturellement, une inflammation dans l'œil, qui mènent parfois à une issue visuelle dévastatrice.

Dans cette étude, le transfert de gène à la rétine est effectué par le liposome TMAG et le liposome DC-cholestérol, entrant par la surface de l'épithélium, ce qui contraste avec la blessure pour le transfert du liposome DDAB.

La différence de constituants lipidiques des liposomes apparaît comme étant un facteur important pour déterminer si les liposomes peuvent diffuser à travers la surface de l'épithélium et trouver où le gène peut être transféré le plus efficacement (Matsuo *et al*, 1996).

IV.2.3.3. Correction au niveau des poumons

La mucoviscidose (ou cystic fibrosis), est la plus fréquente des maladies héréditaires létales chez les sujets de race blanche. Il s'agit d'une maladie des glandes exocrines due à la sécrétion de mucus visqueux trop épais, entraînant la formation de bouchons muqueux. L'atteinte est polyviscérale, mais la morbidité est surtout liée à l'atteinte respiratoire.

Le gène défectueux code une protéine située sur la membrane apicale des cellules et sa structure est un canal qui permet la sortie des ions chlorures.

Le clonage du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) en 1989 et la mise au point de méthodes efficaces de transfert de gènes, permet d'envisager la thérapie génique comme un traitement potentiel de la mucoviscidose. En effet, malgré l'amélioration des traitements conventionnels, la survie moyenne n'est que d'une trentaine d'année ; la mise au point d'un traitement plus efficace, plus radical, est donc souhaitable.

Beaucoup de travaux expérimentaux étudient la possibilité de transférer le gène CFTR au moyen de divers vecteurs, dans des cultures cellulaires *in vitro* et au niveau de l'épithélium respiratoire chez l'animal, notamment en utilisant des modèles murins de la mucoviscidose.

Dans le cas de la mucoviscidose, le tissu cible prioritaire est l'épithélium respiratoire, en raison de la gravité de l'atteinte pulmonaire. Tous les vecteurs actuels aboutissent à l'addition d'une version normale du gène CFTR dans les cellules du tissu cible pour y compléter les deux allèles mutés qui restent en place. Il s'agit donc d'une monogénéothérapie somatique d'addition. Par ailleurs, seul l'emploi directement *in vivo* du vecteur transférant le gène CFTR apparaît possible dans le cas de l'épithélium respiratoire.

Dans le cadre de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose, le but de la thérapie génique est de transférer et de faire fonctionner de façon adéquate le gène CFTR au niveau de l'épithélium respiratoire.

Il faut, d'emblée, souligner ici que l'épithélium respiratoire a une structure complexe avec divers types de cellules en surface et des glandes sous-muqueuses profondes ; de plus, cet épithélium s'étend sur une grande surface et a une structure qui varie tout au long de l'arbre bronchique.

Enfin, dans la mucoviscidose, les voies aériennes sont le siège d'un épais mucus, de phénomènes inflammatoires et d'infections à répétition. La question sur la nature des réelles cellules cibles et de leur accessibilité, est donc posée.

En effet, il faudrait savoir s'il est nécessaire de cibler les glandes sous-muqueuses où le gène CFTR est fortement exprimé après la naissance, ou simplement l'épithélium de surface des voies aériennes périphériques, où l'expression de CFTR est certes plus faible, mais où débute l'atteinte pulmonaire, d'après les données cliniques. L'administration par voie aérienne des

vecteurs actuels, permet un ciblage diffus de l'épithélium de surface, mais ne semble guère permettre d'atteindre les glandes sous-muqueuses.

Donc le ciblage des glandes sous-muqueuses doit avoir recours à une administration par voie vasculaire, ce qui pose le problème du ciblage pulmonaire (éventuellement possible, par l'intermédiaire du récepteur aux IgA ou par injection locale par la vascularisation bronchique) et de la dissémination dans d'autres organes, notamment les gonades.

Des données *in vitro* indiquent qu'une normalisation électrophysiologique globale, peut être obtenue par un transfert de CFTR dans moins de 10 % des cellules CF (*cystic fibrosis*) d'une monocouche épithéliale. Enfin, au niveau de la cellule transfectée, une faible expression de CFTR peut entraîner un effet beaucoup plus marqué, au niveau de la correction des défauts de transports ioniques.

