



**HAL**  
open science

## L' utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux

Gemechis Haile Bobo

► **To cite this version:**

Gemechis Haile Bobo. L' utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01974084

**HAL Id: dumas-01974084**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01974084>**

Submitted on 8 Jan 2019

**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.

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

Soutenu publiquement le 24/03/2017

Par **BOBO, Gemechis Haile**

**L'UTILISATION DES LIPOSOMES COMME VECTEURS  
MÉDICAMENTEUX**

**JURY :**

**Président :** Dr. Catherine DEMAILLY-MULLIÉ, Enseignant-Chercheur à l'UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne.

**Membres :**

Dr. Anne CHARBONNET, Responsable Qualité et Règlementaire au Centre de développement industriel de Sanofi à Compiègne.

Prof. Pascal SONNET, Enseignant-Chercheur à l'UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne.

Thèse n°

## **Remerciement**

Je voudrais remercier, sans les citer, celles et ceux qui m'ont soutenu quand j'en avais besoin. Je ne vous oublierai jamais.

## **Serment de Galien**

En présence des maitres de la faculté et de mes condisciples, je jure :

- 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.

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.

## Sommaire

Abréviations .....	1
Introduction.....	2
Chapitre 1 : Liposomes.....	4
1.1. Lipides.....	4
1.2. Phospholipides.....	4
1.3. Paramètre d'empilement (packing parameter) .....	6
1.4. Température de transition (T <sub>m</sub> - melting temperature) .....	10
1.5. Thermodynamique et cinétique des liposomes.....	11
Chapitre 2 : Classification des liposomes.....	14
2.1 Critères morphologiques : taille et lamellarité .....	14
2.2 Liposomes de 1 <sup>ère</sup> , 2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> générations.....	15
2.2.1 Liposomes de 1 <sup>ère</sup> génération (Liposomes Conventionnels).....	15
2.2.2 Liposomes de 2 <sup>ème</sup> génération (Liposomes Furtifs).....	16
2.2.3 Liposomes de 3 <sup>ème</sup> génération (Immunoliposomes) .....	16
2.3 Procédés de fabrication.....	17
Chapitre 3 : Préparation des liposomes.....	19
3.1 Préparation de liposomes par la dispersion mécanique .....	20
3.1.1 Agitation.....	20
3.1.2 Sonication.....	21
3.1.3 Extrusion .....	21
3.1.4 French press (Presse de French) .....	21
3.1.5 Microfluidisation .....	22
3.1.6 Congélation – Décongélation (Freeze – Thaw).....	22
3.2 Préparation des liposomes par l'élimination du solvant organique.....	22
3.2.1 Evaporation en phase inverse .....	22
3.2.2 Injection de solvant organique.....	23
3.3 Préparation des liposomes par l'élimination d'un détergent .....	24
Chapitre 4 : Encapsulation de principe actif dans les liposomes .....	25
4.1 Encapsulation passive.....	25
4.2 Encapsulation active.....	26
4.2.1 Gradient de pH .....	26

4.2.2	Gradient de potentiel .....	27
4.2.3	Utilisation de détergent.....	28
Chapitre 5 :	La stabilité des préparations à base des liposomes .....	30
5.1	Facteurs influençant la stabilité d'une préparation liposomiale .....	30
5.2	Les différents types d'instabilité .....	30
5.2.1	Instabilité physique.....	30
5.2.2	Instabilité Chimique : réactions d'oxydation, d'hydrolyse, etc.....	31
5.3	Les conditions de stockage des préparations à base de liposome.....	32
Chapitre 6 :	La pharmacocinétique du principe actif vectorisé par un liposome .....	33
6.1	Interaction du liposome avec les éléments plasmatiques (protéines plasmatiques, cellules sanguins, lipoprotéines plasmatiques, etc.) .....	33
6.2	La sortie du liposome furtif des vaisseaux sanguins vers les tissus .....	35
6.3	Interaction de liposome avec les cellules cibles et libération du PA.....	36
6.4	Élimination de constituants du liposome (phospholipides, cholestérol, etc.).....	37
Chapitre 7 :	Immunoliposomes.....	38
7.1	Anticorps directement fixé à la surface des liposomes par une liaison covalente.....	39
7.1.1	Utilisation du SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate).....	40
7.1.2	Utilisation du SMPB (Succinimidyl 4-(p-maléiminido phényl) butyrate) .....	41
7.2	Anticorps formant un complexe non-covalent stable avec le liposome .....	42
7.2.1	Complexe Protéine A –Anticorps.....	43
7.2.2	Complexe Avidine-Biotine / Streptavidine-Biotine .....	44
7.3	Anticorps bi-spécifique .....	44
Chapitre 8 :	Produits pharmaceutiques à base des liposomes .....	46
Bibliographie.....		51

## Abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AC** : Anticorps

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**BHT** : Butylhydroxytoluène

**C** : carbone

**CMC** : Critical micelle concentration

**°C** : degré Celsius

**DTT** : Dithiothréitol

**Ø** : diamètre

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EPR** : enhanced permeability and retention

**Éq.** : Equation

**H** : Hydrogène

**iv** : intraveineuse

**K** : Potassium

**LMV** : large multilammellar vesicles

**LUV** : Large Unilamellar Vesicle

**LUV-ET** : LUV obtenues par extrusion

**µm** : micromètre

**N** : Azote

**nm** : nanomètre

**O** : Oxygène

**P** : Phosphore

**PA** : Principe actif

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PP** : packing parameter (paramètre d'empilement)

**Psi** : pound-force per square inch (livre-force par pouce carré)

**R&D** : Recherche et Développement

**S** : Soufre

**SPM** : système des phagocytes mononuclées

**SUV** : Small Unilammellar Vesicles

**Tm** : Température de transition (melting temperature)

**TNBC** : Triple-negative breast cancer

## Introduction

Aujourd'hui, grâce aux progrès technologique et scientifique dans le domaine de la santé, certaines maladies qui étaient mortelles auparavant sont devenues curables voire évitables. Les autorités sanitaires veillent et mettent en place des réglementations de plus en plus strictes pour s'assurer que les médicaments commercialisés affichent un rapport bénéfice/risque favorable au patient. Les traitements médicamenteux présentent aussi des effets indésirables pour le patient. Une des causes de ces effets indésirables est l'action des molécules thérapeutiques sur les cellules saines de l'organisme.

Un médicament administré subit des transformations par l'organisme humain avant d'arriver à son site d'action. Ces transformations ne sont pas toujours favorables à l'activité du médicament. Des solutions galéniques et chimiques sont employées afin de résoudre ce problème dans la mesure du possible.

Pour éviter l'action des molécules médicamenteuses sur les cellules saines et empêcher la transformation de ces molécules avant d'arriver sur leur site d'action, plusieurs pistes de ciblage des cellules malades ont été développées au cours des 50 dernières années. La thérapie ciblée est surtout avantageuse dans les traitements médicamenteux qui impliquent l'utilisation de molécules hautement toxiques, comme dans le cas de la chimiothérapie anticancéreuse.

Une des pistes de ciblage est la vectorisation de principe actif en utilisant les liposomes. Les liposomes sont des vésicules formées essentiellement de phospholipides. Les phospholipides font partie de constituants naturels des membranes biologiques, donc ils sont atoxiques et biodégradables.

La vectorisation en utilisant les liposomes permet de véhiculer par encapsulation et libérer le principe actif directement sur son site d'action. Ceci permet d'avoir une concentration élevée de principe actif au sein du tissu cible. L'efficacité de la vectorisation dépend de la taille des liposomes, de la composition lipidique de la paroi des liposomes et des propriétés physico-chimiques du principe actif. Les constituants du liposome doivent être compatibles avec le principe actif encapsulé et vice-versa.

L'encapsulation de principe actif dans des liposomes offre les avantages suivants :

- libération programmée du principe actif;

- protection du principe actif contre la dégradation par l'organisme humain afin de garder l'intégrité du principe actif jusqu'à son site d'action;
- diminution de la toxicité du principe actif en évitant son action sur les cellules saines;
- possibilité d'administrer par voie intraveineuse des principes actifs insolubles dans l'eau.

Cette thèse bibliographique expose le progrès réalisé et les défis persistants, dans le domaine de liposomes, depuis leur première description par Bangham et al. (1964) jusqu'à leur utilisation en thérapie ciblée comme des vecteurs.<sup>(1)</sup> Des cas dans lesquels les liposomes ont permis de diminuer les effets indésirables et augmenter l'efficacité des médicaments déjà commercialisés seront évoqués. Les différentes familles de liposomes, les méthodes de préparation, la cinétique et les mécanismes de ciblage de tissus malade seront également abordés.

# Chapitre 1 : Liposomes

## 1.1. Lipides

Le mot liposome vient de deux mots grecs « *lipos* » = graisse et « *soma* » = corps.

Les lipides sont des constituants naturels des êtres vivants. Ils sont soit hydrophobes ou amphiphiles. Les composés amphiphiles sont des molécules possédant à la fois des extrémités (régions) hydrophobes et hydrophiles. Parmi les composés classés comme lipides, on peut citer les acides gras, les glycérides, les phosphoglycérides (phospholipides), sphingolipides, glycolipides, polycétides, stérols (cholestérol) et les vitamines liposolubles. Les lipides sont issus d'une voie de biosynthèse par la condensation de cétoacycle ou l'addition des unités isoprènes. <sup>(2)</sup>

Les lipides ont des rôles importants chez les êtres vivants : stockage d'énergie, constituants de membranes biologiques, messagers cellulaires, etc.

Les liposomes sont des petites structures vésiculaires composés d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. La plupart des lipides utilisés dans la bicouche des liposomes sont des phospholipides.

## 1.2. Phospholipides

Les phospholipides sont des composés amphiphiles qui possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe (Figure 1).

La tête hydrophile contient un groupement phosphate alors que la queue hydrophobe est composée de chaînes carbonées.

Les phospholipides d'origine naturelle (lécithines de soja, jaune d'œuf, ...etc.) sont très hétérogènes (degré d'insaturation, pureté et longueur de la chaîne carbonée variables) donc ils sont moins utilisés dans la préparation des liposomes. Les phospholipides synthétiques, d'une grande pureté et homogénéité, sont le plus souvent utilisés.



### 1.3. Paramètre d'empilement (packing parameter)

Le type de la structure supramoléculaire formée dépend de la nature du phospholipide : taille ou longueur de la chaîne carbonée, surface de la tête polaire, nombre de chaînes carbonées (mono- ou bi- caténaire) et volume de la chaîne hydrophobe vont l'influencer.

Israelachvili *et al* (1975) ont développé un modèle mathématique permettant de prévoir le type de vésicule lipidique formée à partir des grandeurs physiques de phospholipides. C'est ainsi qu'ils ont défini un paramètre sans unité appelé le paramètre d'empilement ou packing parameter (pp) qui permet de prévoir la structure supramoléculaire qui va être formée par des phospholipides en solution aqueuse. <sup>(5)</sup>

$$pp = v_o / (a_e \times l_o) \quad (\text{Éq. 1})$$

- Où  $v_o$  le volume occupé par les chaînes hydrophobes.  
 $a_e$  la surface à l'interface entre la tête polaire et la queue hydrophobe.  
 $l_o$  la longueur des chaînes hydrophobes (Figure 3).

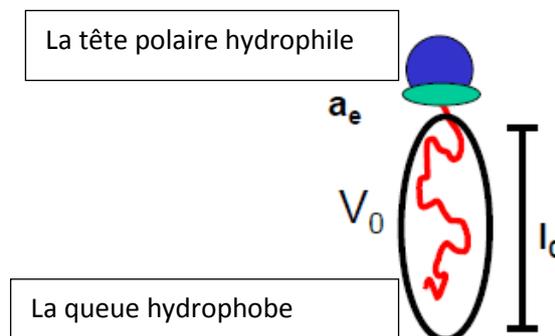


Figure 3. Une molécule de phospholipide. <sup>(6)</sup>

Nous allons prendre un exemple de structure supramoléculaire, micelle, pour étudier le pp (Figure 4) :

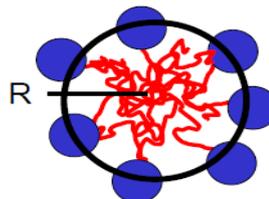


Figure 4. Une micelle avec un rayon R. <sup>(6)</sup>

Soit  $n$ , le nombre de molécules de phospholipides par micelle et  $R$  son rayon.

$$\text{Sachant que Volume de micelle} = n \times v_o = 4\pi R^3/3 \quad (\text{Éq. 2})$$

$$\text{Surface de micelle} = n \times a_e = 4\pi R^2 \quad (\text{Éq. 3})$$

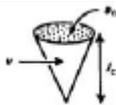
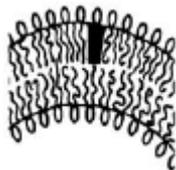
$$\text{Alors } R = 3 \times v_o / a_e \quad (\text{Éq. 4})$$

Pour ce micelle,  $0 \leq R \leq l_o$ , nous aurons  $0 \leq v_o / (a_e \times l_o) \leq 1/3$ .

Donc le modèle d'Israelachvili *et al.* montre que les micelles sont formées par des phospholipides ayant une valeur de  $pp$  inférieure à 0,33.

Ils ont calculé de la même manière pour d'autres auto-assemblages supramoléculaires lipidiques dont les résultats sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Les valeurs de packing parameter en fonction de structures supra-moléculaires. <sup>(5)</sup>

Packing parameter (pp)	Forme de phospholipide	Forme de l'auto-assemblage lipidique
0 – 0,33		Micelle sphérique 
0,33 – 0,5		Micelle cylindrique 
0,5 - 1		Bicouche lipidique, liposomes 
>1		Micelle inverse 

Les travaux pratiques menés par Kumar (1991) sur les phosphoglycérides ont prouvé le modèle d'Israelachvili *et al.* En plus, Kumar a démontré la théorie suivante<sup>(7)</sup> :

- (a) Afin d'avoir un packing parameter suffisant pour former des bicouches lipidiques ou des liposomes, il faut :
  - i. que le phospholipide soit bi-caténaire (deux chaînes carbonées) ;
  - ii. au minimum 10 carbones sur chacune des chaînes carbonées.

Les phospholipides avec un faible nombre de carbones sur la chaîne carbonée forment des micelles. Mais, si le nombre de carbone est encore très faible, ils ne formeront pas de micelle car leur concentration micellaire critique (CMC) sera très élevée. En effet, le fait de n'avoir qu'une petite partie hydrophobe augmente la solubilité dans l'eau.

La concentration micellaire critique (CMC) est la concentration en molécules amphiphiles (phospholipides, tensioactif, etc.) au-dessus de laquelle des micelles se forment.

- (b) La majorité des bicouches lipidiques présentes dans les membranes biologiques et des liposomes vecteurs sont composées de plusieurs phospholipides. *Comment le pp peut-il prévoir la possibilité d'avoir un liposome ou pas quand nous utilisons un mélange de plusieurs types de phospholipides ?*

Le phospholipide lysophosphatidylcholine (phospholipide monocaténaire) ne peut pas former une bicouche lipidique ou liposome. Par contre, Kumar a constaté la capacité d'un mélange de lysophosphatidylcholine et cholestérol (Figure 5) à former une bicouche lipidique.

Ceci est dû à l'**additivité de packing parameter**. L'additivité est le résultat d'une complémentarité structurelle ou stérique entre les phospholipides dans le mélange. Le pp d'un mélange des phospholipides est la moyenne pondérée des pp de chaque phospholipide pris séparément. La pondération se fait en fonction de fraction molaire. Cette hypothèse a été confirmée à travers des études menées sur plusieurs mélanges binaires et ternaires.<sup>(7)</sup>

**Par exemple**, dans un mélange contenant 50% mol lysophosphatidylcholine (pp=0,397) et 50% mol cholestérol (pp=1,21), le pp du mélange sera :

$$(0,5 * 0,397) + (0,5*1,210) = \mathbf{0,804}$$

La lysophosphatidylcholine seule ne peut pas former de bicouche lipidique mais en la mélangeant avec le cholestérol, cette bicouche peut ainsi être obtenue.

Il faut noter aussi que d'autres facteurs (température, pH, force ionique, etc.) jouent également un rôle dans l'organisation supramoléculaire des phospholipides.

