

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE  
UFR DE PHARMACIE

Année : 2019

N°

THÈSE D'EXERCICE  
pour l'obtention du  
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement  
le 24 mai 2019

par  
**Clément NEBOUT-REGIS**

# NANOPARTICULES EN ONCOLOGIE : IMAGERIE ET THERAPIE

## Jury

Président : **M. Vincent GAUMET**

Professeur,  
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **M. Jean-Michel CHEZAL**

Professeur,  
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

**Mme Elisabeth GORNIEWICZ**

Pharmacienne

**Mme Caroline PEYRODE**

Pharmacienne, Maître de conférences,  
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

**Mme Salma SOULA-DION**

Pharmacienne hospitalier,  
CHU Nîmes



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Vincent Gaumet, président de ce jury et directeur de ma thèse. Vous m'avez soutenu et aidé tout au long de la rédaction de celle-ci. Vous êtes certainement le professeur le plus pédagogue qu'il m'ait été donné de rencontrer au cours de mon parcours universitaire. Ce fut toujours un réel plaisir d'assister à vos cours.

Je tiens à remercier les autres membres du jury :

✕ Le Professeur Jean-Michel Chezal, je vous ai choisi comme membre de ce jury car vos travaux sont en adéquation avec ma thèse sur plusieurs points. Je vous remercie de votre présence et pour vos cours de chimie organique particulièrement intéressants.

✕ Le Docteur Elisabeth Gornewicz, pour t'être rendue disponible afin de prendre part à ce jury. Merci pour la gentillesse et la pédagogie dont tu as fait preuve lors de mon stage de découverte de 6 semaines en pharmacie officinale. C'était un réel bonheur de travailler avec toi et je suis content d'avoir pu partager tous ces moments de festivités et de vacances avec toi et Jacek.

✕ Le Docteur Caroline Peyrode, pharmacienne et maître de conférences à l'université de Clermont-Ferrand, pour avoir, au pied levé, accepter de faire partie de mon jury. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité.

✕ Le Docteur Salma Soula, pharmacienne au CHU de Nîmes, et avant tout amie. Je te remercie d'avoir pris le temps de t'intéresser à ma thèse. J'ai eu beaucoup de chance que tu rentres dans nos vies, et j'espère que notre amitié va perdurer.

Je tiens à remercier également tous les autres professeurs et intervenants que j'ai pu avoir durant mes études à la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand, ils ont renforcé mon intérêt pour ce métier.

Merci également au Docteur Philippe Hirlemaan, pharmacien titulaire de la Pharmacie des Facultés, ainsi qu'au reste de son équipe, pour m'avoir accueilli dans son officine au cours de mon dernier stage.

Merci au Docteur Bernard Condat d'avoir été prêt à faire partie de mon jury si cela lui avait été possible. Cette attention m'a beaucoup touché. Je n'oublie pas que c'est grâce à toi que ma vocation de pharmacien s'est révélée lors de mon stage au collège (classe de 4ème).

Je tiens à remercier tous les amis que j'ai rencontrés à Clermont-Ferrand. Qu'ils soient amis de longue date ou rencontrés lors de mon cursus. Ils ont tous été là pour m'encourager et rendre mes études plus douces :

- Pauline Oleon pour tous les super bons moments passés ensemble  
- Caroline Henry pour m'avoir aidé à de multiples reprises durant nos études communes, pour les soirées et les bons moments passés à tes côtés. Je m'excuse de t'avoir blessée à plusieurs reprises. Tu es une personne remarquable et je suis navré que ma bêtise ait pu entacher notre amitié.

- Je remercie tout particulièrement Vladimir Noguine, rencontré lors de nos nombreux TP. Tu es devenu, en plus d'un binôme hors pair, un très grand ami. Avec toi j'ai pu partager beaucoup de bons moments, autour d'un verre, et au stade lorsque nous étions plus

sérieux. Je te dois également des excuses pour certains propos inappropriés de ma part. Merci plus particulièrement pour m'avoir soutenu dans les moments où je n'allais pas bien.

- Allan Levailant & Isabelle Burbaud. Allan tout d'abord pour tous ces excellents moments passer avec toi, à la rivière, sur les pistes de ski. Même si actuellement nous sommes très éloignés géographiquement, tu restes un ami d'exception. Merci pour tes fameux « Apéros Couloir », lorsque les filles ne levaient pas les yeux de leurs bouquins pendant leurs révisions. Ces derniers me manquent. Isabelle, merci pour tous les moments passés tous les quatre qui sont réellement inoubliables pour moi et pour ta bienveillance. Malgré la distance, tu resteras toujours une amie.

A Montpellier, je remercie aussi le Docteur Jérôme Escojido de m'avoir accordé la chance de travailler avec lui et son équipe, à plusieurs reprises durant les vacances d'été. Tu m'as fait confiance et j'ai appris énormément avec toi.

Je remercie aussi toute l'équipe de la Grande Pharmacie d'Odysseum, notamment le Docteur Jérôme Hervé, pharmacien titulaire, ainsi que Nadège, Brittany, Elodie et Adeline. Vous m'avez beaucoup apporté tant sur le plan de l'amitié qu'au niveau professionnel.

Je remercie mes meilleures amies, Megan et Mélina pour avoir toujours été là et pour tous les moments passés ensemble. Vous êtes mes plus grandes confidentes et vous avez été de nombreuses fois un grand soutien pour moi. Je vous adore. Je remercie aussi Manon pour cette amitié de longue date, et pour tous les bons moments qui en découlent. Tu es la petite sœur que je n'ai jamais eue. Merci également de m'avoir aidé pendant ma thèse en me prêtant ton ordinateur.

Je tiens à remercier tous les amis de mes parents (Gilles, Pat, Momo, Bernard, Jacek et Elisabeth) qui ont toujours été là pour moi, qui ont cru en moi et m'ont encouragé malgré le TDAH et la dyslexie sévère dont je souffre.

Je remercie Alexandre Gornewicz et Alexis Condat. Nous étions toujours réunis pendant les vacances d'hiver. Je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble : sur les pistes de skis, à faire les geeks, à boire un verre, les soirées, etc.

Je remercie Remi Dion pour toutes ces sorties, et soirées passées tous les quatre avec Salma et Kelly. Je te souhaite du courage pour finir tes études d'infirmier (tu tiens le bon bout) et plein de bonheur dans votre nouvelle vie qui commence.

Je remercie Gilles Ferrone mon plus vieil ami. On a toujours été, malgré nos différences, très proche. Je suis content que nous nous soyons rencontrés étant petits et que tu m'ais offert ton amitié. Tu es très loin, et nous nous voyons malheureusement peu, mais tu feras toujours partie des gens qui me comprennent et me connaissent le mieux.

Je remercie aussi René pour ces sessions sport et ces discussions passionnées autour des barres de tractions.

Je remercie mes cousins et cousines Elio, Cléa, Maxime, Louis, Julie, Greg, Fred et Bastien pour tous les moments passés ensemble.

Je tiens à remercier ma grand-mère, Mariette qui a toujours été de bons conseils et présente pour moi. Tu m'as beaucoup appris et toujours soutenu.

Je tiens également à remercier mes tantes et mes oncles, ceux qui sont présents et ceux qui ne le sont plus, je vous aime.

Je remercie mes trois sœurs : Camille, Charlotte, Clara ainsi que Lucas et David et leurs petites familles. Toutes les trois, vous m'avez non seulement donné des neveux et nièces magnifiques, mais vous avez aussi toujours été là pour moi. Je ne trouverai pas, et je ne pense pas qu'il existe des mots pour témoigner toute l'admiration, l'amour et la reconnaissance que j'ai pour vous.

Je tiens à remercier grandement mes parents.

Ma mère tout d'abord pour son aide précieuse. Tu m'as apporté plein de choses dans la vie, entre autres, à être entêté et déterminé pour réussir. Je te remercie de toute l'aide, l'amour et le soutien que tu m'as donné au cours de mes études et plus généralement, au cours de toute ma vie. Je t'aime fort.

Mon père, prof d'histoire géo, aux blagues ordinairement vaseuses, mais qui a néanmoins réussi à beaucoup me faire rire en corrigeant la syntaxe et l'orthographe de ma thèse. Tu t'es investi énormément pour m'aider ; je n'ai pas de mots assez forts pour t'en remercier. Je note que grâce à ma thèse, tu as pu enrichir ton humour ; cela a été l'occasion pour toi de tourner en dérision certains termes scientifiques. Ces moments de complicité resteront à jamais gravés. Je te remercie aussi et surtout pour tout ce que tu m'as apporté dans la vie, pour ta patience trop souvent mise à l'épreuve...

Je vous suis reconnaissant également pour votre soutien durant tout mon parcours scolaire et universitaire, vous avez été les seuls à comprendre mes réelles difficultés liées à mon TDAH. Je suis très fier d'être votre fils. Je vous aime.

Je remercie ma belle-famille de m'avoir accepté et de m'avoir fait découvrir le merveilleux pays qu'est le Portugal.

Ma chérie, Kelly, cela fera bientôt 8 ans et demi que nous sommes ensemble. Malgré les hauts et les bas du quotidien je suis très heureux de t'avoir dans ma vie. Je te suis reconnaissant de ta patience, de ton amour, et de tout ce que tu as apporté dans ma vie.

Je te remercie du temps passé avec moi sur ma thèse afin de la rendre compréhensible pour autrui. C'est un exemple parfait qui montre que tu sais très bien ce que je veux dire même quand je m'exprime mal.

Je te souhaite du courage, tu as tout mon soutien pour atteindre tes rêves qui sont aussi les miens. Je ne m'inquiète pas pour ton avenir car je sais à quel point tu es brillante, que ta ténacité et ton ardeur au travail sont les points forts qui te permettront de faire ce que tu voudras dans le milieu hospitalier et dans le domaine pharmaceutique.

Je te remercie également d'être devenue la tante de mes neveux et nièces qui t'aiment et t'apprécient, cela a énormément de valeur pour moi.

Tu es ma reine, mon soleil, ma lune, ma meilleur amie, mon amante, ma femme. Je t'aime.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>I] NANOPARTICULES VECTORISANT LA DOXORUBICINE .....</b>	<b>10</b>
1) GENERALITES SUR LA DOXORUBICINE.....	11
2) LIPOSOMES VEHICULANT LA DOXORUBICINE.....	15
A- <i>Caelyx®</i> .....	15
B- <i>Intérêt des nanoparticules liposomales modifiées de doxorubicine dans le traitement des gliomes</i> .....	23
C- <i>Résumé</i> .....	34
3) DENDRIMERES DE DOXORUBICINE EN ONCOLOGIE .....	36
A- <i>Dendrimères utilisés dans le traitement et l'imagerie du carcinome hépatocellulaire (CHC)</i> .....	36
B- <i>Dendrimères utilisés dans le traitement du cancer du sein</i> .....	48
C- <i>Résumé</i> .....	57
4) AUTRES TYPES DE NPS VEHICULANT LA DOXORUBICINE .....	58
A- <i>Gel de nanofibres</i> .....	58
B- <i>Copolymères</i> .....	60
<b>II] NANOPARTICULES VECTORISANT IR780 .....</b>	<b>63</b>
1) CARACTERISTIQUES DE IR780 .....	63
2) NANOCAPSULES.....	65
A- <i>Thérapie</i> .....	65
B- <i>Toxicité</i> .....	69
C- <i>Imagerie</i> .....	70
D- <i>Résumé</i> .....	71
3) NPS LIPIDIQUES.....	72
A- <i>Caractéristiques et présentation des différents composés</i> .....	72
B- <i>Imagerie</i> .....	79
C- <i>Efficacité thérapeutique</i> .....	84
D- <i>Toxicité</i> .....	91
E- <i>Résumé</i> .....	93
4) MICELLES NON LIPIDIQUES .....	94
A- <i>Caractéristiques et présentation des différentes micelles</i> .....	94
B- <i>Imagerie</i> .....	98
C- <i>Efficacité Thérapeutique</i> .....	103
D- <i>Toxicité</i> .....	111
E- <i>Résumé</i> .....	111
<b>III] NANOPARTICULES VECTORISANT LE GADOLINIUM .....</b>	<b>113</b>
1) GENERALITES SUR LE GADOLINIUM ET SON UTILISATION .....	113
2) GBN : AGUIX® ET SES DERIVES.....	115
A- <i>Caractéristiques et présentation</i> .....	115
B- <i>Imagerie</i> .....	118
C- <i>Thérapie</i> .....	119
D- <i>Toxicité</i> .....	128
E- <i>Résumé</i> .....	129
3) AUTRES TYPES DE GBNS.....	130
A- <i>Caractéristiques et présentation</i> .....	130
B- <i>Imagerie</i> .....	133
C- <i>Thérapie</i> .....	139
D- <i>Résumé</i> .....	142
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>147</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>155</b>

# Introduction

Le cancer est l'une des principales causes de mort prématurée. Il se caractérise par une prolifération anarchique de cellules anormales. Lorsque le nombre de ces cellules au sein d'un tissu ou d'un organe atteint une certaine taille, on parle de tumeur primaire. Par la suite certaines cellules cancéreuses vont se séparer de la masse tumorale et migrer dans les tissus avoisinants ou le sang, cela forme des métastases. Les patients meurent d'un cancer lorsque les principaux organes vitaux sont touchés et subissent des dysfonctionnements importants. [1] Lors de la croissance tumorale, la création de nouveaux vaisseaux sanguins se produit, c'est l'angiogenèse. En effet, les tumeurs ont besoin d'être raccordées au système vasculaire pour continuer à croître, c'est pour cela que certaines cellules tumorales acquièrent la capacité à induire l'angiogenèse, sans cela la tumeur arrête de grandir. Ces cellules, en sécrétant les facteurs de croissance angiogénique comme VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), assurent, par la création de nouveaux vaisseaux sanguins, la continuité du développement de la tumeur. Cette angiogenèse entraîne la création d'un réseau vasculaire désorganisé et anarchique (Figure 1). [2]

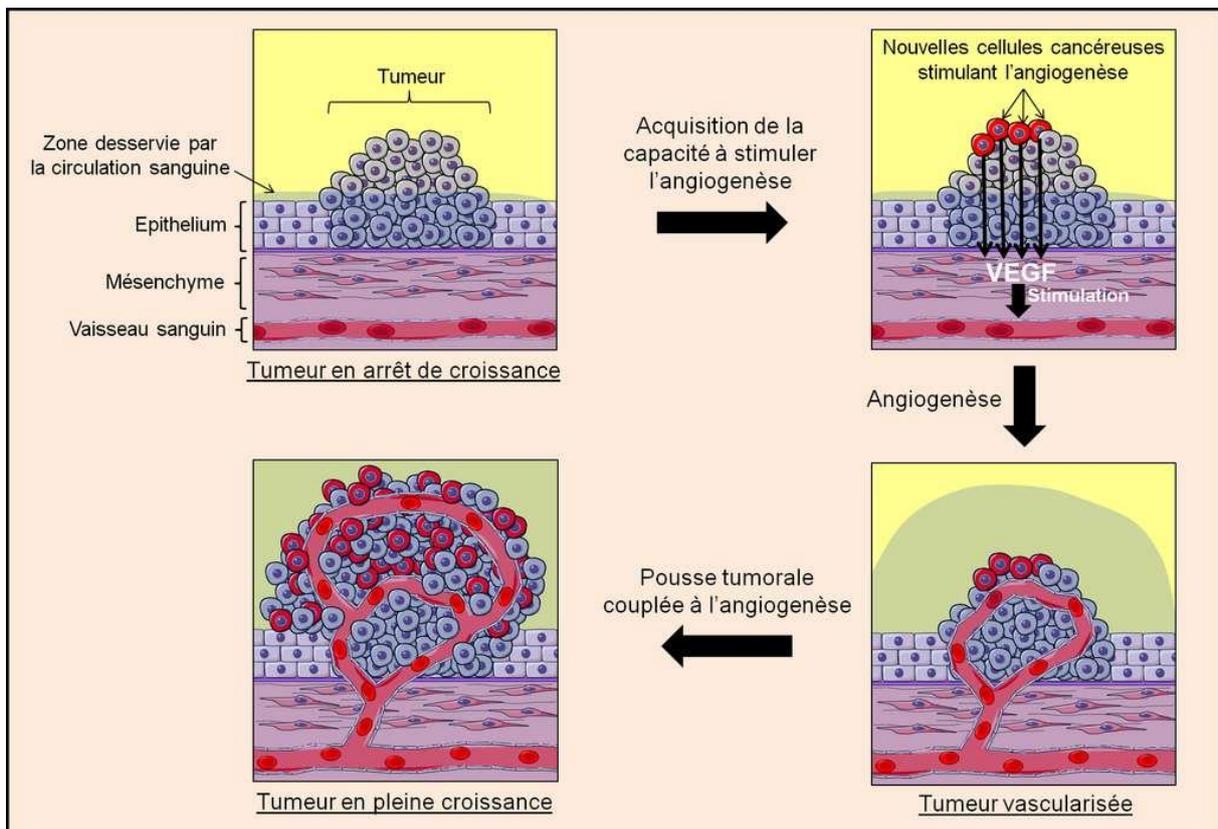


Figure 1 : Processus d'angiogenèse tumorale.

Aujourd'hui, de nombreux moyens permettent de diagnostiquer et d'imager les tumeurs. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui fait appel à des produits de contraste, est utilisée pour explorer les tissus mous du corps humain. L'échographie est, quant à elle, utile dans l'analyse des organes de l'abdomen. La radiographie est indispensable pour imager les différents organes du thorax, les seins et parfois les organes de l'abdomen, elle repose sur l'utilisation des rayons X. Le scanner ou tomodensitométrie (TDM) qui utilise aussi des rayons X permet contrairement à la radiographie conventionnelle d'obtenir des images

plus nettes et plus précises. Le PET-scan (tomographie par émission de positrons) et la scintigraphie font appel à des éléments radioactifs qui vont marquer des organes ou les cellules cancéreuses permettant de préciser la présence et la localisation de la tumeur.

Différents moyens sont utilisés pour la thérapie : la chirurgie, la radiothérapie (irradiation de la tumeur pour détruire les cellules cancéreuses), la chimiothérapie qui se base sur l'utilisation de produits chimiques cytotoxiques pour détruire les cellules cancéreuses. Tous ces traitements provoquent de nombreux effets indésirables chez le patient et peuvent même dans certains cas entraîner la mutation de certaines cellules saines. Plus récemment l'immunothérapie, en cours de développement, montre des résultats prometteurs avec des effets secondaires bien moindres que les précédentes thérapies citées. L'immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire du patient afin que ce dernier combatte les cellules cancéreuses.

Le cancer est la seconde cause de mortalité dans le monde après les maladies cardio et cérébro-vasculaires. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer aurait causé la mort de 8,8 millions de personnes en 2015. Les cancers les plus meurtriers sont : le cancer du poumon (1,69 million de décès), le cancer du foie (788000 décès), le cancer colo-rectal (774000 décès), le cancer de l'estomac (754000 décès) et le cancer du sein (571000 décès). Même si ces cinq types de cancers sont responsables de la majorité des décès, y survivre est possible. A contrario, le glioblastome (tumeur cérébrale) de la catégorie des gliomes est une des tumeurs les plus difficiles à détruire définitivement et aucune survie à plus de 4 ans après diagnostic n'est constatée. [3]

Les nanoparticules, utilisées dans la pharmaco-cosmétique depuis plus d'une dizaine d'années, sont aujourd'hui étudiées pour le diagnostic et le traitement du cancer. L'objectif est de réduire les effets secondaires des traitements anticancéreux tout en préservant (ou en augmentant) l'efficacité des thérapies.

Les nanoparticules (NPs), à l'échelle du nanomètre (soit  $10^{-9}$  mètre ou un milliardième de mètre), sont une branche des nanotechnologies. Elles sont la base de la fabrication de nanostructures. Les NPs font référence à toute particule dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm (Figure 2) même si dans certains cas elles sont plus grosses.

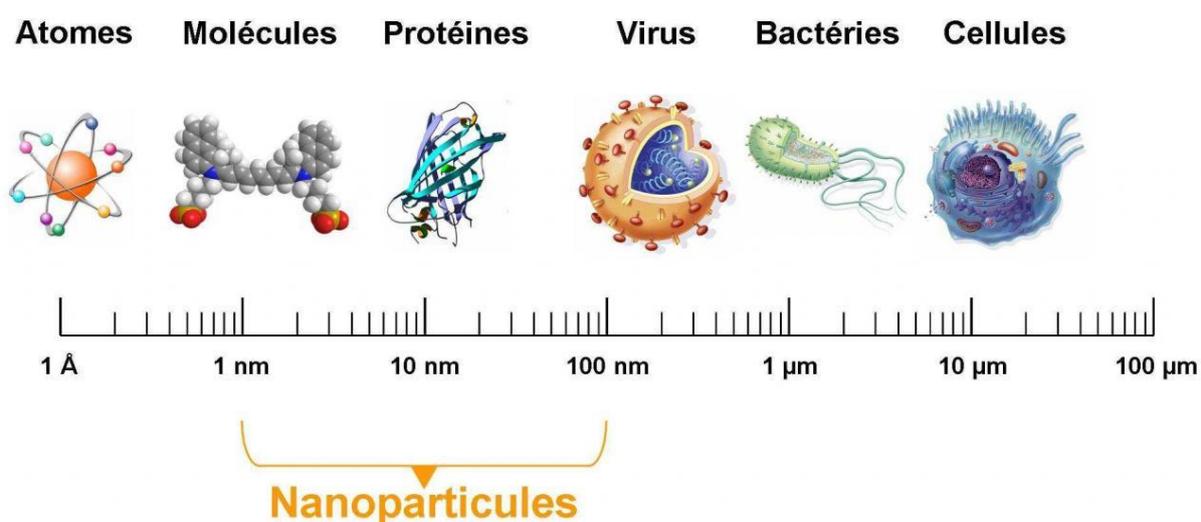


Figure 2 : Ordre de grandeur des nanoparticules

Historiquement, dans le domaine pharmaceutique, les débuts du développement des nanoparticules datent de la fin des années 1960. Une équipe de l'Institut Fédéral de

Technologie de Zurich avait alors tenté de développer une nanocapsule dans le cadre de la vectorisation de médicaments et de vaccins. Dans le domaine vaccinal, leur but était de pouvoir combiner plusieurs vaccins en une seule injection. Il s'agissait d'une nanocapsule contenant des anatoxines tétaniques fabriquées selon un processus de polymérisation micellaire. Cependant Peter Paul Speiser et ses assistants n'ont pas réussi à atteindre leur objectif. Malgré leurs recherches avant-gardistes et leurs méthodes d'expérimentation efficaces, ils se sont retrouvés confrontés aux limites technologiques de leur temps.

A la fin des années 1970, le professeur Patrick Couvreur réalise la première nanoparticule biodégradable, réglant ainsi les problèmes d'accumulation et d'élimination que les NPs pouvaient provoquer.

Dans les années 90, la première nanoparticule est mise sur le marché, il s'agit du Caelyx<sup>®</sup>, liposome qui vectorise la doxorubicine.

En 2012, Patrick Couvreur reçoit la médaille de l'innovation du CNRS pour ses travaux sur les NPs. En 2013, il obtient le prix du meilleur inventeur européen pour ces mêmes travaux. Les nanoparticules, permettent l'administration de doses supérieures de médicaments avec de meilleurs résultats que les chimiothérapies et radiothérapies courantes.

Ces avancées ont permis et permettront encore de sauver de nombreuses vies.

Il existe actuellement différentes sortes de nanoparticules, certaines déjà développées et d'autres en cours de développement. Trois familles de NPs existent : les nanostructures polymériques, les NPs à base de lipides et les NPs métalliques et inorganiques (Figure 3).

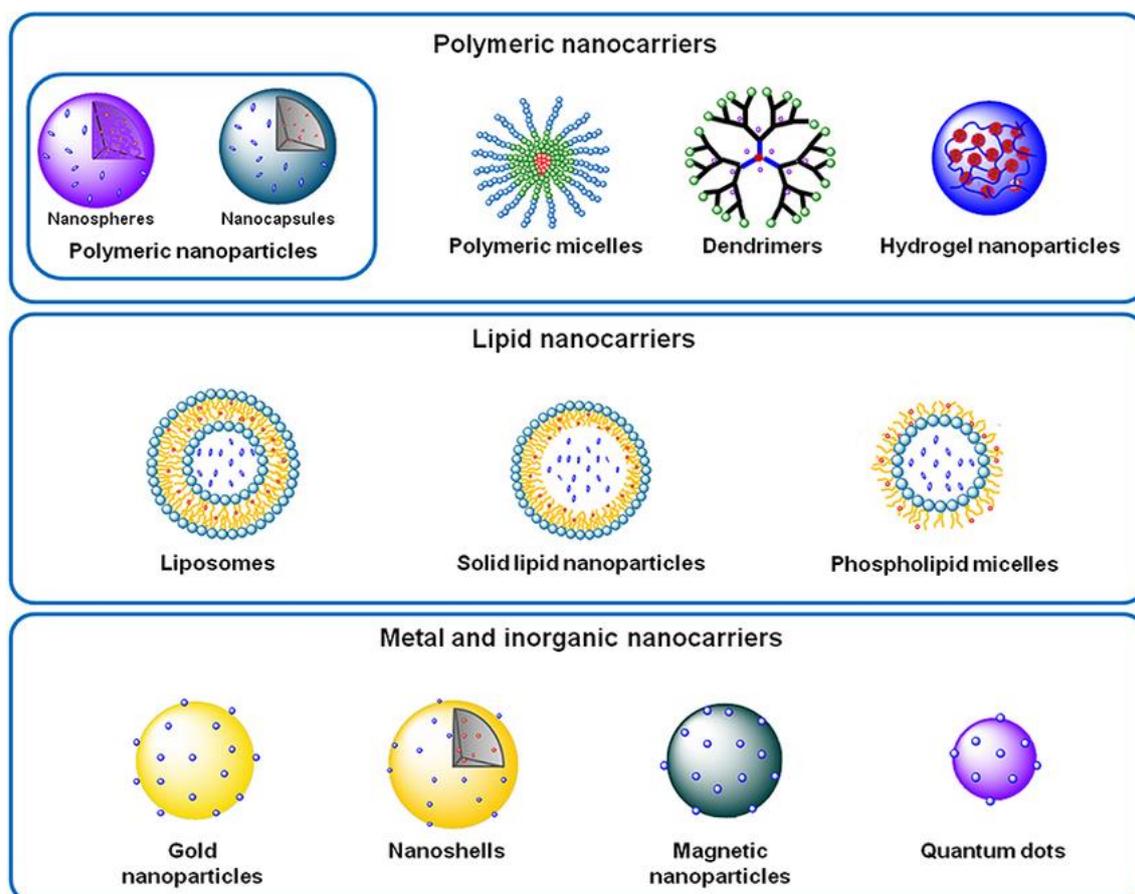


Figure 3 : Répertoire des différents types de NPs

Parmi les NPs polymériques (Figure 3), on peut trouver :

- les nanosphères qui sont composées d'un enchevêtrement de polymères biodégradables. Le plus souvent cette matrice forme un réseau complexe dans lequel un ou plusieurs principes actifs sont piégés. Le principe actif contenu dans la nanosphère est libéré par simple diffusion ou à la suite de la dégradation du polymère. [4]
- les nanocapsules qui présentent, à la différence des nanosphères, une coque composée de polymères permettant de séparer le principe actif qu'elle contient de l'extérieur. Le principe actif au sein de la NP est entouré d'un milieu aqueux ou lipophile. [4]
- les micelles polymériques. Ces micelles sont constituées de polymères possédant un pôle hydrophile et un pôle lipophile. Selon que le produit à encapsuler dans la micelle soit lipophile ou hydrophile, l'agrégation polymérique peut être adaptée pour obtenir soit une micelle soit une micelle inverse.
- les dendrimères tels ceux que produit la société Colcom basée à Montpellier. Les dendrimères ressemblent à un arbre vu du ciel, il s'agit d'un échafaudage de plusieurs molécules se répétant plusieurs fois et formant un réseau en forme de branches comme l'indique étymologiquement son nom (*dendron* se traduit en grec par arbre ou branche). Il existe plusieurs types de dendrimères utilisés en nano médecine, principalement ce sont les dendri-graphes de poly-lysine (DGL) et les polyamidoamine (PAMAM). Les dendrimères sont classés en fonction du nombre de répétitions de leur « motif de base ». Par exemple un DGL de 2ème génération sera composé de 48 motifs de lysine, celui de 3ème génération de 123 motifs et ainsi de suite. Pour les PAMAM, les générations se caractérisent par le nombre de groupes amines (NH<sub>2</sub>) retrouvés à la surface du dendrimère. S'il y a 6 groupes amines par exemple, ce sera une PAMAM de 1ère génération, s'il y en a 12 ce sera une PAMAM G2, et s'il y en a 24 on sera en présence d'une PAMAM G3 et ainsi de suite. Cette variation permet de jouer sur la taille et la surface de la NP mais aussi de modifier ses propriétés physico-chimiques (Figure 4). [5,6]

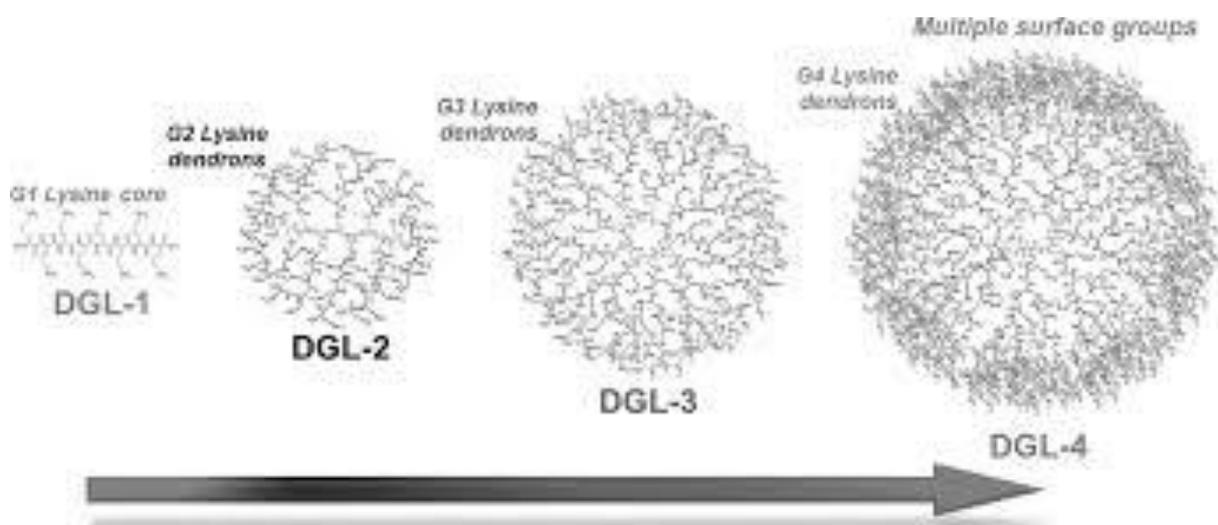


Figure 4 : Représentation schématique des différentes générations de DGL.

Parmi les NPs lipidiques, les liposomes font partie des plus anciennes. Découvertes dans les années 1960, ces NPs sont composées d'une membrane formée par une bicouche lipidique concentrique. Les principes actifs lipophiles ou hydrophobes seront piégés dans la

bicouche alors que les éléments hydrophiles seront contenus dans le cœur du liposome au sein d'un milieu aqueux. Les liposomes utilisés en nanomédecine ont une taille comprise entre 50 et 450 nm. Ces liposomes sont les nanostructures les plus utilisées notamment grâce à leur biocompatibilité. Il existe différentes classes de liposomes, les liposomes de première génération sont les liposomes simples. Ceux de deuxième génération présentent à leur surface des motifs de polyéthylène glycol (PEG), ils sont souvent qualifiés de « furtifs » car ils ne sont pas reconnus comme des éléments étrangers du corps humain. La troisième génération de liposomes est constituée par des liposomes de 2<sup>ème</sup> génération coiffés par différents ligands ou molécules permettant de reconnaître de manière sélective et spécifique certains cancers (Figure 5).<sup>[7]</sup>

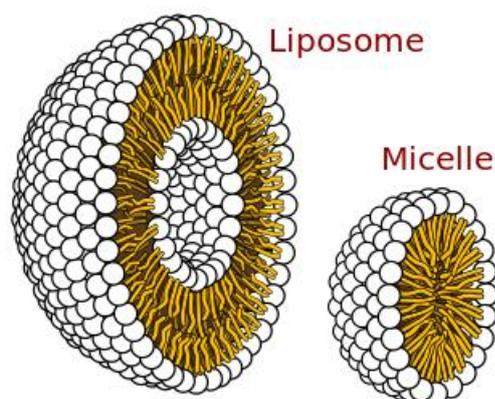


Figure 5 : Représentation d'un liposome et d'une micelle lipidique formée par des phospholipides possédant une tête hydrophile et une queue hydrophobe.

Les NPs lipidiques solides ou SLN sont assez récentes. Elles sont généralement sphériques et composées d'un noyau lipidique solide, assemblage de différents lipides tensioactifs stabilisés par des surfactants mais aussi par des lipides biologiques comme les phospholipides ou les stérols. Les SLN offrent une très bonne protection des médicaments et améliorent leur biodisponibilité.<sup>[8]</sup>

Les NPs magnétiques (MNP) sont bien souvent composées d'oxyde de fer mais aussi d'autres métaux qui possèdent des propriétés paramagnétiques très utilisées dans le diagnostic notamment en IRM mais aussi en thérapie grâce à l'effet hyperthermique.<sup>[9]</sup>

Il existe de nombreux autres types de NPs utilisés en médecine notamment des NPs d'or, des nanogels, des quantum dots ou encore des nanotubes de carbone. Mais ces types de NPs sont moins utilisés en oncologie ou sont en cours d'études.<sup>[10]</sup>

Au cours de cette thèse, nous développerons quelques exemples d'utilisation des NPs pour l'administration de produits utilisés en oncologie pour la thérapie et présentant des effets indésirables ou très toxiques comme la doxorubicine. Nous étudierons ensuite un produit moins utilisé l'IR780 puis le gadolinium actuellement commercialisé pour le diagnostic. Nous analyserons les avantages et inconvénients liés à l'utilisation des nanoparticules pour véhiculer ces différents produits dans l'organisme au plus près des tumeurs.

## I] Nanoparticules vectorisant la doxorubicine

## 1) Généralités sur la doxorubicine

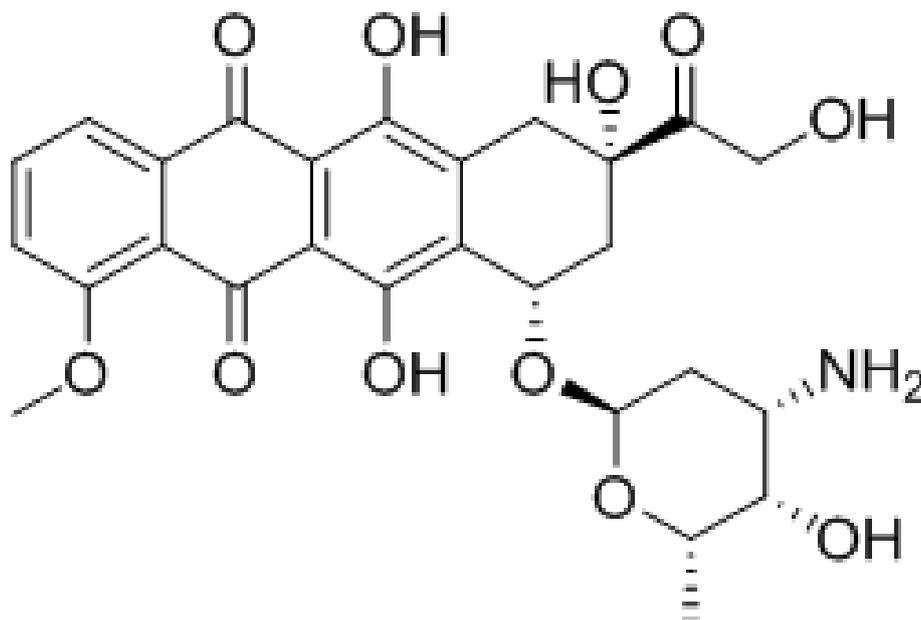


Figure 6 : Représentation topologique de la molécule de doxorubicine

Le nom de la doxorubicine selon la nomenclature IUPAC est : (8*S*,10*S*)-10-[[*(2R,4S,5S,6S)*-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracene-5,12-dione. Elle se compose de deux parties : une partie insoluble dans l'eau (adramycinone) et d'une partie hydrosoluble (daunosamine)

### *Découverte et utilisations :*

La doxorubicine (Figure 6) est extraite de levures du genre *Streptomyces peucetius var. caesisus*. Cette molécule a été développée en 1969 par les chercheurs de Farmitalia Research Laboratory. Ils ont découvert qu'en plus d'être un antibiotique d'origine naturelle appartenant à la famille des anthracyclines, la molécule de doxorubicine possédait une activité antinéoplasique.<sup>[11]</sup> En effet, grâce à plusieurs mécanismes d'action, la doxorubicine possède un pouvoir cytotoxique important qui lui confère une grande utilité en thérapie contre de nombreux types de cancer : sang (leucémie), os, sein, ovaire, testicule, thyroïde, vessie, estomac et tissu mou, lymphome hodgkinien et non hodgkinien, rein, cerveau. C'est pourquoi la doxorubicine est considérée comme un médicament anticancéreux à large spectre même si son emploi reste limité à cause de ses effets secondaires indésirables.

## Pharmacodynamie :

La doxorubicine agit de plusieurs façons :

-substance intercalante au niveau de l'ADN,

Elle inhibe la réplication de l'ADN en s'intercalant entre deux paires de bases successives de la double hélice de l'ADN (Figure 7) ce qui bloque l'action de l'ADN polymérase (chargé de la réplication), mais aussi l'action de l'ARN polymérase (chargé de la transcription). En bref, elle interrompt le cycle cellulaire ce qui entraîne l'apoptose cellulaire.

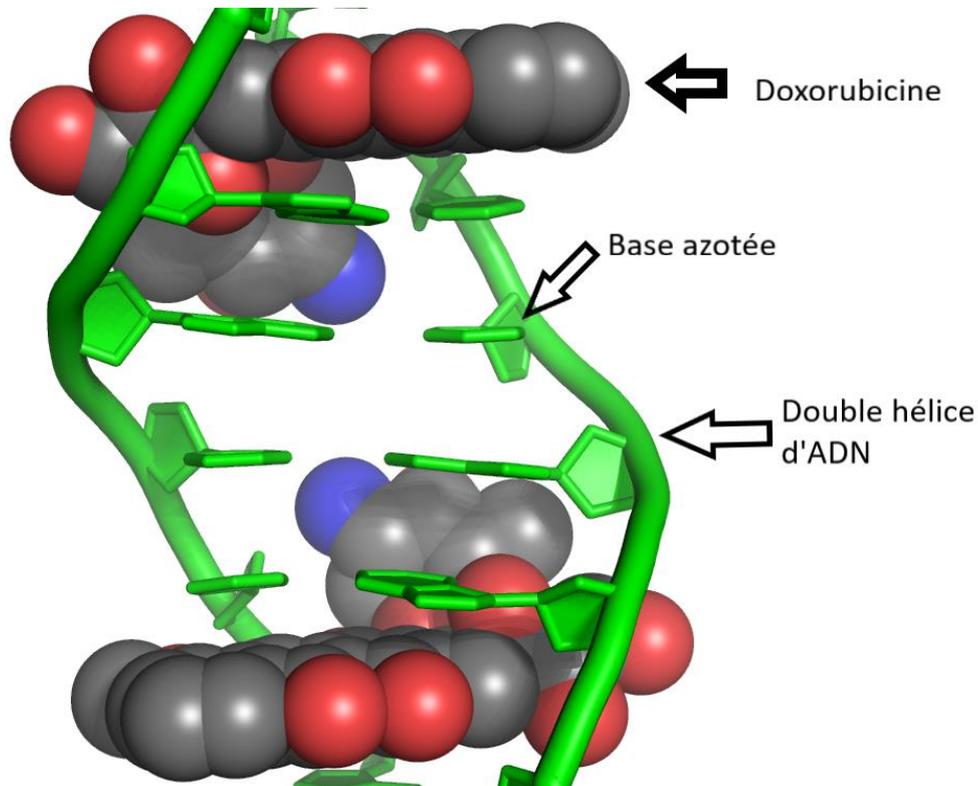


Figure 7 : Intercalation de la doxorubicine dans une double hélice d'ADN

-inhibiteur des topo-isomérases 2 :

Les topo-isomérases 2 sont des enzymes qui tordent et détordent l'ADN au cours des phénomènes cellulaires de réplication et transcription en clivant les deux brins d'ADN puis en les reliant. La doxorubicine agit juste après la coupure des brins d'ADN en stabilisant le complexe ADN-topo-isomérase 2 et donc empêche l'étape suivante de re liaison ce qui entraîne une coupure définitive des deux brins d'ADN conduisant également à la mort cellulaire (Figure 8).

-producteur de radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives qui provoquent des dommages à l'ADN au niveau de son déroulement, de la séparation de ses deux brins ou encore en coupant les brins d'ADN et en augmentant les réactions d'alkylation. En produisant des radicaux libres, la doxorubicine est, ici encore, l'instigatrice de la mort cellulaire (Figure 8).<sup>[12]</sup>

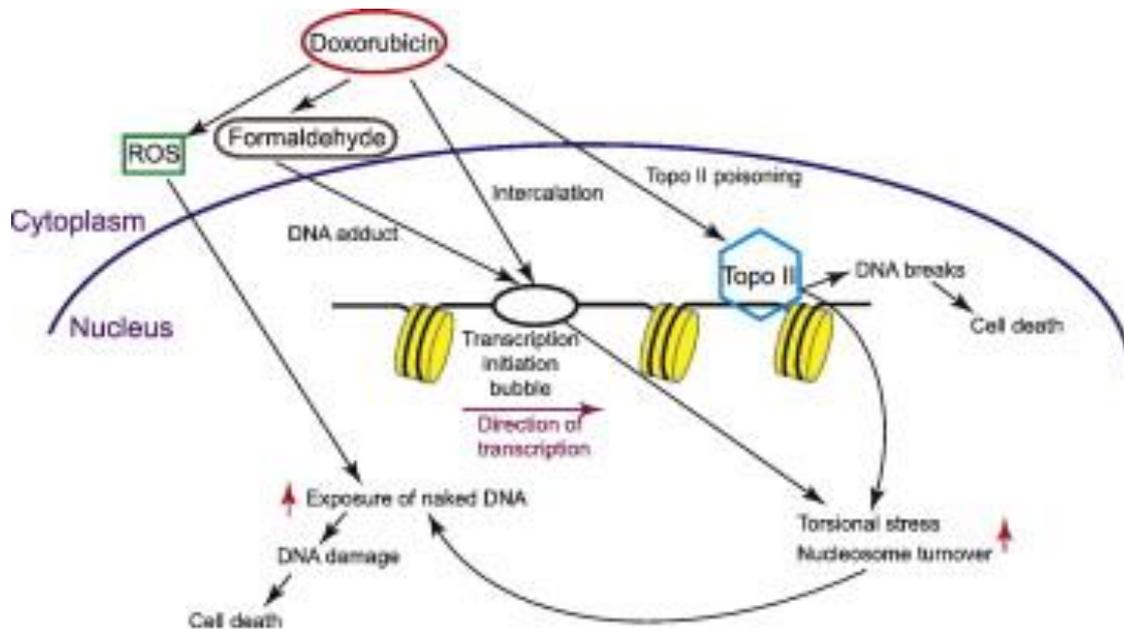


Figure 8 : Mécanismes d'action de la doxorubicine

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la production des radicaux libres par les anthracyclines :

- ayant une structure de type quinone, ces molécules peuvent subir une réduction via l'enzyme flavine réductase et former un dérivé radicalaire qui doit, pour retrouver la forme quinone, céder un électron à l'oxygène produisant des radicaux superoxydes  $O_2^-$ .

- l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  libre présent à l'intérieur des cellules se lie à 3 molécules d'anthracyclines pour former un complexe stable. À la suite d'un cycle interne d'oxydoréduction, ce complexe va former un nouveau complexe radicalaire ferreux  $[Fe^{2+}(anthracycline)_3]$  qui va céder un électron célibataire à l'oxygène formant des radicaux superoxydes  $O_2^-$ .

- L'inflammation provoquée par les anthracyclines produit beaucoup de monoxyde d'azote NO à partir de la L-arginine. Les radicaux superoxydes générés par les mécanismes précédents peuvent réagir avec le monoxyde d'azote pour produire l'anion peroxydrite  $ONOO^-$  qui va générer le radical hydroxyle OH.

### *Inconvénients :*

Juillet 1991 est la date de première autorisation de la spécialité ADRIBLASTINE® de dénomination commune internationale (DCI) : chlorhydrate de doxorubicine. Il s'agit d'une formulation de doxorubicine simple (Dox libre).

Avec leur pouvoir cytotoxique important, les anthracyclines administrées par voie systémique déclenchent sans distinction l'apoptose des cellules saines et tumorales. Cette exposition aveugle de toutes les cellules du corps à l'agent chimiothérapeutique provoque de graves effets secondaires chez les patients. En particulier au niveau des cellules myocardiques où les anthracyclines entraînent une déplétion en superoxyde dismutase (SOD) et en glutathion peroxydases (GSH-PX) qui normalement transforment  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  (par SOD) ensuite décomposé en eau et en oxygène moléculaire. Cette déplétion entraîne une accumulation intracellulaire de  $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  qui conduira à la production de radicaux OH. Les espèces oxydantes produites provoquent la peroxydation lipidique des membranes des cellules myocardiques et donc des fonctions membranaires telles que l'homéostasie calcique (Figure 9). Ceci entraîne une diminution de la contractilité myocardique et un défaut de

relaxation des cellules myocardiques. Le stress oxydatif produit induit des lésions mitochondriales qui vont entraîner une apoptose des cellules myocardiques.

En conclusion, les anthracyclines provoquent une cardiotoxicité qui sera dose cumulative car les cellules myocardiques ne se répliquent pas, lorsqu'une cellule est détruite, aucune ne vient la remplacer. Donc, plus on utilise une dose importante d'anthracycline ou plus on répète les injections, plus le nombre de cellules myocardiques détruites sera important.

La biodistribution non spécifique et les effets secondaires induits, notamment la cardiotoxicité dose cumulative, freinent énormément l'utilisation des anthracyclines. [12-15] D'où un besoin urgent de développer de nouvelles thérapies capables de cibler plus efficacement les cellules tumorales.

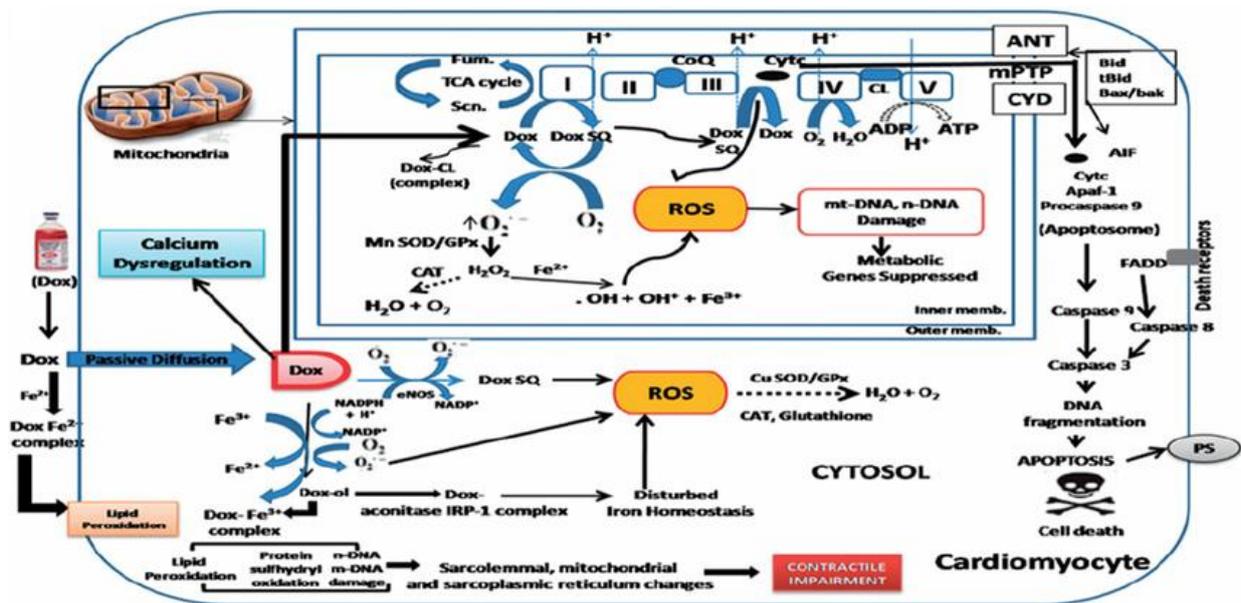


Figure 9 : Hypothèse du mécanisme de cardiotoxicité de la doxorubicine

### Intérêt de l'utilisation des Nanoparticules :

C'est pourquoi, certains chercheurs de Janssen ont eu l'idée en 1995 de développer le DOXIL<sup>®</sup> commercialisé aux USA. En 1996, son équivalent arrive en Europe : le CAELYX<sup>®</sup> (Figure 10). Il s'agit d'une formulation de doxorubicine liposomale pegylée, c'est le premier nanomédicament à être mis sur le marché. [13]

Dans la suite de ce mémoire, nous présenterons les nombreux avantages liés à l'utilisation de cette spécialité dans le domaine thérapeutique, nous discuterons également de son devenir dans l'organisme. Nous étayerons notre discussion en la comparant à la forme simple ADRIBLASTINE<sup>®</sup> et à la forme NP liposomale non pegylée MYOCET<sup>®</sup>. Différentes autres innovations découlant de l'amélioration des NPs utilisées en chimiothérapie du cancer pour une plus grande spécificité et moins de toxicité seront également présentées.

Nous présenterons tout d'abord la spécialité Caelyx<sup>®</sup> avant de développer les formes plus spécifiques de nanoliposomes utilisées dans les études sur le cancer du cerveau.



La méthode de préparation du Caelyx® est basée sur le gradient de pH qui va permettre d'internaliser et d'accumuler la doxorubicine dans le liposome. Ce gradient de pH est créé en encapsulant du sulfate d'ammonium dans les liposomes en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de sodium. A l'intérieur du liposome, le sulfate d'ammonium est dissocié en ions  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ . Par la suite, les ions  $\text{NH}_4^+$  se transforment par réaction acidobasique en molécules d'ammoniac, qui vont sortir facilement du liposome, et en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  qui se concentrent dans le liposome. A l'extérieur, le chlorhydrate de doxorubicine ( $\text{Dox-NH}_3\text{Cl}$ ) se dissocie en ions  $\text{Dox-NH}_3^+$  et chlorures  $\text{Cl}^-$ . Après basification, les ions  $\text{Dox-NH}_3^+$  se transforment en molécule  $\text{Dox-NH}_2$ . Cette forme non ionique de la doxorubicine diffuse et passe à travers la bicouche du liposome préalablement chauffée pour la rendre perméable.  $\text{Dox-NH}_2$  précipite à l'intérieur du liposome au contact des ions  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_3\text{O}^+$  pour donner  $(\text{Dox-NH}_3)_2\text{SO}_4$ .

Cette encapsulation par méthode active permet l'internalisation de plus de 90 % de la doxorubicine dans les liposomes, avec un rapport d'environ 15000 molécules de doxorubicine par liposome. Dans un même échantillon, le diamètre moyen d'un liposome est de 85 nm mais les tailles peuvent varier de 40 à plus de 100 nm (Figure 12F) <sup>[13,16]</sup>. Les flèches de la figure 12D montrent que dans un flacon de Caelyx® il y a quelques liposomes vides. Ces images obtenues par microscopie électronique en transmission démontrent clairement la séquestration de la doxorubicine dans les liposomes. Cette encapsulation se traduit par une forme en grain de café des nanoparticules. L'analyse des graphiques de la figure 12 (E et F) permet de constater que, malgré le fait que Doxil® et Caelyx® sont des spécialités similaires fabriquées par le même laboratoire, la taille et la forme des nanoliposomes peuvent différer légèrement d'un flacon à l'autre. Les comparaisons avec des génériques fabriqués par d'autres laboratoires montrent que ces écarts peuvent être encore plus importants <sup>[13]</sup>.

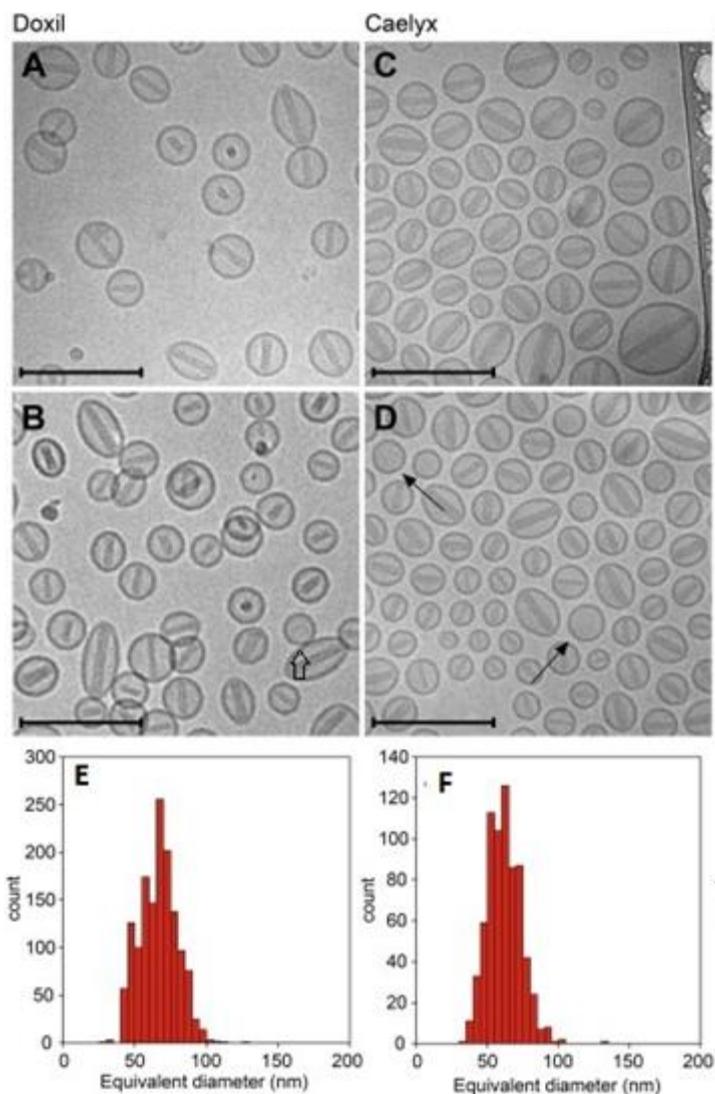


Figure 12 : Caelyx® et Doxil® caractérisation physique et imagerie au microscope.  
 (A, B) : Micrographie du Doxil® obtenu par cryo-TEM ; (C, D) : Micrographie du Caelyx® obtenu par cryo-TEM ;  
 barre d'échelle : 200 nm  
 (E, F) : Répartition des liposomes dans un flacon de Doxil®(E) et de Caelyx®(F) en fonction de leur taille<sup>[13]</sup>

## Pharmacocinétique :

### Absorption

L'administration de Caelyx® est intraveineuse, et, contrairement à la spécialité Myocet® (forme non péglée), elle ne nécessite pas de reconstitution<sup>[12]</sup>. De plus les liposomes péglés sont très stables par rapports aux liposomes de Myocet®. Cette plus grande stabilité résulte de la péglation des liposomes qui permet aux NPs de Caelyx® d'échapper à la phagocytose. Cela se traduit par une présence dans le système sanguin plus longue que pour la Dox libre (ADRIPLASTINE®) ou la doxorubicine liposomée simple (Myocet®). La doxorubicine ne pourra alors agir que lorsque le liposome péglé sort du système sanguin pour aller dans le compartiment tissulaire où elle sera libérée.

## Distribution

La concentration plasmatique de doxorubicine totale est plus importante avec Caelyx<sup>®</sup> qu'avec Adriblastine<sup>®</sup> (Dox libre). Le volume de distribution de la doxorubicine totale est plus faible avec Caelyx<sup>®</sup> qu'avec les formes conventionnelles. Le Caelyx<sup>®</sup> est donc essentiellement confiné dans le compartiment vasculaire et au niveau du foie où la concentration de Caelyx<sup>®</sup> est supérieure à celle de la Dox libre (Figure 13). La majeure partie de la doxorubicine reste encapsulée dans les liposomes et n'est donc pas encore biodisponible. Mais en restant plus longtemps dans le compartiment vasculaire elle est éliminée moins vite et a une durée d'action plus importante [16]. La distribution tissulaire a été étudiée dans un modèle de souris par l'implantation sous cutanée de carcinome gastrique humain (N87) et de mélanome (A375). Pour une dose injectée équivalente (10 mg/kg), la concentration de doxorubicine liposomale pegylée est plus importante au niveau des tissus cancéreux que celle de Dox libre (Figure 14). Si la concentration maximale dans les tissus est atteinte très rapidement après l'injection pour la Dox libre, elle est atteinte aux alentours de 48 heures après l'injection pour la doxorubicine liposomale pegylée. Ceci est la mise en évidence et la conséquence logique du temps de circulation prolongée de la forme liposomale pegylée.

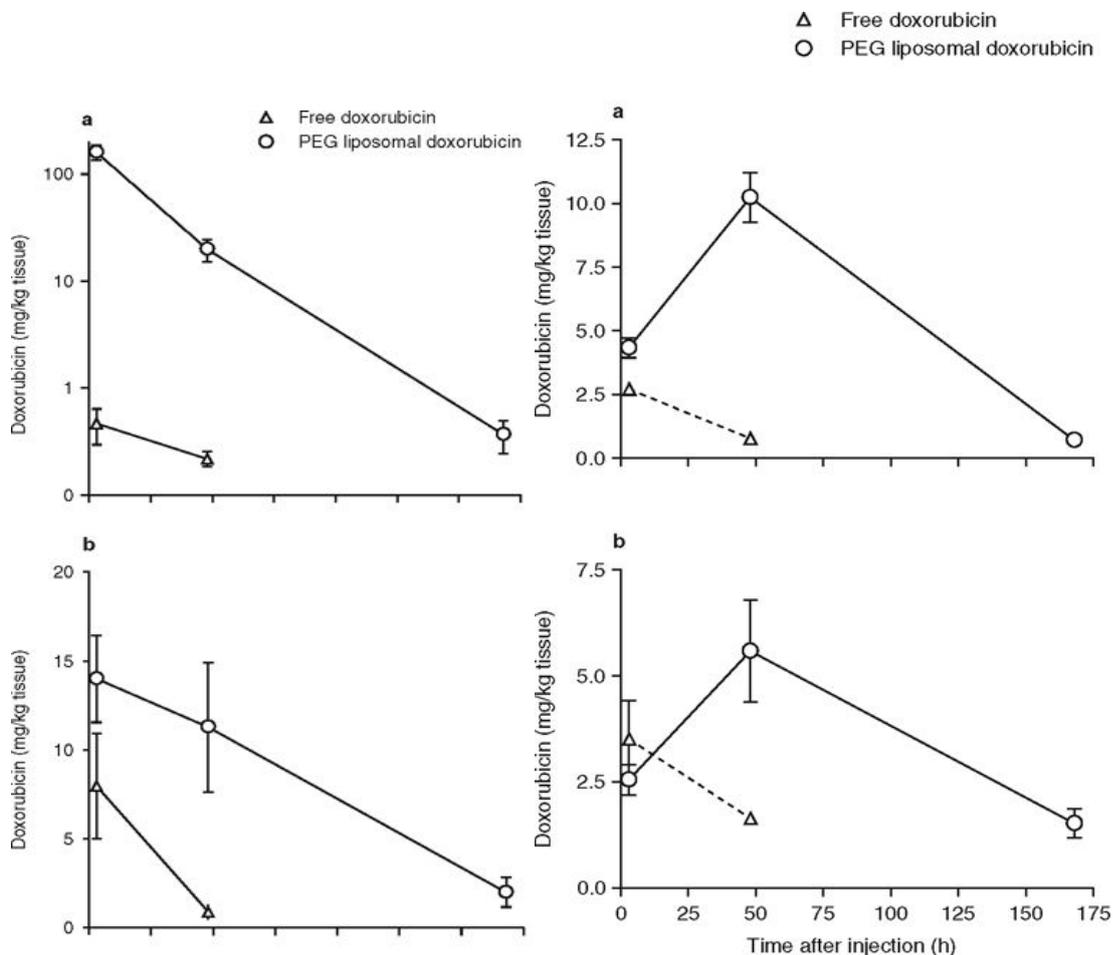


Figure 13 : Différentes concentrations de doxorubicine, (a) plasma (b) foie [16]

Figure 14 : Concentration de doxorubicine dans la peau, (a) N87 (b) A375 [16]

Dans certains cas la concentration dans la tumeur peut être jusqu'à 14 fois plus élevée pour la forme pegylée par rapport à la forme libre [16]. Du fait de cette répartition privilégiée dans les tumeurs, le tissu cérébral sain environnant est épargné. Ceci présente un avantage indéniable par rapport à la forme libre.

## Mécanisme d'accumulation de Caelyx® dans les tumeurs :

Les résultats d'études pharmacocinétiques *in vitro* indiquent une augmentation de doxorubicine dans les tumeurs après administration de Caelyx®. Les travaux permettant d'éclaircir ce phénomène sont basés sur des études morphologiques avec des liposomes fluorescents et des observations microscopiques avec des liposomes coiffés d'or colloïdal. Toutes ces études s'appuient sur le fait qu'un temps de circulation important est indispensable à l'accumulation des liposomes dans les tumeurs. Sur un modèle de tumeurs ascitiques, un processus constant d'extravasation de liposomes à longue durée de circulation se produit dans le compartiment ascitique extracellulaire et provoque une libération progressive de médicament puis une diffusion de celui-ci dans le compartiment cellulaire. Les liposomes circulants, qui s'extravasent dans le liquide extracellulaire de la tumeur en traversant la paroi vasculaire tumorale, restent au niveau des zones périvasculaires avec une faible absorption par les cellules tumorales. Par conséquent peu de liposomes sont internalisés par les cellules tumorales, ils restent aux alentours des micro-vaisseaux tumoraux (Figure 15).

Plusieurs mécanismes au niveau du liquide interstitiel sont proposés :

- une perturbation de l'intégrité de la bicouche liposomale par des phospholipases provoquant une libération lente du médicament
- l'absorption des liposomes par des macrophages infiltrants la tumeur peut être un mécanisme influant la libération de la doxorubicine du liposome.

Une fois le médicament libéré dans l'espace tumoral par ces mécanismes, il atteint les cellules cancéreuses.

Par ailleurs la faible présence de vaisseaux lymphatiques au niveau tumoral explique la séquestration des liposomes dans le compartiment interstitiel, le manque de drainage augmente la concentration du médicament (c'est l'effet EPR : Enhanced Permeability and Retention).

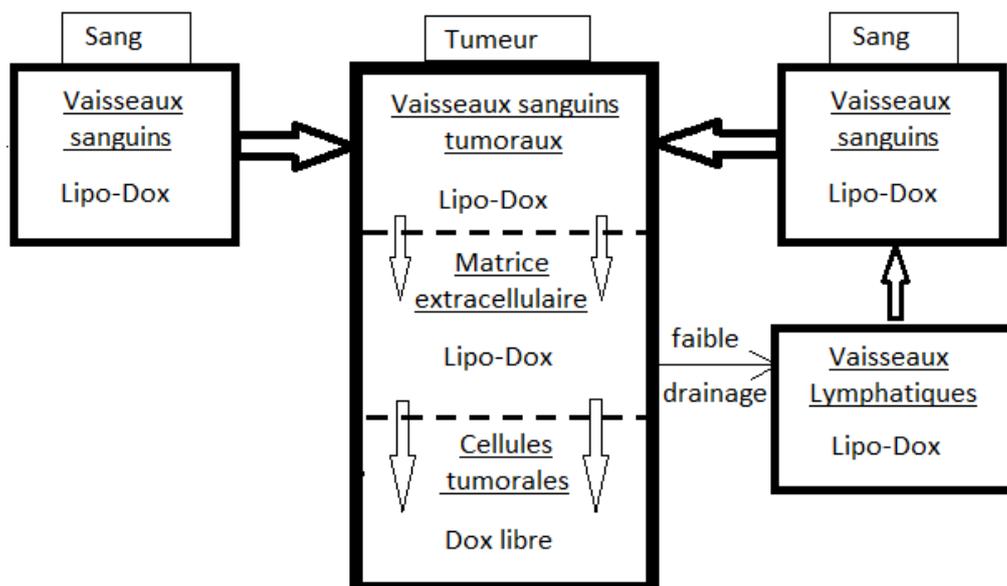


Figure 15 : Mécanisme d'accumulation tumorale du Caelyx®

La concentration de doxorubicine administrée à l'aide de NPs est plus importante dans les cellules tumorales que dans les cellules normales.

Cette observation a été corroborée par plusieurs études :

- *In vivo* sur modèle animal [16]
- Chez l'homme en comparant le traitement par Doxil® (équivalent US de Caelyx®) et celui par Adriblastine (concentration en doxorubicine 16 fois plus importante dans le cas de Doxil® au niveau d'une tumeur ascitique) [16]
- Evaluation de la fixation à l'aide de liposomes radiomarqués [16]
- De même, des biopsies des tissus tumoraux et normaux montrent l'intérêt de l'utilisation du Caelyx® [16]

## Métabolisme et élimination

Le métabolisme et l'élimination du Caelyx® sont similaires à ceux de la forme libre. Le cytochrome p450 transforme la doxorubicine en doxorubicinol (métabolite actif) grâce à une réaction d'oxydoréduction (Figure 16). L'élimination se fait par voies biliaires et/ou urinaires. Mais dans le cas de l'utilisation du Caelyx®, la clairance de la doxorubicine est plus lente car ce dernier se maintient dans la circulation sanguine de façon prolongée.

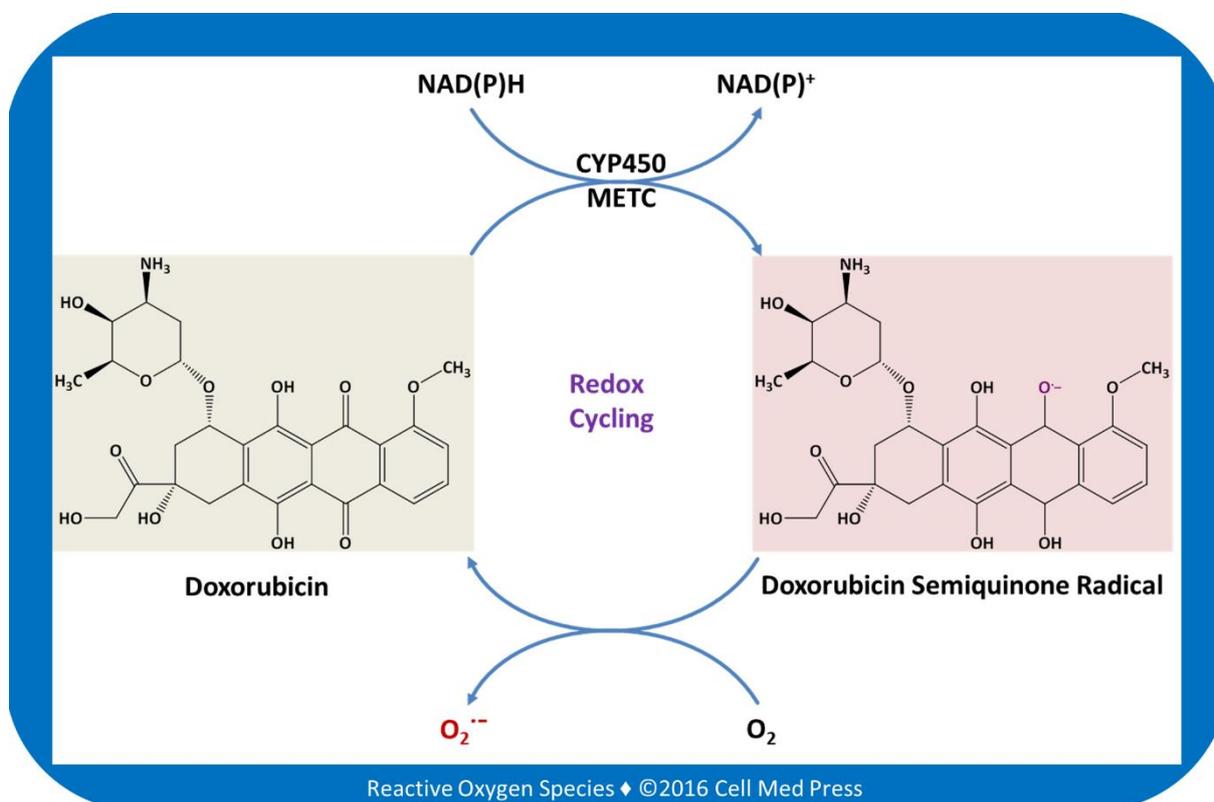


Figure 16 : Métabolisation de la doxorubicine

En résumé, pour la pharmacocinétique, la demi-vie de la doxorubicine est plus importante avec le Caelyx® (55 h selon l'étude comparative de Chang & Yet en 2012) qu'avec les deux autres formes : Myocet® (2,5 h) et Adriblastine® (0,2 h). [12]

Le taux plasmatique de doxorubicinol est considéré comme négligeable lors de l'utilisation du Caelyx® (ce point sera développé dans la partie toxicité). De plus, la forte présence de métabolites dans les urines durant plusieurs jours à la suite du traitement prouve que la doxorubicine libérée par le Caelyx® dans les tissus tumoraux est, *in vivo*, métabolisée en doxorubicinol par le CYP450 à l'endroit même où ce dernier exerce son action. [16]

*Toxicité :*

## Toxicité clinique

Comparaison des différents effets indésirables de Caelyx® par rapport à Adriblastine® : La doxorubicine est toxique une fois métabolisée en doxorubicinol.

En comparant *in vivo* le taux plasmatique des deux formes pour une même dose administrée (50 mg/m<sup>2</sup>), la concentration de Dox libre est 30 fois inférieure avec la forme liposomale par rapport à la forme libre. En effet, le métabolite actif représente 40 à 50% de la concentration plasmatique de Dox libre injectée (Adriblastine®) alors qu'il est seulement de 0,25 à 1,25 % de la concentration totale de Caelyx® injectée. [16] Cette séquestration de doxorubicine à l'intérieur du liposome se traduisant par une faible concentration de Dox libre dans le plasma est une des hypothèses de la faible cardiotoxicité de Caelyx®.

Une étude de phase III sur 254 patientes atteintes d'un cancer du sein métastasé a mis en évidence une toxicité cardiaque significativement différente chez les patientes traitées par Caelyx® et celles traitées par Adriblastine®. Une diminution marquée de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) a été enregistrée pour seulement 10 patientes/254 avec Caelyx® (à 50 mg/m<sup>2</sup> toutes les 4 semaines) contre 48 patientes/254 avec Adriblastine® (à 60 mg/m<sup>2</sup> toutes les 3 semaines). De plus, aucun signe ou symptômes d'insuffisance cardiaque n'a été relevé avec Caelyx® alors qu'il y a eu 10 cas d'insuffisance cardiaque congestive avec Adriblastine®. Cela confirme la faible cardiotoxicité du Caelyx®.

Les réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) à propos de Caelyx® signalent une absence de cardiotoxicité ou une cardiotoxicité faible contrairement à celles d'Adriblastine® qui indiquent une cardiomyopathie et une insuffisance cardiaque congestive tout comme le Myocet® (doxorubicine liposomale simple) [12]. Le Caelyx® peut même être utilisé lors d'insuffisance myocardique sévère, d'infarctus du myocarde récent ou d'arythmie sévère. Une diminution des neutropénies, des nausées et vomissements, des alopecies et de la myélosuppression est également observée lors de l'utilisation du Caelyx®.

Cependant, il y a une augmentation des mucites, des stomatites et des érythrodysesthésies palmo-plantaires (EPI= syndrome main-pied) avec Caelyx®.

Cette toxicité cutanée est dose-limitante et conduit, dans certains cas, à l'arrêt du traitement, mais le syndrome est lié au schéma thérapeutique et son incidence peut être réduite en augmentant l'intervalle entre les cures de 2 semaines en plus des 4 semaines initiales.