Les résultats suggèrent qu'il serait possible de corriger par cette méthode le défaut de transport du chlore de la mucoviscidose dans ce modèle animal. Chez le rat normal, une étude utilisant un nouveau lipide cationique (DMRIE), montre une expression après administration intratrachéale, du gène test LacZ et aussi du gène CFTR. Dans certaines zones bronchiques, l'activité β -galactosidase est mise en évidence, jusque dans 50 % des cellules épithéliales. En ce qui concerne les liposomes cationiques DC-Chol/DOPE, des souris *knock-out* CF reçoivent par aérosol des complexes DC-Chol/DOPE. Le messager CFTR est détecté dans les voies respiratoires de tous les animaux traités, mais à des niveaux variables. De même, les anomalies électrophysiologiques sont corrigées, en moyenne d'environ 50 %, parfois même complètement. Enfin, des résultats montrent l'innocuité du vecteur DC-Chol *in vivo* chez la souris et contribue à l'acceptation par le comité RAC (*Recombinant DNA advisory committee*) du National Institute of Health américain (NIH), d'un premier essai clinique, utilisant ce lipide cationique en injection locale (intratumorale), chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Aucune complication n'est notée lors de l'essai clinique. De plus, une étude avec des liposomes DC-Chol/DOPE (non complexés à de l'ADN) administrés par voie nasale, montre que ces liposomes n'entraînent pas de modification de la différence de potentiel transépithélial nasal chez des sujets normaux ou mucoviscidosiques. Evidemment, ces travaux ouvrent la voie de l'emploi de liposomes cationiques pour des essais cliniques dans le cadre de la mucoviscidose.

La plupart des essais cliniques réalisés ou en cours aux Etats-Unis, en Grande-Bretagne ou en France, utilisent des vecteurs adénoviraux. Quelques essais seulement utilisent des liposomes. Ces essais de phase I ont pour but de tester la faisabilité, l'efficacité biologique et la toxicité du vecteur employé au niveau des cellules de l'épithélium nasal ou bronchique.

Les résultats de l'essai londonien sont publiés. Il s'agit d'un essai en double aveugle contre placebo, chez 15 patients mâles $\Delta F508$, utilisant le liposome

cationique DC-Chol/DOPE, pour transférer un plasmide pSV-CFTR, au niveau de la muqueuse nasale. Aucune réaction générale n'est notée et les biopsies nasales ne montrent pas de réaction inflammatoire. Le plasmide pSV-CFTR et l'ARNm CFTR dérivant du plasmide sont détectés au niveau de cinq biopsies nasales sur les huit effectuées. Une correction partielle (d'environ 20 %) de la différence de potentiel nasal, mesurée lors de la perfusion locale d'une solution peu concentrée en chlore, est observée transitoirement (maximale à j3 et durant 7 jours).

Le protocole Oxford-Cambrige, où le liposome cationique DC-Chol/DOPE est utilisé pour transférer un plasmide pRSV-CFTR au niveau du nez, vient de se terminer récemment. Les résultats préliminaires montrent l'absence de signes toxiques et la possibilité d'obtenir des corrections électrophysiologiques, au moins partielles, chez certains patients. Les résultats sont donc très voisins de ceux du Brompton Hospital à Londres. D'autres essais sont en cours ou sur le point d'être initiés, notamment à Edimbourg (lipide cationique DOTAP, plasmide pCMV-CFTR, nez) et en Alabama (lipide cationique DMRIE, nez).

Les résultats sont donc encourageants, mais ils mettent aussi clairement en évidence la nécessité d'améliorer à la fois, l'efficacité et la durée d'expression du transgène, lors de l'emploi de liposomes cationiques ou de vecteurs chimiques en général.

Certaines perspectives sont relativement à court terme. Il en est ainsi pour l'amélioration des vecteurs déjà employés et l'amélioration des conditions de leur utilisation, par exemple, par la modification de sécrétion du mucus. De multiples classes de nouveaux vecteurs « inertes », peuvent être imaginées ; de façon générale, la conception de ces vecteurs devrait pouvoir tirer profit de l'avancement des connaissances, concernant l'assemblage et le trafic cellulaire des virus. L'autoassemblage *in vitro*, de composants viraux purifiés, est aussi à l'étude pour certains virus.