Les liposomes utilisés comme vecteurs médicamenteux sont composés de :

1. un ou plusieurs phospholipides ;
2. un stérol (cholestérol, etc.) : l'ajout de cholestérol permet de rendre le liposome rigide et moins perméable. Ceci est dû à la structure rigide du cholestérol qui limite la mobilité de la chaîne carbonée de phospholipides;

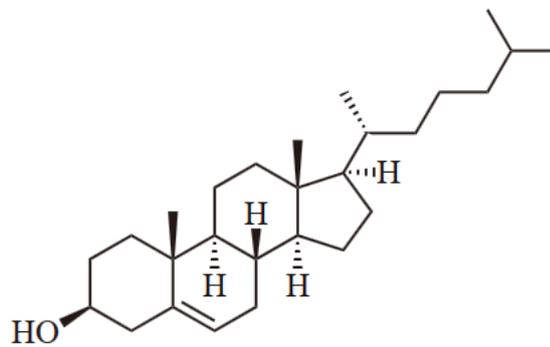


Figure 5. Structure du cholestérol <sup>(8)</sup>

3. des phospholipides ajoutés afin modifier la surface de liposomes. Les modifications de la surface des liposomes incluent :
  - l'ajout des phospholipides ioniques (cations ou anions) pour rendre le liposome chargé ;
  - l'ajout de phospholipides couplés au groupement hydrophile (polyéthylène glycol (PEG)) pour rendre le liposome furtif ;
  - l'ajout de phospholipides couplés à des anticorps (immunoliposomes).

L'ajout des phospholipides chargés augmente l'espace inter-lamellaire des liposomes par répulsion. Ceci permet d'incorporer plus de principe actif hydrophobe à l'intérieur de la bicouche. Egalement, il y a moins de risque d'agrégation de liposomes à cause de la répulsion électrostatique.

Les principaux phospholipides utilisés dans la formation des liposomes sont classifiés selon leurs propriétés physico-chimiques et présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Les phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes. <sup>(9)</sup>

Lipides	Abréviation	carbones/ saturation	Température de transition T <sub>m</sub> (°C)	Charge à PH=7,4
<b>Phospholipides naturels neutres</b>				
Phosphatidylcholine de jaune d'œuf (Egg Phosphatidyl Choline)	EPC		-15 à -7	0
Phosphatidylcholine de soja	SPC		-15 à -7	0
<b>Phospholipides synthétiques neutres</b>				
Dilauroyl phosphatidylcholine	DLPC	12 : 0	-1	0
Dimyristoyl phosphatidylcholine	DMPC	14 : 0	23	0
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	DPPC	16 : 0	41	0
Distéaroyl phosphatidylcholine	DSPC	18 : 0	55	0
Dioleoyl phosphatidylcholine	DOPC	18 : 1	-20	0
Dimyristoyl phosphatidyléthanolamine	DMPE	14 : 0	50	0
Dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine	DPPE	16 : 0	63	0
Dioleoyl phosphatidyléthanolamine	DOPE	18 : 1	-16	0
<b>Phospholipides synthétiques chargés négativement</b>				
Dimyristoyl acide phosphatidique•sodium	DMPA•Na	14 : 0	50	-1,3
Dipalmitoyl acide phosphatidique• sodium	DPPA•Na	16 : 0	67	-1,3
Dioleoyl acide phosphatidique • sodium	DOPA•Na	18 : 1	-8	-1,3
Dimyristoyl phosphatidylglycérol• sodium	DMPG•Na	14 : 0	23	-1
Dipalmitoyl phosphatidylglycérol• sodium	DPPG•Na	16 : 0	41	-1
Dioleoyl phosphatidylglycérol• sodium	DOPG•Na	18 : 1	-18	-1
Dimyristoyl acide phosphatidylsérine•sodium	DMPS•Na	14 : 0	35	-1
Dipalmitoyl phosphatidylsérine• sodium	DPPS•Na	16 : 0	54	-1
Dioleoyl phosphatidylsérine• sodium	DOPS•Na	18 : 1	-11	-1
DOPE-Glutaryl•(Na) <sub>2</sub>		18 : 1	-10	-2
Tetramyristoyl Cardiolipin•(Na) <sub>2</sub>		14:0	59	-2
DSPE-mPEG-2000•Na		18 : 0	N/A	-1
DSPE-mPEG-5000•Na		18 : 0	N/A	-1
DSPE-Maléimide PEG-2000•Na		18 : 0	N/A	-1
<b>Phospholipides chargés positivement</b>				
Di-oleoyloxytriméthylamonio propane•chlore	DOTAP•Cl	18 : 1	0	+1
Stéarylamine	SA	18 : 0	N/A	+1

#### 1.4. Température de transition (T<sub>m</sub> - melting temperature)

Chaque phospholipide est caractérisé par sa température de transition de phase (T<sub>m</sub>). En dessous de cette température le phospholipide se trouve dans **une phase gel ordonné (L<sub>β</sub>)** où les chaînes hydrocarbonées sont parallèles entre elles, étirées au maximum et peu mobiles.

Au-dessus de cette température le phospholipide se trouve dans **une phase fluide désordonnée ( $L_{\alpha}$ )** où les molécules de phospholipide sont mobiles (Figure 6).

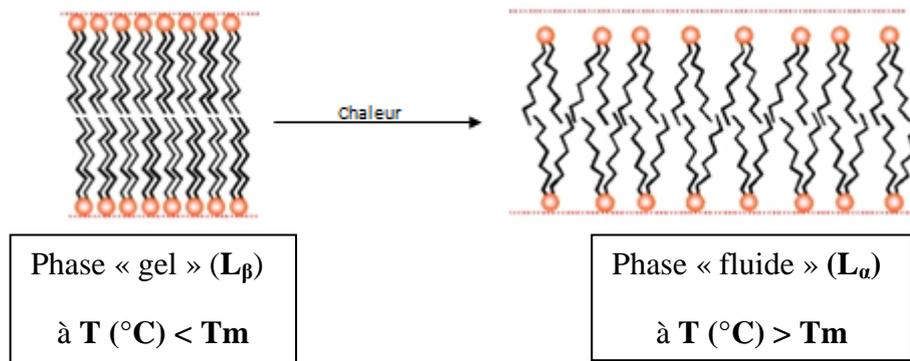


Figure 6. La transition de phase de phospholipides par variation de température.<sup>(10)</sup>

La  $T_m$  augmente proportionnellement avec la longueur de la chaîne carbonée. Par contre, l'insaturation de la chaîne carbonée diminue la  $T_m$ .

Lors de la préparation des liposomes, les phospholipides doivent être en phase fluide donc il faut prendre en compte la  $T_m$ . Dans le cas où l'on mélange plusieurs types de phospholipides, la température lors de la préparation doit être supérieure à la  $T_m$  du phospholipide ayant la  $T_m$  la plus élevée.

L'utilisation des lipides ayant une  $T_m$  élevée résulte en formation des liposomes rigides ayant une perméabilité faible.

### 1.5. Thermodynamique et cinétique des liposomes

Même si le pp décrit avec un paramètre simple la forme d'assemblage des phospholipides, il n'explique pas les processus thermodynamique et cinétique derrière cette organisation supramoléculaire.

Quand une quantité de soluté est ajouté dans l'eau, l'entropie et l'énergie libre d'interaction du système sont augmentées. Pour que le soluté soit dispersé dans l'eau spontanément, l'augmentation en entropie doit être suffisante pour compenser l'augmentation en énergie libre d'interaction. Dans le cas où l'augmentation d'entropie est faible par comparaison à l'augmentation de l'énergie libre d'interaction, une séparation macroscopique de deux phases en résulte.

Dans le cas d'une dispersion de phospholipides dans l'eau, il y a une nette augmentation en énergie libre du système. Donc la formation de liposomes n'est pas de processus spontané favorisé par une stabilité thermodynamique. <sup>(11)</sup> Toute organisation supramoléculaire spontanée vise à diminuer l'énergie libre du système (*deuxième principe de la thermodynamique*).

$$\Delta G = \Delta H - (T \times \Delta S) \quad (\text{Éq. 5})$$

Avec  $\Delta G$  = Variation d'énergie libre du système (en joules)

$\Delta H$  = Variation d'enthalpie du système (en joules)

T = température (en Kelvin)

$\Delta S$  = Variation d'entropie (en joules/kelvin)

Prenons les phospholipides ayant un pp compris entre 0,5 et 1 (*Tableau 1*). Dans un milieu aqueux, ces phospholipides s'auto-organisent d'abord sous forme de surfaces (disques) bicouches. Ces disques bicouches permettent de diminuer le contact entre la chaîne hydrophobe des phospholipides et l'eau. À la périphérie de ces disques bicouches, il y a toujours des interfaces entre la chaîne carbonée et l'eau où la tension de surface est très élevée. Ceci augmente l'énergie libre du système. Par conséquent, les disques fusionnent entre eux afin de diminuer l'interface entre la chaîne carbonée et l'eau (*Figure 7*). <sup>(12)</sup>

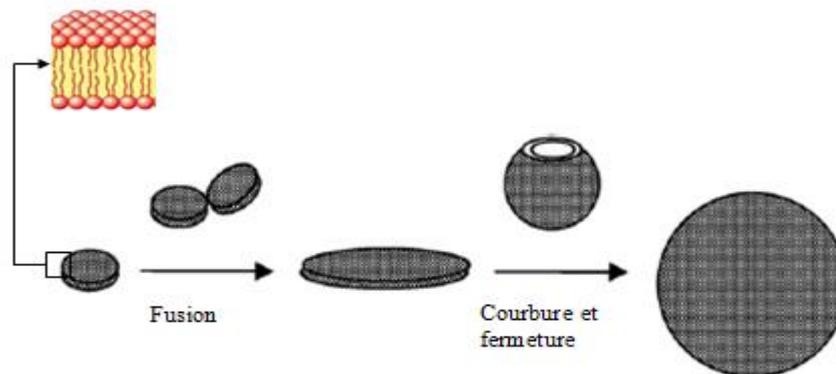


Figure 7. Formation des liposomes. <sup>(13)</sup>

La fusion de ces disques va former des disques de plus large surface. Mais quelle que soit la largeur de la surface, il y a toujours des interfaces eau-chaîne carbonée à la périphérie de ces disques. Donc la fusion de petits disques ne peut pas diminuer significativement la surface d'interaction eau-chaîne carbonée.

La seule possibilité pour effacer définitivement la surface d'interaction eau-chaine carbonée est de plier ces disques bicouches en vésicules sphériques (Figure 7). Mais cette étape est consommatrice d'énergie.

Lors de la préparation des liposomes, une énergie externe est donc appliquée au système (par exemple : sonication, agitation mécanique, etc.) pour rendre possible cette étape. Donc les liposomes possèdent une énergie élevée par rapport au mélange eau-phospholipide initial. L'énergie est stockée sous forme d'énergie élastique dans la surface bicouche de liposomes. Nous pouvons ensuite conclure que la formation de liposomes n'est pas une transformation spontanée favorisée par la thermodynamique. Lasic (1990) a conclu que les liposomes n'ont pas de stabilité thermodynamique mais que ce sont des produits métastables favorisés par la stabilité cinétique.<sup>(11)</sup> Malgré cela, une préparation contenant des liposomes peut être stabilisée par d'autres moyens (*cf. chapitre 5*).

Les liposomes qui se forment au tout début de la préparation ont une grande taille (*échelle  $\mu m$* ) et sont très souvent des large multilammellar vesicles (LMV), mais les liposomes qui nous intéressent pour une application thérapeutique sont les small unilammellar vesicles (SUV) de petite taille (*échelle  $nm$* ). (*cf. chapitre 2*). Afin d'obtenir des SUV, il faut appliquer une énergie externe au système (Figure 8).

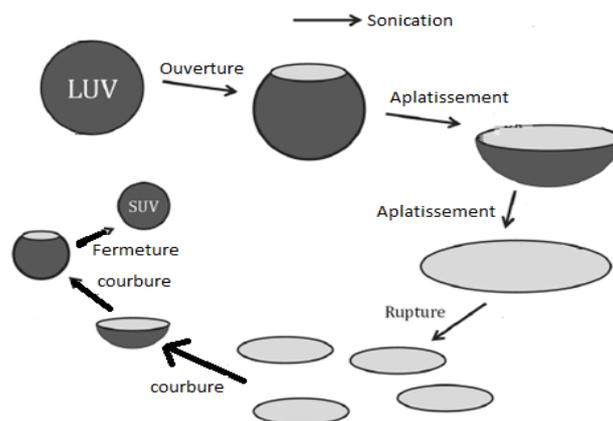


Figure 8. Formation de liposome SUV par sonication.<sup>(14)</sup>

La classification des liposomes et les descriptions de différents types de liposomes feront l'objet du chapitre 2.

## Chapitre 2 : Classification des liposomes

La classification des liposomes peut se faire selon plusieurs critères :

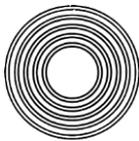
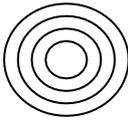
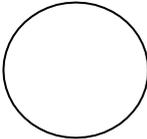
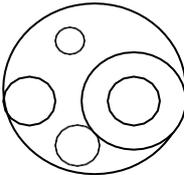
- critères morphologiques : taille et lamellarité ;
- génération : 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations ;
- procédé de fabrication.

Nous allons la détailler dans cette partie.

### 2.1 Critères morphologiques : taille et lamellarité

Nous pouvons distinguer les liposomes par leur taille et par le nombre de bicouches lipidiques par liposome (Tableau 3).

**Tableau 3** : la classification des liposomes selon leur taille et lamellarité. <sup>(15)</sup>

<b>SUV</b>	Small Unilamellar Vesicle		20-100 nm
<b>LUV</b>	Large Unilamellar Vesicle		> 100 nm
<b>MLV</b>	Multilamellar Large Vesicle		> 0,5 µm
<b>OLV</b>	Oligolamellar vesicle		0,1-1 µm
<b>GUV</b>	Giant Unilamellar Vesicle		> 1 µm
<b>MVV</b>	Multi Vesicular Vesicle		> 1 µm

## 2.2 Liposomes de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations

### 2.2.1 Liposomes de 1<sup>ère</sup> génération (Liposomes Conventionnels)

Ils contiennent seulement le principe actif (PA) encapsulé dans la vésicule formée par la bicouche lipidique (Figure 9). Ces liposomes sont injectés dans la circulation sanguine. Certaines protéines plasmatiques, opsonines, s'adsorbent à la surface de ces liposomes pour les marquer comme « non-soi ». Ces liposomes opsonisés seront captés par les macrophages du système des phagocytes mononucléés (SPM).

Le SPM ou le Système réticulo-endothélial (RES) <sup>(16)</sup> est un réseau de cellules disséminées dans l'organisme, caractérisées par leur activité phagocytaire, leur mobilité, leur rôle dans le déclenchement et l'entretien des réactions immunitaires. Ces cellules, d'origine médullaire, passent dans le sang (monocytes), et parviennent dans les tissus conjonctifs lâches où elles prennent le nom d'histiocytes-macrophages. Dans les alvéoles pulmonaires, ce sont les cellules à poussières ou macrophages alvéolaires ; dans le foie, les cellules de Kupffer ; dans le cerveau, les cellules de la microglie ; dans la peau, les cellules de Langerhans ; dans l'os, les ostéoclastes.

Ainsi, les liposomes conventionnels sont détruits et le médicament est libéré au niveau des organes SPM par diffusion à travers la paroi des macrophages. Ils sont utiles pour soigner des maladies des organes SPM, par exemple : le cancer hépatique. Les liposomes de 1<sup>ère</sup> génération ne peuvent pas aller au-delà des organes SPM.

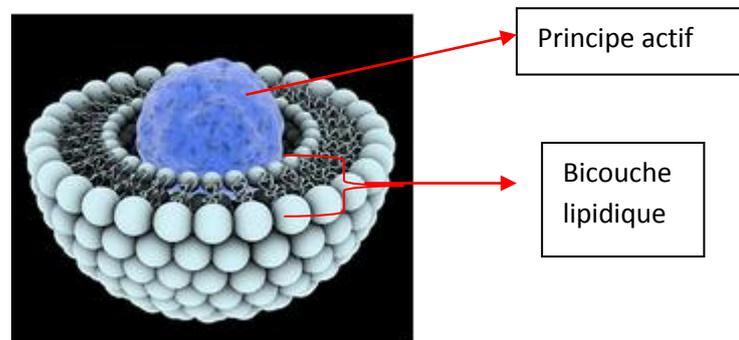


Figure 9. Liposome de 1<sup>ère</sup> génération (Source d'image : CNRS) <sup>(17)</sup>

### 2.2.2 Liposomes de 2<sup>ème</sup> génération (Liposomes Furtifs)

Ils ressemblent aux liposomes de 1<sup>ère</sup> génération. La seule différence est que ces liposomes furtifs contiennent à leur surface des résidus sialiques (gangliosides ou sphingomyélines) ou des polymères hydrophiles comme le PEG. C'est la raison pour laquelle ils sont aussi appelés liposomes pégylés.