Une étude a révélé une corrélation entre la demi-vie circulante du Doxil® et l'apparition de l'EPI. [16] Cette étude montre également que les patients développent rarement un EPI quand Doxil® est associé au cisplatine. En effet, le cisplatine stimule la clairance du Doxil®, réduit sa demi-vie circulante, diminuant ainsi le risque de survenue d'une toxicité cutanée. D'autres études sont en cours afin d'évaluer si cette association ne réduit pas l'activité anticancéreuse ou n'augmente pas à nouveau la toxicité cardiaque. [16]

### Imagerie :

Dans le cas du Caelyx®, l'imagerie sert à observer l'évolution de la tumeur ainsi que l'efficacité du traitement grâce à la sélectivité des liposomes pour le tissu tumoral et la fluorescence naturelle rouge de la doxorubicine. La fluorescence rouge de la doxorubicine une

fois libérée montre son cheminement jusqu'au site d'action cible : la cellule tumorale. L'intérêt du suivi de l'efficacité du traitement est limité car la fluorescence naturelle de la doxorubicine est partiellement éteinte lorsque cette dernière se lie à l'ADN. Pour cette raison, les liposomes ont été marqués à l'or colloïdal pour permettre un meilleur suivi de l'accumulation du produit dans le liquide interstitiel.

## B- Intérêt des nanoparticules liposomales modifiées de doxorubicine dans le traitement des gliomes

### *Généralités sur les tumeurs cérébrales :*

En France et en 2015, selon le rapport de l'INVS (Institut National de Veille Sanitaire), l'incidence des tumeurs cérébrales primitives était de 21 cas diagnostiqués pour 100 000 habitants. En 2017, le nombre de cas était de 5 551 dont 3 806 décès. Le traitement à base de chimiothérapie des tumeurs cérébrales est généralement limité par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière est une barrière neuroprotectrice pour le cerveau, elle maintient et régule l'homéostasie cérébrale. Les gliomes eux représentent 1/3 des tumeurs cérébrales toutes histologies confondues. Le glioblastome (Figure 17) représente 19 % des tumeurs cérébrales et plus précisément 57 % des gliomes. Le glioblastome est une tumeur incurable des astrocytes qui évolue très rapidement. Les traitements actuels sont : chirurgicaux si la tumeur est superficielle, ou radio-chimio thérapeutiques à base de temozolomide. Ces traitements permettent d'augmenter le temps de survie. En 2015, la survie médiane après le début du traitement était d'une quinzaine de mois. Dans les meilleurs pronostics, la survie ne dépasse qu'exceptionnellement les 2 ans et demi. Les traitements peuvent agir en perturbant la BHE par un déséquilibre osmotique, mais cette perturbation entraîne bien souvent des complications et nécessite des installations particulières en plus de traitements spécialisés pouvant être très onéreux.

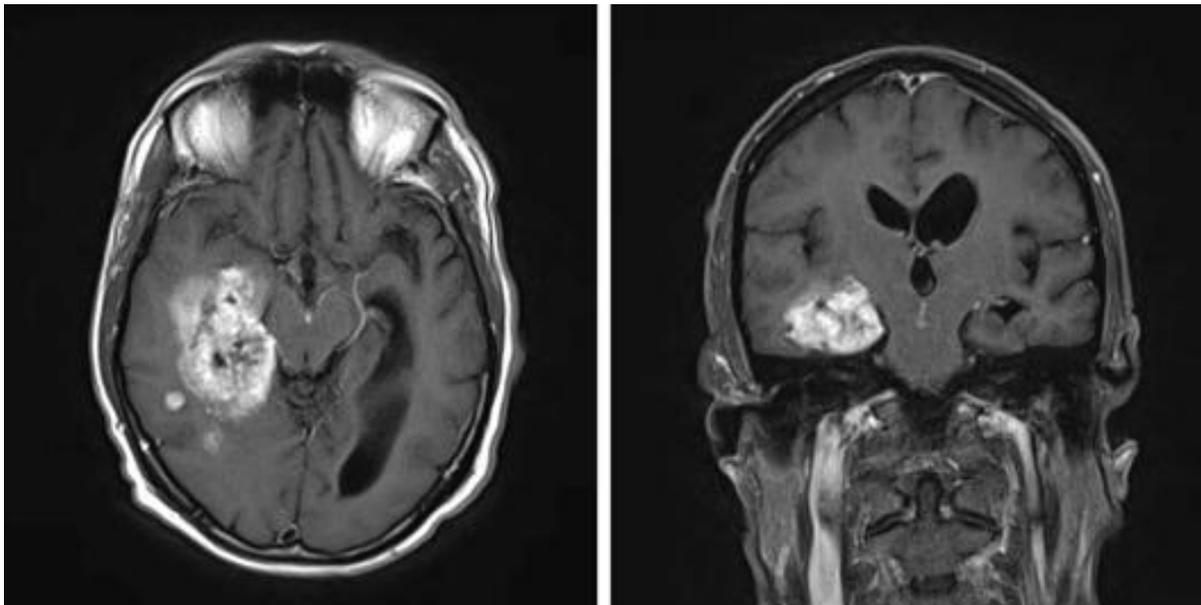


Figure 17 : Glioblastome

Certains chercheurs ont choisi d'utiliser la doxorubicine pour son fort pouvoir cytotoxique. <sup>[16]</sup> L'utilisation de la doxorubicine sous sa forme libre est efficace dans le traitement des tumeurs cérébrales malignes lorsqu'elle est directement injectée dans la région tumorale du cerveau. A contrario, lorsqu'elle est injectée par voie vasculaire, seulement une faible proportion de doxorubicine est retrouvée au niveau cérébral, quantité insuffisante pour avoir une quelconque incidence sur la tumeur.

Dans un modèle de xénogreffe humaine implantée chez la souris, la concentration et l'accumulation tumorale de doxorubicine liposomale pégylée peut être jusqu'à 14 fois

supérieure à la concentration de Dox libre. <sup>[16]</sup> En conséquence, des chercheurs ont pharmacomodulé ces nanoliposomes dans le but d'augmenter le ciblage sélectif du tissu cérébral tumoral tout en conservant un haut profil de sécurité pour améliorer le traitement du glioblastome.

Nous avons choisi deux exemples de nanoliposome modifié pour illustrer notre propos :

- l'un à l'aide du glutathion combiné à la pégylation sur le Caelyx<sup>®</sup>, appelé 2B3-101,
- l'autre à l'aide du sulfatide qui sera un des composants de la couche lipidique du liposome, appelé SCN-DOX (ou SCL-DOX).

### *Doxorubicine liposomale pégylée de glutathion (2B3-101) :*

Son efficacité a été testée dans un modèle murin de glioblastome multiforme, elle sera comparée à l'utilisation de Dox libre et de Caelyx<sup>®</sup>. <sup>[15]</sup>

La pertinence de l'utilisation du glutathion (Figure 18) réside dans le fait que ce dernier est un tripeptide endogène du corps humain qui est physiologiquement transporté de manière active à travers la BHE. Il est utilisé dans le cas présent comme ligand de ciblage couplé au liposome de doxorubicine pégylé (2B3-101) pour augmenter de manière sûre l'administration du médicament au cerveau et plus spécifiquement à la tumeur.

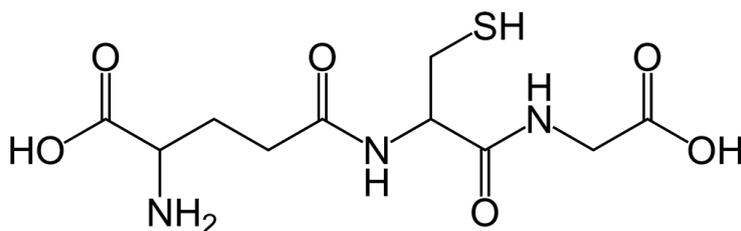


Figure 18: Représentation topologique de la molécule de glutathion

## **Méthode**

La fabrication des liposomes 2B3-101 est similaire à celle du Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup> hormis l'ajout de glutathion qui est réalisé par incubation de ce dernier avec DSPE-PEG pour obtenir au final des entités GSH-PEG-DSPE qui représentent 5 % des lipides totaux du liposome. La doxorubicine est ensuite internalisée de manière similaire au Caelyx<sup>®</sup>.

Des cellules de glioblastome humain (U-87MG) sont injectées directement dans les cerveaux de souris, ce qui provoque le développement de tumeurs cérébrales vascularisées. Les effets de l'administration de 5 mg/kg/semaine d'Adriablastine<sup>®</sup> (dose maximale tolérable), de Caelyx<sup>®</sup> ou de 2B3-101 à la posologie de 5 mg/kg deux fois par semaine sont ensuite comparés. La survie est évaluée avec les différents traitements.

## **Résultats**

En premier lieu, l'absorption de 2B3-101 *versus* Caelyx<sup>®</sup>, par les cellules endothéliales du cerveau humain qui composent la BHE a été évaluée *in vitro*.

L'expérience utilisant les cellules hCMEC/D3 montre, par la mesure de la IMF (Intensité Moyenne de Fluorescence), une fluorescence plus importante avec 2B3-101 qu'avec PEG-lipo-

Dox (ou Caelyx®) pour une même concentration de 450 µg/mL et ce quelle que soit la durée d'incubation (Figure 19A). Ceci permet de supposer qu'en condition physiologique *in vivo*, les cellules endothéliales composant la BHE internalisent préférentiellement les liposomes 2B3-101 pour toutes les concentrations comprises entre 50 et 450 µg/mL (Figure 19B). Ce qui démontre un ciblage spécifique de 2B3-101 pour les cellules endothéliales du cerveau humain.

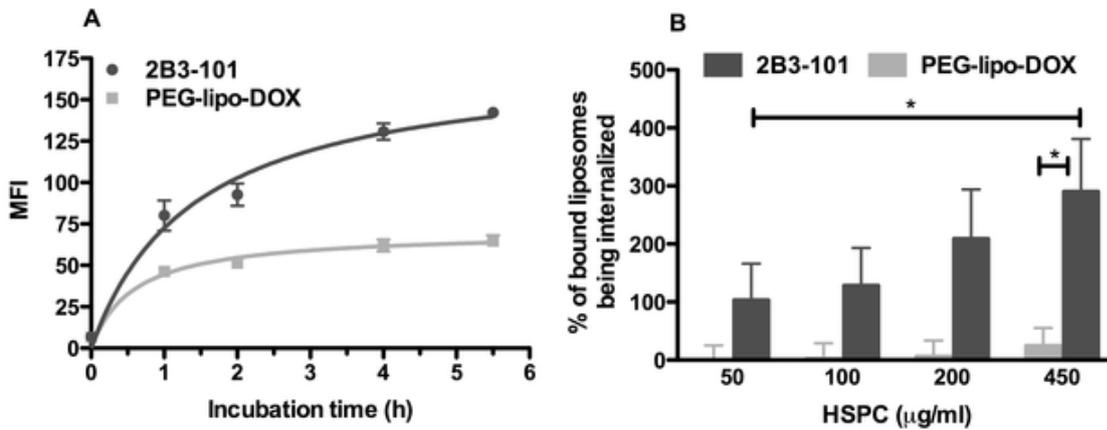


Figure 19 : Absorption de 2B3-101 et de PEG-lipo-DOX par les cellules endothéliales (hCMEC/D3) du cerveau humain.

A : Intensité Moyenne de fluorescence (MFI) émise par les cellules à 37°C au cours du temps

B : Pourcentage de liposomes internalisés par les cellules à différentes concentrations HSPC<sup>[15]</sup>

D'un point de vue pharmacocinétique, les mesures de concentration de doxorubicine marquée au carbone-14 montrent un profil identique entre les deux formes liposomales et confirment un temps de circulation prolongé par rapport à la forme Dox libre. Ces mesures ont été effectuées pour une dose équivalente de doxorubicine (5 mg/kg) administrée *in vivo* à des souris (Figure 20). L'analyse tissulaire associée, montre une biodistribution différentielle entre les trois produits. Une quantité plus importante de liposomes 2B3-101 a été distribuée au cerveau, au foie et à la rate alors que la forme liposomale équivalente au Caelyx® a été davantage retrouvée au niveau des reins, du cœur et surtout au niveau de la peau où elle prédomine sur les deux autres formes. La forme libre a été distribuée davantage au muscle et à la vessie. Au niveau du tissu cérébral, cette analyse *in vivo* confirme le taux de doxorubicine plus important chez les animaux ayant reçu 2B3-101 (Figure 20).

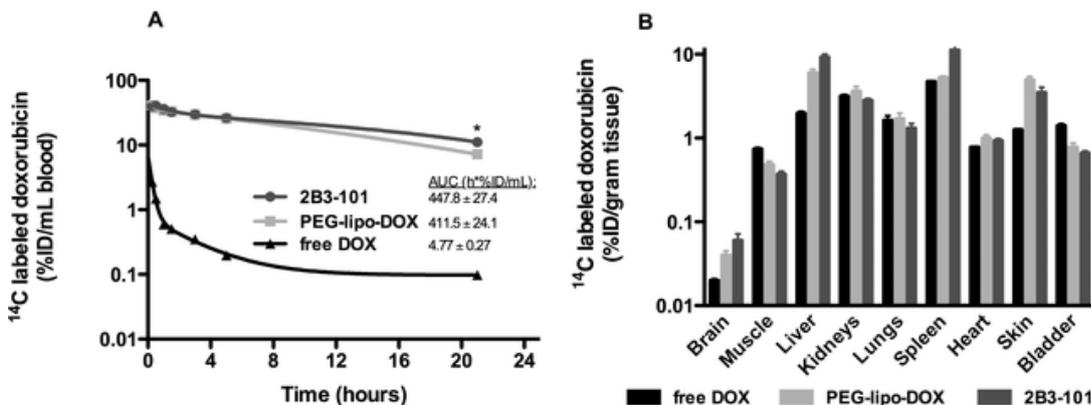


Figure 20 : Analyse pharmacocinétique et de la biodistribution de 2B3-101, PEG-lipo-DOX et de doxorubicine libre.<sup>[15]</sup>

Une analyse pharmacocinétique comparant les deux formes liposomales sur du long terme (4 jours) montre un profil similaire. Même si vers le quatrième jour, la concentration plasmatique de doxorubicine 2B3-101 est légèrement supérieure, au niveau cérébral, la

nanoparticule modifiée au glutathion est retrouvée en plus grande quantité par rapport à la quantité plasmatique mais également par rapport à la forme liposomale pégylée (Figure 21).

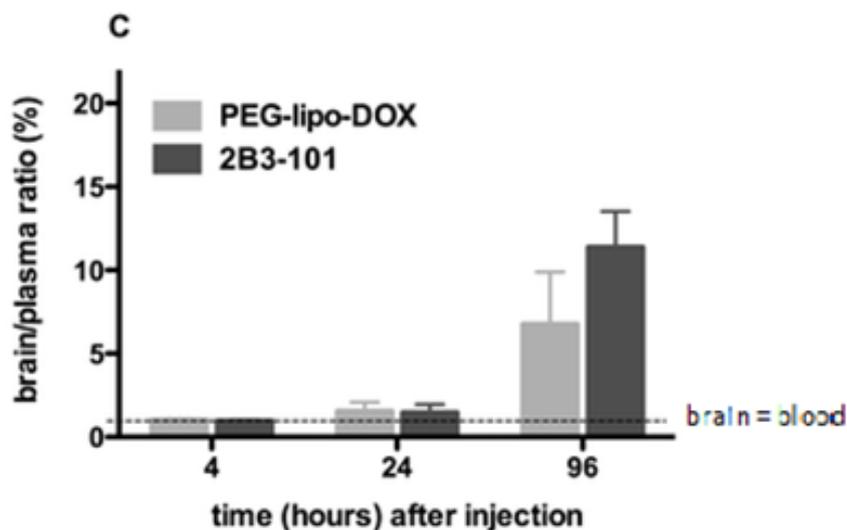


Figure 21 : Ratio d'absorption cérébrale des liposomes à 4, 24 et 96 h après injection (la limite des pointillés indique une quantité de liposomes dans le cerveau égale à celle du sang)<sup>[15]</sup>

Observons maintenant le profil d'efficacité sur des tumeurs cérébrales implantées dans des cerveaux de souris athymiques. Cette expérience a été faite avec un traitement hebdomadaire de 5 mg/kg de doxorubicine sous les trois formes (i.e. libre, PEG-lipo-DOX, 2B3-101) et une solution saline comme témoin. La mesure de l'inhibition de la croissance tumorale a été quantifiée par bioluminescence (BLI) en fonction du temps (en jour après le début du traitement).

*In vivo*, 17 jours après le début du traitement, la bioluminescence quantifiant la croissance tumorale est plus faible avec 2B3-101 (Figure 22A). De plus, deux des neuf souris ayant reçu 2B3-101 présentent une régression complète des tumeurs, ce qui n'a pas été observée dans les autres groupes.

Lorsque les injections ont été doublées (pour les formes liposomales seulement) à 5 mg/kg deux fois par semaine, la réduction de la croissance tumorale a été encore plus importante (Figure 22B) et là encore, une régression complète a été observée chez un animal. Ce qui signifie que le produit 2B3-101 présente une efficacité supérieure aux autres formes de doxorubicine. L'étude sur la survie porte sur l'intégralité des souris ayant reçu deux injections par semaine car aucune d'entre elles n'a perdu de poids contrairement à trois des souris du groupe de solution saline et deux du groupe de la doxorubicine (leur poids corporel a chuté de plus de 20 %). En utilisant une dose de doxorubicine deux fois supérieure à la dose maximale tolérée de Dox libre, un accroissement du temps de survie médian de 38,5 % est constaté avec 2B3-101 par rapport à la solution saline, et de 16,1 % par rapport au Doxil® (Figure 22C).

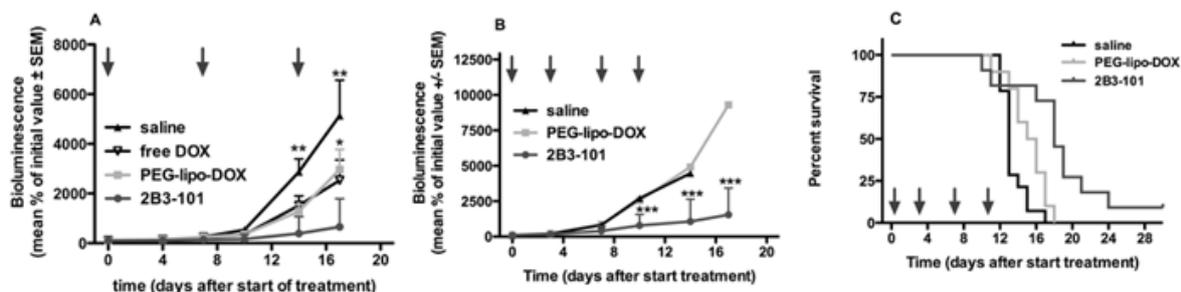


Figure 22 : Inhibition de la croissance des tumeurs cérébrales par 2B3-101 avec un glioblastome expérimental chez des souris. <sup>[15]</sup>

A : Mesure par bioluminescence de la croissance des tumeurs cérébrales après traitement hebdomadaire de doxorubicine libre, PEG-lipo-DOX, 2B3-101 et solution saline

B : Mesure par bioluminescence de la croissance tumorale avec des doses doublées de 2B3-101 et PEG-lipo-DOX

C : Mesure du temps de survie des animaux après doublement des doses de traitement.

Dans le cadre de l'évaluation d'effets indésirables, la surveillance des souris a montré des réactions cutanées modérées à sévères chez les animaux traités par doxorubicine liposomale pegylé et 2B3-101 mais pas avec la Dox libre quelle que soit la fréquence des injections. Malgré tout, en comparaison de la grande toxicité cardiaque de la Dox libre et de la moindre distribution cutanée de 2B3-101 par rapport au Caelyx<sup>®</sup>, le profil de sécurité de 2B3-101 est jugé acceptable en raison de l'efficacité du traitement sur les cancers, de la toxicité qui n'est pas dose cumulative et des réactions cutanées réversibles à l'arrêt du traitement.

### *Doxorubicine nanoliposomale comportant des sulfatides (SCN-DOX) :*

Dans cette étude, le nanoliposome à base de sulfatide est comparé à la Dox libre dans le modèle de xénogreffe de glioblastome humain U-118MG <sup>[14]</sup> et également au liposome pegylé de doxorubicine dans le glioblastome humain de type U-87MG <sup>[17]</sup> chez des souris. Les profils de pharmacocinétique, cytotoxicité, et l'efficacité thérapeutiques sont discutés.

Le sulfatide (Figure 23) est un lipide naturellement présent dans le corps humain notamment au niveau cérébral ce qui fait de lui un composant idéal des nanoliposomes. En effet, le sulfatide est impliqué au niveau biologique dans de nombreux processus comme l'adhésion cellulaire, le trafic de protéines, la transduction de signal pour des réponses inflammatoires et la plasticité neuronale. Il se lie à la ténascine-C de la matrice extracellulaire qui est surexprimée dans de nombreux cancers solides, dont les tumeurs cérébrales malignes. Il est associé dans l'étude qui nous intéresse avec le 1,2 dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) qui est un phospholipide présent dans les cellules humaines.

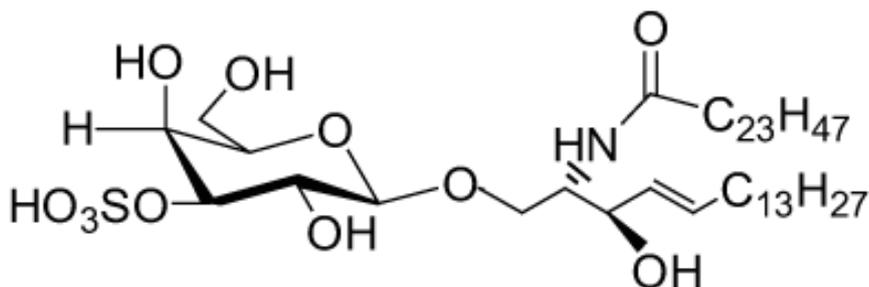


Figure 23 : Représentation topologique de la molécule de sulfatide

## Méthode

Pour la préparation des liposomes, les sulfatides ont été incorporés dès le début de la formulation des vésicules unilinéaires avec du DOPE avec un rapport DOPE/sulfatide de 7/3. Puis des extrusions successives ont été réalisées à travers des membranes munies de pores de 100 nm de diamètre pour obtenir des liposomes de taille inférieure ou égale à 100 nm. Ensuite, l'internalisation de la Dox dans les liposomes se fait avec le même protocole que pour la préparation du Caelyx®. Environ 90 % de la doxorubicine est encapsulée, les 10 % de Dox libre restants sont éliminés à l'aide d'une chromatographie (colonne Sephadex G-50 avec du PBS dégazé).

Les études *in vitro* ont été menées et suivies par l'examen des cellules en utilisant un microscope inversé (Olympus IX71) et un système de microscopie confocale à balayage laser se basant sur la fluorescence naturelle de la doxorubicine. Cette technique a permis d'analyser l'absorption *in vitro* de la Dox libre et des formes liposomales par les cellules tumorales U-118MG et U-87MG. Le marquage des liposomes a parfois été effectué pour une visualisation optimale.

Des dosages sanguins et tissulaires ont ensuite permis l'étude *in vivo* de la biodistribution et de la pharmacocinétique des liposomes SCN-DOX (aussi appelés SCL-DOX). La dernière étape cruciale est la mesure de l'efficacité antitumorale. Celle-ci sera mesurée après implantation de tumeurs chez des souris athymiques. Quelques jours sont suffisants pour obtenir des glioblastomes de taille satisfaisante afin de réaliser cette étude.

## Résultats

Les nanoliposomes contenant du sulfatide sont composés de deux lipides naturellement présents dans les cellules humaines, d'où une biocompatibilité et une biodégradabilité totale dans le corps humain. La matrice extra-cellulaire (MEC) des tumeurs, notamment des gliomes, surexpriment une glycoprotéine : la ténascine-c (TN-C). Les sulfatides se lient à plusieurs glycoprotéines, notamment à celle-ci. Les nanoliposomes contenant des sulfatides devraient interagir avec les cellules glioblastiques tout en épargnant le tissu environnant sain qui lui, ne surexprime pas la TN-C.

Différents lipides à diverses concentrations ont été utilisés pour confectionner plusieurs liposomes. Ceux-ci sont mis en présence de glioblastome U-87MG. *In vitro* le glioblastome internalise préférentiellement les liposomes composés de sulfatides plutôt que ceux composés d'autres lipides (Figure 24).

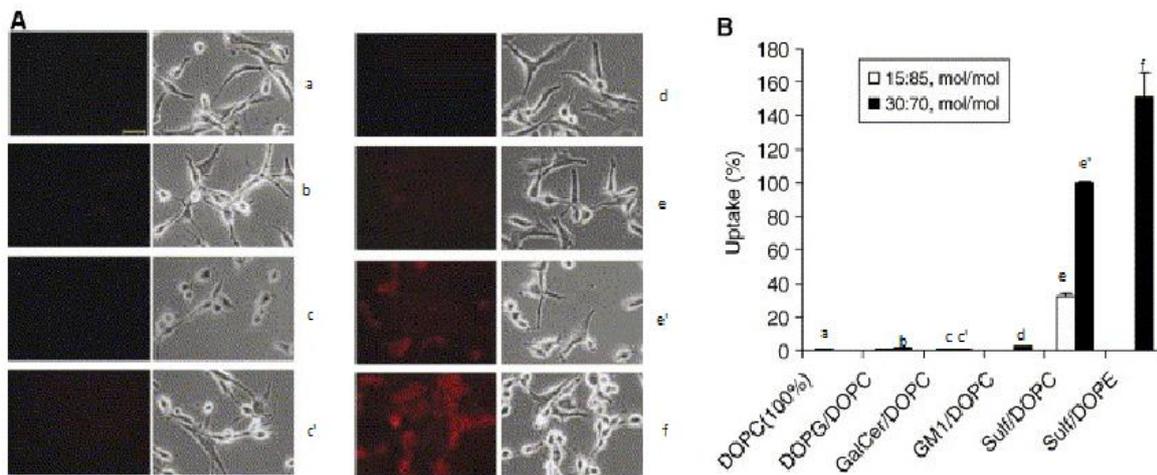


Figure 24 :  
 A : internalisation par les cellules U-87MG de liposomes à différentes concentrations, Image de gauche de haut en bas : (a) DOPC (témoin) ; (b) DOPG/DOPC (30:70, mol / mol) ; (c) GalCer / DOPC (15:85, mol / mol) ; (c') GalCer / DOPC (30:70, mol / mol), Image de droite de haut en bas : (d) GM1 / DOPC (30:70, mol / mol) ; (e) sulfatide / DOPC (15:85, mol / mol) ; (e') sulfatide / DOPC (30:70, mol / mol) ; (f) sulfatide / DOPE (30:70, mol / mol)  
 B : Analyse quantitative de l'internalisation de différents liposomes par les cellules tumorales. [17]

Les sulfatides sont donc essentiels pour une meilleure internalisation des liposomes par ce type de cellules cancéreuses.

Intrinsèquement la fluorescence de Dox libre est plus intense que celle de SCN-DOX. D'autre part, quand la doxorubicine est liée à l'ADN sa fluorescence est partiellement éteinte [16]. L'examen des images obtenues *in vitro* présentées figure 25 montre que SCN-DOX reste intact plus longtemps dans le cytoplasme des cellules de glioblastomes. Il arrive de retrouver du SCN-DOX jusqu'à 24 h après lavage par PBS [14] suggérant une rétention bien plus importante de doxorubicine dans les cellules. Une meilleure efficacité antitumorale et une imagerie plus performante sont attendues *in vivo* avec SCN-DOX.

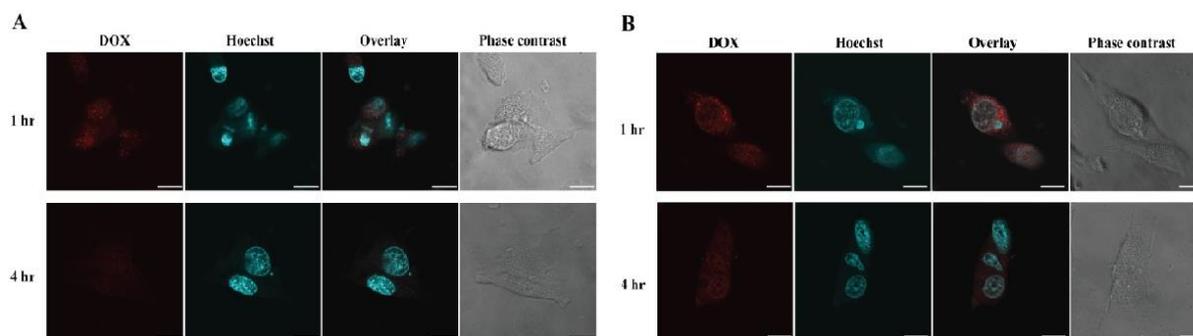


Figure 25 : Accumulation et rétention de Dox libre (A) et de SCN-DOX (B) dans le cytoplasme des cellules U-118MG. Couleur bleu : noyau coloré hoechst 33342, couleur rouge : fluorescence de doxorubicine qui s'accumule dans le cytoplasme. Les cellules tumorales ont été lavées à 1 h et 4 h après la mise en contact avec la Dox par du PBS. [14]

Le pouvoir cytotoxique a été analysé *in vivo* et comparé au Caelyx® et à la Dox libre (Figure 26). Malgré un pouvoir cytotoxique légèrement inférieur à celui de la Dox libre, la doxorubicine encapsulée dans des nanoliposomes composés de sulfatide a une activité bien plus importante que les liposomes pégylés de doxorubicine (Caelyx®).

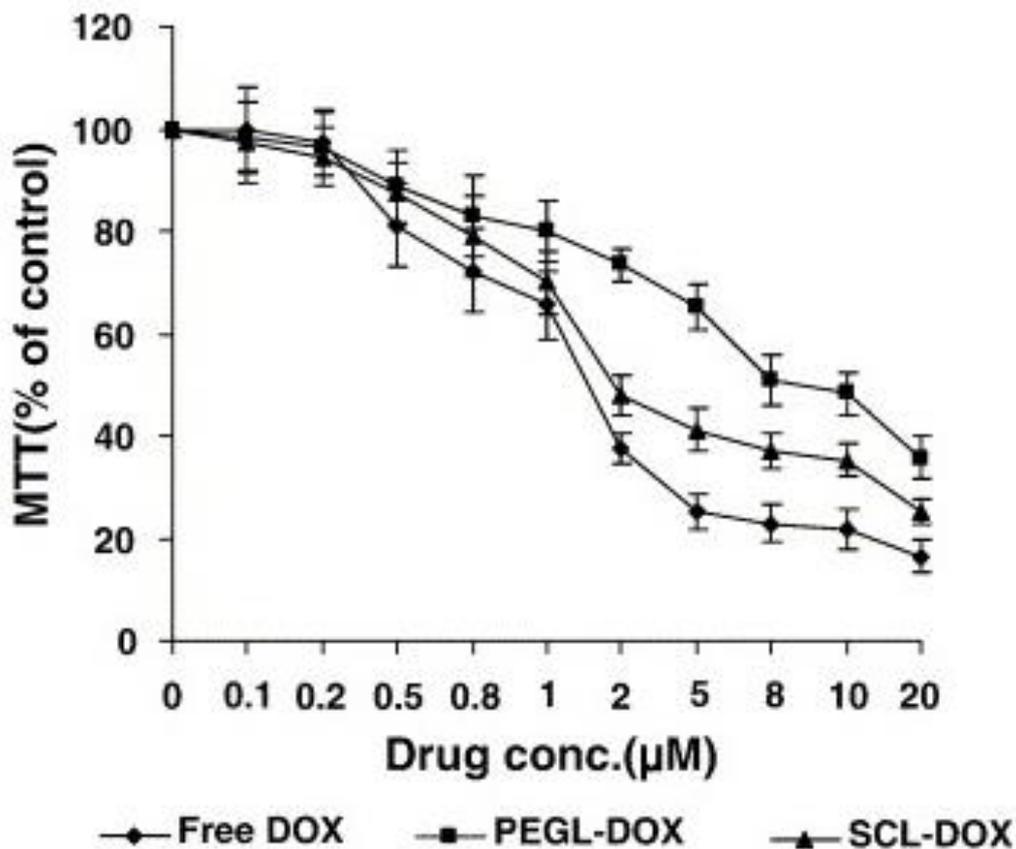


Figure 26 : Cytotoxicité de DOX délivrée aux cellules U-87MG par les trois différentes formes. [17]

La distribution tissulaire *in vivo* dans le modèle murin sain a été étudiée soigneusement après injection de Dox libre et de SCN-DOX à la dose unique de 5 mg/kg, au bout de 30 min, 2 h, 4 h et 24 h après injection. Ensuite le dosage de doxorubicine ou de SCN-DOX dans les différents organes a été effectué à différents moments après euthanasie des souris.

Les résultats suivants sont observés :

- une moindre accumulation dans le cœur, les poumons et les reins de SCN-DOX par rapport à la Dox libre,
- une accumulation plus importante au niveau du foie et de la rate (Figure 27).

Cet écart de distribution important au niveau du cœur confirme le très net avantage de la forme liposomale sulfatide *versus* la forme libre dans le traitement du cancer. En raison d'un profil de toxicité abaissé, SCN-DOX pourrait être utilisé à des dosages plus importants et/ou sur une durée plus grande.

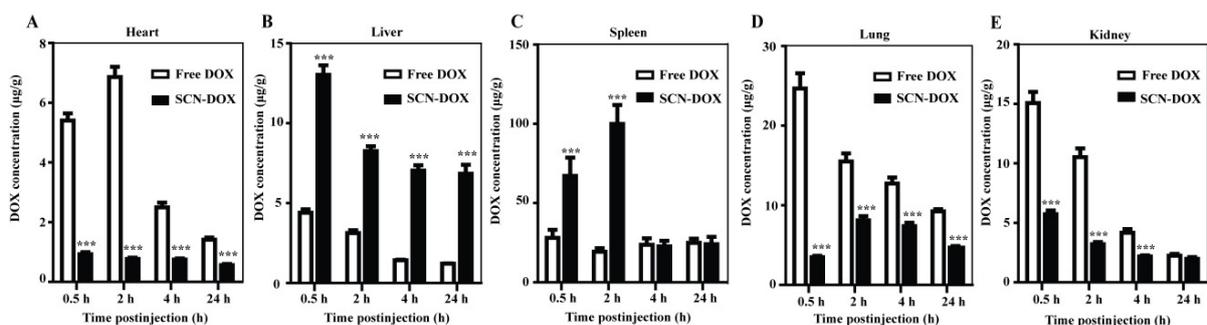


Figure 27 : Distribution tissulaire de Dox libre et SCN-DOX chez des souris saines [14]

La présence accrue des NPs dans le foie et la rate est en lien avec un temps de circulation de la forme liposomale plus long. SCN-DOX avec un volume de distribution de 0,73 L/kg possède un temps de  $\frac{1}{2}$  vie d'élimination de 41 h 53 min alors que la Dox libre avec un volume de distribution de 18,36 L/kg a un temps de  $\frac{1}{2}$  vie d'élimination de 20 h 39 min. <sup>[14]</sup>

Malgré une présence importante dans le foie de SCN-DOX, l'impact sur le taux de ASAT, marqueur de lésion hépatique, semble minime. Cet impact est similaire à celui de la solution saline témoin ce qui suggère que malgré une forte présence hépatique, il ne semble pas y avoir de détérioration du foie. Concernant le taux de créatine kinase (CK), marqueur de lésion cardiaque, les résultats sont similaires : un taux à peu près identique pour la solution saline et le SCN-DOX mais un taux bien plus important pour la Dox libre (Figure 28).

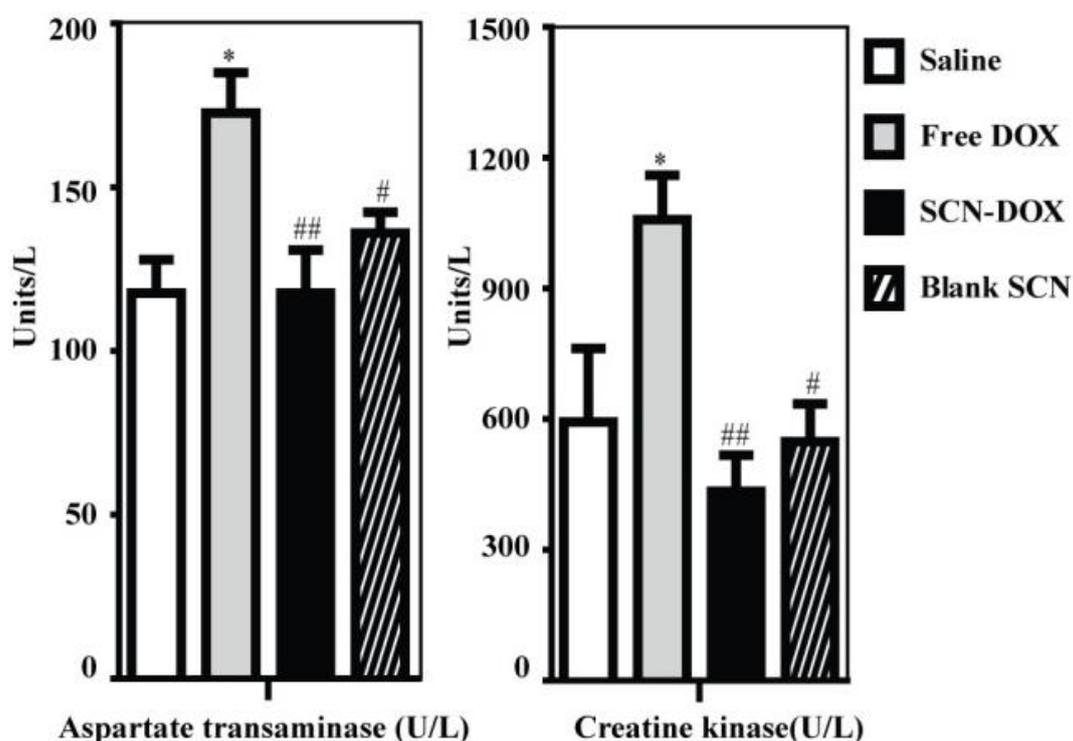


Figure 28 : Dosages ASAT et CK plasmatique de souris porteuses de tumeur U-118MG suite à l'injection de solution saline, doxorubicine libre, SCN et SCN-DOX. <sup>[14]</sup>

Nous allons maintenant nous intéresser aux études de biodistribution menées sur un modèle de xénogreffe de tumeur U-118MG. Comme le suggéraient les études *in vitro* exposées précédemment, SCN-DOX est davantage fixé sur les tumeurs que la Dox libre (Figure 29).

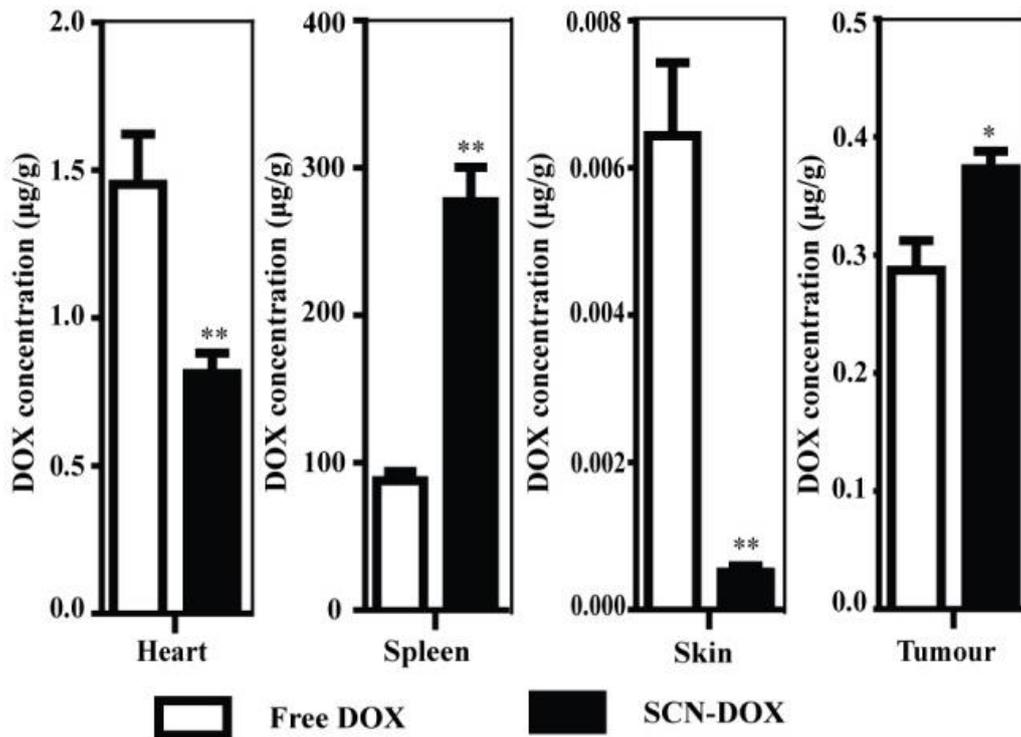


Figure 29 : Biodistribution de doxorubicine encapsulée dans SCN ou libre chez des souris porteuses de tumeur. [14]

L'action de SCN-DOX *versus* celles de la Dox libre ou du PEG-lipo-DOX, a été mesurée pour évaluer son efficacité thérapeutique.

L'étude a été réalisée avec deux injections de 3 mg/kg des différents produits à J16 et à J23 après implantation de la tumeur. *In vivo* l'utilisation de SCN-DOX présente un avantage vis-à-vis de son proche homologue PEG-lipo-DOX où l'on voit à J30 un plus grand retard de croissance tumorale. Compte tenu de l'écart-type moyen, une efficacité similaire du traitement est observée entre la Dox libre et la SCN-DOX (Figure 30A).

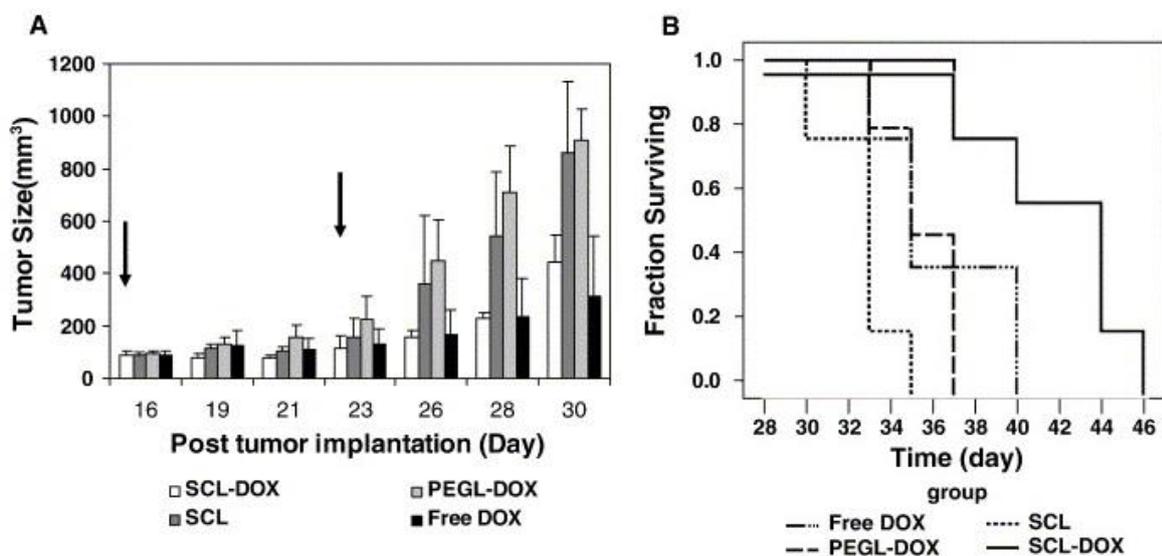


Figure 30 : Efficacité du traitement sur des souris portant des tumeurs U-87MG. A : effets des différents traitements sur la croissance tumorale (SCL = SCN). B : Effets des différents traitements sur la durée de survie (SCL = SCN). [17]

L'observation de la Figure 30B, montre que Dox libre permet une augmentation de survie de 6,7 % par rapport au groupe témoin alors que SCN-DOX entraîne une augmentation de la durée de survie de plus de 30 % sur les souris témoins. Pour conclure, malgré une efficacité plus ou moins similaire entre la Dox libre et SCN-DOX sur la croissance tumorale, seul SCN-DOX semble avoir un impact positif sur la durée de vie des animaux traités.

Quelques années plus tard, dans l'étude effectuée par Lin, J *et al.* [14], sur une autre lignée tumorale, le bénéfice apporté par l'utilisation de SCN-DOX est confirmé. Une fois que les tumeurs U-118MG ont atteint une dimension suffisante (150 mm<sup>3</sup>) des injections de 5 mg/kg de Dox libre, solution saline, SCN vide et de SCN-DOX ont été réalisées une fois par semaine pendant 6 semaines. Une meilleure efficacité des deux formulations contenant de la doxorubicine sur la taille des tumeurs est constatée par rapport à celles sans doxorubicine et à la solution saline témoin. Cependant, comme le présente la figure 31A, il y a une croissance plus importante des tumeurs chez les souris recevant la Dox libre par rapport aux souris recevant SCN-DOX. Les tumeurs à J35 sont passées de 150 mm<sup>3</sup> à 154,76 ± 12,53 mm<sup>3</sup> pour le groupe Dox libre et à 97,29 ± 10,71 mm<sup>3</sup> pour le groupe SCN-DOX. Une diminution de la masse tumorale est même constatée lors de l'utilisation de SCN-DOX.

Sur la Figure 31B, la SCN-DOX permet une durée de survie médiane de 93 jours. Cette durée de survie moyenne est 2,07 fois plus importante qu'avec la solution saline et 1,52 fois plus importante qu'avec la Dox libre. Il faut signaler que les souris ont été sacrifiées lorsqu'une perte de poids de plus de 15 % a été constatée.

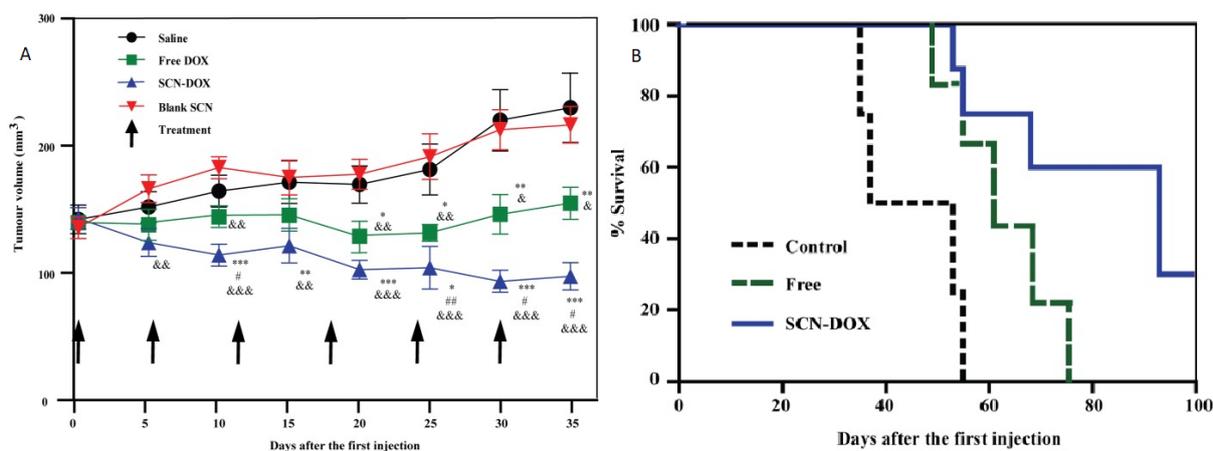


Figure 31 :

A : Évaluation des activités thérapeutiques sur des modèles murins de xénogreffes U-118MG

B : Courbe de survie des souris porteuses de tumeurs traitées par Dox libre et SCN-DOX. [14]

**L'efficacité thérapeutique, l'augmentation du temps de survie et la réduction remarquable de la toxicité des formes liposomales modifiées de DOX en font un outil potentiel de choix pour l'étude des phases cliniques sur le glioblastome. Il serait intéressant de faire une évaluation du rapport bénéfice/risque de l'utilisation des nanoparticules *versus* les traitements actuellement utilisés sur les glioblastomes.**

## C- Résumé

Le Caelyx® (ou Doxil®, PEG-lipo-DOX) est actuellement utilisé dans le traitement de divers cancers :

- cancer de l'ovaire,
- cancer du sein,
- sarcome de Kaposi chez les patients séropositifs,
- myélome multiple en association avec le bortezomid.

Nous relevons également des utilisations hors AMM du Caelyx®. En effet, son utilisation semble avoir des effets bénéfiques intéressants dans le traitement des lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, mais également dans celui des cancers de l'appareil reproducteur chez la femme (hors cancers ovariens).

Ce large panel d'indications se justifie notamment par les propriétés pharmacocinétiques intéressantes de cette formulation : temps de circulation allongé et faible volume de distribution. Ces propriétés s'expliquent par la présence à la surface des liposomes, d'un polymère hydrophile faiblement anionique : le MPEG. L'encombrement stérique induit par le MPEG protège le liposome des diverses interactions qui pourraient déstabiliser sa membrane. De plus, il est à noter que la principale qualité de cette formulation est sa toxicité cardiaque moindre, par rapport à la toxicité induite par la Dox libre.

Concernant ses effets indésirables, une accumulation au niveau de la peau provoquant des EPI (tout comme pour le 2B3-101) a été rapportée. Ceci provoque parfois l'arrêt du traitement. Des études récentes semblent montrer que son utilisation conjointe avec le cisplatine, permettrait d'augmenter l'élimination rénale du Caelyx® et donc de réduire sa toxicité cutanée.

Le Doxil® a été le premier traitement basé sur les NPs à être commercialisé. Il est le précurseur d'une nouvelle génération de nanomédicaments qui permettront à terme de sécuriser les chimiothérapies. La libération du principe actif directement sur la cible thérapeutique pourrait permettre d'amoindrir la toxicité générale des cytotoxiques.

En termes d'efficacité sur le glioblastome, le Caelyx® a montré ses limites. Des formulations à base de glutathion (pseudo tripeptide) ou de sulfatide (lipide) tous deux présents ou utilisables au niveau cérébral ont été imaginées. La formulation 2B3-101 : liposome de doxorubicine pégylé par du glutathion, a décrit une meilleure efficacité que la Dox libre, ou le Caelyx® sur ce type de cancer. De plus, les études pré-cliniques *in vivo* sur modèle murin, traité par le 2B3-101, ont montré chez certains individus une suppression totale de la tumeur.

La formulation à base de sulfatides : SCN-DOX a également été testée. Sa toxicité cutanée semble moins importante que pour la Dox libre, que pour le 2B3-101 ou encore le Caelyx. En effet, sa présence cutanée est 16 fois moins importante que pour la Dox libre (Figure 29). Concernant la cardiotoxicité, elle est équivalente à la solution saline témoin. C'est-à-dire qu'au cours de l'étude pré-clinique, aucune toxicité cardiaque n'a été recensée. Pour finir, soulignons que cent jours post injection, environ 30 % des souris ont survécu (Figure 31B). Toutefois, l'étude ne permet pas d'en connaître le devenir, et n'apporte pas d'autres précisions à ce sujet.

En conclusion, dans l'état actuel, les études pré-cliniques présentées ne permettent pas de conclure sur le taux exact de survie, ni sur le pourcentage de réussite des traitements étudiés. Un développement de ces études pré-cliniques devrait être envisagé pour permettre par la suite des études cliniques. A terme, ces molécules prometteuses pourraient s'ancrez dans la prise en charge du glioblastome dont le pronostic actuel est sombre.

### **3) Dendrimères de doxorubicine en oncologie**

#### **A- Dendrimères utilisés dans le traitement et l'imagerie du carcinome hépatocellulaire (CHC)**

##### *Généralités sur le CHC :*

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la deuxième cause de mortalité liée au cancer dans le monde, et le cinquième cancer le plus fréquent <sup>[18]</sup>. Il s'agit d'un cancer primitif du foie dont l'origine est la cirrhose dans 75 à 80 % des cas. Une hépatopathie chronique non cirrhotique peut également en être la source. Plus exceptionnellement, ce cancer peut se développer à partir de cellules hépatiques saines. <sup>[19]</sup>

Le diagnostic se fait essentiellement lorsque le cancer a atteint un stade intermédiaire ou avancé, ce qui réduit l'efficacité des chimiothérapies et rend plus difficile la chirurgie. Afin d'obtenir un diagnostic plus précoce et ainsi favoriser des thérapies plus efficaces, de nombreuses études sont en cours. Les NPs présentent un intérêt pour le diagnostic précoce par imagerie, mais également dans l'aspect thérapeutique du fait d'une toxicité moindre des chimiothérapies qu'elles engendrent.

Concernant le diagnostic, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'un des moyens de détection les plus utilisés. Les éléments de signalisation utilisés lors des IRM peuvent être des nanosondes moléculaires comprenant un ligand permettant de cibler les cellules cancéreuses hépatiques. <sup>[20]</sup>

La chimio-embolisation trans-artérielle (TACE) est couramment utilisée comme traitement palliatif ainsi que dans le traitement des CHC de stade intermédiaire. Cela consiste en injection directe de doxorubicine pouvant être associée ou non au cisplatine ainsi que d'un agent d'embolisation dans l'artère hépatique. <sup>[18]</sup>

Pour améliorer l'efficacité thérapeutique, le but est de délivrer la doxorubicine grâce à des dendrimères spécifiques ciblant les cellules cancéreuses et épargnant les tissus sains. La formulation d'agent théranostique ayant une activité thérapeutique combinée à une utilisation en diagnostic est également intéressante.

Pour cela, nous allons détailler deux types de dendrimères P1 et P2 <sup>[18]</sup> et présenter leurs avantages en thérapie puis nous nous intéresserons à un dendrimère noté MNP-DGL-RGD-GX1-DOX <sup>[20]</sup> comme agent théranostique.

##### *Synthèses et caractéristiques d'utilisation :*

α P1 et P2

Les dendrimères de polyamidoamines (PAMAM) de 5<sup>ème</sup> génération (G5) possèdent une hydrosolubilité élevée, sont biocompatibles et ont un temps de circulation prolongé. Ces caractéristiques en font un outil de choix parmi l'arsenal des NPs. De plus, la surface du dendrimère G5 permet un chargement plus facile des agents de ciblage et du principe actif utilisé.

Les dendrimères PAMAM G5 sont reliés à la doxorubicine par une liaison azoïque qui sera clivée par une azoréductase (enzyme exprimée par les cellules cancéreuses hépatiques). Une molécule de sucre, le N-acétylgalactosamine (NAcGal $\beta$ ) (ligand de asialoglycoprotein receptor (ASGPR) exprimé sur les cellules hépatiques cancéreuses) conjugué à un PEG est ancré à une branche de PAMAM G5 par une liaison cis-aconityl acido-labile (Figure 32). Ce sera le ligand de ciblage. Les différences structurales entre les produits P1 et P2 se situent au niveau du noyau aromatique composant la liaison azoïque (Figure 32).

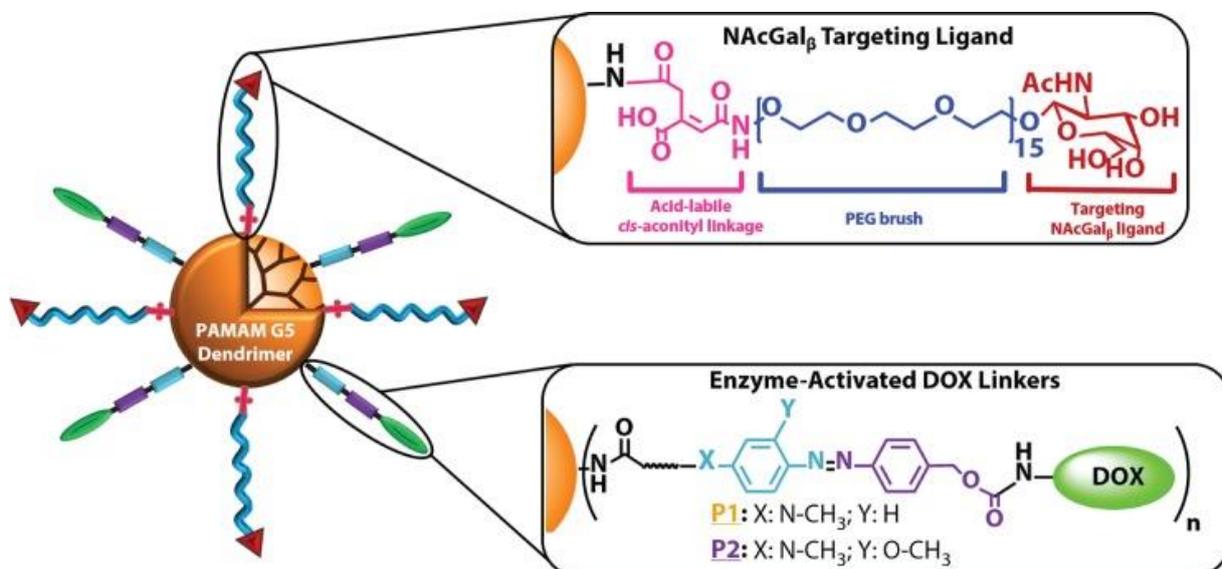


Figure 32 : schéma de la composition des particules P1 et P2<sup>[18]</sup>

La présence de la liaison acido-labile permet une libération préférentielle dans les tissus tumoraux car ces derniers sont plus acides que les tissus sains. <sup>[21]</sup>

La présence de PEG à la surface de PAMAM G5 empêche leur élimination par le système réticulo-endothélial (RES). Les récepteurs ASGPR vont permettre l'endocytose de P1 et P2 et une activation de la doxorubicine, ensuite les enzymes azoréductases présentes dans les cellules cancéreuses permettent la dissociation du principe actif de son véhicule. L'affinité pour le tissu tumoral des NPs est médiée par l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). <sup>[18]</sup>

Le but est de vérifier si *in vitro* et *in vivo* la toxicité de la doxorubicine a bien été atténuée. *In vivo* il faudra également s'intéresser à l'impact thérapeutique sur le développement tumoral. Ces différentes étapes seront conditionnées tout d'abord par l'étude de la cardiotoxicité sur des cardiomyocytes *in vitro*, et l'exploration de la fonction cardiaque des souris saines traitées par P1 et P2 pour la toxicité *in vivo*. Pour évaluer l'efficacité de ces NPs *in vivo* contre le CHC, les chercheurs ont inoculé des cellules HepG2 à des souris. <sup>[18]</sup>

#### α Dendrimère-MNP : MNP-DGL-RGD-GX1-DOX

Les DGL (Dendrigraft de poly-L-lysine) sont un type de NPs de la famille des dendrimères. Ils possèdent de nombreux atouts :

- une structure sphérique,
- une cavité interne très ramifiée permettant la prise en charge de nombreuses molécules,
- la présence de groupements amino actifs qui permettent des modifications afin de rendre le produit plus spécifique suivant l'utilisation souhaitée,

- la biocompatibilité (la lysine étant un acide aminé essentiel chez l'homme),
- une bonne solubilité,
- la biodégradabilité.

Ce sont des produits très polyvalents. Il existe plusieurs générations de DGL. Dans cette étude, les DGL de 3<sup>ème</sup> génération ont été choisis.

Le RGD est un tripeptide qui se lie spécifiquement à la famille des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  surexprimées sur les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse, et peu exprimées dans la majorité des tissus normaux. Le tripeptide RGD[Arg-Gly-Asp] est donc un outil de choix pour l'imagerie. [22]

Le cyclo-peptide GX1 (cyclo [-Cys-Gly-Asn-Ser-Asn-Pro-Lys-Ser-Cys]) a la possibilité de délivrer sélectivement des produits à des sites tumoraux. Il a la capacité de cibler les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) fortement présent dans de nombreux tissus tumoraux et peu présent dans les tissus normaux, au même titre que les intégrines précédemment citées. GX1 possède également la capacité d'inhiber la néovascularisation *in vivo*. Ces propriétés font du GX1 un peptide dont l'utilisation dans le traitement de nombreux cancers peut être intéressante. [23]

Dans l'étude, un pentapeptide à base de RGD (cyclo [-Arg-Gly-Asp-Phe-Lys]) associé au nonapeptide GX1 (cyclo [-Cys-Gly-Asn-Ser-Asn-Pro-Lys-Ser-Cys]) sont utilisés afin de former le dimère hétérogène RGD-GX1.

Pour réaliser des imageries IRM, il est intéressant d'associer les DGL à des particules paramagnétiques contenant de la magnétite ( $Fe_3O_4$ ). Toutefois les MNPs (Magnetic NanoParticules) présentent plusieurs inconvénients *in vivo*. En effet, les particules MNPs s'accumulent dans le système réticulo-endothélial. Elles ont une demi-vie sanguine courte, un ciblage non spécifique et une faible efficacité d'internalisation des ligands greffés en surface. Elles ne peuvent être utilisées comme agents d'imagerie efficaces qu'après modification. [24] Comme les groupements amino actifs à la surface des DGL seront utilisés pour lier les peptides, des MNP de  $Fe_3O_4$  de diamètre 140 nm ont été choisies comme noyau magnétique avant d'être revêtues de DGL.

Ces noyaux ont été modifiés avec de l'acide citrique (CA) pour que leur surface soit rendue hydrophile grâce à la présence de nombreux groupes carboxyl. Les MNP-CA formées peuvent ensuite se lier de façon covalente aux groupements amine des DGL pour former MNP-DGL.

Ensuite les dimères RGD-GX1 composent une liaison amide entre les groupes carboxyl libres du dimère hétérogène et les groupements amino du DGL-3G pour former MNP-DGL-RGD-GX1. Enfin, la doxorubicine a été chargée dans cette NP par absorption physique en phase aqueuse.

Ce chargement résulte de formation de complexes intermoléculaires par la mise en jeu de plusieurs liaisons :

- des liaisons hydrogènes que la doxorubicine peut former avec les groupements amino actifs du DGL,
- des liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles acides des peptides et amino-alcalins de la doxorubicine.

- On suppose qu'il y a également une force hydrophobe d'empilement entre les noyaux aromatiques de la doxorubicine et de la phénylalanine de RGD.

Finalement la NP obtenue (Figure 33) possède un diamètre moyen de 150 nm.

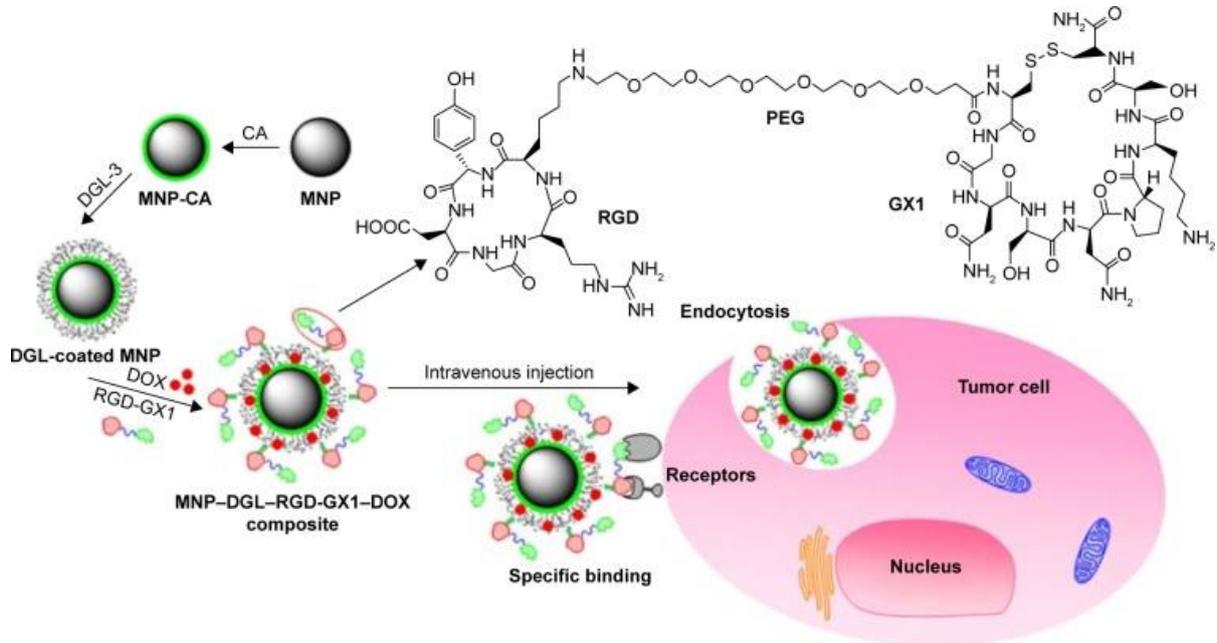


Figure 33 : Schéma de la synthèse de MNP-DGL-RGD-GX1-DOX ciblant le CHC. [20]

Pour étudier la libération de la Dox, les chercheurs ont, *in vitro* à 37°C, quantifié la libération de la doxorubicine par MNP-DGL-RGD-GX1 dans un milieu aqueux à pH 7,4 (représentatif d'un fluide corporel comme le sang) et dans un milieu acide (Figure 34).

Après 8 h, 30 % environ de la doxorubicine provenant de la NP ont été libérés à pH = 7,4 ou 5,3. Ceci représente à peu près la moitié de la quantité de Dox totale qui sera libérée à la fin de l'expérience.

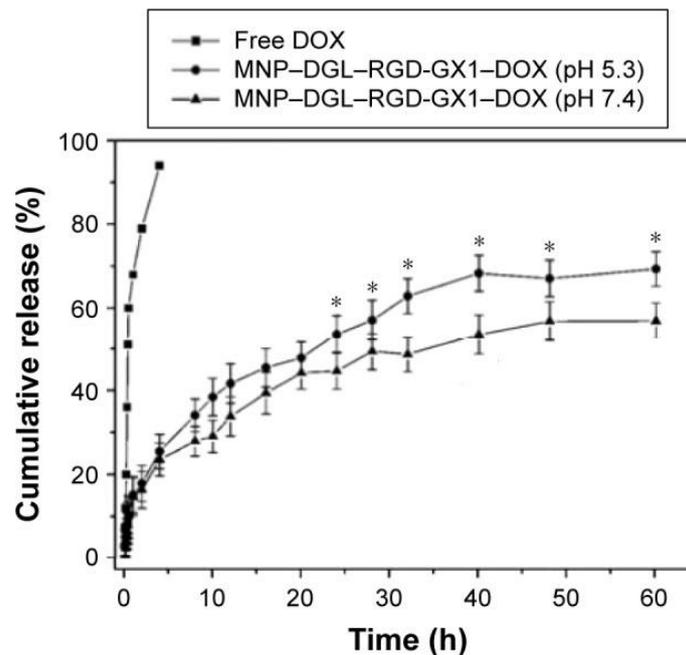


Figure 34 : Profil de la libération de la doxorubicine par MDRGd à pH 5,3 et 7,4 [20]

Après 40 h, le profil des courbes montre clairement une différence significative entre la libération de Dox à pH = 7,4 et à pH = 5,3. La libération est plus élevée dans le milieu acide. Cette libération de la Dox peut s'expliquer par le fait qu'en milieu acide les groupes amino du DGL se lient à un proton pour former  $\text{NH}_3^+$ .

Cette observation est en faveur de l'effet escompté *in vivo* puisque le milieu tumoral est acide.

### Toxicité :

α Toxicité induite par MDRGd

- Les dendrimères cationiques possèdent une toxicité élevée. Toutefois, dans ce modèle, les groupes amino cationiques sont bloqués par des liaisons covalentes, et la charge importante de Dox lors de la fabrication peut permettre d'encombrer les groupes de polylysine exposés restants.

- la doxorubicine encapsulée dans la NP aura un profil plus intéressant car la libération à pH = 7,4 (pH physiologique humain) sera moindre.

*In vivo*, pour corroborer les résultats précédents, des cellules HepG2 ont été inoculées à des souris. Les souris ont ensuite été traitées soit par une injection de Dox libre soit par une injection de MNP-DGL-RGD-GX1-Dox (MDRGd). Des échantillons sanguins ont été prélevés à différents moments après l'injection pour analyser la distribution de la Dox. Ensuite toutes les souris ont été sacrifiées et leurs organes prélevés.

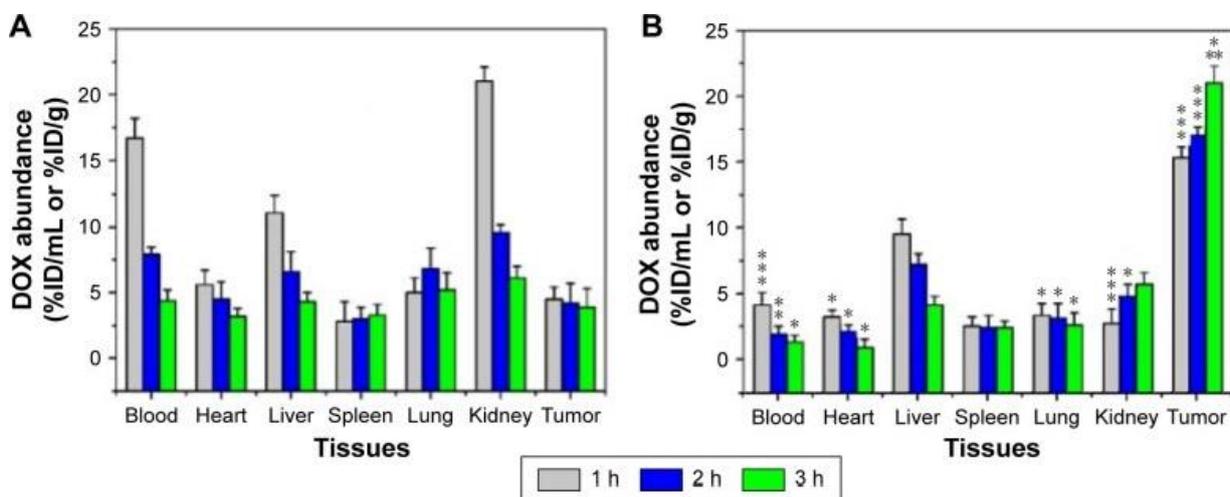


Figure 35 : (A) concentration de Dox dans les différents tissus à différents moments après injection de Dox libre ; (B) même mesure après injection en quantité de dox équivalente de MDRGd. <sup>[20]</sup>

Après 1 h, la Dox libre se distribue préférentiellement dans le sang, le foie et les reins. Mais après 3 h la distribution de Dox s'homogénéise et devient plus ou moins équivalente dans tous les tissus. (Figure 35A) La formulation MDRGd permet une distribution de la doxorubicine plus importante dans le tissu tumoral que dans les autres organes, et ce quel que soit le temps considéré. Contrairement à la Dox libre, sa concentration dans la tumeur augmente au cours du temps et diminue dans les autres tissus. (Figure 35B) Ce résultat démontre la spécificité accrue de la NP grâce notamment aux dimères RGD-GX1 qui permettent d'accroître la délivrance de Dox à la tumeur.

Le profil toxique est plus intéressant pour la NP car on constate une toxicité moins importante dans les organes. En comparant les figures A et B, l'accumulation au niveau du cœur est bien moins importante pour la formulation NP.

#### α Evaluation de la cardiotoxicité induite par P1 et P2

Pour l'évaluation de la cardiotoxicité *in vitro*, les NPs P1 et P2 ont été mises en contact avec des cardiomyocytes (CM) dérivés de cellules souches pluripotentes induites par l'homme (hiPSC CM). Pour l'évaluation des résultats, le triton X-100 a été choisi comme témoin positif pour son activité apoptotique et des CM avec un milieu blanc medium non cardiotoxique comme témoin négatif. Cette évaluation se base sur les images de la phase de contraste d'un microscope et l'utilisation d'un logiciel (IncuCyte Zoom) pour créer un masque de confluence qui permet de quantifier la quantité de CM restante. Une coloration fluorescente est aussi utilisée pour déterminer le pourcentage d'apoptose précoce des CM. [18]

Le masque de confluence permet de mettre en évidence les CM vivants couleur or et les CM morts en grisé. Après 32 heures, il n'y a pas de différences entre les échantillons traités par P1, P2 et le témoin négatif. Le témoin positif montre un fort taux d'apoptose cellulaire. L'échantillon traité par la Dox libre présente également un taux d'apoptose non négligeable (Figure 36A).

Cette analyse visuelle au microscope est quantifiée (Figure 36B). La toxicité cellulaire du témoin positif Triton X-100 est chiffrée à 100 %. Celle du témoin négatif est de 9,7 %. En comparaison, les toxicités induites respectivement par P1, P2, et la doxorubicine libre sont de 8,6 %, 8,2 % et 26,2 %. Les taux de toxicité étant faibles et comparables à celui du témoin négatif, P1 et P2 ne peuvent pas être considérés comme toxiques.

Le pourcentage d'apoptose précoce subit par les CM est également mesuré (Figure 36C). Il est, pour les CM traités par P1 et P2, comparable à celui du témoin négatif. Concernant la doxorubicine, ce pourcentage est 3 fois plus important, confirmant ainsi le caractère toxique de la molécule. [18]

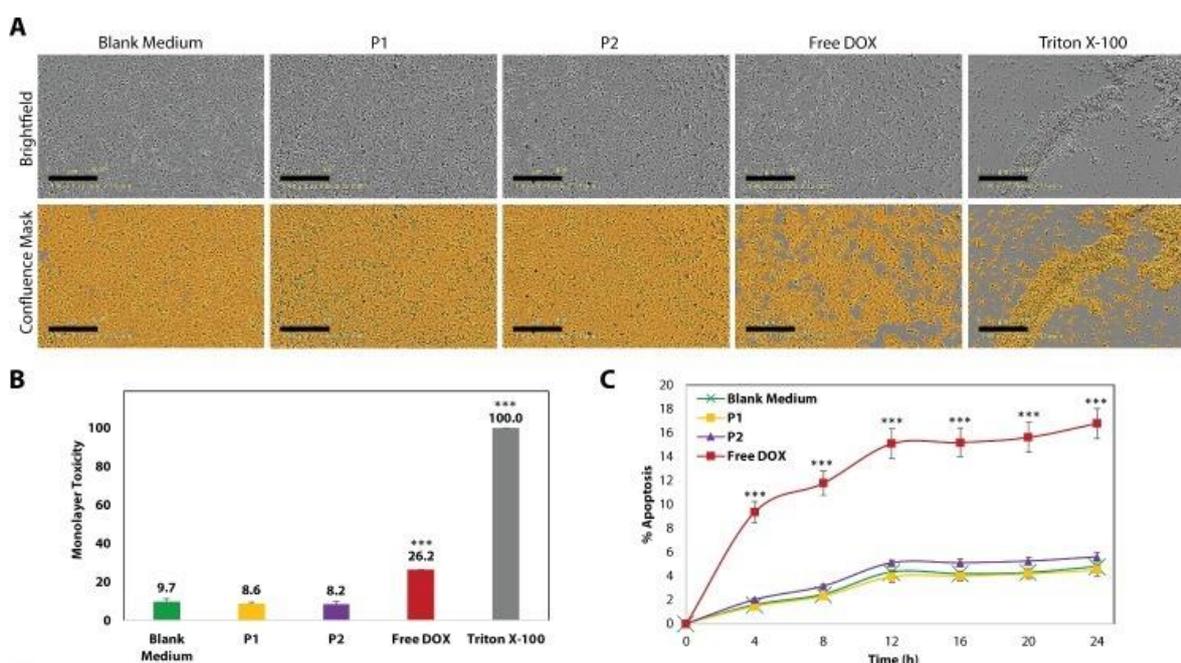


Figure 36: caractérisation de la toxicité des particules P1 et P2 envers les CM *in vitro* [18]

L'étude de la cardiotoxicité *in vivo* est basée sur l'exploration de la fonction cardiaque de quatre groupes de souris saines. Chaque groupe a reçu toutes les 48 h des injections de P1, P2, Dox libre (à une dose de 1mg/Kg équivalente de dox) et de solution saline (témoin) ceci pendant trois semaines. Chaque semaine, le débit cardiaque (Cardiac Output ou CO), le volume d'éjection systolique (Stroke volume ou SV), le volume télésystolique (LVESV) et le volume télédiastolique (LVEDV) sont relevés pour chaque souris de chaque groupe de traitement. [18]

Les valeurs sont mesurées initialement et après 4 semaines pour les trois groupes : solution saline, P1 et P2. Elles ne montrent aucune diminution significative des paramètres mesurés, traduisant une absence de modification de la fonction cardiaque. Pour les souris traitées avec la Dox libre, les valeurs diminuent toutes et la totalité des souris sont mortes au quinzième jour de traitement. Le taux de survie pour les trois autres groupes est de 100 % (Figure 37). Ces résultats laissent supposer que P1 et P2 évitent la libération de la doxorubicine dans le cœur, il est possible également que les NPs ne soient tout simplement pas distribuées dans le tissu cardiaque. [18]

Ces résultats indiquent clairement que P1 et P2 sont, potentiellement, une meilleure alternative à l'utilisation de Dox libre.

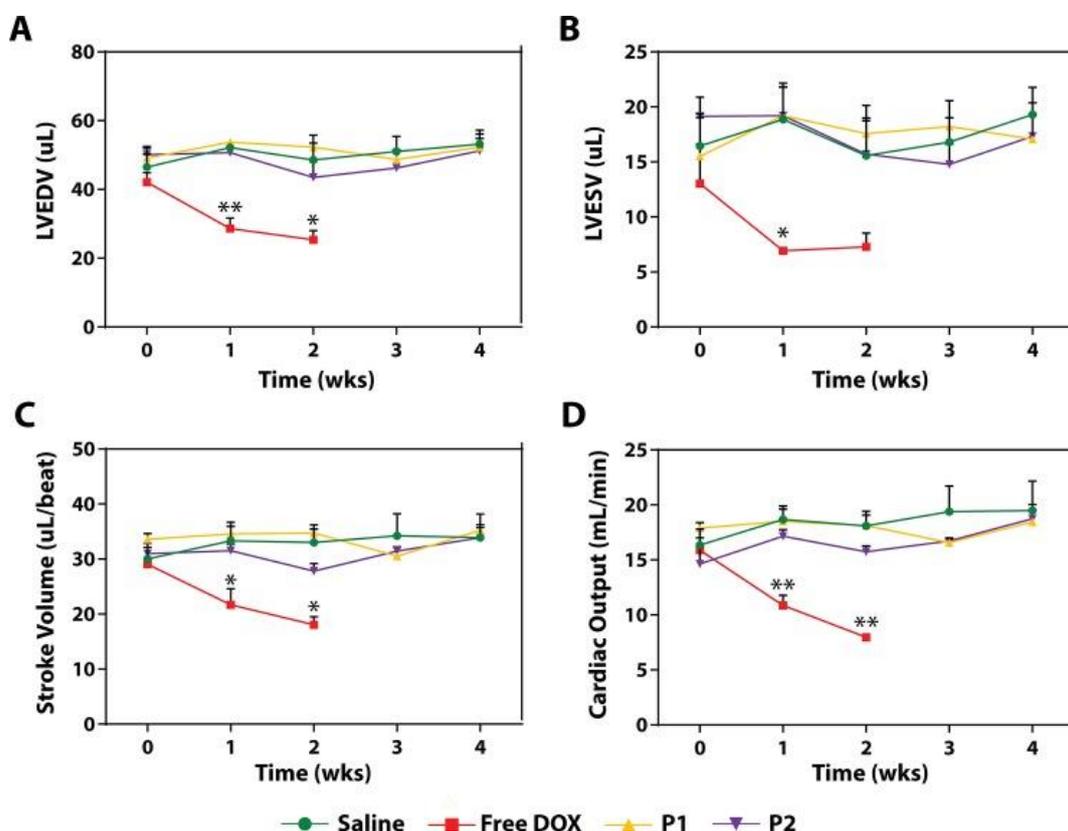


Figure 37: Mesure de la fonction cardiaque des souris traitées par la solution saline, P1, P2 et Dox libre. [18]

### Efficacité thérapeutique :

*in vitro* :

L'étude de viabilité cellulaire a été réalisée sur deux souches de cellules : cellules HepG2 et cellules L02 (hépatocytes humains normaux). Elles ont été incubées avec les différentes NPs décrites dans la figure 38 à différentes concentrations.

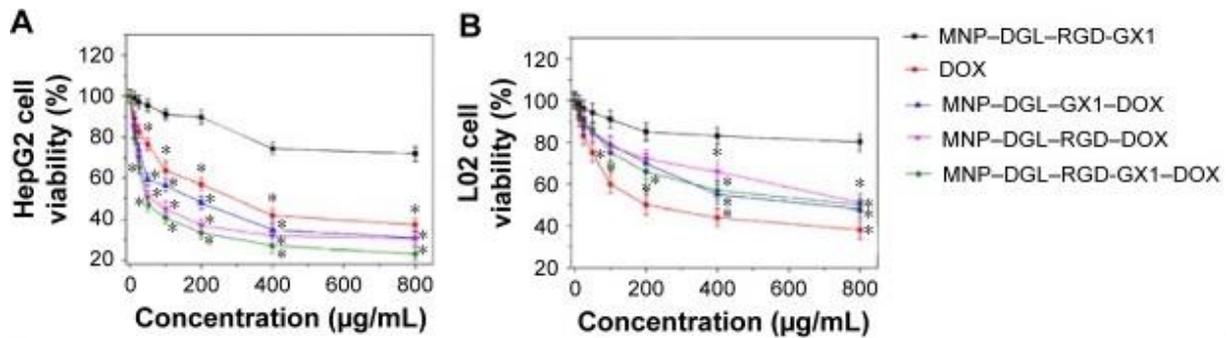


Figure 38 : Viabilité cellulaire des cellules cancéreuses (A) et normales (B) à différentes concentrations de NPs vide ou chargées en Dox. <sup>[20]</sup>

Le pourcentage de viabilité cellulaire est proche de 20 % pour les cellules HepG2 traitées avec la MDRGd à 800 µg/mL. Pour Dox libre, la viabilité cellulaire des mêmes cellules est proche des 40 % à la même concentration. Ce simple résultat montre que la NP expérimentale présente *in vitro* une meilleure action cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Au vu du graphique B, le pourcentage de viabilité cellulaire pour la Dox libre est à peu près le même pour les cellules non tumorales que pour les cellules tumorales. En revanche, pour la NP la viabilité des cellules normales est supérieure à 50 %. La Dox libre exerce sans distinction le même effet cytotoxique sur les cellules saines et tumorales. Ceci est un inconvénient majeur pour l'utilisation de la Dox libre alors que nous avons un effet positif avéré de la MDRGd.

La NP présente moins de toxicité sur les cellules saines que la Dox libre. L'expérience confirme ainsi la spécificité de cette NP à se lier préférentiellement aux cellules cancéreuses du carcinome hépatocellulaire tout en épargnant les cellules normales.

Pour pouvoir quantifier cette différence d'efficacité, un test d'apoptose (analysé par la technique de cytométrie en flux avec l'utilisation de coloration) est réalisé sur les cellules HepG2 (Figure 39).

Avec l'utilisation de Dox libre, il y a 22,5 % (Q1) de cellules mortes alors qu'avec la NP chargée de dox, il y en a deux fois plus (Q1 = 46,7 %) confirmant ainsi l'action cytotoxique révélée par l'étude précédente. Les cellules en voie d'apoptose (Q2+Q3) sont respectivement pour la Dox libre et la NP de 29,35 % et 34,53 %. Sans traitement, il y a 20,18 % de cellules en cours d'apoptose (témoin) ce qui permet de présumer d'une action apoptotique plus importante de la NP. Ceci est confirmé par le pourcentage de cellules vivantes Q4 qui est respectivement de 48,1 % pour les cellules traitées avec la Dox libre et de 18,8 % pour celles ayant reçu la NP.

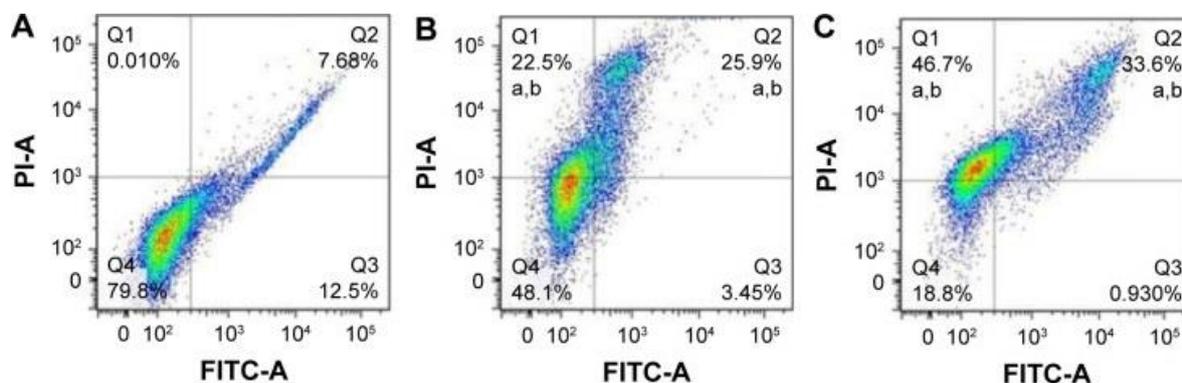


Figure 39 : (A) groupe témoin cell HepG2 non traitées ; (B) cell HepG2 traitées à la Dox libre ; (C) cell HepG2 traitées avec NPs. Q1=pourcentage de cellules mortes ; Q2= cellules apoptotiques au stade tardif ; Q3=cellules apoptotiques au stade précoce ; Q4= cellules vivantes ; PI = iodure de propidium.<sup>[20]</sup>

Pour les NPs P1 et P2, aucune étude *in vitro* n'a été effectuée. Les études *in vitro* sur MNP-DGL-RGD-GX1-Dox ont confirmé le choix judicieux du dimère RGD-GX1 pour favoriser l'endocytose médiée par les intégrines dans les cellules cancéreuses. Elles confirment aussi la non-spécificité de la Dox libre contrairement à cette NP qui, de plus, a démontré une action cytotoxique plus importante que Dox libre. Malgré tout, il existe certains facteurs *in vivo* qui peuvent influencer l'efficacité du médicament c'est pourquoi une étude d'efficacité doit être effectuée.

#### α *In vivo* :

Des cellules HepG2 ont été inoculées à des souris. Une fois que les tumeurs ont atteint un volume moyen suffisant, les souris ont reçu des injections intratumorales de 1mg/kg par jour en équivalent Dox de Dox libre ou de P1 ou de P2, ou d'une solution saline témoin. Ces injections ont eu lieu sur une période de 21 jours (période 1). Les 9 jours suivants, les souris n'ont reçu aucun traitement (période 2). Pendant ces 30 jours, le volume de la tumeur est mesuré tous les 3 jours.<sup>[18]</sup>

Une étude similaire<sup>[20]</sup> portant sur l'activité anti-tumorale de MDRGd vis-à-vis de HepG2 a été entreprise. Le traitement s'effectuait par injections, tous les 2 jours, de 0,2 mL de Dox libre ou d'équivalent Dox sous forme MDRGd, avec un groupe témoin traité par du PBS. Cette étude a été réalisée sur des périodes de 10, 14 et 18 jours de traitement. Le poids de chaque souris, ainsi que le poids de la tumeur ont été mesurés.

Durant la première période, le volume des tumeurs traitées par P1, P2 ou Dox libre n'est statistiquement pas différent de celui traité par la solution saline durant les 12 premiers jours (Figure 40). Parallèlement le poids des tumeurs extraites des souris sacrifiées à J10 du groupe PBS ( $2,06 \pm 0,23$  g) et Dox libre ( $1,98 \pm 0,21$  g) ne présente pas beaucoup de différences comme le montre la figure 41. Le poids des tumeurs du groupe traité par MDRGd est bien inférieur à J10 à celui des deux groupes précédents soit  $0,85 \pm 0,25$  g. Cela témoigne d'une action thérapeutique supérieure à l'action de la Dox libre sur 10 jours.

A la fin des traitements, soit J21 pour P1 et P2 et J18 pour MDRGd, les taux d'inhibition de la croissance tumorale sont les suivants :

- Dox libre : 45 % à J21 dans l'étude [18] et 39,6 % à J18 dans l'étude [20].
- P1 : 75,3 % à J21.
- P2 : 48,3 % à J21.
- MDRGd : 78,5 % à J18.

Ces valeurs évoluent jusqu'à 76,1 % (P1), 72,9 % (P2) et 58,6 % (Dox libre) à la fin de la deuxième période (J30). A la fin de la phase de test, P1 et P2, efficaces pour inhiber la croissance tumorale, induisent des effets thérapeutiques plus importants que la Dox libre. P1 présente une activité antitumorale plus importante que P2 ce qui provient probablement d'une séquestration intracellulaire plus importante. [18]

Avec la Dox libre, les souris ont subi une perte de poids de 11,2 % après 18 jours de traitement. Dans le groupe témoin traité par PBS ou dans le groupe traité par MDRGd, il n'y a aucune diminution du poids corporel des souris. La Dox libre présente donc une toxicité systémique induisant une perte de poids contrairement au groupe recevant les NPs. A la fin du traitement de 18 jours, le poids des tumeurs est de  $0,59 \pm 0,24$  g pour MDRGd, de  $1,66 \pm 0,19$  g pour Dox libre et de  $2,75 \pm 0,34$  g pour le groupe témoin.

La spécificité que possède les NPs chargées de Dox pour les cellules tumorales HepG du CHC (que ce soit le dimère RGD-GX1 pour MDRGd ou le sucre NAcGal $\beta$  pour P1 et P2) conduit à une efficacité anti-tumorale bien supérieure à celle de la Dox libre.

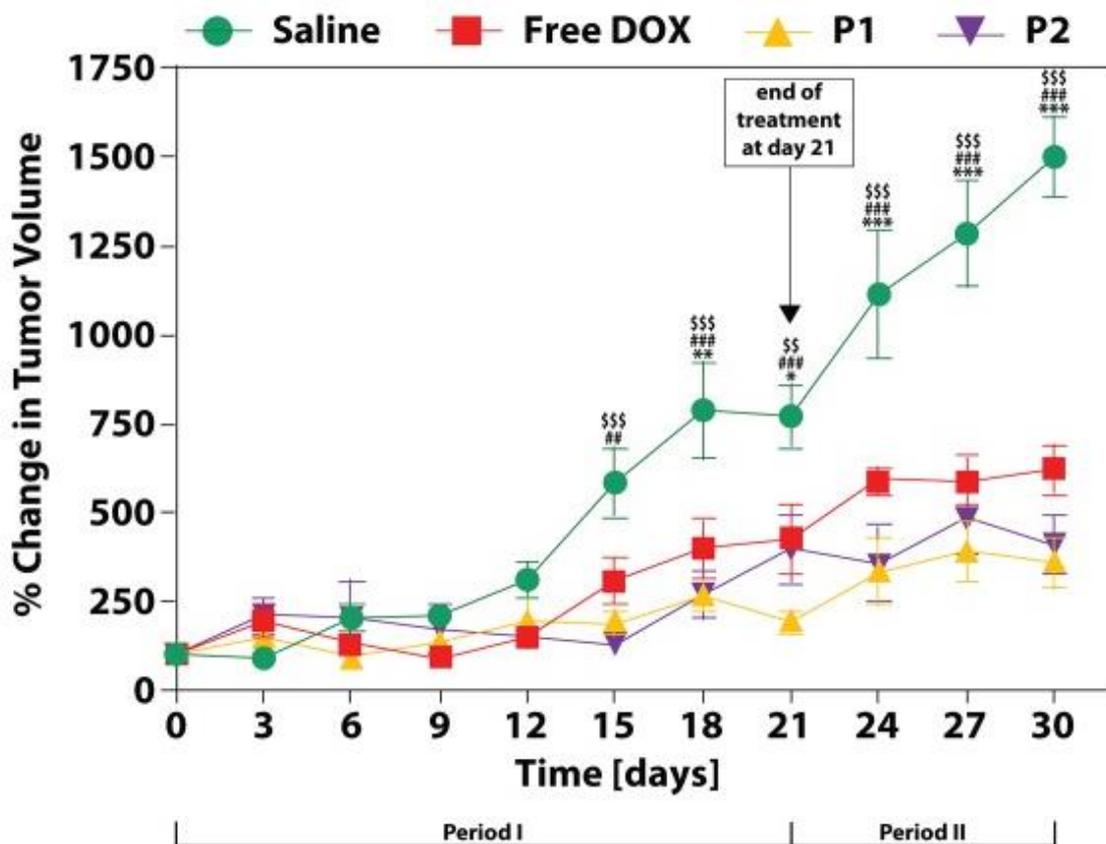


Figure 40: Courbe représentative de l'activité antitumorale des différents composés P1, P2 et Dox libre [18]

Groupes	Temps de traitement (jours)	Poids corporel (g)		Poids de la tumeur (g)	TIR (%) <sup>a</sup>
		Début	Sacrifice		
Contrôle (PBS)	dix	20,39 ± 1,59	22,35 ± 1,09	2,06 ± 0,23	-
	14	20,22 ± 1,66	24,66 ± 1,11	2,32 ± 0,26	-
	18	20,31 ± 1,38	27,78 ± 1,23	2,75 ± 0,34	-
DOX gratuit	dix	20,41 ± 1,46	20,84 ± 1,32	1,98 ± 0,21	9
	14	20,33 ± 1,52	19,56 ± 1,24	1,74 ± 0,18 <sup>b</sup>	25
	18	20,29 ± 1,63	18,01 ± 1,33	1,66 ± 0,19 <sup>b</sup>	39,6
MNP – DGL – RGD-GX1 – DOX	dix	20,24 ± 1,56	23,91 ± 1,19	0,85 ± 0,25 <sup>b, c</sup>	58,7
	14	20,15 ± 1,45	25,56 ± 1,23	0,66 ± 0,15 <sup>b, c</sup>	71,6
	18	20,26 ± 1,53	28,65 ± 1,31	0,59 ± 0,24 <sup>b, c</sup>	78,5

Figure 41: Évolution du poids des souris et du poids de la tumeur après un traitement de 10, 14 et 18 jours <sup>[20]</sup>

### IRM *in vivo* :

20 souris portant des tumeurs HepG2 ont reçu des injections de différentes NPs : MNP-DGL-Dox, MNP-DGL-RGD-Dox, MNP-DGL-GX1-Dox et MNP-DGL-RGD-GX1-Dox (MDRGd) irradiés par <sup>60</sup>Co dans du PBS à une dose de 2 mg/kg. Après anesthésie, une imagerie dans le plan transversal est effectuée par une mesure de l'intensité relative du signal T2 en fonction du temps (Figure 42).

La comparaison des images A et B (non traitée et traitée par MNP-DGL-Dox) Démontre une absence ou un faible ciblage de la tumeur par la NP non modifiée par les peptides.

Quant aux souris traitées par les NPs MNP-DGL-GX1-Dox (figure D) et MNP-DGL-RGD-Dox (figure C), les images montrent un assombrissement de la périphérie des tumeurs qui témoigne d'un ciblage des tumeurs. Le contraste est encore plus net pour le groupe de souris traitées avec MDRGd (Figure E), la partie la plus sombre représente la zone tumorale. Les courbes de la figure F présentent pour les NPs modifiées une diminution très rapide de l'intensité relative du signal jusqu'à un pic qui témoigne de l'augmentation maximale de la négativité de l'image. Ceci est d'autant plus marqué pour la NP MDRGd dont la courbe chute le plus rapidement et où l'intensité relative du signal est inférieure aux deux autres et atteint un creux en dessous de 60 % pour remonter ensuite après 3 h.

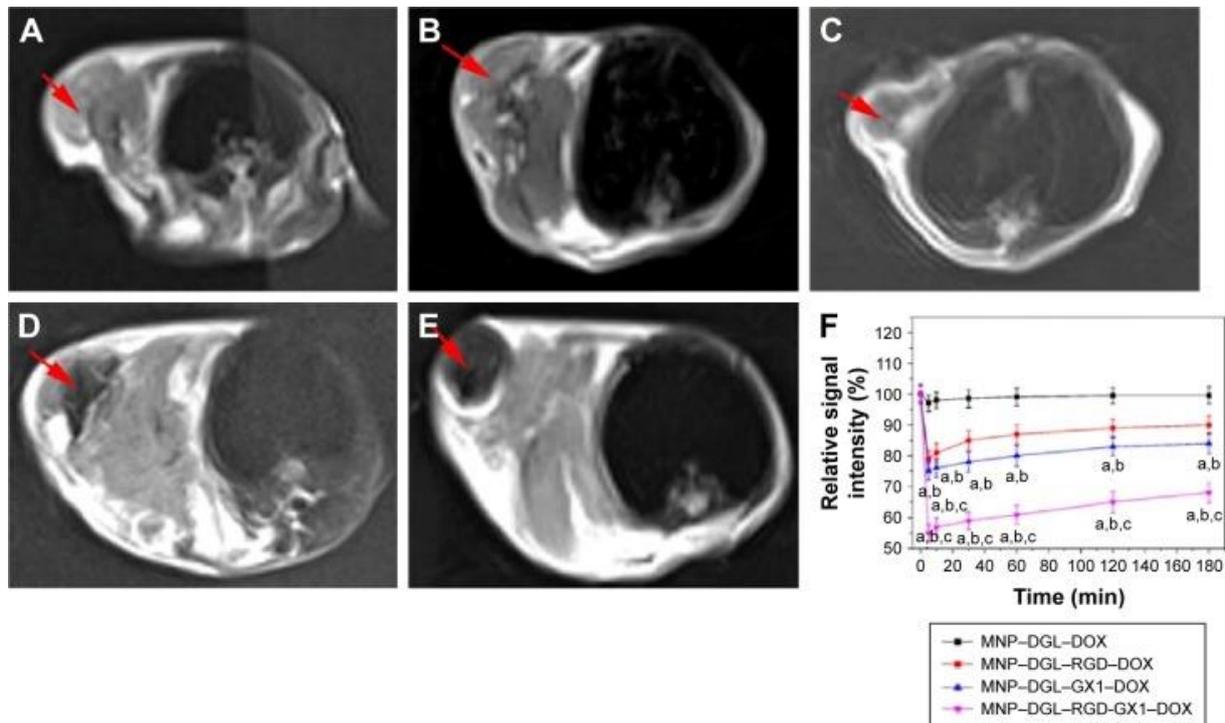


Figure 42: Imagerie IRM des tumeurs des souris portant des tumeur HepG2 avant (A) et après injection des différentes NPs ; (B) : MNP-DGL-Dox, (C) : MNP-DGL-RGD-Dox, (D) : MNP-DGL-GX1-Dox, (E) : MDRGd. (F) : Courbe de l'intensité relative du signal T2 des tumeurs en fonction du temps après injection des différentes NPs. [20]

Les NPs MNP-DGL-RGD-GX1-Dox, possèdent une grande affinité pour le tissu tumoral et permettent une bonne imagerie de la tumeur en IRM.

### Conclusion :

Les NPs étudiées dans le cadre du traitement du CHC ont prouvé que, non seulement, elles avaient une meilleure efficacité antitumorale que le médicament libre mais également une plus grande affinité avec le tissu tumoral. Leur faible toxicité permet une utilisation sans risque à des doses plus importantes.

La NP élaborée couplant un dendrimère de polylysine avec  $Fe_3O_4$  et les dimères RGD-GX1 constitue un produit de chimiothérapie spécifique du CHC qui pourrait être utilisé pour toute tumeur surexprimant les récepteurs de l'endothélium vasculaire et les intégrines. Son utilisation possible en IRM en fait un agent nanotheranostique intéressant.

Les particules P1 et P2 pourraient être une alternative à la Dox libre dans les procédures HAI (Hemagglutination Inhibition Assay). Avec les nouveaux traitements associant plusieurs types de thérapie, elles peuvent constituer une arme supplémentaire dans le traitement du CHC de stade intermédiaire rentrant dans le protocole TACE (TransArterial ChemoEmbolization).

Dans les deux cas, des études cliniques sont indispensables pour, un jour, espérer observer une régression du nombre de décès par CHC dans le monde.

## B- Dendrimères utilisés dans le traitement du cancer du sein

Malgré les grands progrès réalisés dans le domaine oncologique, des obstacles majeurs demeurent pour parvenir à une guérison complète. Comme exposé précédemment, l'utilisation de nanomédicaments est de plus en plus probante particulièrement pour ceux contenant la doxorubicine, puissant produit chimiothérapeutique. Mais le microenvironnement des tumeurs caractérisé par une MEC dense et une pression élevée du liquide interstitiel gêne la bonne distribution des NPs à travers la tumeur. De plus certaines tumeurs peuvent résister aux chimiothérapies, résistances souvent induites par les agents thérapeutiques qui entraînent un fort taux de récurrence des cancers contre lesquels les thérapies deviennent inefficaces.

Par exemple la présence des glycoprotéines P capables d'expulser une grande variété d'agents chimiothérapeutiques totalement différents les uns des autres, entraîne un défaut d'accumulation et conduit à une résistance aux médicaments. <sup>[25]</sup> Dans ce chapitre, nous examinerons les différents moyens pouvant être utilisés pour surmonter ces obstacles. Dans un premier temps, nous étudierons la NP dendrimère-gélatine avec l'intégrine RGD chargée Dox utilisée contre le carcinome mammaire murin (cellules 4T1). <sup>[26]</sup> Dans un second temps, le problème de la résistance dans le traitement du cancer du sein sera abordé avec l'utilisation de NPs sous forme de nanomicelles de dendrimère chargeant la doxorubicine. <sup>[27]</sup>

*Utilisation de RGD-DOX-DGL-GNP dans le modèle 4T1 (carcinome mammaire murin) :*

✕Caractérisation de la NP :

La NP RGD-DOX-DGL-GNP (ou RDDG) utilise le peptide RGD vu précédemment <sup>[22]</sup> pour cibler le tissu tumoral. Comme de nombreuses tumeurs surexpriment les métalloprotéinases 2 (MMP-2) <sup>[28]</sup>, une gélatine sous forme de NP (GNP) est également utilisée. C'est une NP de grande taille qui est potentiellement dégradée par MMP-2. De plus, l'association avec la GNP permet d'augmenter le diamètre de la NP de 34,4 nm (RGD-DOX-DGL-PEG) à 193,1nm (RGD-DOX-DGL-GNP). Cet ordre de grandeur est justifié par la nécessité d'avoir un agent thérapeutique suffisamment gros pour être retenu dans la tumeur mais suffisamment petit pour y pénétrer. La présence des MMP-2 au niveau du tissu tumoral permettrait d'engendrer un rétrécissement de la NP (Figure 43).

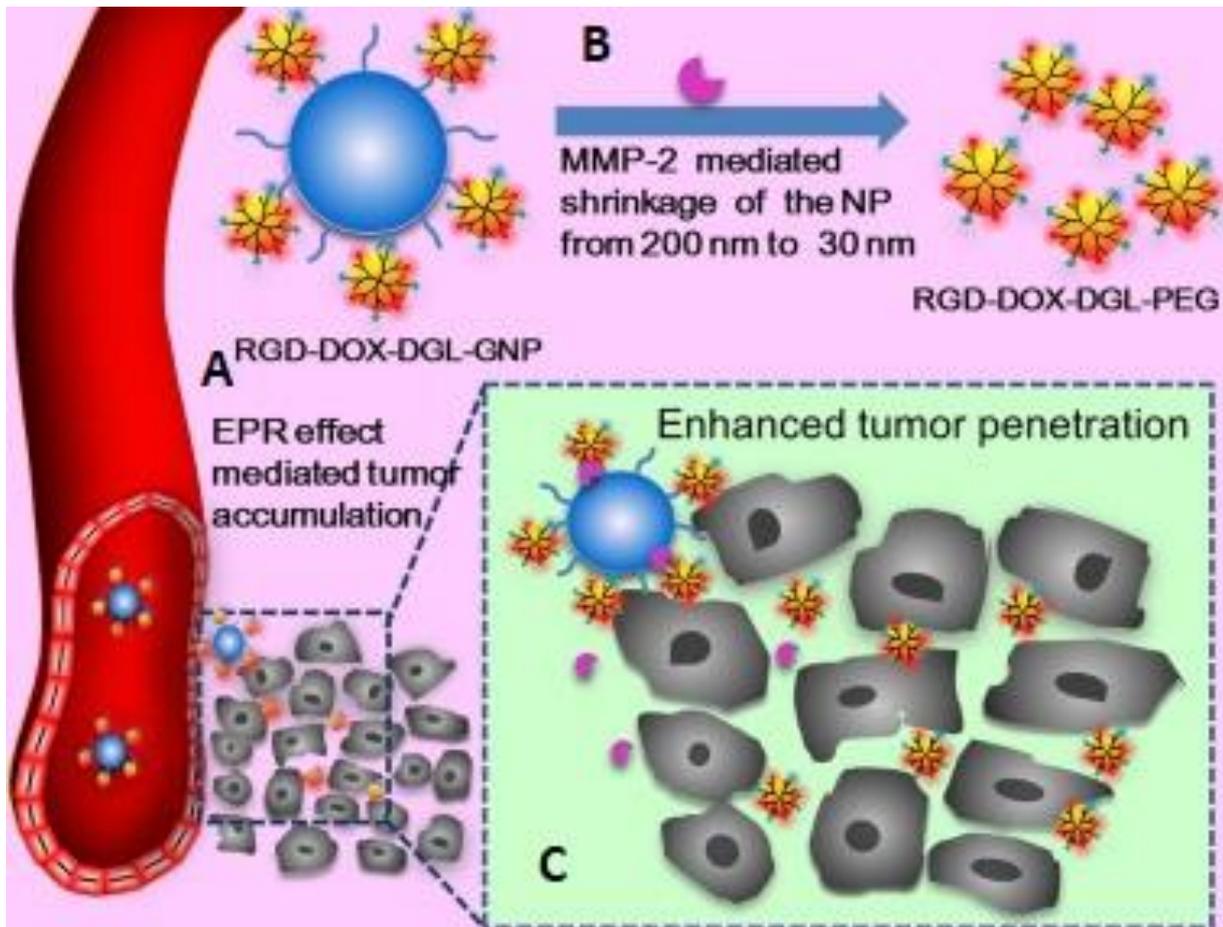


Figure 43 : A : Passage de la NP RGD-DOX-DGL-GNP du sang dans le milieu tumoral via l'effet EPR. B : Pénétration tumorale par l'action des MMP-2 qui dissocie GNP de RGD-DOX-DGL-PEG. C : Interactions peptides RGD avec les intégrines  $\alpha_5\beta_3$  [22]

α Libération de Dox in vitro :

Comme précédemment, la doxorubicine est d'avantage libérée par les NPs en milieu acide (pH = 5,5) plutôt qu'à pH physiologique (pH = 7,4) (Figure 44). Cette libération spécifique de la Dox dans un environnement acide caractéristique du tissu tumoral permettra d'épargner le tissu sain à pH physiologique.

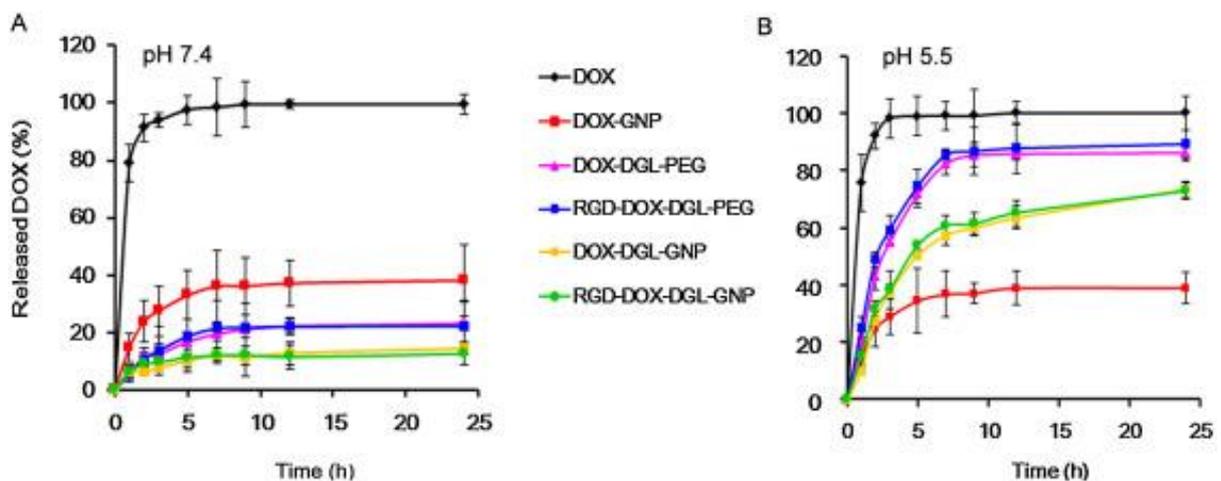


Figure 44 : Profil de libération de la doxorubicine à pH physiologique (A) et à pH acide de 5,5 (B) [22]

α Répartition et pénétration de la tumeur *in vivo* et rétrécissement de la NP

À la suite de l'implantation de tumeur 4T1 à des souris, il a été injecté 5mg/kg de Dox (équivalents) par souris. Vingt-quatre heures après l'administration, les souris ont été sacrifiées et les organes prélevés puis analysés via IVIS afin d'observer la distribution des NPs dans les différents tissus (Figure 45A). L'intensité de fluorescence dans la tumeur est bien plus élevée pour la NP RGD-DOX-DGL-GNP que pour les autres. Ceci témoigne d'une accumulation tumorale plus importante pour cette NP que pour la Dox libre ou les autres NPs qui n'allient pas le ligand de ciblage RGD au GNP et au DGL. Il y a clairement un rapport entre la taille des particules et leur accumulation dans la tumeur. Comme le montre la figure 45A, les NPs de grande taille s'accumulent davantage dans la tumeur que la Dox libre ou que les NPs de petites tailles. Les NPs de grande taille possède donc une meilleure distribution tumorale. L'analyse de la figure 45B confirme les résultats précédents en montrant que quantitativement la NP RDDG est celle qui s'accumule le plus au sein de la tumeur. De plus, la concentration de Dox chez les souris traitées par RDDG est la plus importante tant à l'intérieur de la tumeur qu'à l'extérieur (Figure 45D). Il faut noter également que la NP présente un profil cardiotoxique plus intéressant que celui de la Dox libre du fait d'une accumulation cardiaque moindre (Figure 45C).

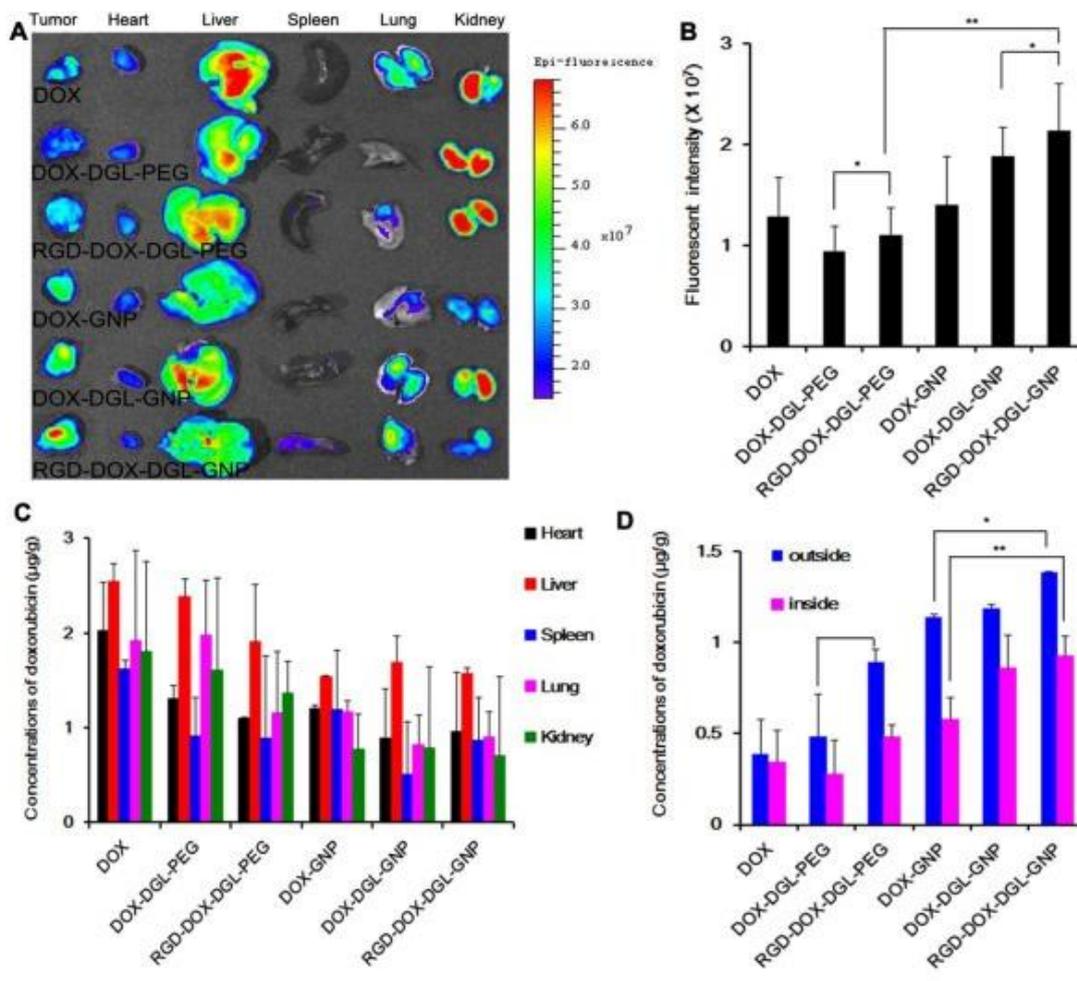


Figure 45 : (A) Analyse *ex vivo* de l'intensité de fluorescence des différents organes de souris porteuses de tumeur 4T1 24 h après injection des différents NPs. (B) Analyse semi-quantitative de l'intensité de fluorescence dans la tumeur des différents produits. (C) Analyse quantitative de la distribution des NPs et de la Dox libre dans les différents organes. (D) Concentration à l'intérieur et à l'extérieur de la tumeur des différents produits testés. [22]

L'étude menée par Hu *et al.* [26] consiste à vérifier le rétrécissement de la NP et la pénétration *in vivo* de la tumeur. Ils ont pour cela, marqué la GNP avec des NPs d'or (AuNP)

en lieu et place de DOX-DGL-PEG. Les structures AuNP-GNP sont dans un premier temps partiellement dégradées, témoignant d'une surexpression des MMP-2 au niveau du tissu tumoral. Grâce à cette dégradation préférentielle du GNP, de plus petites NPs peuvent être libérées et pénétrer l'ensemble du tissu tumoral.

Ces résultats sur les tumeurs 4T1 sont en adéquation avec les résultats d'autres modèles tumoraux comme le cancer pulmonaire humain. [29]

Une meilleure efficacité thérapeutique *in vivo* que la Dox libre se doit d'être confirmé après les bons résultats de distribution et la bonne pénétration tumorale observée pour cette NP.

#### ⌘ Efficacité anti-tumoral

*In vivo*, l'efficacité antitumorale a été démontrée à partir d'une expérience sur différents groupes de traitement de souris portant toutes une tumeur 4T1. Chaque groupe reçoit un type de traitement différent :

- Dox libre,
- Dox-DGL-PEG (DDP),
- RGD-Dox-DGL-PEG (RDDP),
- Dox-GNP (DG),
- Dox-DGL-GNP (DDG),
- RDDG.

Tous les traitements sont administrés à une dose de 5mg/kg tous les trois jours. Quatre injections de chaque produit ont été réalisées. Un groupe témoin traité au PBS permet d'évaluer la croissance normale de la tumeur en l'absence de produit thérapeutique. Comme le montre la figure 46 tous les produits inhibent la croissance des tumeurs 4T1 chez les souris. Mais les NPs DG et DDP montrent une efficacité moindre ou égale à la Dox libre. Les NPs RDDP, DDG et RDDG sont bien plus actives. Ceci témoigne de l'efficacité de ciblage du ligand RGD ainsi que de l'efficacité du système de rétrécissement DGL-GNP par clivage par les MMP-2. La simple présence du RGD permet d'accroître l'inhibition tumorale de 67,4 % (DDG à J27) à 78 % (RDDG) ce qui fait de cette dernière NP, la plus performante.

Aucune perte de poids notable n'a été observée chez les souris traitées par RDDG ce qui n'était pas le cas chez les souris traitées par Dox.

Le poids des tumeurs a également été mesuré et c'est le groupe traité par RDDG qui possèdent les tumeurs de poids le plus faible. La figure 46C vient confirmer ce résultat.

En résumé, le RDDG permet une meilleure accumulation de doxorubicine dans les tumeurs et une amélioration de l'efficacité dans le traitement du cancer.

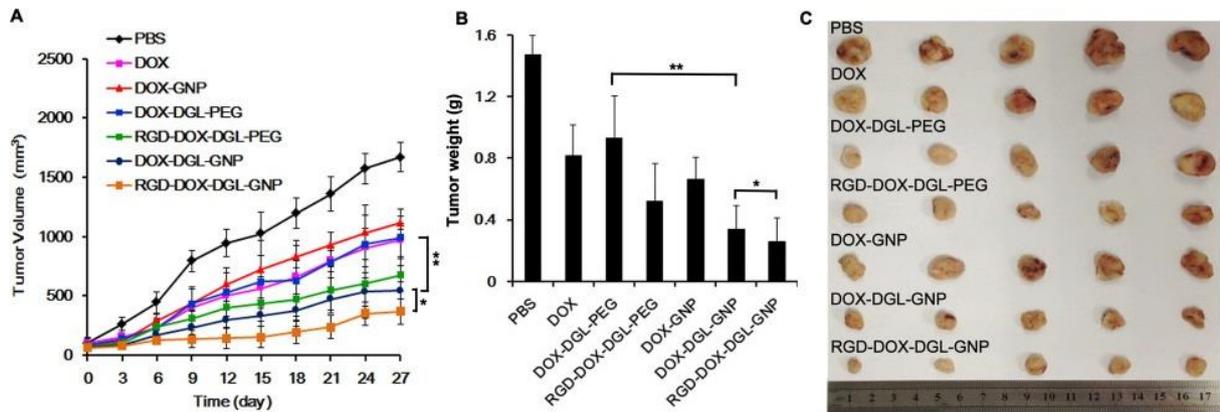


Figure 46 : Efficacité anti-tumorale mesurée par ; (A) Evolution du volume tumoral au cours du traitement ; (B) Mesure du poids des tumeurs à J27 ; (C) Dimensions réelles des tumeurs photographiées à J27 [22]

## Utilisation de Nanomicelle AmDM/DOX dans le modèle du cancer du sein résistant :

### ⌘ Caractérisation de la NPs :

Dans ce modèle, le dendrimère utilisé est composé d'un dendron polyamidoamine hydrophile de première génération (PAMAM G1) lié à deux chaînes alkyle hydrophobe constituées de 18 carbones. Cette combinaison forme un dendrimère amphiphile noté AmDM (Figure 47B).

En appliquant la méthode de dispersion de film, les AmDM forment, par auto-assemblage, des nanomicelles vides de forme sphérique dont le diamètre moyen est de 6,8 nm. En présence de doxorubicine, cet auto-assemblage des AmDM conduit à l'encapsulation de plus de 40 % de la doxorubicine pour donner AmDM/Dox (Figure 47A). Le diamètre moyen des particules AmDM/Dox atteint alors 10 nm.

Cette NP relativement petite, présente un intérêt face au mécanisme de résistance caractérisé par la surexpression de la glycoprotéine P, principale pompe à efflux dans les cellules tumorales mammaires MCF-7. Cette glycoprotéine P peut engendrer une résistance des cellules tumorales face à de très nombreux anticancéreux, telle que la doxorubicine. [27]

Sa taille relativement petite pourra permettre à AmDM/Dox d'être internalisée par la cellule *via* la macropinocytose. La NP, à travers un endosome, pourra ensuite libérer la doxorubicine au niveau intracellulaire échappant ainsi à l'efflux de la glycoprotéine (Figure 47C).

Afin de vérifier l'activité anti-cancéreuse de AmDM/Dox, plusieurs points développés à la suite de ce paragraphe ont été évalués :

- la libération de la doxorubicine au niveau tumoral,
- l'évaluation du profil anti-résistance de la NP,
- l'efficacité anti-tumorale *in vivo*.

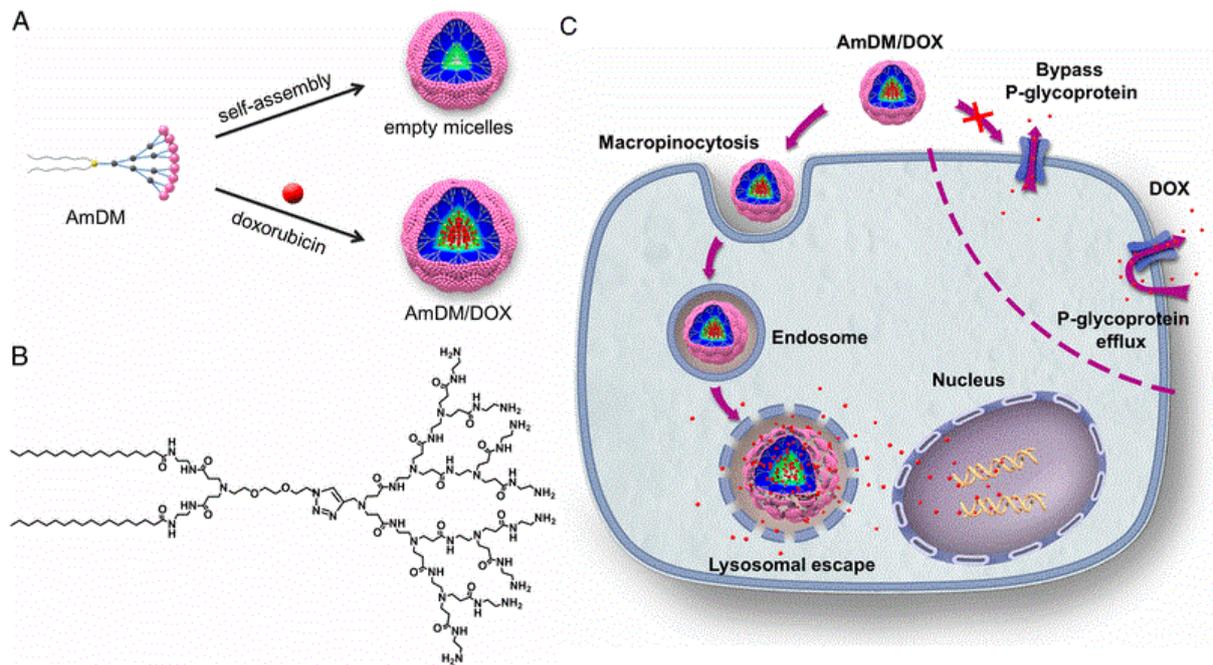


Figure 47 : (A) Formation des nanomicelles; (B) AmDM ; (C) Mécanisme théorique pour étudier le contournement de la résistance à la doxorubicine des cellules MCF-7R <sup>[27]</sup>

#### α Libération de la Dox :

Les nanomicelles AmDM ont été chargés d'un colorant fluorescent dans le proche infrarouge formant AmDM/DiR, puis injecté à des souris porteuses de tumeur MCF-7R. 48 heures après l'injection, l'IVIS a permis d'observer la biodistribution des particules AmDM/DiR et de mettre en évidence l'accumulation et la rétention du produit dans le tissu tumoral (Figure 48A). Ce résultat, commun à d'autre type de NPs, est attribué à l'effet EPR. La pénétration et la rétention dans les tumeurs, ont également été établies *in vitro* en mettant en contact soit la Dox libre soit AmDM/Dox avec un modèle de tumeur sphéroïde MCF-7R. La pénétration plus profonde de la tumeur MCF-7R par la NP est clairement visible (Figure 48B).

D'autre part, la libération de la doxorubicine est plus rapide et plus importante dans un environnement acide ( $\text{pH} = 5$ ) qu'à  $\text{pH}$  physiologique ( $\text{pH} = 7,4$ ). Le microenvironnement tumoral acide prédispose à une libération non ubiquitaire de la doxorubicine préservant les tissus sains (Figure 48C). <sup>[27]</sup>

Les dendrimères ont la particularité d'être des éponges protoniques. A  $\text{pH}$  neutre, seuls les groupements amines superficiels des dendrons sont protonés. A  $\text{pH}$  acide, les groupements amines à l'intérieur des dendrimères finissent par être également protonés ce qui entraîne une répulsion électrostatique entre les dendrimères conduisant à la libération de la doxorubicine. Pour rappel les cellules tumorales possèdent à l'instar des cellules normale des mécanismes pour dégrader les macromolécules endocytées. Les lysosomes chargés de la dégradation utilisent des enzymes acides pour dégrader les molécules, ce qui théoriquement est un avantage pour une NP de type dendrimérique libérant le médicament toxique préférentiellement à  $\text{pH}$  acide.

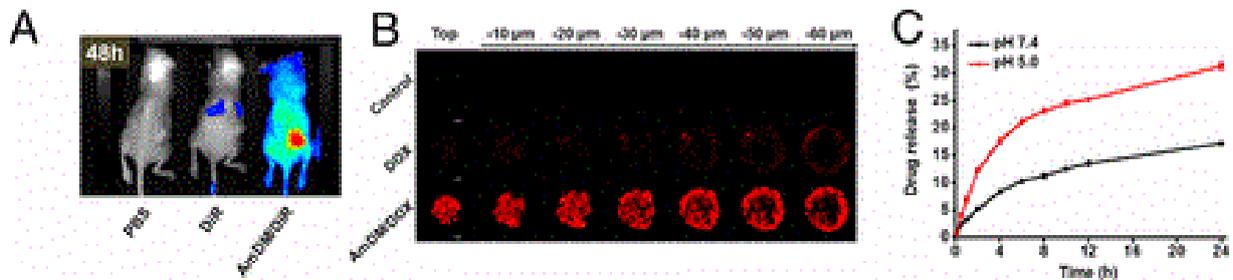


Figure 48 : (A) Image de souris porteuse de tumeur MCF-7R recevant AmDM/DiR vu au IVIS. (B) Analyse au microscope photonique de différentes coupes d'une tumeur sphéroïde MCF-7R traitée par Dox libre et AmDM/Dox. (C) Evolution au cours du temps de la libération de Dox par AmDM/Dox à pH acide et neutre à 37°C. [27]

α Efficacité et profil anti-résistance *in vitro* :

- Dans les cellules MCF-7S, sensibles à la doxorubicine : lorsque la concentration en doxorubicine est supérieure à 1 μM, Caelyx® est moins efficace que la Dox libre elle-même moins efficace qu'AmDM/Dox (à concentration de doxorubicine identique). AmDM/Dox présente une activité antiproliférative à partir d'une concentration de Dox > à 0,01 μM.

L'efficacité d'AmDM/Dox est due à sa rapide absorption par les cellules cancéreuses dès 30 min après traitement, alors que Dox libre n'est internalisée que 2 h après traitement (Figure 49A, C).

- Dans les cellules MCF-7R, résistantes à la doxorubicine : ici pour avoir une cytotoxicité comparable aux cellules MCF-7S il faut une concentration de doxorubicine libre plus de 10 fois supérieure pour détruire 50 % de cellules cancéreuses résistantes. Alors que pour AmDM/Dox il n'y a aucun changement, seulement 1 μM est suffisant pour détruire la moitié des cellules résistantes. En concentration équivalente en doxorubicine de 100 μM il n'y a quasiment plus aucune cellule cancéreuse résistante viable. Le taux d'absorption de la Dox libre est quasiment nul quelles que soient la durée et la concentration du traitement alors qu'il est inchangé avec AmDM/Dox (Figure 49B, D). [27]

Une étude mesurant l'efflux de la doxorubicine par les cellules MCF-7R traitées par de la Dox libre ou libérée par les nanomicelles AmDM/Dox montre qu'après 1 h la quasi-totalité de la doxorubicine libre a été éliminée alors qu'au bout de 8 h l'efflux de la doxorubicine libérée par AmDM/Dox est nulle (Figure 49E).

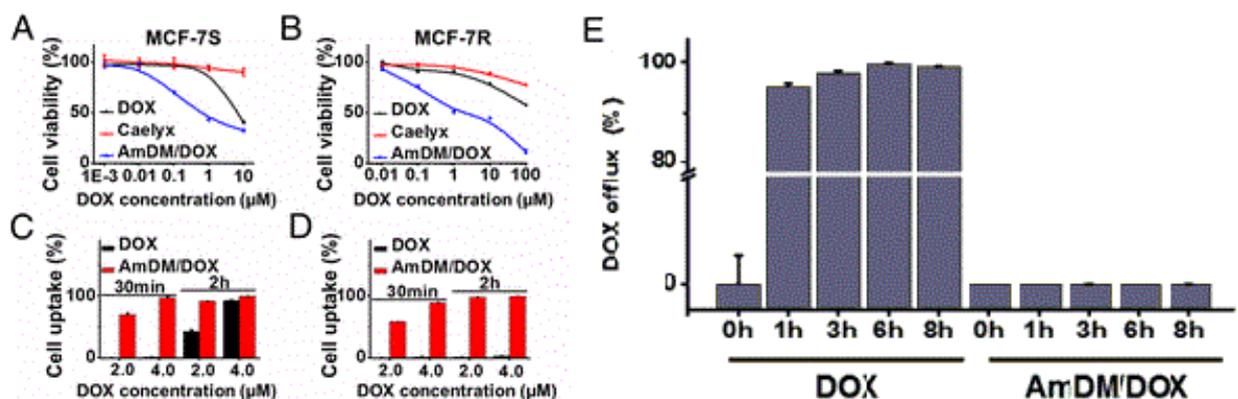


Figure 49: Activité cytotoxique de AmDM/Dox, Caelyx® et Dox libre : (A) sur des cellules MCF-7S du cancer du sein humain sensibles à la doxorubicine ; (B) sur des cellules résistantes à la doxorubicine MCF-7R. Mesure de l'absorption cellulaire de Dox libre et AmDM/Dox dans les cellules 30 min et 2 h après injection : (C) MCF-7S ; (D) MCF-7R ; (E) Pourcentage de l'efflux de doxorubicine dans les cellules MCF-7R après utilisation de Dox libre et AmDM/Dox [27]

*In vitro*, l'efflux de la doxorubicine, caractérisant la résistance des cellules cancéreuses, par la glycoprotéine P est inhibé par l'utilisation de nanomicelles d'AmDM/Dox. L'activité antiproliférative de la NP à base de AmDM est supérieure à celle de la NP liposomale (i.e. Caelyx®) et à celle de la Dox libre quels que soient la concentration utilisée et le profil de résistance de la cellule cancéreuse.

α Efficacité anti-tumorale *in vivo* :

Des souris porteuses de tumeurs MCF-7R ont reçu des injections de Dox libre et d'AmDM/Dox aux doses de 2,5 mg/kg et 5 mg/kg. Le volume de la tumeur, le poids des souris traitées et la quantité de souris survivantes ont été mesurés pendant 14 jours (Figure 50A, B et C). Une analyse histologique des tissus tumoraux (Figure 50D) et cardiaques (Figure 50E) a ensuite été effectuée pour estimer la toxicité.

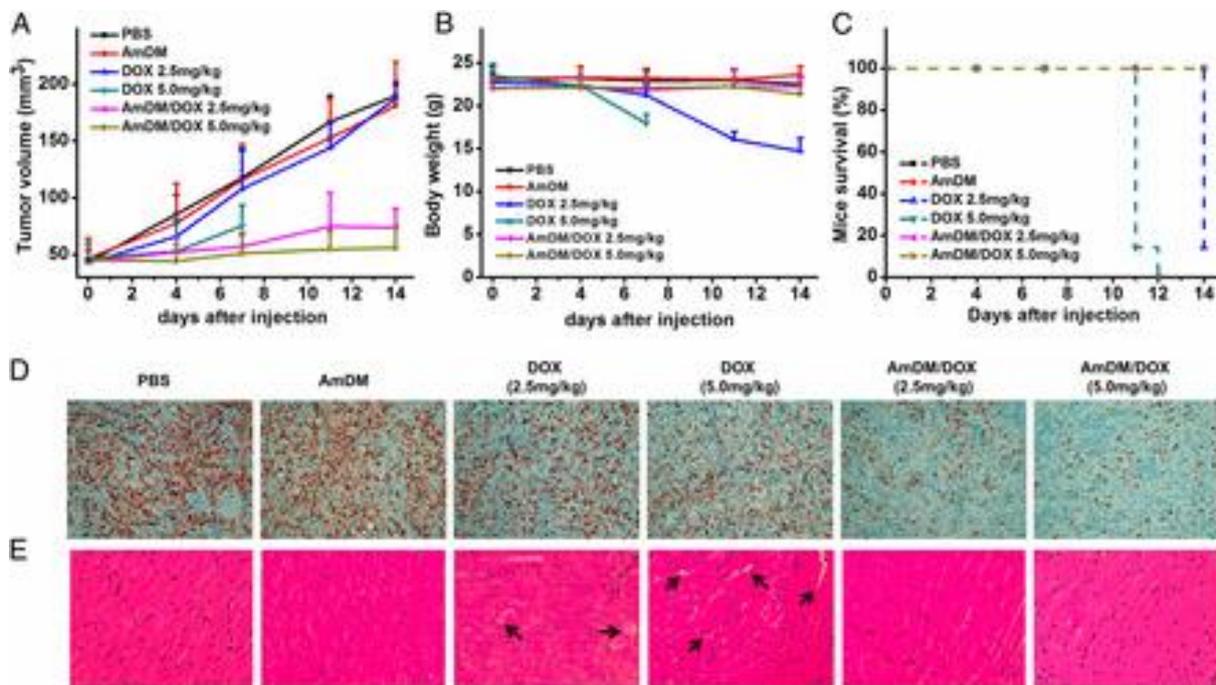


Figure 50 : Activité antitumorale et cardiotoxicité de AmDM/Dox sur des souris portant des xénogreffes de tumeurs résistantes MCF-7R [27]

La prolifération tumorale n'est freinée qu'à la concentration de 5 mg/kg de Dox libre alors que pour AmDM/Dox, une concentration 2 fois moins importante en doxorubicine (soit 2,5 mg/kg) est suffisante pour avoir des résultats comparables durant les 4 premiers jours de traitement. Par la suite, l'efficacité de l'AmDM/Dox sera supérieure à l'efficacité de la Dox libre.

L'analyse histologique des tissus tumoraux marqués avec Ki-67 montre clairement la différence entre les traitements par Dox libre et par AmDM/Dox et ce aux deux concentrations étudiées.

Le poids des souris traitées avec la NP est quasi constant alors qu'une perte de poids significative est constatée chez les souris traitées par Dox libre. De plus, le traitement par Dox libre à la dose de 5 mg/kg a provoqué la mort de toutes les souris traitées. Une seule souris a survécu au traitement à 2,5 mg/kg. Ce résultat témoigne de l'importante toxicité de la

doxorubicine lorsqu'elle est utilisée sous forme libre. Cette toxicité se traduit principalement par des atteintes cardiaques qui peuvent être observées sur les coupes histologiques du tissu cardiaque des souris traitées (Figure 50E : les flèches indiquent des lésions).

L'utilisation des NPs AmDM/Dox se veut d'autant plus rassurante qu'il n'y a que peu de différence entre les tissus cardiaques des souris traitées par AmDM/Dox et celles traitées par PBS.

## **C- Résumé**

Les dendrimères utilisés tels quels ou modifiés, sont des outils de premier ordre pour cibler le tissu tumoral en épargnant les tissus sains (notamment cardiaques dans le cas de la doxorubicine). Les différents types de dendrimères utilisés pour délivrer la doxorubicine ont montré leur efficacité, ainsi que leur supériorité vis-à-vis de Dox libre du fait d'un profil de toxicité moindre permettant une utilisation à des doses plus importantes. Les NPs RDDG ou AmDM/Dox, permettent une pénétration tumorale plus profonde et contournent les mécanismes d'efflux de médicaments responsables de résistances thérapeutiques.

Lors de leurs utilisations en imagerie, ils permettent un diagnostic plus précis et précoce ainsi qu'un meilleur suivi de l'évolution tumorale.

Par leur composition riche en groupements amines primaires secondaires ou tertiaires, les dendrimères sont très utiles pour libérer la doxorubicine uniquement au niveau du tissu tumoral acide. La protonation de ces groupements amines induit une répulsion qui facilite le relargage de la doxorubicine dans le milieu tumoral.

De plus, les groupements amines offrent de nombreuses possibilités de liaison à des ligands de ciblage de cellules cancéreuses, que ce soit par les intégrines, par certains récepteurs fortement exprimés dans divers cancers, ou encore par la surexpression d'enzymes dans le milieu tumoral.

Ces propriétés permettent de faire des dendrimères un véhicule de choix pour l'administration de la doxorubicine. L'utilisation des NPs dendritiques semble plus sécurisant et pourrait permettre de révolutionner le traitement de certains cancers, qu'ils soient sensibles ou bien résistants. Ceci pourrait également élargir le champ d'action de la doxorubicine à des cancers qui jusque-là n'étaient pas traités à l'aide de cette molécule. Toutefois, de nombreuses études cliniques restent encore à réaliser pour installer les dendrimères dans l'arsenal thérapeutique.

## 4) Autres types de NPs véhiculant la doxorubicine

D'autres NPs innovantes peuvent être utilisées dans certains cancers tels que le cancer du poumon ou le cancer du sein. Par exemple,

### A- Gel de nanofibres

Un gel de nanofibre a été élaboré pour le traitement local du carcinome du sein [30]. Comme dans les exemples vus précédemment, ce type de NPs est employé pour une délivrance ciblée de la doxorubicine dans la tumeur afin d'éviter les effets délétères de la doxorubicine sur les autres tissus en particulier cardiaques.

Les nanofibres sont composés de deux peptides amphiphiles (PA) notés E<sub>3</sub>PA (Lauryl-VVAGEEE) et K<sub>3</sub>PA (Lauryl-VVAGKKK).

Dans ces deux peptides, l'enchaînement des quatre premiers acides aminés est identique : 2 valines, une alanine suivie d'une glycine. Sur ce motif sont greffés soit trois Lysines (K) soit 3 glutamates (E) (Figure 51a). La formation du gel se fait grâce aux charges opposées des peptides E (chargés négativement) et des peptides K (chargés positivement) par coassemblage via des interactions de nature électrostatiques mais aussi grâce à des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes.

L'enchevêtrement des nanofibres peut être apprécié grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB). L'organisation structurale des nanofibres est visible au microscope électronique en transmission (MET) (Figure 51).

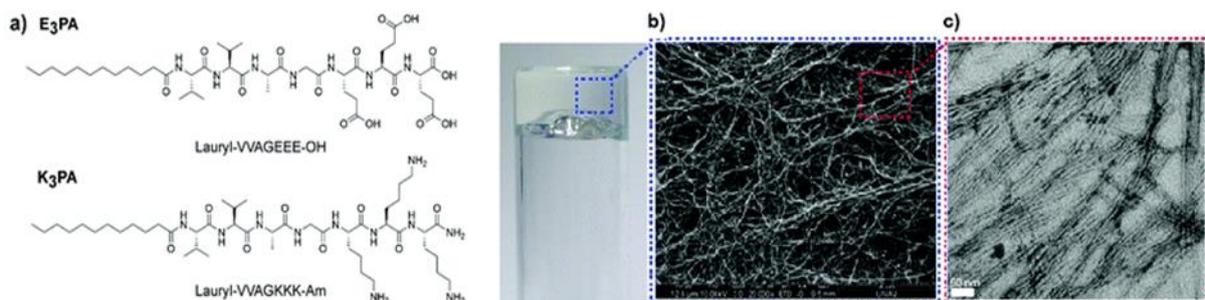


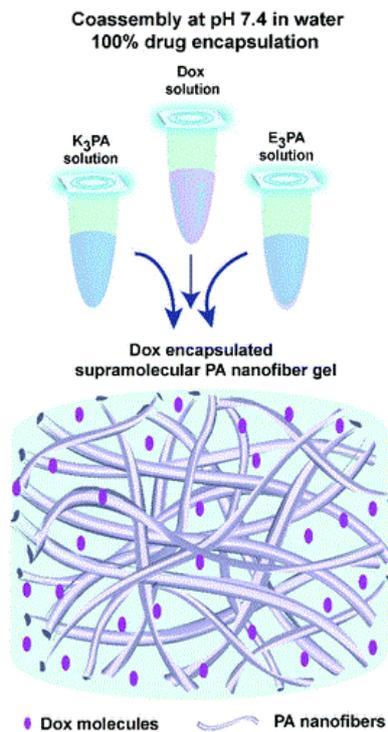
Figure 51: (a) Représentation de Cram des peptides E<sub>3</sub>PA et K<sub>3</sub>PA ; (b) Imagerie MEB du complexe supramoléculaire formant le gel ; (c) Imagerie MET du nanoréseau formé par les nanofibres de peptides amphiphiles coassemblés [30]

⌘ Encapsulation et libération de la doxorubicine :

L'encapsulation de la Dox dans le gel se fait conjointement à la formation du gel. La doxorubicine en solution est mélangée avec K<sub>3</sub>PA chargé positivement, puis la formation de nanofibres débute avec l'ajout de E<sub>3</sub>PA chargé négativement à pH physiologique.

La formation du réseau de nanofibres composant le gel permet d'encapsuler jusqu'à 100 % de doxorubicine (Figure 52). Le taux de libération de la doxorubicine peut être contrôlé en modulant la concentration de PA du gel. Selon les résultats de l'étude menée par Cinar et al. [30] le taux de libération de Dox est supérieur à 60 % lorsque le poids de PA représente au

plus 0,5 % du volume total du gel. Ce taux est respectivement aux alentours de 55, 50 et 45 % pour un poids de PA de 1, 2 et 3 %.



La libération de la doxorubicine dépend des interactions du médicament avec le domaine alkyle hydrophobe des nanofibres, des AA chargés positivement et négativement ainsi que des molécules d'eau piégées dans le nanoréseau.

Le gel de nanofibre de PA 1% a été choisi pour une étude *in vivo* du fait de sa dégradabilité au niveau tumoral par les enzymes protéolytiques ainsi que pour son taux de libération contrôlé de doxorubicine.

Figure 52 : Représentation schématique du coassemblage des PA encapsulant la doxorubicine à pH = 7,4. [30]

#### α Efficacité thérapeutique *in vivo* :

Des xénogreffes de tumeurs formées par des cellules 4T1 du cancer du sein ont été implantées chez des souris comme modèle de tumeur mammaire solide.

Lorsque le volume de tumeur atteint 100 mm<sup>3</sup>, les souris reçoivent selon leur groupe :

- 10 mg/kg de Dox libre,
- une dose équivalente en gel de Dox/PA à 1%,
- une solution contrôle de PBS,
- du gel PA 1% sans doxorubicine.

Le volume de la tumeur est contrôlé tous les trois jours. Les souris sont sacrifiées au 18ème jour (Figure 53).

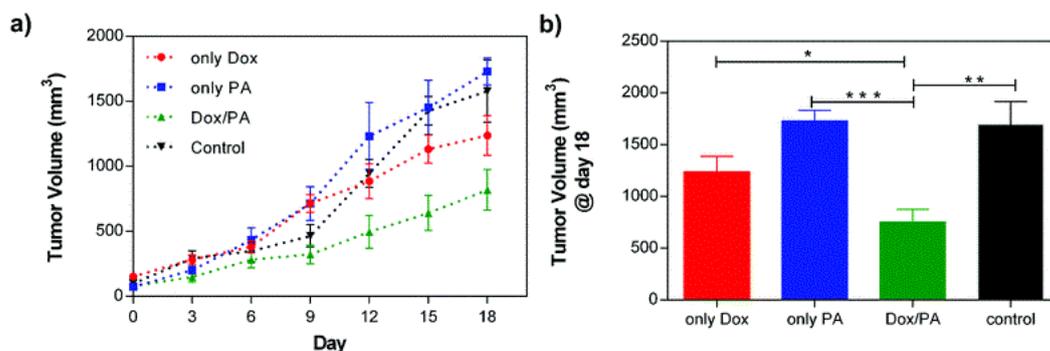


Figure 53 : (a) Evolution de la croissance de tumeur 4T1 chez des souris après injection de Dox libre, Dox/PA, PBS (contrôle) et PA sans dox ; (b) Taille de la tumeur à J18 après injection. [30]

Les résultats montrent clairement qu'au niveau de l'efficacité thérapeutique le gel Dox/PA entraîne une plus grande inhibition de la croissance tumorale que Dox libre. Il faut noter que l'administration s'est faite au niveau du site tumoral ce qui réduit d'autant plus la distribution aux autres organes sains.

## B- Copolymères

Des essais précliniques et cliniques ont montré l'intérêt de l'utilisation de NPs polymériques auto-assemblées à base de PEG-PAA (Poly Acide Aminés) : bonne biocompatibilité et excellente dégradabilité biologique associées aux qualités propres des NPs. [31] Des chercheurs ont choisi de l'associer à la doxorubicine dans le traitement expérimental de certaines tumeurs.

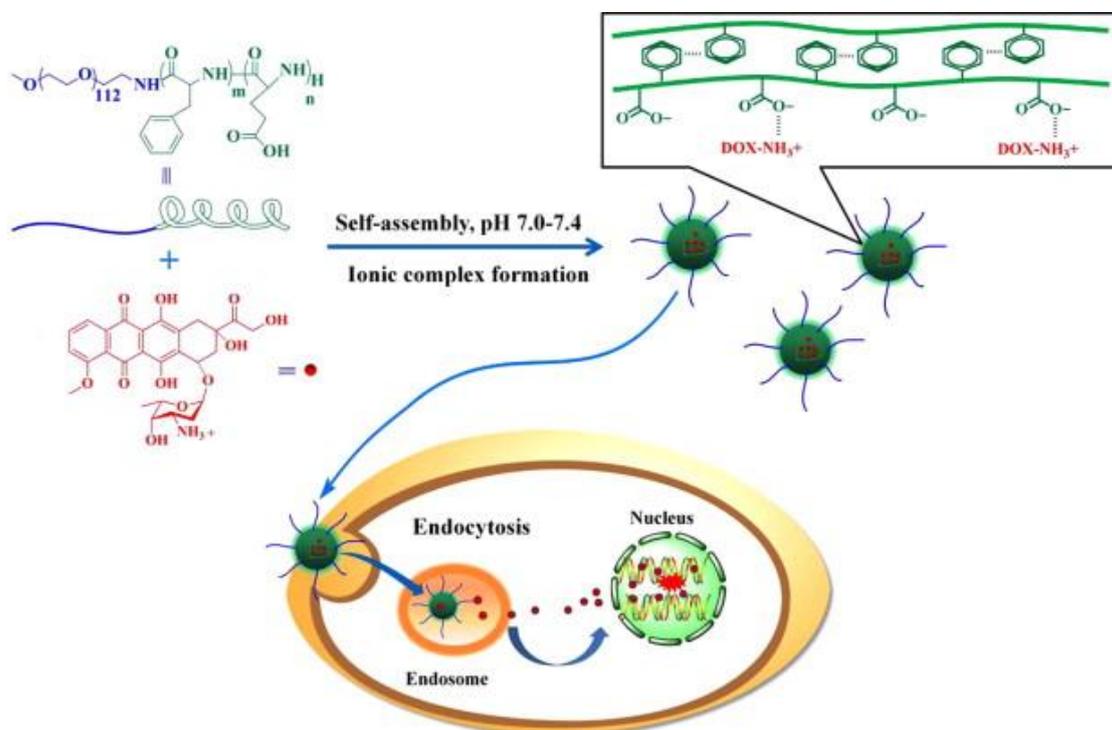


Figure 54 : Schéma de préparation et mécanisme d'action théorique de Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe). [32]

L'objet de l'étude est une NP composée de méthoxypolyéthylène glycol – b – poly (acide glutamique-co-phenylalanine), également nommée mPEG-b-P(Glu-co-Phe), chargée de doxorubicine par interactions électrostatiques (Figure 54). [32]

Le mPEG-b-P(Glu-co-Phe) présente une capacité de charge de doxorubicine intéressante qui est d'environ 97 %.

⌘ Libération du médicament :

La libération *in vitro* de doxorubicine par la NPs a été mesurée à différents pH (Figure 55). La doxorubicine est libérée plus rapidement et en quantité plus importante dans un environnement acide (pH 5,5) par rapport au pH physiologique (pH 7,4). En 12 h environ 60 % de doxorubicine est libéré à pH acide (proche du pH tumoral) alors que seulement 22 % de la Dox a été libérée en condition physiologique normale.

Les pH dans les endosomes et lysosomes sont inférieurs à 5,5. Il se pourrait que dans un tel environnement, le taux de doxorubicine libéré par les NPs soit encore plus important. Comme dans les études précédemment mentionnées, les tissus sains, à pH physiologique ne subissent qu'une faible libération de doxorubicine entraînant un moindre effet toxique.

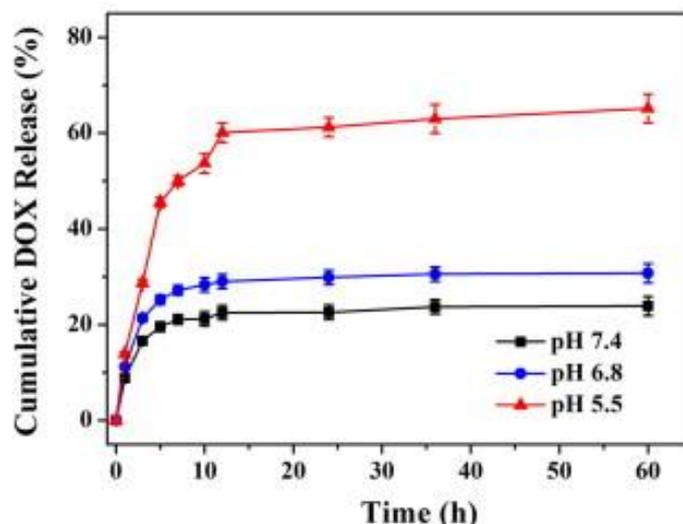


Figure 55 : Libération de la Dox par Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) en fonction du pH à 37°C [32]

α Efficacité thérapeutique :

L'efficacité thérapeutique de Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) a été mesurée et comparée à la doxorubicine libre chez des souris portant des xénogreffes de tumeur de poumon de cellules A549 (typiques du carcinome pulmonaire non à petites cellules).

Avant cette expérience, la dose de charge et le ratio de survie ont été évalués sur des souris saines. Ce ratio a été mesuré pour des doses allant de 5 à 25 mg/kg de Dox libre et de Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe). Toutes les souris ont survécu à des doses allant jusqu'à 10 mg/kg quel que soit le produit injecté. A 15 mg/kg toutes les souris traitées par Dox libre sont décédées contrairement à celles traitées Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) qui ont toutes survécu. Ces résultats confirment là encore que sous forme de NP la doxorubicine est moins toxique que sous forme libre. [32]

Ensuite l'efficacité *in vivo* a été évaluée. Les souris ont subi 4 injections à J0, J3, J7 et J10 des produits à 2 et 4 mg/kg de Dox libre et Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe). Le volume des tumeurs et le poids des souris ont été mesurés (Figure 56).

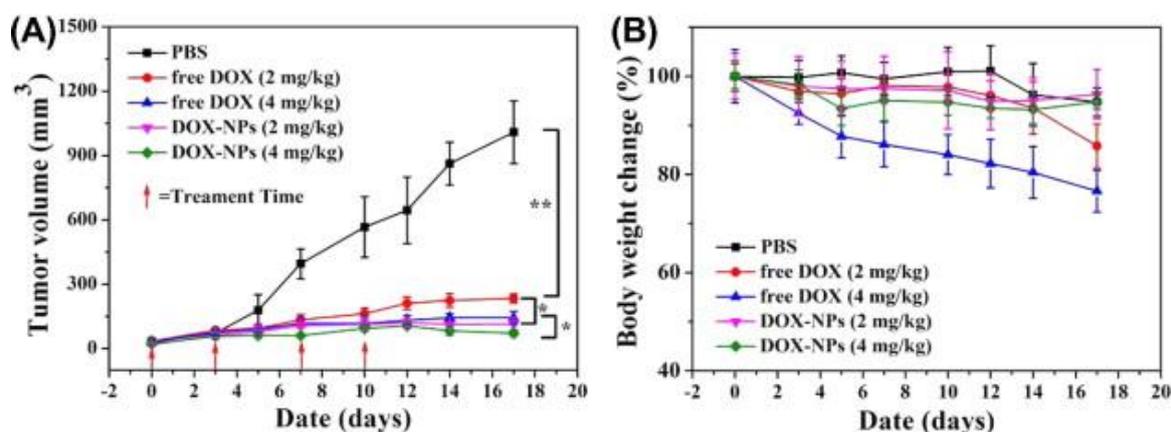


Figure 56 : (A) Croissance de tumeur chez des souris recevant les injections de Dox libre et Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) ; (B) Variation du poids des souris traitées [32]

17 jours après la première injection à 2 mg/kg, les volumes des tumeurs sont en moyenne de 233 et 113 mm<sup>3</sup> respectivement chez les groupes traités par Dox libre et Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe). A 4 mg/kg ces valeurs sont de 143 et 72 mm<sup>3</sup>. Initialement le volume des tumeurs à la première injection était en moyenne de 50 mm<sup>3</sup>.

Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe), quel que soit le dosage utilisé, présente une meilleure efficacité thérapeutique que Dox libre. De plus l'analyse de la figure 56B montre une variation du poids corporel des groupes de souris traitées par Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) comparable au groupe de souris traitées par PBS. A contrario les deux groupes traités par Dox libre à 2 ou 4 mg/kg présentent une nette diminution du poids des souris marqueurs d'une toxicité.

Ces résultats démontrent que la forme NP utilisant la doxorubicine possède *in vivo* à la fois une activité anti-tumorale plus importante mais également une toxicité réduite. Ceci peut s'expliquer par une libération rapide de la doxorubicine par Dox-mPEG-b-P(Glu-co-Phe) au niveau tumoral ainsi que par une accumulation préférentielle dans la tumeur. [32]

**Les formes nanoparticulaires décrites précédemment permettent de délivrer de la doxorubicine en améliorant la distribution tout en sécurisant l'administration du principe actif. Il est démontré dans un cas comme dans l'autre une diminution significative du taux de la croissance tumorale chez les souris. Une toxicité moins importante a été montrée du fait d'une administration locale du produit, ainsi qu'une accumulation tumorale supérieure à celle de la Dox libre.**

**Ces innovations offrent un nouvel espoir dans le cadre du traitement du carcinome mammaire et du carcinome pulmonaire non à petites cellules. Les études *in vivo* sur animal sont encourageantes. Toutefois, la différence inter-espèces qui existe, nécessite la réalisation d'études cliniques afin tout d'abord de référencer les potentiels risques toxiques chez l'humain, puis, de confirmer les avantages d'utilisation de la forme nanoparticulaire.**

## II] Nanoparticules vectorisant IR780

### 1) Caractéristiques de IR780

Le IR780 de son vrai nom IUPAC le 2-[2-[2-chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-diméthyl-1-propyl-2H-indol-2-ylidène)éthylidène]-1-cyclohexen-1-yl]éthényl]-3,3-diméthyl-1-propylindolium iodure <sup>[33]</sup> (Figure 57) possède plusieurs propriétés intéressantes dans la lutte contre le cancer :

- en imagerie : l'iodure IR780 est un colorant du proche infrarouge (NIR) dérivé des heptaméthine cyanine, il émet une fluorescence très élevée quand il est excité entre 807 et 823 nm.
- en thérapie : une fois irradié au laser, l'IR780 provoque une action photodynamique et photothermique dont le mécanisme d'action est expliqué dans le paragraphe suivant.

Malgré son utilisation en thérapie ou en diagnostic contre le cancer, l'IR780 présente quelques inconvénients :

- Il est très hydrophobe (du fait du cycle de cyclohexényle et de l'atome de chlore) ce qui le rend très peu soluble dans les liquides biologiques. Ceci empêche l'administration d'une dose qui serait suffisamment importante pour observer une accumulation tumorale du produit, et de ce fait un effet thérapeutique.
- une absorption tumorale faible ce qui rend plus contraignante l'action photodynamique et photothermique engendrée par l'irradiation au laser dans le proche infrarouge,
- une clairance sanguine accrue ayant pour conséquence une demi vie courte,
- une toxicité aiguë lorsque la dose administrée en iv dépasse 1 mg/kg d'IR780 pur. <sup>[34]</sup>

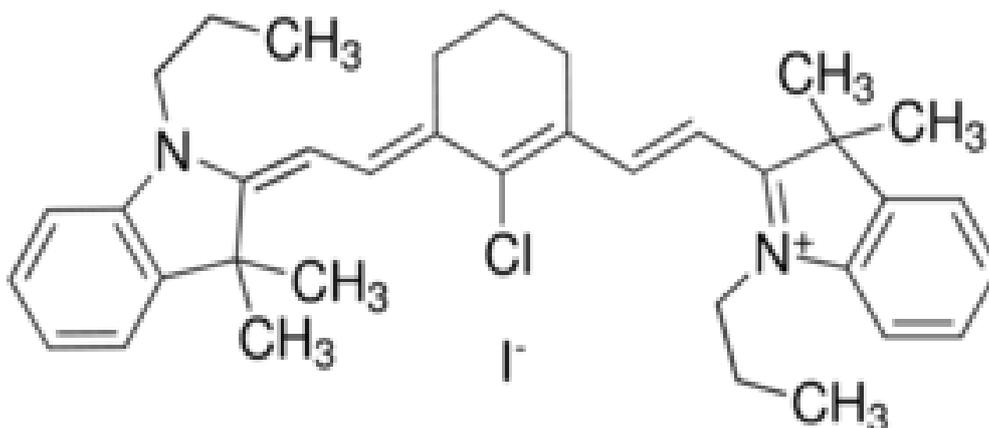


Figure 57 : Représentation topologique de IR780 (forme iodure)

Pour permettre l'utilisation de l'IR780 en cancérologie, différentes études ont été menées. Elles s'intéressent à l'utilisation de différents types de nanostructures associées ou internalisant l'IR780.

Ce chapitre visera à montrer comment les NPs développées permettent de pallier les inconvénients de l'IR780 en améliorant sa solubilité, en augmentant le ciblage et l'accumulation tumorale, tout en réduisant ou supprimant la toxicité induite.

## 2) Nanocapsules

### A- Thérapie

Les NPs sont utilisées pour contrecarrer les inconvénients liés à l'utilisation de cette molécule [35]. En encapsulant l'IR780, très hydrophobe donc peu absorbé par les cellules cancéreuses, par de la sérualbumine humaine (HSA), ils forment une NP nommée HSA-IR780. Les molécules d'albumine étant hydrophiles, HSA-IR780 est soluble, ce qui permet une meilleure absorption par les cellules cancéreuses. Cette formulation réduit également la toxicité de l'IR780.

L'utilisation de l'albumine est judicieuse car elle a la possibilité de traverser les parois vasculaires et donc, de passer du milieu vasculaire, où les NPs sont injectées, au milieu tumoral, où elles doivent agir. Ceci est rendu possible grâce au récepteur gp60, médiateur de la transcytose, des cellules endothéliales. L'accumulation spécifique des nanoparticules dans le milieu tumoral résulte également de leur taille nanométrique et de l'effet EPR [36] (Figure 58).

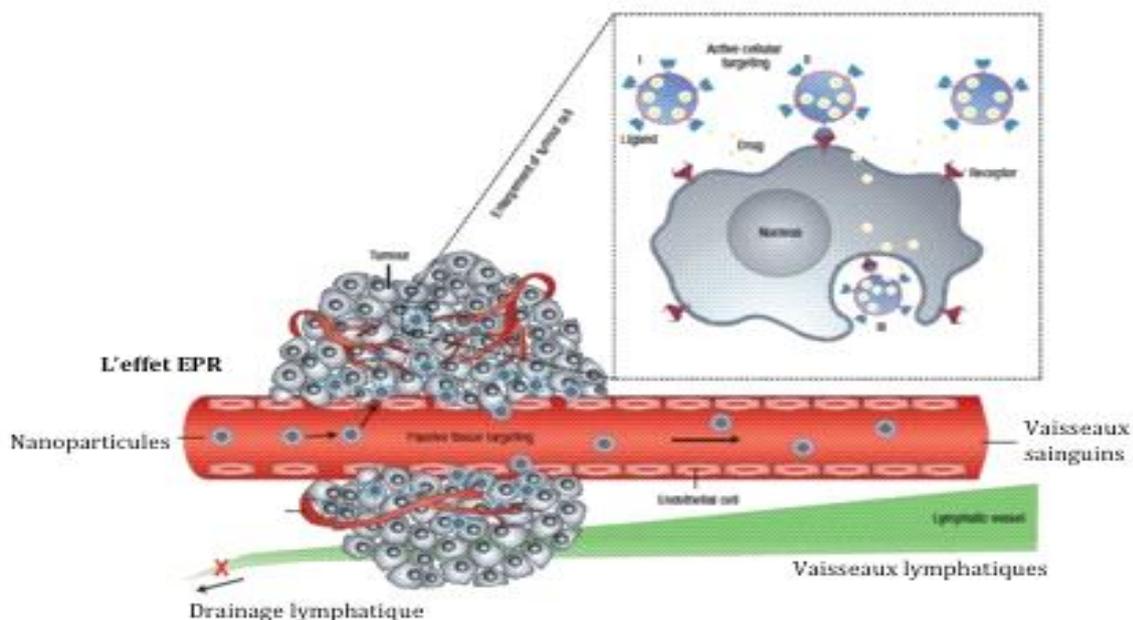


Figure 58 : Accumulation des NPs au niveau tumoral, effet EPR

Lors de cette étude, l'irradiation par laser ( $\lambda = 808 \text{ nm}$ ) de la NP en solution aqueuse permet d'induire deux réactions thérapeutiques : la photothermie (PTT) et la photodynamie (PDT). Ces deux réactions auront un mécanisme d'action différent sur les cellules cancéreuses. La PTT entrainera une augmentation de la température de la tumeur alors que le PDT entraine la formation d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), possédant un pouvoir cytotoxique (Figure 59).

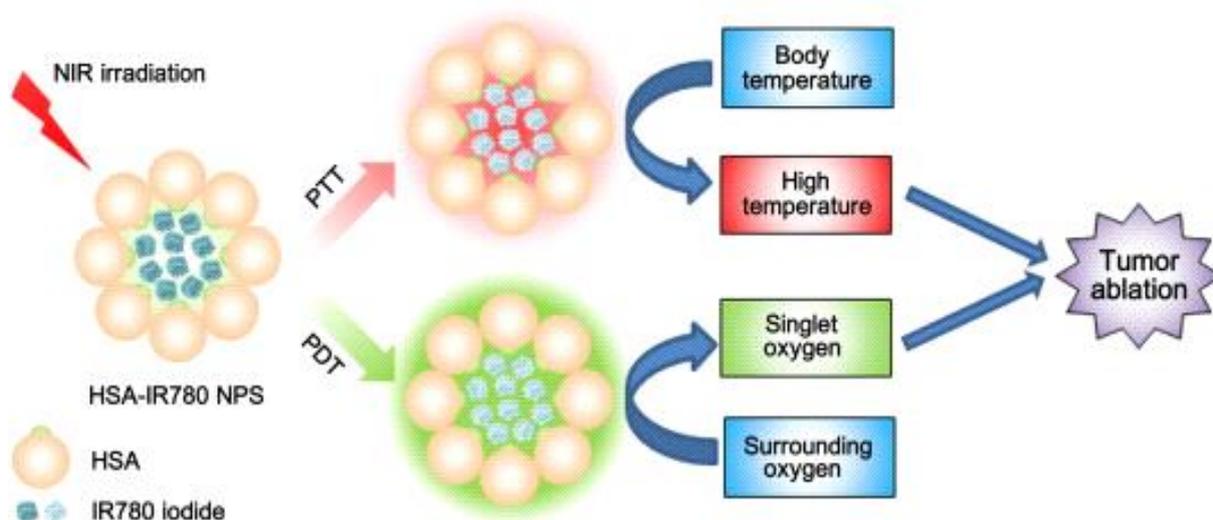


Figure 59 : Principes de l'irradiation au proche infrarouge (NIR) des NPs HSA-IR780 [37]

Une autre approche a été proposée par Lin *et al.* [37]. Ils ont ajouté un oxyde de fer supramagnétique (SPIO) à l'IR780 pour créer un cœur hydrophobe qu'ils ont ensuite recouvert d'HSA et, par la suite, pégylé. La nanoparticule obtenue, nommée PEG-HISP (Figure 60), est utilisée à but diagnostique et en thérapie du fait de ses propriétés photothermiques.

Que ce soit pour cette étude [37] ou la précédente [35], l'utilisation du microscope électronique à transmission (MET) a été indispensable pour suivre la synthèse des différentes nano-formulations, car il permet d'apprécier la taille, la surface de contact et la morphologie des structures.

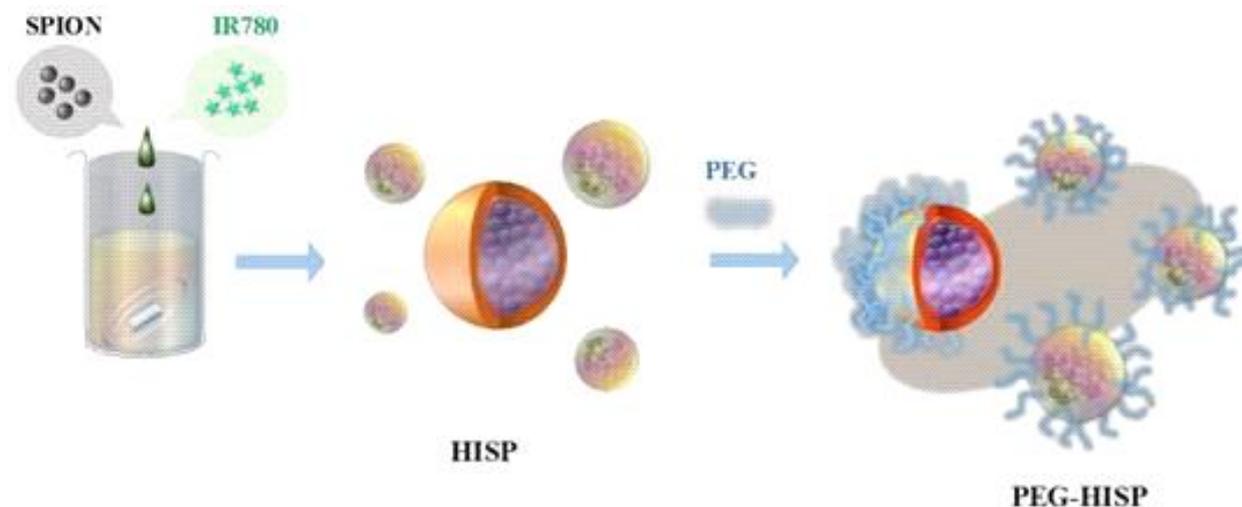


Figure 60 : Fabrication de PEG-HISP [37]

Après l'injection de PEG-HISP, les cellules cancéreuses ont absorbé les HISP efficacement ce qui a entraîné leur mort après l'irradiation mettant ainsi en évidence le pouvoir thérapeutique du nanocomplexe magnétique PEG-HISP tout comme celui de la NP HSA-IR780.

La concentration maximale à l'intérieur des cellules cancéreuses des NPs est atteinte aux alentours de 24 heures après l'injection quelle que soit la forme utilisée : IR780 libre, HISP

ou PEG-HISP (figure 61A). Les cellules cancéreuses CT26 ont ensuite été incubées avec IR780 libre, HISP et PEG-HISP à diverses concentrations d'IR780 pendant 24 heures. Une cytotoxicité négligeable a été observée pour HISP et PEG-HISP (0,02 ~ 10 µg/mL), ce qui suggère leur bonne compatibilité cellulaire (figure 61B). En revanche, une cytotoxicité significative a été observée pour les cellules ayant reçues IR780 libre. L'effet anticancéreux à médiation photothermique a été étudié sur les cellules CT26, pré-alimentées avec du PEG-HISP (PEG-HSA-SPIO) ou du PEG-HISP. Un laser à 808 nm a été utilisé pour irradier (1,5 W/cm<sup>2</sup>) les cellules pendant 1, 3 ou 5 minutes (Figure 61C). La viabilité cellulaire a diminué en fonction du temps d'exposition au laser. Ces résultats suggèrent que le PEG-HISP n'était pas cytotoxique avant son irradiation mais qu'après celle-ci, il présenterait un effet photothermique efficace. En effet, après 5 minutes d'irradiation du PEG-HISP, environ 70% des cellules cancéreuses sont détruites.

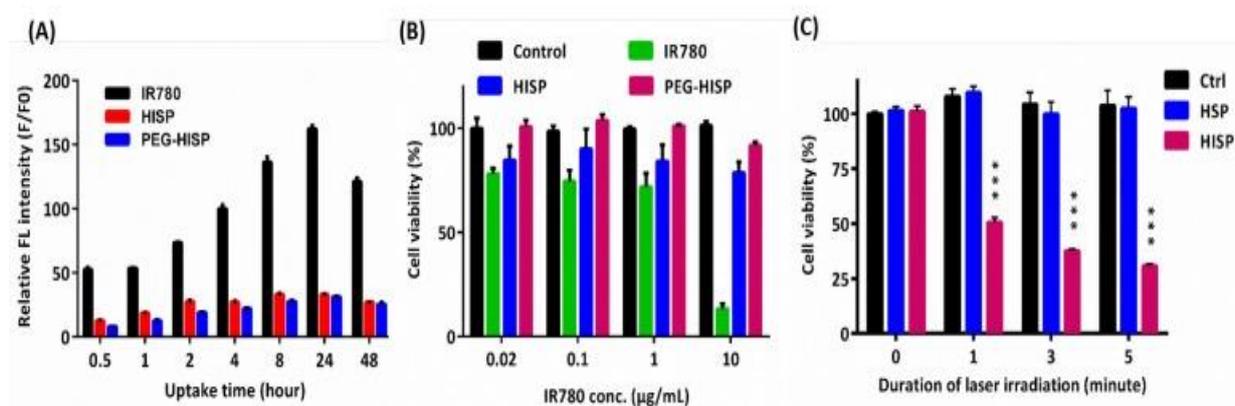


Figure 61: (A) Analyse au cours du temps de l'absorption de IR780 libre, HISP et PEG-HISP par les cellules cancéreuses CT26 ; (B) Effet de la concentration d'IR780 sur le test de cytotoxicité d'IR780 libre, HISP et PEG-HISP sur les cellules cancéreuses ; (C) Influence de l'irradiation NIR ( $\lambda = 808$  nm) sur la viabilité des cellules cancéreuse CT26 <sup>[37]</sup>

L'accumulation des NPs dans la tumeur CT26 a été clairement mise en évidence sur des souris anesthésiées ayant reçu une irradiation ( $\lambda = 808$  nm) de 5 min au laser. On observe une fluorescence bien plus marquée après utilisation de PEG-HISP que lors de l'utilisation d'IR780 libre. Une accumulation maximale du produit au niveau tumoral s'observe 24 h après l'injection (Figure 62).

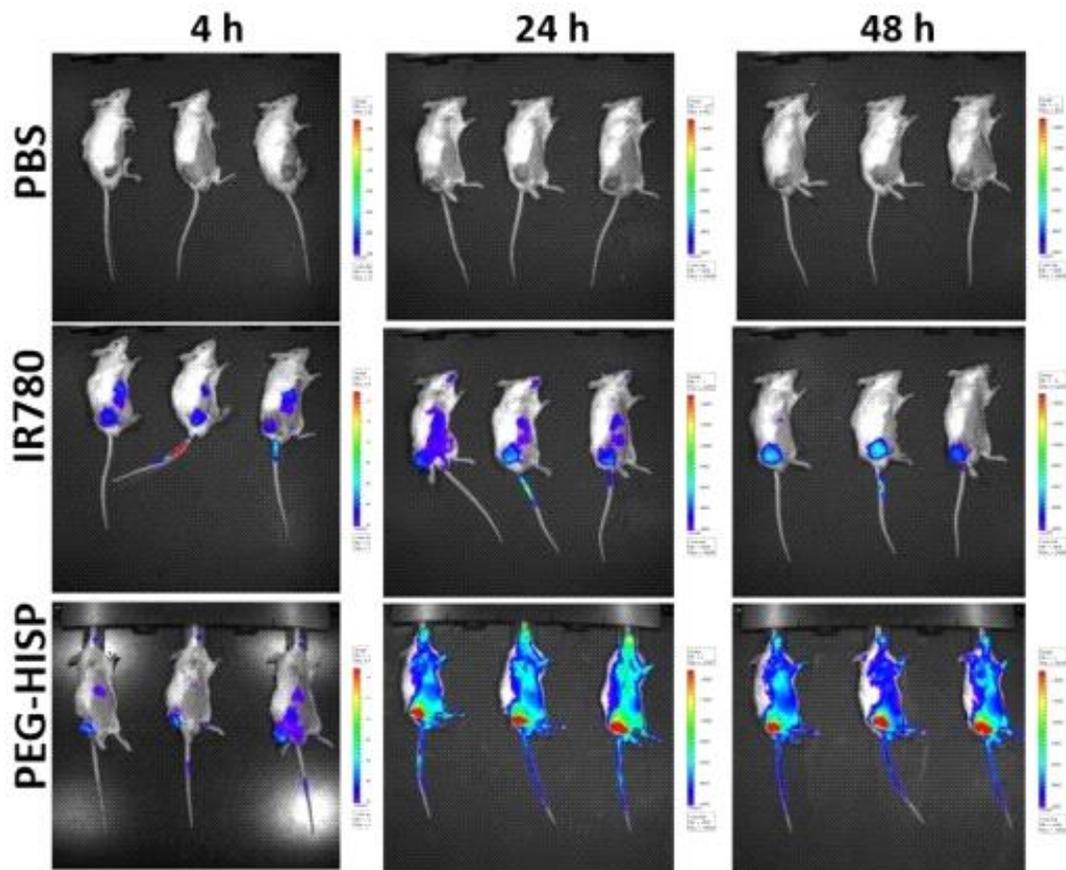


Figure 62 : Analyse de la biodistribution de IR780, PEG-HISP injecté à des souris ayant des tumeurs CT26 via l'utilisation IVIS <sup>[37]</sup>

La Figure 63 montre une augmentation de température *in vitro* (signe d'une activité photothermique) bien supérieure lors de l'utilisation de PEG-HISP que lors de l'injection d'IR780 libre.

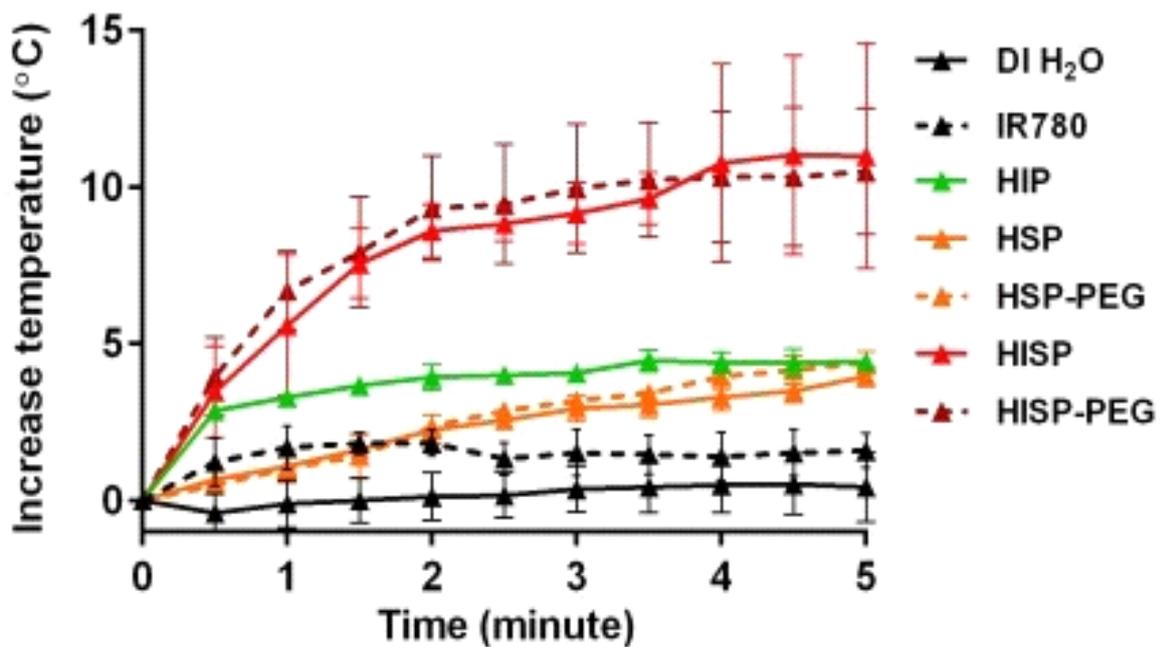


Figure 63 : influence de la durée d'irradiation NIR sur la température des différentes solutions *in vitro*. (HIP= HSA-IR780, HSP= HSA-SPIO) <sup>[37]</sup>

## B- Toxicité

Pour rappel, l'IR780 est un colorant hydrophobe qui est toxique, ce qui limite la dose maximale tolérée à 1,5 mg/kg chez la souris. Les NPs vont être employées pour sécuriser et augmenter les doses injectées. En effet toutes les souris meurent lors d'une seule injection de 2,5 mg/kg d'IR780 alors que leurs congénères traitées par une dose identique d'IR780 sous forme NPs ont toutes survécu.

Pour provoquer une cytotoxicité cellulaire il faut absolument que les NPs soient irradiées. Sans irradiation il n'y aura aucune cytotoxicité. L'irradiation se limitera aux tumeurs épargnant ainsi les tissus sains.

Une analyse histologique a été réalisée sur les prélèvements des différents organes deux semaines après l'injection (Figure 64). Cette analyse montre qu'il n'y a eu aucun dégât sur les tissus dans le cas de l'utilisation de PEG-HISP.

La toxicité hépatique a également été étudiée en dosant et comparant les taux d'enzymes hépatiques (AST et ALT) d'une souris traitée par PEG-HISP et de souris témoins. Aucune différence significative n'a été constatée entre les taux.

La toxicité *in vivo* a été comparée avec des souris ayant reçu le IR780 libre et HSA-IR780. Les études histologiques des différents organes des souris ont montré que la toxicité de IR780 a été fortement réduite quand elle est injectée sous forme de NPs [35].

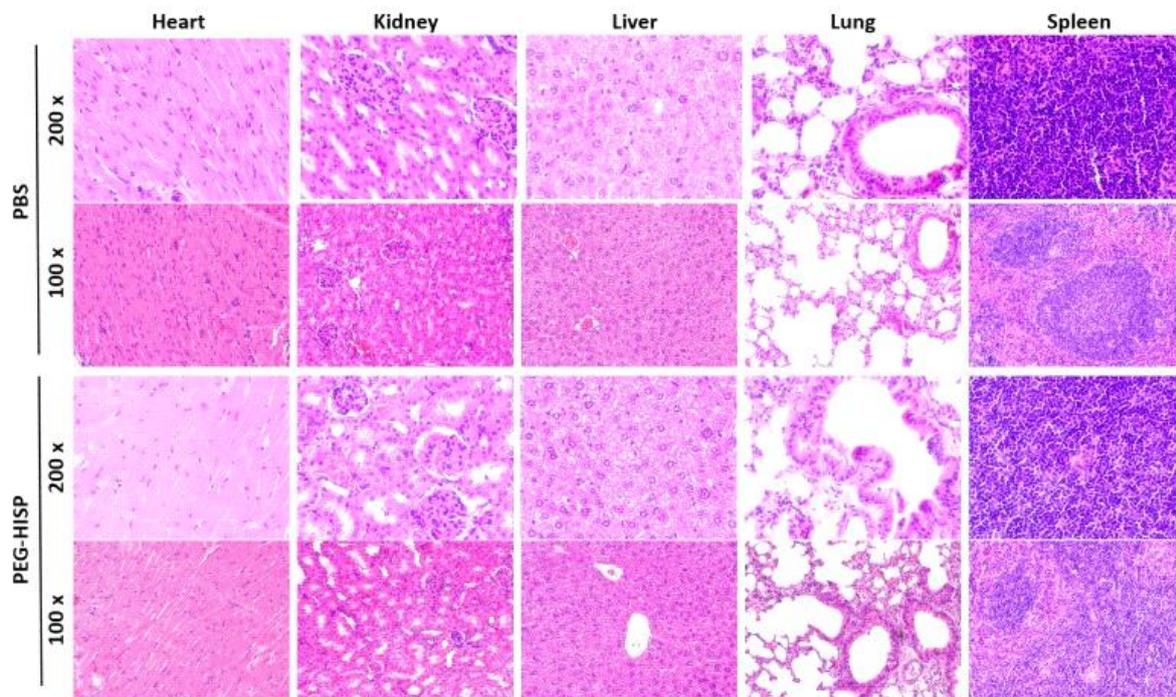


Figure 64 : Coupes histologiques de différents organes après injection [35]

## C- Imagerie

Les propriétés du complexe qui associe HSA et SPIO sous un champ magnétique extérieur nous permettent de constater que lors de l'utilisation de l'IRM, le temps de relaxation spin-spin des molécules d'eau est plus élevé avec HISP qu'avec l'agent de contraste IRM commercial Feridex®. L'albumine permet d'obtenir une meilleure stabilité et solubilité du produit qui rend possible un diagnostic des tumeurs *in vivo* par IRM <sup>[35]</sup>.

Par ailleurs le diagnostic *in vivo* est possible par l'imagerie IRM notamment grâce à la présence de HSA à la surface du complexe HISP. Cette formulation permet une meilleure stabilité de l'image du SPIO à l'IRM ce qui engendre un contraste plus important (figure 65).

L'utilisation de la NP PEG-HISP préférentiellement à l'utilisation d'IR780 libre comme produit théranostique est également démontré lors de l'étude de la fluorescence d'IR780 en employant l'*In Vivo* Imaging System (IVIS) sur des cellules cancéreuses animales CT26 (Figure 62).

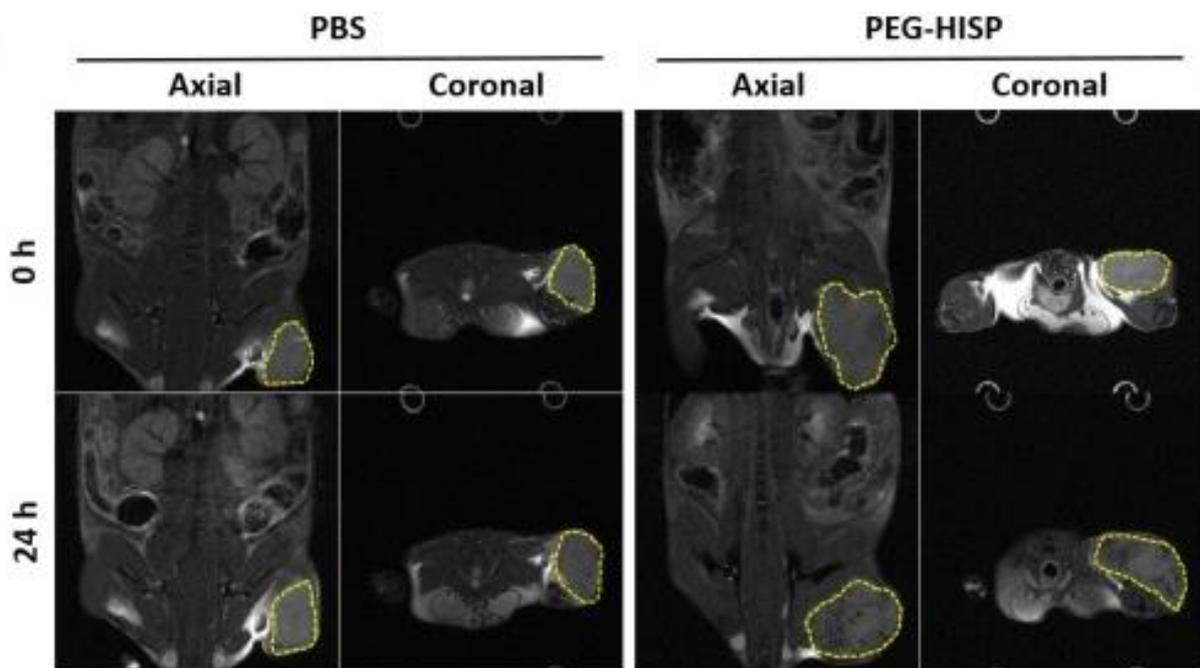


Figure 65 : Image IRM d'une tumeur après injection de PBS et de PEG-HISP <sup>[37]</sup>

## **D- Résumé**

Tout comme la NP HSA-IR780, le nanocomplexe PEG-HISP permet non seulement la vectorisation accrue de IR780 vers les tumeurs via l'effet EPR, mais également une diminution de la toxicité du composé vectorisé constaté grâce aux examens histologiques (pour HSA-IR780 et PEG-HISP) et au dosage des enzymes hépatiques (PEG-HISP).

L'utilisation des formes nanoparticulaires pour IR780 permet un meilleur effet thérapeutique. Elles augmentent la température de la tumeur et créent des oxygènes singulets réactif (ROS) qui entraînent une cytotoxicité plus importante lors de l'irradiation au laser des cellules cancéreuses par rapport à l'utilisation de IR780 libre.

Enfin, le nanocomplexe PEG-HISP améliore l'imagerie IRM des tumeurs de façon significative chez les souris.

PEG-HISP peut être qualifié de produit nanothéranostique puisqu'il peut être utilisé dans le diagnostic et la thérapie contre les cancers.

### **3) NPs lipidiques**

Des transporteurs lipidiques sont utilisés comme nanostructure pour l'administration de l'IR780 : des liposomes, des micelles lipidiques, ainsi que des « nanostructured lipid carrier » (NLC).

#### **A- Caractéristiques et présentation des différents composés**

L'IR780 peut être chargé de multiples façons par les nanostructures. Comme par exemple avec l'utilisation de liposome où l'IR780 se trouve à l'intérieur de la bicouche lipidique. C'est notamment le cas dans les études [Li S & al] <sup>[38]</sup> ou [Yang X & al] <sup>[39]</sup>. Dans cette dernière étude, le liposome contient du Sunitinib.

Les chercheurs ont choisi le Sunitinib qui se lie au récepteur de tyrosine kinase (RTK). En se liant à ce récepteur, le Sunitinib va inhiber les processus de prolifération cellulaire, l'angiogenèse, et l'apparition de métastases induite par la voie de signalisation des facteurs de croissance endothéliale vasculaire (via leur récepteur VEGF-R), et par la voie des facteurs de croissance dérivée plaquettaire (via leur récepteur PDGF-R) <sup>[40]</sup>.

Cependant le sunitinib possède une toxicité cardiovasculaire car sa diffusion est non spécifique. <sup>[41]</sup>

Pour préserver son action tout en évitant sa toxicité, les chercheurs ont utilisé un liposome comme nanoporteur (nanocarrier). La thérapie photothermique (PTT) utilise l'irradiation dans le proche infrarouge (NIR) pour déclencher la délivrance du médicament. Les photo-absorbants produisent de la chaleur à partir de l'absorption de la lumière, entraînant ainsi l'ablation thermique des cellules cancéreuses. Les colorants sensibles au NIR (IR780, IR825, etc.) sont des agents photothermiques qui convertissent le rayonnement NIR en chaleur locale. Cette chaleur permet dans le cas présent de déstabiliser la membrane du liposome et de libérer le médicament. C'est pourquoi l'IR780 est internalisé dans la bicouche du liposome.

Ils ont obtenu la NP Lip-IR780-Sunitinib (Figure 66A) par la méthode d'évaporation du solvant où 250 mg de phospholipides de soja et 1 mg de IR780 ont été dissous dans un mélange chloroforme / éthanol. Ce mélange a ensuite été évaporé à 37°C dans un évaporateur rotatif pendant 30 min pour éliminer le solvant. Le film mince sec obtenu a été hydraté avec 10 mL de solution aqueuse de Sunitinib (80µg/mL) à 37°C pendant encore 30 min. IR780 et Sunitinib non incorporés ont été éliminés par filtration à travers une membrane de nitrate de cellulose de 0,45 µm.

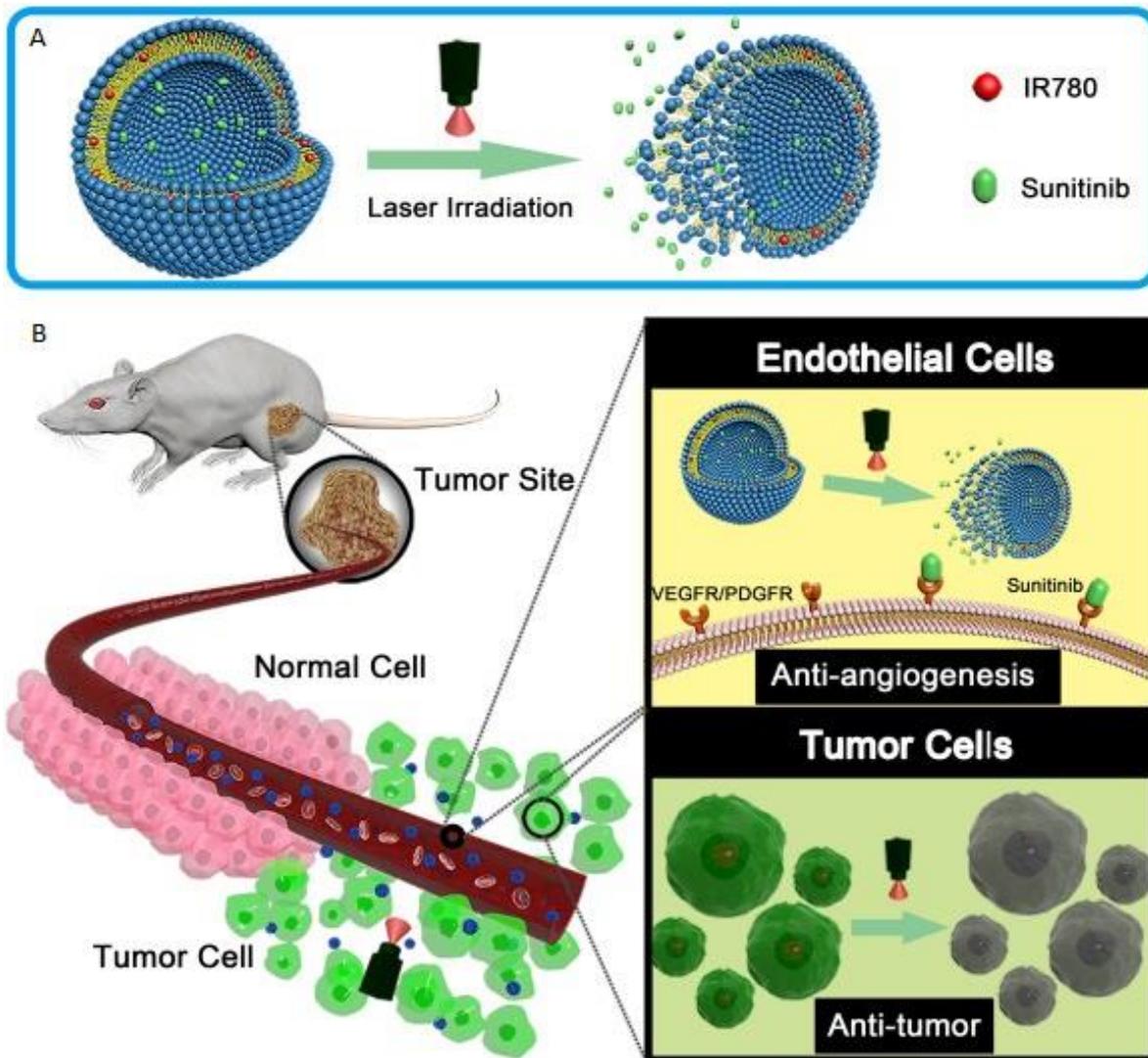


Figure 66 : Lip-IR780-Sunitinib (A) Mécanisme de libération ; (B) Mécanisme d'action <sup>[39]</sup>

*In vitro* la mesure de la taille des NPs lip-IR780-Sunitinib non irradiées est d'environ 150 nm. Après irradiation à 808 nm pendant 4 minutes, la température atteinte par la solution de NPs (environ 70°C) est supérieure à celle d'IR780 libre (environ 40°C). <sup>[39]</sup> La stabilité de lip-IR780-Sunitinib a été mesurée à différents pH. Les résultats montrent que la taille des NPs ne varie pas de façon statistiquement significative, tout comme la libération du Sunitinib qui est aux alentours de 30 % au bout de 24 heures. Les chercheurs ont toutefois constaté une déformation notable des liposomes. Leur taille varie de  $143,5 \pm 2,5$  nm à  $86,4 \pm 3,7$  nm après 4 minutes d'irradiation laser. Cela signifie que la déformation de la bicouche lipidique est probablement induite par l'effet photothermique de l'IR780 contenue dans la bicouche. Cet effet permet la libération du Sunitinib (Figure 66) et précise l'hypothèse de la libération et du mécanisme d'action des NPs.

Le liposome développé par Li *et al.* contient également de l'IR780 dans sa bicouche mais cette fois ci, certains phospholipides de la couche de surface sont coiffés de PEG. La préparation est proche de celle présentée pour le liposome précédent mais sans l'ajout de Sunitinib. Les lipides utilisés sont les mêmes que pour le Caelyx® c'est-à-dire : DSPC, cholestérol et DSPE-PEG2000 au rapport molaire de 54,8 : 40 : 5 pour former la bicouche de du liposome. <sup>[38]</sup> Dans cette étude, les chercheurs ont mis en opposition la forme liposomale

intégrant l'IR780, avec la forme micellaire lipidique. Cette dernière a été préparée par obtention d'un film lipidique mince composé de DSPC et de DSPE-PEG2000 contenant l'IR780 (rapport molaire, 59,5 : 40 : 0,5) de manière identique à la méthode de fabrication du liposome. Les schémas théoriques des NPs obtenues sont illustrés par la Figure 67. Le diamètre moyen des liposomes est de 95 nm alors que celui de la micelle est de 26 nm. Les chercheurs ont prouvé que la micelle était plus stable que le liposome sur une période mesurée de 40 jours, à l'obscurité totale à -20°C et 4°C. [38]

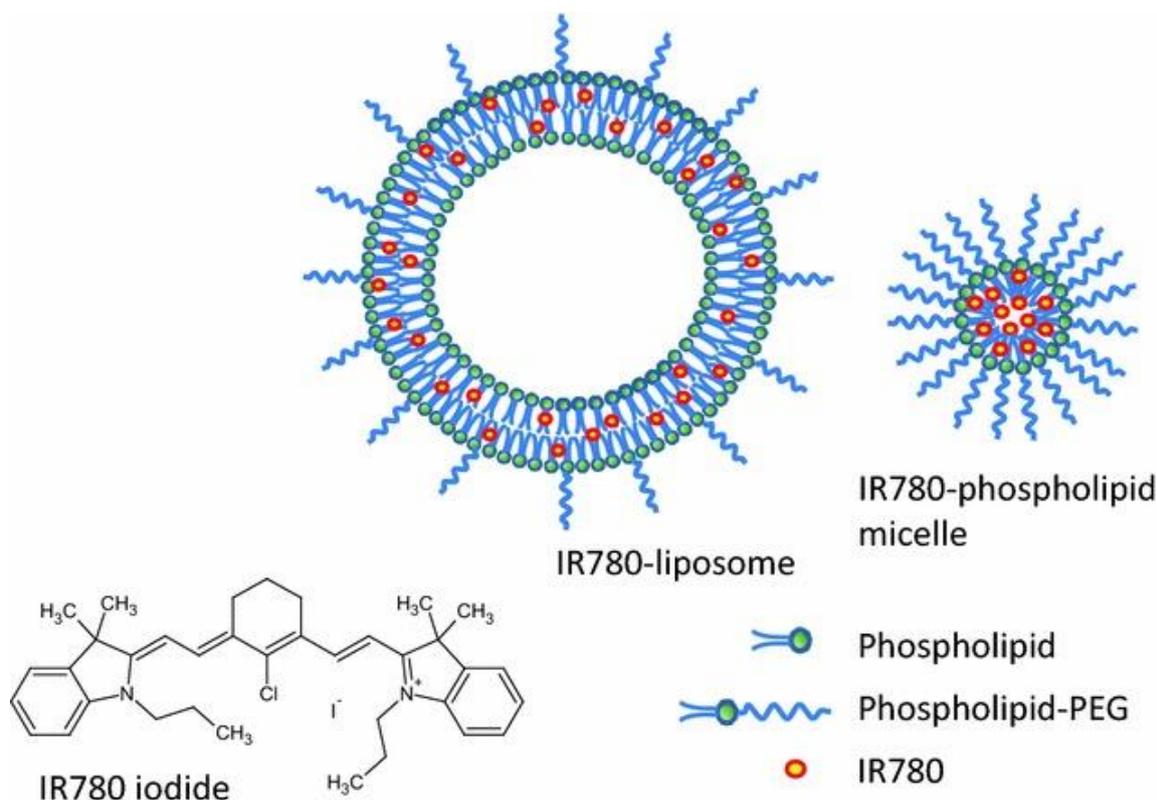


Figure 67 : Représentation schématique du liposome et de la micelle phospholipidique chargée d'IR780 [38]

Pour rappel, certaines nanostructures se base sur l'utilisation de RGDc un tripeptide cyclique. Ce tripeptide cible les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  surexprimées par certaines cellules tumorales. Il existe des nanoparticules lipidiques (LNP) qui sont composées par une monocouche de phospholipides, encapsulant de l'IR780-oléyl synthétisé à partir d'iodure IR780. La Figure 68 détaille la structure de la NP RGDc-LNP. Le peptide RGD cyclique est reliée à la LNP par le surfactant PEG via une réaction de type maléimide-thiol. Afin de comparer l'avantage lié à l'utilisation du RGDc, les chercheurs ont choisi d'utiliser le peptide RAD cyclique comme témoin négatif de RGDc. [42]

La taille de la LNP simple est d'approximativement 50 nm, alors que pour RGDc-LNP la taille est de 55 nm en moyenne. Le potentiel zêta ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) mesuré montre que les NPs ne forment pas d'agrégats et qu'il y a peu de chance que des interactions électrostatiques non spécifiques se produisent. [42]

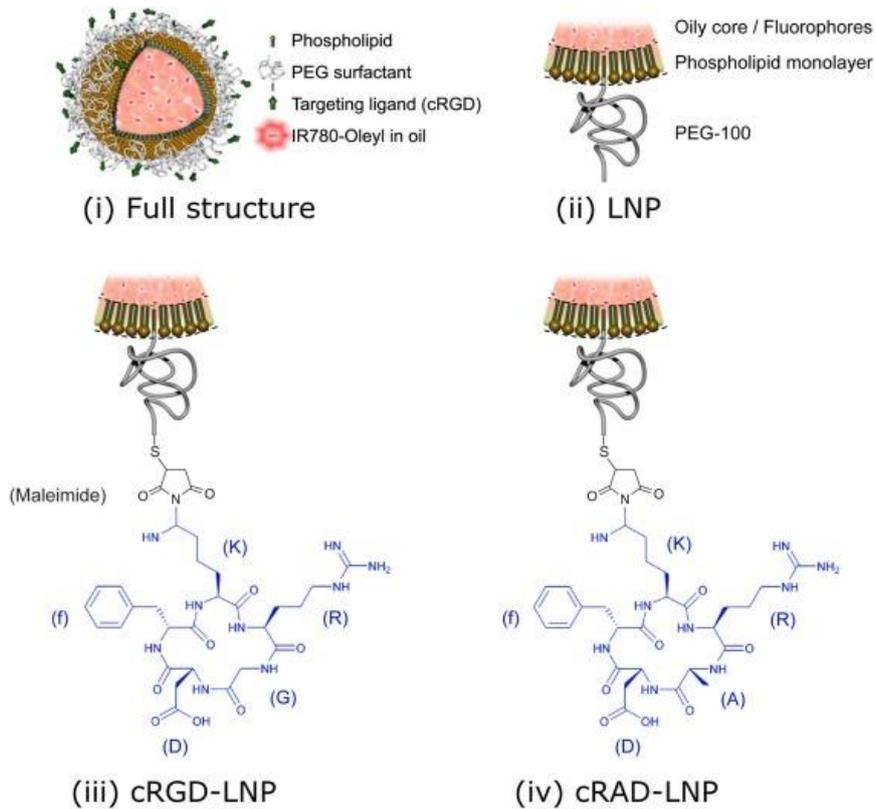


Figure 68 : (i) Composition schématique des LNP associée aux ligands de ciblage ; (ii) Structure de la monocouche de phospholipide reliée au surfactant PEG ; (iii) reliée au RGDc ; (iv) reliée à un peptide contrôle RADc. <sup>[42]</sup>

Une autre NP utilisant le peptide RGD se base sur l'utilisation de nanoparticules lipidiques solides (SLN) contenant dans sa matrice lipidique l'IR780. Le processus d'obtention de la NP SLN RGDc-IR780 se fait par la méthode de diffusion de solvant (un lipide solide est utilisé pour remplacer le lipide liquide dans l'émulsion d'huile dans l'eau). La couche superficielle est composée de polysorbate (le tween 80) ainsi que de Poloxamère 407 (ou P407) et de DSPE-PEG(2000)-carboxylic acid qui lie le RGDc comme le montre la Figure 69, offrant une protection suffisante aux agents contenus dans la matrice lipidique.

Le diamètre de la NP finale est de  $145,45 \pm 7,56$  nm et la mesure du potentiel zêta pour SLN cRGD-IR780 est de  $-3,43 \pm 3,12$  mV ce qui est suffisamment proche de la neutralité, évitant les interactions électrostatiques non voulues. De plus les SLN cRGD-IR-780 présentent une bonne stabilité sans qu'il n'y ait eu de précipitation pendant 7 jours. <sup>[43]</sup>

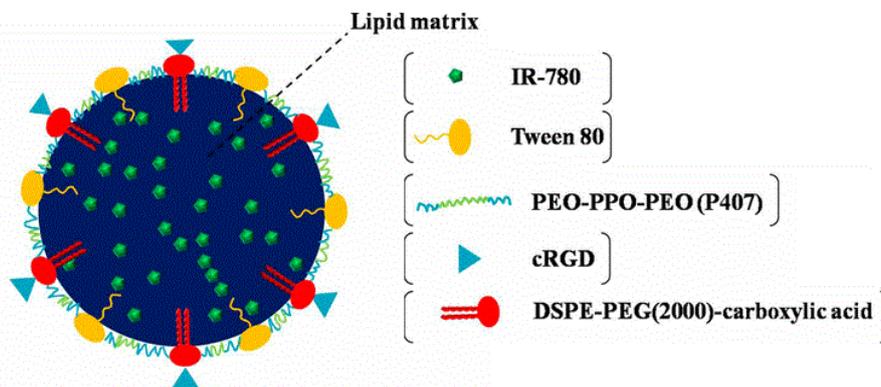


Figure 69 : Structure de SLN cRGD-IR780 <sup>[43]</sup>

D'autres nanoparticules lipidiques possèdent une double fonction : action photothermique de l'IR780 et ciblage tumoral avec AMD3100 [44]. Le principe de libération de AMD3100 de la NLC est similaire à celui de lip-IR780-Sunitinib. [45]

L'AMD3100 est un antagoniste du récepteur 4 de chimiokine (CXCR4). Ce dernier est le récepteur du ligand SDF-1 (CXCL12) qui régule la migration des cellules tumorales permettant la formation de métastases. Les cellules cancéreuses du cancer du sein surexpriment les récepteurs CXCR4 et que de nombreux organes potentiellement métastasés possèdent un taux élevé de SDF-1.

L'AMD3100 a été combiné de deux façons différentes dans des NPs lipidiques contenant IR780 pour empêcher l'invasion tumorale et l'invasion des métastases. [44, 45]

Soit AMD3100 est combiné dans la coque de la NLC formant AMD-NLC qui est chargée d'IR780 (Figure 70). Pour ce faire les chercheurs ont employé la méthode d'évaporation de solvant. Lorsque les NLC ont été revêtue d'AMD, leur taille a diminué d'environ 21 nm. Leur diamètre est de 135 nm environ. Cette diminution s'explique probablement par les interactions électrostatiques entre l'AMD et les phospholipides anioniques de la membrane des NLC. Afin de comparer l'avantage de l'emploi de AMD, des NPs IR780-NLC ont été préparés. Les images obtenues par MET révèlent que IR780-AMD-NLC et IR780-NLC sont de forme sphérique et possèdent un diamètre d'environ 100nm. *In vitro* l'effet photothermique de IR780-AMD-NLC après irradiation laser pendant 4 min était supérieur à l'effet photothermique obtenu avec IR780 seule [44].

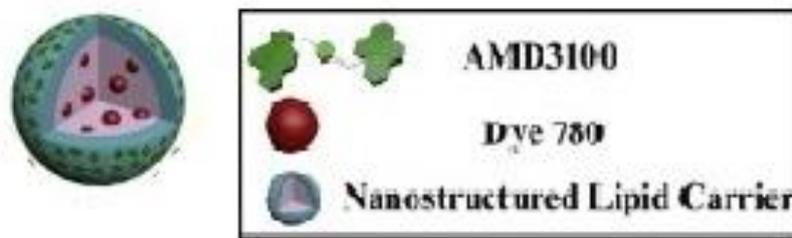


Figure 70 : Représentation schématique de IR780-AMD-NLC [44]

Soit AMD3100 est intégré à l'intérieur d'un liposome. IR780 étant inséré dans la bicouche phospholipidique du liposome, celui-ci, exposé à une irradiation laser, libère son contenu par effet photothermique (Figure 71A). [45]

La méthode de dispersion de film a été utilisée pour préparer les NLC chargées d'IR780. Par la suite, IR780-NLC et AMD3100 sont mélangés par hydratation du film formé par les phospholipides de soja fonctionnalisés IR780 pour former des liposomes contenant IR780 dans leur bicouche et IR780-NLC et AMD3100 en leur centre.

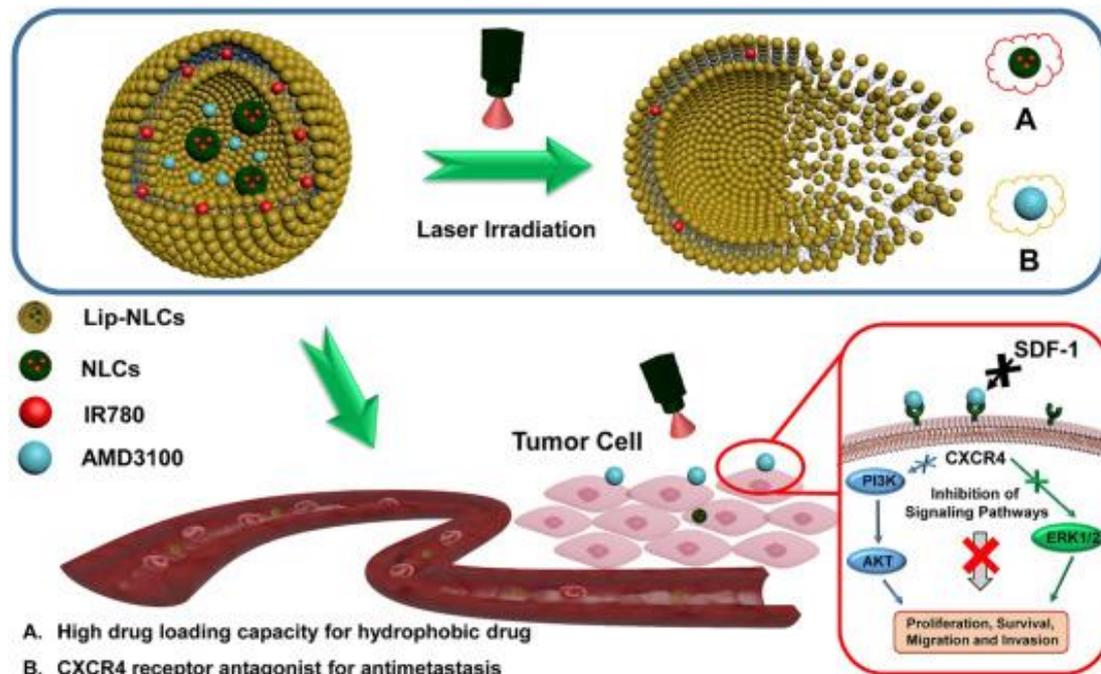


Figure 71 : Structure de IR780-AMD-Lips-NLCs, mécanisme de libération et d'action des NPs. <sup>[45]</sup>

La taille des NPs et le potentiel zêta diminuent après irradiation au laser <sup>[45]</sup> témoignant d'une déformation des liposomes et de la libération de AMD3100.

Par ailleurs, des NLC micellaires chargées IR780 (IR780@NLC) ont été mises au point pour une administration orale dans le traitement du cancer colorectal. Un des avantages de la voie orale est la meilleure observance du traitement par le patient ainsi qu'un coût relativement plus bas. Ces NLC micellaires permettent une meilleure stabilité physique et une fabrication à grande échelle plus simple. Elles présentent de plus une bonne biocompatibilité associée à une bonne biodégradabilité. IR780@NLC a été étudié à différents pH afin de modéliser les variations rencontrées dans le tractus digestif. <sup>[46]</sup>

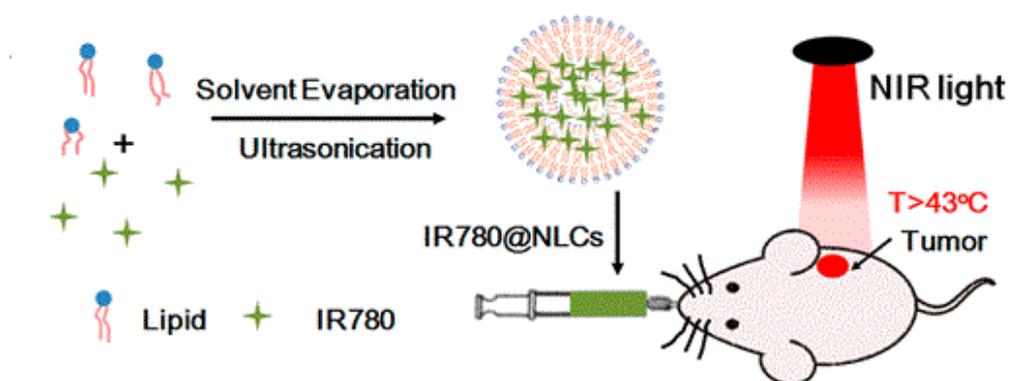


Figure 72 : Structure IR780@NLCs administrés par voie per os. <sup>[46]</sup>

Des micelles composées de lécithine de soja, de trilaurine et de Labrafac CC chargées IR780 ont été obtenues par évaporation de solvant (Figure 72). La taille de ces NPs IR780@NLC est d'environ 170 nm. La température atteinte après une irradiation de 5 min du composé est de 56°C. Cette température est légèrement supérieure à celle atteinte par l'IR780.

L'étude de stabilité à différents pH (1, 2 et 7) n'a montré aucun changement dans l'absorption de l'IR780@NLC contrairement à l'IR780. Un changement de taille des NPs n'a été constaté qu'à pH = 2. L'absorption d'IR780 a été modifiée en présence d'enzyme gastro-intestinal (pepsine et trypsine) alors que celle la NP a été beaucoup moins impactée. Ces résultats montrent que IR780@NLC reste relativement stable tout au long du cheminement du tractus gastro-intestinal. [46]

D'autres groupes de recherche ont encapsulé IR780 à l'intérieur d'une micelle hybride polymère-lipide. Le polymère employé est l'homopolymère zwitterionique poly(12-(méthacryloyloxy)dodécyl phosphorylcholine), il forme avec le lipide la monocouche PCB-lipid (Figure 73). Rajendrakumar SK *et al.* ont montré par mesure MET que la taille de PCB-lipid-IR780 est en moyenne de 318 nm, une grande taille pour une NP.

Les différentes températures mesurées dans la tumeur irradiée au laser à 808 nm pendant 5 min à diverses concentrations d'IR780 dans la NP ont permis de déterminer que même une faible concentration d'IR780 est suffisante pour obtenir *in vivo* une ablation photothermique de la tumeur. Il a été montré qu'à 7 µg/mL d'IR780, la température létale pour les cellules cancéreuses (> 49°C) a été dépassée. [47]

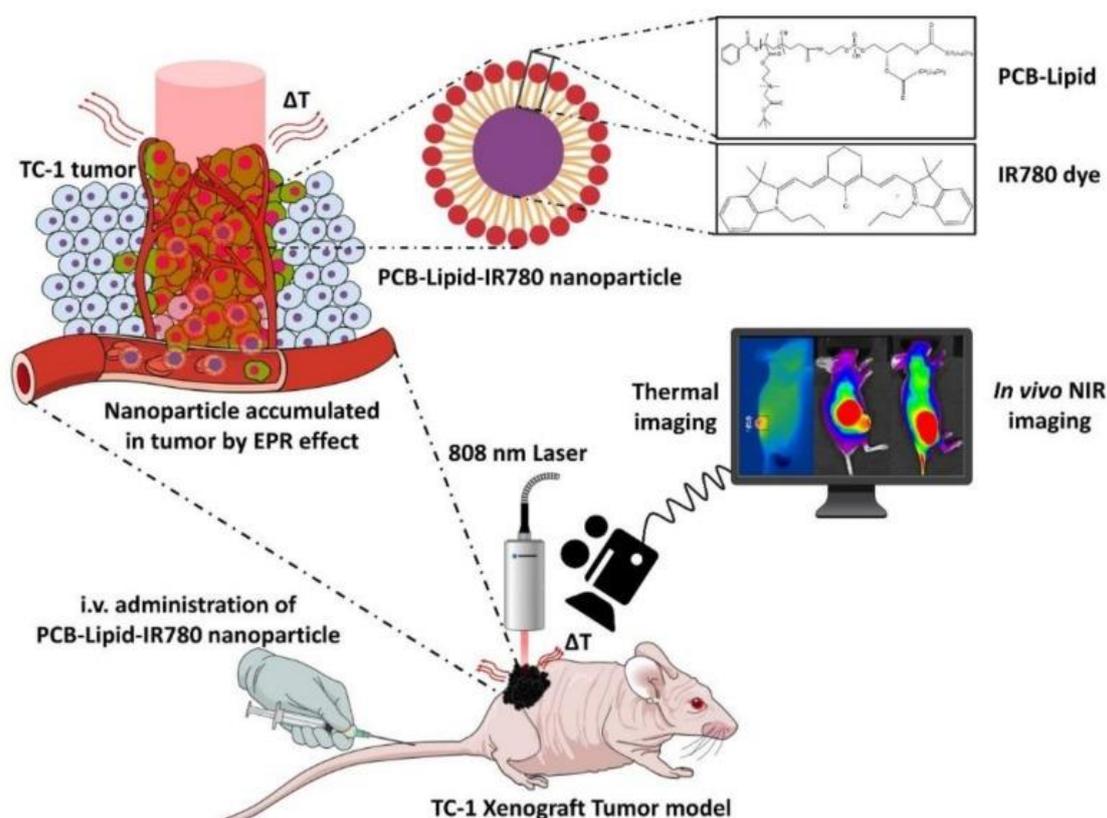


Figure 73 : Structure et mécanisme d'action PCB-Lipid-IR780 [47]

## B- Imagerie

L'IR780 est, grâce à son signal fluorescent dans le proche infrarouge (NIRF), un agent d'imagerie intéressant. De nombreux travaux portent sur les moyens d'accumuler spécifiquement cet agent dans les tumeurs pour obtenir des images suffisamment contrastées.

Par exemple, une étude a été réalisée sur des tumeurs formées par des cellules U87MG qui se sont multipliées dans le flanc de souris. Ces souris ont reçu des injections uniques de IR780, IR780-liposomes, IR-780-micelles et de RGDc-IR780-SLNs puis des images ont été recueillies au NIRF à différentes heures après injection (figures 69 et 70).

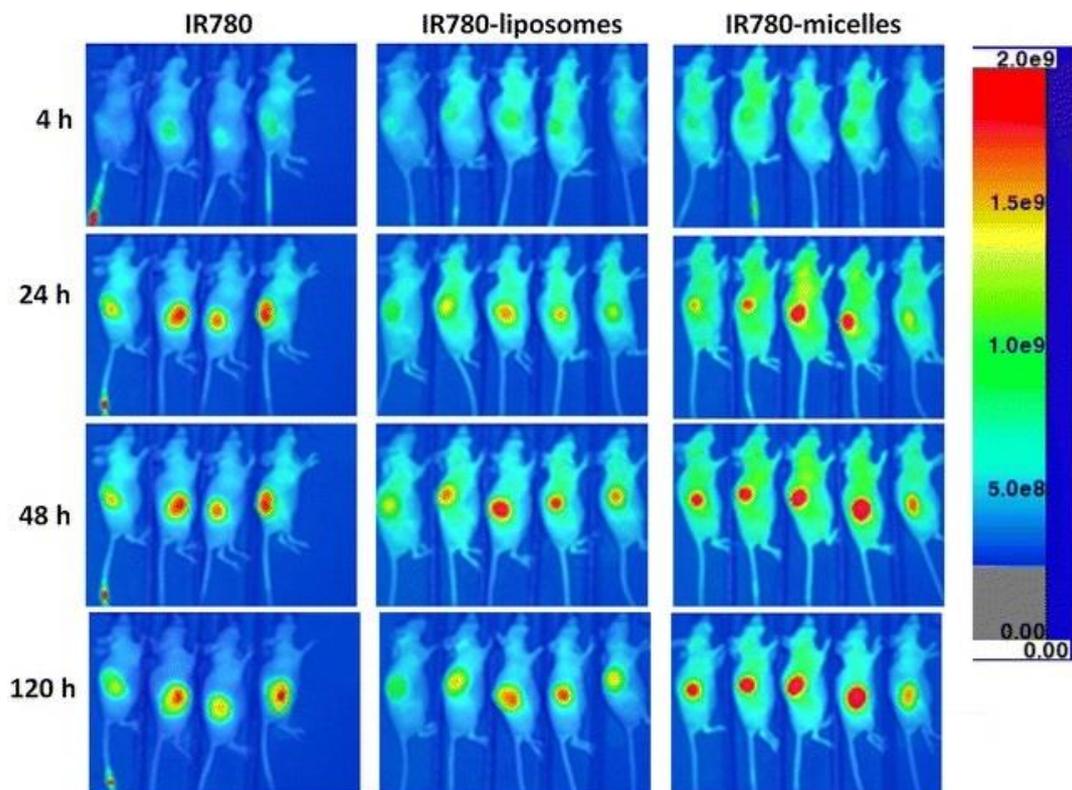


Figure 74 : Imagerie au NIRF des différents groupes de souris portant des tumeurs U87MG à 4, 24, 48 et 120 h après injection des différents produits (IR780, IR780-liposomes et IR780-micelles) <sup>[38]</sup>

La Figure 74 montre clairement que, à 4 heures après injection, les différents produits ne permettent pas de visualiser clairement la tumeur. 24 heures après injection et jusqu'à 120 heures, le groupe traité par IR780-micelles montre une intensité de fluorescence bien plus importante que chez les deux autres groupes traités par IR780 libre ou IR780-liposomes. Aussi, dans l'étude *in vivo* sur une tumeur développée au niveau crânien chez la souris, il est préférable d'utiliser la NLC composée de micelles phospholipidiques car sa formulation permet un ciblage, une pénétration et une rétention plus importante d'IR780 de/dans la tumeur. <sup>[38]</sup>

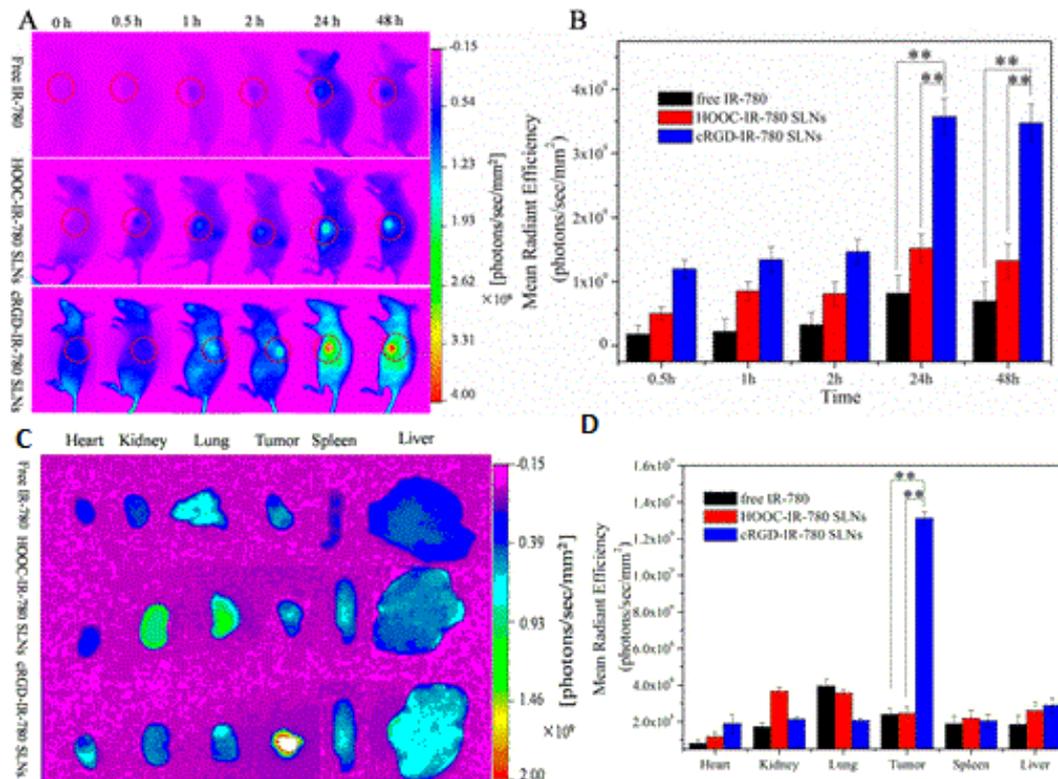


Figure 75 : (A) Imagerie NIRF de souris porteuses de tumeur ectopique U87MG traité par IR780 libre, COOH-IR780 SLNs et RGDC-IR780 SLNs à 0, 0,5, 1, 2, 24 et 48 h après injection ; (B) Intensité de fluorescence des différents traitements aux différents moments ; (C) Image NIRF des différents organes et de la tumeur prélevée 24 h après injection ; (D) Biodistribution semi-quantitative d'IR780 dans les différents organes par mesure de l'intensité de fluorescence. [43]

Une autre étude intéressante démontre l'intérêt des nanostructures pour des applications en imagerie (Figure 75).<sup>[43]</sup> L'intensité de fluorescence totale mesurée montre un pic de fluorescence 24 h après injection, cela laisse supposer qu'il s'agirait du meilleur moment pour la PTT (Figure 75B). D'autre part, c'est avec la NP pegylée fonctionnalisée RGDC que l'intensité de fluorescence est la plus élevée. Cette observation démontre clairement que RGDC-IR780 SLNs est davantage distribué dans la tumeur que dans les autres organes.

Cette étude qui met en concurrence l'utilisation de IR780 libre, COOH-IR780 SLNs et RGDC-IR780 SLNs, permet de confirmer non seulement l'avantage que possèdent les formulations nanoparticulaires, mais aussi la spécificité qu'apporte l'utilisation du peptide RGD en imagerie dans le diagnostic et le suivi des tumeurs cérébrales. D'autres études ont aussi mis en évidence le potentiel de ce peptide utilisé en nanotheranostic pour le cancer de la prostate grâce à une internalisation préférentielle des NPs présentant le peptide. [42]

Le seul écueil de cette étude [43] est que le traitement dans un modèle orthotopique de tumeur n'a pas été effectué et ne permet donc pas d'apprécier la capacité de distribution au niveau cérébral de la NP RGDC-IR780 SLNs.

Des travaux menés sur des modèles orthotopiques de tumeurs cérébrales U87MG ont permis de lever ce questionnement. En comparant le signal bioluminescent et l'imagerie au NIRF 24 h après l'injection *in vivo*, on observe une superposition de zones à contraste élevé et de forte fluorescence. De plus, l'intensité du signal fluorescent perdure durant au moins 4 jours (figure 76 a). Les souris saines n'ont montré aucun signal NIRF au niveau de leur cerveau. Chez les souris portant des tumeurs orthotopiques, l'intensité du signal se situe dans la zone

tumorale ce qui souligne la bonne accumulation et rétention des micelles phospholipidiques d'IR780 dans la tumeur intracrânienne.

L'accumulation spécifique intratumorale est confirmée par l'imagerie *ex vivo* des cerveaux et des autres organes disséqués ce qui témoigne de la spécificité de l'IR780-micelles pour les cellules tumorales ainsi que sa capacité à pénétrer la BHE tout en épargnant les organes sains (figure 76 b, c).

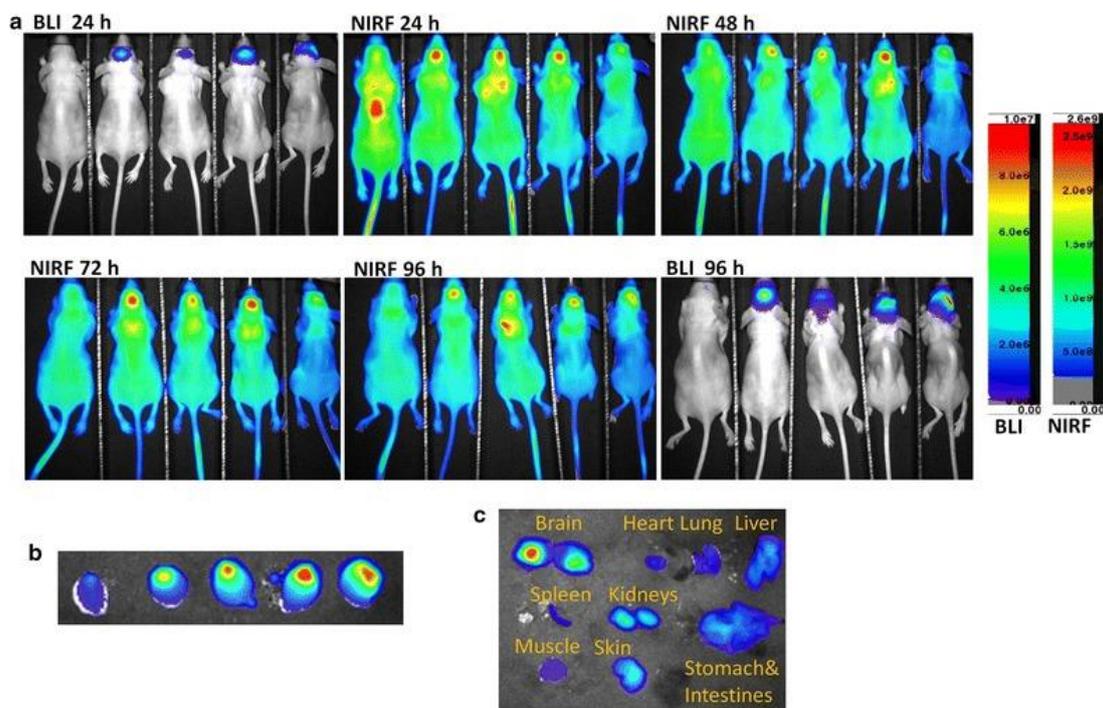


Figure 76 : (a) Imagerie au NIRF et au BLI après injection de micelles phospholipidiques IR780. La souris à gauche de chaque cliché est saine alors que les autres sont porteuses de tumeurs orthotopiques U87MG ; (b) Imagerie des cerveaux disséqués au NIRF 96 h après injection ; (c) Imagerie au NIRF des différents organes. [38]

L'IR780 peut être utilisé en imagerie pour d'autres formes de cancer :

- Modèle tumoral 4T-1 (cancer du sein)

L'étude menée par Li H *et al.* a démontré que le système constitué de NLC et d'AMD3100 améliore la stabilité des Lip-NLC dans la circulation sanguine ce qui conduit à une meilleure accumulation tumorale. Les tumeurs étudiées sont des tumeurs formées par des cellules 4T-1. L'IVIS est utilisée pour apprécier l'évolution des tumeurs à différents moments après l'injection de IR780-AMD-Lip-NLCs (Figure 77A). 12 h après injection, l'IVIS montre clairement une accumulation préférentielle au niveau tumoral pour IR780-AMD-Lip-NLCs par rapport à IR780 ou IR780-AMD-Lip (liposomes sans NLC). NLC est donc indispensable non seulement pour stabiliser le liposome mais également pour favoriser l'accumulation intratumorale d'IR780 (Figure 77 B, C). [45]

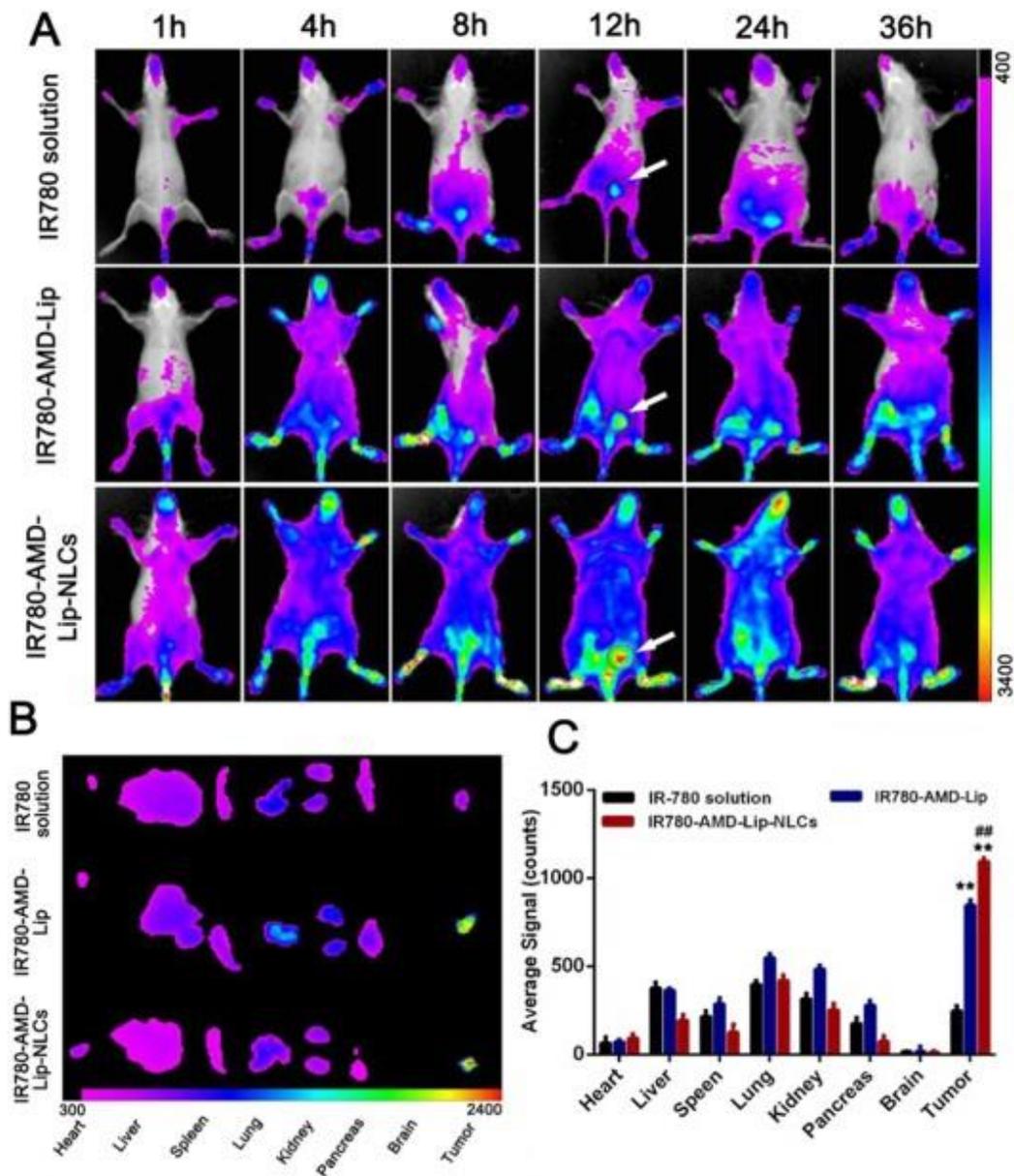


Figure 77 : (A) Image prise à l'IVIS de la distribution d'IR780 chez des souris porteuses de tumeur 4T-1 après injection d'IR780 libre, IR780-AMD-Lip et IR780-AMD-Lip-NLCs ; (B) Intensité du signal perçu dans les différents organes et la tumeur disséqués après autopsie ; (C) Mesure de l'intensité du signal dans les différents organes et la tumeur. [45]

Ce couplage entre AMD3100 et NLC avec l'IR780 a déjà prouvé son efficacité en termes d'imagerie. La biodistribution montre que les nanoparticules IR780-AMD-NLC ciblent les tumeurs et peuvent diagnostiquer efficacement des tumeurs en clinique. [44] Il en va de même pour l'IR780-AMD-Lip-NLC qui pourrait être utilisé à la fois en diagnostic et en thérapie.

- Modèle tumoral TC-1 (cancer du col de l'utérus)

Le composé zwitterionique PCB-lipid-IR780 a été étudié sur un modèle de tumeur TC-1 spécifique des cancers du col utérin implanté chez des souris. IR780 et PCB-lipid-IR780 ont été injectés à hauteur de 2 mg/kg en injection unique. Les souris qui ont reçu PCB-lipide-IR780 présentent une fluorescence dans le proche infrarouge localisée au niveau de la tumeur bien plus importante que les souris traitées par IR780. Cela témoigne d'une spécificité bien plus importante de PCB-lipide-IR780 pour la tumeur et permet sa localisation de façon bien plus rapide. Chez les souris traitées par PCB-lipide-IR780, la localisation de la tumeur est possible

dès 8 h après l'injection alors que cette localisation n'est possible qu'à partir de 72 h pour les souris traitées par IR780 (Figure 78A).

Les images fluorescentes *ex vivo* des organes montrent que la PCB-lipide-IR780 est localisée bien plus spécifiquement (intensité de fluorescence accrue) sur le site de la tumeur après l'injection intraveineuse que pour IR-780. L'administration i.v. d'IR-780 seule a montré un signal initial fort dans les poumons, alors que le signal du groupe traité aux PCB-lipides-IR780 a une intensité considérablement réduite dans les poumons et plus importante dans la tumeur. <sup>[47]</sup>

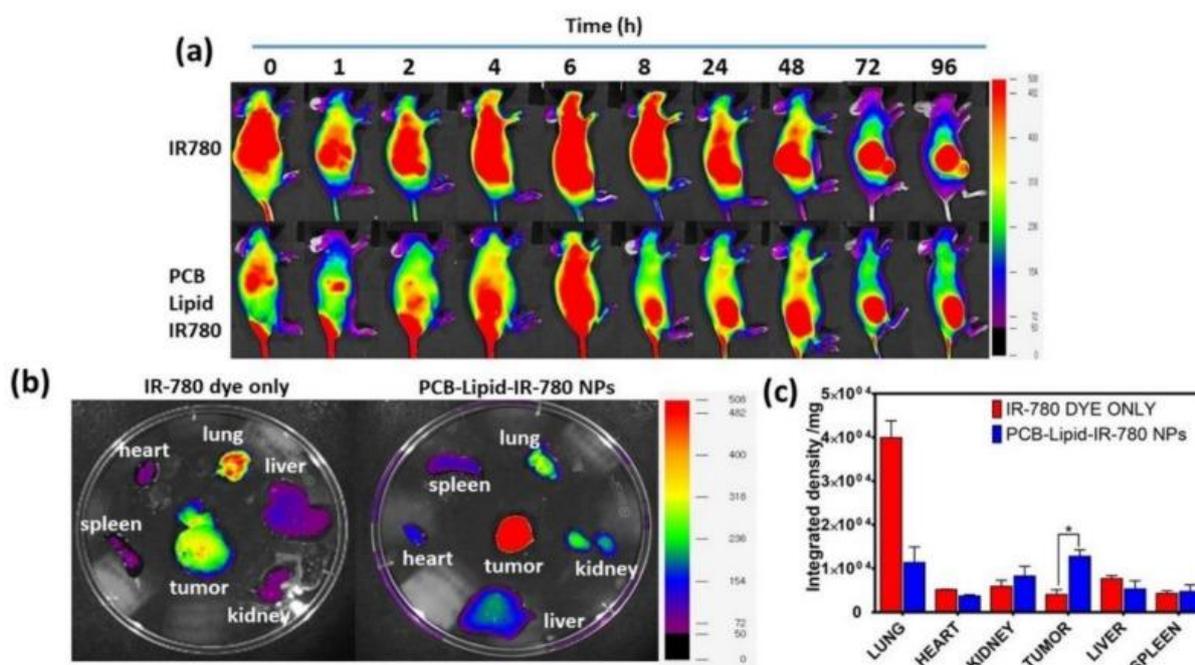


Figure 78 : (A) Imagerie NIRF à différents temps après injection d'IR780 et de PCB-lipid-IR780 chez des souris porteuses de tumeur TC-1 ; (B) Imagerie NIRF des différents organes prélevés chez les souris 48 h après injection des produits ; (C) Quantité d'IR780 et de PCB-Lipid-IR780 dans les différents organes. <sup>[47]</sup>

Ces nombreuses études prouvent que l'IR780 est un agent utile dans l'imagerie par fluorescence (FI) des tumeurs grâce à son signal fluorescent dans le proche infrarouge (NIRF). Il est utilisé surtout pour les tumeurs du cerveau où il est encapsulé par des nano porteurs lipidiques (NLC) (surtout de type micelle phospholipidique) qui ont démontré leur capacité à traverser la BHE, à localiser et se fixer aux cellules tumorales <sup>[38]</sup>.

## C- Efficacité thérapeutique

Les différentes NPs lipidiques composées de IR780 ont une action thérapeutique à l'encontre de différentes tumeurs. Par exemple pour traiter des tumeurs mammaires, IR780 peut être utilisé pour une libération contrôlée d'un produit anti-angiogénique (Sunitinib) ou encore pour une PTT ou bien, lorsqu'il est couplé à l'AMD, avoir une activité anti-métastatique.

L'action du Sunitinib est bien connue en oncologie malgré sa forte toxicité. [40,41] Des liposomes (Lip-IR780-Sunitinib) contenant IR780 dans la bicouche phospholipidique et le Sunitinib au centre ont fait l'objet d'une étude *in vitro* poussée [39]. Des cellules 4T-1 (représentatives du cancer du sein) ont été mises en présence à différentes concentrations de Lip-Sunitinib, de Lip-IR780 et de Lip-IR780-Sunitinib et elles ont été ensuite exposées au laser proche infra-rouge (Figure 79 A). Sans exposition laser, les produits sont inactifs et les cellules restent viables. Lip-Sunitinib exposé au laser reste inactif ce qui veut dire que, sans IR780 dans la bicouche phospholipidique, le sunitinib n'est pas libéré. A la concentration de 0,8 µg/mL c'est le produit Lip-IR780-Sunitinib irradié qui engendre la plus forte cytotoxicité chez les cellules 4T-1. Lip-IR780 irradié provoque légèrement moins de cytotoxicité que Lip-IR780-Sunitinib. *In vitro*, le composé Lip-IR780-Sunitinib présente une double action sur les cellules de carcinome mammaire : l'effet PTT de l'IR780 et l'action anti-angiogénique du Sunitinib. [39]

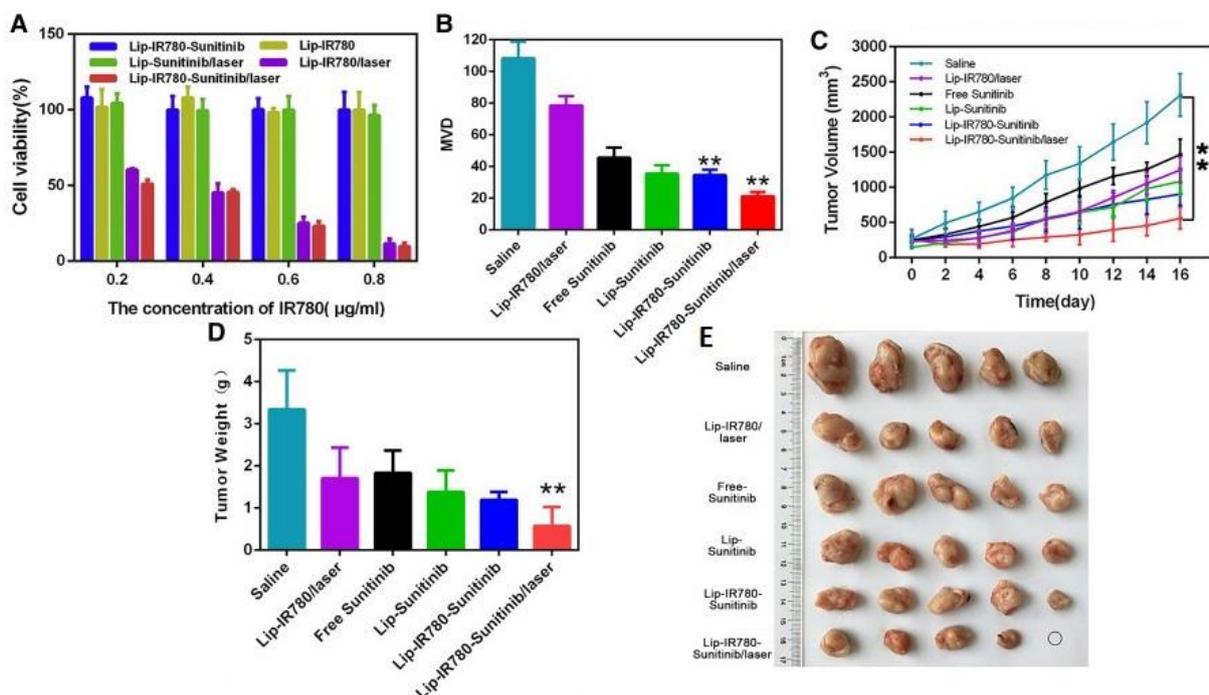


Figure 79 : (A) Etude *in vitro* de la viabilité de cellules 4T-1 traitées par Lip-IR780 (irradié et non irradié), Lip-IR780-Sunitinib (irradié et non irradié) et Lip-Sunitinib irradié ; (B) Mesure de la MVD en fonction des différents traitements ; (C) Mesure du volume tumoral ; (D) Poids de la tumeur ; (E) Tumeurs extraites des différents groupes de souris. [39]

Une étude *in vivo* est réalisée pour vérifier si les résultats retrouvés *in vitro* sont transposables. Des tumeurs 4T1 ont été développées chez des souris et, lorsqu'elles ont atteint une taille de 200 mm<sup>3</sup>, chaque groupe de souris reçoit une injection de solution saline (témoin), de sunitinib libre, de Lip-Sunitinib, de Lip-IR780 (avec laser) et enfin de Lip-IR780-Sunitinib (avec et sans laser) avec une dose de sunitinib de 2,5 mg/kg et une dose d'IR780 de 1 mg/kg. Les résultats de l'efficacité thérapeutique sont illustrés par les figures 74 C, D et E.

*In vivo*, les chercheurs ont clairement établi que la NP Lip-IR780-Sunitinib une fois irradiée à 808 nm pendant 4min entraine la plus forte inhibition de croissance tumorale (Figure 79 C et D). Les tumeurs extraites des souris traitées par Lip-IR780-Sunitinib sont les plus petites (Figure 79 E). [39]

La formulation Lip-IR780-Sunitinib est la plus appropriée pour traiter les carcinomes mammaires. L'action *in vivo* du Sunitinib intégré dans le liposome est évaluée par la mesure de la densité de micro-vaisseaux (MVD) qui est le marqueur de l'angiogenèse. Le liposome irradié Lip-IR780-Sunitinib permet d'inhiber jusqu'à 80,7 % de l'angiogenèse en comparaison avec le groupe test traité par la solution saline. Ces résultats traduisent la conservation et même l'augmentation de l'activité du Sunitinib lorsqu'il est utilisé sous forme de Lip-IR780-Sunitinib irradié. [39]

La double fonction thérapeutique que présente la NP lipidique étudiée dans le cadre du traitement de la tumeur 4T-1 est nettement supérieure à l'utilisation du sunitinib ou de Lip-IR780 seule. Mais d'autres types de NPs lipidiques utilisent l'IR780 dans les traitements des cancers du sein.

Deux types de NP couplées à l'IR780 élaborées par l'équipe de Huipeng Li utilisent l'AMD3100 qui possède théoriquement une action anti-métastatique. [44, 45] Pour vérifier l'efficacité sur le carcinome mammaire des NPs élaborées, à savoir IR780-AMD-NLCs et IR780-AMD-Lip-NLCs, elles sont tout d'abord placées *in vitro* en présence de cellules 4T-1, puis l'expérience est réalisée *in vivo* sur un modèle de tumeur ectopique chez des souris.

*In vitro*, la cytotoxicité mesurée avec IR780-AMD-NLCs montre que seulement 20 % de cellules 4T-1 ont survécu après 4 min d'irradiation laser à 808 nm (Figure 80 A) alors que sous forme liposomale (IR780-AMD-Lip-NLCs), c'est moins de 10 % des cellules 4T-1 qui survivent pour une même concentration d'IR780 de 1,6µg/mL (Figure 80 B).

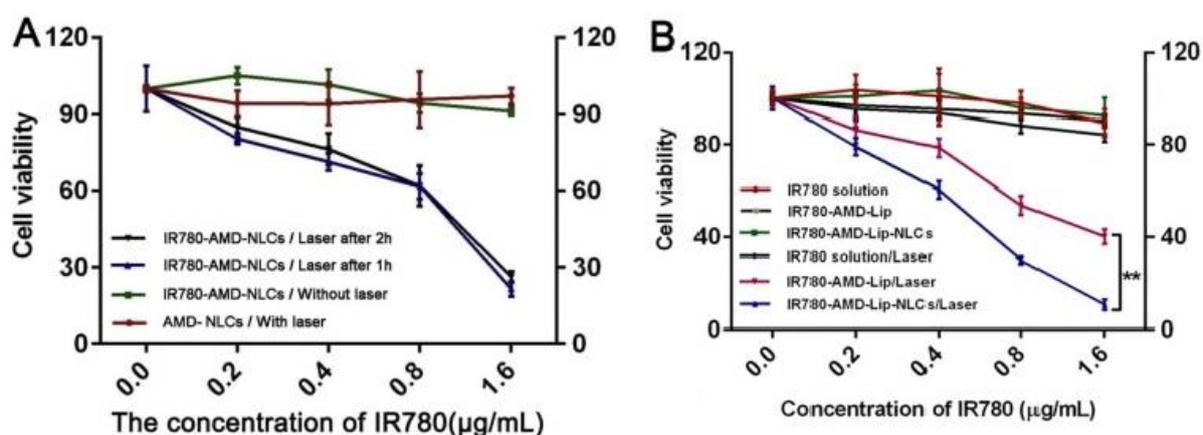


Figure 80 : Etude *in vitro* de la viabilité cellulaire 4T-1 traitée par IR780-AMD-NLCs (A) et IR780-AMD-Lip-NLCs (B) irradiée et non irradiée au laser à 808 nm pendant 4 min. [44, 45]

Dans un cas comme dans l'autre, il y a une forte activité cytotoxique. Malgré tout une étude *in vivo* est indispensable pour savoir si l'activité antimétastatique et anti-tumorale est vérifiée.

*In vivo*, des tumeurs 4T-1 ont été implantées chez des souris femelles. Ensuite, chaque groupe de souris a reçu des injections de différents produits : solution saline (témoin négatif pour mesurer l'évolution de la croissance tumorale), IR780 libre, IR780-NLCs, IR780-AMD-NLCs, IR780-AMD-Lip et IR780-AMD-Lip-NLCs. Après irradiation, la température puis le volume et le poids des tumeurs sont mesurés, enfin les tumeurs sont prélevées chez toutes les souris après le traitement (Figure 81).

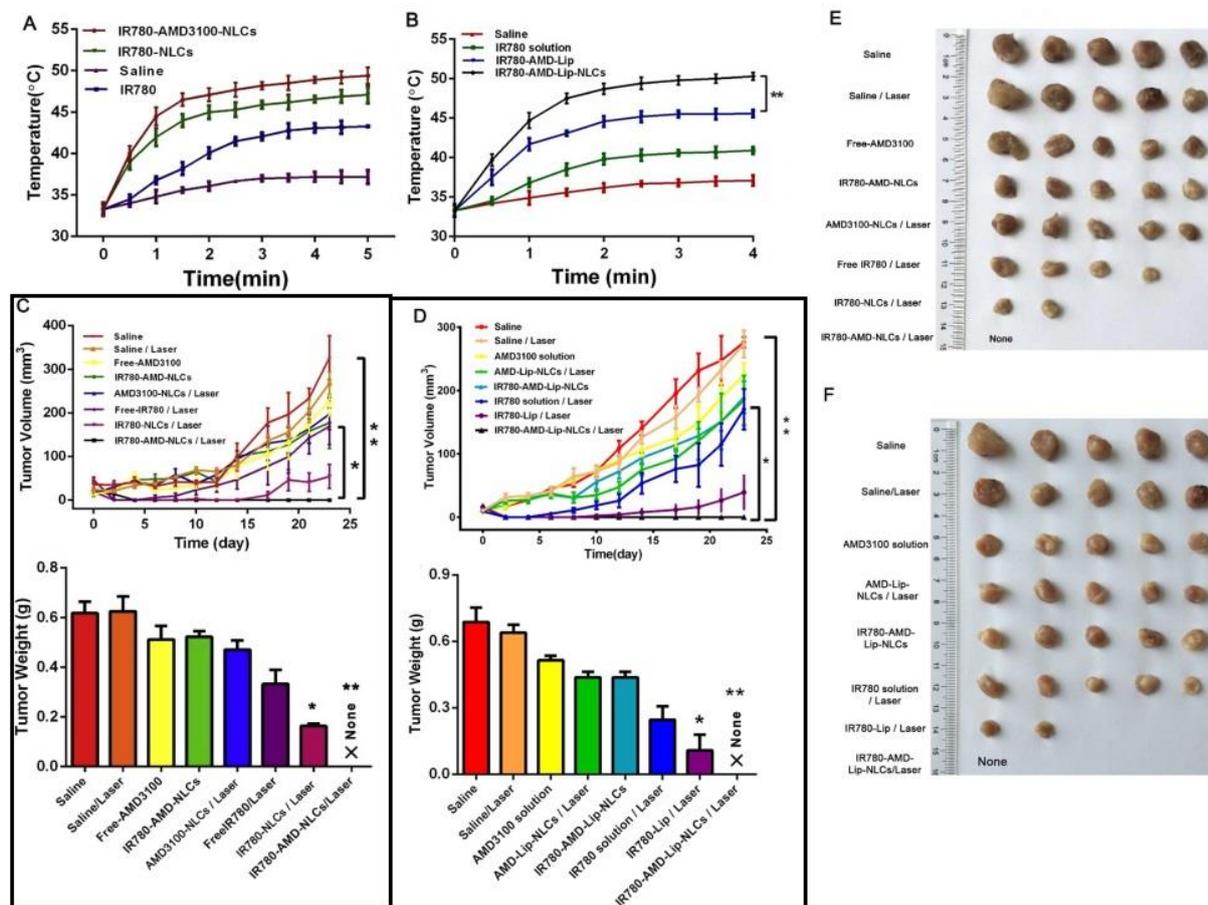


Figure 81 : Mesure de la température après irradiation de la tumeur générée par les composés testés : solution saline, IR780, IR780-NLCs et IR780-AMD-NLCs (A) IR780, solution saline, IR780-AMD-Lip et IR780-AMD-Lip-NLCs (B). (C) Mesure du volume et du poids tumoral chez les souris après injection des produits suivants : saline et IR780-AMD-NLCs (irradié et non irradié), AMD (non irradié), AMD-NLCs, IR780 et IR780-NLCs (irradié). (D) Mesure du volume et du poids tumoral chez les souris après injection des produits suivants : saline et IR780-AMD-Lip-NLCs (irradié et non irradié), AMD (non irradiée), AMD-Lip-NLCs, IR780-Lip, IR780 (irradié). (E) et (F) Photographies des tumeurs ayant reçues les différents traitements. [44, 45]

Après 5 minutes d'irradiation à 808 nm pour le groupe traité par IR780-AMD-NLCs, la température atteint 49,3°C alors que pour le groupe traité par IR780-AMD-Lip-NLCs, après 4 min d'irradiation à 808 nm, la température atteint 50,3°C. Avec 1 minute d'irradiation en moins, la forme liposomale entraîne une température plus importante de 1°C, cela signifie que son activité photothermique est plus importante.

Dans les deux cas, nous avons une efficacité anti-tumorale supérieure pour les NPs testées comparée à IR780 libre (Figure 81C, D). Il apparaît clairement une diminution du poids des tumeurs et de leurs volumes. L'étude a aussi montré des régressions complètes de plusieurs tumeurs chez trois souris traitées par IR780-AMD-NLC et chez toutes les souris traitées par IR780-AMD-Lip-NLC, cela témoigne d'une très grande efficacité *in vivo* des composés. Si les produits testés empêchent le développement de la tumeur, ceci est

probablement dû à la présence de AMD qui va stabiliser le nanocomplexe et les nanoplateformes utilisés en permettant une meilleure administration et une meilleure action photothermique de l'IR780 sur le site tumoral (Figure 81E, F).

Les chercheurs ont évalué l'efficacité antimétastatique en utilisant l'imagerie par bioluminescence sur les cellules 4T1-luc (exprimant la luciférase) au niveau du poumon bien souvent le premier organe touché par les métastases de carcinome mammaire. L'intensité de bioluminescence a été mesurée après chaque traitement. Les résultats sont sans appel, dans les deux cas les produits ont ralenti la migration des cellules tumorales au niveau des poumons. Mais l'équipe a remarqué qu'avec la NP IR780-AMD-Lip-NLC irradiée au laser, l'intensité de bioluminescence était bien moindre que pour IR780-AMD-NLC. (Figure 82A, B) [44, 45]

En conclusion, IR780-AMD-NLC et IR780-AMD-Lip-NLC présentent une efficacité anti-tumorale proche, mais c'est la forme liposomale qui présente la meilleure action antimétastatique même si celle de IR780-AMD-NLC est remarquable.

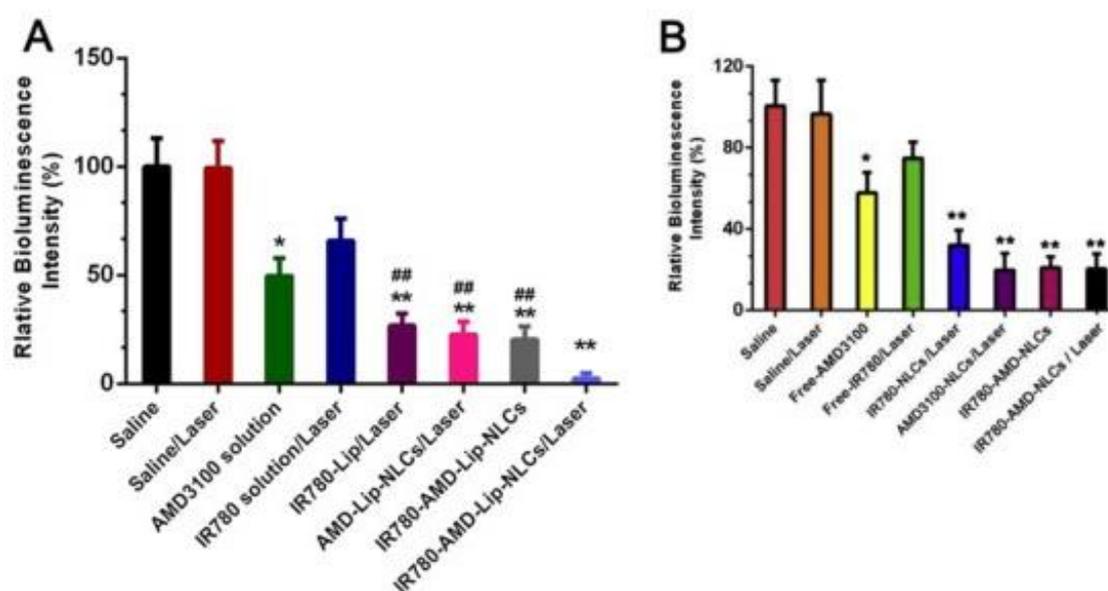


Figure 82 : mesure de l'intensité relative de bioluminescence dans les différents groupes de traitement pour la mesure de l'activité anti-métastatique. [44, 45]

Comme vu précédemment avec la doxorubicine, les NPs qui présentent les peptides cycliques RGDc ont une spécificité pour les cellules tumorales surexprimant les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . C'est d'ailleurs grâce à cette spécificité que le diagnostic et la thérapie peuvent être améliorés. Avec cet objectif, RGDc-IR780-SLNs (peptide associé à une nanoparticule lipidique solide) a été étudié dans un modèle ectopique de glioblastome de cellules U87MG chez des souris.

Kuang Y *et al.* ont montré que la NP RGDc-IR780-SLN libère IR780 préférentiellement à pH acide plutôt qu'à pH physiologique. Afin d'évaluer l'avantage qu'apporte SLN et RGDc, les chercheurs ont opposé IR780 à HOOC-IR-780-SLNs et à cRGD-IR780-SLNs de façon à mesurer la température du site tumoral après 5 min d'irradiation au laser à 808 nm, 2 heures et 24 heures après injection des produits. Le volume tumoral et l'activité photothermique ont été imagés durant l'irradiation au laser.

24 h après injection de IR780 libre, la température de la tumeur augmente de 8,6°C avec une irradiation au laser de 3 min. Dans les mêmes conditions, cette augmentation est de

18,0°C pour cRGD-IR780 SLNs (Figure 83C). Cet écart plus important pour cRGD-IR780 SLNs est observé pour tous les temps d'irradiation 24 h après injection. Cependant, 2 h après injection, cet écart entre les augmentations de température est beaucoup moins flagrant : 6,5°C contre 9,5°C pour 3 min d'irradiation respectivement pour IR780 libre et cRGD-IR780 SLNs. De plus, l'association de RGDc à IR780-SLNs permet, tant à 2 h qu'à 24 h après injection, d'obtenir une température tumorale plus importante après 5 min d'irradiation que lors de l'utilisation de IR780-SLNs (sans RGDc) (Figure 83B). Ce résultat souligne l'avantage qu'apporte RGDc à l'activité photothermique. L'ensemble de ces résultats montre que l'accumulation dans le site tumoral se fait de façon optimale 24 h après l'injection de cRGD-IR780 SLNs. Ces résultats sont confirmés par ceux de l'imagerie NIR et démontrent l'efficacité de la thérapie photothermique guidée par imagerie NIR. Le test de l'efficacité thérapeutique basée sur la mesure du volume tumoral débute lorsque les tumeurs subissent l'irradiation au laser à 808 nm 24 h après l'injection des produits (Figure 83A).<sup>[43]</sup>

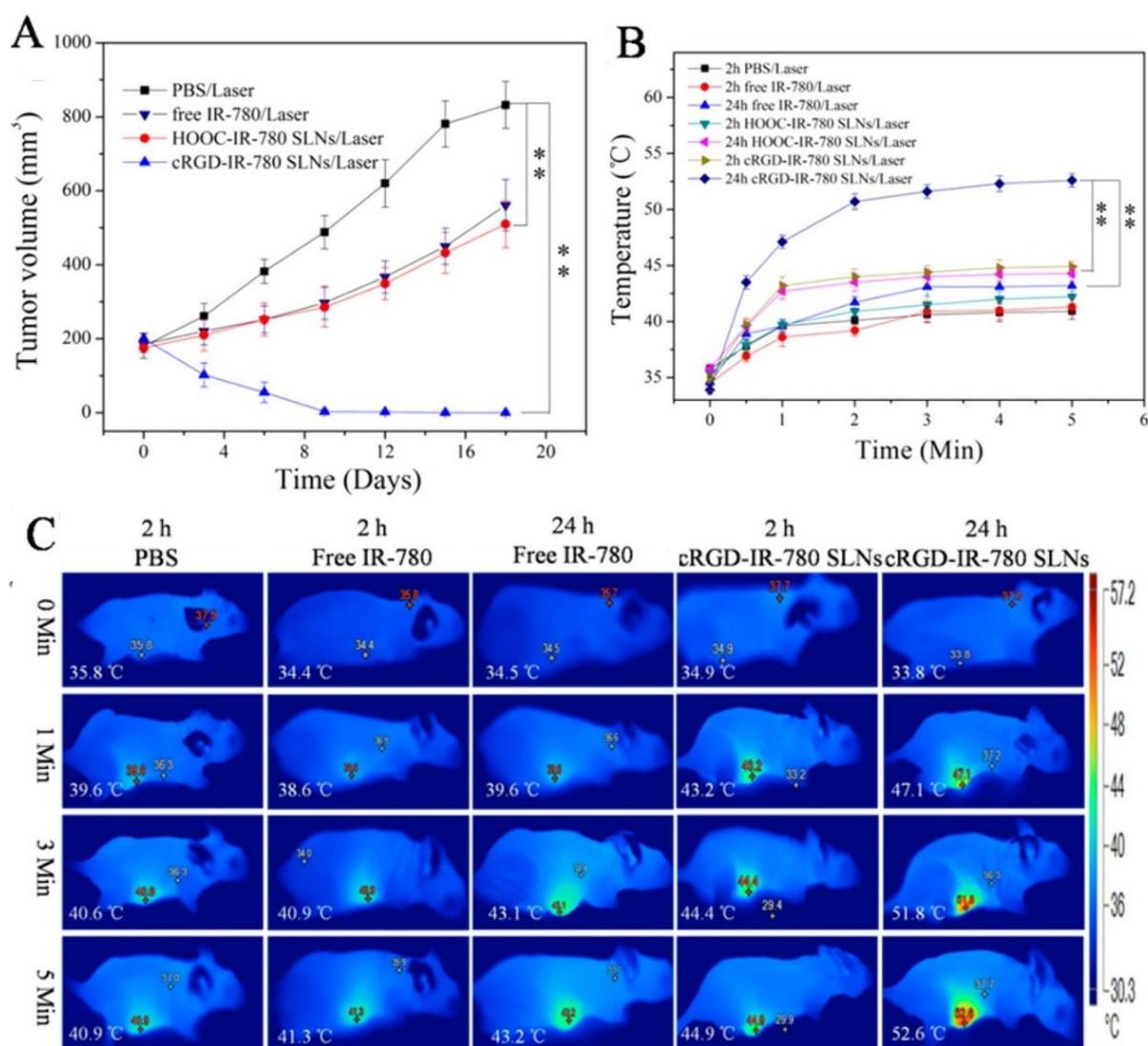


Figure 83 : (A) Volume tumoral mesuré après injection des produits et irradiation. (B) Mesure de la température obtenue dans la tumeur 2 h et 24 h après injection des produits. (C) Carte thermographique infrarouge des souris irradiées à 808 nm après injection des produits.<sup>[43]</sup>

Deux jours après l'irradiation et trois jours après l'injection, les souris ayant reçu RGDc-IR780 SLNs présentent une lésion hémorragique tumorale plus importante que les souris

traitées par IR780 libre ou HOOC-IR780 SLNs. Six jours après l'apparition de cette lésion, le volume des tumeurs des souris ayant reçu RGDc-IR780 SLNs continue de diminuer jusqu'à tendre vers 0 mm<sup>3</sup>. Pour les autres groupes, le volume tumoral augmente. Neuf jours après, le volume des tumeurs U87MG n'a pas changé pour le groupe traité par RGDc-IR780 SLNs. Dix-huit jours après irradiation, le volume tumoral du groupe traité par PBS est d'environ 800 mm<sup>3</sup>, de 450 mm<sup>3</sup> pour le groupe IR780 libre et de 430 mm<sup>3</sup> pour le groupe HOOC-IR780 SLNs. Les tumeurs traitées par RGDc-IR780 SLNs ont fini par disparaître, un contrôle effectué après 30 jours ne montre aucune récurrence.

En résumé, IR-780 libre et HOOC-IR-780 SLN provoquent peu d'effet photothermique en raison d'une faible accumulation d'IR-780 dans les sites tumoraux. Cette efficacité du PTT n'est pas suffisante pour empêcher la croissance de la tumeur. Au contraire, les tumeurs du groupe traité avec cRGD-IR-780 SLN ont totalement disparu. Cela en fait un remarquable produit nanotheranostic. [43]

La voie orale peut être utilisée pour administrer l'IR780 par le biais d'une NLC. Cette utilisation a été testée dans le cadre d'une PTT sur des tumeurs CT-26 (cancer du colon) développées chez des souris. [46]

Après irradiation, la température mesurée 24 h après l'administration orale d'IR780@NLC monte jusqu'à 50°C, température bien au-dessus de celle capable de provoquer des dégâts dans les cellules tumorales (Figure 84A). Les températures atteintes par IR780 et le PBS une fois irradiés n'ont pas été suffisantes pour effectuer des dégâts similaires. La figure 84B montre clairement que le volume tumoral du groupe recevant IR780@NLCs irradié au laser à 808 nm pendant 5 min ceci 24 h après la prise orale est celui présentant le plus fort taux d'inhibition.

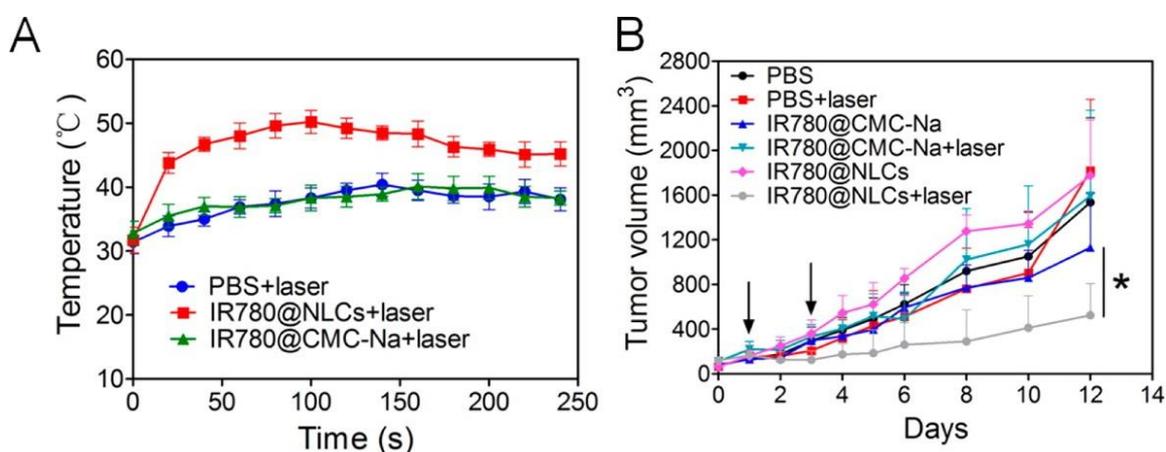


Figure 84: (A) Température tumorale mesurée lors d'irradiation au laser à 808nm ; (B) Evolution du volume tumoral chez des souris porteuses de tumeurs CT-26 (produits irradiés et non irradiés) [46]

Durant l'étude, trois des six souris du groupe IR780@NLC ont présenté une régression complète de la tumeur par la PTT. Cela offre une solide perspective d'avenir en oncologie associée à une administration orale plus confortable pour le patient. [46]

Pour augmenter l'administration et la délivrance d'agents hydrophobes (comme le colorant IR780) aux tumeurs, des NPs zwitterioniques peuvent être utilisées. [47]

Afin de traiter des cellules cancéreuses TC-1 (cancer du col de l'utérus) implantées chez des souris, l'IR780 a été encapsulé par PCB-Lipid, une micelle amphiphile. Après irradiation

des tumeurs à 808 nm, 24 h après administration, la température tumorale atteinte est de 50,2°C pour PCB-Lipid-IR780 et de 45,4°C pour le produit témoin au bout de 150 secondes (i.e. IR780 libre) (Figure 85a). Cet écart d'environ 5°C est suffisant pour inhiber le développement de la tumeur et augmenter la durée de vie des souris (Figure 85b). En outre IR780 encapsulé dans le nanocomposé zwitterionique présente un taux d'inhibition tumorale déjà plus important que IR780 seul même sans irradiation (courbe verte et rose respectivement). Mais ce taux d'inhibition reste très faible comparé à celui obtenu avec PCB-Lipid-IR780 irradié au laser (courbe bleue), la réduction du volume de la tumeur par rapport aux souris témoins traitées au PBS (courbe rouge) est très significative. [47]

Après 14 jours, des organes et la tumeur ont été prélevés et colorés. Dans le groupe traité par PCB-Lipid-IR780 puis irradié, le prélèvement tumoral montre des vides autour des cellules cancéreuses et un noyau condensé, signe de la présence de cellules cancéreuses apoptotiques résiduelles. Un nombre plus élevé de cellules nécrotiques au niveau tumoral par rapport aux autres groupes est également observé. [47]

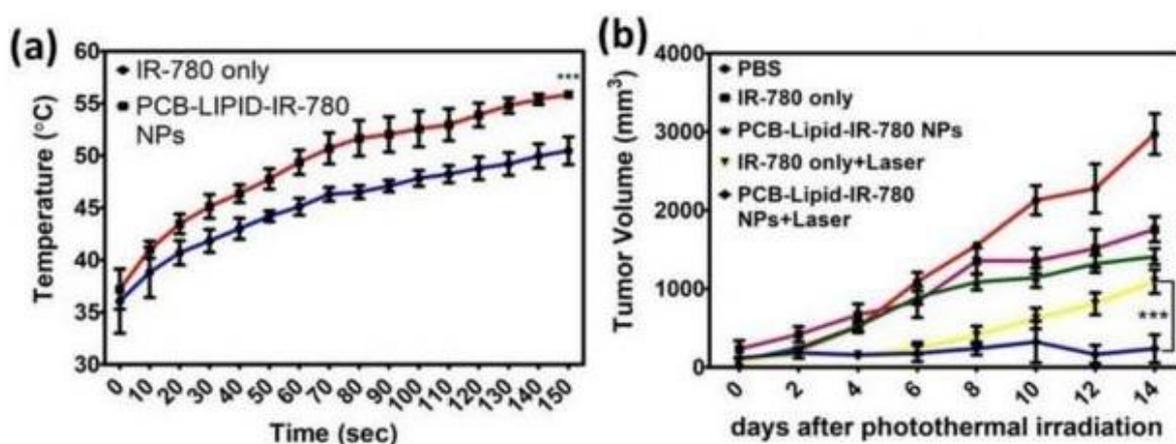


Figure 85 : (a) Température tumorale mesurée lors d'irradiation au laser à 808 nm chez différents groupes de souris porteuses de tumeur TC-1 traitées 24 h auparavant par IR780 et PCB-lipid-IR780 NPs. (b) Evolution du volume tumoral chez des groupes identiques à l'expérience précédente mais avec 3 groupes supplémentaires non irradiés pour mettre en avant l'efficacité de la PTT. [47]

Toutes ces NPs encapsulant IR780 permettent une meilleure efficacité de IR780, une meilleure efficacité de PTT, une libération plus spécifique du produit dans les tumeurs. Toutefois afin de vérifier si ces NPs présentent un réel avantage en thérapie, il est important d'évaluer leurs effets toxiques sur les organes sains.

## D- Toxicité

Parallèlement à la mesure de l'efficacité anti-tumorale (cf. le chapitre précédent), la toxicité potentielle des NPs a été évaluée par la mesure du poids corporel des souris. La variation de poids des souris porteuses de tumeurs traitées par NPs est alors comparée à celle des souris porteuses des mêmes tumeurs traitées par des solutions salines.

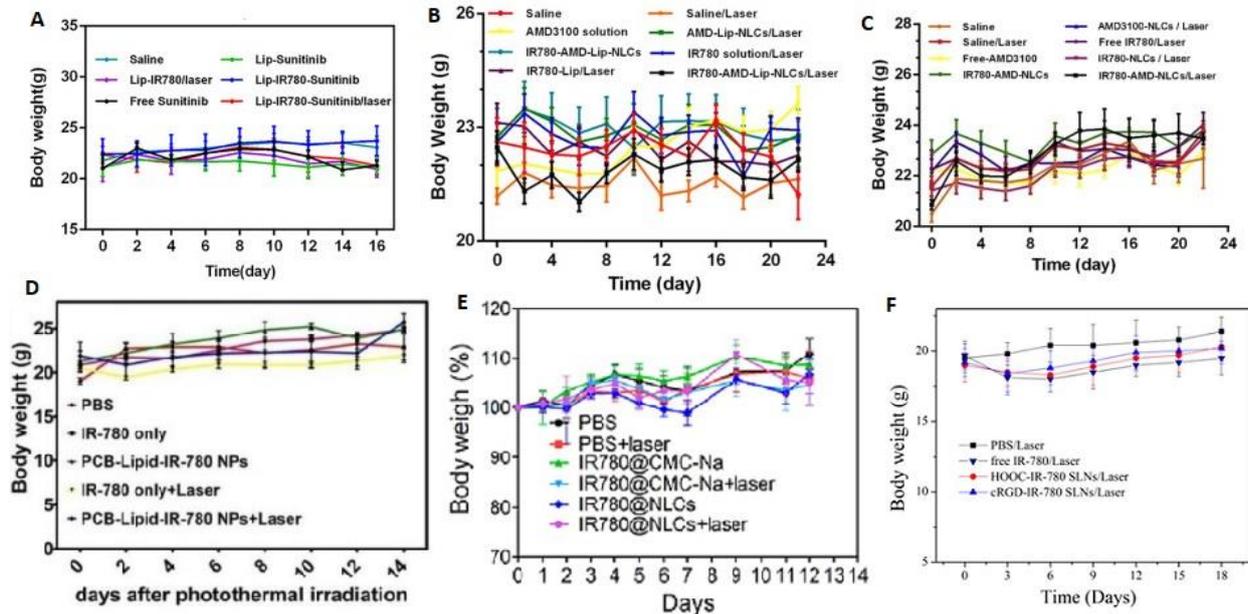


Figure 86 : Mesure du poids corporel des souris traitées par les différentes NPs lipidiques [39, 43, 44, 45, 46, 47]

Les formulations variées de NPs intégrant l'IR780, vues dans le chapitre précédent, n'entraînent pas de variation ou de perte de poids significatives par rapport aux solutions salines (Figure 86). [39, 43, 44, 45, 46, 47]

Différents organes comme la rate, le poumon, le cœur, le foie et le rein ont été photographiés et/ou ont subi une coloration H&E pour une analyse histologique afin de vérifier s'il y a pas de toxicité au niveau tissulaire suite aux traitements nanoparticulaires.

Le pesage puis la photographie des différents organes disséqués comme le cœur, le poumon ou le rein permettent de constater qu'aucune variation ne se produit entre les groupes. Mais pour la rate qui a un rôle central dans le système immunitaire, les souris porteuses de tumeurs traitées par PBS présentait une splénomégalie comme c'est le cas chez les patients atteints de tumeurs au stade avancé. Lors de l'utilisation de l'IR780-AMD-NMC ou de l'IR780-AMD-Lip-NLCs ou encore de Lip-IR780-sunitinib, aucune augmentation du volume de la rate n'est constatée ce qui témoigne de l'efficacité du traitement en plus d'une faible toxicité à ce niveau.

Après coloration H&E des différents organes, on ne remarque aucun changement pathologique témoignant d'une toxicité lors des différents traitements en comparaison avec les groupes de souris traitées avec une solution saline. Aucune lésion tissulaire notable n'a été relevée à l'examen des différents organes ce qui confirme que l'IR780 sous forme nanoparticulaire n'entraîne pas de toxicité significative.

La mesure de certaines enzymes et marqueurs biologiques est également un bon moyen pour évaluer la toxicité comme par exemple la mesure des enzymes hépatiques aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) mais aussi avec l'azote uréique sanguin (BUN) qui est un marqueur de la toxicité rénale. Les dosages hématologiques (globules blancs, globules rouges, hémoglobine, numération plaquettaire, neutrophiles, lymphocytes et monocytes) sont aussi un moyen pour juger de l'hématotoxicité. Tous ces dosages sur les souris porteuses de tumeurs recevant les traitements puis l'irradiation sont effectués et comparés aux mêmes dosages effectués chez des souris recevant des solutions salines.

Les résultats obtenus pour Lip-IR780-Sunitinib, IR780-AMD-Lip-NLC, IR780-AMD-NLC et IR780@NLC sont similaires en comparaison des groupes traités par solution saline. Il n'y a aucune différence entre les taux d'ASAT, d'ALAT et de BUN dans chaque groupe ce qui témoigne d'une absence de toxicité hépatique et rénale, le dosage des marqueurs hématologiques indique qu'aucun effet systémique comme une anémie hémolytique ou une infection aiguë n'est provoqué. <sup>[39, 45, 44, 46]</sup>

L'ensemble de ces résultats sur la toxicité montrent que les NPs testées sont potentiellement d'excellentes candidates pour un traitement par photothérapie en oncologie.

## E- Résumé

Les nanoparticules lipidiques utilisant l'IR780 sont très efficaces pour libérer de façon précise et contrôlée certains médicaments comme le sunitinib qui possède de nombreux effets secondaires notamment une toxicité cardiovasculaire. C'est le cas du liposome utilisé à cet effet où l'irradiation au laser de la tumeur entraîne une perturbation de la bicouche lipidique du liposome via l'effet photothermique de l'IR780 situé dans la bicouche. Ainsi le sunitinib n'est libéré qu'au site tumoral pour agir comme anti-angiogénique. Ces résultats démontrent que la forme lipidique est un bon outil de thérapie guidé par l'imagerie NIR.

Il en va de même pour les micelles phospholipidiques IR780 qui ont montré une grande spécificité pour imager les gliomes chez les souris dans un essai préclinique. Ces micelles offrent une opportunité de diagnostic clinique des glioblastomes mais aussi dans la chirurgie guidée par imagerie NIRF.

Les deux nanoparticules lipidiques développées par Li H et *al.* qui utilisent IR780 et AMD ont permis d'inhiber la croissance tumorale mais également l'invasion des cellules cancéreuses évitant ainsi l'apparition des métastases dans le cadre d'un modèle de cancer du sein. De plus, l'intensité de fluorescence pour IR780-AMD-Lip-NLCs est deux fois plus importante que pour IR780 libre au niveau tumoral ce qui en fait aussi un bon outil en imagerie. Ces nano plateformes sont à la fois sûres et pratiques comme vecteurs pour la libération contrôlée des anticancéreux et pour la thérapie en oncologie ce qui font d'elles des systèmes multifonctionnels.

Le système par voie orale développé est très intéressant car il a montré son action photothermique efficace dans le traitement du cancer colorectal. De plus, la formulation galénique IR780@NLC permet une administration plus confortable pour le patient.

D'autres chercheurs se sont intéressés à l'utilisation d'une NP lipidique zwitterionique qui permet en imagerie et en thérapie d'avoir un impact positif conséquent sur les tumeurs du col utérin dans un modèle murin préclinique sans présenter de toxicité chez les souris traitées.

Les résultats de la formulation mettant en jeu le peptide RGD couplé à une NP lipidique solide vectorisant IR780 permettent de présenter l'agent RGD-IR780-SLN comme un produit théranostique polyvalent, sûr et stable dans le traitement du glioblastome guidé par imagerie NIR. Toutefois une étude sur un modèle de tumeur orthotopique devrait être réalisée pour confirmer que cet agent puisse passer correctement la BHE.

Les NPs lipidiques associées à IR780 ont prouvé qu'elles étaient des outils crédibles pour exploiter au mieux les différents effets de l'activité photothermique. De plus, elles sont un vecteur idéal en imagerie par NIRF ou IVIS ainsi que dans le traitement thérapeutique qui, dans certaines études, a entraîné la suppression définitive des tumeurs, tout ceci sans présenter d'effets indésirables ou de toxicité notables dans le modèle préclinique. C'est pourquoi des études cliniques sont en cours afin d'offrir une meilleure perspective de guérison, un traitement plus confortable et/ou un allongement du temps de survie des patients.

## 4) Micelles non lipidiques

### A- Caractéristiques et présentation des différentes micelles

#### *Micelle PEG-IR780-C13 :*

IR780 est utilisé comme synthon de base de la micelle. <sup>[48], [49]</sup> L'IR780 est couplé à deux chaînes constituées de 13 "carbone" qui apportent un caractère hydrophobe marqué. Le caractère hydrophile de la molécule est obtenu par greffage d'une chaîne de polyéthylène glycol (PEG<sub>2000</sub>). Placées dans l'eau distillée, ces molécules PEG-IR780-C13 s'auto-assemblent pour former des micelles (Figure 87). <sup>[48]</sup>

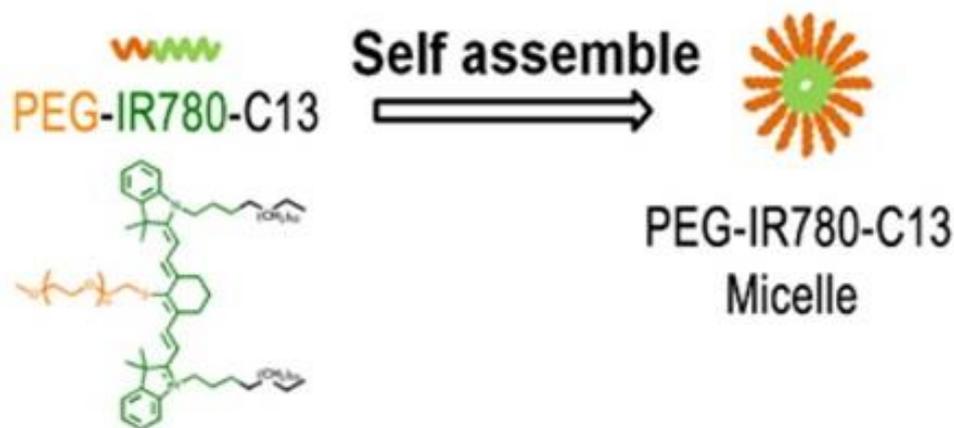


Figure 87 : Auto-assemblage d'une micelle de PEG-IR780-C13 <sup>[48]</sup>

Ces micelles possèdent un diamètre moyen de  $52,4 \pm 6,8$  nm <sup>[49]</sup>. Elles sont très stables car la solution micellaire ne précipite pas même après un mois de stockage.

#### *Micelle IR780-PluronicF127 :*

IR780, molécule possédant un caractère plutôt hydrophobe, est chargée dans une NP appelée Pluronic F127. Cette NP est fabriquée à partir d'un copolymère tribloc amphiphile [PEO]<sub>100</sub>-[PPO]<sub>65</sub>-[PEO]<sub>100</sub>. Ces copolymères s'auto-assemblent spontanément en micelles dans une solution aqueuse pour former la NP Pluronic F127. La méthode de réhydratation sur film est ensuite utilisée pour encapsuler IR780 dans Pluronic F127. Après l'addition séquentielle de l'agent de couplage au silane TEOS (tetraéthyle ortosilicate) et du réactif de réticulation DEDMS (diéthoxydiméthysilane) à la solution micellaire, des nanoparticules chargées de IR 780 très solubles dans l'eau (IR780-PluronicF127) ont été obtenues. Une dialyse permet au final de purifier IR780-PluronicF127 (Figure 88). <sup>[50]</sup>

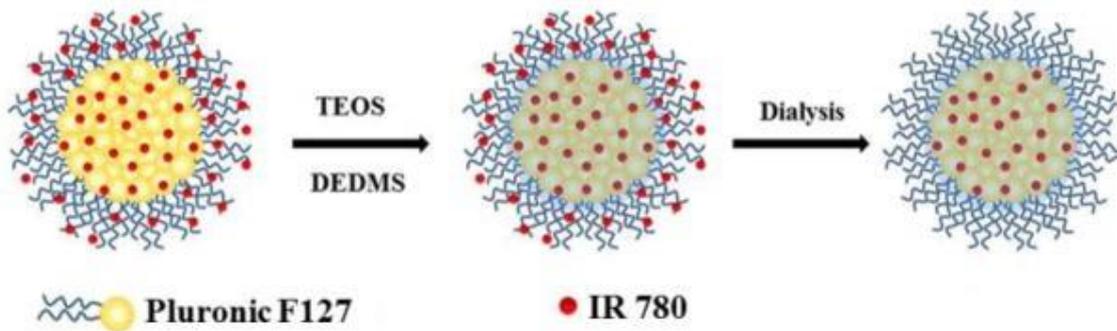


Figure 88 : Fabrication de micelle IR780-PluronicF127 <sup>[50]</sup>

Les micelles sphériques formées possèdent un diamètre d'environ 30 nm, aucune précipitation et aucun changement de taille n'ont été remarqués après un mois de stockage en solution aqueuse.

### Micelle NLG919/IR780 :

La PTT peut être limitée par la pénétration de la lumière NIR et la diffusion de chaleur. Elle peut entraîner au niveau tumoral une augmentation de chaleur qui peut réguler positivement les protéines de choc thermique (ou HSP) ce qui engendre une protection cellulaire. Coupler IR780 à un inhibiteur de HSP peut être intéressant pour améliorer l'efficacité thérapeutique du PTT. Ceci peut être une stratégie dans le combat pour inhiber la croissance tumorale et l'apparition de tumeurs secondaires via la fuite immunitaire des cellules tumorales médiée par les protéines qui, comme HSP, s'expriment à la suite de l'échauffement dû à la PTT. Par exemple l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) est un immunomodulateur inhibant l'activité des Lymphocytes T ce qui induit une tolérance immunitaire des cellules tumorales. <sup>[51]</sup>

Le composé NLG919 (1-Cyclohexyl-2-(5H-imidazo[5,1-a]isoindol-5-yl)ethanol), un inhibiteur de la voie de l'IDO, a été choisi. <sup>[51]</sup> *In vivo*, NLG919 induit une réduction de 95 % du volume tumoral dans certains cas. <sup>[52]</sup> Des micelles polymériques contenant NLG919 et IR780 sont préparées par la méthode d'hydratation en couches minces via un mélange IR780, NLG919 et mPEG-PCL (mPEG-Poly(Caprolactone)) dans de l'éthanol (Figure 89).

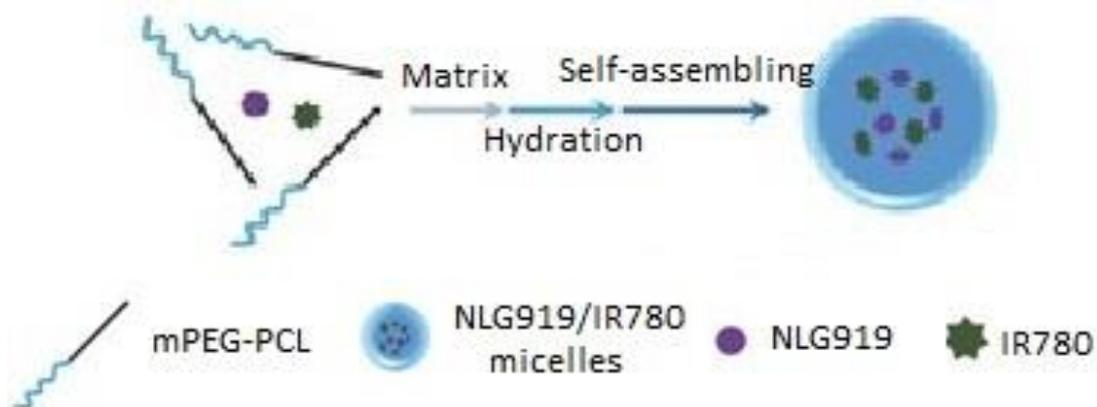


Figure 89 : Formation des micelles NLG919/IR780 <sup>[51]</sup>

La taille des micelles obtenues est de  $43 \pm 3,2$  nm, cette taille inférieure à 50 nm est bénéfique pour la circulation lymphatique. Lorsque la concentration des micelles est de 50 ou  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , la température atteint respectivement 63,7 et 77°C ce qui prouve que l'emploi

des micelles NLG919/IR780 peut être utile pour la PTT. La libération lente de NLG919 et IR780 constatée permet d'améliorer l'efficacité de l'administration des micelles au niveau des tissus tumoraux et de la circulation lymphatique. Ces avantages peuvent devenir un atout dans la lutte contre certains cancers et leurs métastases. [51]

### Micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX :

Des NPs micellaires non lipidiques utilisent non seulement IR780 mais aussi la doxorubicine pour une chimiothérapie photothermique. Certaines études ont déjà exploré cette voie comme par exemple le nanomédicament multifonctionnel formé de paclitaxel et du vert d'indocyanine (ICG) pour la PTT. Elles ont montré de nombreux effets positifs notamment l'éradication de tumeurs sous-cutanées mais l'utilisation de ce produit est malheureusement limitée par la libération incontrôlée du médicament et par conséquent un effet non synergique des deux agents.