Une autre voie de recherche fondamentale, concerne le type de structures génétiques à transférer. Les plasmides transférés pourrait comporter certaines séquences AAV (*adeno-associated viruses*) pour l'expression à long terme. Il peut aussi s'agir de développer des « michromosome » artificiels humains, comportant une véritable structure génomique CFTR.

Le transfert de structure génétiques d'aussi grande taille, constitue un redoutable défi pour les vecteurs synthétiques, défi qu'eux seuls peuvent relever.

En conclusion, bien que les premiers essais cliniques ne donnent pas de résultats aussi fantastiques, que ne laissait espérer l'hypermédiatisation de l'approche de la thérapie génique, ils aboutissent cependant, à des éléments positifs, certes partiels, mais offrant d'importantes perspectives. Au vu des résultats obtenus, soit avec des vecteurs adénoviraux, soit avec des liposomes, et en raison de l'incertitude concernant la nature du vecteur idéal, l'ensemble

de la vectorologie, et notamment les vecteurs synthétiques, mérite d'être développée, dans le futur proche. De plus, la multidisciplinarité de ce type de recherche thérapeutique, invite à une collaboration étroite entre chercheurs de diverses disciplines, partenaires industriels et cliniciens. Alors, la phase actuelle « d'optimisme prudent », pourra déboucher sur les progrès scientifiques nécessaires et leur application clinique (Lehn *et al*, 1996) .

Une autre étude montre que le défaut électrophysiologique de la trachée de souris mutantes CF transgénique peut être, partiellement ou entièrement corrigé, par instillation ou aérosolisation d'expression d'ADNc humain, complexé avec un liposome cationique.

DOTAP est choisi comme liposome cationique, parce que leurs administrations répétées sont bien tolérées chez les souris ; et quand il est complexé avec pCMV-CFTR et administré aux souris mutantes CF transgéniques, la correction approximative de 80 % du défaut électrophysiologique trachéal, est détectée les 8-9^{ème} jours après l'administration.

Nous restreignons notre traitement à l'épithélium nasal des patients pour avoir des estimations plus sûres ; pouvoir reproduire l'enregistrement des propriétés électrophysiologiques ; prendre une biopsie nasale et répéter l'effleurement nasal pour les analyses histologiques, fonctionnelles et pour la génétique moléculaire.

L'objectif principal de l'étude est d'établir la sécurité de l'application du complexe pCMV-CFTR-DOTAP. Les découvertes sont encourageantes et en contraste avec les réponses inflammatoires rapportées dans les études adénovirales.

En conclusion, les niveaux de transfert géniques réalisés sont comparables à ceux rapportés utilisant les vecteurs adénoviraux, mais plus durables et sans effets indésirables attribuables au véhicule du transfert de gène. Ces études sont en accord avec les observations des souris normales et transgéniques et fournissent de façon importante, une correction substantielle du défaut électrophysiologique de la trachée, après une simple dose de pCMV-CFTR-DOTAP et n'apportent pas d'effets indésirables aux doses répétées du gène délivré par DOTAP aux poumons.

Les données rassurantes sur la sécurité rapportées ici, justifient l'étude de l'effet du gène CFTR délivré par DOTAP aux poumons des patients CF. Cela détermine si les niveaux thérapeutiques du transfert et de l'expression de gène peuvent être établis et maintenus par doses répétées en l'absence d'effets toxiques (Proteous *et al*, 1997).

IV.2.3.4. Correction de l'hypertension artérielle

Les oligonucléotides antisens sont désignés pour inhiber la production des protéines spécifiques. Dans le modèle de l'hypertension, nous ciblons le système rénine-angiotensine au niveau des synthèses (angiotensinogène) et du récepteur (récepteur AT1).

Le projet des oligonucléotides antisens nécessite le choix d'un site pour inhiber le processus d'ARNm ou de translation.