Le PEG est couplé à des phospholipides et/ou au cholestérol par une liaison covalente. Il inhibe l'adsorption des opsonines à la surface de ces liposomes en créant une barrière stérique (Figure 10). L'efficacité d'inhibition dépend du degré de polymérisation et de densité de PEG à la surface des liposomes. Plus la chaîne de PEG est longue, plus la barrière stérique est forte. Donc ils ne seront pas reconnus comme étant un corps étranger par le système de macrophage du SPM. Ceci leur donne une durée de vie plasmatique plus longue et leur permet d'aller jusqu'au tissu malade extravasculaire. Par contre, le ciblage de tissu malade est passif. En arrivant par la circulation sanguine à proximité du tissu malade, ce liposome furtif va rencontrer un épithélium vasculaire discontinu. La perméabilité capillaire est très élevée au niveau de l'organe malade (par exemple : tumeur). Cette perméabilité capillaire très élevée s'appelle l'effet EPR (enhanced permeability and retention). C'est par ces « trous » vasculaires que le liposome va s'échapper de la circulation vers le tissu malade. Le liposome véhicule et libère ainsi le principe actif au sein du tissu malade.

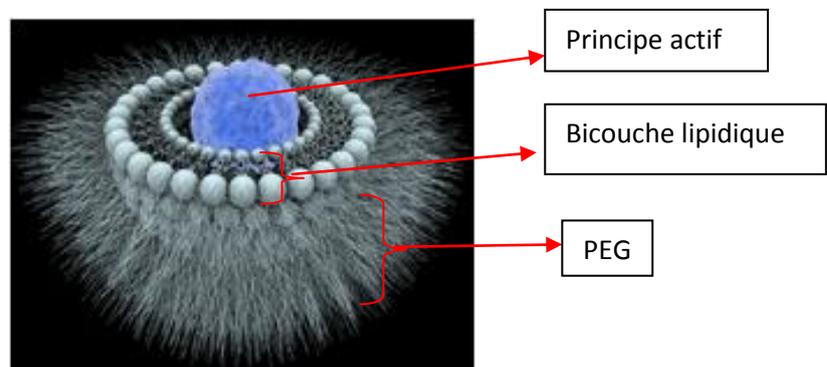


Figure 10. Liposome de 2<sup>ème</sup> génération (Source d'image : CNRS)<sup>(17)</sup>

### 2.2.3 Liposomes de 3<sup>ème</sup> génération (Immunoliposomes)

Ces liposomes ressemblent aux liposomes de 2<sup>ème</sup> génération. La seule différence est qu'ils portent à leur surface des anticorps ou fragments d'anticorps spécifiques à la cellule cible ou d'autres composés à activité biologique (Figure 11). Ils ciblent activement le tissu malade.

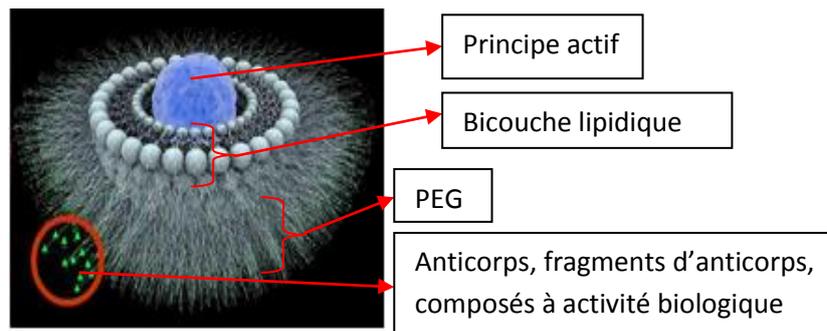


Figure 11. Liposome de 3<sup>ème</sup> génération (Source d'image : CNRS)<sup>(17)</sup>

La particularité des liposomes de 3<sup>ème</sup> génération est leur capacité à cibler l'organe malade. Les immunoliposomes sont évoqués comme faisant partie de cette génération, mais il existe d'autres liposomes de 3<sup>ème</sup> génération utilisant un autre mode de ciblage basé sur des agents physiques :

- a) **Température** : en appliquant une température spécifique au sein d'organe malade, il est possible de désintégrer les liposomes et libérer le PA à cet endroit (liposomes thermosensibles).
- b) **pH** : les liposomes se dissocient et libèrent le PA au pH spécifique de l'organe cible.
- c) **Lumière** : Une lumière à une longueur d'onde spécifique est appliquée sur l'organe cible afin de désintégrer les liposomes véhicules et libérer le PA à cet endroit.

### 2.3 Procédés de fabrication

Le tableau 4 classe les liposomes selon leur procédé de fabrication.

**Tableau 4:** Classification des liposomes selon leur mode de préparation.<sup>(18)</sup>

Abréviation	Signification de l'abréviation en anglais	Signification de l'abréviation en Français
REV	Vesicles made by Reverse phase EVaporation	Vésicules obtenues par d'évaporation en phase inverse
MLV-REV	MLV made by REV	MLV obtenues par d'évaporation en phase inverse
VET	Vesicles made by ExTrusion	Vésicules obtenues par extrusion
LUV-ET	LUV made by ExTrusion	LUV obtenues par extrusion
FPV	Vesicles made by French Press	vésicules produites par une presse de French

FTV	Vesicles made by Freeze - Thaw	vésicules obtenues par congélation-décongélation
DRV	Vesicles made by Dehydration Rehydration method	vésicules obtenues par déshydratation-réhydratation
EIV	Vesicles made by Ether Injection method	vésicules obtenue par la méthode d'injection d'éther

Ces différents procédés de fabrication des liposomes vont maintenant être vus en détail dans le chapitre suivant.

## Chapitre 3 : Préparation des liposomes

Plusieurs types de procédés existent pour fabriquer les liposomes. Le choix de procédé dépend de la qualité de liposomes que nous cherchons à fabriquer. La qualité des liposomes désirés dépend des facteurs suivants :

- *la taille et la lamellarité* : les liposomes utilisés en thérapeutique sont souvent des SUV ;
- *le volume d'encapsulation et le taux d'encapsulation désiré* ;
- *les propriétés physico-chimiques du principe actif et des composants de la bicouche lipidique.*

Quelle que soit la méthode de la préparation de liposomes choisie, elle doit respecter les normes de qualité des préparations injectables.

Les différentes méthodes de préparation des liposomes sont <sup>(19)</sup> :

- La dispersion mécanique :
  - Agitation ;
  - Sonication ;
  - Extrusion ;
  - French Press (Presse de French);
  - Microfluidisation ;
  - Congélation – Décongélation (Freeze – Thaw).
  
- L'élimination du solvant organique :
  - Evaporation en phase inverse ;
  - Injection de solvant organique (éther, éthanol, etc.).
  
- L'élimination d'un détergent :
  - Dialyse ;
  - chromatographie d'exclusion – diffusion ;
  - adsorption sur des résines hydrophobes.

### 3.1 Préparation de liposomes par la dispersion mécanique

Les phospholipides sont d'abord mélangés et dissous dans un ballon en utilisant un solvant organique afin d'obtenir un mélange homogène. Le solvant le plus souvent utilisé est le chloroforme ou un mélange chloroforme/méthanol.<sup>(20)</sup> Dans le cas où l'utilisation de chloroforme est déconseillée, le t-butanol ou le cyclohexane sont utilisés. Ensuite, le solvant organique est éliminé par évaporation sous pression réduite. Lors de cette évaporation, il est conseillé d'agiter le mélange afin d'augmenter la surface d'évaporation et de maintenir l'homogénéité du mélange lipidique. A la fin de cette évaporation, on obtient un film de phospholipides sec. Pour éliminer la trace résiduelle du solvant organique, le ballon avec le film lipidique peut être gardé sous vide pendant 1-3 jours ou l'on peut balayer la surface du film lipidique par un courant d'azote ou d'argon.<sup>(21)</sup>

Le ballon avec la couche mince (film) de phospholipides sec est gardé dans la glace en attendant son utilisation.

Au moment de la préparation de liposomes, le ballon contenant le film de phospholipides est chauffé à une température supérieure au  $T_m$  du phospholipide ayant la  $T_m$  le plus élevée. Puis l'hydratation des phospholipides se fait par l'ajout de la phase aqueuse. Le principe actif hydrophile peut être mélangé dans la phase aqueuse avant l'hydratation du film lipidique. La phase aqueuse peut être de l'eau distillée, une solution tampon, saline ou sucrée. Quelle que soit la phase aqueuse utilisée, le produit final doit avoir une osmolalité compatible avec celle du corps humain.

#### 3.1.1 Agitation

Au contact d'une solution aqueuse, plusieurs bicouches lipidiques se forment. Sous **agitation mécanique**, ces bicouches lipidiques deviennent des vésicules MLV de taille hétérogène.

Les vésicules MLV de taille hétérogène ont peu d'intérêt en thérapie ciblée. Une énergie mécanique est appliquée à ces MLV par des étapes de Microfluidisation, Extrusion ou Sonication afin de diminuer et homogénéiser la taille (diamètre) de liposomes et obtenir des SUV homogène (Figure 12).

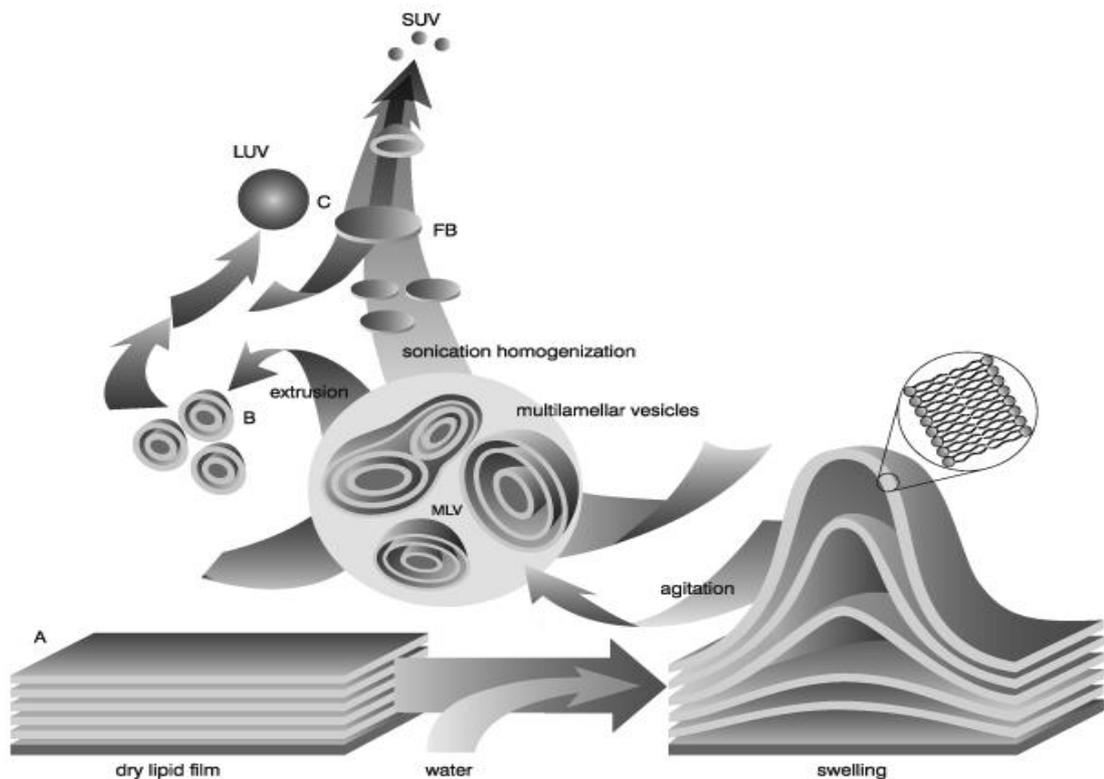


Figure 12. Formation des liposomes SUV par agitation mécanique. <sup>(22)</sup>

### 3.1.2 Sonication

L'application de l'énergie ultrasonique aux vésicules MLV réduit leur diamètre et nous donne des vésicules SUV de 15 -50 nm. La sonication se fait dans un bain à ultrason ou en utilisant une sonde ultrason. La température à laquelle la sonication se fait doit être supérieure à la  $T_m$  des phospholipides utilisés pour la préparation du MLV.

### 3.1.3 Extrusion

Une suspension de vésicules MLV est forcée à travers un filtre de polycarbonate ayant une taille de pore prédéfinie. La suspension doit être à une température supérieure à la  $T_m$  des composants de vésicules MLV. Cette méthode diminue le nombre de lamelles et nous donne des liposomes LUV-ET ayant un diamètre proche de la taille des pores du filtre.

### 3.1.4 French press (Presse de French)

La suspension de vésicules MLV est placée dans une cellule de French et une pression très élevée d'environ 20 000 psi est appliquée à l'aide d'un piston pour forcer la suspension à travers un petit orifice. Après environs 5 passages, des liposomes SUV de 30-50 nm sont obtenus.

### **3.1.5 Microfluidisation**

Une suspension de vésicules MLV est poussée avec une pression d'environ 10 000 psi au travers d'un filtre de microfluidiseur ( $\varnothing$  de pore = 5 $\mu$ m). En sortant du filtre, le fluide est divisé en 2 flux à haute vitesse. Ces deux flux à haute vitesse se rejoignent dans une chambre de collision. Des liposomes SUV sont formés suite à cette collision. Plus la pression et le nombre de passages dans le microfluidiseur sont augmentés, plus la taille du liposome diminue. Des liposomes SUV de diamètre 60 -80 nm sont obtenus après 10 passages dans le microfluidiseur.<sup>(19)</sup>

### **3.1.6 Congélation – Décongélation (Freeze – Thaw)**

Une suspension des liposomes MLV hétérogènes subit successivement une congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation à une température supérieure à la  $T_m$  des phospholipides du MLV. Cette procédure aboutit à la rupture des MLV et à la formation d'une population homogène de LUV dont le diamètre est inférieur à 150 nm. En augmentant le nombre de cycles de congélation/décongélation, la taille et la lamellarité des MLV diminuent.

## **3.2 Préparation des liposomes par l'élimination du solvant organique**

### **3.2.1 Evaporation en phase inverse**

Les phospholipides sont d'abord mélangés dans un solvant organique. Le solvant organique le plus souvent utilisé est le chloroforme ou un mélange de chloroforme/éther isopropylique (1:1). Ensuite, la phase aqueuse pouvant contenir un principe actif est ajoutée à la phase organique. Le rapport de phase aqueuse/phase organique est 1/3 à 1/6. Les phospholipides se placent à l'interface de deux phases non-miscibles. Le mélange non-miscible va subir une agitation mécanique ou ultrasonique. Cette agitation donne une émulsion eau/huile constituée des micelles inverses dans lesquelles la phase aqueuse est enfermée à l'intérieur des micelles. La phase organique est éliminée par évaporation sous pression réduite. Cette élimination de la phase organique entraîne le rapprochement des micelles inverses et formation d'un gel. L'élimination totale de la phase organique mène à la rupture du gel. La rupture du gel est suivie par le rapprochement des monocouches de phospholipides et la formation de bicouche de phospholipides qui entourent les liposomes LUV (Figure 13).