Pour contourner ces inconvénients Yang Z et *al.* [53] ont utilisé un nano-système de micelles UCST (upper critical solution temperature). Le copolymère amphiphile méthylpolyéthylène glycol-b-poly(acrylamide-co-acrylonitrile-co-vinylimidazole), abrégé mPEG-PAAV, est un bon composé UCST. Il se modifie en fonction du pH pour une libération contrôlée de médicaments médiés par laser NIR.

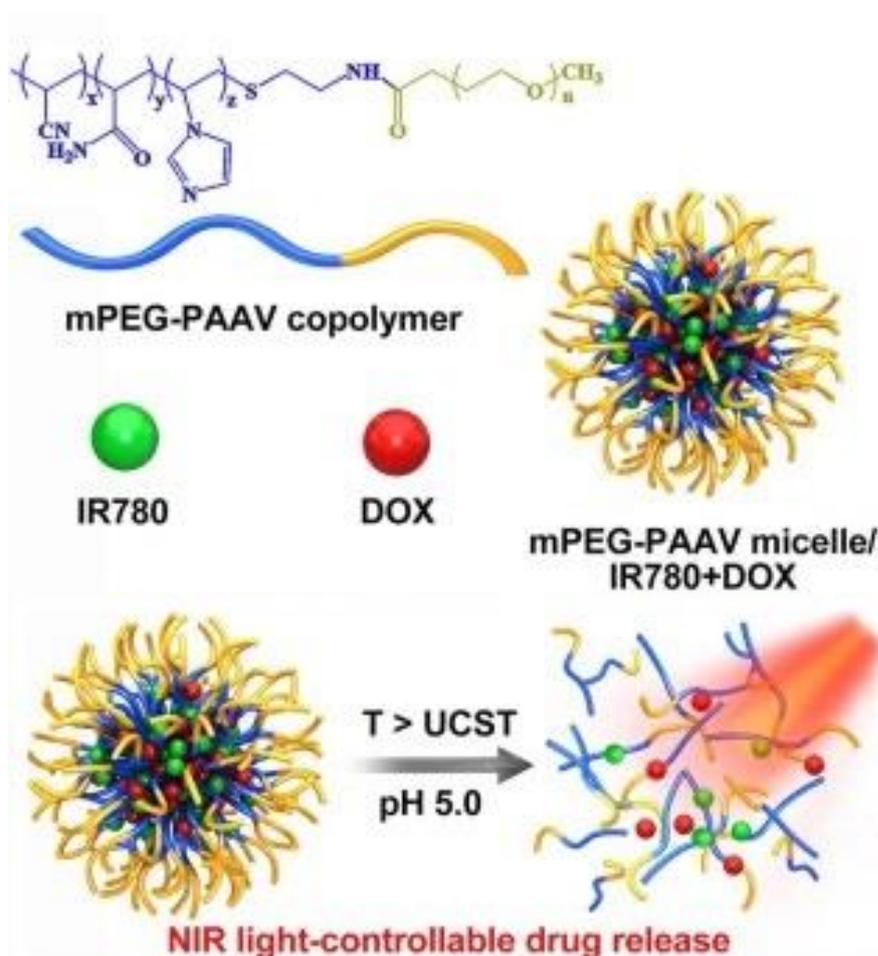


Figure 90 : Formulation et mécanisme de libération la micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX [53]

En premier lieu, le copolymère PAAV est synthétisé par polymérisation radicalaire puis conjugué au mPEG-COOH pour former mPEG-PAAV présenté à la Figure 90. Le copolymère

mPEG-PAAV peut spontanément former des micelles par dialyse. C'est pourquoi les copolymères sont avec IR780 et Dox dissous dans du DMSO pour former les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX.

La taille des micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX est de  $198,5 \pm 10,7$  nm. C'est à pH acide et à  $43^{\circ}\text{C}$  que la libération des médicaments est optimale. A pH acide ( $\text{pH} = 5,0$ ), 55,3% de doxorubicine est libéré au bout de 24 h, ce pourcentage augmente jusqu'à 71,5% de doxorubicine libérée après 144 h. A titre de comparaison, seulement 36% de doxorubicine est libéré à  $\text{pH} = 7,4$  ( $\text{pH}$  physiologique) et à  $45^{\circ}\text{C}$  ce qui souligne l'influence du pH dans la libération de doxorubicine. Il en va de même après irradiation laser, à  $\text{pH} = 5$ , trois fois plus de doxorubicine est libéré que sans irradiation laser. [53]

Ces résultats montrent que ces micelles sont des nano-systèmes viables pour la libération de doxorubicine.

### Micelle IPM :

PMPC-b-P(MEMA-hydrizide-DOX) peut également être utilisé comme polymère sensible au pH. Suite à l'autoassemblage de ces polymères en présence d'IR780 et après dialyse, des micelles, nommées IPM, ont été formées (Figure 91). [54]

L'IPM de forme sphérique possède un diamètre d'environ 63 nm. Les mesures de la libération de Dox ont montré que, seulement 8 % de Dox est libéré par IPM à  $\text{pH} = 7,4$  alors que cinq fois plus sont libérés à  $\text{pH} = 5,0$ . Ses résultats montrent que la libération de Dox sera plus importante à pH acide comme par exemple dans le milieu tumoral. La température de la solution IPM mesurée après irradiation laser à 808 nm pendant 5 min atteint  $44,2^{\circ}\text{C}$ .

Ces résultats illustrent le potentiel PTT d'IPM dans l'ablation thermique de certaines tumeurs. Le pH et l'irradiation au laser permettent de libérer de façon contrôlée la doxorubicine au site tumoral cela peut permettre de contrarier le mécanisme de résistance aux chimiothérapies des tumeurs. [54]

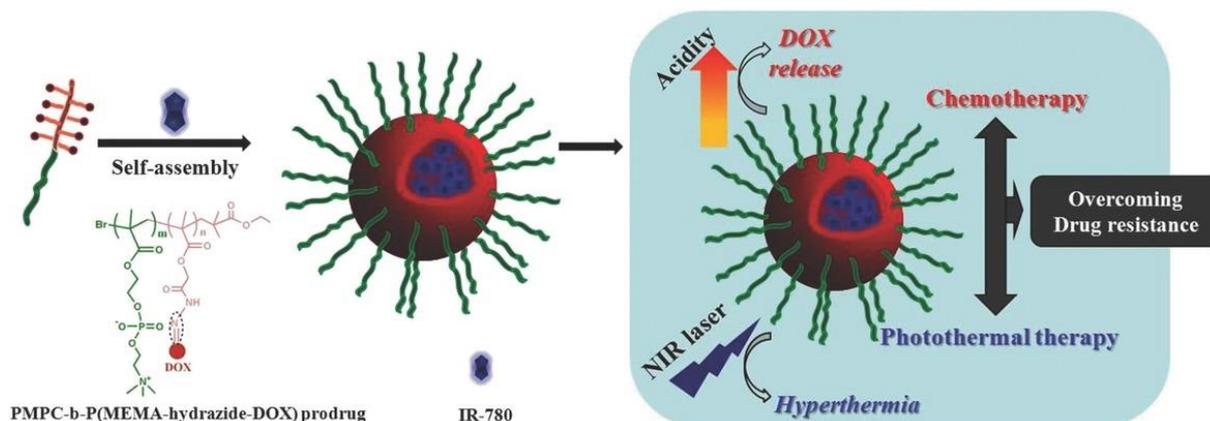


Figure 91 : Formation et mécanisme théorique de libération de Dox et d'IR780 par IPM [54]

## B- Imagerie

Les NPs contenant IR780 peuvent être utilisées en imagerie : IVIS, NIRF ou encore photoacoustique (PA).

### *Micelle PEG-IR780-C13 :*

La capacité en imagerie des micelles PEG-IR780-C13 est mesurée par le signal de fluorescence une heure après injection de 1 mg/kg à des souris porteuses de tumeur CT26. Avec le temps, les micelles PEG-IR780-C13 se sont accumulées dans la tumeur avec un pic d'absorption par la tumeur de 24 à 48 h après injection (Figure 92). Des morceaux d'organes et de tumeur ont ensuite été prélevés pour analyse. Les résultats confirment que c'est bien dans les coupes tumorales que s'accumulent préférentiellement les NPs.

Les chercheurs ont également comparé l'accumulation des NPs dans différents organes de souris saines par rapport à des souris porteuses de tumeur CT26. C'est dans le foie des souris saines que la plus forte accumulation a été constatée. Le foie des souris porteuses de tumeur CT26 présente aussi une accumulation des micelles, mais en bien moindre proportion que dans le foie des souris saines ou dans la tumeur. Ces NPs possèdent une haute spécificité pour le tissu tumoral.

En conclusion, le produit micellaire PEG-IR780-C13 se révèle être un bon outil pour l'imagerie *in vivo*.<sup>[48]</sup>

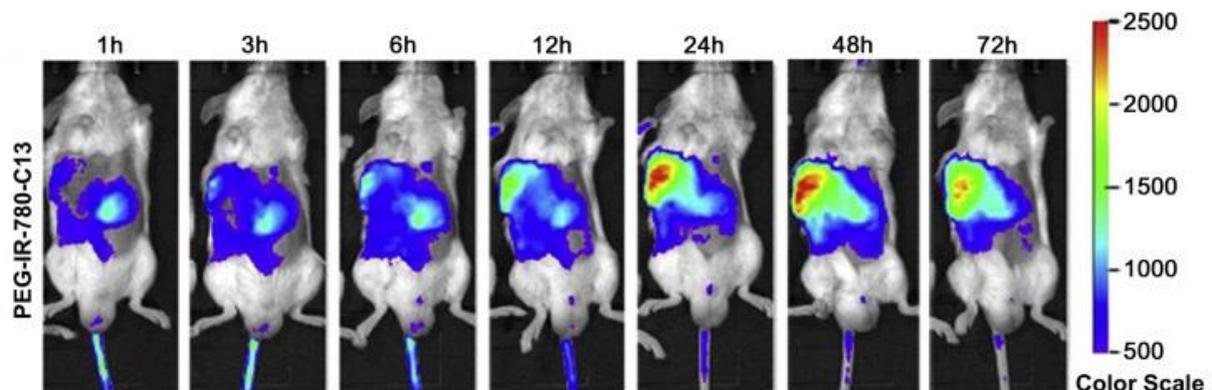


Figure 92 : Imagerie au NIRF des souris porteuses de tumeur CT26 prise après injection de PEG-IR780-C13 (1 mg/kg)<sup>[48]</sup>

### *Micelle IR780-PluronicF127 :*

IR780-PluronicF127 a été étudié comme agent de contraste en imagerie.<sup>[50]</sup> Dans un premier temps l'intensité de fluorescence à l'IVIS de IR780-PluronicF127 a été comparée à celle de IR780 injecté à des souris saines. Les signaux de fluorescence au point d'injection d'IR780-PluronicF127 sont beaucoup plus importants.

Dans un deuxième temps, la fluorescence des ganglions sentinelles a été mesurée après injection sous cutanée. Cette cartographie est utilisée en clinique pour prédire la propagation métastatique via les ganglions lymphatiques régionaux. Le faible diamètre de IR780-PluronicF127 (environ 30 nm) est très avantageux pour l'accumulation dans les

ganglions lymphatiques. Dès 2 min après injection, les ganglions lymphatiques sont devenus fluorescents. Cette fluorescence persiste 15 minutes après injection même si l'intensité de fluorescence est bien moindre qu'après 2min. Les souris ayant reçu une injection sous-cutanée de IR780 libre ne présentent aucune fluorescence à 2 ou 15 minutes après injection au niveau des ganglions sentinelles. [50]

Ces résultats soulignent l'importance de ces NPs pour le diagnostic précoce de l'apparition de métastase. Leur capacité de détection des tumeurs dans un modèle de xéno greffe de tumeur A431 chez la souris a ensuite été examinée pour une potentielle utilisation en imagerie tumorale.

Lorsque les xéno greffes des tumeurs A431 ont atteint des tailles d'environ 200 mm<sup>3</sup>, les souris ont reçu une injection i.v. d'IR780-PluronicF127 ou d'IR780 libre. Les résultats des analyses *in vivo* des tumeurs analysées par IVIS montrent que l'intensité du signal après injection est plus importante au niveau du site tumoral dans le groupe traité par IR780-PluronicF127 que dans le groupe de souris traité par IR780 libre (Figure 93A). L'accumulation tumorale maximale est visible 48 h après injection. Le signal de fluorescence tumorale des souris traitées par IR780-PluronicF127 est plus important que pour IR780 libre grâce à l'effet EPR que présentent les NPs conjugué à la luminosité accrue de la forme micellaire. La distribution au niveau tumoral a été quantifiée en fonction du temps, l'accumulation maximale d'IR780-PluronicF127 est atteinte 36 h après injection alors que pour IR780 libre le pic est se situe 12 h après injection (Figure 93 C). [50]

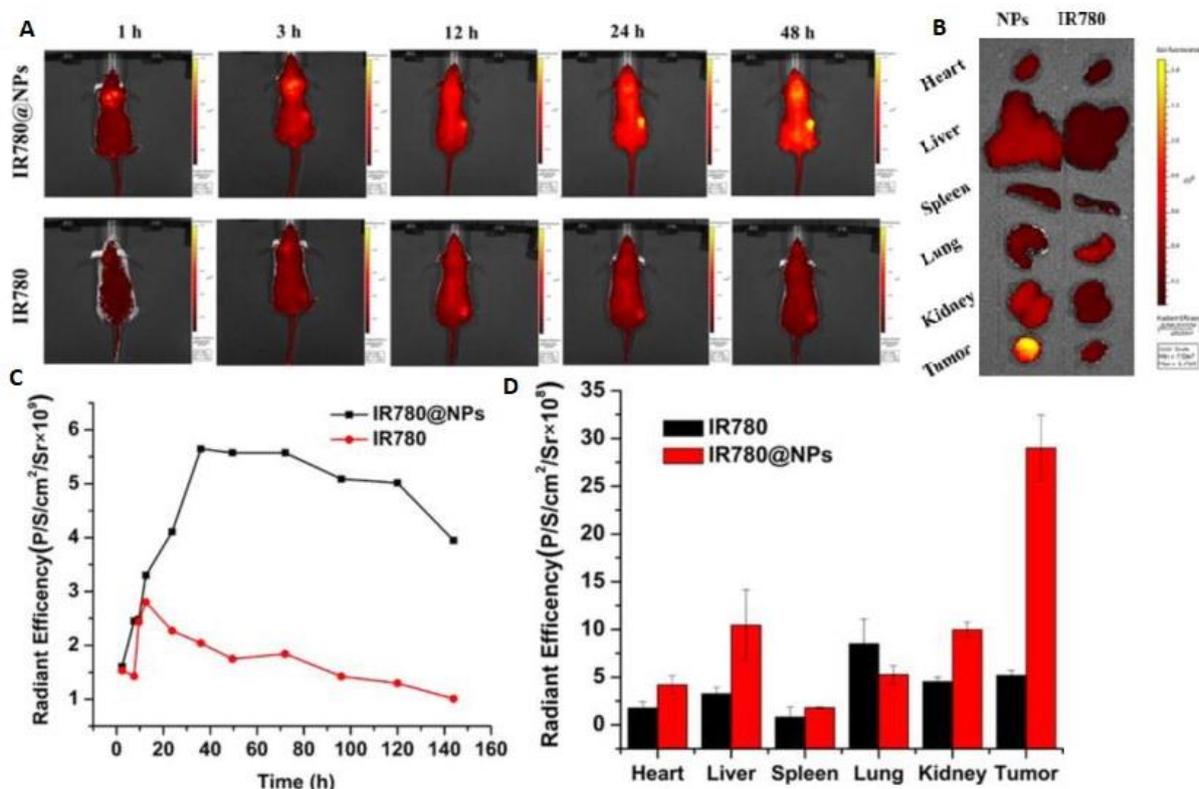


Figure 93 : Imagerie par fluorescence *in vivo* de souris porteuses de tumeur (A431) après injection d'IR780-PluronicF127 et d'IR780 libre (A) IVIS corps entier. (B) Imagerie IVIS de divers organes et de la tumeur prélevés chez les souris. (C) Profil de distribution tumorale des produits mesuré par les signaux NIR en fonction du temps. (D) Profil quantitatif d'accumulation des produits dans les différents organes et la tumeur. [50]

144 h après l'injection, les différents organes et la tumeur sont prélevés et imagés avec IVIS (Figure 93B) et la distribution des produits est quantitativement évaluée (Figure 93D). Les

résultats montrent clairement pour les tumeurs des souris traitées par IR780-PluronicF127 une intensité de fluorescence bien plus importante que dans les autres organes. A contrario, chez les souris traitées par IR780 libre, aucune accumulation spécifique dans la tumeur n'a été détectée. Cette NP est, au vu des résultats, un bon vecteur pour l'utilisation d'IR780 comme agent de contraste dans l'imagerie tumorale *in vivo*. [50]

### Micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX :

Le système d'imagerie par fluorescence IVIS permet de vérifier si la biodistribution des micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX cible le tissu tumoral. L'imagerie photoacoustique est utilisée en complément pour apprécier la morphologie de la tumeur et sa distribution microvasculaire *in vivo*.

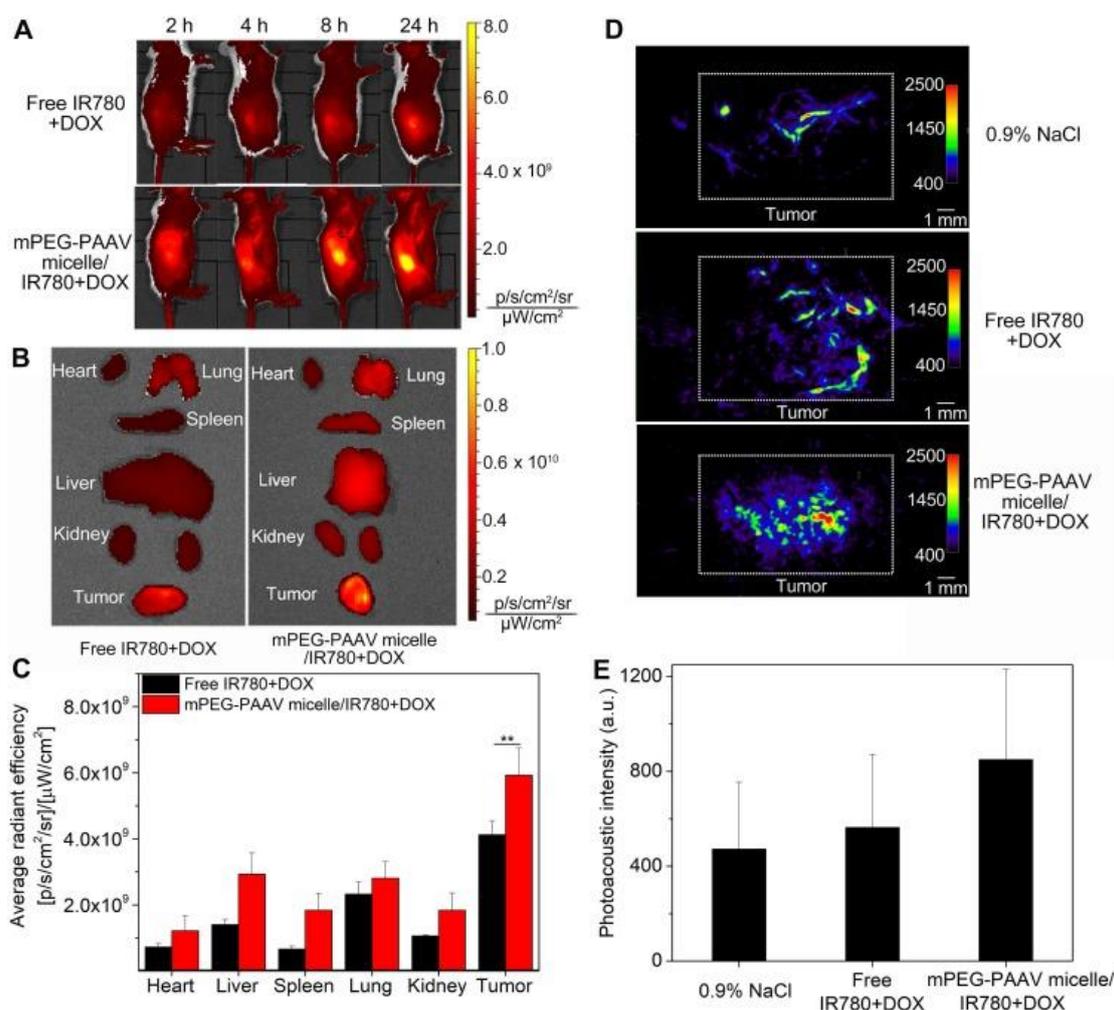


Figure 94 : A : Imagerie NIRF par IVIS corps entier de souris porteuses de tumeur 4T1 ayant reçu une injection de micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX ou d'IR780+DOX libre, B : Imagerie IVIS réalisée après prélèvements des organes et la tumeur 24 h après injection, C : Analyse quantitative de l'intensité de fluorescence IR780 dans la tumeur.

D : Imagerie photoacoustique de la tumeur 24 h après injection, E : Mesure de l'intensité photoacoustique sur site tumoral. [53]

Le signal de fluorescence de IR780 au site de la tumeur augmente au cours du temps jusqu'à atteindre un pic 24 h après injection. (Figure 94A) Les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX ciblent les tumeurs solides mammaires et s'accumulent de façon bien plus importante dans la tumeur que dans les autres organes (Figure 94B). De plus, les signaux

fluorescents sont 1,44 fois plus importants pour le groupe recevant les micelles que pour le groupe recevant IR780+DOX libre (Figure 94C). [53]

L'imagerie PA montre un effet de contraste suffisant pour que les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX puissent être utilisées à cet effet (Figure 94D). L'intensité photoacoustique est satisfaisante et permet d'apprécier *in vivo* la morphologie de la tumeur. La mesure des signaux PA est 1,5 fois plus importante pour le groupe traité par NPs que pour le groupe traité par les produits IR780+Dox (Figure 94E).

Ces résultats indiquent que l'imagerie PA, tout comme l'IVIS, basée sur les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX est une approche efficace pour évaluer la biodistribution des micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX. L'imagerie PA permet d'obtenir des d'informations supplémentaires sur la microstructure de la tumeur *in vivo*. [53]

### Micelle IPM :

Dans la structure de la molécule de base constituant la NP IPM, la doxorubicine est reliée à un polymère par une liaison hydrazone sensible aux pH acides. Cette particularité va permettre la libération au niveau tumoral d'IR780 et de doxorubicine. L'IR780 délivré émet, sous excitation lumineuse, des signaux fluorescents dans le proche infra-rouge qui permettent la détection et le suivi *in vivo* de l'évolution tumorale en temps réel.

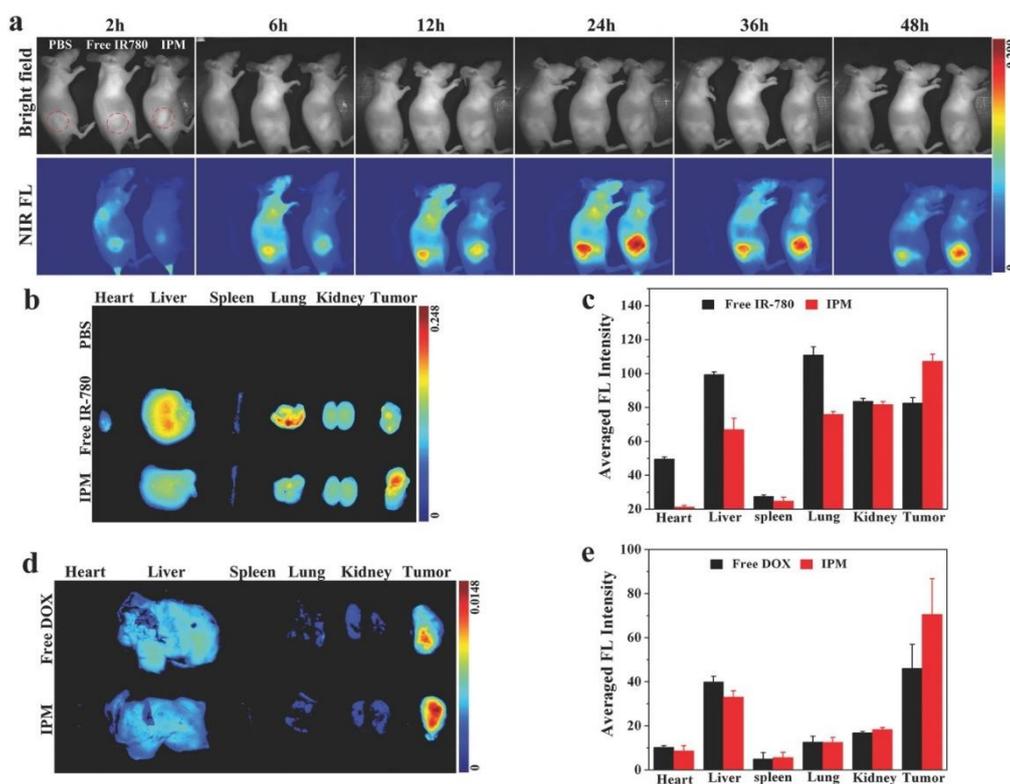


Figure 95 : (a) Imagerie NIRF *in vivo* de souris porteuses de tumeur MCF-7 après injection i.v. de PBS, IR780 et IPM (de gauche à droite) ; (b) Imagerie NIRF des principaux organes et tumeurs prélevés chez les souris 48 h après injection ; (c) Biodistribution d'IR780 et d'IPM mesurée via l'intensité moyenne de fluorescence dans les différents organes et la tumeur ; (d) Image de fluorescence des principaux organes et des tumeurs après injection i.v. de Dox libre et d'IPM et prélevés 24 h après injection ; (e) Mesure de l'intensité moyenne de fluorescence de Dox libre et IPM dans les principaux organes et la tumeur. [54]

Des souris porteuses de tumeurs MCF-7 ont reçu une injection de PBS, d'IR780 ou d'IPM afin d'évaluer le potentiel d'IPM en imagerie NIRF (Figure 95). Les signaux de fluorescence dans la zone tumorale atteignent un maximum 24 h après injection. L'accumulation d'IPM et sa rétention au niveau tumoral perdurent jusqu'à 48 h post-injection. Pour IR780 libre, l'intensité de fluorescence est aussi maximale à 24 h mais son intensité est moindre et la fluorescence au niveau tumoral décroît plus rapidement. L'intensité de fluorescence dans les régions non tumorales chez les souris traitées par IR780 libre est plus intense que chez les souris traitées avec IPM quel que soit le moment après injection. Ceci est la conséquence de l'absorption et de la clairance non spécifique de l'IR780 libre dans la circulation sanguine entraînant une distribution aléatoire dans tout le corps et son accumulation dans les principaux organes analysés *ex vivo* (Figure 95b). Les résultats de l'évaluation *ex vivo* ont montré que les souris traitées par IR780 libre présentent une intensité de fluorescence plus forte dans chaque organe que celles traitées avec IPM, à l'exception du tissu tumoral (Figure 95c).

L'imagerie NIRF est également utilisée pour vérifier l'accumulation de Dox libre dans les différents tissus en comparaison de celle IPM (Figures 95d, e). L'imagerie montre que la quantité de Dox retrouvée dans le tissu tumoral des souris traitées par IPM est bien au-dessus de la quantité retrouvée dans le groupe traité par Dox libre. <sup>[54]</sup>

Ces résultats confirment que la libération de la doxorubicine et d'IR780 est induit par le pH acide tumoral ce qui entraîne l'accumulation préférentielle dans les xénogreffes de tumeur MCF-7 chez les souris. L'IR780 permet un suivi oncologique grâce à l'imagerie IVIS. <sup>[54]</sup>

## C- Efficacité Thérapeutique

La plupart des micelles non lipidiques impliquant IR780 présentent, non seulement des propriétés en imagerie, mais également une efficacité thérapeutique soit par PTT soit par thérapie combinée avec un agent chimiothérapeutique.

### *Micelle PEG-IR780-C13 :*

L'effet photothermique des micelles est évalué par la mesure de la température au cours d'une irradiation laser à 808 nm puis comparé aux mêmes mesures effectuées sur IR780 libre et PEG-IR780-C13. Pour ces derniers, la température ne dépasse pas 48°C alors que pour les micelles PEG-IR780-C13 la température atteint 66,5°C ce qui témoigne d'une action bien supérieure. <sup>[48, 49]</sup>

Les micelles PEG-IR780-C13 ont été évaluées dans deux types de cancer : tumeur rénale composée par les cellules RENCA <sup>[49]</sup> et tumeur formée par des cellules cancéreuses CT-26 (cancer colorectal) <sup>[48]</sup>.

Dans la première étude, une tumeur rénale est implantée de façon orthotopique chez des souris. Une fois les tumeurs ayant atteint une taille de 100 mm<sup>3</sup>, les souris sont réparties en 2 groupes, l'un recevant une injection de solution saline et l'autre de micelles PEG-IR780-C13 (40 mg/kg), ensuite, elles sont irradiées au laser à 808 nm pendant 10 min et la température est mesurée. Le volume tumoral est mesuré 10 jours après l'injection.

L'étude de biodistribution <sup>[49]</sup> montre que le composé s'accumule préférentiellement dans le tissu tumoral et dans une moindre mesure dans le foie (Figure 96A). Ce ciblage spécifique du site tumoral par les micelles entraîne après irradiation de 10 minutes une augmentation de température de la tumeur de 25°C, avec une augmentation de 12°C dans les 30 premières secondes (Figure 96B). Cette élévation de température provoque la suppression de la croissance tumorale rénale et une atténuation du volume tumoral pour le groupe traité par PEG-IR780-C13 et irradié (Figure 96C).

Ce résultat est confirmé par l'étude histologique de la tumeur où une nécrose coagulante est apparue dans son volume entier ; les micelles PEG-IR780-C13 irradiées dans le proche infrarouge peuvent entraîner assez de chaleur pour détruire totalement la tumeur. <sup>[49]</sup>

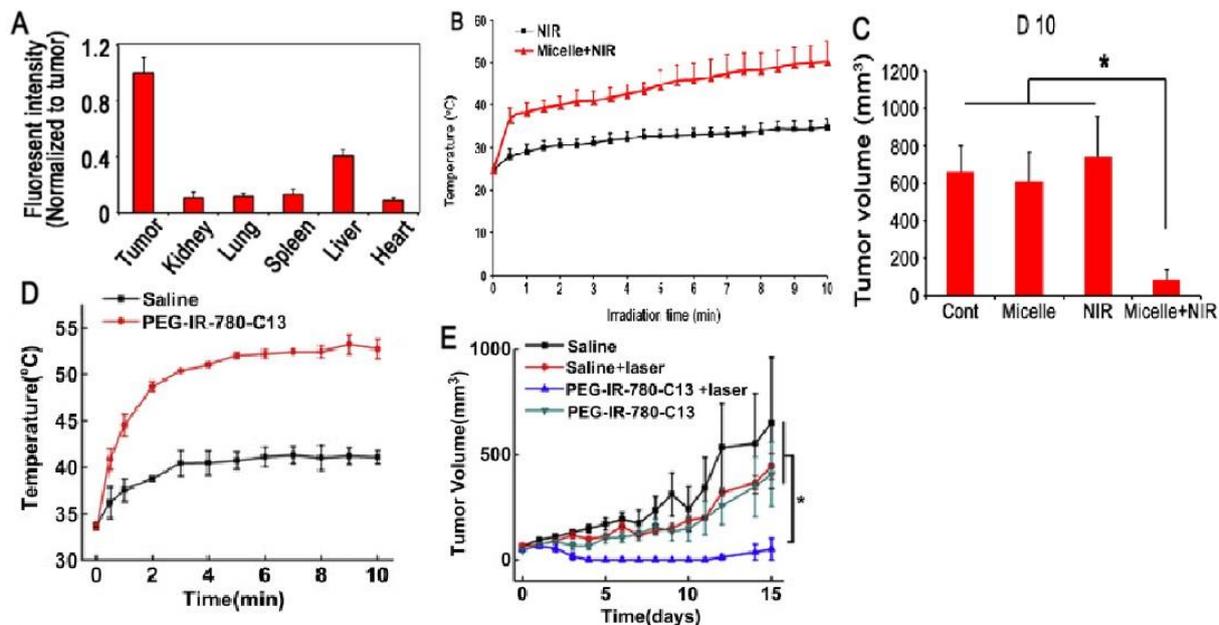


Figure 96 : Chez des souris porteuses de tumeur orthotopique RENCA, (A) Mesure de la biodistribution de PEG-IR780-C13 dans les différents organes et tumeurs 24hrs après injection, (B) Température mesurée au site tumoral durant les 10 minutes d’irradiation laser à 808nm, (C) Volume tumoral mesuré 10 jours après injection. Les souris porteuses de tumeurs CT26 : (D) Mesure de la température au niveau tumoral durant les 10 minutes d’irradiation tumorale à 808nm, (E) Evolution du volume tumoral. <sup>[48, 49]</sup>

Dans la deuxième étude, les tumeurs implantées chez les souris ont atteint un volume d’environ 200 mm<sup>3</sup> avant que celles-ci ne reçoivent une injection de PEG-IR780-C13. Les souris sont irradiées au laser 24 h après injection. La température moyenne mesurée au site tumoral sous irradiation laser augmente assez rapidement pendant les 5 premières minutes jusqu’à atteindre 52,1°C puis les 5 minutes suivantes plus lentement jusqu’à 52,5°C (Figure 96D). La température mesurée est bien au-dessus du seuil de 43°C, c’est la température minimale pour engendrer des dommages aux cellules tumorales. Les micelles PEG-IR780-C13 peuvent donc être employées dans la PTT *in vivo* pour le traitement des tumeurs colorectales.

Les souris reçoivent une injection de 30 mg/kg de micelles PEG-IR780-C13 puis une irradiation au laser à 808 nm durant 10 minutes. La mesure du volume tumoral pendant 15 jours a été effectuée (Figure 96E). La taille des tumeurs s’est réduite en moyenne jusqu’à 10 mm<sup>3</sup>. De plus, certaines tumeurs traitées par PEG-IR780-C13 avec irradiation disparaissent dès le troisième jour après injection ce qui témoigne de l’efficacité photothermique du produit testé dans le traitement du carcinome colorectal à cellules CT-26. <sup>[48]</sup>

### Micelle NLG919/IR780 :

L’étude de ces NPs vise à développer un médicament efficace face au cancer du sein (cellules 4T-1 ou MCF-7).

Peng J *et al.* <sup>[51]</sup> ont montré que, via l’utilisation de NLG919 qui inhibe l’IDO, la dynamisation de l’activité des Lyc T entraîne une immunomodulation permettant de supprimer la croissance de la marge tumorale non affectée par la PTT. Les micelles NLG919/IR780 présentent comme toutes les NPs la particularité de s’accumuler de façon passive dans la tumeur via l’effet EPR et une longue  $\frac{1}{2}$  vie. Pour tester *in vivo* le potentiel des micelles NLG919/IR780, des souris reçoivent une implantation ectopique de cellules cancéreuses 4T1. Lorsque le volume des tumeurs a atteint 100 mm<sup>3</sup> environ, les souris sont divisées en plusieurs groupes et reçoivent selon les groupes des injections de solution saline,

de micelles NLG919/IR780, de micelles IR780 irradiés ou non au laser à 808 nm durant 5 min selon le protocole décrit figure 97A. [51]

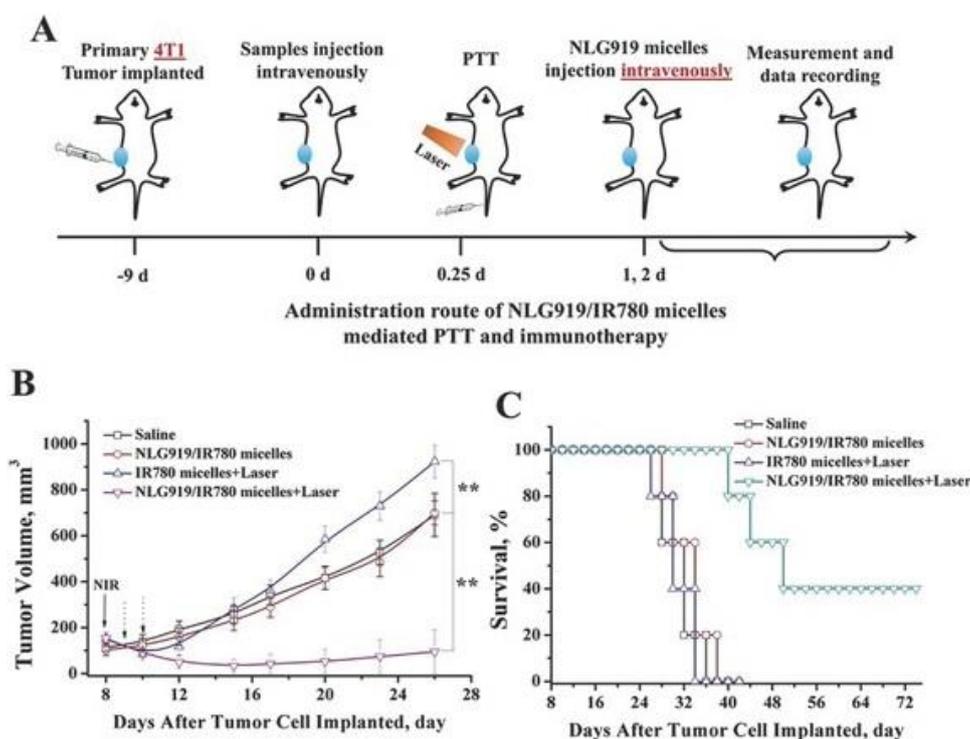


Figure 97 : (A) Protocole d'étude mis en place pour évaluer *in vivo* l'efficacité des micelles NLG919/IR780 sur des souris porteuses de tumeur 4T1 ; (B) Mesure de l'évolution du volume tumoral chez les souris recevant les différents traitements et irradiées (pour deux groupes) au laser à 808 nm durant 5 min ; (C) Mesure du temps de survie moyen des souris avec les différents traitements. [51]

A la suite de l'irradiation au laser à 808 nm durant 5 minutes, seul le groupe de souris traité par les micelles NLG919/IR780 présente une régression de la marge tumorale au-delà de la PTT effective (Figure 97B). Ces résultats indiquent que l'utilisation d'un inhibiteur d'IDO améliore les résultats. La courbe de survie des souris traitées confirme les résultats obtenus, le groupe recevant les micelles NLG919/IR780 et irradié au laser montre que 40 % des souris ont survécu jusqu'à 72 jours après l'implantation des cellules tumorales (Figure 97C).

Une fois que la tumeur primitive développée atteint les 100 mm<sup>3</sup>, Peng J et al. poussent l'expérience plus loin pour vérifier si les micelles NLG919/IR780 peuvent avoir un effet sur des tumeurs distales secondaires non irradiées, injectées par voie sous cutanée sur le flanc opposé (Figure 99 A).

La température à la surface de la tumeur primitive est de 45°C après irradiation à 808 nm lorsque les souris ont reçu 1 mg/kg de micelles NLG919/IR780 et une température de 54°C lorsque la dose de micelles administrée est de 2 mg/kg.

Les micelles IR780 et NLG919/IR780 inhibent efficacement la croissance tumorale et éliminent certaines tumeurs. Pour les tumeurs secondaires, le traitement avec les micelles NLG919/IR780 sans irradiation laser est plus efficace qu'avec des micelles IR780 avec irradiation. Lors de l'utilisation d'un modèle de tumeur 4T1-LUC (tumeur mammaire fortement métastatique au niveau pulmonaire) pour visualiser la croissance des métastases, les résultats confirment l'efficacité thérapeutique de la combinaison PTT avec l'immunothérapie.

Les MMP-2 sont impliquées dans le processus métastatique, la détection du taux de MMP-2 ou de pro-MMP-2 peut donc être un indicateur pour des métastases de certains cancers. L'inhibition de la sécrétion et de l'activation de MMP-2 permettrait de développer de nouveaux types de traitement des cancers du sein afin de diminuer les métastases (nombre de nodules et volume). Le relâchement du tissu tumoral induit par l'activité des MMP-2 entraîne une augmentation des métastases (via la fuite de cellules tumorales) et la diminution du temps de survie chez les patients atteints de carcinome mammaire primitif alors qu'un faible taux de MMP-2 est plutôt associé à un pronostic favorable. [55] Dans cette optique, Peng J *et al.* ont mesuré le taux d'expression de MMP-2 dans le tissu pulmonaire chez les souris porteuses de tumeur 4T1 et recevant différents traitements avec ou sans irradiation au laser. Le résultat illustré par la Figure 98 indique que l'expression de MMP2 dans le groupe recevant la thérapie combinatoire est la plus basse. Ceci souligne que le traitement par les micelles NLG919/IR780 irradiées peut soulager les métastases pulmonaires des cancers du sein à cellules 4T1 chez les souris et donc augmenter sensiblement la durée de survie. [51]

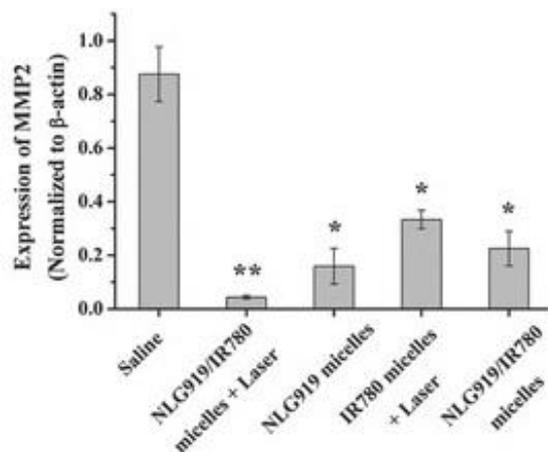


Figure 98 : Expression de MMP-2 dans les différents groupes de traitement chez les souris porteuses de tumeur 4T1. [51]

Les études montrent que les micelles NLG919/IR780 peuvent inhiber la croissance des métastases, cela peut être dû à une réponse immunitaire induite par ces mêmes micelles. C'est pourquoi, une étude a été menée sur la proportion des Lyc T infiltrés CD4+, CD8+ et la population de Lyc T régulateurs dans la rate et les tumeurs primitives et/ou secondaires. Dans la tumeur primitive et la rate du groupe traité par les micelles NLG919/IR780 irradiées au laser, la population de Lyc T CD8+ est bien plus importante que la population de Lyc T CD4+. Alors que dans les autres groupes, aucune augmentation notable de Lyc T CD8+ n'a été observée, comparés au groupe avec solution saline. Il en est de même dans les tumeurs secondaires. Ces résultats indiquent non seulement que l'immunothérapie est avantageuse par la combinaison de l'agent photothermique et de l'inhibiteur d'IDO mais aussi que les micelles NLG919/IR780 induisent une différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T CD8+ qui interviennent en inhibant la croissance tumorale. L'avantage supplémentaire que présente l'utilisation d'un inhibiteur de l'IDO au niveau immunitaire est qu'il peut réguler négativement la fonction des lyc T reg. Il est montré que la population de Lyc T reg au niveau de la rate des souris porteuses de tumeur 4T1 est réduite de 19 % (pour le groupe de solution saline) à environ 5 % dans le groupe de souris traité par les micelles NLG919/IR780 et micelles NLG919 non irradiées. Quasiment aucune diminution n'a été observée dans le groupe traité par les micelles IR780 irradiées au laser. Quant au groupe traité par les micelles NLG919/IR780 irradiées à 808 nm, la population de Lyc T reg est réduite jusqu'à environ 0,5 %. La baisse de la population de Lyc

T reg renforce la réponse immunitaire au niveau tumoral pour inhiber la croissance de la tumeur. [51]

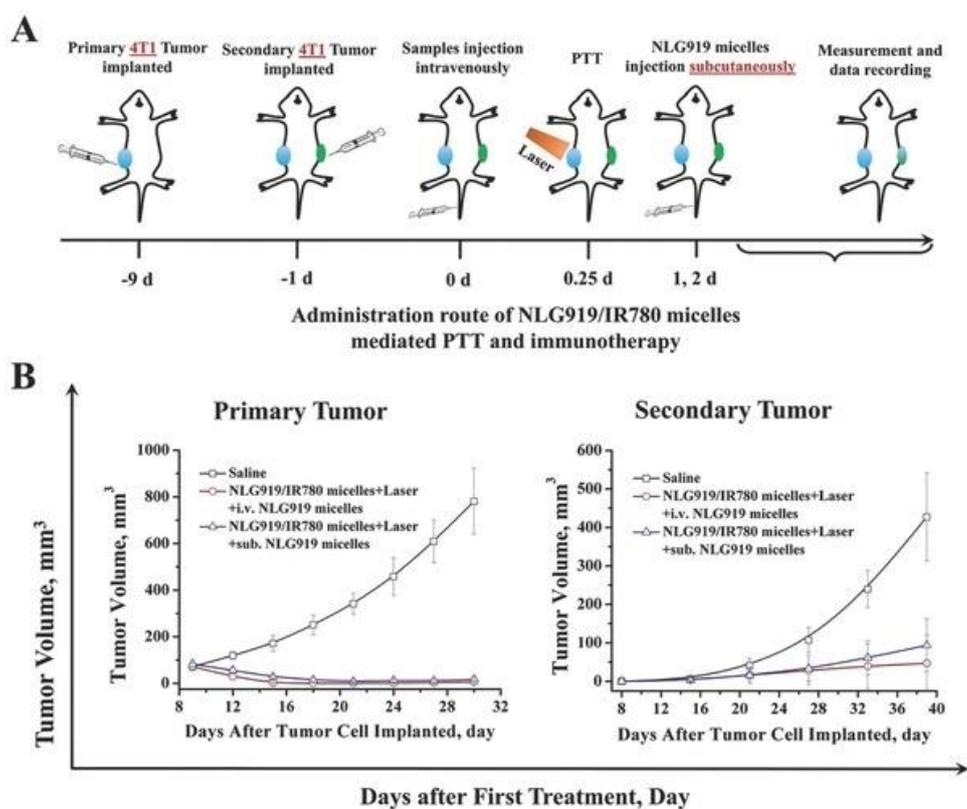


Figure 99 : (A) Protocole d'étude en fonction des différentes voies d'administration des micelles NLG919 après la PTT. (B) Variation du volume tumoral des tumeurs primaires et secondaires après traitement. [51]

Dans le modèle d'étude illustré par la Figure 99 A, après implantation de la tumeur secondaire distale, les souris ont reçu une injection de micelles NLG919/IR780. Après irradiation au laser à 808 nm pendant 5 min, une seconde injection de micelles NLG919 est réalisée en sous-cutanée ou en intraveineuse. La mesure du volume des tumeurs primaires et secondaires est effectuée pour évaluer le meilleur processus. Pour les tumeurs primaires, aucune différence n'est observée entre les deux groupes alors qu'une légère différence (peu significative) apparaît au niveau du volume tumoral des tumeurs secondaires (Figure 99 B). [51]

Les chercheurs ont ensuite effectué la même étude pour les tumeurs MCF-7. Les cellules MCF-7 sont des cellules tumorales humaines. Afin d'éviter un rejet, le thymus des souris doit être inactivé ce qui interfère avec l'action immunothérapeutique des micelles NLG919/IR780 sur les tumeurs secondaires. De plus amples études sont nécessaires afin de valider ou d'invalider l'avantage thérapeutique que propose cette NP.

#### Micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX :

Un autre type de traitement combinatoire a fait l'objet d'étude pour la thérapie du cancer du sein mais ici, il s'agit d'une thérapie chimio-photothermique exploitant le pouvoir cytotoxique de la doxorubicine.

Afin d'estimer les performances des micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX, l'effet photothermique *in vivo* a été mesuré par la variation de la température durant l'irradiation au laser à 808 nm chez des souris porteuses de tumeurs 4T1, 24 h après administration des NPs.

L'évolution du volume tumoral et le poids des tumeurs à la fin de l'expérience ont été étudiés. La morphologie des tumeurs pour tous les traitements : solution saline (témoin) ± laser, IR780+DOX libre ± laser, micelles mPEG-PAAV/DOX, micelles mPEG-PAAV/IR780 + laser, micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX ± laser a été analysée. L'efficacité thérapeutique *in vivo* mise en évidence par ces résultats est illustrée par la figure 100. [53]

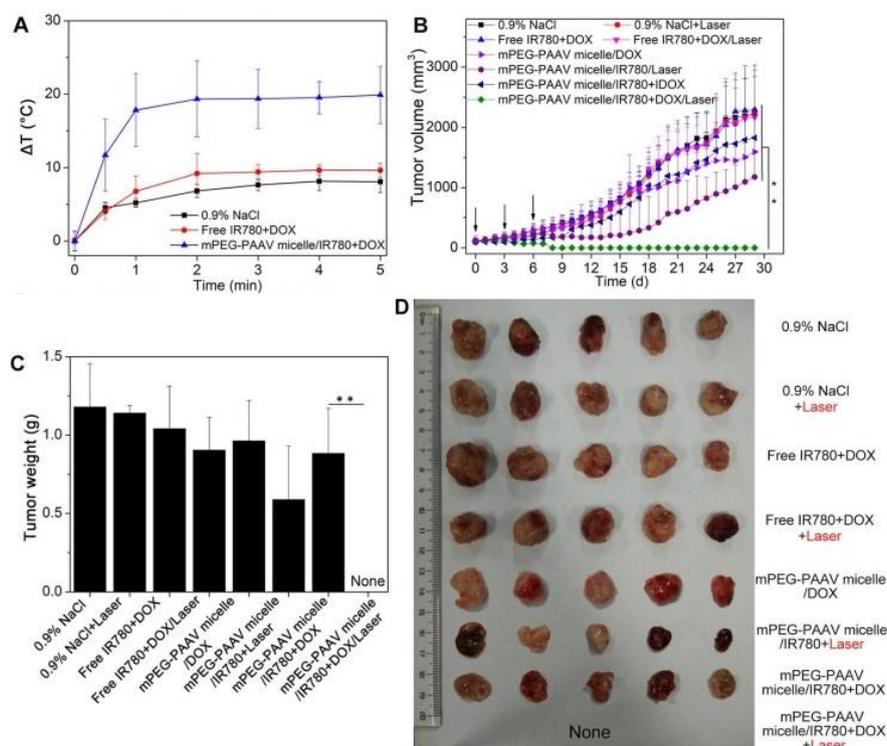


Figure 100 : (A) Variation de la température ( $\Delta T$ ) au cours de l'irradiation tumorale au laser à 808 nm chez des groupes de souris porteuses de tumeur 4T1 recevant solution saline, IR780+Dox libre et micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX (IR780 à 0,5 mg/kg et Dox à 0,65 mg/kg). (B) Variation du volume tumoral avec les différents groupes de traitements. (C) Poids et (D) Morphologie des tumeurs extraites à la fin de l'expérience. [53]

Lorsque le volume des tumeurs 4T1 atteint 100-150 mm<sup>3</sup>, les différentes formulations sont administrées aux souris à dose équivalente d'IR780 de 0,5 mg/kg et de Dox 0,65 mg/kg. Les injections ont lieu à J0, J3 et J6, les tumeurs sont irradiés 24 h post-injection dans le proche infra-rouge à 808 nm pendant 5 minutes.

La température tumorale des souris recevant l'administration intraveineuse de micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX augmente rapidement pour atteindre une variation de température de + 20°C, cette variation est nettement supérieure au  $\Delta T$  du groupe IR780 + Dox libre ( $\Delta T = + 9,6^\circ\text{C}$ ) et du groupe NaCl à 0,9 % ( $\Delta T = + 8,0^\circ\text{C}$ ). La température supérieure à 50°C entraîne une nécrose du tissu tumoral, et, lorsque la température intra-tumorale dépasse 45°C, la libération de la Dox s'accroît. Cette libération est également favorisée par l'environnement tumoral acide.

La différence entre le groupe témoin (solution saline irradié et non irradié) et le groupe traité par les micelles mPEG-PAAV/IR780 irradié traduit l'efficacité PTT que possède IR780 sous forme de micelles. Malgré la faible inhibition de la croissance tumorale des groupes traités par les micelles contenant la Dox et les micelles contenant Dox+IR780 non irradié, on suppose que la doxorubicine est efficacement séquestrée par les micelles. Mais ces résultats montrent nettement que, lors de ces traitements, l'effet chimiothérapeutique ou l'effet photothermique ne sont pas suffisants. Le groupe de souris où le volume tumoral a le plus

régressé jusqu'à disparaître est le groupe traité par les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX irradiées. De plus, aucune réapparition des tumeurs 4T1 n'est observée jusqu'à la fin de la période expérimentale de 29 jours. A la fin de l'expérience, toutes les tumeurs de chaque groupe de souris ont été prélevées pour être pesées et photographiées (Figure 100C et D). L'analyse montre que la NP micellaire combinant la Dox et IR780 possède un pouvoir chimio-photothérmiq ue suffisant pour éliminer complètement des tumeurs mammaires murines.

Les métastases pulmonaires sont très fréquentes chez les patientes atteintes d'un cancer du sein de stade avancé. Pour cette raison, lors de l'étude précédente, le nombre de nodules métastatiques au niveau des poumons chez les souris porteuses de tumeur 4T1 a été mesuré. Les groupes traités par solution saline irradié et non irradié montrent environ 12 nodules pulmonaires. Le groupe traité par les micelles non irradiées ne présentent que 6 nodules. Le groupe traité par les micelles mPEG-PAAV/IR780+DOX avec irradiation tumorale ne présente, en plus de la destruction totale de la tumeur, aucun nodule pulmonaire donc une absence de métastases pulmonaires. <sup>[53]</sup>

### *Micelle IPM :*

Comme le montre la Figure 47D sur le mécanisme de résistance à la doxorubicine des cellules cancéreuses du sein, des micelles contenant la doxorubicine et IR780 sont étudiées par Li Z. et *al.* pour contourner la résistance impliquant les glycoprotéines P.

Pour tester l'efficacité de la NP expérimentale IPM contre les cancers du sein résistants, les chercheurs inoculent des cellules cancéreuses mammaires humaines résistantes à la doxorubicine (MCF-7/ADR) à des souris. Lorsque les tumeurs ont atteint un certain volume, les souris sont séparées en plusieurs groupes pour recevoir différents traitements : PBS, Dox libre (0,34 mg/mL), PM (0,34 mg/mL de Dox), IM ou micelles PBMA-*b*-PMPC chargées d'IR780 (0,14 mg/mL d'IR780) et IPM (0,14 mg/mL d'IR780 et 0,34 mg/mL de Dox). 24 h après administration, les tumeurs sont irradiées au laser à 808 nm pendant 5 minutes et les traitements sont répétés 2 fois par intervalle de 2 jours. <sup>[54]</sup>

Dans les groupes traités par PBS (irradiés et non irradiés), les tumeurs se développent sans contrainte (Figure 101). Le groupe traité par Dox libre (MP) présente une inhibition de la croissance des tumeurs non significative confirmant la résistance de ce type de tumeur à la doxorubicine. Pour les souris traitées par IM subissant une irradiation tumorale, la cytotoxicité photothérmiq ue est clairement démontrée puisqu'une diminution significative du volume tumoral est observée. Toutefois, le volume des tumeurs réaugmente juste après le dernier traitement, pour atteindre à J26 un volume final 4,6 fois supérieur au volume initial. Dans le groupe traité par IPM irradié, la croissance des tumeurs est inhibée grâce à la combinaison des agents chimiothérapeutiques et photothérmiq ues. En effet, au bout de 26 jours, le groupe traité par IPM montre des tumeurs de taille réduite comparées à celles des autres groupes (Figure 101). Cette combinaison d'agents entraînant un puissant effet thérapeutique peut s'expliquer par la forte accumulation d'IPM et par la libération contrôlée de Dox et d'IR780 au site tumoral. <sup>[54]</sup>

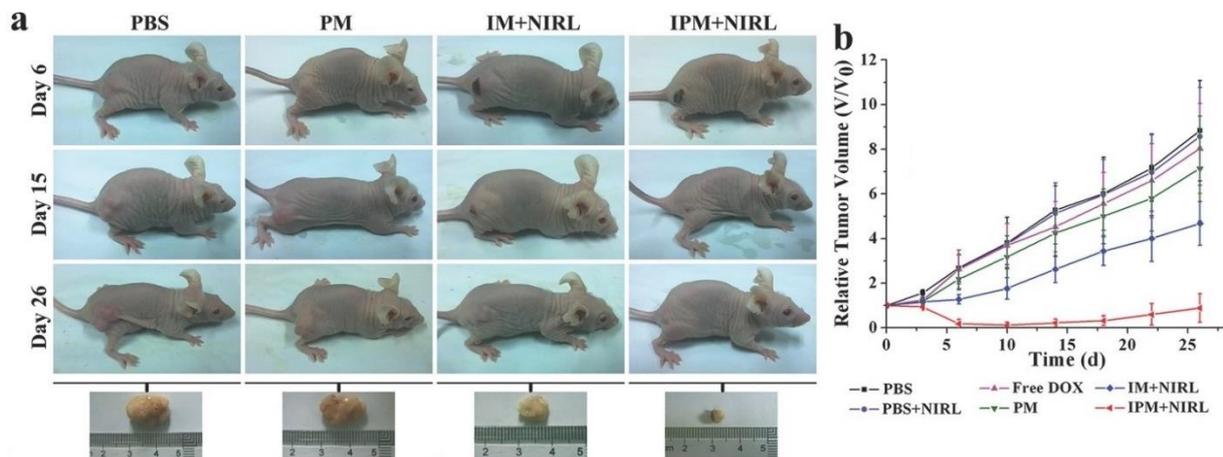


Figure 101 : (a) Images représentatives des souris porteuses de tumeur MCF-7/ADR et des tumeurs excisées 26 jours après traitements. (b) Courbe de croissance tumorale après traitement ( $V$  = volume mesuré au jour  $d$  et  $V_0$  = volume initial).<sup>[54]</sup>

Les micelles non lipidiques présentent une grande efficacité en thérapie contre le cancer, que ce soit par leur action photothermique, ou par la combinaison avec un agent cytotoxique. Elles entraînent une action chimio-photothermique qui va permettre une suppression totale des tumeurs, ou qui va contrer la résistance tumorale face aux agents cytotoxiques. Malgré tout, un profil sécurisant par rapport à l'utilisation de ces produits doit être établi en vue d'un potentiel essai clinique.

## **D- Toxicité**

Seules les études réalisées à partir des NPs : PEG-IR780-C13 [48, 49], mPEG-PAAV/IR780+Dox [53] et IPM [54] ont fait l'objet de test *in vivo* de toxicité par la mesure de marqueurs biologiques et/ou par le prélèvement de différents tissus.

Dans le cadre de l'utilisation des micelles PEG-IR780-C13 des dosages de différents marqueurs des fonctions tissulaires sont réalisés :

- pour la fonction rénale : dosage de BUN, de créatinine urinaire (Cr), d'acide urique (URIC), d'urée sérique (UREA),
- pour la fonction hépatique : mesure des enzymes hépatiques (ALT, AST, GGT), ou des autres fonctions avec l'adénosine désaminase (ADA), la bilirubine totale, le rapport albumine/globine (A/G), le lactate déshydrogénase (LDH).

Une analyse histologique est également pratiquée. Des tissus provenant de différents organes sont prélevés et colorés tels que des tissus rénaux, hépatiques, cardiaques ou pulmonaires.

Dans le traitement de tumeur rénale par les micelles, histologiquement des dommages sont montrés dans la zone péri-tumorale, avec une nécrose coagulante dans le tissu rénal. En dehors de cette zone, à proximité de la tumeur, la structure du tissu rénal est intacte.

Dans le traitement de cancer colorectal, aucune lésion tissulaire notable n'est observée au niveau des reins ou des autres organes, et cela même quand la dose administrée est doublée.

De plus, les dosages des différents marqueurs dans le cadre du cancer du rein n'ont montré aucun dysfonctionnement, témoignant ainsi d'une activité normale malgré la nécrose coagulante.

Quant aux autres marqueurs (hépatiques, rénaux et hématologique), ils ne présentent pas de grande différence avec le groupe témoin dans le cadre du cancer colorectal témoignant d'un fonctionnement normal des différents organes.

Ces résultats démontrent que la NP PEG-IR780-C13 ne présente pas de grande toxicité pour les tissus sains et n'interfère pas avec le fonctionnement physiologique des organes. [48, 49]

Avec les micelles contenant la Dox et l'IR780, la mesure du poids des souris traitées dans les différentes expériences ne présente aucune diminution significative, ce qui suggère que les micelles sont bien tolérées. Une coupe histologique de différents organes (notamment le cœur) avec coloration ainsi que des dosages de marqueurs rénaux, hépatiques et sanguins sont effectués pour évaluer la toxicité. Seules les souris traitées par la micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX sont concernées par ces explorations. Au niveau histologique aucun changement n'a lieu entre le groupe témoin et le groupe traité. Concernant le dosage des marqueurs sériques, aucun dysfonctionnement tissulaire notable n'est suggéré chez les souris traitées. [53, 54]

## **E- Résumé**

Les micelles non lipidiques ont permis non seulement, de contrer les inconvénients liés à IR780, mais aussi, via une meilleure absorption tumorale, de permettre une meilleure imagerie *in vivo*. Ceci permet un diagnostic en oncologie et un bon suivi de l'efficacité des traitements anti-tumoraux. L'imagerie est nettement améliorée par rapport au système d'imagerie conventionnelle via l'imagerie photoacoustique dans certain cas, l'imagerie NIRF ou encore par le IVIS.

De plus, les micelles non lipidiques peuvent permettre d'avoir une meilleure efficacité sur le traitement des tumeurs tout en étant moins toxique.

Le système de micelles permet une libération contrôlée de la doxorubicine, produit de chimiothérapie très toxique. En effet, grâce à leur sensibilité au pH et à l'irradiation au laser à 808 nm, permettant une augmentation de la température, la libération de doxorubicine combinée à IR780 est ciblée.

De plus ces NPs ont la capacité de passer facilement les barrières biologiques via l'effet EPR provoqué par les différents cancers.

Des études cliniques restent toutefois nécessaires pour confirmer la sécurité d'emploi et l'efficacité de ces traitements innovants.

# III] Nanoparticules vectorisant le gadolinium

## 1) Généralités sur le gadolinium et son utilisation

Le gadolinium a été découvert au XVIII<sup>ème</sup> siècle par J. Gadolin. C'est un métal qui appartient à la famille des lanthanides. Son numéro atomique est 64 et sa masse molaire est de 157,25 g/mol. Son ion trivalent  $Gd^{3+}$  est utilisé pour son important effet paramagnétique (10,8 magnétons de Bohr) <sup>[56]</sup> s'expliquant par la présence de 7 électrons non appariés et pour sa relaxation électronique lente <sup>[57]</sup>. Ces propriétés lui permettent d'être utilisé comme agent de contraste en IRM. Le rayon ionique de l'ion gadolinium ( $Gd^{3+}$ ) est de 1,02 Å, très proche de celui du calcium, ce qui le met en compétition avec les systèmes biologiques calcium dépendants.

Sous forme ionique libre, il est toxique car il interfère avec les systèmes biologiques et enzymatiques calciums dépendants engendrant de ce fait le blocage du RES, la contractilité myocardique et la coagulation. C'est donc sous forme chélatée que l'ion  $Gd^{3+}$  est utilisé comme agent de contraste.

Actuellement de nombreux agents de contraste à base de gadolinium sont délivrés en officine, (Figure 102) notamment :

- Magnevist<sup>®</sup> ou gadopentétate de diméglumine,  $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$
- Omniscan<sup>®</sup> ou gadodiamide,  $[Gd(DTPA-BMA)(H_2O)]$
- Dotarem<sup>®</sup> ou gadotérate de méglumine,  $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$
- Gadovist<sup>®</sup> ou gadobutrol,  $[Gd(BT-DO3A)(H_2O)]$
- Prohance<sup>®</sup> ou gadotéridol,  $[Gd(HP-DO3A)(H_2O)]$ .

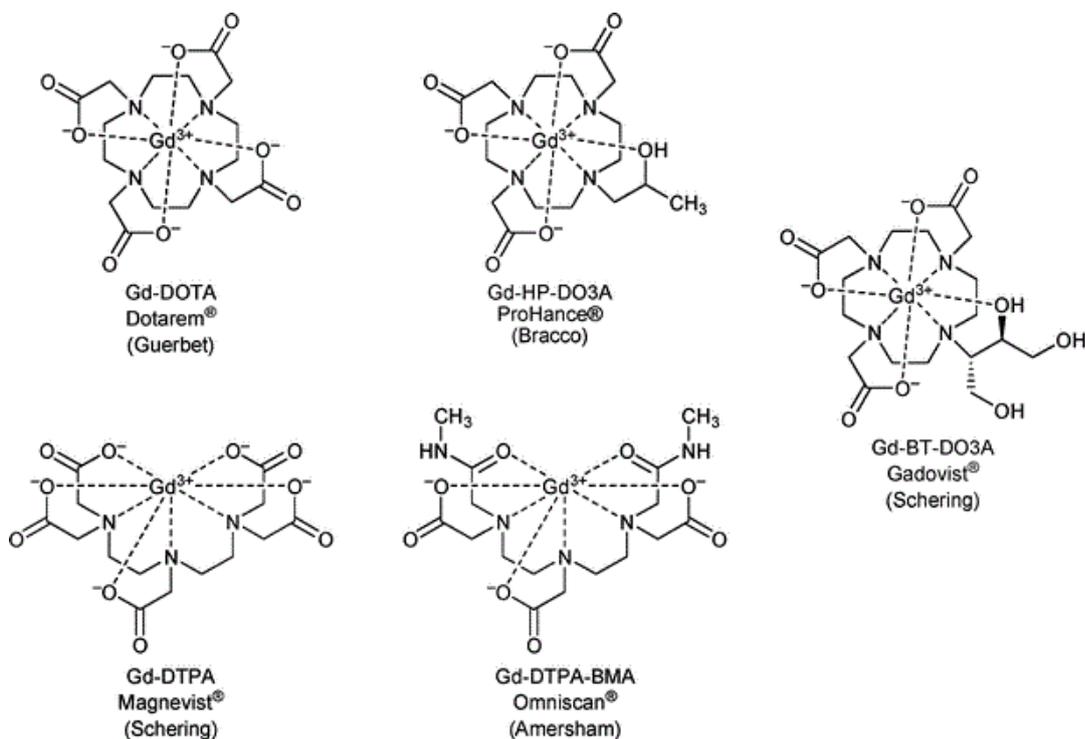


Figure 102 : Agents de contraste chélatés de gadolinium.

Les chélateurs du cation  $Gd^{3+}$  sont linéaires (Omniscan® et Magnevist®) ou cycliques (Dotarem®, ProHance® et Gadovist®), ils permettent l'obtention de chélates biologiquement stables et de pallier ainsi à la toxicité de l'ion gadolinium non complexé.

Les agents de contrastes à base de  $Gd^{3+}$  (GBCA) sont, lorsqu'ils sont utilisés à des doses correctes, bien tolérés et présentent un bon profil d'innocuité pour plus de 97 % des patients. Le taux global d'effets indésirables se situe entre 0,07 % et 2,4 % avec notamment des réactions de type allergiques. Malgré tout certains événements indésirables rares liés à l'exposition aux GBCA sont graves comme par exemple : des fibroses systémiques néphrogénique (FSN) ou encore la maladie du dépôt de gadolinium (GDD).<sup>[58]</sup> La FSN apparaît chez les patients ayant une insuffisance rénale (IR). C'est une maladie pouvant être mortelle, se traduisant par une fibrose progressive qui se généralise à tout le tissu rénal. Le lien entre les deux est clairement établi alors que le mécanisme exact ne l'est pas. L'utilisation des GBCA est donc contre-indiquée chez les patients insuffisants rénaux. La GDD touche les patients à fonction rénale normale présentant un stockage de gadolinium dans les tissus entraînant des conséquences symptomatologiques graves. Le processus de stockage du gadolinium n'est à ce jour pas encore élucidé. Malgré tout on sait que son élimination se fait par voie urinaire et donc que le stockage n'a pas lieu au niveau rénal. Cette maladie se traduit par une réponse immunologique aiguë probablement due à une décomplexation du gadolinium. Les chercheurs supposent que les patients présentant une GDD ont une anomalie génétique interférant dans la métabolisation des métaux lourds ce qui explique également la variation de la gravité des symptômes entre les différents patients. Les symptômes peuvent survenir quelques heures à quelques jours après l'administration de GBCA. Aucun diagnostic à l'heure actuelle n'est suffisamment fiable pour détecter la maladie. Le traitement consiste en une rechélation du gadolinium combiné à une modulation du système immunitaire. En général, le chélateur utilisé est le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) qui possède une très forte affinité avec le Gd. Le DTPA permet de piéger  $Gd^{3+}$  suffisamment longtemps pour qu'il soit éliminé par voie urinaire.<sup>[58]</sup>

Les GBCA sont très souvent utilisés pour les IRM du crâne et du rachis mais aussi pour d'autres types de lésions tissulaires du corps humain. Ils contribuent grandement au diagnostic des cancers cérébraux mais aussi osseux. Les nanoparticules permettent non seulement de conférer une sécurité d'utilisation du Gd, mais également d'effectuer des thérapies ciblées grâce à un diagnostic précis. Ce sont bien souvent des NPs multimodales qui sont utilisées, suffisamment petites pour traverser la BHE. Les NPs vectorisant le Gd se différencient en deux groupes : les NPs couplées à un chélate de Gd et les NPs possédant un noyau de Gd ou dopées au Gd à leur surface. Dans la plupart des cas le traitement des cancers se fait par radiothérapie à la suite du diagnostic grâce à l'effet radiosensibilisant du gadolinium.<sup>[57]</sup>

## 2) GBN : AGuIX® et ses dérivés

Une start-up française NHTherAguix fondée par Géraldine Le Duc et le Professeur Olivier Tillement a mis au point de petites nanoparticules à base de gadolinium pour l'imagerie par IRM et pour la radiosensibilisation nommées AGuIX® (Activation Guided by Irradiation by X-rays).<sup>[59]</sup>

### A- Caractéristiques et présentation

#### *Gd/DTPA/NP :*

La première NP à base de gadolinium (ou GBN) développée par l'équipe du professeur Tillement est composée d'un cœur en oxyde de gadolinium entouré d'une coque de polysiloxane réduite (afin de diminuer la taille de la NP finale). A ceci s'ajoute des dérivés de DTPA greffés sur le polysiloxane afin de chélater au maximum les ions  $Gd^{3+}$  échappés du cœur à cause de la réduction du polysiloxane. Le DTPA est déjà utilisé comme agent de contraste associé au Gd (Magnevist®), de plus, il octroie aux NPs une bonne stabilité à pH physiologique malgré un potentiel zêta proche de 0. Cette GBN est développée non seulement pour son potentiel en imagerie, mais elle est aussi évaluée en radiothérapie par microfaisceaux (MRT) dans le traitement du gliosarcome de 9L (9LGS).<sup>[60]</sup>

#### *AGuIX® :*

Un second type de GBN, similaire au précédent, a été développé. Cette fois ci les molécules greffées à la coque de polysiloxane sont dérivées du DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraaccétique) : le DOTAGA (GA= acide glutamique). Le DOTA a été sélectionné afin d'empêcher la libération de Gd qui une fois libre est toxique. Aucun cas de FSN n'a encore été recensé lorsque le Gd est chélaté par les dérivés de DOTA. Le DOTAGA est intéressant car il présente plus de sites carboxyliques que le DOTA pour complexer les cations toxiques après le greffage sur la coque de polysiloxane<sup>[61]</sup> Le procédé de synthèse (Figure 103) est le suivant :

- a) Synthèse du cœur d'oxyde de Gd :  $Gd_2O_3$ .
- b) Synthèse de la coque de polysiloxane par hydrolyse-condensation d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS). Après cette étape, la NP formée a un diamètre d'environ 4,5 nm. Le rapport choisi est de 2 Si / 1 Gd afin de réduire l'épaisseur de la coque.
- (c) Greffage du DOTAGA à la coque par couplage peptidique avec la fonction amine résiduelle de APTES. La stabilité colloïdale de la NP synthétisée est assurée par la valeur de -17 mV du potentiel zêta correspondant à une répulsion électrostatique des NPs entre elles dans la solution. Plus le ratio DOTAGA / Gd est grand, plus les nanoparticules sont petites. Lorsque ce ratio est égal à 3 / 4, les NPs formées mesurent 8 nm, lorsque le ratio est de 6 / 4, la taille des NPs est d'environ 3,5 nm. A ce stade, toutes les étapes ont été réalisées dans du diéthylène glycol.
- (d) Transfert des NPs en solution aqueuse.
- (e) La coque de polysiloxane étant très fine, l'échappée des ions  $Gd^{3+}$  est possible. Le cœur  $Gd_2O_3$  va progressivement se dissoudre. L'équilibre est déplacé dans le sens de la

dissolution du cœur  $Gd_2O_3$  car les ions libérés sont chélatés par les ligands DOTAGA à la surface de la coque de polysiloxane.

(f) L'étape précédente entraîne la dislocation de la NP en plus petites particules. Au final, la composition est de 1 Gd pour 1,5 DOTAGA, 2,3 APTES et 1,5 TEOS. [61] Ces nouvelles NPs ont un diamètre d'environ  $3 \pm 0,1$  nm pour une masse de  $8,5 \pm 1$  kDa.

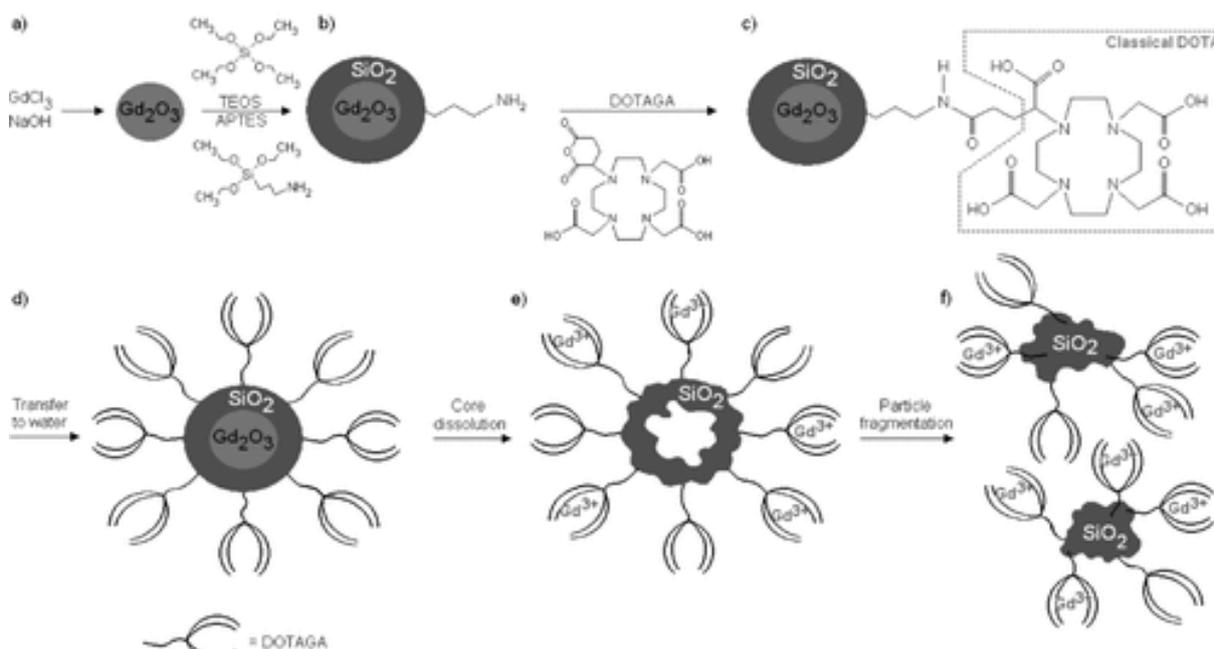


Figure 103 : schéma de synthèse des NPs AGuIX®. [61]

La structure chimique tridimensionnelle de AGuIX® est représentée figure 104. [62]

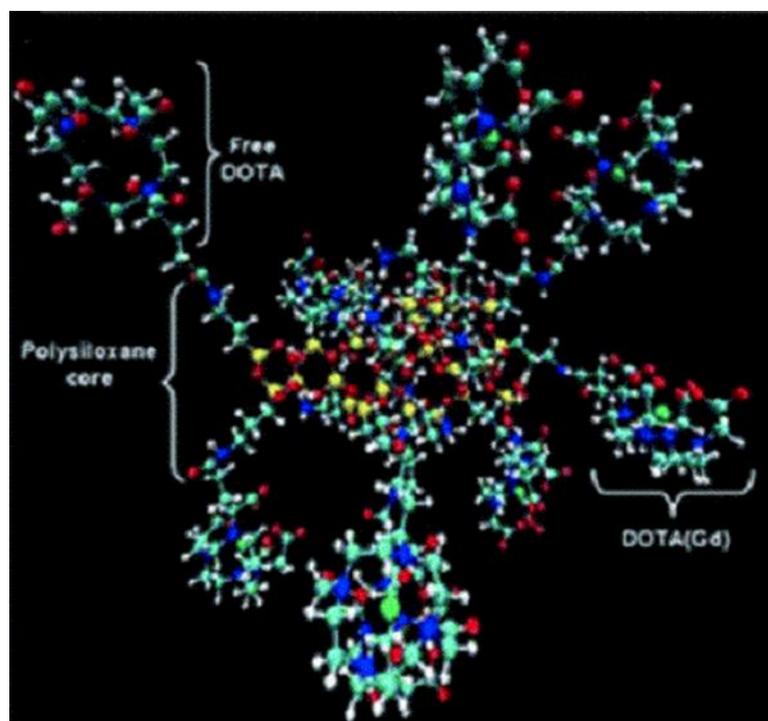


Figure 104 : Structure chimique 3D de AGuIX® (Si en jaune, O en rouge, C en bleu clair, N en bleu, Gd en vert, H en blanc). [62]

*SiBiGdNP :*

D'autres chercheurs, en collaboration avec des membres de l'équipe de NHTherAguix, se sont inspirés de AGuIX® pour faire des NPs incorporant du bismuth (Bi) en plus du Gd. Ces NPs sont nommées SiBiGdNP. Le même procédé que pour AGuIX® a été utilisé pour la synthèse. L'avantage du Bi c'est sa biocompatibilité et sa faible toxicité. Si le Gd est indispensable en imagerie par résonance magnétique car il amplifie la dose de rayonnement, le Bi a un numéro atomique ( $Z = 83$ ) plus élevé que le Gd ( $Z = 64$ ) et donc plus de chance de générer des interactions photoélectriques. L'utilisation du Bi est intéressante pour l'élaboration de nouvelles NPs notamment pour ses propriétés de contraste et comme sensibilisant aux radiations par tomographie par densité (CT). [63]

Pour synthétiser cette nouvelle NP thérapeutique, une fois que l'étape de dislocation est achevée, des ligands DOTA-NHS sont greffés à leur tour à la surface du réseau de polysiloxane. Dans un deuxième temps, ces ligands servent à complexer les ions  $\text{Bi}^{3+}$  pour former SiBiGdNP (Figure 105). Le diamètre hydrodynamique d'une particule de SiBiGdNP est de  $4,5 \pm 0,9$  nm, elle possède un potentiel zêta de  $-3,6$  mV à  $\text{pH} = 7$ . Le rapport de complexation  $\text{Gd}^{3+} / \text{Bi}^{3+}$  est en moyenne de  $10 / 5$  pour une particule. [63]

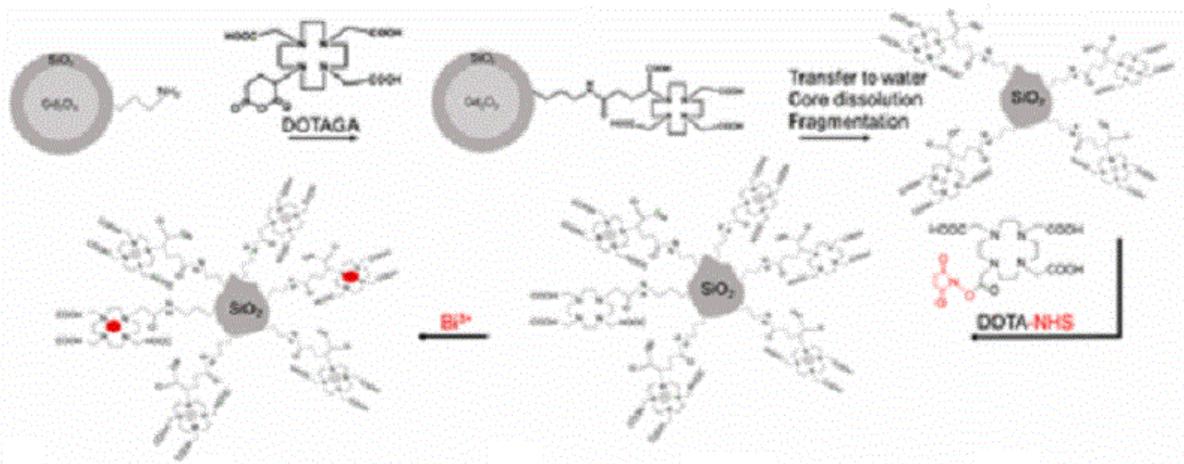


Figure 105 : Schéma de synthèse de SiBiGdNP [63]

Contrairement aux NPs AGuIX®, cette NP n'a pas été utilisée en imagerie ou pour la thérapie des gliomes. Elle a été développée comme agent thérapeutique face à une xénogreffe ectopique de tumeur solide de l'adénocarcinome du poumon A549.

## B- Imagerie

Les GBNs ont une taille inférieure à 10 nm leur permettant de franchir la BHE. L'accumulation des GBNs dans la tumeur peut s'effectuer de façon totalement passive grâce à l'effet EPR dû à la présence de vaisseaux tumoraux. Les GBNs ont donc la capacité de cibler les tumeurs cérébrales, notamment les gliomes qui représentent 70% des tumeurs cérébrales. Les GBNs sont notamment étudiées dans le cadre des gliosarcomes caractérisés par la lignée cellulaire 9LGS. Comme vu précédemment, les gliomes sont particulièrement virulents et le taux de survie après 1 an est relativement faible notamment pour les glioblastomes. Les GBNs pourraient permettre un diagnostic précoce plus précis associé *a posteriori* à une radiothérapie efficace. [60]

Pour illustrer la capacité des GBNs comme agent de contraste, nous présentons ci-après les résultats d'IRM sur des rats porteurs de tumeurs orthotopiques 9LGS obtenus après injection de trois agents de contraste différents. Nous comparons deux GBNs, i.e. Gd/DTPA/NP et AGuIX®, avec Gd-DOTA (Dotarem®), un agent de contraste utilisé actuellement en clinique.

La tumeur est clairement visible à l'IRM dès 5 minutes (1 min pour AGuIX®) après l'injection des GBNs (Figure 106 et 107). [59] Le contraste positif observé dans l'hémisphère droit est associé à une délimitation nette de la tumeur. Dans le cas de AGuIX®, même 1 jour après injection, un faible signal IRM demeure encore et permet de visualiser approximativement la tumeur [59] mais la délimitation tumorale reste clairement distincte jusqu'à approximativement 45 min après injection. Le temps optimal semble se situer aux alentours de 15 min après injection.

Les images présentées par la figure 107 permettent d'apprécier la pénétration progressive de la tumeur par la GBN. Sur les premières images (images 107B et C), seule la zone externe de la tumeur est visible ; à partir de 15 min (image 107D), le centre est également contrasté.

Avec le Dotarem® et pour des teneurs identiques en Gd, le contraste est moins net et la visualisation de la tumeur plus difficile. De plus, 1 h après l'injection, plus aucun contraste n'est visible (Figure 108). Cet agent de contraste a une clairance rénale rapide et présente une mauvaise séquestration par le tissu tumoral, contrairement aux GBNs qui peuvent rester présentes dans la tumeur jusqu'à 24 h post injection. [64]

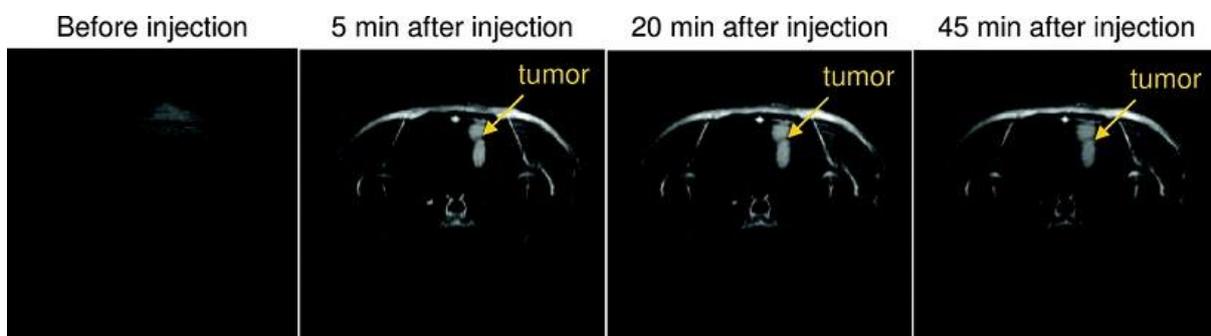


Figure 106 : Image pondérée en T1 du cerveau d'un rat porteur de tumeur 9LGS, avant, 5, 20 et 45 minutes après injection i.v. de la GBN Gd/DTPA/NP (56  $\mu\text{mol}$  de Gd :  $[\text{Gd}^{3+}] = 40\text{mM}$ ,  $V = 1,4 \text{ mL}$ ). [59]

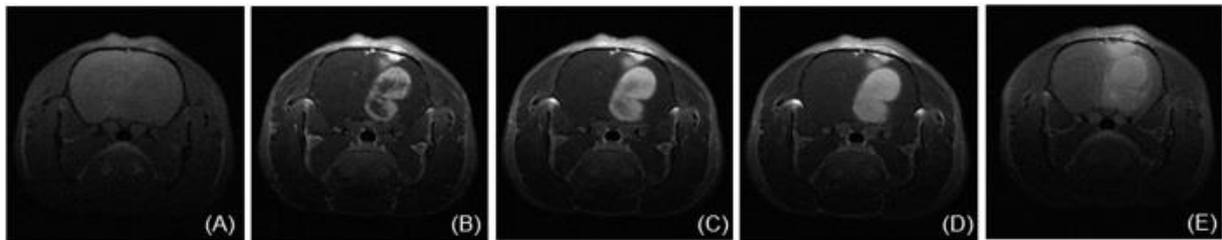


Figure 107 : image IRM en T1 du cerveau d'un rat porteur de tumeur 9LGS, (A) avant, (B) 1 min, (C) 10 min, (D) 15 min et (E) 1 h après injection de la GBN AGuIX® (56  $\mu\text{mol}$  de Gd) <sup>[59]</sup>

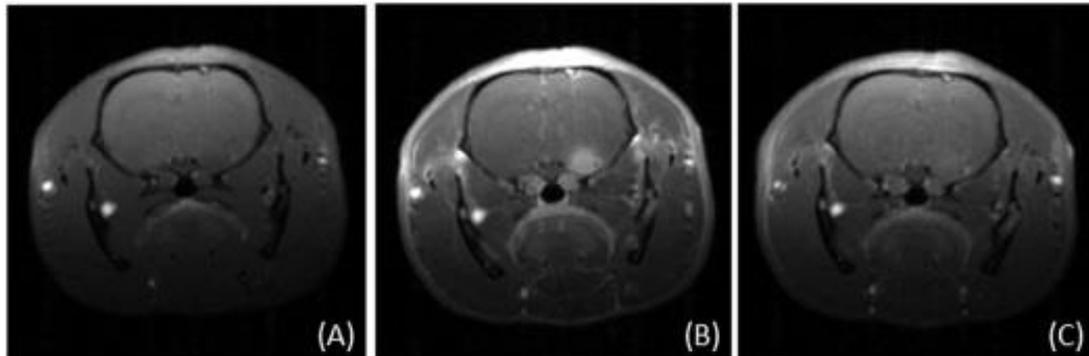


Figure 108 : Image IRM en T1 du cerveau d'un rat porteur de tumeur 9LGS, (A) avant, (B) 20 min et (C) 1 h après injection i.v. de Dotarem® (à 56  $\mu\text{mol}$  de Gd) <sup>[64]</sup>

La mesure de l'intensité du signal IRM au cours du temps permet également de mettre en exergue les performances des GBNs (Figure 109). Ces NPs s'accumulent dans la tumeur (carrés noirs) jusqu'à atteindre un maximum aux alentours de 15 min post-injection, puis reste à peu près constante jusqu'à 30 min post-injection, avant de diminuer lentement. Ceci témoigne d'une pénétration et d'une rétention accrue des NPs dans la tumeur. Il est à noter la grande différence d'accumulation entre le tissu tumoral et le tissu sain. <sup>[60]</sup> Dans le tissu non tumoral, l'intensité augmente très légèrement jusqu'à 5 minutes puis diminue.

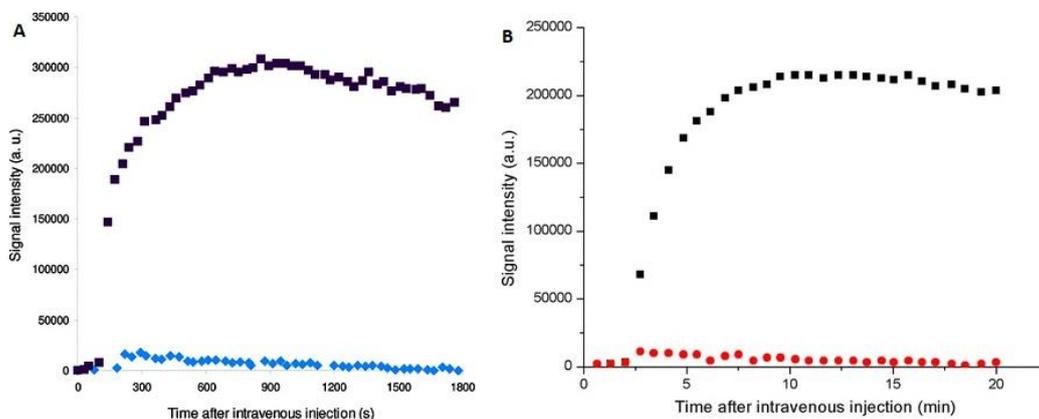


Figure 109 : Evolution au cours du temps du signal IRM dans la tumeur (carrés noirs) et dans du tissu normal (carrés bleus ou rouges) après injection de : (A) GBN Gd/DTPA/NP ; (B) GBN AGuIX®.

La qualité d'un agent de contraste se mesure également par la valeur de la relaxivité longitudinale. Pour AGuIX® la relaxivité longitudinale est de  $6,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette relaxivité est à peu près deux fois supérieure à celle du Dotarem® qui est de  $3,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , mais elle est également supérieure à celle de tous les autres agents de contraste commerciaux (Magnevist® ( $3,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), Omniscan® ( $3,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et Prohance® ( $3,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )). Ces résultats soulignent le potentiel clinique de l'utilisation des GBNs dans le diagnostic des tumeurs cérébrales. <sup>[65]</sup>

## C- Thérapie

Actuellement, les tumeurs cérébrales sont le plus souvent traitées par radiothérapie. Celle-ci entraîne de nombreux effets indésirables car elle touche les tissus environnants sains du fait d'un manque de précision et de sélectivité. Grâce à la précision et la franche délimitation qu'apportent les GBNs, la radiothérapie par microfaisceau (MRT) peut être utilisée pour épargner les tissus sains. [60]

La MRT permet de traiter les tumeurs cérébrales en utilisant des rayons X pour faire de la radiochirurgie. Les microfaisceaux résultent du fractionnement d'un faisceau incident de rayon X à travers un collimateur. Ils permettent d'induire une radiation assez énergétique ne faisant que quelques dizaines de micromètres de largeur (Figure 110). Cette faible taille permet une radiothérapie bien plus précise, et limite ainsi les dégâts au niveau des tissus environnants. Des études ont montré que l'utilisation de MRT permettait d'augmenter la survie médiane de souris porteuses de tumeurs 9LGS. [66]

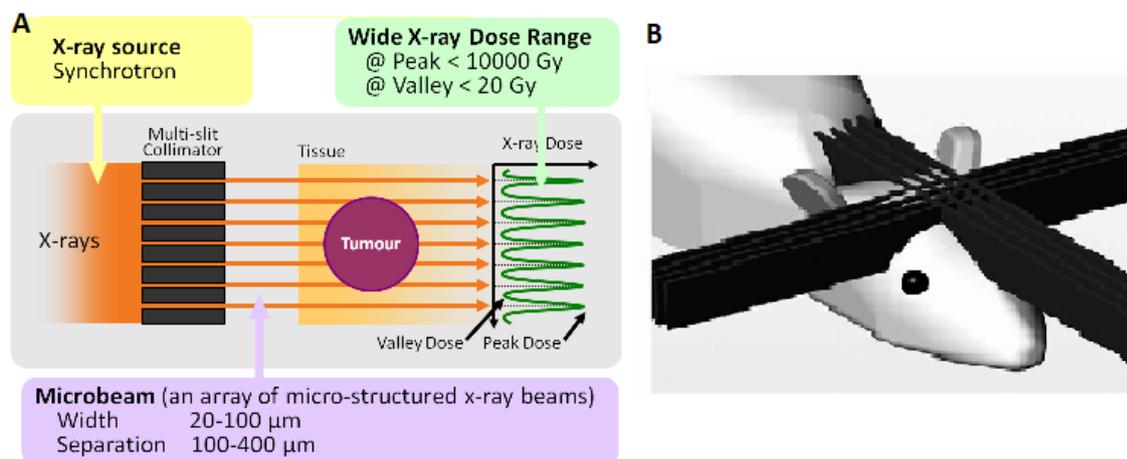


Figure 110 : A : Principe d'obtention de MRT. B : Irradiation MRT de rats porteurs de tumeur 9LGS

### Gd/DTPA/NP :

Pour évaluer les GBNs à base de DTPA, les chercheurs ont utilisé pour la MRT un faisceau biomédical ID17 synchrotron qui génère des microfaisceaux de 50  $\mu\text{m}$  de largeur et espacés de 211  $\mu\text{m}$ . Le champ d'irradiation des microfaisceaux est centré sur le gliosarcome L9 des rats (visualisé par IRM). Ce champ d'irradiation fait 10,5 mm de hauteur et 8 mm de largeur. La durée de la procédure est approximativement de 2 min, durée pendant laquelle les rats porteurs de tumeur 9LGS ont reçu tout d'abord une irradiation latérale puis une seconde irradiation à 90° de la première (Figure 110). Les doses d'irradiation sont de 400 Gy au niveau des pics et de 20 Gy au niveau des creux.

Afin d'évaluer l'efficacité en thérapie que peuvent apporter les GBNs, les chercheurs ont mesuré le temps de survie médian. [60] Pour cela, ils ont séparé les rats porteurs de tumeur 9LGS en 4 groupes :

- le groupe 1 témoin (4 rats) ne recevant aucun traitement.
- le groupe 2 traité par MRT uniquement (7 rats)
- le groupe 3 traité par MRT 5 min après injection de GBN (8 rats)
- le groupe 4 traité par MRT 20 min après injection de GBN (8 rats)

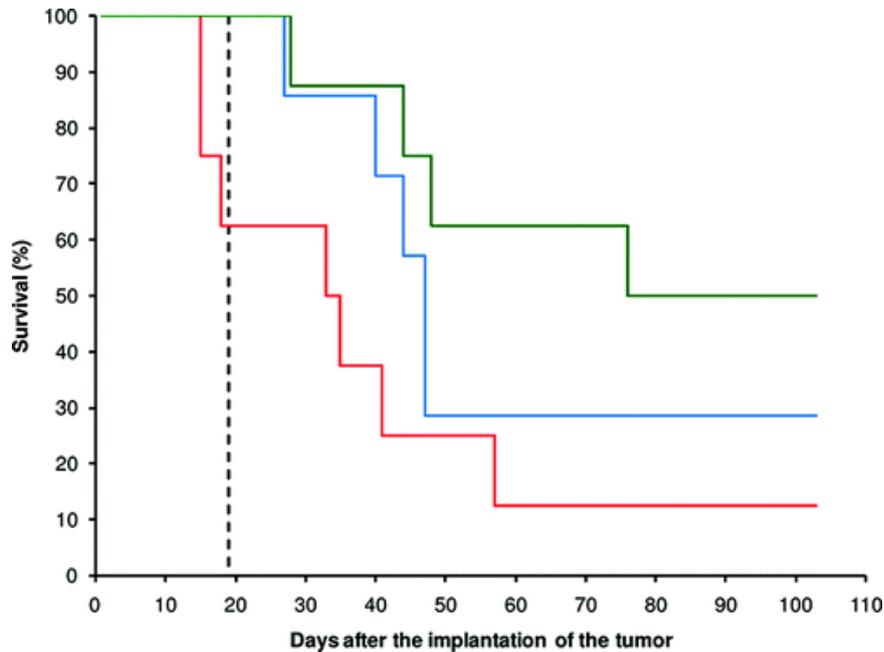


Figure 111 : courbe de survie des rats porteurs de tumeur 9LGS. Groupe 1 en pointillé noir, groupe 2 en bleu, groupe 3 en rouge et groupe 4 en vert. <sup>[60]</sup>

Les rats ayant seulement été traités par MRT (groupe 2) présentent un temps de survie médian 2,47 fois supérieur aux rats du groupe témoin (groupe 1) : il est de 47 jours après implantation des tumeurs pour le groupe 2 alors qu'il est seulement de 19 jours pour le groupe 1. Pour le groupe traité par MRT 5 min après injection des GBNs (groupe 3), le temps de survie médian, de 34 jours, est également supérieur à celui du groupe témoin 1, mais inférieur à celui du groupe 2. Par contre le temps de survie du dernier groupe est largement plus important que celui des autres groupes : 100 jours après l'implantation des tumeurs, 4 rats sur 8 ont survécu ce qui correspond à une augmentation de la durée de vie de 373 %.

La différence entre les temps de survie lorsque la MRT est effectuée 5 min et 20 min après injection des GBNs est probablement liée à la différence de distribution des GBNs dans le cerveau. 20 min après injection, la quantité de GBN dans les tissus sains de l'hémisphère cérébral lésé est moins importante que 5 minutes après injection. En déduction, la différence d'efficacité ne résulte pas de la teneur en GBN dans la tumeur mais plutôt de la teneur en GBN dans le tissu sain. En effet, elle est moins importante 20 min après injection et donc, le tissu sain est moins altéré par la MRT ce qui peut expliquer un temps de survie plus important. <sup>[60]</sup>

### AGuIX® :

Une étude similaire de radiothérapie par microfaisceau a été menée avec AGuIX®. La comparaison a été faite avec Dotarem®.

AGuIX® a déjà affichée son efficacité comme radiosensibilisant dans de nombreux types de modèles tumoraux *in vivo* avec une efficacité de la radiothérapie nettement améliorée dans des modèles précliniques de métastases cérébrales, mélanomes, cancers hépatiques, pancréatiques, pulmonaires, ou cancers de la tête et du cou. <sup>[66]</sup> Dans ces études précliniques, AGuIX® est administré par voie intraveineuse. Des études ont montré qu'il est également efficace lorsqu'il est injecté par voie intra tumorale. Toutefois, en clinique une administration intra tumorale comporte des risques et n'est pas toujours envisageable lorsqu'il s'agit de traiter des tumeurs profondes ou des métastases disséminées, c'est

pourquoi la voie i.v. a été retenue pour cette étude sur l'utilisation de AGuiX® comme produit théranostique. [68]

Le protocole expérimental est le même que celui exposé précédemment pour Gd/DTPA/NP. Des souris porteuses de tumeur orthotopique 9LGS ont été séparées en différents groupes 10 jours après l'implantation des tumeurs :

- Groupe 1 témoin ne recevant aucun traitement.
- Groupe 2 traité par MRT uniquement
- Groupe 3 traité par MRT 20 min après injection de Dotarem® ([Gd<sup>3+</sup>] = 1 M, V = 56µL)
- Groupe 4 traité par MRT 20 min après injection de Dotarem® ([Gd<sup>3+</sup>] = 40 mM, V = 1,4 mL)
- Groupe 5 traité par MRT 20 min après injection de AGuiX® ([Gd<sup>3+</sup>] = 40 mM, V = 1,4 mL)

L'irradiation par microfaisceau est faite de manière identique à la précédente. [59]

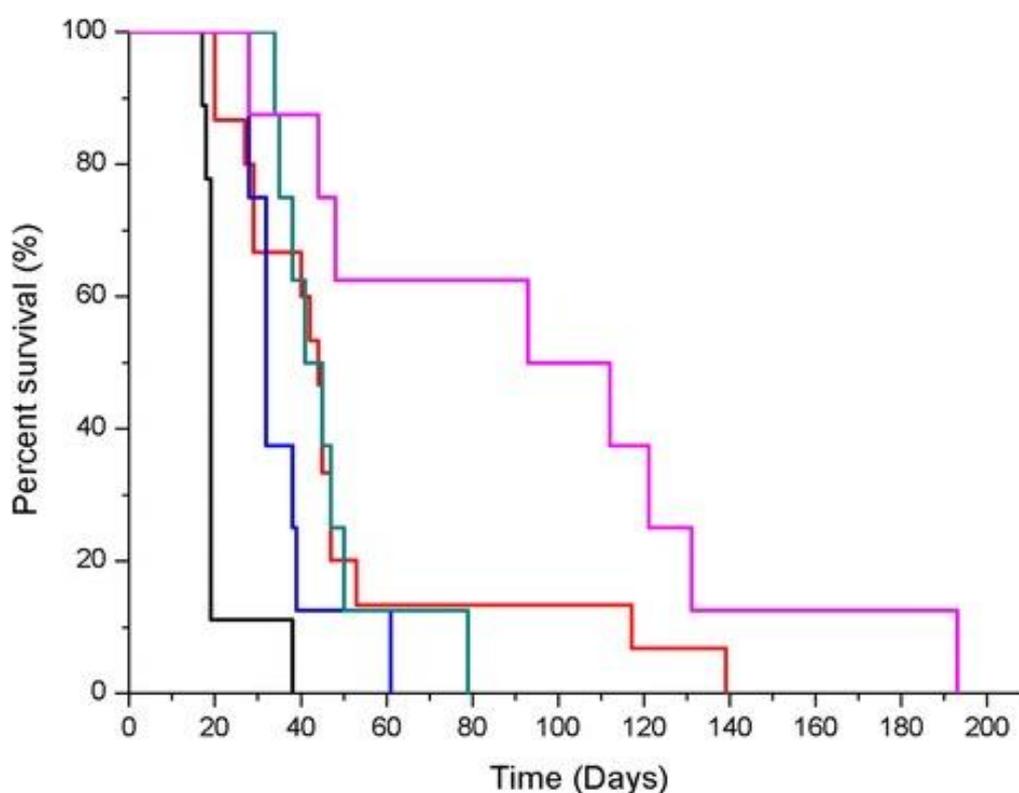


Figure 112 : Courbe de survie des souris porteuses de tumeur 9LGS. Groupe 1 (courbe noire), groupe 2 (courbe rouge), groupe 3 (courbe bleue), groupe 4 (courbe verte), groupe 5 (courbe rose).

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas une grande différence entre le temps de survie moyen des groupes traités par Dotarem® et par MRT seule (Figure 112). Mais leurs temps de survie sont tout de même bien supérieurs au groupe de souris ne recevant aucun traitement. Les temps de survie médians sont :

- Groupe 1 : 19 jours
- Groupe 2 : 44 jours
- Groupe 3 : 32 jours
- Groupe 4 : 43 jours
- Groupe 5 : 102,5 jours

L'utilisation du Dotarem® n'apporte aucun avantage à la radiothérapie par microfaisceaux. En revanche, le groupe traité par la GBN présente une augmentation de la durée de vie de 439 %. AGuiX® apporte donc un réel bénéfice dans le traitement par MRT des

gliosarcomes 9L. Ceci résulte probablement de son accumulation spécifique dans le tissu tumoral par l'effet EPR, et de son temps de demi-vie qui est approximativement deux fois supérieur à celui du Dotarem®. [59, 69]

Une équipe de chercheurs a choisi d'effectuer la MRT 1 h et 24 h après l'administration des NPs. [64] Le groupe irradié 24 h après l'administration des NPs présente un temps de survie médian de 95,5 jours alors qu'il n'est que de 62 jours pour le groupe irradié 1 h après (Figure 113). Préalablement, il a été démontré, qu'1 h après l'injection i.v. la quantité intra tumorale de Gd est estimée à 550 ppb alors qu'elle n'est que de 15 ppb 24 h après. Sans irradiation et à forte dose de NPs, la durée médiane de survie est identique au groupe témoin ne recevant aucun traitement. Les résultats montrent donc une meilleure efficacité de la MRT lors de son utilisation conjointe avec AGuIX®, même si la tumeur ne contient qu'une faible quantité de Gd. [64]

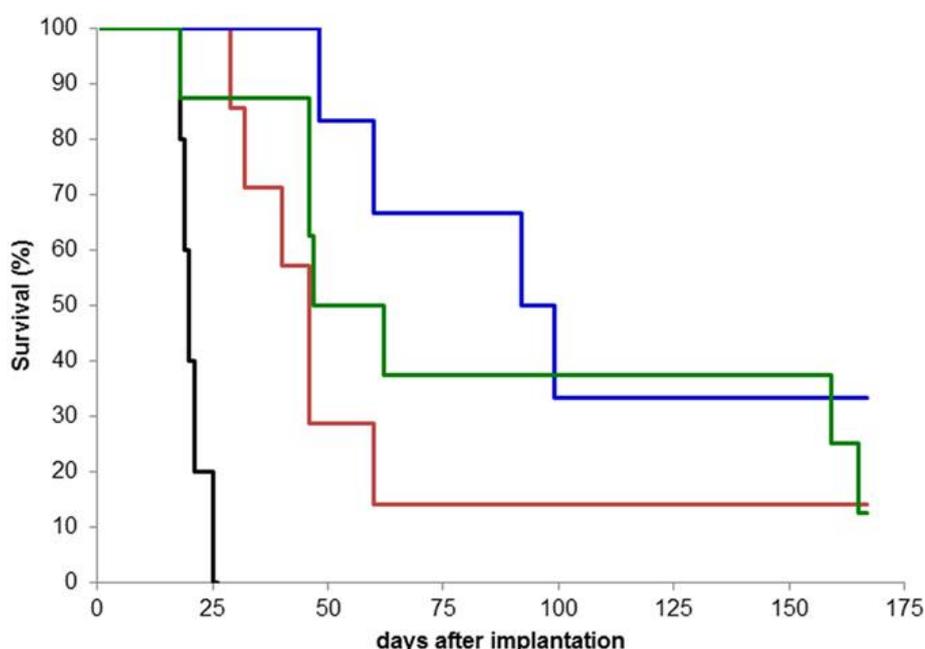


Figure 113 : Courbes de survie de souris porteuses de tumeur 9LGS. Sans traitement (courbe noire), traitées uniquement par MRT (courbe rouge), traitées par MRT 1 h après injection (courbe verte) et 24 h après injection (courbe bleue). Les traitements ont débuté 10 jours après l'implantation des tumeurs. [64]

AGuIX® peut également être administrée par voie aérienne comme lors de l'étude utilisant une NP, nommée ultrasmall rigid platform (USRP). L'USRP est administrée par voie orotrachéale *in vivo* chez des souris porteuses de tumeur orthotopique d'adénocarcinome pulmonaire représentatif du cancer du poumon non à petites cellules. [70]

L'étude menée par Bianchi. A *et al.* [70] a permis de mettre en valeur le potentiel de l'agent de contraste USRP par voie pulmonaire dans le diagnostic et la radiothérapie de l'adénocarcinome pulmonaire chez la souris. Ils ont remarqué que, par administration orotrachéale d'USRP (via un processus de nébulisation), une dose 4 fois moindre de produit est suffisante pour avoir un meilleur rapport de contraste par rapport à la voie intraveineuse. En effet, par voie orotrachéale, USRP (50 µL de 50 mmol/L de [Gd<sup>3+</sup>]) présente une amélioration du signal presque 2 fois plus importante que par voie i.v. (200 µL de 50 mmol/L de [Gd<sup>3+</sup>]). De même, USRP utilisée par voie i.v. présente une nette amélioration du signal par rapport à l'agent de contraste actuellement utilisé en clinique : le Dotarem® en i.v. (200 µL de 50 mmol/L de [Gd<sup>3+</sup>]). De plus, par voie orotrachéale, l'élimination des NPs par la tumeur est

quatre fois plus lente que par voie i.v. et le moment le plus propice pour le diagnostic IRM est entre 1 et 2 h après administration. [70]

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'utilisation de AGuIX® par voie orotrachéale. Une amélioration du signal et du rapport de contraste est observée dans le groupe de souris recevant AGuIX® par voie pulmonaire par rapport à la voie i.v. Ceci permet d'avoir une délimitation plus marquée du tissu tumoral qui permet un meilleur diagnostic et une radiothérapie (RT) plus efficace.

*In vivo* une irradiation de 10 Gy est effectuée 24 h après administration par nébulisation de AGuIX® (50 µL de 20 mM [Gd<sup>3+</sup>]). L'expérience est effectuée sur trois groupes de souris porteuses de carcinome pulmonaire humain non à petites cellules : un groupe n'a reçu aucun traitement, un groupe a reçu uniquement de la RT et un groupe reçoit une administration AGuIX® et la RT. Une différence non significative entre le taux de survie du groupe témoin sans traitement (83 jours) et du groupe recevant uniquement la RT (77 jours) est constatée. Pour le groupe ayant reçu la nébulisation de AGuIX® et la RT à 24 h, le temps de survie médian est plus important (112 jours).

Signalons que les NPs AGuIX® se prête facilement à l'administration orotrachéale. Une administration de volumes plus faibles à une concentration plus faible de gadolinium permettrait d'augmenter l'efficacité de la RT tout en diminuant les risques et la survenue éventuelle d'effets indésirables chez les patients. L'utilisation de la MRT pourrait également être un atout non négligeable. [68]

En bref, l'utilisation des nanoparticules AGuIX® a permis la détection de tumeurs millimétriques au niveau pulmonaire avec une excellente précision vérifiée par histologie après euthanasie des rats, ce qui en fait un bon agent de contraste pour l'utilisation théranostique. [69]

### ***SiBiGdNP :***

La nouvelle génération de NPs dérivées de AGuIX® avec l'ajout du bismuth (i.e. SiBiGdNP) devrait accroître l'efficacité de la radiothérapie via une interaction plus importante avec l'irradiation. Le pouvoir radio sensibilisant de ces NPs a été testé *in vivo* sur des cellules d'adénocarcinome du poumon A549. [71]

Les souris ont reçu une implantation sous-cutanée de cellules cancéreuses A549 créant un modèle ectopique de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Dix jours après implantation des cellules cancéreuses, les souris reçoivent une première l'injection de NPs (Figure 114 A). Afin d'évaluer la biodistribution et la cinétique *in vivo*, une imagerie IRM est faite 15 min, 3, 6 et 24 h post injection. La RT doit s'effectuer 30 minutes après injection, c'est le moment où la tumeur est la plus chargée en NPs. [63]

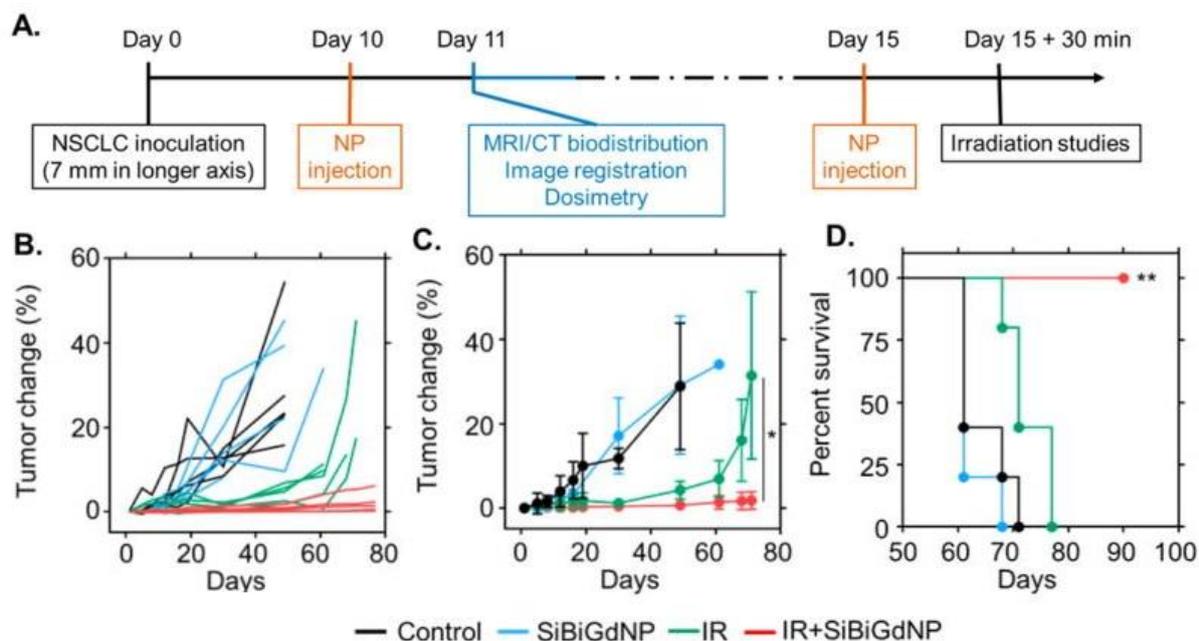


Figure 114 : A : Chronologie de l'étude préclinique B : Evolution de la taille des tumeurs des souris de chaque groupe en fonction du temps. C : Evolution du volume tumoral moyen de chaque groupe de traitement en fonction du temps. D : Courbes de survie. [63]

Les souris sont ensuite réparties en 4 groupes :

- un groupe témoin ne recevant aucun traitement,
- un groupe recevant une injection i.v. de SiBiGdNP (420 mg/kg (poids sec)),
- un groupe recevant seulement une irradiation de 10 Gy,
- un groupe, subissant une irradiation de 10 Gy, 30 minutes après injection des NPs.

Afin que les résultats de l'étude soient transposables au modèle humain, un matériau équivalent en eau de 10 cm a été placé entre les souris et la source de rayonnement afin de reproduire la profondeur où se trouverait une tumeur solide dans le corps humain.

Le volume tumoral de chacune des souris a été mesuré pendant 80 jours. Le taux de survie est également estimé pour évaluer l'efficacité du traitement (Figure 114). Pour les deux groupes ne recevant aucun traitement par irradiation, le volume tumoral augmente vite et l'intégralité des souris de ces 2 groupes sont décédées avant la fin de l'étude. Le groupe irradié à 10 Gy montre tout d'abord une faible augmentation du volume tumoral pendant les 30 premiers jours, puis, une croissance rapide des tumeurs. La totalité des souris de ce groupe est morte avant le 80<sup>ème</sup> jour. Les souris ayant reçu une injection de SiBiGdNP 30 minutes avant irradiation à 10 Gy, présentent non seulement une croissance tumorale faible durant toute la durée de l'étude mais aussi un taux de survie de 100 %, 90 jours après le début du traitement (Figure 114). Ces résultats sont très encourageants et témoignent d'une forte efficacité du traitement théranostique des NPs SiBiGdNP associées à une RT. [63]

Le Gd, tout comme le Bi, permettent de provoquer davantage de dommages aux cellules tumorales après irradiation que si l'irradiation est administrée seule. Ceci est dû à leur pouvoir radiosensibilisant. Cette radiosensibilité est démontrée par le ratio de fraction de survie des cellules irradiées et des cellules traitées et irradiées. Le taux d'amélioration de l'efficacité radiosensibilisante peut aller jusqu'à 2,5 en fonction de l'énergie de l'irradiation. La présence de plusieurs atomes de gadolinium autour de la NP induit, après une certaine dose d'irradiation, la formation d'une couche Auger (multitude d'électrons Auger autour des

groupements) et de photoélectrons de forte énergie, ce qui conduit à une augmentation des doses déposées autour des groupements de gadolinium (Figure 115). Les électrons d'Auger et les photoélectrons provoquent des dommages à l'ADN (cassures des doubles brins), fatals pour les cellules. Mais des études plus poussées sont indispensables pour déterminer clairement le mécanisme d'action des NPs chargées de Gd lors de la radiothérapie. [71, 72]

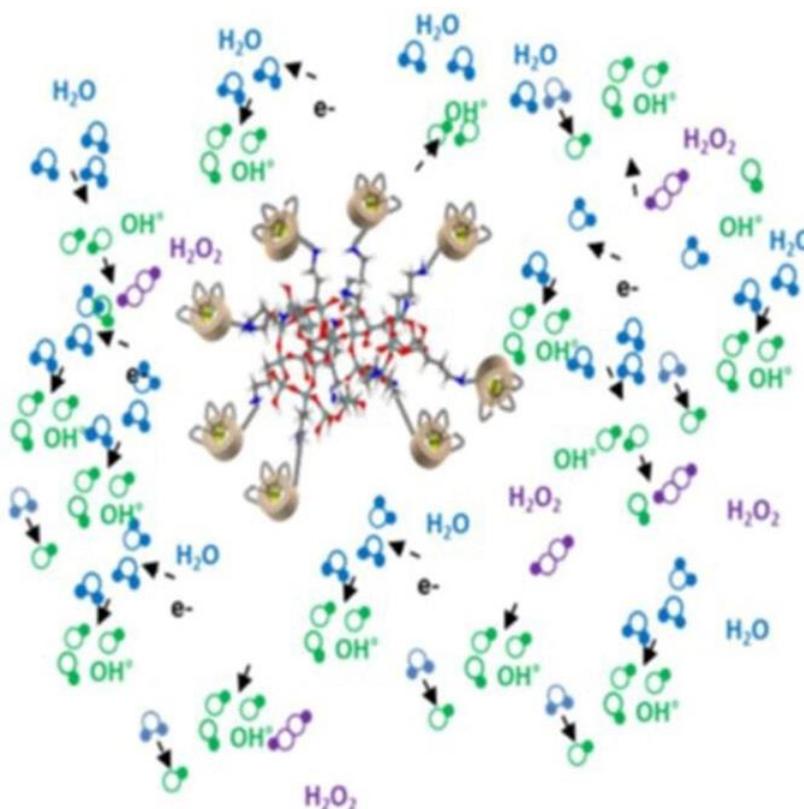


Figure 115 : Représentation schématique de la formation des électrons d'Auger et d'espèces oxygénées réactives autour d'AGuIX® après irradiation. [71]

Pour cela, l'effet des GBNs sur la réparation ou la cassure des doubles brins d'ADN chez des cellules tumorales U87 irradiées a été étudié *in vitro*. Le nombre de foyers de réparation de l'ADN a été quantifié par  $\gamma$ H2AX, colorant les marqueurs des cassures du double brin (DSB).

Cette étude montre que les NPs n'interfèrent pas avec les dommages ou la réparation de l'ADN nucléaire. En effet, il n'y a pas de différence significative entre le nombre de foyers de réparation chez les cellules incubées et non incubées avec des GBNs après irradiation. Cependant, la fraction des cellules survivantes est plus importante lorsque les cellules n'ont pas été incubées avec GBN, que ce soit à 1 ou 4 Gy (Figure 116). Ces résultats soulignent que, malgré le manque d'effet sur l'ADN nucléaire, les GBNs permettent d'accentuer l'effet de la RT et sont donc bien radiosensibilisants. Par ailleurs, Štefančíková L *et al.* [73] montrent que les GBNs sont localisées principalement dans le compartiment cytoplasmique des cellules. Ils supposent que la radio-sensibilisation provoquée par les GBNs se fait au niveau cytoplasmique où les GBNs entraînent, à la suite de l'irradiation, des dommages à différents organites comme les lysosomes ou encore les endosomes, conduisant à la mort cellulaire. [73]

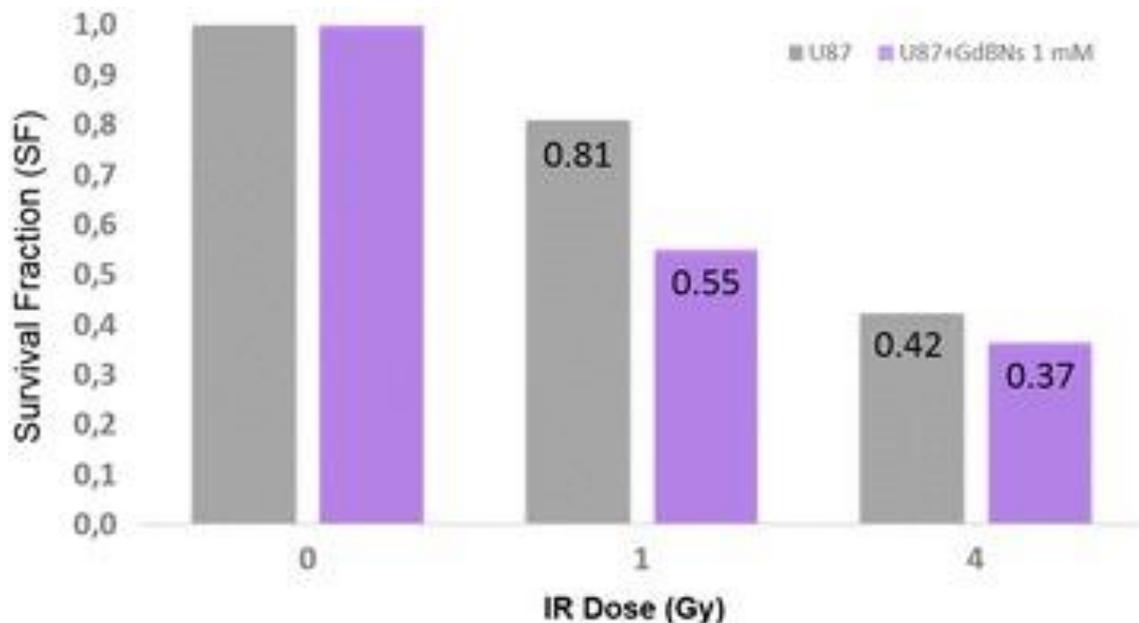


Figure 116 : Effet des GBNs sur la population survivante de cellules U87. En gris : cellules non incubées avec les GBN, en violet : cellules incubées avec 1 mM de GBN pendant 1 h. [73]

Une autre étude, menée *in vivo* sur des tumeurs de type A549, [63] montre une augmentation significative des dommages causés à l'ADN lors de l'association de SiBiGdNP avec la RT (Figure 117).

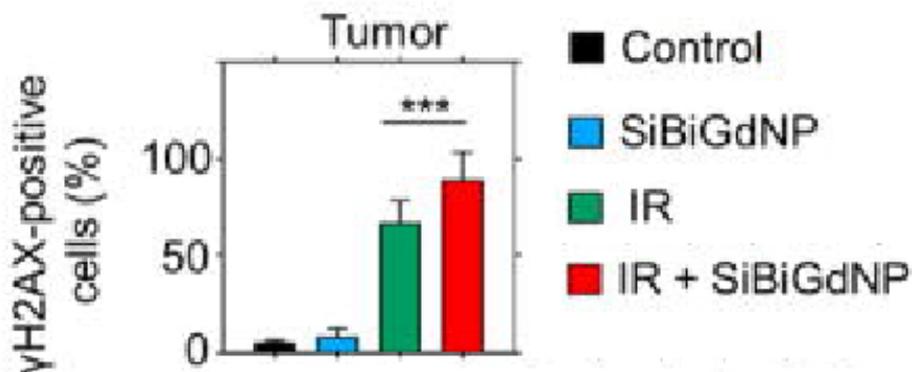


Figure 117 : étude des dommages à l'ADN induits par les rayonnements dans la tumeur quantifiés via la coloration γH2AX sur les différents groupes de souris porteuses de tumeur A549. [63]

Les deux études précédentes, l'une *in vitro* sur des cellules U87 [73], et l'autre *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs A549 [63] présentent donc des résultats contradictoires sur les dommages causés à l'ADN par les GBNs. Si de nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer ces résultats, de plus amples recherches restent à mener pour découvrir le mécanisme d'action cellulaire induit par la présence de GBN.

## D- Toxicité

La petite taille (< 10 nm) des GBNs (i.e Gd/DTPA/Np, AGuIX<sup>®</sup>, SiBiGdNP) (leur permet d'avoir une bonne élimination rénale. Pour rappel, les produits à base de Gd sont potentiellement toxiques pour le tissu rénal et c'est pourquoi dans pratiquement toutes les études, une analyse histologique du rein est menée. D'autres organes sont également étudiés post exposition aux GBNs afin d'évaluer toutes les toxicités possibles.

Une analyse de l'urine des rats traités par des GBNs montre que 30 % du gadolinium injecté peut être éliminé durant l'heure qui suit l'injection i.v. Leur petit diamètre hydrodynamique favorise leur clairance rénale et permet donc une meilleure élimination de l'excédent évitant toute toxicité rénale à long terme. [60]

Pendant le processus d'élimination, AGuIX<sup>®</sup> (non dégradée) a été retrouvée dans les tubules proximaux jusqu'à plusieurs jours après l'injection. Elle finit par être éliminée au cours du temps. Après 4 semaines, seules quelques traces ont été retrouvées dans les reins. Cependant la toxicité résultante devrait être faible si le Gd reste chélaté au niveau des NPs durant tout le processus d'élimination. Une enquête de sécurité a démontré que AGuIX<sup>®</sup> ne présente que de faibles effets altératifs sur la fonction rénale (même à forte dose). Ces altérations n'ont été que transitoires et n'ont pas entraîné de décès parmi les souris à dose thérapeutique. Seule une souris est décédée après utilisation d'une très forte dose. [74]

En comparaison avec la toxicité sans utilisation de NPs, la RT entraîne davantage de dégâts dans les tissus sains. Avec la meilleure délimitation des tumeurs par les NPs, la RT et la MRT sont bien plus précises et permettent d'avantage d'épargner les tissus sains.

Au niveau des dommages à l'ADN des tissus non tumoraux, les études ne relevent pas de différences significatives entre les groupes de souris recevant uniquement la radiothérapie et ceux recevant la radiothérapie après une injection de SiBiGdNP (Figure 118). [63]

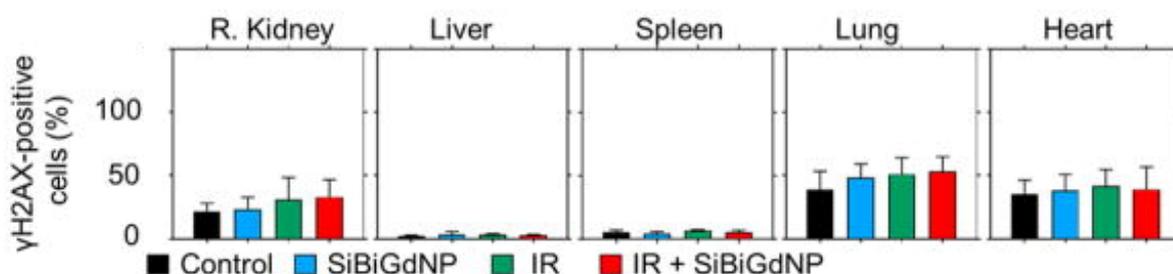


Figure 118 : Etude des dommages de l'ADN après coloration  $\gamma$ H2AX dans les différents tissus de souris traitées avec ou sans SiBiGdNP irradié ou non. [63]

Ces faibles toxicités ont permis à la start-up française NHTherAguix d'obtenir l'autorisation de la Haute Autorité de Santé pour effectuer des études cliniques de phase 1b NANORAD sur AGuIX<sup>®</sup> dans le cadre de métastases cérébrales.

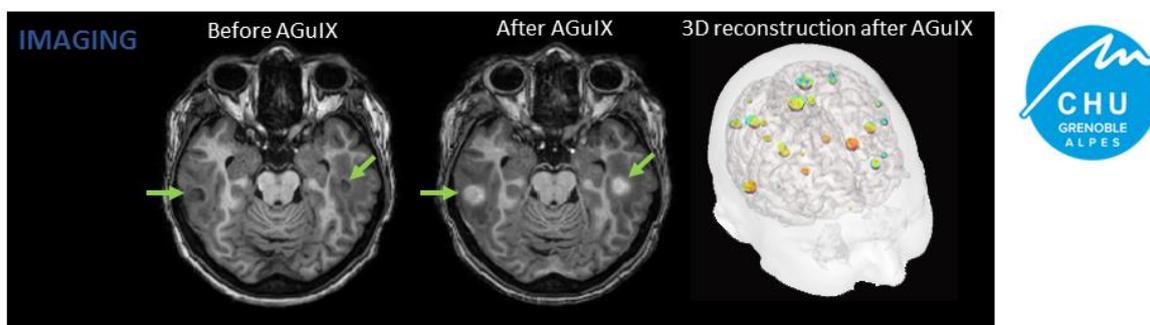
## E- Résumé

Les NPs décrites précédemment font partie des plus petites nanoparticules, cette taille qualifiée d'ultrafine assure une bonne élimination rénale en évitant les effets toxiques du gadolinium. Les images IRM sont plus contrastées avec les GBNs qu'avec les agents de contraste commerciaux au gadolinium. Cette efficacité repose sur la sélectivité des NPs pour la tumeur par rapport aux tissus sains. Ce ciblage spécifique permet également une meilleure radiothérapie guidée par imagerie via un meilleur ciblage de la tumeur. De plus, le pouvoir radio sensibilisant du gadolinium permet de démultiplier l'effet thérapeutique de la radiothérapie dans des modèles précliniques. En conclusion, les GBNs peuvent être qualifiées d'agents théranostiques. [71]

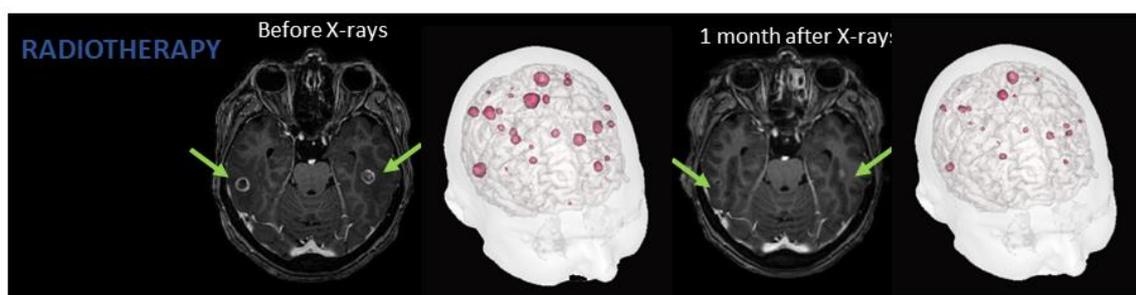
Les tests cliniques ont montré une grande efficacité *in vivo* sur huit modèles de tumeurs différents ainsi que sur des tumeurs radiorésistantes. AGuIX® a fait l'objet de plusieurs types d'administration (i.e. i.v. et intratrachéale. [68] Deux essais cliniques de phase 1 ont déjà eu lieu avec AGuIX® administré par voie i.v.

Les résultats obtenus au CHU de Grenoble sont très encourageants. Les résultats NanoRAD ont été obtenus sur des métastases cérébrales secondaires du mélanome ou du cancer du poumon non à petites cellules. La haute spécificité d'AGuIX® pour les métastases cérébrales a permis une réduction de plus de 45 % du diamètre des métastases un mois après le début du traitement. (Figure 119) [71]

### Radiosensitization of brain metastasis using AGuIX with RT *Selected example*



Targeting and contrast enhancement after AGuIX intravenous injection @100 mg/kg on a brain metastasis patient  
*The targeting was proven on 15 patients over 15*



Reduction of the total tumor size (sum of diameters) of 45 % 1 month after initiation of the treatment  
*Clinical benefit was shown for 12 patients over 13*

Figure 119 : Résultats de l'étude NanoRAD (source internet startup NHTherAguix).

### 3) Autres types de GBNs

#### A- Caractéristiques et présentation

Contrairement aux NPs présentées dans le chapitre précédent, ici les GBNs ont une taille supérieure à 10 nm.

##### *Gd-PEG-Bi* :

Une nouvelle fois le Bi est associé au Gd mais la composition de la NP obtenue est très différente de celle vue précédemment pour SiBiGdNP.

Des NPs Gd-PEG-Bi NPs sont fabriquées selon le protocole suivant (Figure 120) :

- $\text{Bi}^{3+}$  est associé au 1-dodécane-thiol pour former DT-Bi qui constituera le cœur hydrophobe de la NP finale.
- $\text{Gd}^{3+}$  préalablement associé à du DTPA-BC (DTPA-bis-hexadécylamide) est dissous dans une solution saline avec du DSPE-mPEG et du DSPC.
- A la solution précédente est ajouté DT-Bi.

DSPE-PEG permet d'améliorer la circulation sanguine de la NP et de la rendre davantage biocompatible. Au final, la particule Gd-PEG-Bi est formée avec le bismuth au centre, le PEG et le Gd (chélaté par du DTPA) à la surface (Figure 120 a). [75]

Les GBNs obtenues présentent au MET des formes sphériques dont les diamètres s'étalent de 20 à 70 nm, le diamètre hydrodynamique moyen étant de 45 nm (Figure 120).

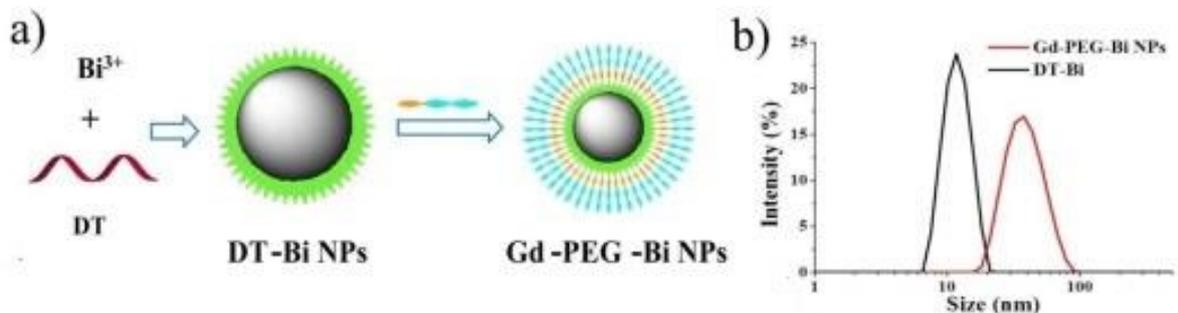


Figure 120 : a) Schéma de synthèse de Gd-PEG-Bi. b) Mesure du diamètre par MET. [75]

Après un mois de stockage, le diamètre et la polydispersité mesurés montrent peu de différence avec les valeurs mesurées post-fabrication ce qui indique que le produit formé présente une stabilité structurale correcte. Le coefficient d'absorption élevé dans le proche infra-rouge (700 à 900 nm) de Gd-PEG-Bi en fait un potentiel agent thérapeutique pour l'utilisation en PTT et PAI. [75]

##### *DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd* :

Des dendrimères ont aussi fait l'objet d'études pour véhiculer le Gd.

Des dendrigrafts de poly-L-lysines (DGL) de 3<sup>ème</sup> génération sont utilisés comme support de la nanosonde. Les DGL de 3<sup>ème</sup> génération possèdent 123 fonctions amines primaires ce qui les rend très fonctionnalisables. Dans un premier temps, du PEG (associé à un

ester de maléimide et de N-hydroxysuccinimidyle) est associé au DGL pour former les DGL-PEG. A partir de DGL-PEG, deux GBNs différentes sont synthétisées.

- DPC-DTPA-Gd : Un ajout de dérivé de choline se fait à l'extrémité libre des PEG de DGL-PEG. Un agent chélateur, l'acide 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-diéthylentriaminepentaacétique (ou p-SCN-Bn-DTPA), est ensuite greffé au niveau des amines superficielles non pegylées. Au final, en ajoutant les ions  $Gd^{3+}$ , qui seront chélatés par le DTPA, DPC-DTPA-Gd est obtenue.
- DP-DTPA-Gd : idem que DPC-DTPA-Gd, mis à part que DGL-PEG ne subit pas la modification des PEG par le dérivé de la choline. (Figure 121). [76]

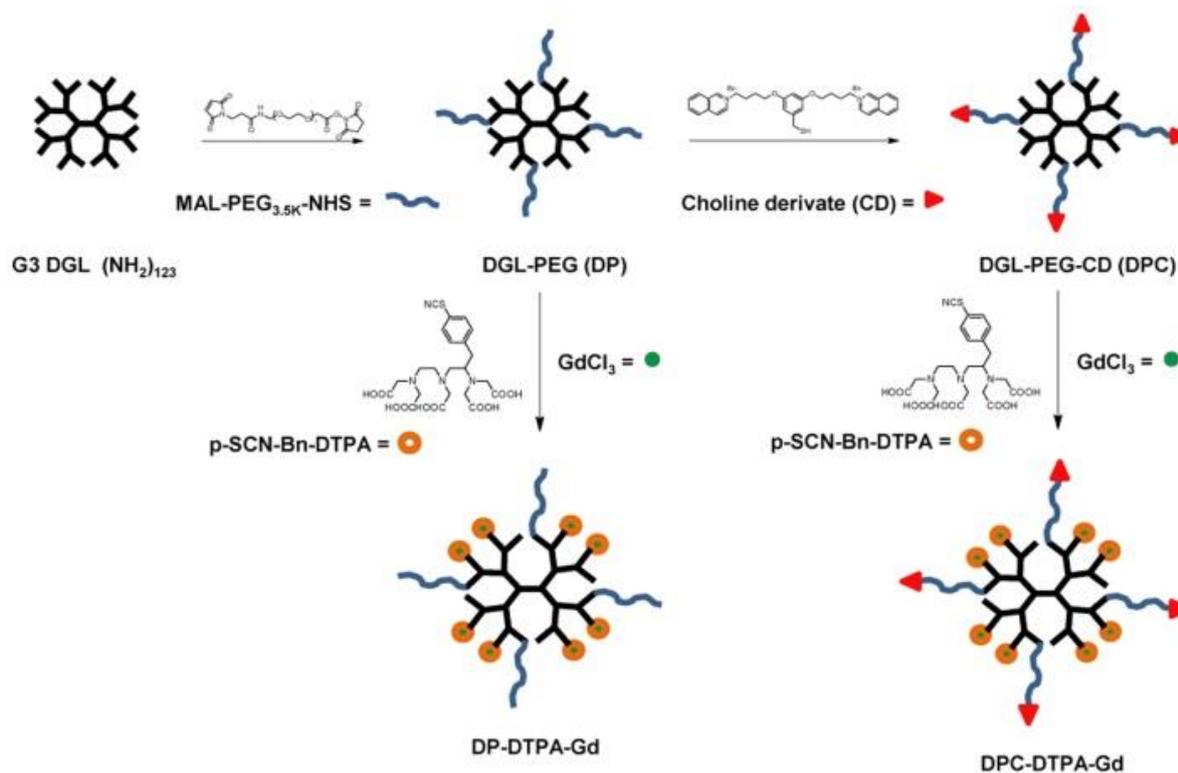


Figure 121 : Processus de synthèse de DP-DTPA-Gd et de DPC-DTPA-Gd [76]

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanosondes obtenues est de  $30 \pm 3,5$  nm pour DP-DTPA-Gd et de  $32,1 \pm 0,2$  nm pour DPC-DTPA-Gd. La mesure de la relaxivité (vitesse de relaxation) *ex vivo* permet de confirmer que les NPs dendrimériques peuvent être utilisées *in vivo* pour l'IRM.

Les résultats obtenus *in vivo* sur des cellules cancéreuses U87MG montrent que DPC-DTPA-Gd est nettement plus absorbée et retenue par les cellules cancéreuses que DP-DTPA-Gd, démontrant ainsi l'importance de la fonctionnalisation par le dérivé de la choline. [76]

### IL13-Lip-Gd-DTPA :

Des NPs de type liposomales sont également utilisées de diverses façons avec le gadolinium en oncologie pour le diagnostic ou la thérapie.

Beaucoup de cancers cérébraux de haut grade et tous les astrocytomes surexpriment le récepteur à l'interleukine 13 (IL-13R $\alpha$ 2) [77,78]. Cependant, le tissu cérébral sain n'exprime

que de façon insignifiante ces récepteurs. Liu *et al.* <sup>[79]</sup> ont associé l'interleukine 13 à un liposome contenant du gadolinium pour former la NP IL13-Lip-Gd-DTPA.

Les liposomes de gadolinium ont été conçus par un mélange de lipide (DPPC, cholestérol, DSPE-PEG) qui forme en présence de Gd-DTPA et de poly-L-lysine des vésicules multi-lamellaires donnant Lip-Gd-DTPA. Les liposomes les plus petits sont ensuite sélectionnés par extrudation à travers une membrane. Ils sont ensuite conjugués à de l'IL-13 d'origine humaine. Les liposomes formés sont de forme sphérique et leur diamètre moyen est de  $137 \pm 43$  nm. <sup>[79]</sup> Ces liposomes sont étudiés dans le cadre de diagnostic de gliomes.

D'autres liposomes sont en cours d'étude. Ils expriment *in vitro* un grand potentiel comme agent de contraste mais aussi en thérapie comme le liposome de gadolinium associé au peptide KLA qui est cytotoxique. <sup>[80]</sup>

## B- Imagerie

L'IRM est une technique d'imagerie couramment utilisée en association avec des produits de contraste à base de gadolinium ou d'iode. L'avantage des GBNs réside dans le fait qu'elles ont tendance à s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR.

### *Gd-PEG-Bi* :

Les propriétés de contraste de Gd-PEG-Bi ont été étudiées *in vitro* puis *in vivo* sur des souris porteuses de tumeur. Gd-PEG-Bi a également fait l'objet d'expériences en imagerie photoacoustique. [75]

La relaxation  $r_1$  mesurée pour cette NP est de  $4,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette relaxation longitudinale est assez proche de celle du produit commercial déjà largement utilisé : le Magnevist® ( $r_1 = 4,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Gd-PEG-Bi a donc été utilisée *in vivo* comme agent de contraste IRM dans un modèle préclinique de souris porteuse de xénogreffe de tumeurs C6 (cellules de gliomes). Les souris ont reçu une injection i.v. de NPs (10 mg/mL) et des images en coupe de la tumeur ont été relevées avant injection puis à 30 min, 1 h, 2 h, 3 h et 24 h post-injection. En parallèle, l'intensité du signal dans la tumeur a également été mesurée (Figure 122).

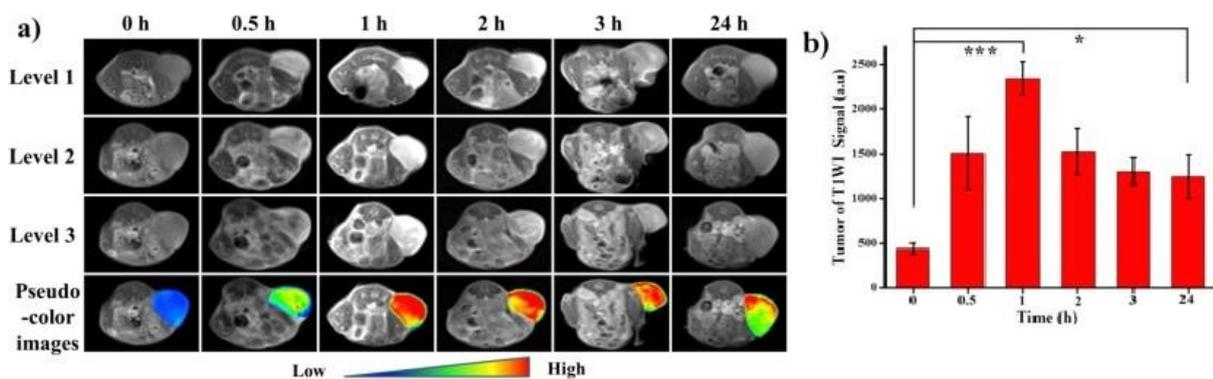


Figure 122 : a) Images pondérées en T1 des souris porteuses de tumeurs C6 avant et après injection. b) Mesure de l'intensité du signal à la surface des tumeurs. [75]

Le contraste au niveau tumoral augmente de 30 minutes à 3 heures après injection des nanoparticules (Figure 122a). L'intensité du signal est maximale dans la tumeur 1 h après injection ; à ce moment, le signal est 5 fois plus important qu'avant-injection (Figure 122b). Cette forte accumulation au niveau tumoral résulte de l'effet EPR. En comparaison au Magnevist®, la NP reste bien plus longtemps en contact avec le site tumoral. Ces résultats *in vivo* confirment que Gd-PEG-Bi pourrait être utilisée comme agent de contraste en IRM dans le futur. [75]

Le bismuth ayant un fort coefficient d'atténuation des rayons X, Gd-PEG-Bi a été évalué en tomodensitométrie (TDM). Ainsi chez des souris porteuses de tumeurs C6, les chercheurs ont remarqué qu'une heure après injection, l'augmentation du signal au niveau de la zone tumorale permet de conclure que la NP peut aussi être utilisée en TDM.