Quand ils sont injectés dans le cerveau, les oligonucléotides antisens du récepteur AT1, de l'ARNm et de l'ARNm angiotensinogène, réduisent la pression sanguine chez les rats spontanément hypertendus. Ils réduisent significativement la concentration de la protéine.

Les oligonucléotides sont aussi efficaces en administration systémique. La décroissance de la pression sanguine après libération dans le sang ou le cerveau, des oligonucléotides antisens, dure de 3 à 7 jours. Pour prolonger l'action, l'injection directe d'ADN nu et l'injection d'ADN porté par des liposomes sont testées.

Les liposomes sont utilisés pour encapsuler AS-ODN (Antisens Oligodéoxynucléotides) et le délivrer dans le sang. L'antisens dirigé par l'ARNm angiotensinogène dans les liposomes donne de très bon résultats. L'encapsulation d'angiotensinogène antisens dans un liposome et l'injection du virus Sendai dans la veine porte sont utilisés. La pression sanguine diminue durant plusieurs jours.

Cependant, les résultats ne sont pas comparés aux effets de l'ADN nu. Faisons la comparaison de l'antisens encapsulé dans le liposome et de l'ADN nu apportés en intra-artérielle. Seul l'encapsulation dans le liposome est efficace ; sous les mêmes conditions, l'ADN nu ne l'est pas. Vingt-quatre heures après l'encapsulation de 50 µg d'AS-ODN dans les liposomes, la pression sanguine est diminuée de 25 mmHg.

Les niveaux de protéine (angiotensinogène et Ang II dans le plasma) sont significativement réduits pour le groupe ODN encapsulé dans le liposome. L'antisens seul, les lipides seuls, et l'ODN brouillé dans les liposomes n'ont aucun effet sur les niveaux de protéines.

Le développement des liposomes avec les lipides cationiques permet une transfection efficace élevée de l'ADN de plasmide. Les simples brins courts d'AS-ODNs ne sont pas encapsulés, mais sont complexés avec des vésicules microlamellaires par interactions électrostatiques. Ceux-ci simplifient la production du système de délivrance d'antisens et permettent de nombreuses voies de délivrance, incluant les spray d'aérosol nasal et les injections parentérales.

(Phillips, 1997).

THESE SOUTENUE PAR : **Annabelle CHASTAGNIER**

TITRE : **LES LIPOSOMES EN THERAPIE ORALE ET PARENTERALE.**

CONCLUSION

Depuis 1960, les liposomes font l'objet de très nombreuses études. Ils sont passés de simple membrane de phospholipides à des liposomes pilotables ou autopilotés conçus pour libérer spécifiquement leur contenu dans une cible, représentée par un organe ou un tissu particulier.

Le succès de l'application clinique des liposomes ne dépend pas seulement de la forme vectorisée du médicament mais aussi de la faisabilité technique de ce système.

Ces considérations montrent qu'un essai clinique ne peut être porteur d'informations que s'il s'appuie sur une étude physico-chimique rigoureuse.

D'une manière générale, l'ensemble des données cliniques suggère que les liposomes constituent un vecteur de médicament particulièrement bien toléré mais dont les potentialités, en terme d'amélioration de l'efficacité thérapeutique, méritent de plus amples confirmations cliniques.

Les recherches sur les liposomes continuent à se développer et les plus récentes aboutissent à des systèmes de plus en plus sophistiqués.

L'espoir de faire progresser la thérapeutique médicamenteuse demeure le moteur essentiel de ces recherches, mais d'autres domaines d'applications médicales non développés dans ce travail sont également concernés : imagerie médicale et diagnostic, radioprotection et vaccination. C'est aussi le cas de la pharmacotechnie, où les liposomes peuvent contribuer à résoudre certains problèmes purement technologiques (stabilité, solubilité des principes actifs), du génie génétique et des biotechnologies, des bioréactifs ainsi que de secteurs industriels très divers, en particulier l'industrie cosmétique qui utilise déjà plusieurs types de véhicules lipidiques.

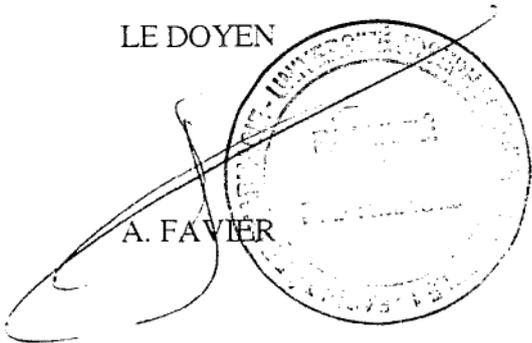
La technologie pointue des liposomes complique leur utilisation mais laisse de nombreux espoirs pour le futur.

Au cours de ce travail nous avons, dans un premier temps, développé quelques généralités portant sur la microencapsulation des principes actifs et indiqué quels peuvent être les domaines d'application. Par la suite nous avons parlé des aspects techniques portant sur la fabrication des liposomes, de leur séparation en fonction du type et de la taille souhaitée, de leur conservation et du mode d'administration en vue d'une activité systémique. Enfin, la dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude de l'utilisation des liposomes dans différentes pathologies.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 22/07/98

LE DOYEN

A circular stamp of the University of Grenoble Alpes is partially obscured by a large, stylized signature. The signature is written in black ink and overlaps the stamp. The stamp contains the text "UNIVERSITÉ DE GRENOBLE ALPES" and "FACULTÉ DE MÉDECINE".

A. FAVIER

LE PRESIDENT DE THESE

A stylized signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines.

PROFESSEUR :
R. STEIMAN

BIBLIOGRAPHIE

Alzas S. Intérêt des liposomes en dermatologie et en cosmétologie. Thèse d'exercice en pharmacie, Grenoble, 1998.

Amantea M.A., Forrest A., Northfelt D.W., and Mamelok R. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated-liposomal doxorubicin in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, USA, 1997, **61** : 301-311.

Bally M.B., Hope M.J., Van Etcheld C.J.A., Cullis P.R. Uptake of safranin and other lipophilic cations into vesicles in response to a potential membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812** : 66-76.

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 1965, **13** : 238-252.

Chakrabarti A.C., Clark-Lewis I., Harrigan P.R., Cullis P.R. Uptake of basic amino acids and peptides into liposomes in response to transmembrane pH gradients. *Biophys J.*, 1992, **61** : 228-234.

Coker R.J., Murphy S.M., Harris J.R.W. Experience with ambisome in cryptococcal meningitis in AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991, **28** : 105-109.

Cooper Mark J. Noninfectious Gene Transfer and Expression Systems for Cancer Gene Therapy. *Seminars in oncology*, 1996, **23** : 172-187.

Crowe L.M., Womersley C., Crowe J.H., Reid D., Appel L., Rudolph A. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **861** : 131-140.

Couvreur P. Liposomes en clinique humaine : Le point sur les résultats thérapeutiques. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 214-224.

Delattre J. Liposomes et barrières endothéliales. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 167-178.

Devissaguet J.P., Puisieux F. Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 179-213.

Düzgünes Nejat, Flasher Diana, Venkata Reddy M., Luna-Herrera Julieta et Gangadharam R.J. Pattisapu. Treatment of Intracellular *Mycobacterium avium* Complex Infection by Free and Liposome-Encapsulated Sparfloxacin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. San Francisco California, 1996, 2618-2621.

Fattal E., Couvreur P., Puisieux F. Méthodes de préparation des liposomes, In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 42-62.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M. *et al.* Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1987, **84** : 7413-7417.

Fidler I.J., Raz A., Fogler W.E., Kirsh R., Bugelski P., et Poste G. Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res.* 1980, **40** : 4460-4466.

Finkelstein M.C., Kuhn S.H., Schieren H., Weissmann G. et Hoffstein S. Liposomes uptake by human leukocytes. Enhancement of entry mediated by human serum and aggregated immunoglobulins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981, **673** : 286-302.

Fraley R., Subramani S., Berg P. et Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.* 1980, **255** : 10431-10435.

Gao X. et Huang L. *Biochemistry.* 1996, **35** : 1027-1036.

Ghoumari AM, Rixe O, Yarovoi SV *et al.* Gene transfer in hepatocarcinoma cell lines : in vitro optimization of a virus-free system. *Gene therapy.* Paris, 1996, **3** : 483-490.

Hamilton R.L., Guo L ; French pressure cell liposomes : Preparation, properties and potential. In : *Liposome Technology*, CRC press Boca : Raton, Florida, 1984, 37-50.

Hara Toshifumi, Aramaki Yukihiro, Takada Shinako, Koike Katsuro et Tsuchiya Seishi. Receptor-mediated transfer of pSV2CAT DNA to a human hepatoblastoma cell line HepG2 using asialofetuin-labeled cationic liposomes. *Gene*, Japan, 1995, **159** : 167-174.

Heywood S.M., Havaranis A.S., O'Loughin J.T. et Soleimani I. Experimental procedures with liposomes to insert macromolecules and macromolecular complexes into muscle cells in culture. Dans Gregoriadis (ed) *Liposomes Technology*, CRC Press, 1984, **11** : 177-185.

Hiroyuki Mizuguchi, Tetsuhiko Nakagawa, Mahito Nakanishi, Susumu Imazu, Shinsaku Nakagawa et Tadanori Mayumi. Efficient Gene Transfer into Mammalian Cells Using Fusogenic Liposome. *Biochemical and biophysical communications*, Osaka University, 1996, **218** : 402-407.

Hofland Hans E.J., Shephard Lee et Sullivan Sean M. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93** : 7305-7309.

Holt C.E., Garlick N., et Cornel E. Lipofection of cDNAs in the embryologic vertebrate central nervous system. *Neuron*, 1990 **4** : 203-214.

Hsiao Michael, Victor Tse, Carmel Jason, Tsai Yali, Felgner Philip L., Haas Martin et Silverberg Gerald D. Intracavitary Liposome-Mediated p53 Gene Transfer into Glioblastoma with Endogenous Wild-Type p53 *in Vivo* Results in Tumor Suppression and Long-Term Survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Stanford California, 1997, **233** : 359-364.

Huang L., Huang A. et Kennel S.J. Coupling of antibodies with liposomes. Dans G. Gregoriadis (ed) *Liposome Technology* CRC Press, 1984 **III** : 51-62.

Hung Mien-Chie, Matin Angabin, Zhang Yujiao, Xing Xiangming, Sorgi Frank, Huang Leaf et Yu Dihua. HER-2/neu-targeting gene therapy - a review. *Gene*, USA, 1995, **159** : 65-71.

Hwang K.J. and Mauk M.R. Fate of lipid vesicles in vivo : A γ - ray perturbed angular correction study, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74** : 4991-4995.

Ivanoff Nathalie, Phillips Nigel, Schacht Anne-Marie, Heydari Chahdad, Capron André et Riveau Gilles. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposomes-associated Sm 28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine*, Lille France, 1996, **14** : 1123-1131.

Jackson A.J. Intramuscular absorption and regional lymphatic uptake of liposome-trapped insulin, *Am. Soc. Pharm. Exp. Therap.*, 1981, **9** : 535-540.

Jain R.K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, 1990, **9** : 253-266.

Juliano R.L., Hsu M.J., Peterson D., Regen S.L. and Sigh A. Interactions of conventional or photopolymerized liposomes with platelets in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1983, **146** : 422-427.

Junqueira L.C., Carneiro J. Vascular Histology *In Basic Histology*, 3rd ed. Piccin Nuova Libreria, 1987.

Kawashima Y., Hino H., Takeuchi H., Niwa T., and Matsui K. Lyophilization and size control of liposomes entrapping alkaline phosphatase prepared by freeze/thawing method. The effect of additives : Sugar, amino acid, protein and water-soluble polymer. *S.T.P. Pharma sciences*, 1992, **2** : 270-278.

Koch H.J. Les sphérulites. *Monographie Technique*. Laboratoire VIBRAC, 06516 Carros, France, 1997.

Kucheryanu V.G., Yurasov V.V., Kryzhanovskii G.N., Nikushkin E.V., Zhigal'tsev I.V., Kaplun V.P., et Shvets V.I. Effect of Liposomal L-Dopa on the Parkinson's Syndrome in Mice. *General Pathology and Pathological Physiology*, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Russie, 1997, **1** : 24-27.

Kuppermann Baruch D., Assil Kerry K., Vuon chou *et al.* Liposome-Encapsulated (S)-1-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl) cytosine for Long-Acting Therapy of Viral Retinitis. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 1996, **173** : 18-23.

Lee Robert J. et Huang Leaf. Folate-targeted, Anionic Liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, Pennsylvania USA, 1996, **14** : 8481-8487.

Le Hir A. *Pharmacie galénique. Bonne pratiques de fabrication des médicaments* 7^{ème} édition Masson, 1997.

Lehn P, Oudrhiri N, Navarro J. Thérapie génique de la mucoviscidose à l'aide de liposomes. *Arch Pédiatr.* Paris, 1996, **3** : 88-92.

Madden D., Harrigan P.R., Tai L.C.L. *et al.* The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient : a survey. *Chem. Phys. Lipids*, 1990, **53** : 37-46.

Matsuo Toshihiko, Masuda Ikuya, Yasuda Tatsuji et Matsuo Nobuhiko. Gene Transfer to the Retina of Rat by Liposome Eye Drops. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Japon, 1996, **219** : 947-950.

Mayer L.D. Bally M.B., Hope M.J., Cullis P.R. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 1986a, **40** : 333-345.

Mayer L.D., Hope M.J. et Cullis P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986b, **858** : 161-168.

Northfelt D.W., Dezube B.J., Thommes J.A. *et al.* Efficacy of Pegylated-Liposomal Doxorubicin in the Treatment of AIDS-Related Kaposi's Sarcoma After Failure of Standard Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, USA, 1997, **15** : 653-659.

Ollivon M., Paternostre M. Techniques de marquage des liposomes. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 87-112.

Parker R.J., Priester E.R., Sieber S.M. Effect of route of administration and liposome entrapment on the metabolism and disposition of adriamycin in the rat, *Drug Metab. Dispos.*, 1982, **10** : 499-504.

Patel H.M., Boddie K.M., Vaughan-Jones R. Assessment of the potential use of liposomes for lymphoscintigraphy and lymphatic drug delivery : Failure of ⁹⁹Tc marker to represent intact liposomes in lymph nodes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **801** : 76-86.

Pattarino F., Trotta M., Morel S., et Gasco M.R. Liposomes sterically immobilized in agarose gel beads as stationary phase for column chromatography of drugs. *S.T.P. Pharma sciences*, Torino Italy, 1997, **7** : 199-204.

Phillips Ian. Antisense Inhibition and Adeno-Associated Viral Vector Delivery for Reducing Hypertension. *State of the art lecture*. Floride, 1997, **29** : 177-187.

Pickering J.G., Jekanowski J., Weir L., Takeshita S., Losordo D.W., et Isner J.M. Liposome-mediated gene transfer into human vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 1994, **89** : 13-21.

Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G *et al*. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy*, UK, 1997, **4** : 210-218.

Poste G., Kirsh R., Bugelski P. Liposomes as a drug delivery system in cancer therapy. In : Sunkara P.S., (ed), *Cell Biology : a series of monographs. Novel approches to cancer chemotherapy* Academic Press Inc. Orlando, Florida., 1984, 166-230

Poste G., Bucana C., Raz A., Bugelski P., Kirsh R., Fidler I.J. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res.*, 1982, **42** : 1412-1422.

Puisieux F. et Delattre J. *Les liposomes applications thérapeutiques. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, 1985, 41.

Reeta T. Mehta. Liposome Encapsulation of Clofazimine Reduces Toxicity In Vitro and In Vivo and Improves Therapeutic Efficacy in the Beige Mouse Model of Disseminated *Mycobacterium avium-M. intracellulare* Complex Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Houston Texas, 1996, 1893-1902.

Rowland R.N., Woodley J.F. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **620** : 400-409.

Schöni M.H., Nikolaizik W.H. Aerosol therapy in patients with cystic fibrosis. *Schweiz Med Wochenschr*, Davos Platz, 1997, **127** : 158-164.

Schuber F., Frisch B., Réactions et techniques de conjugaison de ligands aux liposomes. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 113-136.

Schubert R., Wolburg H., Schmidt K.H., Roth H.J. Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes. *Chem. Phys. Lipids*, 1991, **58** : 121-129.

Szoka F.C. and Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75** : 4194-4198.

Szoka F.C., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng*, 1980, 467-508.

Vidal M. Méthodes de caractérisation des liposomes, In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Les éditions INSERM, Paris, 1993, 69-86.

Vladimir P. Torchilin. Liposomes as targetable drug carriers. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, Moscou, 1984, **2** : 65-115.

Vladimir S. Trubetskoy, Vladimir R. Berdichevsky, Eugene E. Efremov and Vladimir P. Torchilin On the possibility of the unification of drug targeting systems. *Biochemical Pharmacology*, Great Britain, 1987, **36** : 839-842.

Woodley J.F. Liposomes for oral administration of drugs, *CRC Crit. Rev. Drug Carr. Syst.*, 1986, **2** : 1-18.

Yamada Kazuo, Moriguchi Atsushi, Morishita Ryuichi *et al.* Efficient oligonucleotide delivery using the HVJ-liposome method in the central nervous system. *Am. J. Physiol. Japon*, 1996, **271** : 1212-1220.

Yong Liu, Liggitt Denny, Zhong Wendy, Tu Guanhuan, Gaensler Karin et Debs Robert. Cationic Liposome-mediated Intravenous Gene Delivery. *The journal of Biological Chemistry*, USA, 1995, **42** : 24864-24870.



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



RESUME

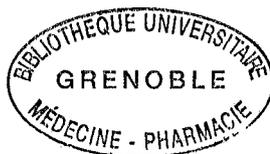
L'utilisation des liposomes en thérapeutique est envisagée pour la première fois il y a une vingtaine d'années.

De très nombreuses investigations sont réalisées chez l'animal et des succès incontestables sont enregistrés. Les techniques poussées de formulations des liposomes sont à la base de ces résultats encourageants et de la pléthore de publications traitant de l'utilisation des liposomes en pharmacologie expérimentale, peu d'applications concrètes voient le jour en médecine humaine, sous la forme d'un nouveau médicament.

Les causes de cette situation sont probablement multifactorielles : problèmes techniques, manque de motivation des industriels du médicament, recherche et développement menés de manière peu cohérente avec des méthodologies et des compositions lipidiques qui interdisent souvent la comparaison des résultats.

Face à ce tableau une question s'impose : « Les liposomes sont-ils réellement efficaces en clinique humaine et si oui, sont-ils dépourvus de toxicité et d'effets secondaires ? ».

Après l'aspect technique des liposomes, l'analyse des nombreux essais thérapeutiques nous donnera certaines réponses.



TITRE : Les liposomes en thérapie orale et parentérale

RESUME

L'utilisation des liposomes en thérapeutique est envisagée pour la première fois il y a une vingtaine d'années.

De très nombreuses investigations sont réalisées chez l'animal et des succès incontestables sont enregistrés. Les techniques poussées de formulations des liposomes sont à la base de ces résultats encourageants et de la pléthore de publications traitant de l'utilisation des liposomes en pharmacologie expérimentale, peu d'applications concrètes voient le jour en médecine humaine, sous la forme d'un nouveau médicament.

Les causes de cette situation sont probablement multifactorielles : problèmes techniques, manque de motivation des industriels du médicament, recherche et développement menés de manière peu cohérente avec des méthodologies et des compositions lipidiques qui interdisent souvent la comparaison des résultats.

Face à ce tableau une question s'impose : « Les liposomes sont-ils réellement efficaces en clinique humaine et si oui, sont-ils dépourvus de toxicité et d'effets secondaires ? ».

Après l'aspect technique des liposomes, l'analyse des nombreux essais thérapeutiques nous donnera certaines réponses.

Mots clefs : LIPOSOMES - FORMULATION - THERAPIE - ORALE - PARENTERALE - VECTEURS - TRANSFERT.

JURY

Mademoiselle le Professeur R. STEIMAN

Mademoiselle P. GUIRAUD maître de conférences

Monsieur D. BROQUET

Président du jury

Docteur en pharmacie

Pharmacien

Thèse soutenue le 29 juillet 1998

A 18 heures

AUTEUR

Annabelle CHASTAGNIER

[Données à caractère personnel]