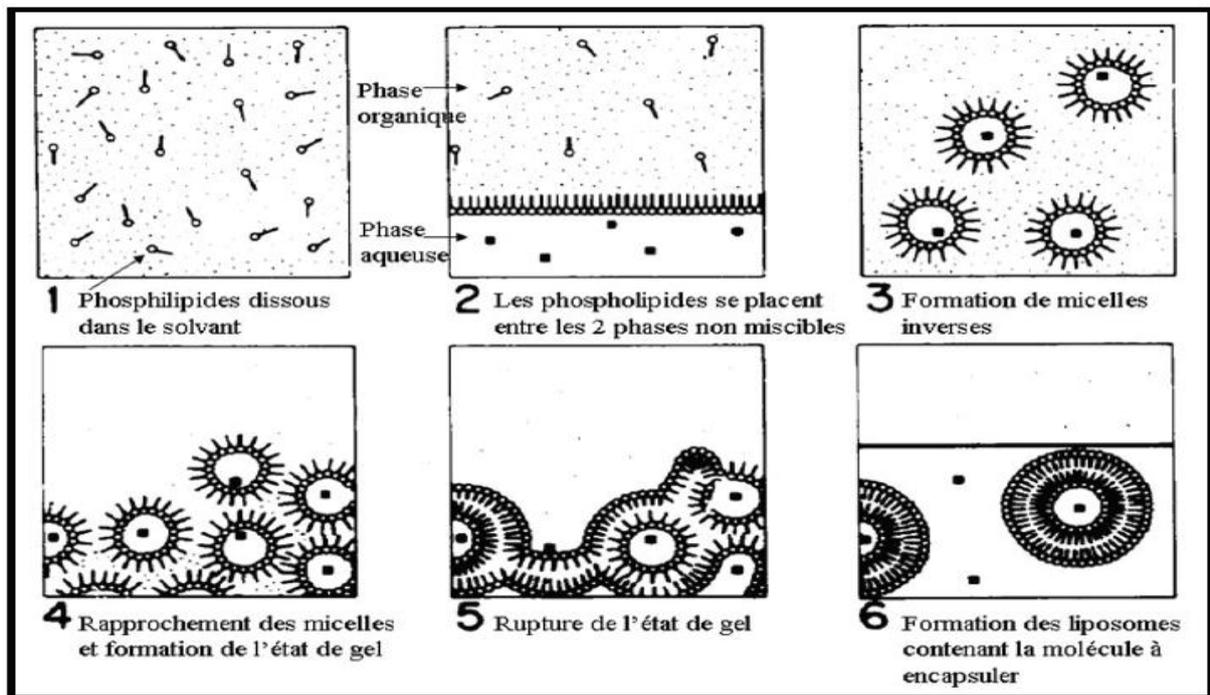


Figure 13. Formation des liposomes par évaporation en phase inverse. <sup>(23)</sup>

### 3.2.2 Injection de solvant organique

Des phospholipides dissous dans l'éther éthylique, l'éthanol ou un mélange éther éthylique/méthanol sont injectés à l'aide d'une seringue en verre dans une solution aqueuse contenant le principe actif. La solution aqueuse est sous agitation et à une température supérieure à la  $T_m$  de phospholipides. Le solvant organique est ensuite éliminé par une évaporation sous vide (Figure 14). Cette méthode nous donne de liposomes hétérogènes de taille 30 - 250 nm.

L'inconvénient de cette méthode est la difficulté d'élimination totale d'éthanol car il forme un mélange azéotrope avec l'eau et l'éther favorise l'oxydation de phospholipides.

Le diamètre de phospholipides formés dépend de la vitesse d'agitation, la vitesse d'injection de la phase organique et la concentration de phospholipides dans la phase organique.

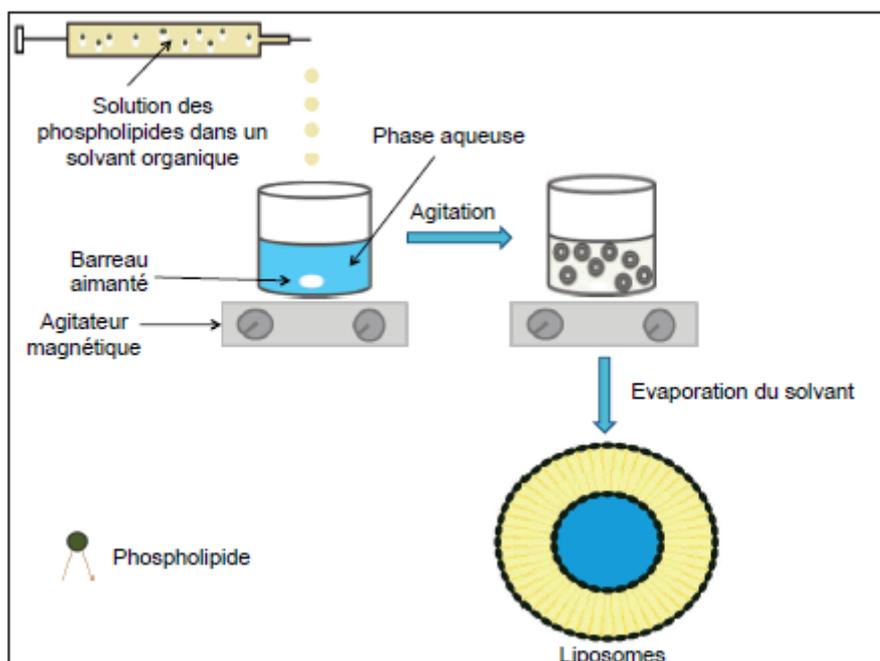


Figure 14. Préparation des liposomes par injection de solvant organique. <sup>(24)</sup>

### 3.3 Préparation des liposomes par l'élimination d'un détergent

Les phospholipides sont solubilisés dans un milieu aqueux à l'aide d'un détergent. Ceci résulte en la formation des micelles mixtes constituées de phospholipides et détergent. L'élimination du détergent résulte en micelles riches en phospholipides qui fusionneront pour devenir des liposomes LUV (Figure 15). Cette élimination de détergent se fait par dialyse, par chromatographie d'exclusion stérique sur un gel de sephadex ou par chromatographie d'adsorption sur des résines hydrophobes.

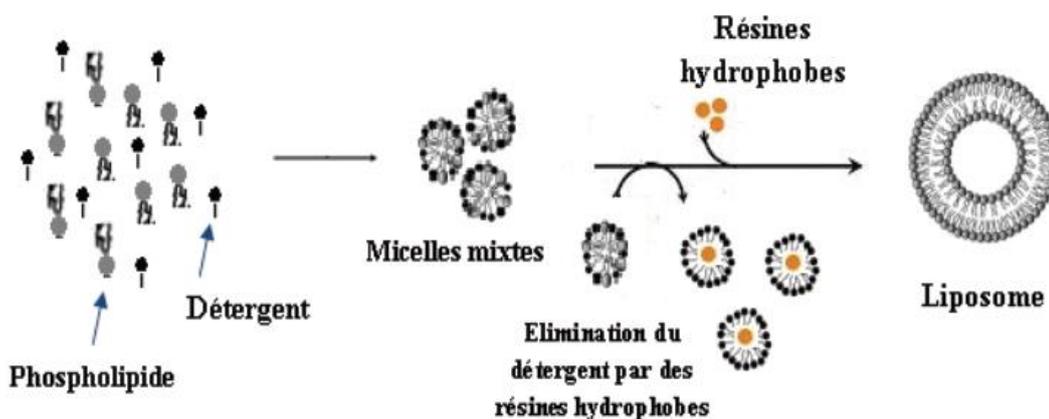


Figure 15. Préparation des liposomes par la méthode d'élimination de détergent. <sup>(25)</sup>

L'encapsulation de PA médicamenteux dans les liposomes sera vu dans le chapitre suivant.

## Chapitre 4 : Encapsulation de principe actif dans les liposomes

L'encapsulation d'un PA dans un liposome dépend sur plusieurs facteurs :

- les propriétés physico-chimiques du PA (taille, charge, hydrophobicité, etc.) ;
- les caractéristiques du liposome (taille, lamellarité, concentration des phospholipides, composition du liposome, etc.).

La localisation du PA dans le liposome dépend de la nature chimique du PA. Les PA lipophiles sont piégés dans la bicouche lipidique et les PA hydrophiles sont localisés dans le compartiment aqueux de liposomes (Figure 16).

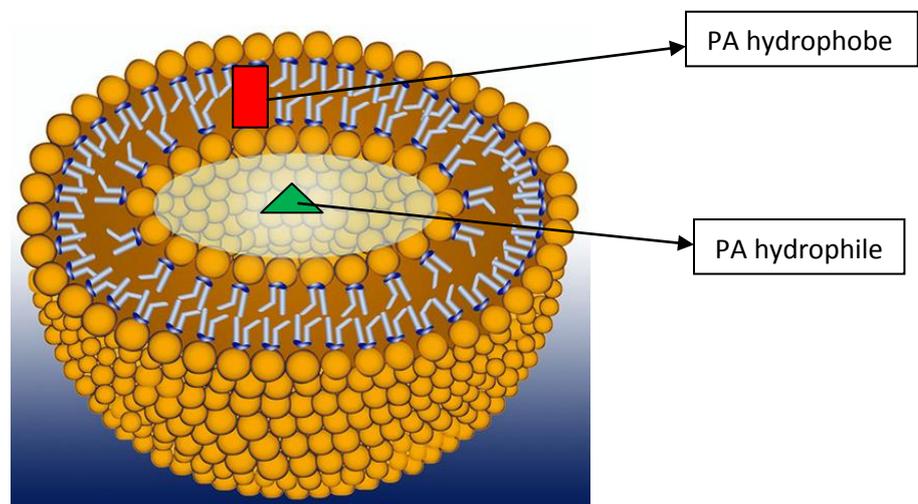


Figure 16. Encapsulation de principe actif dans un liposome. (Image de source est légèrement modifiée pour adaptation).<sup>(26)</sup>

Il y a deux modes d'incorporation de PA dans les liposomes :

- encapsulation passive ;
- encapsulation active.

### 4.1 Encapsulation passive

Lors de la préparation de liposomes, le PA hydrophile est directement dissous dans la phase aqueuse utilisée pour l'hydratation du film phospholipidique.

Le PA lipophile est dissous dans le solvant organique avec les phospholipides. Après l'élimination du solvant organique, les chaînes carbonées de phospholipides serviront comme un environnement solubilisant pour ce PA lipophile et il restera dans la bicouche phospholipidique de liposome.

## 4.2 Encapsulation active

L'encapsulation active consiste à introduire le PA dans des liposomes préformés. Les PA non chargés (neutres) et lipophiles peuvent diffuser facilement à travers la bicouche lipidique.

Il y a plusieurs méthodes d'incorporation active :

- gradient de pH ;
- gradient de potentiel ;
- utilisation de détergent.

### 4.2.1 Gradient de pH

Les PA hydrophiles ayant des fonctions chimiques protonables (par exemple : acides faibles, bases faibles, ...etc.) peuvent être incorporés dans un liposome par le gradient de pH. La forme neutre des acides faibles et des bases faibles peut diffuser à travers la bicouche lipidique mais leur forme ionisée ne peut pas traverser la bicouche lipidique.

- Pour les PA qui sont des acides faibles (AH), un pH inférieur au pKa à l'extérieur du liposome est maintenu et un pH supérieur au pKa à l'intérieur du liposome. Le PA reste neutre à l'extérieur du liposome donc peut traverser la bicouche, mais en arrivant à l'intérieur il est ionisé et reste piégé à l'intérieur du liposome (Figure 17).

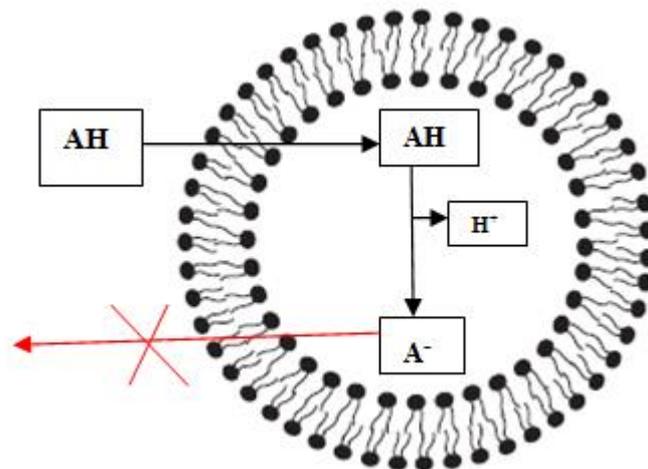


Figure 17. Encapsulation active des acides faibles par un gradient de pH. (Image de source est légèrement modifiée pour adaptation).<sup>(27)</sup>

- Pour les PA qui sont des bases faibles (B), un pH supérieur au pKa est maintenu à l'extérieur du liposome et un pH inférieur au pKa à l'intérieur du liposome. Le PA

reste neutre à l'extérieur du liposome donc peut traverser la bicouche, mais en arrivant à l'intérieur il est ionisé et reste piégé à l'intérieur du liposome (Figure 18).

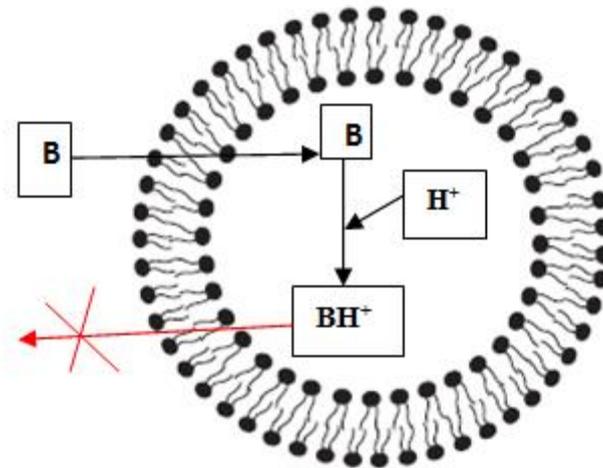


Figure 18. Encapsulation active des bases faibles par un gradient de pH. (Image de source est légèrement modifiée pour adaptation).<sup>(27)</sup>

#### 4.2.2 Gradient de potentiel

Les ions  $K^+$  sont encapsulés dans les liposomes passivement en les incorporant dans la phase aqueuse utilisée pour l'hydratation du film phospholipidique. Un ionophore valinomycine, échangeur sélectif de  $K^+/H^+$ , est intégré dans la membrane du liposome. Les ions  $K^+$  qui restent à l'extérieur du liposome sont éliminés par une dialyse ou une chromatographie d'exclusion. Donc, un gradient de  $K^+$  est créé à travers la membrane du liposome. Les ions  $K^+$  sortent vers l'extérieur du liposome à travers l'ionophore valinomycine. Cet échappement des ions  $K^+$  crée un gradient de potentiel car l'intérieur de liposome devient négatif et une charge positive s'accumule à l'extérieur du liposome. Ce gradient de potentiel déclenche le flux des ions  $H^+$  vers l'intérieur du liposome. Cette accumulation des ions  $H^+$  à l'intérieur du liposome donne lieu à un gradient de pH. Ce gradient de pH est utilisé pour l'encapsulation active des PA.

Le gradient de  $H^+$  peut être créé par le gradient d'autres ions (sulfate d'ammonium, bicarbonate de calcium, acétate de calcium, etc.). Par exemple, la Doxorubicine (DOX), un anti-cancéreux, peut être encapsulée dans un liposome en utilisant un gradient de  $(NH_4)_2SO_4$  (Figure 19). Le  $(NH_4)_2SO_4$  est directement incorporé dans la phase aqueuse utilisée pour l'hydratation du film phospholipidique. Ceci permet d'encapsuler le  $(NH_4)_2SO_4$  à l'intérieur du liposome. Le  $(NH_4)_2SO_4$  non encapsulé dans le liposome est éliminé par une

dialyse ou une chromatographie d'exclusion. Le sel se dissocie dans le compartiment aqueux pour donner  $2\text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{2-}$ . Ensuite, le  $\text{NH}_4^+$  dissocie pour donner  $2\text{H}^+ + 2\text{NH}_3$ . Le  $\text{NH}_3$  diffuse vers l'extérieur du liposome à travers la bicouche lipidique. Les ions  $\text{H}^+$  s'accumulent à l'intérieur du liposome. Ceci crée un gradient de  $\text{H}^+$ , donc un gradient de pH.

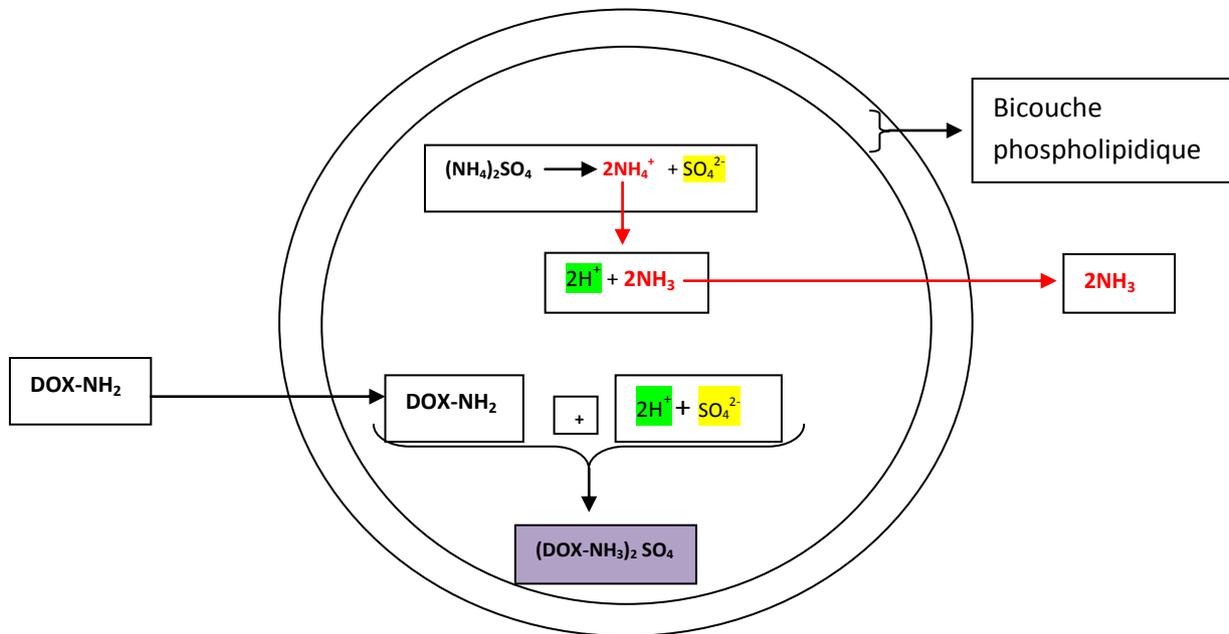


Figure 19. Encapsulation active de Doxorubicine en utilisant un gradient de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .<sup>(27)</sup>

D'autres gradients de cations ont été utilisés dans l'encapsulation active de PA dans les liposomes. Par exemple, un gradient de manganèse peut être créé à travers de la membrane bicouche en incorporant un sel de manganèse directement dans la phase aqueuse utilisée pour l'hydratation de film lipidique. Le PA neutre traverse la membrane de l'extérieur vers l'intérieur du liposome. Une fois à l'intérieur, il forme un complexe avec le cation. Ce complexe [PA-Cation] reste piégé dans le liposome.