Les propriétés de contraste de Gd-PEG-Bi ont aussi été testées en imagerie photoacoustique (PAI). La PAI est une technique d'imagerie médicale récente, elle se base sur l'utilisation d'ondes électromagnétiques émises sous forme d'impulsion qui viendront, au

niveau des tissus, créer un cycle de compression-dilatation qui permettra de fabriquer une image du tissu à leur écoute. Cette technique permet d'avoir une meilleure résolution d'image des tissus les plus profonds par rapport aux moyens actuellement employés en imagerie clinique. [81]

Pour évaluer les propriétés photoacoustiques (PA) de Gd-PEG-Bi *in vivo*, des souris porteuses de tumeurs C6 ont reçu une injection i.v. (10 mg/mL) de NPs. A l'aide du système PA (Endra Nexus 128) les souris ont été scannées à différents moments après injection. Juste avant l'injection, les signaux PA ont été enregistrés pour être comparés aux signaux post-injection.

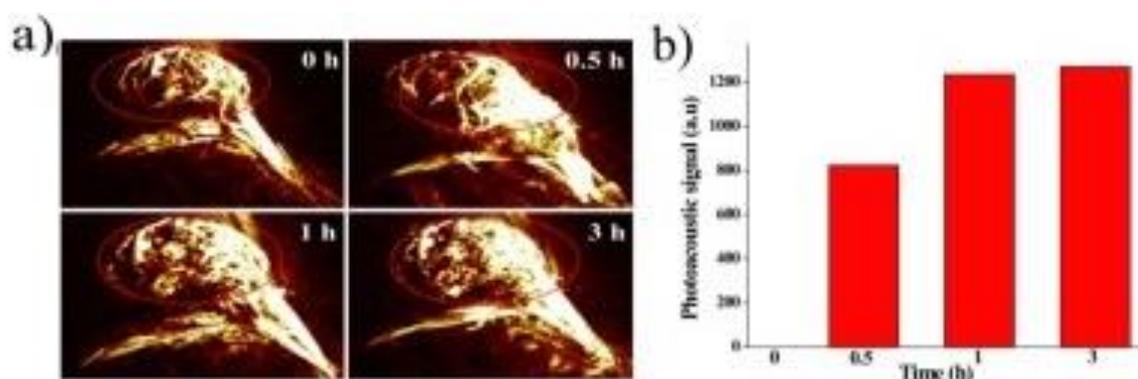


Figure 123 : a) PAI à différents intervalles de temps (0 h, 0,5 h, 1 h et 3 h) après injection de Gd-PEG-Bi à des souris porteuses de tumeurs. b) Mesure de l'intensité du signal photoacoustique (a.u) aux différents moments. [75]

Le signal PAI augmente rapidement et passe de 0 à 822 a.u 30 minutes après injection, et continue d'augmenter jusqu'à atteindre 1271 a.u au bout de 3 h (Figure 123). Cette augmentation du signal montre que les NPs se sont accumulées dans la tumeur, mais aussi qu'elles y sont séquestrées pendant longtemps. [75]

Les NPs Gd-PEG-Bi peuvent donc être non seulement utilisées en IRM et TDM mais aussi comme agent de contraste PAI.

#### *DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd :*

Les dendrimères à base de Gd ont déjà fait l'objet d'une étude pour une utilisation théranostique. Des dendrimères PAMAM de 5<sup>ème</sup> génération ont été modifiés avec du DOTA, un chélatant du gadolinium, et avec un ligand ciblant les récepteurs AF surexprimés dans certains cancers pour former Gd-DOTA-SNP. La relaxivité  $r_1$  ( $17,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) de ces dendrimères est 4 fois supérieure à celle des complexes Gd-DTPA (Magnevist®). Des expérimentations sur des modèles précliniques de souris porteuses de tumeurs ont montré non seulement que Gd-DOTA-SNP permet d'augmenter le niveau de contraste et mais également une meilleure clarté en IRM par rapport au Gd-DTPA. Ces résultats ont permis d'élaborer un protocole pour un diagnostic plus précoce de certaines tumeurs, grâce notamment à un temps de rétention intra tumoral plus important, au bon contraste, mais également grâce à une meilleure imagerie des différents ganglions lymphatiques sentinelles des tumeurs.

Ces dendrimères chargés de complexes DOTA-Gd peuvent être modifiés pour contenir par exemple de la doxorubicine et en faire des agents de contraste et de chimiothérapie très

efficaces. Les dendrimères à base de gadolinium sont des plateformes prometteuses pour des applications théranostiques. [82]

DPC-DTPA-Gd a été évalué dans le cadre du diagnostic *in vivo* de gliome U87MG. Des souris porteuses de tumeurs U87MG de petit volume et de grand volume ont été scannées à l'IRM à différents moments après administration i.v. de Gd-DTPA, DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd à concentration de 0,05 mmol/kg de Gd. Des images en T1 et T2 ont été relevées pour mettre en évidence les tumeurs. Avant l'imagerie en T1, une imagerie en T2 (image à gauche de la Figure 124 a, b) est faite pour localiser et mesurer la tumeur.

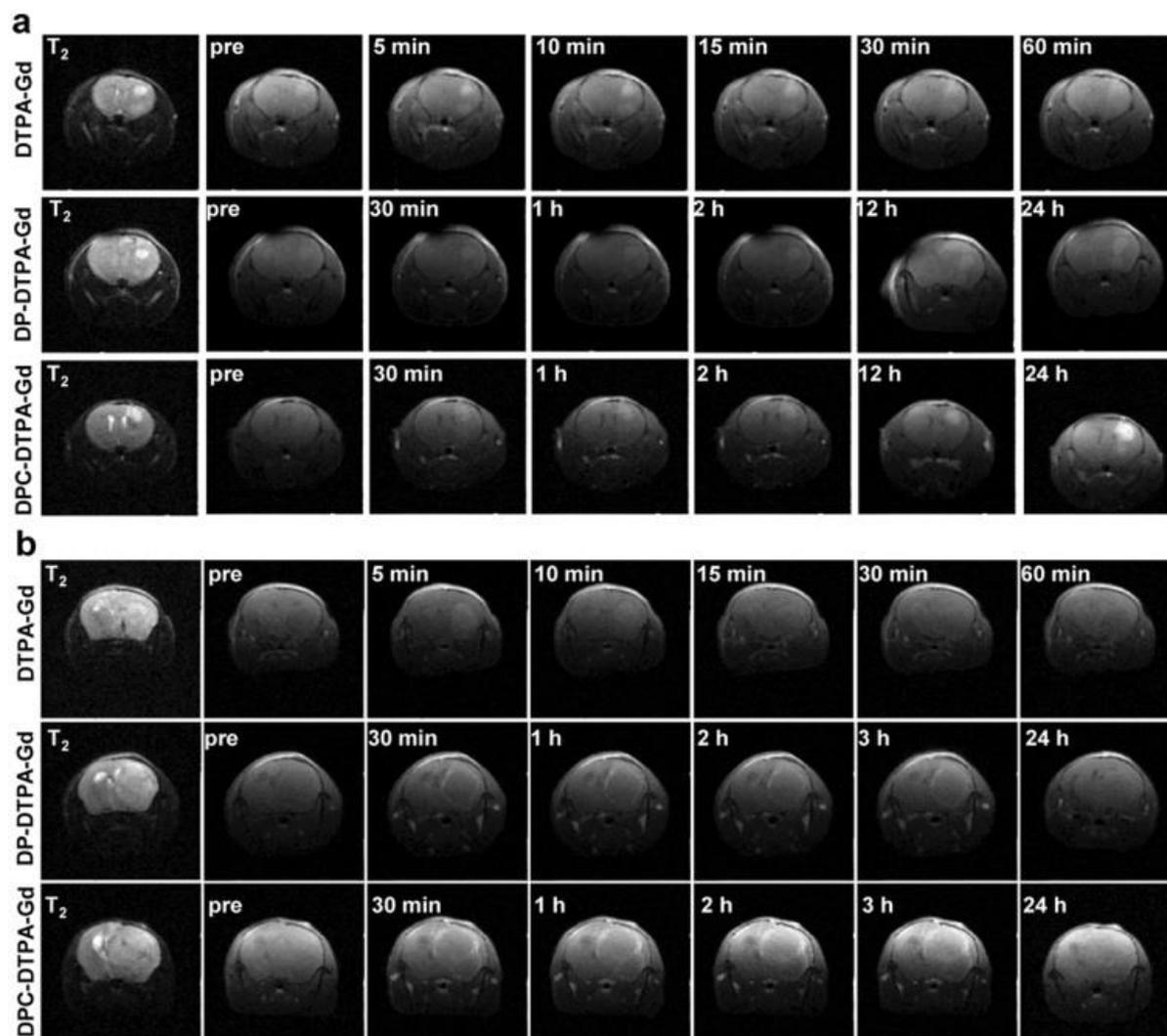


Figure 124 : a : Imagerie de souris porteuses de gliome de petit volume recevant DTPA-Gd, DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd ; b : Imagerie de souris porteuses de gliome de grand volume recevant DTPA-Gd, DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd.

En observant les images de la figure 124 et les courbes de la figure 125, les gliomes à petit volume sont visibles 5 minutes après administration de DTPA-Gd avec une augmentation de contraste de 113,6 %. Ensuite le contraste est de moins en moins important, ce qui témoigne d'une élimination rapide de DTPA-Gd par voie rénale. A contrario, après l'injection de DPC-DTPA-Gd le contraste augmente légèrement et progressivement au cours des 3 premières heures et atteint son maximum 24 h après injection. Quantitativement, le contraste a augmenté de 146,1 %. DPC-DTPA-Gd produit un meilleur contraste que DP-DTPA-Gd qui reste à un niveau constant après l'augmentation de la première heure (Figure 125). Le dendrimère DPC-DTPA-Gd est celui qui permet une meilleure délimitation des tumeurs de

petit volume. Ce résultat souligne l'importance d'utiliser un dérivé de choline sur le dendrimère. En revanche, pour les tumeurs de grand volume, il n'y a pas de grande différence entre les contrastes des images IRM présentées après injection de DPC-DTPA-Gd et DTPA-Gd. [76] Une lésion annulaire plus épaisse et irrégulière, signe classique des gliomes de haut grade, est observable chez les souris recevant DPC-DTPA-Gd. [83]

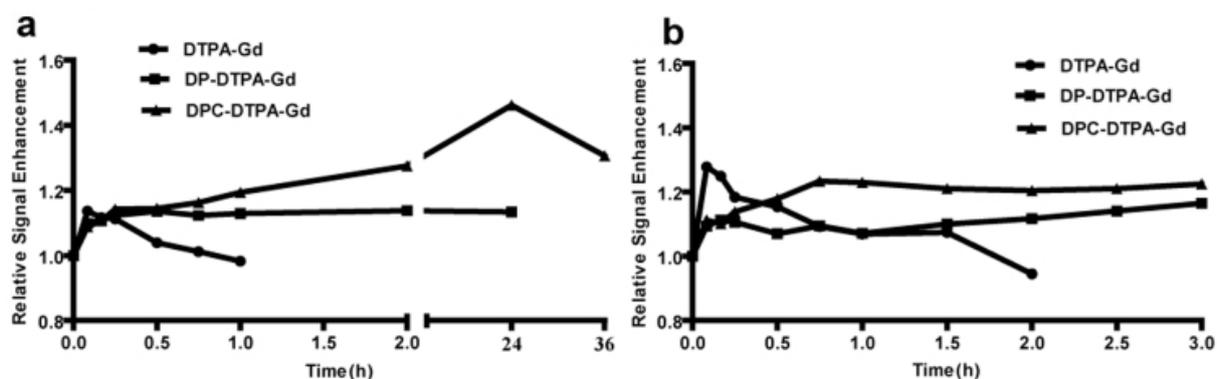


Figure 125 : Courbe des analyses quantitatives des intensités moyennes de signal RM mesuré pour chaque tumeur après injection de DTPA-Gd, DP-DTPA-Gd et DPC-DTPA-Gd pour quantifier l'amélioration relative du signal. a) gliomes petit volume ; b) gliomes gros volume.

Pour expliquer la différence entre les dendrimères coiffés par des dérivés de choline (DPC) et ceux ne l'étant pas (DP), les deux NPs ont été marquées par BODIPY, un marqueur fluorescent. Une imagerie par fluorescence *in vivo* est effectuée chez des souris porteuses de tumeur U87 MG recevant les deux NPs. (Figure 126). La différence est flagrante : les dendrimères DPC marqués montrent une fluorescence très importante au niveau de la zone tumorale alors que les dendrimères DP marqués ne montrent qu'une très faible fluorescence au niveau du cerveau. Ces résultats sont confirmés par l'imagerie fluorescente *ex vivo* où la différence de contraste est très marquée entre la zone tumorale et le tissu normal chez les souris traitées par DPC.

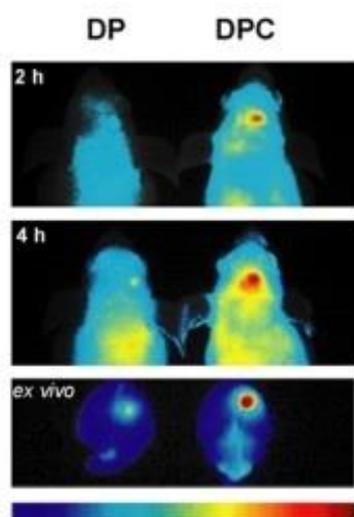


Figure 126 : Image fluorescente *in vivo* après injection i.v. de DP et DPC marquée au BODIPY à des souris porteuses de tumeurs U87 MG, et imagerie *ex vivo* d'une coupe de cerveau des souris.

L'accumulation tumorale de DPC est nettement supérieure à DP ce qui témoigne du grand potentiel d'efficacité comme agent de contraste pour le ciblage des gliomes de la GBN DPC-DTPA-GD. [76]

## IL13-Lip-Gd-DTPA :

Les liposomes à base de Gd sont également testés pour le diagnostic des tumeurs cérébrales.

Pour vérifier un passage correct de la BHE *in vivo* par le liposome, une IRM est pratiquée et le changement de l'intensité du signal est mesuré pour le tissu cérébral normal et pour l'hypophyse après que les souris ont reçu une injection de NP IL-13-Lip-Gd-DTPA ou de Magnevist® (Figure 127). Dans la glande pituitaire (qui ne présente pas de BHE), un changement de signal est observé à la fois pour le Magnevist® et pour la NP. Cela signifie que l'IL-13-Lip-Gd-DTPA entraîne un contraste identique au Magnevist® *in vivo* à l'IRM. Mais dans le tissu cérébral, on note seulement une augmentation du signal avec le liposome. En conclusion, Magnevist® ne peut pas franchir une BHE intacte, alors que le liposome peut traverser la BHE et se retrouver dans le parenchyme cérébral d'une souris saine. [79]

Ainsi Liu *et al.* ont prouvé que l'utilisation d'IL-13-Lip-Gd-DTPA entraîne un meilleur passage de la BHE que Gd-DTPA (Magnevist®) dans un modèle *in vitro* de BHE. La concentration en Gd de l'autre côté de la barrière augmente de façon plus importante avec la NP qu'avec l'agent de contraste commercial.

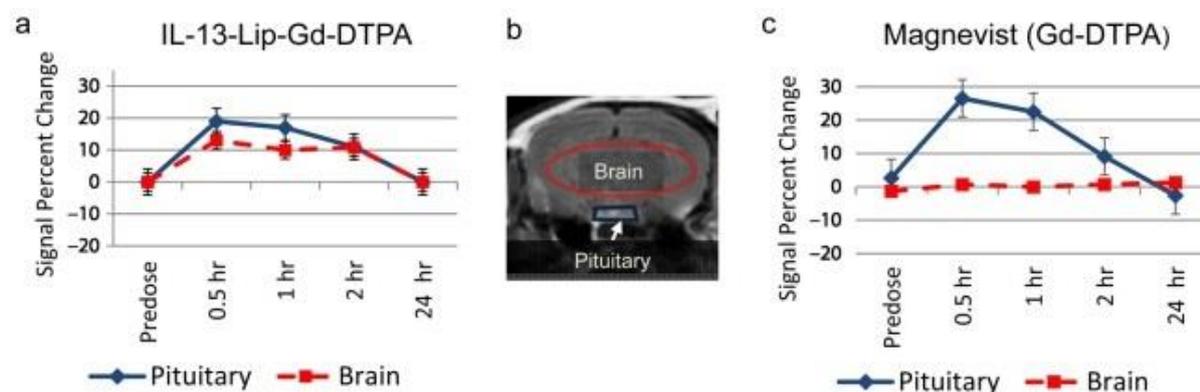


Figure 127 : Tracé de l'évolution temporelle de l'intensité du signal mesurée en image T1 dans le tissu cérébral (pointillé rouge) et dans l'hypophyse (ligne bleue) dans le cerveau (b). (a) : Après injection d'IL-13-Lip-Gd-DTPA ou de (c) : Magnevist®.

Une autre expérience est ensuite menée avec des souris porteuses de gliomes. Les souris reçoivent tout d'abord une injection de Magnevist® et, 24 h après, une injection d'IL-13-Lip-Gd-DTPA. Une première image montrant une coupe du cerveau et de la tumeur est prise, une seconde image située 2 mm en arrière de la première est aussi réalisée.

La NP provoque un contraste suffisant pour délimiter la tumeur primaire, ce contraste est similaire à celui produit par le Magnevist® (flèches blanches, Figure 128 a, b). En revanche, de petites masses tumorales voisines de la tumeur primaire sont seulement identifiables avec IL-13-Lip-Gd-DTPA (flèches rouges, Figure 128 b).

Dans la coupe réalisée 2 mm en arrière, d'autres petites masses tumorales supplémentaires (flèches rouges - Figure 128 d) sont visualisables et délimitables avec IL-13-Lip-Gd-DTPA alors que l'agent de contraste commercial Magnevist® a été moins efficace (Figure 128 c). Après euthanasie de la souris, une coupe du cerveau de ce dernier plan a été réalisée. Cette coupe a ensuite été colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (H et E) (Figure 128 e, f). La masse tumorale (plus foncée que le reste du tissu) est clairement visible au même endroit que la zone identifiée à l'IRM. Une accumulation des liposomes marqués au FITC (autre marqueur

fluorescent) est identifiable dans le site tumoral (Figure 128 g) et correspond à l'emplacement où une forte expression d'IL-13R $\alpha_2$  est définie par immunohistochimie confocale du tissu prélevé (Figure 128 h). Ces deux dernières images indiquent nettement le ciblage par les liposomes des tissus surexprimants les récepteurs  $\alpha_2$  de l'IL-13 et donc l'affinité des liposomes pour les gliomes par rapport au tissu sain. [79]

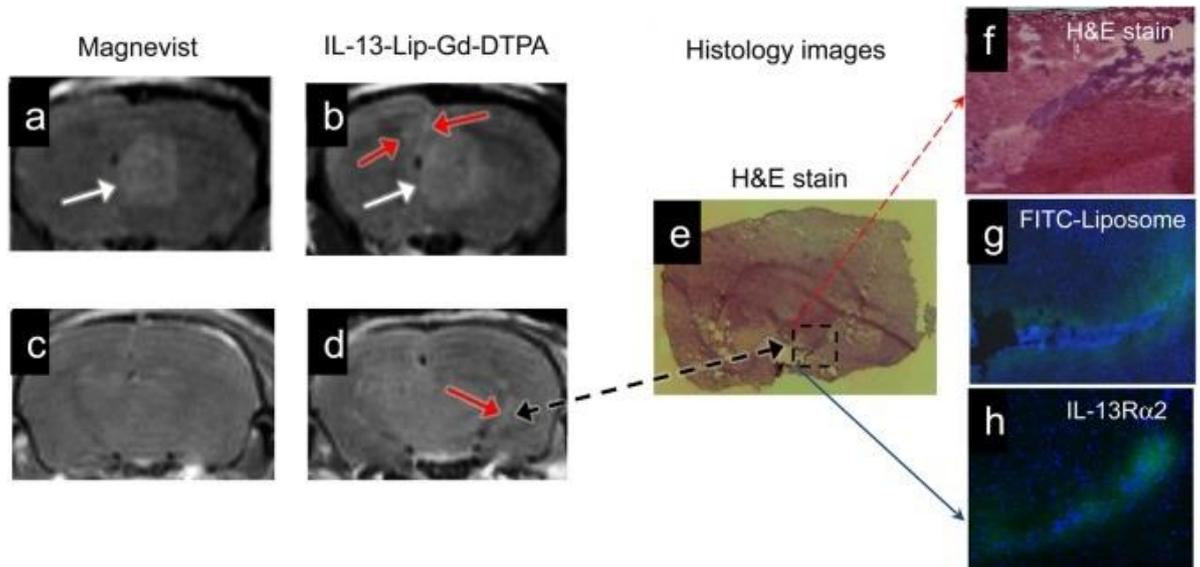


Figure 128 : a,b,c,d : Imagerie par résonance magnétique en T1 d'un gliome chez une même souris traitée par Magnevist® (a, c) puis 24 h après par IL13-Lip-Gd-DTPA (b, d). Les flèches blanches montrent la tumeur primitive. c, d : Images 2 mm en arrière de la tumeur primitive. Flèches rouges : masses tumorales voisines de la tumeur primaire. e : Coupe histologique de l'image d colorée par H&E. f : Agrandissement de e. g : Image des liposomes marqués par FITC. h : Imagerie confocale immunohistochimique de la coupe histologique e recouverte de DAPI pour observer l'expression d'IL-13R $\alpha_2$ . [79]

## C- Thérapie

### *Gd-PEG-Bi* :

Gd-PEG-Bi présente de bonnes capacités en imagerie IRM, PAI et TDM (ou CT), elle permet une excellente identification des localisations tumorales autorisant ainsi une thérapie guidée, ciblée.

Les glioblastomes et les gliomes sont des tumeurs qui majoritairement sont dispersées et profondes. Les tumeurs frontales sont les tumeurs cérébrales qui s'opèrent le mieux. [87] Les chercheurs ont remarqué que cette NP présentait une bonne photostabilité sous 2 minutes d'irradiation à 808 nm répétée 6 fois. Les variations de températures sont similaires à chaque répétition. Aussi les aptitudes photothermiques de Gd-PEG-Bi ont été étudiées *in vitro* et *in vivo* pour des applications en PTT.

### *In vitro* :

Des cellules C6 (de gliomes) ont été incubées *in vitro* avec des solutions de NPs à différentes concentrations pendant 12 h.

Un test de cytotoxicité *in vitro* par microscopie confocale est réalisé pour visualiser la proportion de cellules vivantes et de cellules mortes lorsqu'elles sont en présence ou non de Gd-PEG-Bi et lorsqu'elles sont irradiées ou non. Lorsqu'elles sont viables, les cellules sont colorées en vert au microscope avec la calcéine-AM/PI (Figure 129).

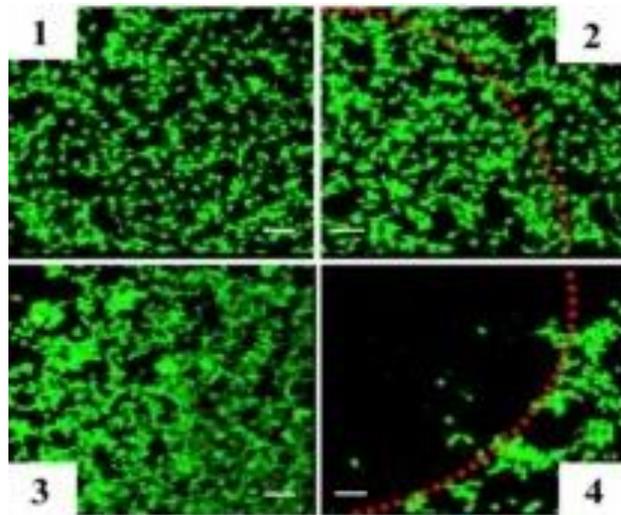


Figure 129 : Image microscope confocale de cellules C6 traitées avec : (1) PBS, (2) irradiation laser 808 nm pendant 10 min, (3) Gd-PEG-Bi, (4) Gd-PEG-Bi et irradiation laser. Les cellules vivantes sont vertes. La zone irradiée est délimitée par les pointillés rouges.

Dans les trois cas où les cellules ne subissent pas le traitement combinant les NPs et l'irradiation, peu de cellules meurent. Pour Gd-PEG-Bi, plus de 80% des cellules sont restées viables en l'absence d'irradiation laser. En revanche, dans le groupe traité par les NPs et irradié au laser dans le proche infra-rouge, la quasi-totalité des cellules présentes dans les zones irradiées sont mortes : le taux de viabilité cellulaire a chuté à 12 % pour une concentration en NPs de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Les cellules situées hors de la zone irradiée ont survécu mais ce résultat est mitigé dans la zone limitrophe où une petite portion des cellules cancéreuses a été détruite.

Cette expérimentation permet de prouver l'action photothermique de Gd-PEG-Bi pouvant potentiellement induire *in vivo* une ablation photothermique des tumeurs. [79]

Signalons qu'une destruction photothermique similaire est constatée chez des cellules normales (COS-7) incubées avec les NPs. *In vitro*, la destruction cellulaire due à l'activité photothermique est donc non sélective. [79]

Une plus grande sélectivité est attendue *in vivo* grâce à l'effet EPR dans les tissus cancéreux induisant une accumulation passive des NPs dans les tumeurs.

#### *In vitro* :

Des cellules C6 ont été injectées dans le flanc de souris afin de développer un modèle de tumeur ectopique de gliomes. Quand les tumeurs ont atteint 50 mm<sup>3</sup>, les souris ont été divisées en plusieurs groupes.

Tout d'abord deux cohortes ont subi une irradiation laser à 808 nm pendant 10 minutes après une injection de PBS pour l'une et de Gd-PEG-Bi pour la seconde. Les images thermiques montrent clairement une élévation de la température tumorale bien plus importante avec la NP qu'avec le PBS : la température augmente de 20°C au bout de 5 minutes d'irradiation chez la souris recevant les NPs alors qu'elle n'augmente que de 8,7°C avec le PBS après 15 minutes d'irradiation (Figure 130a,b).

L'efficacité anti-tumorale est ensuite évaluée par la mesure du volume tumoral et le rapport pondéral avant/après traitement. Pour cela les souris porteuses de tumeurs ont été séparées en 4 groupes de traitements distincts :

- groupe recevant PBS (groupe témoin)
- groupe traité par irradiation laser à 808 nm
- groupe traité par Gd-PEG-Bi
- groupe traité par Gd-PEG-Bi avec irradiation laser

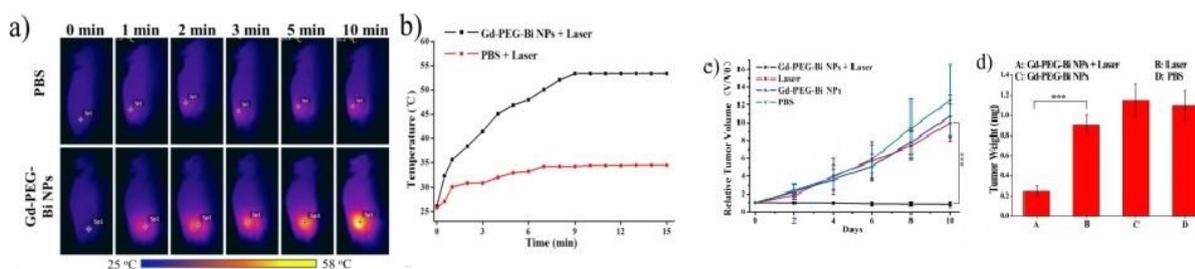


Figure 130 : a) Imagerie thermique des souris recevant PBS ou Gd-PEG-Bi irradiées pendant 10 min à 808 nm, b) Courbe des températures tumorales mesurées chez les souris, c) Courbes de la variation du volume tumoral chez des souris porteuses de tumeurs C6 recevant PBS, Gd-PEG-Bi, irradié ou non dans le proche infra-rouge, d) Ratio du poids tumoral en comparaison avec le poids de la tumeur des souris recevant PBS à J10.

L'évolution de la croissance tumorale pour les souris traitées uniquement par PBS est considérée comme le témoin dans l'expérience. Pour les souris traitées par NPs sans irradiation, l'évolution du volume tumoral ne présente pas de différence significative avec celle du groupe traité par PBS. Le groupe traité par irradiation seule présente une légère diminution de la croissance tumorale. La taille de la tumeur à J10 pour ces trois groupes est à peu près 9 fois supérieure à celle de la tumeur en début d'expérience. Cependant le groupe traité par Gd-PEG-Bi et irradié montre une forte inhibition de la croissance tumorale de 101,1 % (Figure 130). Wu. Bo *et al.* ont d'ailleurs constaté que les tumeurs ont totalement

disparu et qu'aucune récurrence cancéreuse n'a été observée durant la période d'expérimentation.

Gd-PEG-Bi pourrait donc être utilisée pour une ablation des tumeurs du cerveau guidée par imagerie.

### Dendrimères :

Les dendrimères contenant du Gd-DOTA peuvent être utilisés en thérapie.

Associés avec de la prednisolone phosphate (PLP) dans un modèle de mélanome murin [84], ils ont montré un fort bénéfice en imagerie, mais leur efficacité antitumorale est non significative.

Associés avec la doxorubicine, ils deviennent des agents théranostiques pouvant traiter et cibler différents types de cancers. [85]

Pour épargner au maximum les tissus sains en limitant le volume de l'excès lors de la chirurgie, celle-ci peut être guidée par imagerie. Dans ce but une sonde bimodale composée d'un dendrimère de deuxième génération a été élaborée pour le traitement des cancers de la prostate par chirurgie. Ce dendrimère est fonctionnalisé avec :

- Gd-DOTA pour l'imagerie à l'IRM,
- Cyanine5 (Cy5) pour l'imagerie par fluorescence,
- CLT1, un peptide cyclique qui se lie à la fibronectine surexprimée dans le tissu tumoral de la prostate.

Cette sonde bimodale se nomme CLT1-G2-(Gd-DOTA-MA)-Cy5 (Figure 131). [86]

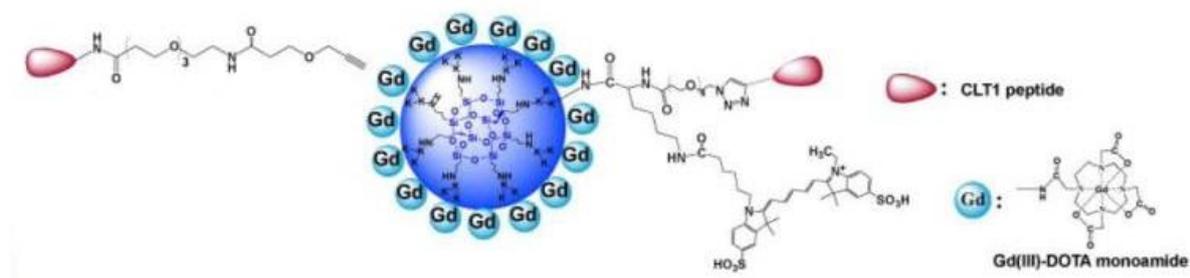


Figure 131 : Schéma de la np CLT1-G2-(Gd-DOTA-MA)-Cy5

Que ce soit avec l'imagerie par fluorescence ou par IRM, la localisation et la délimitation de la tumeur orthotopique chez les souris ont clairement été établies. Toutefois, une accumulation de cette NP a été relevée au niveau des poumons ce qui constitue un frein à son utilisation. Des nanostructures similaires sont donc développées avec un poids moléculaire et une taille hydrodynamique moindres pour pallier à ce problème. [82]

### Liposomes :

Des études *in vitro* sur le liposome GdMSNs-LP couplé avec le peptide KLA ont montré une très grande cytotoxicité contre des cellules cancéreuses. La NP formée possède une biocompatibilité et une stabilité très importante. Les études ont montré que KLA@GdMSNs-Lp possède un potentiel comme agent théranostique. D'autres études restent néanmoins indispensables pour valider cette NP. [80]

## **D- Résumé**

Les NPs vectorisant le gadolinium comme les dendrimères DPC-DTPA-G ou encore les liposomes coiffés à l'interleukine 13 permettent une bien meilleure visualisation des tumeurs que le Magnevist®. Ils pourront constituer dans quelques années des outils indispensables à la détection des cancers du cerveau même si quelques zones d'ombre restent à éclaircir. Ces NPs, tel AGuIX®, constituent d'ores et déjà un bon outil pour le suivi de l'évolution des tumeurs du cerveau. De plus, elles permettent une franche délimitation des tumeurs autorisant à postériori soit une radiothérapie conventionnelle soit une radiothérapie par microfaisceaux bien plus précise. Cela en fait potentiellement d'excellents agents théranostiques qui épargneront au maximum les tissus sains.

En thérapie, très peu de NPs associées au Gd autres que celles décrites précédemment ont fait l'objet d'études thérapeutiques. Gd-PEG-Bi a montré un grand pouvoir de diagnostic en IRM, en tomographie par ordinateur ou en imagerie photoacoustique. Toutes ces techniques permettent une reconstruction précise en 3D de la tumeur. De plus, cette nanoparticule, une fois irradiée, peut aussi traiter la tumeur grâce à son activité photothermique. Tout comme l'IR780, seules les NPs irradiées émettent une chaleur dommageable aux cellules environnantes. La localisation précise de la tumeur via l'imagerie autorise une irradiation toute aussi précise et épargne ainsi au maximum les tissus normaux. De plus, une faible toxicité aux doses expérimentales est observée, aucune lésion des organes vitaux ni de lésion inflammatoire n'est notée. Toutefois, des essais pré-cliniques sur un modèle de tumeur orthotopique doivent être effectués. <sup>[79]</sup>

Des études cliniques pourraient ensuite être entreprises pour valider l'intérêt de l'utilisation de ces NPs chez l'Homme.

# Conclusion

Le Caelyx® a permis une utilisation plus sûre de la doxorubicine en oncologie : la toxicité cardiaque est plus faible avec des effets plus ou moins identiques à ceux de la doxorubicine seule. En effet, cinq fois moins de diminution de la FEVG (Fonction Ejection Ventriculaire Gauche) et une absence totale d'insuffisance cardiaque sont relevés chez les patients traités par Caelyx® en comparaison avec les patients traités à dose équivalente par la doxorubicine. Malgré un effet secondaire (accumulation dans la peau responsable d'EPI), l'utilisation de Caelyx reste préférable à celle de la doxorubicine seule ; Caelyx® est quasiment dépourvu de toxicité dose cumulative contrairement à la doxorubicine seule.

Le glioblastome est connu pour être l'un des rares cancers incurables. Toutefois, l'utilisation de NPs liposomales à base de doxorubicine, modifiées par du glutathion ou des sulfatides à leur surface, permet une meilleure diffusion à travers la BHE et une potentialisation de l'action du cytotoxique pouvant être intéressante dans le traitement. Le liposome modifié au glutathion connaît une meilleure accumulation cérébrale que le Caelyx®, et une accumulation cutanée moindre. Il sera moins pourvoyeur d'effets secondaires de type EPI. De plus, la NP 2B3-101 permet d'augmenter les doses de doxorubicine administrées tout en améliorant le temps de survie des animaux. De nombreuses études restent encore à réaliser sur 2B3-101 pour envisager une utilisation à visée thérapeutique chez l'Homme.

Les liposomes de Dox modifiés avec des sulfatides (SCN-DOX) n'ont pas montré de toxicité cardiaque puisqu'aucun cobaye traité avec cette NP n'a révélé de cardiopathie. Là encore, l'administration de cette NP a permis une augmentation importante du temps de survie.

Reste à comparer SCN-DOX et 2B3-101 pour savoir laquelle a le meilleur profil bénéfique/risque vis-à-vis du glioblastome. L'utilisation de NPs permet d'améliorer l'emploi de la doxorubicine en la rendant à la fois plus sûre et plus efficace que lorsqu'elle est utilisée seule. Les formes liposomales de 2<sup>ème</sup> génération encapsulant la doxorubicine, modifiées au glutathion ou au sulfatide, ne présentent pas d'effets indésirables d'ordre cutané.

Les dendrimères PAMAM G5 permettent également une vectorisation de la doxorubicine. Ils ont montré une bonne efficacité thérapeutique sur un modèle de carcinome hépatocellulaire (CHC). Aucune anomalie cardiaque n'a été observée lors de l'utilisation des dendrimères P1 et P2 chargés de Dox. Les dendrimères semblent être une alternative thérapeutique intéressante à la doxorubicine seule lors du traitement des CHC. P1 présente environ 30 % d'inhibition supplémentaire de la croissance tumorale par rapport à la Dox libre. P2 présente une meilleure tolérance et un profil d'utilisation plus sûr.

Des dendrimères du type DGL ont fait l'objet d'essais pré-cliniques portant sur le CHC. Le taux d'inhibition de la croissance tumorale est presque 2 fois supérieur à celui de la Dox libre, et est également supérieur au taux d'inhibition du dendrimère P1. Une étude comparative des deux dendrimères P1 et MDRGd doit d'être effectuée afin de pouvoir conclure que la doxorubicine vectorisée par DGL présente une efficacité supérieure à celle encapsulée par des dendrimères PAMAM G5. Tout comme P1, MDRGd s'accumule moins dans le tissu cardiaque que la Dox libre. Les souris traitées par la MDRGd n'ont pas connu de variation de poids significative par rapport au groupe témoin. Seul le groupe traité par Dox libre a subi une perte de poids, ce qui signe une toxicité de la molécule. De plus, MDRGd peut être utilisé pour l'IRM.

D'autres DGL reliés à la doxorubicine, coiffés par des ligands RGD sont chargés sur une grosse NP de gélatine. Celle-ci, au contact de la tumeur va rétrécir du fait de l'action des métalloprotéases (MMP-2) présentes au niveau tumoral. Cette action va conduire, après désagrégation de la gélatine, à la libération de RGD-Dox-DGL. Un double ciblage est donc obtenu : un rétrécissement grâce au MMP-2 et une reconnaissance spécifique des cellules tumorales via les ligands RGD. Le relargage de la doxorubicine dans le milieu tumoral est favorisé du fait de l'acidité particulière de celui-ci. Les dendrimères libèrent de façon contrôlée l'agent cytotoxique permettant ainsi d'épargner les tissus sains. Ces NPs présentent un potentiel thérapeutique dans le traitement du cancer du sein.

Un autre type de dendrimère auto-assemblable en micelle permet de contourner le système de résistance du cancer du sein, et offre de nouvelles perspectives de traitement dans la lutte contre les cancers chimio-résistants. De plus ces derniers peuvent être utilisés en IVIS.

D'autres expériences visent à inclure la doxorubicine à l'intérieur d'autres types de NPs, par exemple dans un nanogel ou dans un copolymère. Une meilleure efficacité thérapeutique et une toxicité moindre de la doxorubicine sont alors relevées *in vivo*.

Toutes les NPs citées précédemment ouvrent de nouvelles perspectives dans l'utilisation de la doxorubicine en oncologie jusqu'à présent limitée par sa toxicité. Les NPs ont permis également d'élargir le champ d'utilisation de ce cytotoxique. Il existe néanmoins d'autres NPs pouvant la vectoriser, mais nécessitant encore de nombreuses années de recherche.

Ainsi, les NPs peuvent permettre l'emploi de cytotoxiques délaissés du fait de leur grande toxicité ou de leur faible spécificité pour le tissu tumoral. De plus amples études chez l'Homme sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Des NPs ont intégré à la fois le pouvoir cytotoxique de la doxorubicine mais aussi l'IR780 permettant une ablation thermique des tumeurs guidée par imagerie. L'association de ces deux molécules dans une NP micellaire (mPEG-PAAV/IR780+DOX), accompagnée d'une irradiation laser localisée sur la tumeur a permis la destruction totale de tumeurs 4T1 sans qu'aucune rechute ne soit observée à la fin de l'expérience. Ces résultats sont meilleurs que ceux observés lors de l'utilisation de micelles de Dox ou de micelles d'IR780. Malgré les résultats probants obtenus pour la micelle mPEG-PAAV/IR780+DOX, une étude portant sur des cellules MCF-7 du cancer du sein humain, et dans un modèle orthotopique se doit d'être réalisée avant d'envisager des tests chez l'Homme.

La micelle nommée IPM testée *in vivo* sur des modèles de tumeur de cancer du sein humain résistant à la doxorubicine, montre un bénéfice au niveau de l'activité thérapeutique. Elle constitue un moyen de lutte contre la résistance de certaines tumeurs aux agents chimiothérapeutiques. Ces micelles contenant l'IR780 peuvent être une bonne base pour l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques auxquels certains cancers résistent.

L'IR780 associé aux NPs métalliques supramagnétiques (SPION) offre un excellent moyen d'imagerie des tumeurs et de traitement par PTT. De plus, lorsqu'il est associé au HSA il bénéficie d'une meilleure pénétration tumorale. Ce modèle présente une bonne biocompatibilité. L'IR780 n'est pas couramment utilisé en oncologie mais la nanocapsule formée permet son utilisation comme agent théranostique anticancéreux.

Les liposomes sont aussi utilisés pour vectoriser l'IR780 tout comme les micelles phospholipidiques ou les SLN. Grâce à son hydrophobie, IR780 peut être emprisonné dans la

bicouche phospholipidique des liposomes. Ceci offre la possibilité de libérer le contenu du liposome de façon contrôlée. C'est le système utilisé lors de l'emploi du Sunitinib ou des AMD3100. En termes de diagnostic et d'efficacité anti-tumorale par PTT, toutes ces NPs lipidiques ont montré un grand intérêt. L'utilisation du liposome d'IR780 internalisé associé au Sunitinib a permis un ralentissement de la croissance tumorale après une administration par voie orale. Les autres NPs lipidiques : IR780-AMD-NLCs, IR780-AMD-Lip-NLc et cRGD-IR780 SLN associées à une irradiation, ont provoqué une diminution du volume tumoral allant dans certains cas jusqu'à la destruction totale de la masse tumorale sans réapparition de la tumeur.

Pour PCB-lipid-IR780 la croissance tumorale est inhibée mais sans qu'une destruction totale de la tumeur ne soit observée. Malgré tout, quel que soit le type de nanostructure lipidique employé, les tests de toxicité ont montré une absence de toxicité significative. Leur utilisation de façon sûre doit être vérifiée chez l'Homme.

Les micelles polymériques vectorisant l'IR780 présentent de nombreux avantages diagnostiques. En effet, grâce à la forte affinité des NPs pour la tumeur constatée à l'imagerie NIRF, ces micelles peuvent être utilisées comme agents de contraste afin de localiser précisément des tumeurs en IVIS.

Pour la PTT, les micelles PEG-IR780-C13 présentent, lors d'une irradiation dans le proche infrarouge de la tumeur, une élévation de la température suffisante pour engendrer une diminution du volume tumoral allant jusqu'à la disparition de la tumeur rénale dans la plupart des cas. Les autres micelles associant l'IR780 au NLG919 ont permis une efficacité thérapeutique basée non seulement sur la PTT, mais aussi par une immunomodulation inhibant la croissance tumorale dans la zone périphérique de la cible irradiée. Dans ce dernier cas, les chercheurs ont mis en avant une augmentation du temps de survie de la population traitée. Malgré tout, ces résultats doivent être comparés aux traitements actuellement utilisés dans la thérapie du cancer du sein afin d'évaluer le bénéfice potentiel de cette micelle.

Les NPs permettent d'utiliser de diverses façons l'IR780 en lui conférant un profil toxique intéressant : en thérapie photothermique, en thérapie combinée, en diagnostic ou pour le théranostique. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles non seulement pour l'utilisation de l'IR780, ne présentant jusqu'alors que peu d'intérêt en oncologie, mais aussi pour la vectorisation d'autres éléments peu pertinents dans ce domaine.

Des études comparatives avec les traitements actuels doivent être effectuées avant de conclure à une meilleure efficacité des NPs vectorisant l'IR780.

Le gadolinium est actuellement très utilisé en diagnostic. Une NP vectorisant le DOTAGA Gd : AGuIX® montre des propriétés de contraste supérieures au Dotarem® et au Magnevist® à l'IRM avec une délimitation plus franche et plus nette des tumeurs. D'autres GBNs présentent aussi de bons résultats en IRM du fait d'une accumulation plus importante dans les tumeurs cérébrales. La MRT et la radiothérapie conventionnelle, en association avec ces NPs accentuent l'effet anti-tumoral grâce au pouvoir radiosensibilisant du Gd.

Les résultats obtenus lors des mesures des temps de survie sont encourageants. Des tests cliniques ont montré des effets prometteurs sur les métastases cérébrales de différents cancers.

Cependant la MRT associée aux NPs doit être davantage approfondie avant d'être utilisée dans les phases cliniques. AGuIX® peut aussi être administrée par voie aérienne ce qui est intéressant pour le traitement des cancers pulmonaires. Dans le cancer du poumon non à

petites cellules, l'association de la RT avec SiBiGdNP a entraîné une destruction totale des tumeurs dans le modèle murin.

La toxicité de ces NPs utilisées en RT n'est pas plus importante pour les tissus sains que lors de l'utilisation de la RT seule ; la différence avec les groupes ne recevant aucun traitement n'est pas significative. Elles possèdent une activité thérapeutique et un meilleur potentiel en imagerie par IRM que les agents de contraste actuellement commercialisés.

Une majorité de ces NPs sont déjà en phase d'essai clinique (projet NanoRAD par exemple).

D'autres types de NPs peuvent vectoriser le gadolinium. Leurs principales utilisations seront le traitement et/ou le diagnostic précis des gliomes. Pour le diagnostic, les produits ont tous révélé une bien meilleure accumulation au niveau des tumeurs orthotopiques que les produits de contraste à base de Gd commercialisés. En effet, dans la plupart des études, les NPs sont comparées à l'utilisation du Magnevist®. Les résultats montrent, à l'IRM, une démarcation nette de la tumeur permettant de la localiser avec précision. De plus, certaines NPs ont permis l'utilisation de l'imagerie photoacoustique ou encore de la tomographie par émission de positons permettant une visualisation intégrale de la tumeur et sa représentation en trois dimensions grâce au PAI. C'est notamment le cas pour la NP de Gd couplé au Bi. Ces NPs ont aussi fait l'objet d'un test *in vivo* avec une irradiation dans le proche infrarouge tout comme l'IR780. Les résultats illustrent une efficacité permettant d'envisager l'emploi de Gd-PEG-Bi comme agent nanotheranostique. Les liposomes couplés à une interleukine et les dendrimères chargés en Gd ont eux aussi montré un grand intérêt en imagerie IRM pour les gliomes.

Des chercheurs ont mis au point un liposome présentant à la fois le Gd et un peptide cytotoxique : le KLA. Des tests *in vivo* sont en cours de réalisation.

Toutes ces NPs qui vectorisent le Gd ont permis un diagnostic pré-clinique des cancers de façon plus efficace que les produits actuellement utilisés et peuvent être associées à la RT, la MRT, la NIR ou la chirurgie pour combattre le cancer.

De nombreux produits anticancéreux sont apparus ces dernières années et les produits de contraste sont d'ores et déjà présents en officine. Même si dans la plupart des cas de nombreux tests et essais doivent intervenir, il est donc légitime de supposer que certaines nanoparticules de contraste à base de gadolinium pourront être accessibles en pharmacie ainsi que d'autres produits anticancéreux pris par voie orale ou trachéale.

# Bibliographie

- [1] Comprendre Le cancer, qu'est-ce que c'est ? | *Thierry Souccar Editions*. Disponible sur: <https://www.thierrysouccar.com/sante/info/le-cancer-quest-ce-que-cest-2468>
- [2] Ségala Grégory. *L'angiogenèse du tissu tumoral*. 28 février 2012. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/13/>
- [3] *Cancer*. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [4] *Les nanovecteurs*. Disponible sur: <http://nanotechna.e-monsite.com/pages/nano-objets/les-nanovecteurs.html>
- [5] Bondia AM, Larcher N, Garrelly L, Rossi JC, Pascal R. Synthesis and ligation ability of mono-aminoxy-functionalized dendrigraft poly-l-lysine (DGL). *Tetrahedron Letters*. juin 2010, 51(25), 3330-3333. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.04.078
- [6] PAMAM Dendrimers. Disponible sur: <http://www.dendritech.com/pamam.html>
- [7] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine*, 2 févr 2015, 10, 975-999. DOI: 10.2147/IJN.S68861
- [8] Saupe A, Gordon KC, Rades T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm*, 11 mai 2006, 314(1), 56-62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.022
- [9] Wu M, Huang S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mol. Clin. Oncol.*, nov 2017, 7(5), 738-746. DOI: 10.3892/mco.2017.1399
- [10] Closa D. Los desafíos de la Ciencia. *La nanomedicina*. 2017
- [11] Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius var. caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969, 11(6), 1101-1110. DOI: 10.1002/bit.260110607
- [12] Gallani, A. Etude du profil de sécurité des spécialités à base de doxorubicine : influence de la forme galénique. Thèse d'exercice université de Lorraine (2016)
- [13] Wibroe PP, Ahmadvand D, Oghabian MA, Yaghmur A, Moghimi SM. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. *Journal of Controlled Release*, 2016, 221, 1-8. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.11.021
- [14] Lin J, Shigdar S, Fang DZ, Xiang D, Wei MQ, Danks A, et al. Improved Efficacy and Reduced Toxicity of Doxorubicin Encapsulated in Sulfatide-Containing Nanoliposome in a Glioma Model. *PLoS One*, 2014, 9(7), e103736. DOI: 10.1371/journal.pone.0103736

- [15] Gaillard PJ, Appeldoorn CCM, Dorland R, van Kregten J, Manca F, Vugts DJ, et al. Pharmacokinetics, Brain Delivery, and Efficacy in Brain Tumor-Bearing Mice of Glutathione Pegylated Liposomal Doxorubicin (2B3-101). *PLoS One*, 2014, 9(1), e82331. DOI: 10.1371/journal.pone.0082331
- [16] Gabizon, A., Shmeeda, H. & Barenholz, Y. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, 42(5), 419-436. DOI : 10.2165/00003088-200342050-00002
- [17] Shao K, Q Hou, Duan W, ML Go, Wong KP, et al. Intracellular drug delivery by sulfatide-mediated liposome to gliomas. *J. Control. Release*, 2006, 115(2), 150-157. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.07.024
- [18] Kuruvilla SP, Tiruchinapally G, Crouch AC, ElSayed MEH, Greve JM. Dendrimer-doxorubicin conjugates exhibit improved anticancer activity and reduce doxorubicin-induced cardiotoxicity in a murine hepatocellular carcinoma model. *PLoS One*, 2017, 12(8), e0181944. DOI: 10.1371/journal.pone.0181944
- [19] Blanc JF, Barbare JC, Baumann AS, Boige V, Boudjema K, Bouattour M, Crehange G, Dauvois B, Decaens T, Dewaele F, Farges O, Guiu B, Hollebecque A, Merle P, Roth G, Ruiz I, Selves J. «Carcinome hépatocellulaire». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, Décembre 2017
- [20] Shen J-M, Li X-X, Fan L-L, Zhou X, Han J-M, Jia M-K, et al. Heterogeneous dimer peptide-conjugated polylysine dendrimer-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite as a novel nanoscale molecular probe for early diagnosis and therapy in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, 12, 1183-1200. DOI: 10.2147/IJN.S126887
- [21] Han L, Liu M, Ye D, Zhang N, Lim E, Lu J, et al. Tumor cell membrane-targeting pH-dependent electron donor-acceptor fluorescence systems with low background signals. *Biomaterials*, 1 mars 2014, 35 (9), 2952-2960. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2013.12.020
- [22] Sun X, Li Y, Liu T, Li Z, Zhang X, Chen X. Peptide-based imaging agents for cancer detection. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, févr 2017, 110-111, 38-51. DOI : 10.1016/j.addr.2016.06.007
- [23] Chen B, Cao S, Zhang Y, Wang X, Liu J, Hui X, et al. A novel peptide (GX1) homing to gastric cancer vasculature inhibits angiogenesis and cooperates with TNF alpha in anti-tumor therapy. *BMC Cell Biol*, 9 sept 2009, 10, 63. DOI : 10.1186/1471-2121-10-63
- [24] Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1 janv 2011, 63(1), 24-46. DOI : 10.1016/j.addr.2010.05.006
- [25] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, janv 2002, 2(1), 48-58. DOI : 10.1038/nrc706

- [26] Hu G, Zhang H, Zhang L, Ruan S, He Q, Gao H. Integrin-mediated active tumor targeting and tumor microenvironment response dendrimer-gelatin nanoparticles for drug delivery and tumor treatment. *Int. J. Pharm.*, 30 déc 2015, 496(2), 1057-1068. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2015.11.025
- [27] Wei T, Chen C, Liu J, Liu C, Posocco P, Liu X, et al. Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance. *PNAS*, 10 mars 2015, 112(10), 2978-2983. DOI : 10.1073/pnas.1418494112
- [28] Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1 nov 2009, 27(31), 5287-5297. DOI : 10.1200/JCO.2009.23.5556
- [29] Hu G, Chun X, Wang Y, He Q, Gao H. Peptide mediated active targeting and intelligent particle size reduction-mediated enhanced penetrating of fabricated nanoparticles for triple-negative breast cancer treatment. *Oncotarget*, 12 oct 2015, 6(38), 41258-41274.
- [30] Cinar G, Ozdemir A, Hamsici S, Gunay G, Dana A, B. Tekinay A, et al. Local delivery of doxorubicin through supramolecular peptide amphiphile nanofiber gels. *Biomaterials Science*, 2017, 5(1), 67-76. DOI : 10.1039/C6BM00656F
- [31] Bae Y, Kataoka K. Intelligent polymeric micelles from functional poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10 août 2009, 61(10), 768-784. DOI : 10.1016/j.addr.2009.04.016
- [32] Lv S, Li M, Tang Z, Song W, Sun H, Liu H, et al. Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 1 déc 2013, 9(12), 9330-9342. DOI : 10.1016/j.actbio.2013.08.015
- [33] Sigma-Aldrich. IR-780 iodide 425311. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/>
- [34] Alves CG, Lima-Sousa R, de Melo-Diogo D, Louro RO, Correia IJ. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. *International Journal of Pharmaceutics*, 5 mai 2018, 542(1), 164-175. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2018.03.020
- [35] Jiang, Chenxiao, Hao Cheng, Ahu Yuan, Xiaolei Tang, Jinhui Wu, et Yiqiao Hu. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. *Acta Biomaterialia*, 2015, 14, 61-69. DOI : 10.1016/j.actbio.2014.11.041
- [36] Maeda, Hiroshi, Jun Fang, Takao Inutsuka, et Yasunori Kitamoto. Vascular Permeability Enhancement in Solid Tumor: Various Factors, Mechanisms Involved and Its Implications. *International Immunopharmacology*, 2003, 3(3), 319-328. DOI : 10.1016/S1567-5769(02)00271-0
- [37] Lin, Ssu-Yu, Rih-Yang Huang, Wei-Chen Liao, Chun-Chiao Chuang, et Chien-Wen Chang. Multifunctional PEGylated Albumin/IR780/iron Oxide Nanocomplexes for Cancer

- Photothermal Therapy and MR Imaging. *Nanotheranostics*, 2018, 2(2), 106-116. DOI : 10.7150/ntno.19379
- [38] Li S, Johnson J, Peck A, Xie Q. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. *J. Transl. Med.*, 23 janv 2017, 15. DOI : 10.1186/s12967-016-1115-2
- [39] Yang X, Li H, Qian C, Guo Y, Li C, Gao F, et al. Near-infrared light-activated IR780-loaded liposomes for anti-tumor angiogenesis and Photothermal therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1 oct 2018, 14(7), 2283-2294. DOI : 10.1016/j.nano.2018.06.011
- [40] Raymond E, Dahan L, Raoul J-L, Bang Y-J, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *New England Journal of Medicine*, 10 févr 2011, 364(6), 501-513. DOI : 10.1056/NEJMoa1003825
- [41] Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *The Lancet*, 15 déc 2007, 370(9604), 2011-2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61865-0
- [42] Choi J, Rustique E, Henry M, Guidetti M, Josserand V, Sancey L, et al. Targeting tumors with cyclic RGD-conjugated lipid nanoparticles loaded with an IR780 NIR dye: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 5 nov 2017, 532(2), 677-685. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2017.03.007
- [43] Kuang Y, Zhang K, Cao Y, Chen X, Wang K, Liu M, et al. Hydrophobic IR-780 Dye Encapsulated in cRGD-Conjugated Solid Lipid Nanoparticles for NIR Imaging-Guided Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12 avr 2017, 9(14), 12217-12226. DOI : 10.1021/acsami.6b16705
- [44] Li H, Wang K, Yang X, Zhou Y, Ping Q, Oupicky D, et al. Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. *Acta Biomaterialia*, 15 avr 2017, 53, 399-413. DOI : 10.1016/j.actbio.2017.01.070
- [45] Li H, Yang X, Zhou Z, Wang K, Li C, Qiao H, et al. Near-infrared light-triggered drug release from a multiple lipid carrier complex using an all-in-one strategy. *Journal of Controlled Release*, 10 sept 2017, 261, 126-137. DOI : 10.1016/j.jconrel.2017.06.029
- [46] Chen G, Wang K, Zhou Y, Ding L, Ullah A, Hu Q, et al. Oral Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Near-Infrared Dye for Image-Guided Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 28 sept 2016, 8(38), 25087-25095. DOI : 10.1021/acsami.6b07425
- [47] Rajendrakumar SK, Chang N-C, Mohapatra A, Uthaman S, Lee B-I, Tsai W, et al. A Lipophilic IR-780 Dye-Encapsulated Zwitterionic Polymer-Lipid Micellar Nanoparticle for Enhanced Photothermal Therapy and NIR-Based Fluorescence Imaging in a Cervical Tumor Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.*, 13 avr 2018, 19(4). DOI : 10.3390/ijms19041189

- [48] Yuan A, Qiu X, Tang X, Liu W, Wu J, Hu Y. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. *Biomaterials*, 1 mai 2015, 51, 184-193. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2015.01.069
- [49] Qiu X, Xu L, Zhang Y, Yuan A, Wang K, Zhao X, et al. Photothermal Ablation of in Situ Renal Tumor by PEG-IR780-C13 Micelles and Near-Infrared Irradiation. *Mol. Pharmaceutics*, 7 mars 2016, 13(3), 829-838. DOI : 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00734
- [50] Yan L, Wang H, Zhang A, Zhao C, Chen Y, Li X. Bright and Stable Near-Infrared Pluronic-Silica Nanoparticles as a Contrast Agent for in vivo Optical Imaging. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.*, 2016, 4(33), 5560-5566. DOI : 10.1039/C6TB01234E
- [51] Peng J, Xiao Y, Li W, Yang Q, Tan L, Jia Y, et al. Photosensitizer Micelles Together with IDO Inhibitor Enhance Cancer Photothermal Therapy and Immunotherapy. *Adv. Sci.*, 26 févr 2018, 5(5). DOI : 10.1002/advs.201700891
- [52] NLG-919 (CAS 1402836-58-1) | Cayman Chemical. Disponible sur: <https://www.caymanchem.com/product/21509>
- [53] Yang Z, Cheng R, Zhao C, Sun N, Luo H, Chen Y, et al. Thermo- and pH-dual responsive polymeric micelles with upper critical solution temperature behavior for photoacoustic imaging-guided synergistic chemo-photothermal therapy against subcutaneous and metastatic breast tumors. *Theranostics*, 16 juill 2018, 8(15), 4097-4115. DOI : 10.7150/thno.26195
- [54] Li Z, Wang H, Chen Y, Wang Y, Li H, Han H, et al. pH- and NIR Light-Responsive Polymeric Prodrug Micelles for Hyperthermia-Assisted Site-Specific Chemotherapy to Reverse Drug Resistance in Cancer Treatment. *Small*, 4 avr 2016, 12(20), 2731-2740. DOI : 10.1002/smll.201600365
- [55] Jezierska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med. Sci. Monit.*, févr 2009, 15(2), 32-40
- [56] Présentation de l'IRM : principe et fonctionnement de l'IRM sur chimie sup. Disponible sur : <http://chimie.sup.pagesperso-orange.fr/IRM.html>
- [57] Lux F, Sancey L, Bianchi A, Crémillieux Y, Roux S, Tillement O. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine*, 25 févr 2015, 10(11), 1801-1815. DOI : 10.2217/nnm.15.30
- [58] Ramalho J, Ramalho M, Jay M, Burke LM, Semelka RC. Gadolinium toxicity and treatment. *Magn. Reason. Imaging*, 2016, 34(10), 1394-1398. DOI : 10.1016/j.mri.2016.09.005
- [59] Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.*, 2014, 5(1). DOI : 10.1186/s12645-014-0004-8

- [60] Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, et al. Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles. *ACS Nano*, 27 déc 2011, 5(12), 9566-9574. DOI : 10.1021/nn202797h
- [61] Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, et al. A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications. *Chemistry – A European Journal*, 2013, 19(19), 6122-6136. DOI : 10.1002/chem.201203003
- [62] Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C, et al. Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 16 déc 2011, 50(51), 12299-12303. DOI : 10.1002/anie.201104104
- [63] Detappe A, Thomas E, Tibbitt MW, Kunjachan S, Zavidij O, Parnandi N, et al. Ultrasmall Silica-Based Bismuth Gadolinium Nanoparticles for Dual Magnetic Resonance–Computed Tomography Image Guided Radiation Therapy. *Nano Lett.*, 8 mars 2017, 17(3), 1733-1740. DOI : 10.1021/acs.nanolett.6b05055
- [64] Dufort S, Le Duc G, Salomé M, Bentivegna V, Sancey L, Bräuer-Krisch E, et al. The High Radiosensitizing Efficiency of a Trace of Gadolinium-Based Nanoparticles in Tumors. *Sci. Rep.*, 14 juill 2016, 6. DOI : 10.1038/srep29678
- [65] Lux F, Sancey L, Bianchi A, Crémillieux Y, Roux S, Tillement O. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine*, 25 févr 2015, 10(11), 1801-1815. DOI : 10.2217/nnm.15.30
- [66] Serduc R. Effets de la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron sur la microvascularisation cérébrale saine et tumorale chez la souris. Thèse de doctorat en Génie biologique et médical. Université Joseph Fourier (Grenoble). 2006.
- [67] Lux F, Tran VL, Thomas E, Dufort S, Rossetti F, Martini M, et al. AGuIX® from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *BJR*, 18 sept 2018, 92(1093). DOI : 10.1259/bjr.20180365
- [68] Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.*, sept 2014, 87(1041). DOI : 10.1259/bjr.20140134
- [69] Lux F, Detappe A, Dufort S, Sancey L, Louis C, Carme S, et al. Nanoparticules ultrafines en radiothérapie : le cas des AGuIX. *Cancer/Radiothérapie*, 1 oct 2015, 19(6), 508-514. DOI : 10.1016/j.canrad.2015.05.019
- [70] Bianchi A, Dufort S, Lux F, Fortin P-Y, Tassali N, Tillement O, et al. Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 24 juin 2014, 111(25), 9247-9252. DOI : 10.1073/pnas.1402196111
- [71] Lux F, Tran VL, Thomas E, Dufort S, Rossetti F, Martini M, et al. AGuIX® from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *BJR*, 18 sept 2018, 92(1093). DOI : 10.1259/bjr.20180365

- [72] Gimenez P. Radiotherapy by photoactivation of nanoparticles and Mössbauer effect [Theses]. Université Grenoble Alpes; 2015
- [73] Štefančíková L, Lacombe S, Salado D, Porcel E, Pagáčová E, Tillement O, et al. Effect of gadolinium-based nanoparticles on nuclear DNA damage and repair in glioblastoma tumor cells. *J. Nanobiotechnology*, 28 juill 2016, 14. DOI : 92(1093). DOI : 10.1259/bjr.20180365
- [74] Sancey L, Kotb S, Truillet C, Appaix F, Marais A, Thomas E, et al. Long-Term in Vivo Clearance of Gadolinium-Based AGuIX Nanoparticles and Their Biocompatibility after Systemic Injection. *ACS Nano*, 24 mars 2015, 9(3), 2477-2488. DOI : 10.1021/acsnano.5b00552
- [75] Wu B, Lu S-T, Yu H, Liao R-F, Li H, Lucie Zafitatsimo BV, et al. Gadolinium-chelate functionalized bismuth nanotheranostic agent for in vivo MRI/CT/PAI imaging-guided photothermal cancer therapy. *Biomaterials*, mars 2018, 159, 37-47. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2017.12.022
- [76] Li J, Huang S, Shao K, Liu Y, An S, Kuang Y, et al. A choline derivate-modified nanoprobe for glioma diagnosis using MRI. *Sci. Rep.*, 8 avr 2013, 3. DOI : 10.1038/srep01623
- [77] Debinski W, Gibo DM, Hulet SW, Connor JR, Gillespie GY. Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5(5), 985-990.
- [78] Witusik-Perkowska M, Zakrzewska M, Szybka M et al. Astrocytoma-associated antigens - IL13Ralpha2, Fra-1, and EphA2 as potential markers to monitor the status of tumour-derived cell cultures in vitro. *Cancer Cell Int.*, 2014, 14, 82. DOI : 10.1186/s12935-014-0082-z
- [79] Liu X, Madhankumar AB, Miller PA, Duck KA, Hafenstein S, Rizk E, et al. MRI contrast agent for targeting glioma: interleukin-13 labeled liposome encapsulating gadolinium-DTPA. *Neuro Oncol.*, mai 2016, 18(5), 691-699. DOI : 10.1093/neuonc/nov263
- [80] Jin Y, Zhang N, Li C, Pu K, Ding C, Zhu Y. Nanosystem composed with MSNs, gadolinium, liposome and cytotoxic peptides for tumor theranostics. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 1 mars 2017, 151, 240-248. DOI : 10.1016/j.colsurfb.2016.12.024
- [81] Z. Zha, Z. Deng, Y. Li, C. Li, J. Wang, S. Wang, E. Qu, Z. Dai. Biocompatible polypyrrole nanoparticles as a novel organic photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging. *Nanoscale*, 2013, 5(10), 4462-4467. DOI : 10.1039/C3NR00627A
- [82] Ray S, Li Z, Hsu C-H, Hwang L-P, Lin Y-C, Chou P-T, et al. Dendrimer- and copolymer-based nanoparticles for magnetic resonance cancer theranostics. *Theranostics*, 29 nov 2018, 8(22), 6322-6349. DOI : 10.7150/thno.27828
- [83] Lipsitz D. et al. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Vet. Pathol.*, 2003.

- [84] Filippi M, Catanzaro V, Patrucco D, Botta M, Tei L, Terreno E. First in vivo MRI study on theranostic dendrimersomes. *Journal of Controlled Release*, 28 févr 2017, 248,45-52. DOI : 10.1016/j.jconrel.2017.01.010
- [85] Zhu J, Xiong Z, Shen M. et al. Encapsulation of doxorubicin within multifunctional gadolinium-loaded dendrimer nanocomplexes for targeted theranostics of cancer cells. *RSC Adv*, 2015, 5(38), 30286-30296. DOI : 10.1039/C5RA01215E
- [86] Tan M, Ye Z, Lindner D, Brady-Kalnay SM, Lu Z-R. Synthesis and Evaluation of a Targeted Nanoglobular Dual-Modal Imaging Agent for MR Imaging and Image-Guided Surgery of Prostate Cancer. *Pharm. Res.*, juin 2014, 31(6), 1469-1476. DOI : 10.1007/s11095-013-1008-5
- [87] La chirurgie des glioblastomes et des gliomes malins ou bas grade. Disponible sur: <http://gfme.free.fr/therap/chirur.html>

# Abréviations

2B3-101 = liposome contenant du glutathion de doxorubicine pégylé  
AA = Acide Aminé  
AmDM/Dox = micelle de dendrimère amphiphile chargée de doxorubicine  
AMM = Autorisation de Mise sur le Marché  
BHE = Barrière Hemato-Encephalique  
CHC = Carcinome HepatoCellulaire  
CM = CardioMyocytes  
Cryo-TEM = Cryogenic Transmission Electron Microscopy  
DCI = Dénomination Commune Internationale  
DGL = dendrigraphe de Lysine  
Dox libre = doxorubicine libre (seule)  
Dox-NPs = doxorubicine chargé dans des NPs composés de mPEG-b-P(Glu-co-Phe)  
Dox/PA = doxorubicine chargé dans le gel de nanofibre de PA  
DOTA = acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraaccétique  
DOTAGA = DOTA+acide glutamique  
DPPC = 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine  
DSPC = 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
DSPE = di-stearoyl-phosphatidyl-ethanolamine  
DT = 1-dodécane-thiol  
DTPA = acide diéthylènetriaminepentaacétique  
DTPA-BC = DTPA-bis-hexadecylamide  
EPI = érythrodysesthésies palmo-plantaires (ou syndrome main-pied)  
EPR = Enhanced Permeability and Retention  
GBN = Gadolinium-Based Nanoparticle (Nanoparticule contenant du gadolinium)  
GNP = NP de gelatine  
GSH = Glutathion  
HAI = Hemagglutination Inhibition Assay  
HIP = HSA + IR780  
HISP = Nanocomplexe formé par HSA, SPIO et IR780  
HSA = Serum albumin humaine  
HSP = HSA + SPIO  
IRM = Imagerie par résonance magnétique  
IVIS = In vivo imaging system  
LNP = Lipidic NanoParticle (nanoparticule lipidique)  
MDRGd = MNP-DGL-RGD-GX1-Dox  
MEB = Microscopie Electronique à Balayage  
MET = Microscope Electronique à Transmission  
MMP-2 = Matrice MétalloProtéinases de type 2  
MNP = Np métallique composé d'oxyde de fer (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)  
MRT = Microbeam Radiation Therapy (radiothérapie par micro-faisceaux)  
NIR = Proche infrarouge  
NLC = Nanostructured Lipid Carrier  
NPs = Nanoparticules  
OMS = Organisation Mondiale de la Santé  
PA = peptide amphiphile  
PAMAM = polyamidoamine

PDT= Thérapie PhotoDynamique  
PEG = polyéthylène glycol  
PEO = poly(oxyde d'éthylène)  
PLP = prednisolone phosphate  
PMPC = poly(MéthacryloyloxyéthylPhosphorylCholine)  
ppb = part per billion  
PPO = poly(oxyde de propylène)  
PTT= Thérapie photothermique  
RCP = réunion de Concertation Pluridisciplinaire  
RDDG = RGD-Dox-DGL-GNP  
RES = Système réticulo-endothélial  
SCL = Sulfatine-Containing Liposome  
SCN = Sulfatine-Containing Nanoliposome  
SCN = Sulfatine-Containing Nanoliposome  
SLN = Solid Lipid NP  
SPIO = SupraParamagnetic Iron Oxyde  
TACE = TransArterial ChemoEmbolization  
TDM = TomoDensitoMétrie  
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

# Résumé

Ces dernières années, les nanoparticules connaissent un grand essor dans le domaine de la médecine et de la recherche.

L'utilisation des nanoparticules ouvre des perspectives révolutionnaires et constitue un réel tournant dans l'histoire de la médecine. En effet, leurs applications sont nombreuses. Elles peuvent contribuer à diminuer la toxicité de principes actifs particulièrement iatrogéniques, à élargir le champ des possibles en permettant l'emploi de produits, en diagnostic et/ou en thérapie, qui jusqu'alors, n'étaient soit pas utilisés, soit utilisés dans un seul de ces domaines. Cette nouvelle technologie permet d'envisager la mise au point de produits « théranostiques », dont l'utilisation en diagnostic tout comme en thérapie, permet de cartographier et de cibler efficacement les tumeurs.

La doxorubicine, l'IR780 ou bien encore le gadolinium pour ne citer que ceux-ci, ont fait l'objet de nombreuses études, et les résultats sont encourageants.

Du fait de nos modes de vie à risque, et du vieillissement de la population, le nombre de cancers dans le monde ne fait qu'augmenter. A l'heure actuelle, certains d'entre eux sont résistants aux traitements conventionnels et aboutissent à des impasses thérapeutiques. Les nanoparticules pourraient constituer une nouvelle arme au sein de l'arsenal thérapeutique disponible, en traitant les tumeurs tout en améliorant la qualité de vie des patients.

De nombreuses études et années de recherche doivent encore être menées avant de les inscrire dans les protocoles de traitements en oncologie.

Cette nouvelle médecine tiendra-elle toutes ses promesses ?

Mots-clefs :

- Nanoparticules
- Théranostique
- Oncologie
- Doxorubicine
- IR780
- Gadolinium