Quelle que soit la méthode d'encapsulation utilisée, elle ne doit pas impacter l'efficacité du PA.

#### 4.2.3 Utilisation de détergent

Cette méthode consiste à utiliser les molécules de détergent afin de créer des pores transitoires dans la membrane bicouche du liposome. Des petites molécules peuvent entrer via ces pores transitoires et peuvent être incorporées dans le liposome.

Comme toute préparation à usage pharmaceutique, la préparation liposomiale doit garder ses attributs de qualité dans la spécification préalablement définies. Les différents facteurs qui influencent la stabilité d'une préparation liposomiale et les précautions à prendre seront discutés dans le chapitre suivant.

## **Chapitre 5 : La stabilité des préparations à base des liposomes**

Pour utiliser le liposome comme un vecteur efficace, il faut que la préparation à base des liposomes garde sa stabilité physique, chimique et microbiologique dans le temps et dans les conditions de stockage choisies.

### **5.1 Facteurs influençant la stabilité d'une préparation liposomiale**

#### **5.1.1 La composition qualitative et quantitative de la bicouche phospholipidique**

Une paroi de liposome constituée de cholestérol et phospholipides ayant une  $T_m$  élevée est plus rigide et moins perméable. Les phospholipides possédant des chaînes carbonées saturées diminuent la perméabilité de la bicouche phospholipidique.

La proportion des différents composants de la paroi est aussi un facteur déterminant de la stabilité. Il faut trouver une proportion optimale pour la stabilité physico-chimique de la préparation et pour le profil pharmacocinétique (la biodisponibilité) souhaité.

#### **5.1.2 Le rapport PA/Phospholipide**

La quantité des phospholipides utilisés doit être suffisante pour une encapsulation optimale de la quantité du PA à administrer. Ce rapport est variable selon le PA, la méthode d'encapsulation et les composants du liposome. Ce paramètre est important et permet d'avoir la quantité suffisante des phospholipides pour véhiculer le PA intègre jusqu'au site d'action.

#### **5.1.3 La méthode de préparation**

Les méthodes de la préparation des liposomes et l'encapsulation du PA jouent un rôle dans la stabilité de la préparation liposomiale finale. Pour les PA qui sont des bases faibles, l'encapsulation par le gradient de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  donne des sels de sulfate ayant une meilleure stabilité à l'intérieur des liposomes qu'une encapsulation par un simple gradient de pH. Dans l'utilisation de gradient de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , il y a la protonation et la formation de sel. <sup>(28)</sup>

### **5.2 Les différents types d'instabilité**

Les problèmes d'instabilité qu'une préparation liposomiale peut subir sont :

#### **5.2.1 Instabilité physique : agrégation des liposomes, fuite du contenu, etc.**

## **Agrégation**

C'est une coalescence des liposomes afin de former des vésicules de plus grande taille. Ce phénomène peut être évité en utilisant des phospholipides chargés négativement ou positivement comme composant de la bicouche phospholipidique. La répulsion électrostatique qui en résulte évite la coalescence.

La présence de PEG à la surface des liposomes crée une répulsion stérique qui diminue également le risque d'agrégation.

## **Fuite du contenu**

La fuite du contenu d'un liposome peut être le résultat d'interactions entre les composants de la bicouche et son environnement. L'utilisation de phospholipides de très faible  $T_m$  et l'absence de cholestérol dans la composition de la paroi liposomiale favorise le risque de fuite du contenu à la température du corps humain et avant d'arriver à son site d'action.

### **5.2.2 Instabilité Chimique : réactions d'oxydation, d'hydrolyse, etc.**

#### **Les réactions d'oxydation**

Ce sont des réactions catalytiques dans lesquelles des réactions radicalaires s'enchainent. Ces réactions entraînent le clivage de la chaîne carbonée et/ou formation de peroxydes. Les phospholipides ayant des chaînes carbonées insaturées ou polyinsaturées sont plus susceptibles de subir la réaction d'oxydation. Les chaînes carbonées saturées sont résistantes à l'oxydation à basse température, mais à une température très élevée elles peuvent être oxydées.

L'oxydation est déclenchée par une exposition à l'oxygène, à la lumière ou aux métaux.

Afin d'éviter l'oxydation des phospholipides, les liposomes doivent être stockés à une température basse ( $\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ ), hors contact avec les métaux lourds, à l'abri de la lumière et de l'air. Un antioxydant comme butylhydroxytoluène peut être utilisé afin de protéger les phospholipides contre l'oxydation.

#### **Les réactions d'hydrolyse**

Les liaisons esters d'un phospholipide peuvent subir une réaction d'hydrolyse dans un milieu aqueux. Les esters de carboxyle s'hydrolysent plus rapidement que les esters de phosphate.

Cette hydrolyse donne des acides gras libres. Cette réaction est dépendante du pH et de la température. Elle est très lente à un pH neutre et température basse. Les pH acide et basique favorisent l'hydrolyse.

*In vivo*, le phospholipide est hydrolysé par la phospholipase A2 (PLA2) au niveau de la liaison d'ester carboxylique sur le carbone C-2 du glycérol.

### **5.3 Les conditions de stockage des préparations à base de liposome**

Afin de résoudre les problèmes d'instabilité des préparations liposomiales, les conditions de stockage suivantes sont proposées :

- à basse température ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) ;
- à l'abri de la lumière et de l'air ;
- dans un récipient non métallique ;
- à pH neutre ;
- après lyophilisation : cette technique consiste en plusieurs cycles de congélation-séchage. La congélation transforme l'eau en cristaux de glace. Le séchage par sublimation sous vide poussé élimine les cristaux de glace en les passant directement de l'état solide à l'état gazeux. Mais cette méthode risque d'entraîner l'agrégation/fusion des liposomes et de donner des vésicules de grande taille. Elle peut aussi impacter l'intégrité de la bicouche avec un risque de fuite de PA. Pour éviter ces problèmes, la lyophilisation se fait en présence de cryoprotecteurs. Les cryoprotecteurs le plus souvent utilisés sont des sucres (glucose, lactose, mannitol, tréhalose, etc.) ou des polyalcools (glycérol). Ces cryoprotecteurs interagissent avec les phospholipides du liposome par la liaison hydrogène. Cette liaison hydrogène est créée entre les fonctions hydroxyles des cryoprotecteurs et les phosphates des phospholipides constituant le liposome.

Le but d'avoir une préparation liposomiale stable est de garder l'intégrité du liposome et son contenu dès son administration jusqu'à son site d'action. La pharmacocinétique d'une préparation liposomiale va faire l'objet du chapitre suivant.

## **Chapitre 6 : La pharmacocinétique du principe actif vectorisé par un liposome**

La pharmacocinétique d'une préparation liposomiale administrée par la voie intra-veineuse (IV) est la plus étudiée par plusieurs travaux scientifiques. La pharmacocinétique d'une préparation liposomiale est largement influencée par les propriétés du liposome dans le milieu biologique : *stabilité dans le milieu plasmatique, franchissement des barrières vasculaires et interaction avec les cellules cibles*. Donc la composition et la taille du liposome dictent le devenir du PA encapsulé dans le liposome. Le PA ne peut pas agir avant libération de son vecteur liposome. Une fois libéré, le PA va suivre un chemin dicté par son propre comportement physico-chimique.

Les liposomes sont composés d'une bicouche phospholipidique comme les cellules de l'organisme. Après une administration de préparation liposomiale par la voie iv, les liposomes conventionnels sont opsonisés et le système des phagocytes mononucléés (SPM) va reconnaître les liposomes comme *non-soi*. La conséquence est la phagocytose de liposomes par les cellules de SPM. Donc les liposomes conventionnels sont détruits et leur temps de circulation est réduit à quelques minutes. C'est pourquoi les liposomes conventionnels ont de la difficulté à aller au-delà des cellules du SPM. Donc dans la formulation d'une préparation liposomiale, le premier défi est d'avoir des liposomes qui échappent aux attaques des cellules du SPM. D'où l'importance des liposomes furtifs capables de contourner le SPM.

### **6.1 Interaction du liposome avec les éléments plasmatiques (protéines plasmatiques, cellules sanguines, lipoprotéines plasmatiques, etc.)**

Dès l'injection IV des liposomes conventionnels dans l'organisme, ces derniers vont être entourés à leur surface par des protéines plasmatiques (protéine C-réactive, fibronectine, facteur du compliment 3b, IgG, etc.). Ce processus dans lequel un corps étranger est entouré par les protéines plasmatiques s'appelle opsonisation. Les macrophages possèdent des récepteurs pour ces protéines, ceci leur permet de phagocyter les liposomes opsonisés (Figure 20).

## La phagocytose

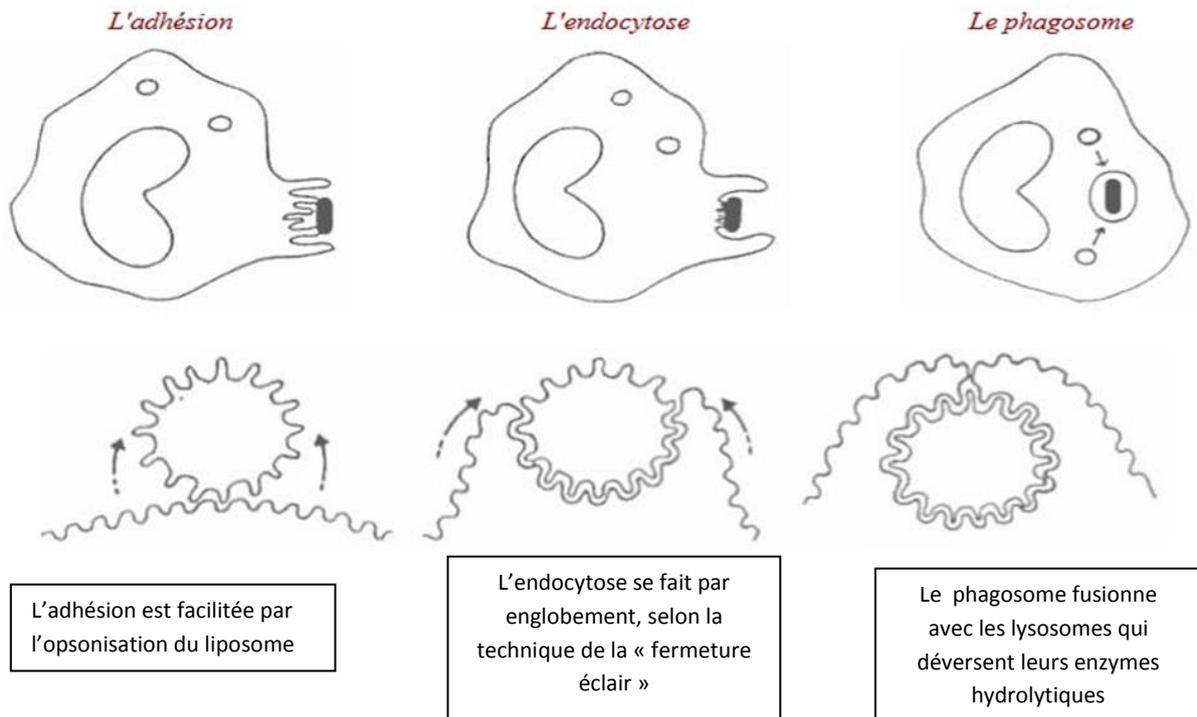


Figure 20. La phagocytose des liposomes opsonisés. <sup>(29)</sup>

L'interaction des liposomes conventionnels avec les lipoprotéines plasmatiques déstabilise et désorganise les liposomes. Cette déstabilisation est le résultat de transfert des phospholipides de la bicouche lipidique du liposome vers les lipoprotéines de haute densité (HDL – High Density Lipoprotein). Ceci entraîne la fuite rapide du PA.

Les cellules sanguines (érythrocytes, plaquettes, etc.) interagissent également avec les liposomes conventionnels par fusion ou échange de phospholipides de la bicouche lipidique. Cette interaction entraîne la fuite précoce du contenu du liposome.

Les différentes interactions que subit le liposome conventionnel dans le compartiment sanguin justifient la nécessité de développer des liposomes furtifs. Les liposomes furtifs gardent leur intégrité dans le compartiment sanguin donc ils peuvent aller jusqu'à une cible extravasculaire.

Afin d'augmenter la durée de vie plasmatique de liposomes et délivrer le PA encapsulé à son organe cible, plusieurs propositions ont été faites :

- **Augmentation de la dose** : en augmentant la dose liposome-PA administrée afin de dépasser la capacité de phagocytose des macrophages du système SPM, il est possible d'augmenter la probabilité d'atteindre des cibles extravasculaires. Toutefois, il faut prendre en considération le profil toxicologique et les effets indésirables qui peuvent en découler.<sup>(30)</sup>
- **Utilisation des liposomes vecteurs de petite taille** : en utilisant des liposomes vecteurs de petite taille (SUV), le risque d'opsonisation par les protéines sériques est largement diminué. Donc ces liposomes ne seront pas reconnus et détruits par les macrophages du SPM.<sup>(31)</sup>
- **Composition des liposomes vecteurs** : l'incorporation de cholestérol et des phospholipides ayant une T<sub>m</sub> élevée dans la formulation des liposomes permet d'augmenter la durée de vie.<sup>(32)</sup>
- **Charge et hydrophilie à la surface des liposomes** : les liposomes ayant une charge négative à leur surface sont rapidement opsonisés et éliminés. Par contre, les liposomes ayant une charge neutre ou positive ont une durée de vie plus longue. Les liposomes dont la surface est hydrophile (par exemple : liposomes pégylés) ont également une durée de vie beaucoup plus longue.<sup>(33)</sup>

## 6.2 La sortie du liposome furtif des vaisseaux sanguins vers les tissus

Pour que le PA puisse agir sur les tissus cibles extravasculaires, les liposomes doivent quitter la cavité vasculaire. Les artères et veines sont constituées des barrières infranchissables dans la situation physiologique normale. L'échange avec le tissu est envisageable seulement au niveau des capillaires dont la paroi est formée d'une monocouche cellulaire. Le passage des liposomes de la cavité vasculaire vers les tissus cibles dépend de la structure histologique de l'endothélium capillaire et de la taille des liposomes. Nous avons 3 types de capillaires selon leur structure histologique d'endothélium : endothélium continu, endothélium fenêtré et endothélium discontinu (Figure 21).

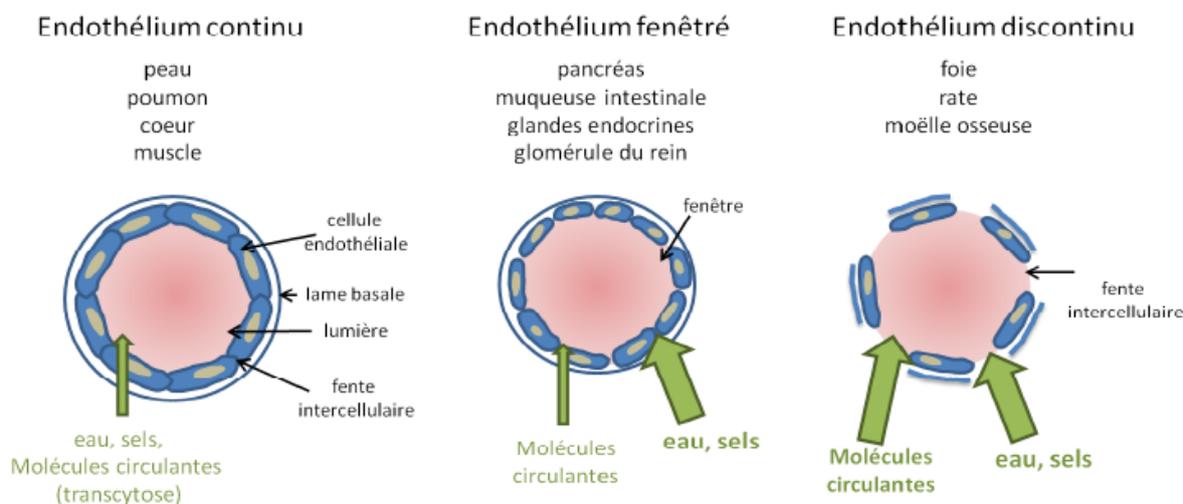


Figure 21. Les 3 types d'endothélium : continu, fenêtré et discontinu. <sup>(34)</sup>

La sortie de la cavité vasculaire des liposomes est possible seulement si le diamètre de pore d'endothélium vasculaire est supérieur à la taille des liposomes. Les liposomes utilisés comme vecteurs médicamenteux sont des SUV ayant un diamètre de 20 à 100 nm. Dans la situation physiologique normale, seul l'endothélium discontinu permet l'extravasation des liposomes. C'est pourquoi les liposomes s'accumulent dans les organes de SPM (foie, rate, moelle osseuse) dotés d'endothélium capillaire discontinu. Les organes hors SPM ne peuvent pas capturer les liposomes à cause de la continuité de leur endothélium capillaire.

En situation pathologique (inflammation, tumeur, etc.), la perméabilité capillaire dans l'organe atteint est augmentée par l'effet EPR. Par conséquent, les liposomes furtifs sont alors extravasés pour atteindre les cellules cibles.

### 6.3 Interaction de liposome avec les cellules cibles et libération du PA

Un PA encapsulé dans le liposome n'est pas biodisponible pour agir, c'est seulement après sa libération du liposome qu'il devient disponible. Cette libération doit être réalisée au sein de tissu cible. La cinétique de libération du PA de son vecteur liposome est un paramètre décisif car il détermine la concentration du PA à son site d'action. En fonction de la fenêtre thérapeutique de chaque PA, cette concentration peut être toxique ou non.

Les liposomes interagissent avec les cellules cibles selon différents mécanismes repris dans la figure 22.

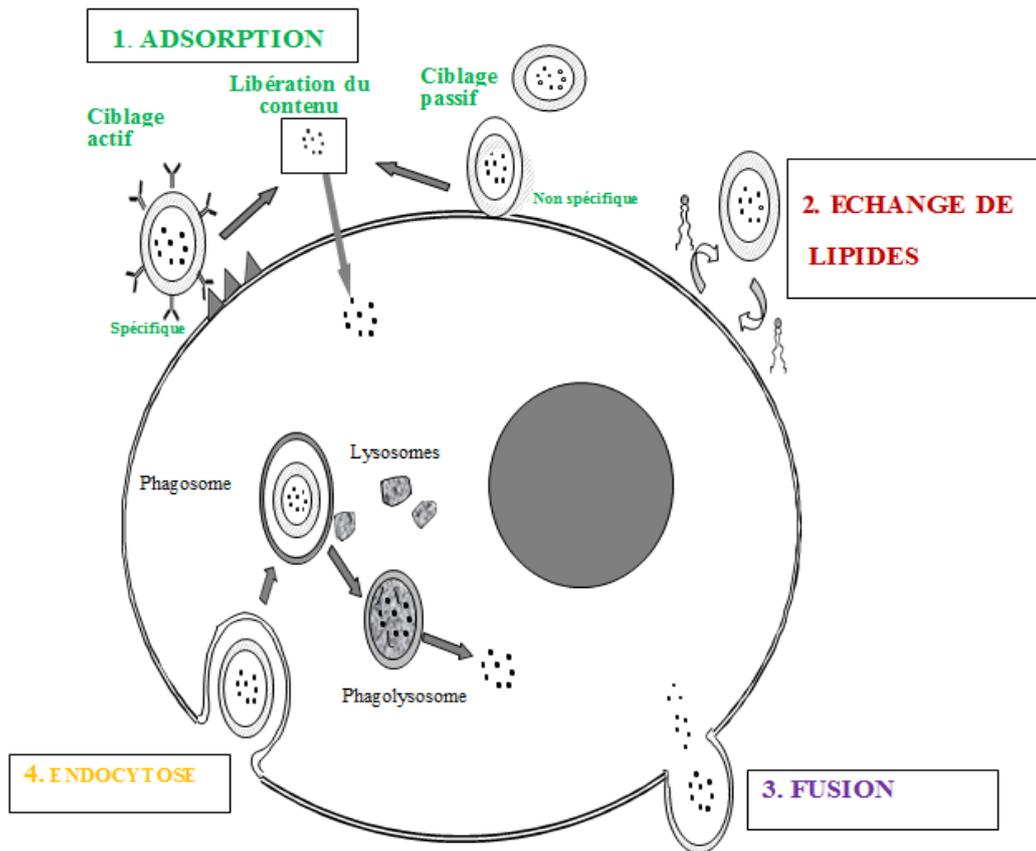


Figure 22. Les différents types d'interactions liposome–cellule cible. <sup>(35)</sup>

#### 6.4 Élimination de constituants du liposome (phospholipides, cholestérol, etc.)

Après la libération de PA, les constituants du liposome et le PA suivent leurs propres voies de transformation et élimination indépendantes les unes des autres.

Dans le chapitre suivant, les immunoliposomes seront traités avec une attention particulière due à leur capacité de ciblage de tissu malade.

## Chapitre 7 : Immunoliposomes

Ce chapitre dédié à des immunoliposomes est le résultat de leurs perspectives très prometteuses comme vecteurs dans le domaine de thérapeutique. Nous allons voir de plus près les différentes techniques de modification de la surface liposomiale afin de former des immunoliposomes.

Les immunoliposomes font partie des liposomes de 3<sup>ème</sup> génération. Ils portent, à leur surface, un anticorps qui permet de cibler un organe malade.

Les liposomes conventionnels portant un anticorps à leur surface sont peu utiles car ils sont rapidement phagocytés et éliminés par le SPM. Par contre, le fait d'ajouter des anticorps à la surface des liposomes furtifs facilite le ciblage de site d'action.

Les anticorps peuvent être liés soit directement à la surface des liposomes furtifs soit à l'extrémité de PEG (Figure 23).

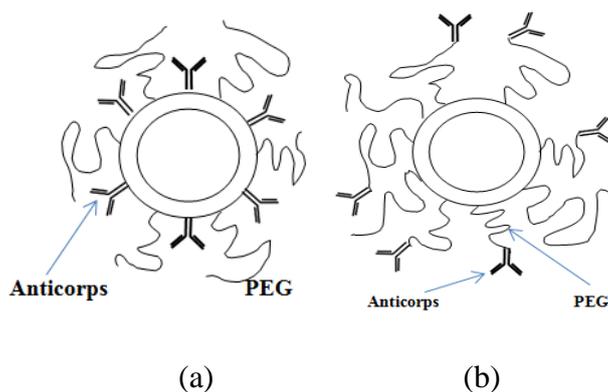


Figure 23. Différents types d'immunoliposomes. <sup>(36)</sup>

(a) anticorps directement lié à la surface de liposomes furtifs.

(b) anticorps lié à l'extrémité de PEG de liposome furtifs.

Pour les liposomes furtifs, des PEG de petite longueur (par exemple : PEG 2000) n'ont pas d'impact sur l'efficacité d'anticorps. Par contre, les PEG ayant une longueur élevée (par exemple : PEG 5000) empêchent la fixation d'anticorps à la surface liposomiale et la reconnaissance d'antigène par l'anticorps. C'est pour cette raison que les anticorps sont liés au bout de ces PEG à longues chaînes au lieu de surface liposomiale.

## 7.1 Anticorps directement fixé à la surface des liposomes par une liaison covalente

L'anticorps est directement lié à la surface de liposome vecteur par une liaison covalente. Cette liaison covalente entre l'anticorps et les lipides peut se former avant ou après la préparation des liposomes. Le ciblage se fait par une reconnaissance et liaison entre l'anticorps et l'antigène à la surface de cellule cible.

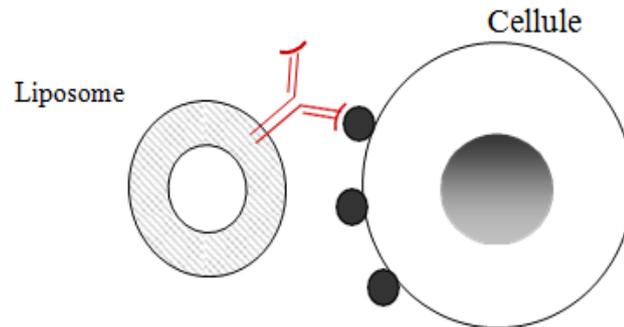


Figure 24. Anticorps fixé à la surface liposomiale par une liaison covalente. <sup>(18)</sup>

Afin de réaliser cette liaison covalente, le phospholipide constituant le liposome est rendu réactif envers une fonction présente naturellement ou introduite sur l'anticorps.

La méthode la plus souvent employée consiste à introduire une fonction  $-SH$  (thiol) sur l'anticorps et rendre le phospholipide constituant le liposome, avant la préparation de liposome, réactif envers  $-SH$ . Ainsi, une liaison covalente se forme entre le liposome et l'anticorps.

La phosphatidyléthanolamine (PE) est le phospholipide le plus souvent utilisé pour rendre le liposome réactif envers la fonction  $-SH$  du fragment Fab de l'anticorps. Le groupe chimique qui est réactif envers  $-SH$  est lié à la PE avant la formation du liposome et ce groupe va se localiser à la surface de liposome.

La PE peut être rendue réactive envers les fonctions  $-SH$  sur l'anticorps en utilisant des réactifs chimiques suivants <sup>(37)</sup>:

- SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate) ;
- SMPB (Succinimidyl 4-(p-maléiminido phényl) butyrate).

### 7.1.1 Utilisation du SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate)

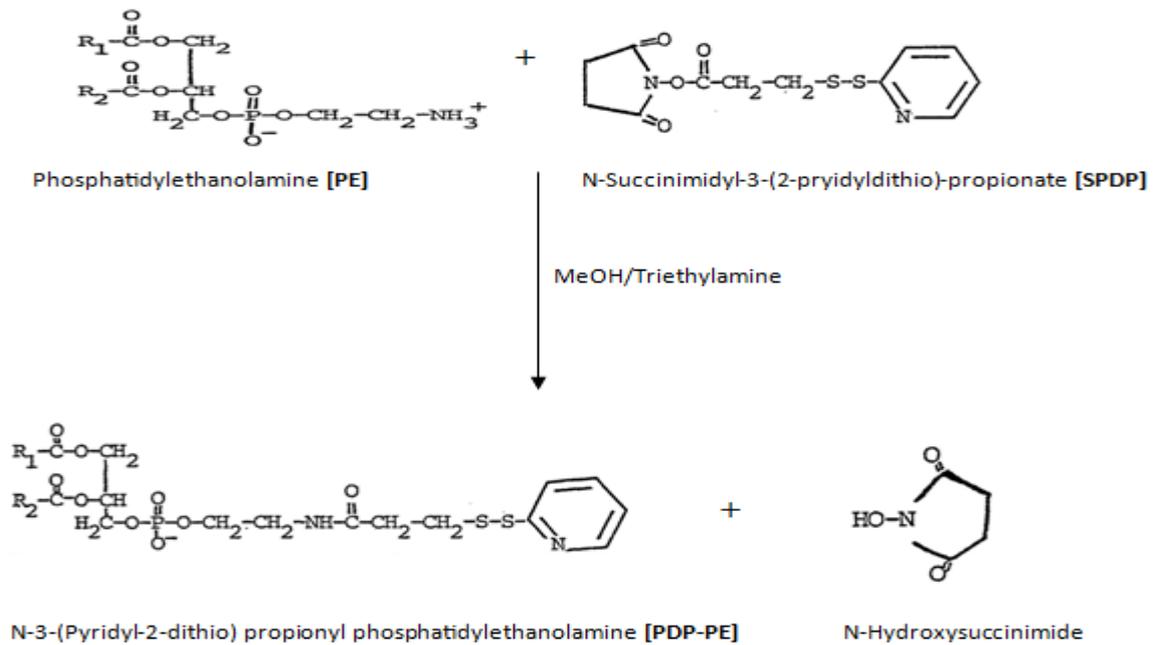


Figure 25. La réaction chimique pour rendre la PE réactive envers la fonction  $-SH$  de l'anticorps en utilisant le SPDP. <sup>(37)</sup>

Le PDP fixé à la PE va ensuite se localiser à la surface du liposome.

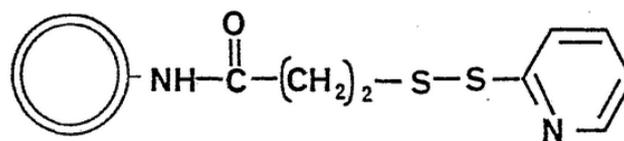


Figure 26. Liposome-PDP. <sup>(37)</sup>

A partir d'un anticorps (IgG), 2 fragments Fab' ayant une fonction thiol ( $-SH$ ) sont générés. La fonction thiol ( $-SH$ ) d'un fragment Fab' va réagir avec le PDP à la surface liposomiale afin de former une liaison covalente entre le fragment d'anticorps et le liposome (Figure 27).

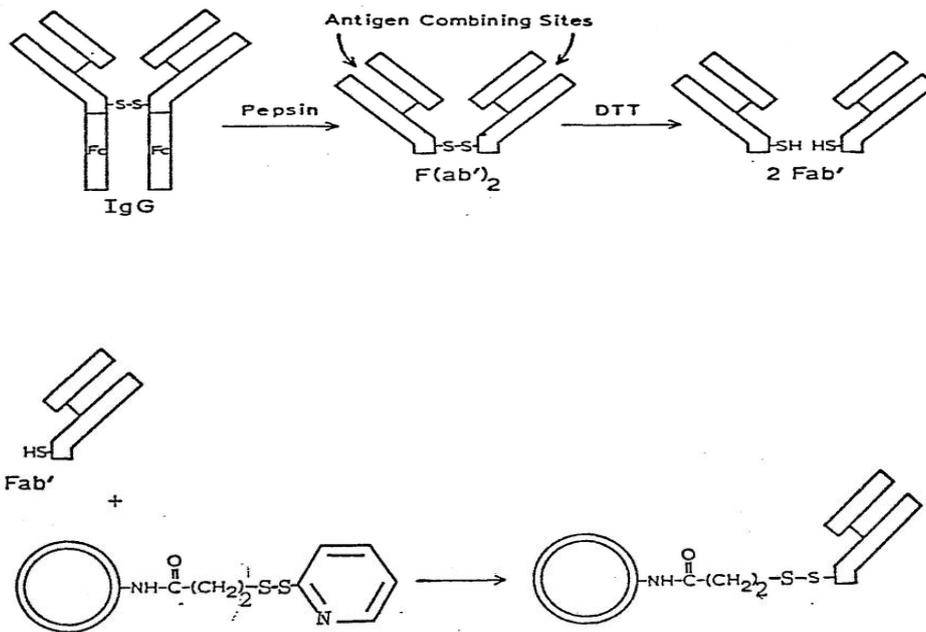


Figure 27. La formation d'un immunoliposome. <sup>(37)</sup>

### 7.1.2 Utilisation du SMPB (Succinimidyl 4-(p-maléiminido phényl) butyrate)

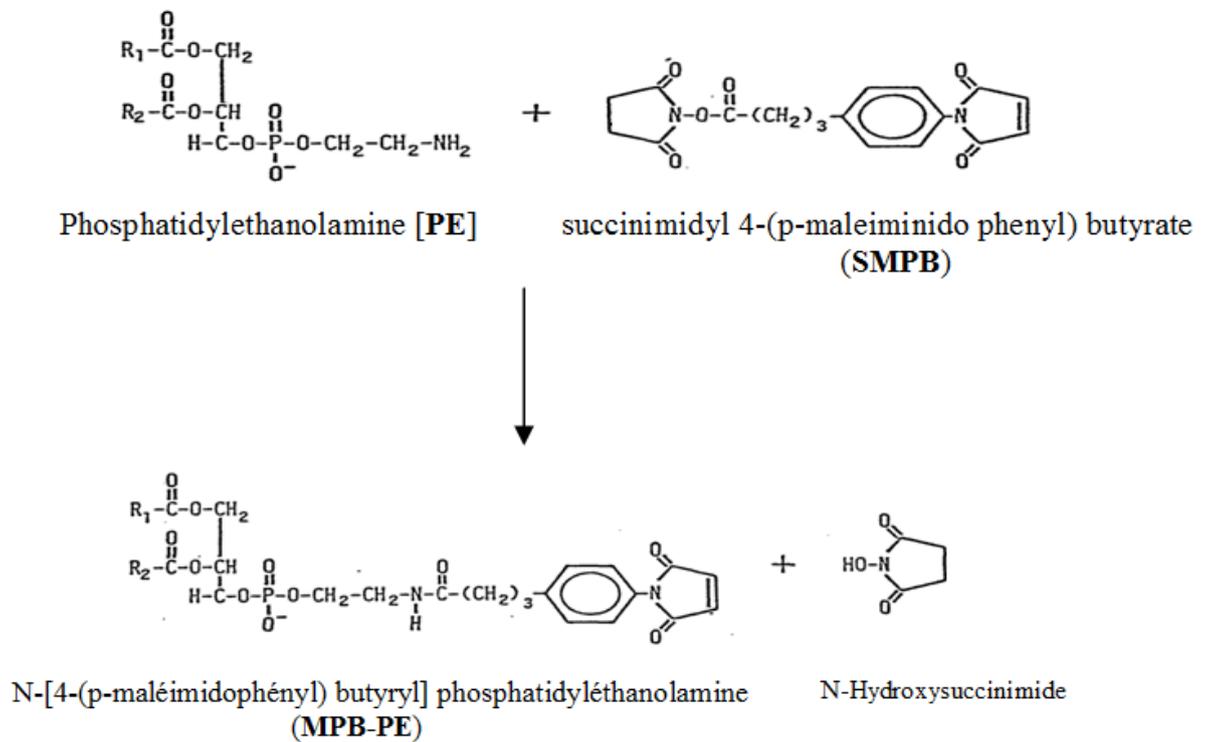


Figure 28. La réaction chimique pour rendre la PE réactive envers la fonction -SH de l'anticorps en utilisant le SMPB. <sup>(37)</sup>

Le MPB fixé à PE va se localiser à la surface de liposome.

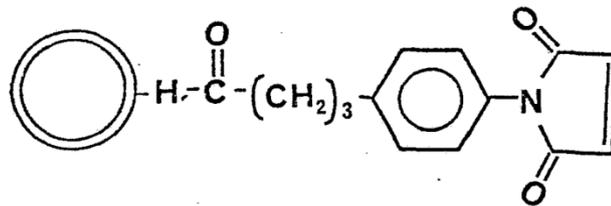


Figure 29. Liposome – MPB. <sup>(37)</sup>

La fonction thiol (-SH) d'un fragment Fab' va réagir avec le MPB à la surface liposomiale afin de former une liaison covalente entre le fragment d'anticorps et le liposome.

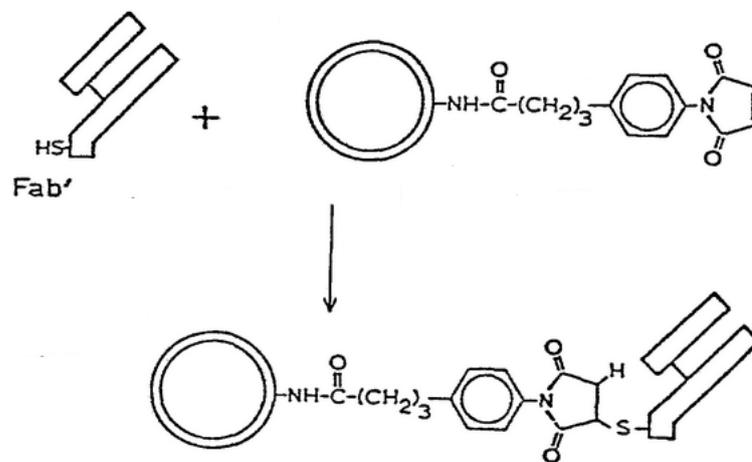


Figure 30. La formation d'immunoliposome. <sup>(37)</sup>

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont développées afin de créer une liaison covalente entre l'anticorps et le liposome. Donc les méthodes évoquées ci-dessus ne sont pas exhaustives.

## 7.2 Anticorps formant un complexe non-covalent stable avec le liposome

L'anticorps peut former un complexe non-covalent stable avec une petite protéine (protéine A, avidine, streptavidine) liée à la surface des liposomes par une liaison covalente. Ces protéines interagissent avec l'anticorps sans impacter son interaction avec l'antigène à la surface de la cellule cible (Figure 31).

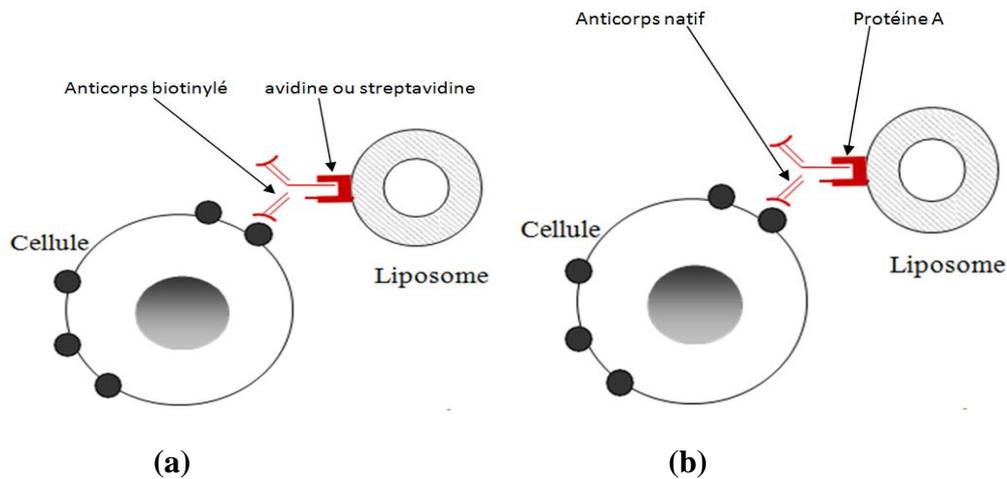


Figure 31. Anticorps fixé à la surface liposomiale par formation d'un complexe stable. <sup>(18)</sup>

(a) Complexe Biotine-Avidine ou Biotine-Streptavidine. (b) Complexe protéine A – Anticorps.

### 7.2.1 Complexe Protéine A –Anticorps

La protéine A a la capacité de se lier avec une bonne affinité à des fragments Fc des immunoglobulines sans impacter l'interaction Anticorps-Antigènes. En fixant la protéine A par une liaison covalente à la surface des liposomes, nous obtiendrons des liposomes universels capables de former des complexes stables avec le fragment Fc des anticorps.

D'abord une fonction thiol (-SH) est introduite sur la protéine A en utilisant le SPDP.

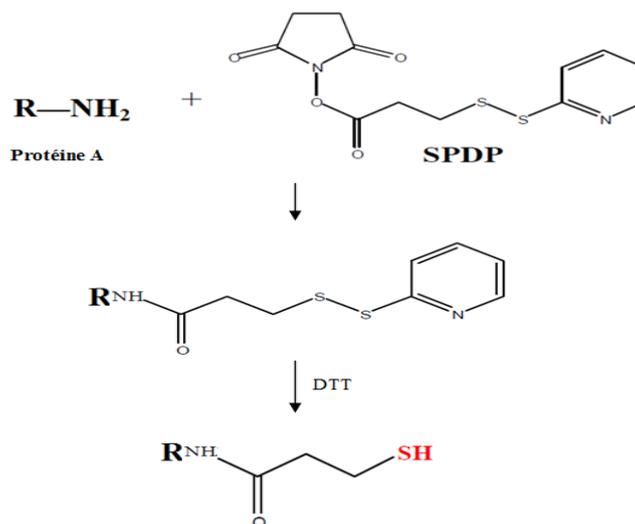


Figure 32. Introduction d'une fonction thiol (-SH) sur la protéine A. <sup>(18)</sup>

Ensuite, la protéine A ayant une fonction -SH (thiol) greffée va réagir avec un liposome portant PDP à sa surface (Voir 7.1.1). Cette réaction va créer une liaison covalente entre le

liposome et la protéine A. L'anticorps forme un complexe par son fragment Fc avec la protéine A pour donner un immunoliposome.

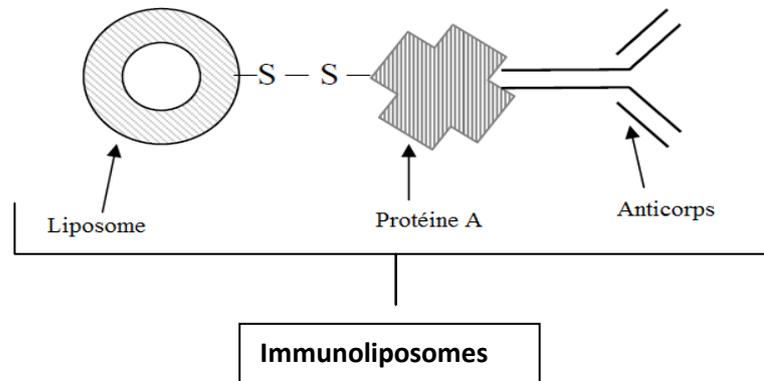


Figure 33. Structure d'immunoliposome formé en utilisant le ligand protéine A. <sup>(18)</sup>

### 7.2.2 Complexe Avidine-Biotine / Streptavidine-Biotine

Avidine et streptavidine sont des petites protéines qui ont une très forte affinité pour la biotine (vitamine B8). La (strept)-avidine et la biotine forment un complexe fort et non-covalent. Cette propriété peut être utilisée afin de fixer l'anticorps (**Ac**) à la surface liposomiale. Plusieurs combinaisons sont possibles :

- (a) **Ac – biotine + (strept) avidine + biotine – liposome** : Ici le risque est l'agrégation entre liposomes sous forme de Liposome –biotine + (strept) avidine + biotine –Liposome.



- (b) **Ac – biotine + (strept) avidine – liposome**

- (c) **Ac -(strept) avidine + biotine-liposome**

## 7.3 Anticorps bi-spécifique

L'anticorps peut avoir une bi-spécificité. Donc il peut interagir avec une petite molécule (haptène) à la surface des liposomes et un antigène à la surface de cellule cible.

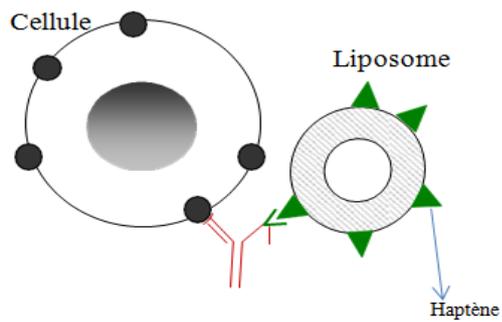


Figure 32. Anticorps bi-spécifique.<sup>(18)</sup>

Dans le chapitre 8, nous allons voir les préparations liposomiales commercialisées et en cours de développement.

## **Chapitre 8 : Produits pharmaceutiques à base des liposomes**

Des nombreux médicaments à base des liposomes ont fait leur preuve en thérapeutique. La majorité de ces principes actifs ont été déjà commercialisés sans être vectorisés par liposomes. La vectorisation liposomiale leur a permis de mieux cibler les tissus malades, de diminuer la toxicité, d'atteindre l'effet souhaité à faible dose, d'augmenter la demi-vie et d'augmenter la solubilité des principes actifs peu solubles. C'est la raison pour laquelle les formulations liposomiales sont intéressantes en oncologie, infectiologie, immunologie (vaccin), thérapie génique et radiologie. La liste des spécialités à base de liposomes commercialisées ou en essais cliniques est reprise dans le tableau 5.

En infectiologie, les liposomes conventionnels véhiculent des agents anti-infectieux aux macrophages infectés. Les macrophages phagocytent le liposome conventionnel puis l'agent anti-infectieux encapsulé dans ces liposomes va être libéré à l'intérieur de ces macrophages. Par exemple, la formulation liposomiale d'amphotéricine B (Ambiosome<sup>®</sup>) a démontré son efficacité clinique et une néphrotoxicité moindre que la formulation non-liposomiale.

Dans le cas de vaccins, des agents immunogènes peuvent être véhiculés par liposomes. En plus de leur rôle de véhicule, les liposomes ont un effet d'adjuvant et peuvent porter une haptène afin de favoriser la réponse immunitaire.

En oncologie et imagerie scintigraphique, les liposomes furtifs sont utilisés à cause de leur capacité d'extravaser et atteindre la tumeur. Les formulations liposomiales de doxorubicine et daunorubicine ont été commercialisées avec succès. Une dose élevée de ces agents anticancéreux a été administrée avec moins d'effets indésirables. La molécule seule a un effet cardiotoxique plus élevé que la formulation liposomiale. La préparation liposomiale de ces molécules a une durée plasmatique plus longue et ceci a permis d'avoir une concentration élevée de PA au site de tumeur par ciblage passif (effet EPR).

Tableau 5. La liste de produits pharmaceutiques à base de liposome. <sup>(38)</sup>

Médicament vectorisé en utilisant le liposome	Maladies	Statut
Vaccin anti Hépatite A (Epaxal <sup>®</sup> )	Hépatite A	AMM (en Suisse), 1994
Doxorubicine (Doxil <sup>®</sup> , Myocet <sup>®</sup> )	Leucémie, cancer (seins, os, poumons, cerveau), sarcome de Kaposi	AMM (commercialisé) par FDA en 1995
Daunorubicine (Daunoxome <sup>®</sup> )	Leucémie, Tumeur solides	AMM (commercialisé) par FDA en 1996
Amphotéricine B (Ambisome <sup>®</sup> , Abeket <sup>®</sup> , Amphocil <sup>®</sup> )	Infection fongique	AMM (commercialisé) par FDA en 1997
Verteporfine	Dégénération maculaire	AMM (commercialisé) par FDA en 2000
Sulfate de morphine	Douleur	AMM (commercialisé) par FDA en 2004
Doxorubicine et Bortezomib	Myélome multiple	AMM (commercialisé) par FDA en 2007
Cytarabine (DepoCyte <sup>®</sup> )	Méningite lymphomateuse	AMM (commercialisé) par FDA en 1999
Vincristine (Marqibo <sup>®</sup> )	Lymphome Non-Hodgkinien	AMM (commercialisé) par FDA en 2012
Amikacine (Mikasome <sup>®</sup> )	Infection pulmonaire	Phase III
Doxorubicine (liposome thermosensible)	Cancer du foie	Phase III
Doxorubicine (liposome thermosensible)	Cancer de seins	Phase I
Paclitaxel	Cancer (seins, pancréas)	Phase II
Mitoxantrone	Leucémie, cancer de prostate	Phase I
Tretinoïn	Leucémie, cancer de prostate	Phase II
Irinotecan	Cancer colorectale	Phase II
Annamycine	leucémie	Phase II
Lurtotecan	Cancer (Ovaire, tête, cou)	Phase II
Vinorelbine	Tumeur Solide	Phase I
Topotecan	Tumeur Solide	Phase II
Nystatine (Nyotran <sup>®</sup> )	Infection fongique	Phase III
Camptothecin	Cancer de l'ovaire	Phase I

Des médicaments vectorisés par les liposomes furtifs ont obtenu l'AMM et sont actuellement commercialisés. Par contre, à ce jour, aucun médicament vectorisé par immunoliposome n'a obtenu d'AMM. Plusieurs produits sont toutefois dans le pipeline (Tableau 6).

Tableau 6. Pipeline de produits pharmaceutiques à base des immunoliposomes. (39)

Product	Drug	Target	Ab fragment	Formulation	Condition	Status
MCC-465	DXR	GAH	F(ab') <sub>2</sub>	GAH F(ab') <sub>2</sub> -Mal-DPPC	Gastric and colorectal cancer	Phase I
anti-EGFR-ILs-dox	DXR	EGFR	Fab'	C225 Fab'- Mal-PEG-DSPE	Solid tumor	Phase I
MM-302	DXR	HER2	scFv	F5cys-MP-PEG-DSPE	Breast cancer	Arrêt d'étude en décembre 2016 Phase II/III
SGT-53	P53 DNAp	TfR	scFv	TfRscFv- DOTAP:MPB-DOPE-HoKC	Solid tumors, pancreatic cancer and glioblastoma	Phase I/II
SGT-94	RB94 DNAp	TfR	scFV	TfRscFv-DOTAP:MPB-DOPE-HoKC	Solid tumors	Phase I

Abbreviations: DXR (doxorubicin), DNAp (DNA plasmid), GAH (goat anti-human), EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2 (human EGFR 2), TfR (transferrin receptor), C225 (anti-EGFR antibody), F5cys (anti-HER2 scFv), maleimidated dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine (Mal-DPPC), Mal-PEG-polyethylene-glycol-distearoylphosphatidylethanolamine (Mal-PEG-DSPE), MP-PEG-DSPE (maleimidopropylamide-PEG-DSPE), DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium propane), MPB-DOPE (N-maleimido-phenylbutyrate-dioleoylphosphatidylethanolamine), HoKC (histidylated oligolysine peptide).

Un essai clinique (phase 2) est en cours pour le traitement du cancer du sein TNBC (triple negative breast cancer) par des immunoliposomes encapsulant la doxorubicine et portant à leur surface liposomiale un anticorps anti-EGFR (epidermal growth factor receptor). Le cancer du sein TNBC constitue environ 20% des cancers du sein. Ce cancer n'exprime pas les 3 récepteurs utilisés pour classifier le cancer du sein : ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor) et HER2(human epidermal growth factor receptor). Par contre, le cancer du sein TNBC exprime l'EGFR. L'anticorps anti-EGFR permet ainsi de cibler les cellules cancéreuses. (40) (41)

Du fait de leur nature lipidique et leur capacité d'encapsulation de biomolécules, les liposomes sont aussi utilisés dans le transfert de fragment d'ADN. Le liposome qui a encapsulé un fragment d'ADN s'appelle lipoplexe.

L'utilisation des liposomes cationiques dans la thérapie génique par lipofection a fait l'objet de plusieurs études. Ces études in vitro ont montré le potentiel de liposomes cationique comme vecteurs non-viraux des fragments d'ADN. Contrairement à des vecteurs viraux, les liposomes n'ont pas d'effet inflammatoire ni immunogènes.

L'ADN est une molécule anionique, hydrophile et de masse moléculaire très élevée. Par conséquent, son passage à travers la membrane plasmique chargée négativement n'est pas favorisé. C'est la raison pour laquelle des vecteurs comme les liposomes cationique sont employés afin de faciliter le transfert d'ADN à l'intérieur de la cellule. Les charges négatives d'ADN forment un complexe avec les charges positives des liposomes cationiques. Le lipoplexe qui en résulte a une nette charge positive.

Quelle que soit la méthode de la vectorisation utilisée, il y a 3 étapes obligatoires pour ces lipoplexes (Figure 33) :

- s'associer avec la cellule de manière spécifique ou non ;
- pénétrer dans le cytoplasme de la cellule, soit par fusion directe avec la membrane plasmique, soit après rupture de vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes) ;
- permettre l'entrée de l'ADN dans le noyau de la cellule.

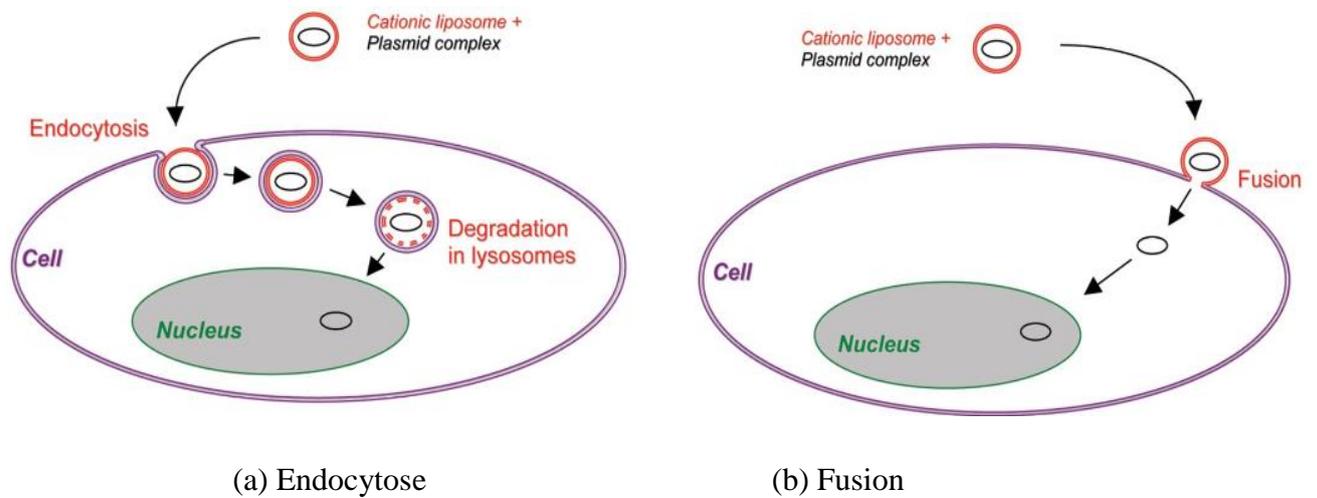


Figure 33. Mécanismes de lipofection. <sup>(42)</sup>

Des produits de transfection à base de lipoplexe ont fait l'objet d'essais cliniques et des résultats prometteurs ont été obtenus dans le domaine de l'oncologie et pour des maladies infectieuses et métaboliques et génétiques. (Tableau 7)

Tableau 7. Liste de produits à base de lipoplexes en essai clinique pour une thérapie génique.<sup>(43)</sup>

Produits	Utilisation thérapeutique
Leuvectin <sup>®</sup>	Le gène d'IL-2 (interleukine 2) vectorisé par des liposomes cationiques est injecté directement dans la tumeur. Ceci augmente la sécrétion locale d'IL-2 qui va renforcer le système immunitaire afin de détruire les cellules cancéreuses.
Allovectin-7 <sup>®</sup>	Le gène de l'antigène HLA-B7 vectorisé par des liposomes cationiques est injecté directement dans la tumeur. Les cellules cancéreuses vont exprimer l'antigène HLA-B7 à leur surface. Ceci permet au système immunitaire de détecter et détruire ces cellules cancéreuses.

Des essais cliniques par des produits à base de lipoplexes chargés de gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) sont en cours pour une application locale dans la voie respiratoire afin de soigner la Mucoviscidose.<sup>(44)</sup>

## Conclusion

La recherche d'un demi-siècle sur le liposome a permis de mieux le comprendre et l'utiliser dans l'intérêt de la santé humaine. Mais le nombre de produits à base de liposomes ayant obtenu l'AMM est très faible comparé au nombre d'années de recherche sur ces derniers. Ceux qui ont obtenu l'AMM étaient déjà commercialisés sous forme d'une autre formulation non-liposomiale et l'obtention d'AMM pour la formulation liposomiale est la conséquence des très nombreux avantages.

L'évolution rapide dans le domaine de la biotechnologie va donner un coup d'accélérateur au R&D des liposomes, surtout aux immunoliposomes. La vectorisation efficace pourra un jour révolutionner l'arsenal thérapeutique en donnant aux principes actifs existants des champs d'application élargis, une efficacité plus élevée et moins d'effets indésirables.

# Bibliographie

1. **A.D. Bangham, R.W. Horne.** Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. [éd.] Elsevier Ltd. 5, Volume 8, Issue 5, 1964, Pages 660–668, : s.n., 1964, Journal of Molecular Biology, Vol. 8. IN2–IN10.
2. **Edward A. Dennis, et al.** Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. S9-S14, CA : American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., April 2009, The Journal of Lipid Research, Vol. 50 (supl). Online ISSN 1539-7262.
3. [En ligne] [Citation : 26 Janvier 2017.]  
<http://www.zipworld.com.au/~ataraxy/CellBiology/chapter2/membrane.html>.
4. **Anthony D'Onofrio, PhD.** [En ligne] [Citation : 26 Janvier 2017.]  
<http://www.alyvea.com/micro/lipids.php>.
5. **Israelachvili, Jacob N.** Physical principles and modes of interaction of membrane lipids and amphiphiles. Canberra : s.n., 1981.
6. **Thomas, Arne.** [En ligne] [Citation : 26 Janvier 2017.]  
<http://www.mpikg.mpg.de/886719/MicelleFormation.pdf>.
7. **Kumar, V. V.** Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. 2, Austin, MN : s.n., Janvier 1991, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , Vol. 88, pp. 444–448.
8. [En ligne] [Citation : 4 Février 2017.] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cholest%C3%A9rol>.
9. **Marsh, Derek.** Thermodynamics of Phospholipid Self-Assembly. Mars 2012, Biophysical Journal, Vol. 102, pp. 1079-1087.
10. **Blaber, Dr. Michael.** [En ligne] [Citation : 29 Janvier 2017.]  
<http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture14/Lecture14.htm>.
11. **D.D.Lasic.** Letter to the editor: on the thermodynamic stability of liposomes. 1 Novembre 1990, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 140.
12. **Leng, J., Egelhaaf, S. U., & Cates, M. E.** Kinetics of the Micelle-to-Vesicle Transition: Aqueous Lecithin-Bile Salt Mixtures. 3, 2003, Biophysical Journal, Vol. 85, pp. 1624–1646.
13. **Guida, Vincenzo.** Thermodynamics and kinetics of vesicles formation process. [éd.] elsevier. 15 Janvier 2010, Advances in Colloid and Interface Scienc, Vol. 161, pp. 77-88.
14. **A. A. Barba, S. Bochicchio, G. Lamberti, A. Dalmoro.** Ultrasonic energy in liposome production: Process modelling and size calculation. 15, Università degli Studi di Salerno : Royal Society of Chemistry, Mars 2014, Soft matter, Vol. 10, pp. 2574-81.

15. **Kreuter, Jorg.** Colloidal Drug Delivery Systems. 1994. pp. 74-75. ISBN-13: 978-0824792145.
16. [En ligne] [Citation : 27 Janvier 2017.] <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/?q=systeme+mononucl%C3%A9e> .
17. [En ligne] [Citation : 27 Janvier 2017.] <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/vecto/vecto.htm>.
18. **MOUGIN-DEGRAEF, Marie.** Les liposomes: Aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie. [Th D Pharm, Université de Nante]. 30 avril 2004.
19. **H.A.H. Rongen, A. Bult, W.P. van Bennekom.** Liposomes and immunoassays. 1997, Journal of Immunological Methods, Vol. 204, pp. 105–133.
20. **S.M. JOHNSON, A.D. BANGHAM, M.W. HILL, E.D. KORN.** Single bilayer liposomes. BBA 71080, 1971, Biochimica et Biophysica Acta.
21. **J.S. Dua, Prof. A. C. Rana, Dr. A. K. Bhandari.** Liposome: Methods of preparation and applications 2, Avril-Juin 2012, International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, Vol. 3, pp. 14-20. E-ISSN 2229-4619.
22. [En ligne] [Citation : 29 01 2017.] <https://avantlipids.com/tech-support/liposome-preparation/> .
23. **FRANCIS SZOKA, JR., DEMETRIOS PAPAHA DJOPOULOS.** Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. 9, Septembre 1978, Biochemistry, Vol. 75, pp. 4194-4198.
24. **SEBAALY, Carine.** Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine. *Th Doctorat, Lyon 1/Liban*. Lyon : s.n., 5 Janvier 2016. p. 18.
25. **Habib, Lamice.** Étude des propriétés membranaires des vésicules lipidiques incorporant des diterpènes oxygénés bioactifs d'origine végétale : application à la cucurbitacine E et à l'érythrodiol. *Th Doctorat, Lyon 1*. 1 Décembre 2014. p. 74.
26. **Hank Liers, PhD.** [En ligne] 1 Janvier 2016. [Citation : 30 Janvier 2017.] <http://www.integratedhealthblog.com/benefits-of-liposomal-nutrients-liposomes-2/>.
27. **Gubernator, Jerzy.** Active methods of drug loading into liposomes: Recent strategies for stable drug entrapment increased in vivo activity. 5, University de Wroclaw : s.n., Mai 2011, Expert Opinion on Drug Delivery, Vol. 8. ISSN 1742-5247.
28. **Daniel Zucker, David Marcus, Yechezkel Barenholz, Amiram Goldblum.** Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's

physicochemical properties. 139, Jerusalem, Israel : s.n., Juin 2009, Journal of controlled release, pp. 73-80.

29. [En ligne] [Citation : 30 Janvier 2017.]

<http://anne.decoستر.free.fr/immuno/dico/48phago.htm> .

30. **Howard J. Lim, Michael J. Parr, Dana Masin, Natashia L. McIntosh, Thomas D. Madden, Guoyang Zhang, Sharon Johnstone and Marcel B. Bally.** Liver, Kupffer Cells Do Not Play a Role in Governing the Efficacy of Liposomal Mitoxantrone Used to Treat a Tumor Model Designed to Assess Drug Delivery. 11, Novembre 2000, Vol. 6, pp. 4449-4460.

31. **Maria Laura Immordino, Franco Dosio, Luigi Cattel.** Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. 3, 2006, Int J Nanomedicine, Vol. 1, pp. 297-315.

32. **SANTOS, Nancy DOS.** Characterization of cholesterol-free liposomes for use in delivery of anti-cancer drugs. University of British Columbia, Canada : s.n., Septembre 2004, Th Doctorat.

33. **Gabizon A., Papahadjopoulos D.** The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. 1, 1992, Biochim Biophys Acta, Vol. 1103 , pp. 94-100.

34. **Desroches-Castan, Agnès.** Inhibition de l'angiogenèse tumorale : criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. Université de Grenoble : s.n., 12 Février 2015, Th Doctorat, p. 15.

35. **John N. Weinstein, Lee D. Leserman.** Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. 2, 1984, Pharmacology & Therapeutics, Vol. 24, pp. 207-233.

36. **Maruyama, Kazuo.** PEG-immunoliposome. 2, Teikyo University, Tokyo : s.n., May 2002, Bioscience Reports, Vol. 22.

37. **The Regents Of The University Of California, Frank J. Martin, Demetrios P. Papahadjopoulos, Wayne L. Hubbell, Moins.** Thiol reactive liposomes. WO 1983002069 A1 USA, 7 Décembre 1982. Demand.

<http://www.google.dj/patents/WO1983002069A1?cl=en> .

38. [En ligne] [Citation : 31 Janvier 2017.]

[http://www.frontiersin.org/files/Articles/163819/fphar-06-00286-r2/image\\_m/fphar-06-00286-t001.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/163819/fphar-06-00286-r2/image_m/fphar-06-00286-t001.jpg).

39. [En ligne] [Citation : 31 Janvier 2017.]

[https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2015/144654/TFG\\_esthergaciapages.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2015/144654/TFG_esthergaciapages.pdf) .

40. Clinical Trials. [En ligne] [Citation : 30 Janvier 2017.]

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02833766>.

41. **Ricardo Costa, et al.** Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development. Décembre 2016, Cancer Treatment Reviews, Vol. 53, pp. 111–119.

42. [En ligne] [Citation : 31 Janvier 2017.] <http://www.biochemj.org/content/387/1/1>.

43. **Sobol Robert E., Scanlon Kevin J., Nestaas Eirik (Eds.)**. Gene Therapy. 1998. pp. 38-43. ISBN 978-3-662-03577-1.

44. **Alton, et al.** Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. Londre : s.n., 3 Juillet 2015, The Lancet Respiratory Medicine.

BOBO, Gemechis Haile

**L'utilisation des Liposomes comme vecteurs médicamenteux**

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie

Université de Picardie Jules Verne

2017

**Mots clés** : liposome, immunoliposome, vectorisation, thérapie ciblée

**RESUMÉ**

Cette thèse traite le progrès réalisé dans l'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux. La classification de liposomes, les techniques de la préparation des différents types de liposomes et les méthodes d'encapsulation des principes actifs sont présentées. La pharmacocinétique est ensuite abordée, montrant que les liposomes furtifs ont une durée de vie plasmatique longue et peuvent atteindre des cibles extravasculaires car ils ne sont pas détectés par le système des phagocytes mononuclées. Les immunoliposomes possèdent en outre les atouts nécessaires pour le développement de la thérapie ciblée. Les liposomes cationiques sont utilisés dans la thérapie génique par lipofection. Des nombreux produits à base de liposomes sont commercialisés et d'autres sont en cours d'essais cliniques, avec comme perspectives leur utilisation en oncologie et en thérapie génique (cancer, mucoviscidose).

**JURY**

**Président** : Dr. Catherine DEMAILLY-MULLIÉ, Enseignant-Chercheur à l'UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne.

**Membres** :

Dr. Anne CHARBONNET, Pharmacienne Responsable au Centre de développement industriel de Sanofi, Compiègne.

Prof Pascal SONNET, Enseignant-Chercheur à l'UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne.