

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTE DE PHARMACIE DE
MARSEILLE

LE 9 JUILLET 2021

PAR

MR BENOIT IMMORDINO

Né le 17 DECEMBRE 1996 à MARSEILLE

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

Stratégies d'immunomodulation en oncologie expérimentale

JURY :

Président : Pr. Joseph Ciccolini

Membres : Dr. Raphaëlle Fanciullino
Dr. Bertrand Pourroy
Dr. Guillaume Sicard

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT

Chargés de Mission : Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE

Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE

Doyens honoraires : M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,

Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT

Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI

Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL

Chef de Cabinet : Mme Aurélie BELENGUER

Responsable de la Scolarité : Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Dujé BURIC
--	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

REMERCIEMENTS :

Je remercie mon président de jury, le Pr. Joseph Ciccolini pour les opportunités qu'il m'a offert durant mon cursus ainsi que pour m'avoir permis de réaliser ce stage au cours duquel j'ai énormément appris et progressé.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr. Raphaëlle Fanciullino pour m'avoir encadré, transmis son savoir sur les nanoparticules ainsi que pour sa gentillesse.

Je remercie le Dr. Bertrand Pourroy de me faire l'immense honneur de siéger parmi mon jury de thèse.

Je remercie le Dr. Anne Rodallec pour m'avoir transmis son intérêt pour les nanotechnologies au cours de ces dernières années.

Je remercie mes parents pour l'éducation et les valeurs qu'ils m'ont transmis, c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci à mes grand-mères Nicole et Thi Ung d'avoir toujours été là pour moi.

Je remercie mon frère Maxime et ma sœur Marina pour m'avoir apporté leur amour toutes ces années. Merci également à Jérémy mon beau-frère et Elodie ma belle-sœur pour leur gentillesse et leur affection.

Je remercie également mes tantes et oncles Corinne, Olivier, Germaine, Emilienne, Pierre pour leur affection et leur présence.

Merci également au reste de ma famille et à mes proches pour avoir été présents toutes ces années.

Je remercie Sarah Giacometti pour m'avoir formé et pour sa disponibilité (abonnez-vous @sun_the_berner).

Je remercie Mélanie Donnette pour son aide et sa convivialité.

Je remercie Guillaume Sicard pour son soutien et sa gentillesse.

Merci au Dr. Florence Gattacceca pour sa disponibilité ainsi que pour l'enseignement de qualité que j'ai eu la chance de recevoir durant le M2PK.

Merci également à l'ensemble de l'équipe COMPO et au Dr. Sébastien Benzekry pour leur accueil chaleureux.

Merci à mes potes Nico, Gwé, Manu, Yann, Thibaud, Maël, Kev d'être des personnes respectables et pour leur présence précieuse.

Merci Chris !

« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS. »

RESUME :

L'essor de l'immunothérapie a considérablement changé les perspectives thérapeutiques en oncologie. Dans plusieurs types de cancers, principalement le mélanome métastatique et le cancer du poumon, l'utilisation des inhibiteurs de checkpoints de l'immunité (ICI), une classe d'immunothérapie, a révolutionné la prise en charge des patients et a démontré des résultats d'une efficacité sans précédent. Malheureusement, peu de patients sont répondeurs lorsque ces thérapies sont administrées seules. Différentes combinaisons sont donc actuellement évaluées en recherche expérimentale et en clinique, notamment l'association avec certains cytotoxiques et nanomédicaments ayant la propriété de « booster » les immunothérapies¹. Ces thérapeutiques présentent la propriété d'activer l'immunité au sein du microenvironnement des tumeurs ne répondant pas aux immunothérapies. Ce mémoire décrit le travail d'optimisation d'un immunoliposome préalablement développé et combinant le trastuzumab (Herceptin®) et le docétaxel (Taxotère®), deux molécules constituant le traitement de référence dans le cancer du sein. Ce travail s'inscrit dans un projet visant à terme, à évaluer les propriétés immunomodulatrices de cette forme vectorisée en association avec un antiangiogénique et un anti-PDL1 dans un modèle murin de cancer du sein. Nous présenterons dans ce mémoire la caractérisation de ce nanovecteur et les spécificités attendues, ainsi que les matériels et méthodes utilisés afin d'évaluer les différentes formulations testées. Il y sera également détaillé les travaux expérimentaux préliminaires à l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de ses propriétés immunomodulatrices.

Mots clés : Nanomédicaments, Liposome, Cancer du sein, Docétaxel, Trastuzumab, Formulation

Table des matières

Liste des abréviations	13
Partie I Introduction	15
Partie II Les Nanoparticules en oncologie : principe et applications	17
A. Nanoparticules et concept de la « Magic Bullet »	17
B. Ciblage passif : L'EPR effect	17
C. Pharmacocinétique des nanomédicaments	18
C.1. Absorption des nanomédicaments.....	19
C.2. Distribution des nanomédicaments.....	19
C.3. Élimination des nanomédicaments	20
D. Différentes classes de nanoparticules	22
D.1. Vecteurs polymériques	22
D.2. Vecteurs lipidiques.....	23
D.3. Vecteurs inorganiques	24
D.4. Conjugués anticorps-médicaments.....	26
D.5. Nanoparticules virales	27
D.6. Nanomédicaments commercialisés en oncologie	27
Partie III Les liposomes comme nanomédicaments en oncologie	29
A. Définition et classification	29
B. Liposomes de 1^{ère} génération	30
C. Liposomes de 1^{ère} génération indiqués en oncologie	31
C.1. Depocyt®.....	31
C.2. Myocet®	31
C.3. Marqibo®.....	32
C.4. Vyxeos®	32
D. Liposomes de 2^{nde} génération	34
E. Principaux liposomes de 2^{nde} génération indiqués en oncologie	35
E.1. Doxil® et Caelyx®.....	35
E.2. Onivyde™	36
F. Liposomes de 3^{ème} génération	36
A. Histoire de l'immunothérapie	37
B. Ciblage des cellules cancéreuses	40
C. Ciblage du micro-environnement immunitaire tumoral	41
D. Ciblage du système immunitaire périphérique	43
E. Objectif du travail expérimental	44
Partie V Matériels & méthodes	46
A. Préparation d'un liposome de 2^{nde} génération	46
A.1. Composition et préparation de la solution mère (SM)	46
A.2. Principe de la Thin Film Method	48
A.3. Principe du microfluidic mixing.....	49
A.4. Principe du NanoAssemblr Benchtop®.....	50

B. Caractérisation des liposomes	51
B.1. Évaluation de la taille et de la morphologie des nanoparticules.....	51
B.2. Évaluation de l'efficacité d'encapsulation : dosage par CLHP-UV	52
C. Étude <i>in vitro</i> d'efficacité	54
C.1. Culture cellulaire	54
C.2. Étude de cytotoxicité en 2D : Test au MTT	55
C.3. Quantification du récepteur HER2 par cytométrie en flux	57
D. Essai de greffe tumorale <i>in vivo</i>.....	58
D.1. Choix des souris	58
D.2. Greffe de cellules cancéreuses.....	58
D.3. Suivi tumoral post-greffe.....	59
Partie VI Résultats.....	60
A. Formulation	60
B. Taille et morphologie des liposomes	61
B.1. Cryo-TEM	61
B.2. Light scattering	64
C. Analyse par CLHP.....	67
C.1. Concentrations en docétaxel	68
C.2. Efficacité d'encapsulation	68
C.3. Rendement et taux d'encapsulation.....	68
D. Étude <i>in vitro</i> d'efficacité	69
D.1. Étude de cytotoxicité en 2D : Test au MTT	69
D.2. Quantification du récepteur HER2	70
E. Essai de greffe tumorale <i>in vivo</i>.....	71
E.1. Évaluation du nombre de cellules à greffer.....	71
Partie VII Discussion et perspectives.....	73
Partie VIII Bibliographie	75
Partie IX Annexes.....	78
ANNEXE 1 : Dosage du docétaxel par CLHP couplé à la détection UV	78
ANNEXE 2 : Images cryo-TEM ; test de stabilité.....	80
.....	80

Liste des abréviations

ADC : Antibody-drug conjugates
ANC: Antibody-drug conjugates
ATCC: American Type Culture Collection
BL-ANC: Blank-Antibody-drug conjugates
CHOL : Cholestérol
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
CpG : Cytosine-phosphate-guanine
Cryo-TEM : Cryo-microscopie électronique à transmission
DAMPs : Danger-associated molecular patterns
DAR : Drug/Antibody Ratio
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcétique
EMA : European Medicines Agency
ePC : L- α -phosphatidylcholine egg-yolk
EPR: Enhanced permeability and retention
FDA: Food & Drug Administration
G5%: Glucose 5%
HMGB1: High Mobility Group Box 1 protein
ICI : Inhibiteur des checkpoints de l'immunité
IDO Indoleamine 2,3-dioxygenase
LUV: Large unilamellar vesicle
MDSC: Myeloid-derived suppressor cells
MLV : Multilamellar large vesicle
MET : Micro-environnement tumoral
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PA : Principe actif
PBS : Phosphate buffered saline
PEG : Polyéthylène glycol
PEG-MAL : Polyéthylène glycol maléimide
PLGA: Acide polylactide-co-glycolique
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SLN: Solid lipid nanoparticle

SM: Solution mère

SPARC: Secreted protein acidic and rich cysteine

SUV: Small unilamellar vesicle

TAM: Tumor-associated macrophages

TGF- β : Transforming growth factor beta

TLR9: Toll-like receptor 9

UV: Ultraviolet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Partie I Introduction

Les nanoparticules sont des objets dont la dimension maximale est de l'ordre du nanomètre (entre 1 et 1000 nm) présentes naturellement dans l'environnement ou issues des nanotechnologies. L'application des nanotechnologies à la médecine aux sciences pharmaceutiques a permis l'administration de principes actifs sous forme vectorisée dans des nanoparticules.

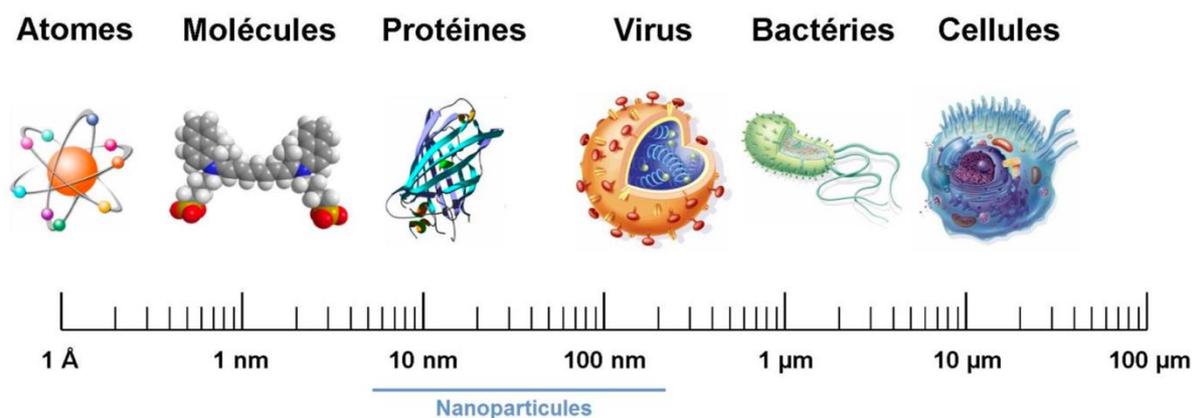


Figure 1 : échelle de taille des nanoparticules².

Le développement des nanoparticules a eu un essor considérable en oncologie ces dernières décennies avec le développement de nouveaux matériaux et formes vectorisées. La plupart des cytotoxiques utilisés en oncologie présentent une marge thérapeutique étroite, un profil de toxicité important ainsi qu'une faible diffusion tissulaire justifiant ce besoin de créer de nouveaux moyens de délivrance permettant de s'affranchir de ces problématiques. Toutefois, un nombre restreint de ces nanoparticules est arrivé sur le marché à ce jour.

L'essor de l'immunothérapie ces dernières années a cependant permis de repositionner les nanotechnologies en oncologie en s'appuyant sur certaines de leurs propriétés inexploitées ou jugées indésirables jusqu'alors comme leur capacité à déclencher une réaction pro-inflammatoire. Dans ce travail, nous présenterons les principales propriétés des nanoparticules, ainsi que les différentes classes existantes. L'intérêt de ces technologies et leur place dans l'immunothérapie seront ensuite développés. Cette revue de la littérature scientifique aura pour but de mettre en contexte le travail expérimental que nous avons réalisé au sein du SMARTc.

Ces expérimentations s'inscrivent dans un projet de recherche transversale visant à associer des thérapies dont les recherches actuelles ont démontré des propriétés immunomodulatrices : un anti-angiogénique (bevacizumab, Avastin®) et un immunoliposome de 3^{ème} génération (ANC-1) développé précédemment au sein du laboratoire avec une immunothérapie anti-PDL1 : l'atézolizumab (Tecentriq®). Le bevacizumab, par exemple, a la capacité d'inhiber le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) secrété par les cellules cancéreuses. Le VEGF est pro-tumoral car il a la propriété d'inhiber la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules dendritiques, et donc, la réponse immunitaire innée. Il aurait également la capacité de limiter la migration des lymphocytes T et favoriserait leur apoptose³. Les propriétés immunomodulatrices des chimiothérapies cytotoxiques ainsi que des nanoparticules seront plus précisément détaillées dans la suite de ce manuscrit. Les travaux de formulation de l'ANC-1 ainsi que les études *in vitro* et *in vivo* initiées au cours de ce travail seront présentés.

Partie II Les Nanoparticules en oncologie : principe et applications

A. Nanoparticules et concept de la « Magic Bullet »

Le concept de la « Magic Bullet » fut développé au début du XXème siècle par Paul Ehrlich - prix Nobel de médecine. Paul Ehrlich imaginait qu'un jour, des médicaments pourraient cibler le siège de la pathologie en épargnant les tissus sains. En modifiant la pharmacocinétique des thérapies anticancéreuses, l'utilisation des nanoparticules en médecine, plus précisément en oncologie, s'inscrit parfaitement dans cette démarche. En effet, ces nanoparticules permettent la modification des phases pharmacocinétiques ADME (Administration, Distribution, Métabolisme, Élimination) des principes actifs, par exemple en diminuant leur clairance d'élimination ou en modifiant leur distribution par ciblage actif ou passif via l'*EPR effect* (*Enhanced Permeability and Retention*).

Cette spécificité des vecteurs issus des nanotechnologies permet d'améliorer l'accumulation des cytotoxiques dans le microenvironnement tumoral (MET). Une autre utilité de l'encapsulation de principes actifs via les nanotechnologies est leur protection contre la dégradation par les différentes enzymes retrouvées dans le flux circulatoire. Certains nanomédicaments combinent plusieurs thérapeutiques connues pour avoir un effet synergique permettant leur délivrance simultanée directement au siège de la pathologie. L'ensemble de ces propriétés permet l'administration de doses réduites comparativement aux formes libres réduisant la toxicité inhérente aux thérapeutiques, sans altérer leur efficacité.

B. Ciblage passif : L'*EPR effect*

L'*EPR effect* est un concept selon lequel la néoangiogénèse des tissus tumoraux est de moins bonne facture que celle des tissus sains. Ces capillaires tumoraux présentent des fenestrations au niveau des jonctions serrées, permettant la diffusion des particules de taille inférieure à 200 nm et ainsi leur accumulation dans le site tumoral [Figure 2].

L'absence de système lymphatique efficace dans les tissus tumoraux favorise également leur rétention mais la pression élevée du liquide interstitiel au sein de la

tumeur limite leur diffusion. La composition de la matrice extracellulaire de certaines pathologies malignes telles que le cancer du pancréas est également une barrière limitant l'accès des nanoparticules au siège tumoral⁴.

L'*EPR effect* dépend du type tumoral et n'est pas observé dans tous les types de cancer. De nombreux facteurs l'influencent, notamment :

- La signature moléculaire de la tumeur ;
- Son degré de néovascularisation ;
- Sa masse, sa masse inflammatoire...

L'ensemble de ces caractéristiques intrinsèques à la tumeur varie au cours du temps et est à prendre en compte lors du développement d'un nanomédicament.

Un autre facteur à prendre en compte est le risque d'accumulation des nanomédicaments dans les organes possédant un épithélium fenestré tels que le foie ou la rate⁵.

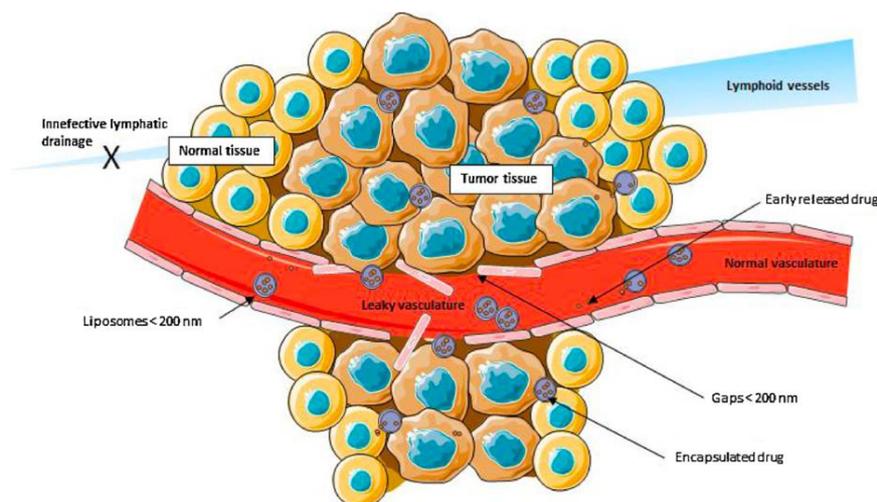


Figure 2 : représentation schématique de l'*EPR effect*⁶.

C. Pharmacocinétique des nanomédicaments

Les thérapeutiques utilisées en oncologie présentent une grosse variabilité pharmacocinétique due aux conditions physiopathologiques et à la diversité de tumeurs pouvant entraîner un échappement thérapeutique ou une surtoxicité. Contrairement à ce qu'on pourrait penser a priori, il a été démontré que la pharmacocinétique des nanomédicaments est plus variable que pour les formes libres, mais la quantité moyenne de cytotoxiques atteignant la tumeur est supérieure pour les formes vectorisées comparativement aux formes libres⁷.

C.1. Absorption des nanomédicaments

La principale voie d'administration des nanomédicaments est la voie intraveineuse. Un des avantages des nanovecteurs pour cette voie est la possibilité de solubiliser des PA très hydrophobes tels que le paclitaxel. Le paclitaxel un anticancéreux nécessitant d'être formulé avec du cremophor® et de l'éthanol, des excipients toxiques augmentant les effets indésirables de sa forme libre.

Le développement du nab-paclitaxel, forme sous laquelle le paclitaxel est conjugué à des molécules de nano-albumine, a permis de s'affranchir de ces excipients et a démontré une meilleure efficacité ainsi qu'un index thérapeutique amélioré par rapport au paclitaxel libre. Par ailleurs, le retrait du cremophor a permis d'augmenter le transport endothélial du paclitaxel *in vitro*⁸.

D'autres voies d'administration tel que les voies intranasales, orale et pulmonaire se développent. Une équipe étudiant le glioblastome a démontré dans un modèle murin que l'administration intranasale de bevacizumab encapsulé dans un vecteur polymérique : l'acide polylactide-co-glycolique (PLGA) résulte en une meilleure biodisponibilité en comparaison avec la forme libre. Cette forme a également permis d'augmenter le temps de résidence du bevacizumab en limitant son exposition systémique⁹. Cet exemple démontre un des principes de base de l'utilisation des nanoparticules en médecine : le PA suit la pharmacocinétique de son vecteur, pouvant permettre d'améliorer sa biodisponibilité ainsi que d'éviter sa prise en charge par diverse enzymes de dégradation ou d'efflux.

C.2. Distribution des nanomédicaments

L'un des avantages des nanomédicaments est leur propriété d'optimiser la distribution des PA contrairement aux formulations conventionnelles. La modification de la taille, de la charge ainsi que de la forme influera sur la pénétration dans les tissus via ciblage passif. Concernant la taille, elle a un rôle prépondérant afin de déterminer dans quel tissu une nanoparticule pourra potentiellement se distribuer. Par exemple, des études ont montré que les fenestrations des capillaires pulmonaires étaient d'environ 35 nm ; seules les nanoparticules d'une taille inférieure peuvent donc diffuser dans les poumons ; cela conditionne l'efficacité mais également la toxicité des formes vectorisées¹⁰. L'ajout d'un ligand spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire conduit à

la formation d'un nanomédicament dit de 3^{ème} génération. Ce type de nanoparticule permet d'exercer un ciblage actif comme pour le nab-paclitaxel cité précédemment. Une étude de 2009 sur les cancers de la tête et du cou a démontré que les patients dont les cellules cancéreuses exprimaient fortement la protéine SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich Cystein*), protéine se liant à l'albumine, présentaient une accumulation intratumorale et un taux de réponse supérieurs aux patients dont l'expression de SPARC était faible¹¹. Cependant, le nab-paclitaxel est le seul nanomédicament bénéficiant d'un ciblage actif, soulignant la difficulté de mise sur le marché de ce type de technologie. De plus, l'accès pour les patients de cette catégorie de médicaments innovants dépend de la politique interne de chaque pays. En France, l'Abraxane® n'est pas disponible pour les patients souffrant d'un cancer du pancréas avancé malgré une amélioration significative de la survie en association avec la gemcitabine vs. la gemcitabine seule¹².

C.3. Élimination des nanomédicaments

Les nanovecteurs augmentent généralement le temps de résidence dans l'organisme et la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique des PA vectorisés en les protégeant de leur dégradation par les différentes enzymes de l'organisme. La métabolisation hépatique et l'élimination rénale sont les principales voies impliquées dans l'élimination des PA sous forme libre. Néanmoins, les formes vectorisées présentent des voies de dégradation leur étant propres, justifiant le développement de nanomédicaments de 2^{nde} génération dits furtifs.

Dans le flux circulation sanguin, les nanoparticules vont interagir avec un certain nombre d'enzymes susceptibles d'altérer leur stabilité et d'entraîner la libération précoce et indésirable du PA vectorisé sous forme libre. Le phénomène d'opsonisation (phénomène immunologique d'agglutination des protéines biologiques sous forme de couronne protéique autour des nanoparticules) est également acteur de sa dégradation. Les protéines majoritairement impliquées dans ce phénomène d'opsonisation (*protéines corona*) sont l'albumine, les apolipoprotéines, les protéines du complément ainsi que celles dans la coagulation. Cette agglutination des protéines est un phénomène rapide dépendant notamment de la charge, de la forme ainsi que de la taille des nanoparticules. Les nanoparticules opsonisées sont alors prises en charge par le système phagocytaire mononucléé et se concentrent principalement

dans le foie ou la rate où elles seront dégradées¹³. Les nanoparticules dont la taille excède 100 nm sont préférentiellement concernées par cette voie de dégradation.

Par ailleurs, la taille des nanoparticules conditionne également leur élimination rénale. Les particules mesurant plus de 60 nm ne seront pas concernées par cette excrétion, la fenestration des capillaires glomérulaire étant de l'ordre de 60 nm. Inversement, les particules d'une taille inférieure à 8 nm seront rapidement filtrées par le rein et donc éliminées¹⁴. La taille influe également sur l'internalisation des nanovecteurs par les cellules cancéreuses [Figure 3] :

- La phagocytose concerne les très grosses nanoparticules d'un à plusieurs dizaines de μm .
- La pinocytose permet l'internalisation de fluides extracellulaires comprenant des nanoparticules de l'ordre de quelques centaines de nm à quelques μm . Pour les particules d'une taille supérieure à 1 μm , on parle de macropinocytose.
- L'endocytose concerne principalement les nanoparticules de taille inférieure à 200 nm. Elle peut être dépendante de la clathrine, de la cavéoline ou indépendante de ces protéines selon la taille des particules à internaliser¹⁵.

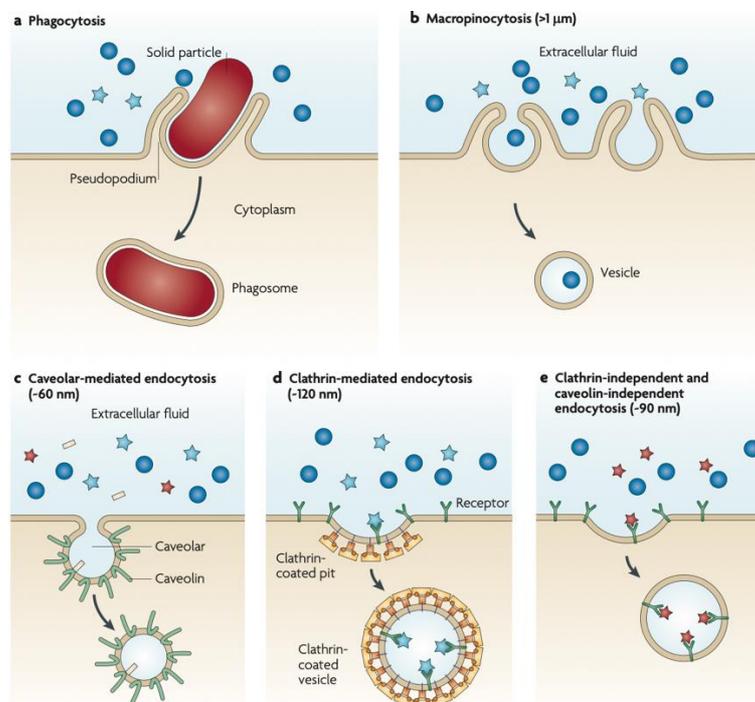


Figure 3 : modes d'internalisation des nanoparticules selon leur taille.

La charge électrique modifie également la cinétique des nanoparticules ; les particules chargées positivement ont tendance à être plus rapidement éliminées comparativement aux nanoparticules neutres ou chargées négativement. Néanmoins, l'accumulation des particules chargées au niveau de la tumeur est plus importante¹⁵.

D. Différentes classes de nanoparticules

Les nanoparticules se différencient principalement par le type de matériau utilisé ainsi que leur composition. Si leur composition est primordiale en termes de protection et de relargage des principes actifs, leurs propriétés de surface le sont tout autant. Ces paramètres ont une incidence sur leur cinétique dans l'organisme, notamment au niveau de leur distribution, du ciblage ainsi que de leur élimination.

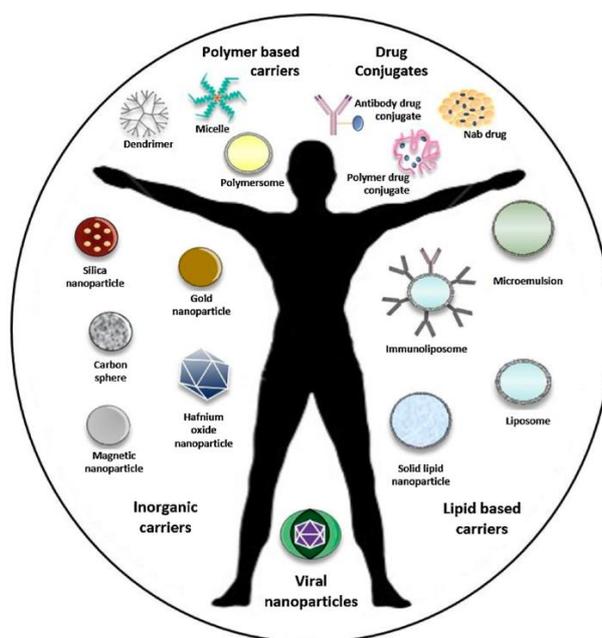


Figure 4 : classification des principales nanoparticules⁶.

D.1. Vecteurs polymériques

Les polymères sont un assemblage de motifs élémentaires en macromolécules. Ceux utilisés pour la synthèse de nanoparticules peuvent être d'origine naturelle ou synthétique et se doivent d'être biocompatibles et biodégradables par l'organisme. Les polymères les plus utilisés sont ceux issus de l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) et leur copolymère, le PLGA.

L'utilisation de polymères permet une grande diversité en termes de forme et de morphologie. Les propriétés des nanoparticules synthétisées ne dépendent pas que du polymère choisi mais également du procédé de fabrication car de nombreuses techniques différentes peuvent être utilisées. Les formes les plus courantes sont les matrices solides également appelées nanosphères, les dendrimères, les micelles polymériques ainsi que les polymersomes [Figure 5].

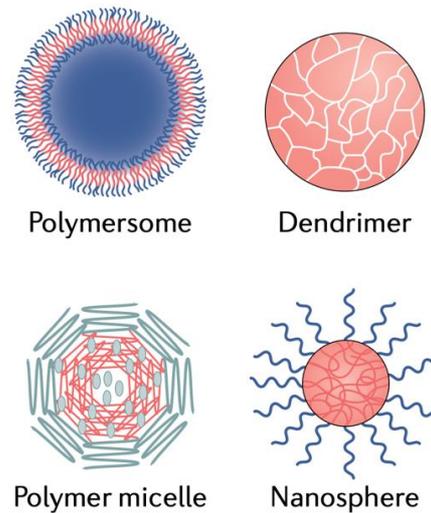


Figure 5 : principales nanoparticules polymériques¹⁶.

D.2. Vecteurs lipidiques

Les vecteurs lipidiques peuvent avoir différentes formes mais la majorité est sphérique et comprend au moins un feuillet lipidique. Plusieurs formulations lipidiques existent : les principales sont les micelles, les liposomes ainsi que les nanoparticules lipidiques solides (SLN : *Solid lipid nanoparticle* [Figure 6].

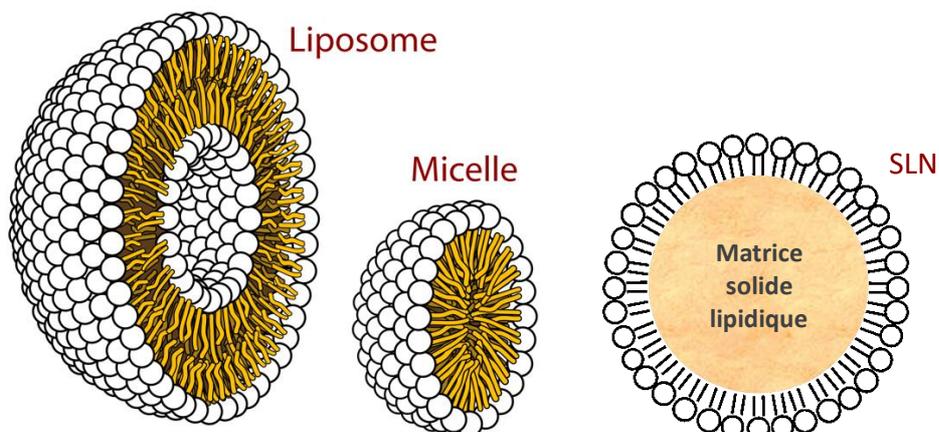


Figure 6 : schéma des principaux vecteurs lipidiques.

Les micelles sont organisées en monocouche de molécules tensio-actives s'auto-arrangeant sous forme sphérique en milieu aqueux. La partie externe, hydrophile, permet leur solubilisation, la partie interne et lipophile constitue un réservoir pour des PA hydrophobes. Les SLN sont des nanoparticules lipidiques solides à température physiologique (37°C). Elles sont composées d'une monocouche de lipides amphiphiles en périphérie entourant une matrice solide lipidique dans laquelle est encapsulée le PA. Les ingrédients utilisés sont généralement des triglycérides ou des cires biocompatibles et tolérés par l'organisme. Parmi les vecteurs lipidiques, les liposomes sont les plus utilisés et seront détaillés par la suite.

Les nanovecteurs lipidiques présentent l'avantage d'être simples à formuler et de s'auto-assembler, car ils sont généralement formulés avec des lipides amphiphiles tels que les triglycérides et les phospholipides, leur conférant ainsi leur stabilité en milieu aqueux. La variété importante de lipides physiologiques disponibles offre également une large variété de supports, permettant de créer des formes avec des propriétés physico-chimiques variables dépendant des ingrédients choisis, ainsi que des techniques de synthèse utilisées. L'utilisation de composants physiologiques et recyclés par les cellules tels que du cholestérol, des triglycérides ou encore des phospholipides est un avantage important sur les autres classes de nanoparticules permettant d'éviter la bioaccumulation du vecteur ainsi que son recyclage après internalisation. L'utilisation d'agents de surface permet d'augmenter le temps de résidence dans l'organisme en limitant leur captage par le foie et par la rate.

D.3. Vecteurs inorganiques

Ce type de nanoparticules peut être conçu avec un large choix de taille, structure et forme. Ces nanoparticules présentent des propriétés magnétiques, électriques, optiques uniques liées au matériau utilisé et en faisant de très bons candidats pour des applications théranostiques. En effet, en couplant des isotopes instables à des molécules thérapeutiques, les nanoparticules inorganiques permettent de traiter les tumeurs tout en suivant leur comportement. Leur composition est très diverse, on y retrouve notamment des nanoparticules métalliques (d'or ou d'argent), de silice et des nano-cristaux semi-conducteurs tels que le quantum dots [**Figure 7**].

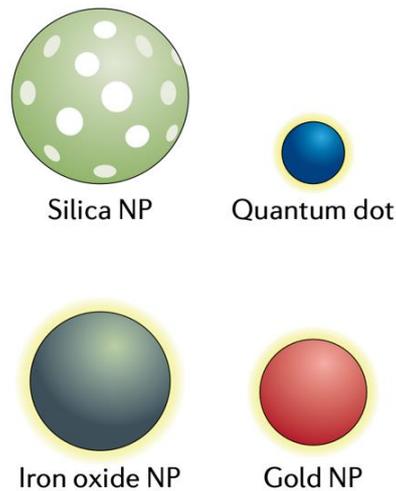


Figure 7 : principales nanoparticules inorganiques¹⁶.

Les nanoparticules à base d'oxyde de fer représentent la majorité des nanoparticules inorganiques commercialisées par la FDA (*Food & Drug Administration*), principalement dans les anémies.

Cependant, les particules d'or, utilisées dans des formes diverses (sphérique, allongée, étoilée...), sont les plus étudiées. Ces dernières possèdent des électrons libres à leur surface leur conférant des propriétés photodynamiques et photothermiques lors de l'application d'une lumière infra-rouge. L'activation de ces propriétés permet la génération de dérivés réactifs de l'oxygène toxiques pour les cellules cancéreuses¹⁷.

L'utilisation de silice comme nanomatériau a également démontré son efficacité dans la délivrance de principes actifs ainsi que dans diverses applications telles que l'immunothérapie et la vaccination anticancéreuse. Une étude a démontré que l'administration de peptides antigéniques encapsulés dans des nanoparticules photothermiques de silice mésoporeuse permet l'activation des cellules dendritiques dans un modèle murin immunocompétent. Cette activation des CPA permet l'infiltration de LT cytotoxiques au sein de la tumeur associée à une réponse anticancéreuse efficace et 2,6 fois supérieures à la thérapie sans photothermie, soulignant un des nombreux avantages que peuvent avoir les particules inorganiques comme nanovecteurs¹⁸.

Par leurs propriétés magnétiques, radioactives ou électriques, les nanoparticules inorganiques ont donc des applications qui leur sont propres, telles que la

théranostique ou les thérapies photothermiques. Cependant, bien que certaines telles que les silices mésoporeuses soient biodégradables, les applications des matériaux inorganiques en tant que nanovecteurs sont limitées en clinique à cause de leur faible solubilité et des problèmes concernant leur toxicité, particulièrement pour ceux formulés avec des métaux lourds.

D.4. Conjugués anticorps-médicaments

Les *antibody-drug conjugates* (ADC) sont des complexes formés par un anticorps monoclonal auquel est accroché via un *linker* un cytotoxique appelé *payload* et caractérisé par un *Drug/Antibody Ratio* (DAR) [Figure 8].

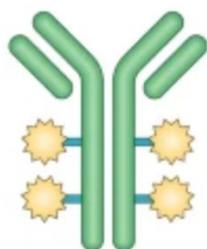


Figure 8 : représentation schématique d'un ADC ¹⁹. En vert l'anticorps ; en bleu le linker ; en jaune le payload ; dans cet exemple le DAR est égal à 4.

- L'anticorps est choisi selon sa spécificité ainsi que son affinité avec une cible hautement exprimée dans la tumeur.
- Le *linker* doit être stable dans la circulation mais également capable de libérer le *payload* dans la tumeur
- Le *payload* choisi se doit de posséder une puissante activité cytotoxique intrinsèque. En effet, la plupart des ADC commercialisés sont formulés avec des molécules cytotoxiques efficaces à des concentrations sub-nanomolaires limitant leur utilisation en monothérapie.

Le DAR correspond au nombre de molécules de cytotoxique pouvant être greffées par anticorps et conditionne l'activité d'un ADC. Une étude sur le brentuximab vedotin a montré que plus le DAR est élevé, plus l'activité *in vitro* de l'ADC était augmentée (DAR=8), mais sa clairance également. De plus, sa marge thérapeutique était diminuée, un équilibre avec un DAR est préconisé afin d'obtenir une balance efficacité

/ toxicité acceptable (la diminution du DAR de 8 à 4 a augmenté l'index thérapeutique de 2 fois)²⁰.

Actuellement, neuf ADC sont commercialisés dans le cancer et des dizaines sont en cours de développement clinique et pré-clinique. L'ADC le plus populaire est le trastuzumab-emtansine (Kadcyla®), un anticorps anti-HER2 conjugué par un *linker* thioéther avec le DM1, une molécule cytotoxique dérivée de la maytansine et inhibant la polymérisation des microtubules. Le Kadcyla® est très représentatif du principe même des ADC : améliorer l'index thérapeutique du *payload* et favoriser son internalisation. Le ciblage actif et spécifique concédé par le trastuzumab permet l'utilisation de molécules très actives comme le DM1, jusqu'alors trop toxique pour être mis sur le marché en monothérapie.

D.5. Nanoparticules virales

Les nanoparticules virales peuvent être utilisées en choisissant une souche virale ayant un tropisme pour les cellules cancéreuses et en les modifiant afin de les faire exprimer une protéine thérapeutique d'intérêt. Les *Pox virus* tels que les souches *myxoma* ou *vaccinia* par exemple, sont connus pour avoir un tropisme pour les cellules cancéreuses. Le blocage de l'apoptose, la dérégulation de la réplication et l'évasion immunitaire sont autant de caractéristiques des cellules cancéreuses bénéficiant aux *Pox virus* et justifient leur potentiel usage. Cependant, à ce jour, aucun nanovecteur viral n'a encore été testé en clinique pour des questionnements autour de leur innocuité.²¹.

D.6. Nanomédicaments commercialisés en oncologie

De nombreux nanomédicaments ont été développés ces dernières années et certains, en grande majorité utilisant des liposomes, ont été approuvés par les autorités de santé :

Product name	Manufacturer	Description	Targeted cancer	Approval details
Oncaspar Doxil	Sigma tau pharmaceuticals Inc. Centocor Ortho Biotech, J&J	PEG asparaginase PEGylated Doxorubicin liposomes	Acute lymphoblastic leukemia Recurrent ovarian cancer, AIDS-related Kaposi sarcoma, Multiple myeloma	1994 1995; EMA for metastatic breast cancer (Caelyx)
DaunoXome	Galen, Ltd.	Daunorubicin liposomes	HIV-associated Kaposi Sarcoma	1996
DepoCyt	Sigma-Tau Pharmaceutical, Inc.	Cytarabine liposomes	Lymphomatous meningitis	1999
Myocet	Sopherion Therapeutics, LLC and Cephalon, Inc.	Doxorubicin liposomes	Metastatic breast cancer	2000 in Canada and Europe
Neulasta	Amgen, Inc.	PEG filgrastim	Chemotherapy-associated neutropenia	2002
Abraxane	Celgene	Albumin bound -paclitaxel	Metastatic breast cancer, advanced NSCLC, late stage pancreatic cancer	2005, 2012, 2013
Marqibo	Talon Therapeutics Inc.	Vincristin liposomes	Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia	2012
Kadcyla	Genentech, Inc.	Ado- Trastuzumab Emtansine	Recurrent HER2-positive, metastatic breast cancer	2013
Onivyde	Merrimack Pharmaceuticals, Inc.	PEGylated irinotecan liposome	Advanced (metastatic) pancreatic cancer	2015
Paclical	Oasmia Pharmaceutical AB	Paclitaxel micelles	Epithelial ovarian cancer	2015 in the Russian Federation
Vyxeos	Jazz Pharmaceuticals	Cytarabine + Daunorubicine liposome	AML	2017

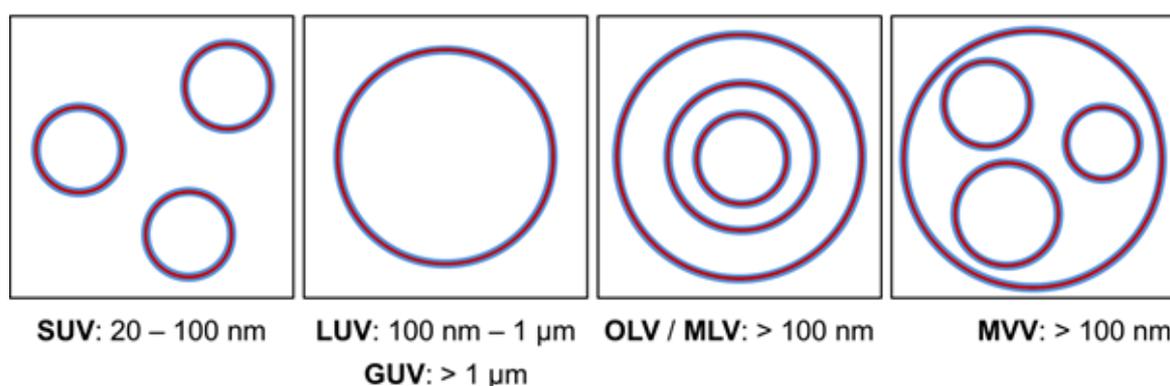
Tableau 1 : nanomédicaments approuvés en oncologie⁶.

Partie III Les liposomes comme nanomédicaments en oncologie

A. Définition et classification

Les liposomes sont des nanovecteurs lipidiques majoritairement composés de phospholipides assemblés sous forme de bicouche lipidique entourant un cœur aqueux. Ils peuvent se présenter sous diverses formes et sont généralement classifiés selon leur taille ainsi que par leur lamellarité, c'est-à-dire le nombre de bicouche(s) lipidique(s) les composant [Figure 9]. On distingue :

- Les liposomes unilamellaires, comprenant les LUV (*Large unilamellar vesicle*), les GUV (*Giant unilamellar vesicle*) ainsi que les SUV (*Small unilamellar vesicle*). Ils ne comportent qu'une seule bicouche entourant une cavité aqueuse.
- Les multilamellaires qui incluent les MLV (*Multilamellar large vesicle*) et les OLV (*Oligo lamellar vesicle*) comportant plusieurs bicouches concentriques ainsi que les MVV (*Multi vesicular vesicle*) constitués de plusieurs parois non concentriques délimitant plusieurs compartiments aqueux.



Type de liposomes	Abbréviation	Taille
Multilamellar Large Vesicle	MLV	> 0,5 µm
OligoLamellar Vesicle	OLV	0,1 à 1 µm
Small Unilamellar Vesicle	SUV	20 à 100 nm
Large Unilamellar Vesicle	LUV	> 100 µm
Giant Unilamellar Vesicle	GLV	> 1 µm
Multi Vesicular Vesicle	MVV	> 1 µm

Figure 9 : classification des différents types de liposomes en fonction de leur taille et de la lamellarité ²².

La caractéristique de posséder une bicouche lipidique hydrophobe entourant un cœur aqueux hydrophile confère aux liposomes un de leur principal intérêt justifiant leur application en médecine : ces derniers permettent l'encapsulation simultanée ou non de PA hydrophiles et hydrophobes ; ce sont donc des vecteurs polyvalents permettant de préserver une large gamme de PA aux propriétés physico-chimiques variables. Il existe trois générations de liposomes se démarquant par le niveau de complexité de leur structure :

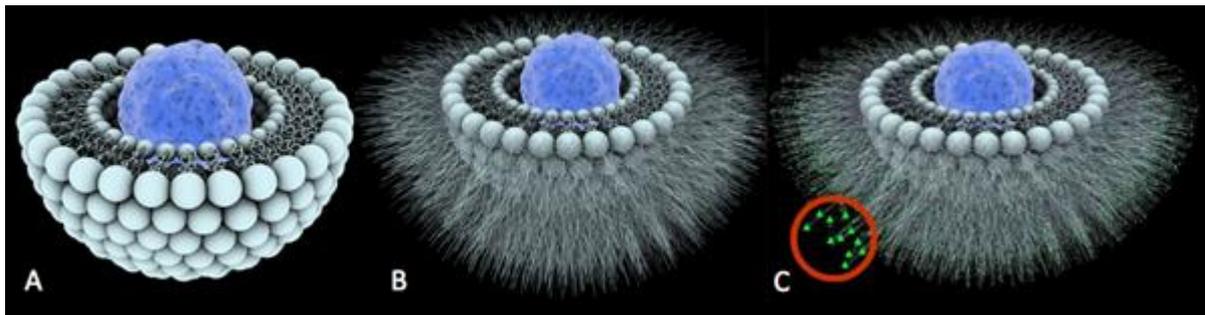


Figure 10 : différentes générations de liposomes [19]. A. liposome de 1^{ère} génération ; B. liposome de 2^{nde} génération ; C. liposome de 3^{ème} génération.

B. Liposomes de 1^{ère} génération

Ce sont des nanovecteurs à ciblage passif et s'accumulent au sein du site tumoral via l'*EPR effect*. Ils présentent une clairance élevée car rapidement reconnus comme éléments étrangers par le système immunitaire inné. Ils sont ensuite opsonisés puis dégradés par le système réticulo-endoplasmique au niveau de la rate et du foie par les cellules de Kupffer²³. Cette captation hépatique des nanoparticules de 1^{ère} génération est indésirable dans la majorité des pathologies car elle ne permet pas une exposition systémique suffisante pour atteindre le site de la pathologie. Cependant, cette propriété peut être recherchée lorsqu'une accumulation hépatique du principe actif est souhaitée comme dans les cancers du foie.

De nombreux liposomes de 1^{ère} génération ayant, pour la plupart, l'objectif de modifier la pharmacocinétique de leur PA et/ou de diminuer les toxicités inhérentes aux cytotoxiques encapsulés ont été commercialisés ces dernières décennies.

C. Liposomes de 1^{ère} génération indiqués en oncologie

C.1. Depocyt®

Le Depocyt® est un nanomédicament encapsulant la cytarabine, indiqué dans la méningite lymphomateuse et administré par voie intrathécale²⁴. Cette formulation commercialisée en 1999 est basée sur la technologie Depofoam™ qui consiste en la formation de liposomes multivesiculaires de 3 à 30 µm avec une structure alvéolaire [Figure 11]. Chaque alvéole est formée d'une bicouche lipidique et le PA est encapsulé en son centre. Après administration, les liposomes vont lentement s'éroder pendant une période allant de quelques heures jusqu'à plusieurs semaines. Cela permet le relargage progressif du PA ce qui est un avantage pour les traitements nécessitant de nombreuses administrations ou ayant une faible durée d'action.

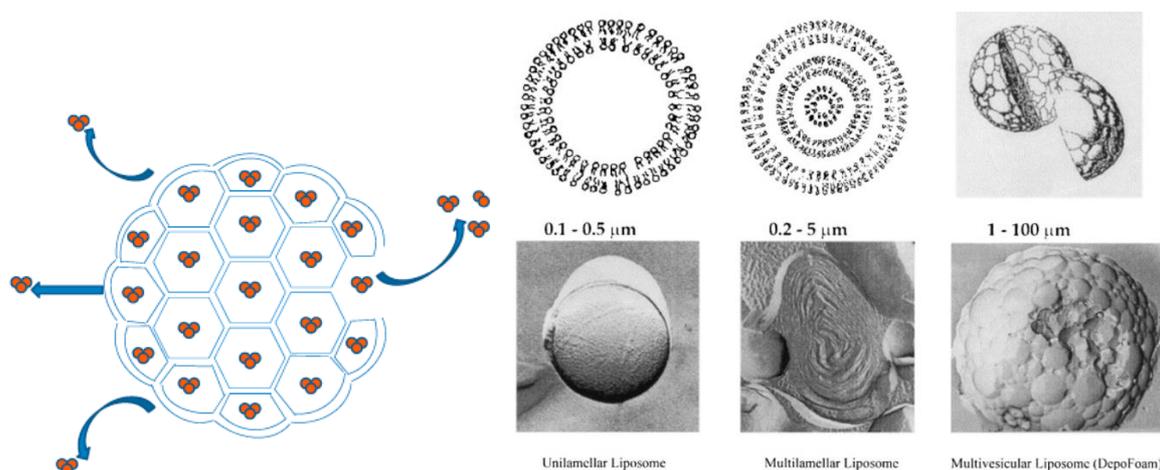


Figure 11 : structure d'une particule basée sur la technologie Depofoam™ et comparaison avec les formes liposomales conventionnelles^{25 26}.

C.2. Myocet®

Le Myocet® (accepté en 1999 par l'EMA) est une formulation liposomale de 1^{ère} génération à base de citrate de doxorubicine et indiquée en association avec le cyclophosphamide dans le cancer du sein métastatique chez la femme (en première ligne)²⁷. Cette forme a été développée afin de réduire la cardiotoxicité cumulative et irréversible de la doxorubicine, une molécule appartenant à la famille des anthracyclines et inhibitrice de l'ADN topoisomérase II. Cette toxicité cumulative limite l'administration maximale de doxorubicine à 550 mg/m² pour les patients sans antécédents ainsi qu'à

400 mg/m² pour les patients présentant des antécédents cardiaques ²⁸. Ces contraintes limitent l'utilisation de doxorubicine à long terme et justifient la recherche de nanovecteurs modifiant sa pharmacocinétique afin de limiter sa diffusion dans le tissu cardiaque. La taille de ces liposomes est importante et comprise en 150 et 250 nm (supérieure au Doxil® et au Caelyx®, liposomes de 2nde génération abordés par la suite), maximisant leur captation par le système phagocytaire mononucléé. Cette propriété diminue leur diffusion dans les tissus, limitant l'efficacité des liposomes mais également les toxicités associées contrairement à des liposomes de taille inférieure qui diffuseront mieux.

Des études cliniques comparatives ont confirmé que l'administration de Myocet® permettait de réduire les effets indésirables cardiovasculaires avec une efficacité équivalente en comparaison avec la doxorubicine libre²⁹.

C.3. Marqibo®

Le Marqibo® (accepté en 2012 par la FDA) est une forme injectable de liposomes encapsulant du sulfate de vincristine prescrite dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aigüe associée à une absence de mutation du chromosome Philadelphie (mutation BCR-ABL provoquée par la translocation entre les chromosomes 9 et 22)³⁰. La vincristine est encapsulée dans le cœur aqueux des liposomes dont le diamètre est inférieur à 100 nm, augmentant le temps de résidence du cytotoxique dans la circulation.

Un essai de phase II sur des patients atteints d'un lymphome non-hodgkinien a démontré que l'injection de doses de Marqibo® deux fois supérieures à celles de vincristine libre n'occasionnait pas d'effets secondaires supplémentaires, confirmant ainsi que la vincristine liposomale permet de limiter la diffusion du cytotoxique dans les tissus sains³¹.

C.4. Vyxeos®

Le Vyxeos® dont la mise sur le marché fut actée en 2017 par la FDA et en 2018 par l'European Medicines Agency (EMA) est une formulation liposomale de 1^{ère} génération associant la daunorubine et la cytarabine. Ces deux molécules sont solubilisées dans

les cavités hydrophiles du nanovecteur, ce dernier se présente sous forme de liposome bilamellaire [Figure 12] avec une taille approximative de 100 nm.

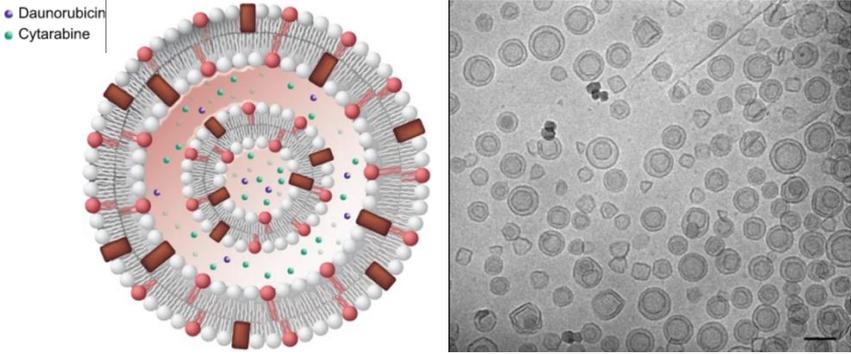


Figure 12 : représentation schématique du Vyxeos et visualisation en cryo-microscopie électronique (cryo-TEM)³².

Le Vyxeos® est indiqué dans le traitement des patients atteints de leucémie aigüe myéloblastique nouvellement diagnostiquée secondaire à un traitement, ainsi que dans la leucémie aigüe myéloblastique avec anomalies associées aux myélodysplasies.

Une étude de phase III de supériorité a démontré la supériorité du Vyxeos® en comparaison avec le traitement de première ligne : le protocole 7+3 consistant en l’administration de cytarabine 7 jours, associé à la daunorubicine les trois premiers jours de la cure. La formulation liposomale a démontré une supériorité en terme de survie globale du bras Vyxeos® (9,56 mois contre 5,95 mois pour le bras 7+3) [Figure 13], démontrant l’intérêt de l’utilisation d’une forme nanovectorielle dans ce cas³³.

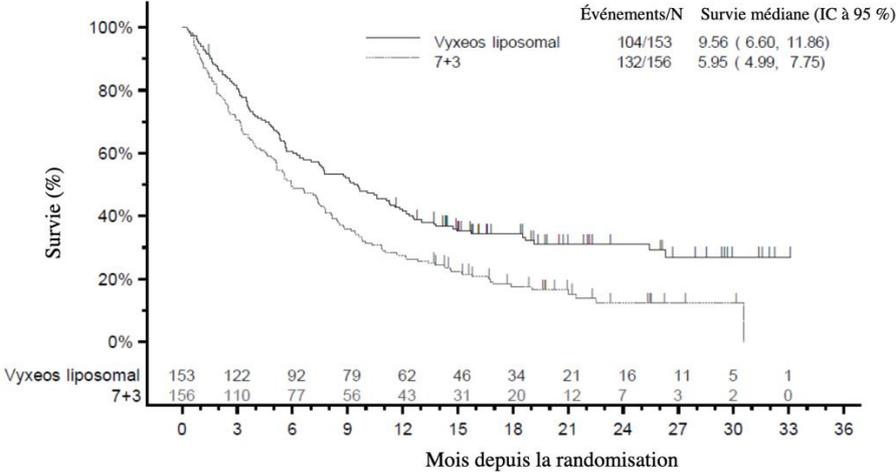


Figure 13 : courbe de Kaplan-Meier et survie globale³³.

D. Liposomes de 2nde génération

Les liposomes de 2nde génération sont recouverts de polymères, généralement de polyéthylène glycol (PEG), un polymère hydrophile. La présence de PEG à la surface des liposomes permet de les rendre furtifs et de limiter leur captation par certains organes tels que la rate réduisant leur prise en charge par le système immunitaire. Les liposomes de 2nde génération présentent donc une $\frac{1}{2}$ vie prolongée dans la circulation sanguine, facilitant leurs accumulation passive via l'*EPR effect*.

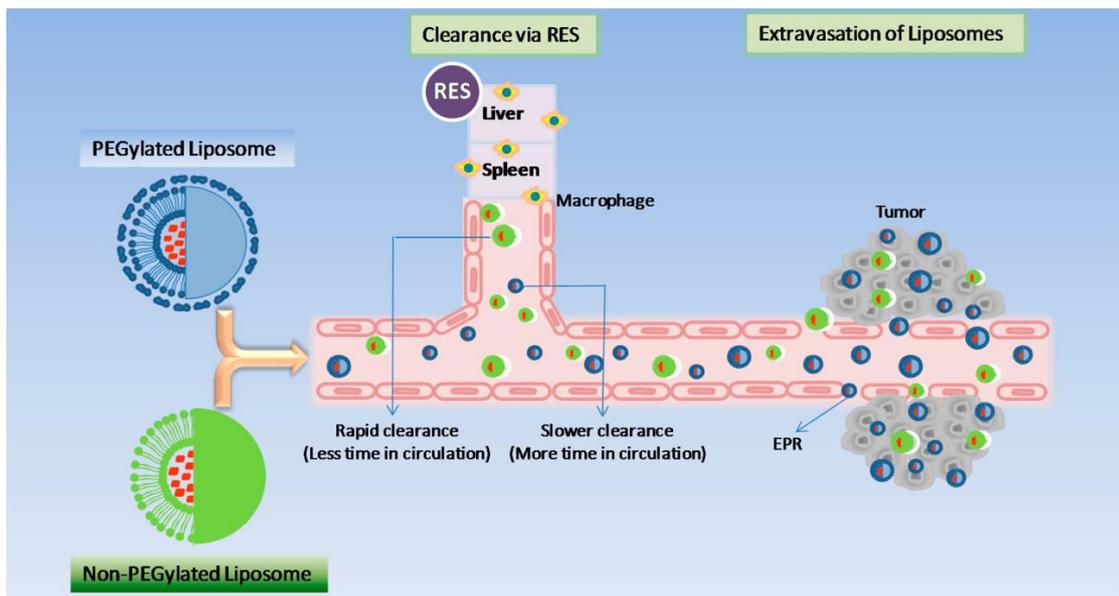


Figure 14 : pharmacocinétique des liposomes pegylés et non pegylés²⁵.

Cependant, l'essor de ces formes n'empêche pas l'utilisation des formes vectorisées de 1^{ère} génération car ces dernières présentent l'avantages d'avoir un profil de toxicité différent. La complémentarité entre ces différentes générations de vecteurs est parfaitement illustrée par l'exemple de la doxorubicine liposomale. La forme de 1^{ère} génération : le Myocet®, présente une $\frac{1}{2}$ vie ainsi qu'un profil de toxicité moins avantageux que celles de 2nde génération (Doxil® et Caelyx®) mais certains effets secondaires tels que le syndrome main-pied, les stomatites et les mucosites sont bien moins fréquents. Par ailleurs, le syndrome main-pied est l'effet secondaire le plus largement associé aux liposomes pegylés comparativement aux formes libres³⁴.

E. Principaux liposomes de 2^{nde} génération indiqués en oncologie

E.1. Doxil® et Caelyx®

Le Doxil®, accepté en 1995 par la FDA et le Caelyx®, accepté en 1996 par l'EMA sont des liposomes pegylés de 80 à 100 nm encapsulant le chlorhydrate de doxorubicine dans leurs cavités aqueuses [Figure 15].

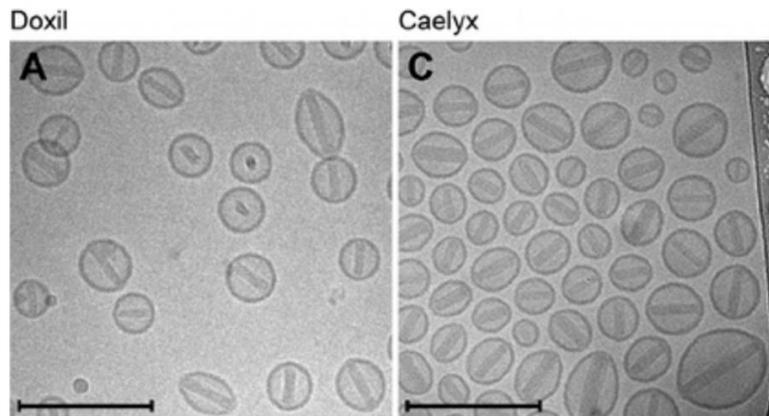


Figure 15 : images cryo-TEM du Doxil® et du Caelyx®³⁵.

Ces deux formes liposomales sont indiquées dans de nombreuses pathologies malignes³⁶ :

- En monothérapie dans le cancer du sein métastatique avec un risque cardiaque augmenté ;
- Dans le cancer ovarien à un stade avancé chez les femmes après l'échec d'une chimiothérapie de première intention à base de platine ;
- En association avec le bortézomib dans le traitement du myélome multiple chez les patients ayant reçu au moins un traitement antérieur et qui sont inéligibles à la greffe de moelle osseuse ;
- Dans le traitement du Sarcome de Kaposi associé au SIDA chez les patients ayant un faible taux de lymphocytes CD4 et présentant des lésions cutanéomuqueuses ou viscérales étendues.

Une étude de phase III comparant le Caelyx® vs. la doxorubicine libre dans le cancer du sein métastatique a démontré une non-infériorité associée à un risque de développer un effet cardiotoxique bien plus faible. En effet, aucun effet cardiotoxique n'a été constaté à des doses cumulées de 450 mg/m² avec le Caelyx®.

Une autre étude de phase III comparant l'administration de Caelyx® en association avec le bortézomib vs. le bortézomib seul a présenté une amélioration du critère principal : le temps avant progression était significativement supérieur de deux mois pour l'association³⁶.

E.2. Onivyde™

L'Onivyde™ est une forme injectable d'irinotecan liposomal mise sur le marché en 2015 après avoir été approuvée par la FDA. Cette dernière est indiquée dans le traitement des adénocarcinomes du pancréas métastatiques en association avec le 5-fluorouracile ainsi que la leucovorine³⁷. Onivyde™ se présente sous forme de liposomes pegylés unilamellaires d'une taille moyenne de 110 nm. Cette formulation a permis d'augmenter l'exposition plasmatique tout en diminuant la clairance de l'irinotecan³⁷.

F. Liposomes de 3^{ème} génération

En plus de leur caractère furtif, les liposomes de 3^{ème} génération possèdent un agent de ciblage actif, par la greffe d'un ligand biologique fonctionnalisé à la surface des molécules de PEG. Ils permettent la reconnaissance d'une cible fortement exprimée par les cellules tumorales.

Aucun liposome de cette classe n'a encore été mis sur le marché. Cependant le nab-paclitaxel, nanomédicament non-liposomal exerçant un ciblage actif est actuellement commercialisé dans de nombreux pays. Par ailleurs, une nouvelle génération de nanovecteurs voit actuellement le jour avec la mise au point de particules libérant leurs principes actifs sous un stimulus déterminé (libération pH-dépendante, fonction de la température locale, d'hypoxie, d'ultrasons ou encore en présence d'une enzyme spécifique)¹³.

Partie IV Nanomédicaments & immunothérapie

A. Histoire de l'immunothérapie

Le premier médicament immunomodulateur a été décrit par le chirurgien William Coley au début de 20^{ème} siècle. William Coley avait remarqué qu'une patiente atteinte d'un ostéosarcome a pu obtenir une régression totale de sa tumeur après avoir été infectée par la bactérie *Streptococcus Pyogène*. Fort de sa découverte, Coley mit au point différentes préparations à partir de cette souche et les injecta à plus de mille patients au cours de sa carrière. Bien qu'il ne comprît pas totalement le mécanisme par lequel le système immunitaire permettait de lutter contre les cancers, ses recherches furent pionnières dans le domaine de l'immunothérapie³⁸. Malgré l'ancienneté de cette découverte, l'utilisation de l'immunothérapie en traitement anticancéreux n'a été popularisée que très récemment.

Dans plusieurs types de cancers, principalement le mélanome métastatique ou le cancer du poumon, l'immunothérapie basée sur l'utilisation des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI) a révolutionné la prise en charge des patients et a démontré des résultats d'une efficacité sans précédent. Ces résultats incluent une régression complète des cancers à un stade métastatique avancé ainsi que des rémissions à long terme sans rechute. Les ICI comprennent les anticorps anti CTLA-4, les anti PD1 et les anti PD-L1 [**Tableau 2**].

Table. Approved Uses for CTLA-4, PD-1, and PD-L1 Inhibitors

Agent	Mechanism of action	Approved disease sites ^a
Nivolumab	PD-1 inhibitor	Metastatic melanoma Metastatic non-small cell lung cancer Metastatic renal cell carcinoma Classical Hodgkin lymphoma Recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck Mismatch repair deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer Hepatocellular carcinoma Locally advanced or metastatic urothelial carcinoma
Pembrolizumab	PD-1 inhibitor	Metastatic melanoma (first line) Metastatic non-small cell lung cancer (PD-L1 expression-dependent) Recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck Classical Hodgkin lymphoma Microsatellite instability-high cancers ^b Recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (PD-L1 expression-dependent) Locally advanced or metastatic urothelial carcinoma
Nivolumab + ipilimumab	PD-1 inhibitor + CTLA-4 inhibitor	Metastatic or unresectable melanoma (first line)
Ipilimumab	CTLA-4 inhibitor	Adjuvant therapy for stage 3 melanoma Metastatic melanoma
Atezolizumab	PD-L1 inhibitor	Locally advanced or metastatic urothelial carcinoma Metastatic non-small cell lung cancer
Durvalumab	PD-L1 inhibitor	Locally advanced or metastatic urothelial carcinoma

Note. PD-1 = programmed cell death protein 1; PD-L1 = programmed cell death ligand 1; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. Information from FDA (2014a-c, 2015a-f, 2016a-e, 2017a-h).
^aApproval in the second-line metastatic setting unless otherwise noted.
^bFirst cancer treatment approved for solid tumor based on specific genetic feature.

Tableau 2 : ICI approuvés par la FDA³⁹, cibles et indications.

Ces trois marqueurs sont des récepteurs de surfaces exprimés majoritairement par :

- Les LT (*lymphocyte T*) régulateurs, des lymphocytes immunosupresseurs rétro contrôlant la réponse immunitaire en inhibant les CPA (*Cellules présentatrices d'antigènes*). Cette inhibition passe par l'expression du CTLA-4, récepteur ayant une affinité importante avec le CD80/86 des CPA. CD80/86 sont des molécules indispensables à l'activation des LT cytotoxiques. L'inhibition de ce signal par la reconnaissance du CTLA-4 inhibe l'activation des LT cytotoxiques⁴⁰.
- Les tumeurs peuvent également surexprimer des points de contrôles immunitaires les rendant résistantes à la réponse immunitaire cellulaire [Figure 16]³⁹.

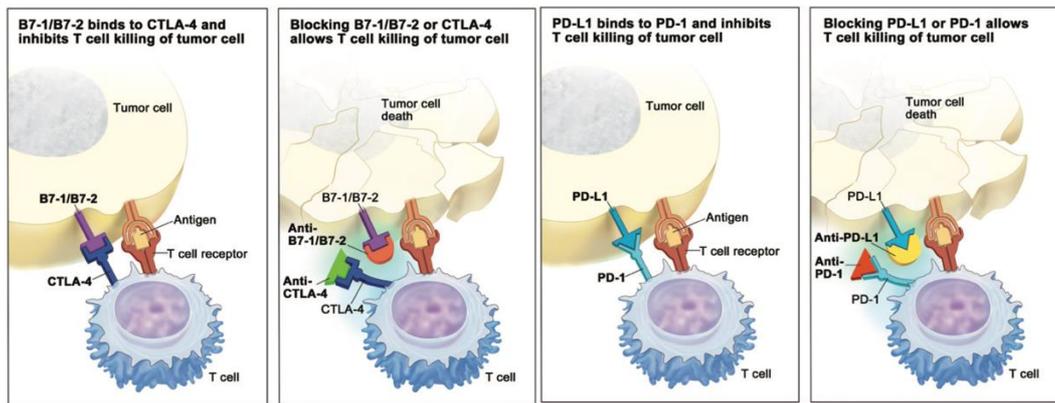


Figure 16 : mécanisme d'action des ICI³⁹. En bloquant la liaison PD1/ PDL1 ou la liaison CTLA4/B7(CD80/86), les ICI permettent de lever l'inhibition de la lyse cellulaire tumorale par les lymphocytes T cytotoxiques.

Malheureusement, seulement une personne sur trois est répondeuse lorsque ces thérapies sont administrées seules. Afin d'améliorer le taux de réponse, différentes stratégies ont vu le jour, notamment la stratification des patients afin de déterminer quel patient pourrait potentiellement être réceptif aux immunothérapies. Cela comprend la recherche de biomarqueurs typiques des tumeurs dites « froides » et « chaudes » immunologiquement. Les tumeurs « froides » correspondent à des tumeurs dont le micro-environnement tumoral (MET) est pauvre en leucocytes. Cette faible densité des effecteurs de l'immunité peut être associée à une surexpression de voies de signalisation inhibitrices de l'immunité. Ces tumeurs présentent une forte probabilité d'échec lors de l'administration d'immunothérapie car elles échappent à la surveillance du système immunitaire. Les tumeurs « chaudes » à l'inverse sont riches en leucocytes et la probabilité de réponse lors de l'administration d'immunothérapie est plus importante.

L'union de l'immunothérapie avec d'autres thérapies est également étudiée, comprenant l'association avec des nanomédicaments. En plus du ciblage passif (via l'*EPR effect*) et du ciblage actif par les nanovecteurs de 3^{ème} génération, les nanotechnologies semblent avoir des applications prometteuses en association avec l'immunothérapie. Par différents mécanismes, elles permettent de modifier la dynamique immunitaire au sein du MET des tumeurs dites « froides » afin de les rendre plus immunogènes et réceptives aux immunothérapies¹.

B. Ciblage des cellules cancéreuses

Les nanomédicaments peuvent être utilisés afin de promouvoir une mort immunogène des cellules cancéreuses aboutissant en la libération de DAMPs (*Danger-associated molecular patterns*).

Ces DAMPs sont importants car ils déclenchent et amplifient la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses après phagocytose par les CPA, activant ces dernières. Les CPA activées sont alors impliquées dans la génération de lymphocytes T (LT) cytotoxiques après maturation. Ces LT migreront sur les sites tumoraux afin d'éradiquer les cellules cancéreuses. C'est à ce moment-là que l'immunothérapie, *via* les ICI, est utilisée afin de bloquer les signaux inhibiteurs qui pourraient contrer l'action anti tumorale des LT cytotoxiques [Figure 17].

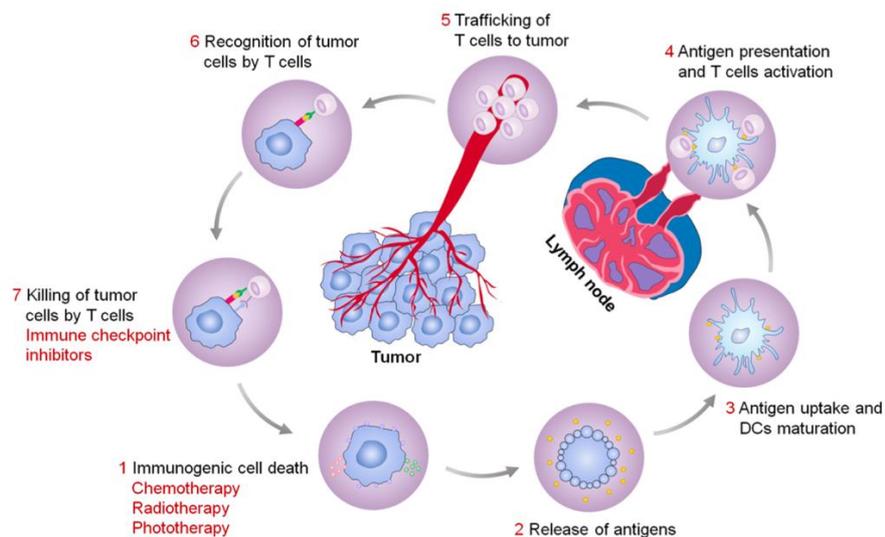


Figure 17 : mécanisme de la mort cellulaire immunogène⁴¹.

Les DAMPs peuvent être induits par certains types de chimiothérapies, par exemple, la doxorubicine, l'oxaliplatine et le cyclophosphamide. La radiothérapie, et d'autres stimuli physiques peuvent également être impliqués dans la formation de DAMPs. La translocation de la calréticuline à la surface cellulaire, la libération d'ATP (*adénosine triphosphate*), d'ADN, de filaments de l'actine-F et de la protéine HMGB1 (*High mobility group box 1 protein*) dans l'environnement extracellulaire sont les principaux DAMPs connus à ce jour [Figure 18].

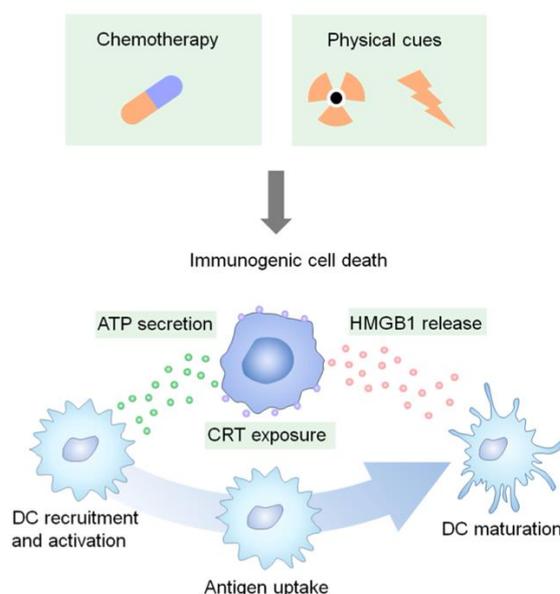


Figure 18 : certaines chimiothérapies et stimuli peuvent induire une mort cellulaire immunogène par le relargage de DAMPs⁴¹.

Certains nanomédicaments comme le Caelyx® et le Doxil®, connus pour générer une mort immunogène des cellules cancéreuses sont également de plus en plus utilisés en association avec l'immunothérapie⁴². De plus, la diminution des toxicités hématologiques attribuées à certains cytotoxiques lorsqu'ils sont encapsulés dans un nanovecteur peut être impliquée dans l'amélioration de la réponse immune en limitant l'immunodépression dont les patients sont généralement victimes.

L'association de plusieurs thérapeutiques déclenchant la mort immunogène des cellules cancéreuses pourrait donc permettre d'augmenter le taux de réponse et la survie des patients éligibles.

C. Ciblage du micro-environnement immunitaire tumoral

De nombreuses voies de signalisation immunosuppressives sont souvent surexprimées dans le MET, notamment par l'infiltration au sein de la tumeur de TAM (*tumor-associated macrophages*) qui sont dans la majorité des cas des macrophages polarisés *de type M2*. Ce phénotype *M2* correspond à des macrophages pro-tumoraux et immunosuppresseurs inhibant la pénétration lymphocytaire dans le MET ainsi que l'action des immunothérapies. Ces TAM modulent la réponse immune anti tumorale en ciblant les cellules de l'immunité telles que les macrophages, les cellules

dendritiques et le lymphocytes T et inhibent certaines voies de signalisation immunosuppressives dans le micro-environnement tumoral [Figure 19].

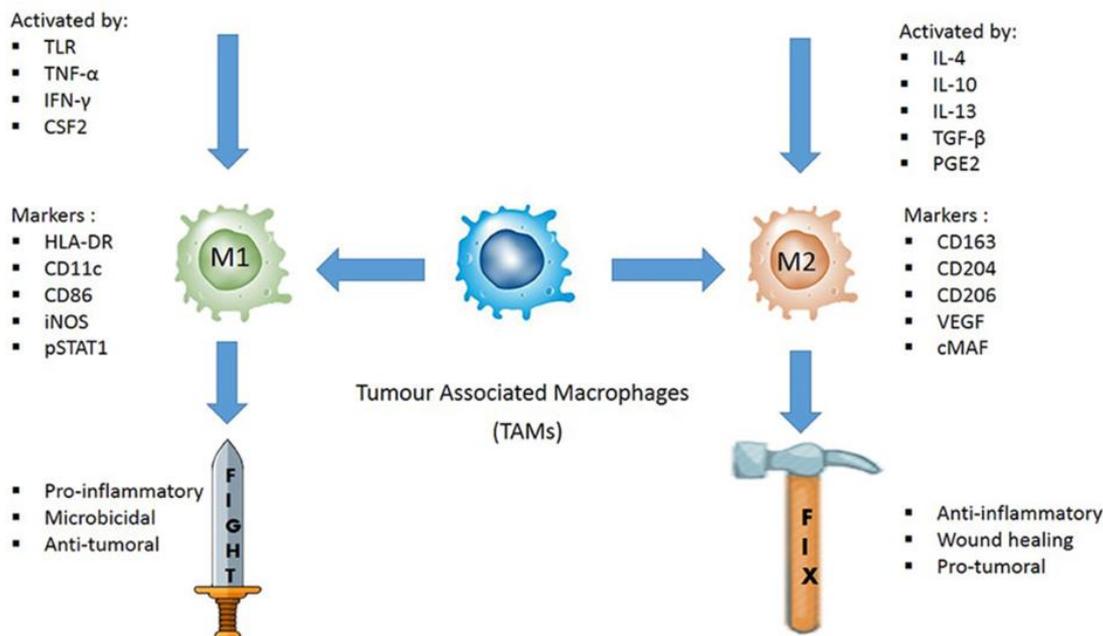


Figure 19 : macrophages associés aux tumeurs : activateurs, marqueurs et propriétés selon le phénotype⁴³.

Certaines nanoparticules ont démontré leur capacité à modifier le phénotype de ces macrophages en *type M1*, un phénotype aux propriétés anti tumorales et pro-inflammatoires. Une étude a démontré qu'une injection systémique de ferumoxytol, une nanoparticule à base d'oxyde de fer super paramagnétique avait la capacité à changer la polarisation des TAM de *type M2* en *type M1*, inhibant ainsi la croissance tumorale et la dissémination des métastases dans le foie et les poumons.

Des études ont également démontré que certains cytotoxiques pouvaient présenter des mécanismes d'action similaire et synergique avec l'immunothérapie. Par exemple, il a été démontré que l'utilisation de docétaxel, le cytotoxique que nous utilisons dans la formulation de notre liposome a également la capacité d'activer les effecteurs immuns en induisant la polarisation de monocytes et de TAM de *type M2* en TAM de *type M1*.

D'autre part, les monocytes internalisant le docétaxel secrètent des taux d'IL1- β et d'IL8 augmentés, résultant en une réponse pro-inflammatoire du MET favorable aux immunothérapies. Il a également été montré que certaines thérapies et cytotoxiques tels que le paclitaxel ont la propriété d'accélérer la maturation des cellules dendritiques. D'autres PA tels que la doxorubicine peuvent diminuer la quantité de

cellules immunitaires immunosuppressives telles que les MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*) sur le site de la tumeur⁴⁴.

Les nanomédicaments peuvent également agir sur les inhibiteurs solubles présents dans le MET tels que le TGF- β (*transforming growth factor beta*) et l'IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*). Ces deux molécules promeuvent la conversion du tryptophane en kynurenine, un puissant inhibiteur des LT. Elles ont également le pouvoir d'activer la différenciation des LT régulateurs, lymphocytes inhibant la réaction immunitaire au sein du MET. Des études ont démontré que l'injection de nanoparticules conjuguées avec des inhibiteurs du TGF- β ou de l'IDO diminuait l'inhibition tumorale et augmentait la prolifération des LT⁴².

L'ensemble de ces résultats expérimentaux suggèrent que combiner ou associer des nanotechnologies et chimiothérapies peut potentialiser la réponse immune anti tumorale et agir en synergie avec les médicaments utilisés en immunothérapie tels que les ICI.

D. Ciblage du système immunitaire périphérique

Le ciblage des organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques est également une stratégie intéressante car c'est à ce niveau que la présentation antigénique entre les CPA et les LT cytotoxiques se déroule. Ces organes sont donc essentiels dans la réaction immune anti-tumorale mais souvent altérés dans les pathologies cancéreuses.

En potentialisant la présentation des antigènes (Ag) par les CPA (notamment par la génération de DAMPs), les nanoparticules permettent de restaurer les fonctions des organes lymphoïdes secondaires. Elles ont notamment la capacité de se drainer jusqu'aux ganglions lymphatiques et d'améliorer la phagocytose des Ag par les CPA, ainsi que leur préparation en fragments antigéniques [**Figure 20**].

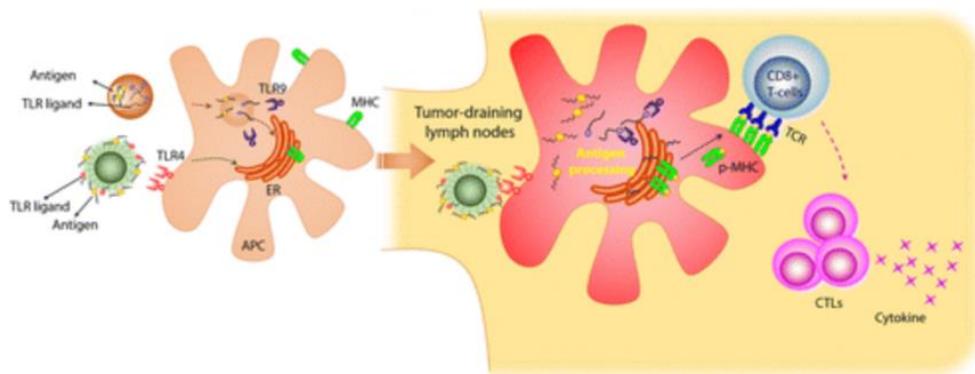


Figure 20 : drainage lymphatique des CPA après activation par les nanoparticules et présentation d'un Ag spécifique de la tumeur. Les nanoparticules encapsulant des antigènes et adjuvants peuvent être utilisées afin de promouvoir l'activation et le drainage lymphatique des CPA. Une fois au niveau des ganglions lymphatiques, la présentation de l'Ag aux LTCD8+ immatures entrainera leur activation en LT cytotoxiques « actifs » et amplifiera la réponse immunitaire anti tumorale par la libération de cytokines pro-inflammatoires⁴⁵.

De nombreuses recherches se sont basées sur cette propriété afin de mettre au point des vaccins anticancéreux. Des équipes ont développé des nanovaccins contenant un antigène peptidique couplé à des motifs CpG (*cytosine-phosphate-guanine*). Les motifs CpG servent d'adjuvant et sont reconnus par le TLR9 (*Toll-like receptor 9*), un récepteur de l'immunité innée qui induit l'activation des macrophages, des cellules NK, des lymphocytes B ainsi que la prolifération des LT cytotoxiques⁴⁶. Ces vaccins ont réussi à atteindre les ganglions lymphatiques et permis d'améliorer l'immunité anticancéreuse.

E. Objectif du travail expérimental

L'objectif de ce projet en collaboration avec l'institut Roche et Genentech est de développer un immunoliposome encapsulant le docétaxel et exerçant un ciblage actif grâce à des molécules de trastuzumab (Herceptin®) à sa surface, ceci afin d'évaluer ses propriétés immunomodulatrices en association avec un anti-angiogénique, le bevacizumab (Avastin®) et l'atezolizumab (Tecentriq®), un anti PD-L1 inhibiteur des checkpoints de l'immunité. Ce mémoire présente une partie du travail préliminaire à cette étude, comprenant l'optimisation d'un liposome de 3^{ème} génération, l'ANC-1

(Antibody-drug conjugate-1) préalablement développée au sein du laboratoire⁴⁷. Des études comparatives ont montré que l'ANC-1 fonctionnait mieux que les traitements de référence tels que l'association trastuzumab et docétaxel ou que le Kadcyla® dans le cancer du sein HER2+. Cette supériorité a ensuite été confirmée chez des modèles de souris xéno greffées⁴⁷. Par ailleurs, nous présenterons la mise au point des études *in vitro* et *in vivo* nécessaires à l'étude de ses propriétés immunomodulatrices.

Partie V Matériels & méthodes

A. Préparation d'un liposome de 2^{nde} génération

La synthèse de nos liposomes se réalise en plusieurs étapes et se base sur le principe du *microfluidic mixing* permettant la synthèse rapide de liposomes. Antérieurement, nos liposomes étaient fabriqués selon la *Thin Film Method* couplée à l'extrusion qui sont parmi les méthodes de référence. Cependant, cette méthode était fastidieuse et très chronophage. La commercialisation d'automates par l'entreprise canadienne *Precision Nanosystems*TM spécialisée dans la formulation de nanovecteurs a permis l'essor d'une nouvelle méthode basée sur le principe du *microfluidics mixing*. Cette nouvelle technologie permet de synthétiser des liposomes de façon beaucoup plus rapide (quelques minutes vs. 16 heures), et plus simple en comparaison avec la méthode précédente.⁴⁸

A.1. Composition et préparation de la solution mère (SM)

La synthèse de liposomes nécessite la pesée préalable des différents composants ainsi que leur solubilisation ; on obtient alors une solution mère (SM). La composition de la SM utilisée afin de synthétiser nos lots a été déterminée préliminairement à ce travail :

- L- α -phosphatidylcholine egg-yolk (ePC)	50 mg
- Cholestérol (CHOL)	16 mg
- Polyéthylène glycol maléimide (PEG-mal)	3,9 mg
- Docétaxel	1,9 mg

- La ePC est le constituant principal de nos liposomes et un des principaux phospholipides membranaires avec les céphalines et les sphingomyélines. Les phospholipides sont des composés amphiphiles avec une extrémité polaire, correspondant à une molécule à fonction alcool : la choline, associée à un acide phosphorique, lui-même lié de façon covalente à une molécule de glycérol. La partie hydrophobe ou apolaire est composée de deux acides gras fixés à la molécule de glycérol. Cette dualité polaire/apolaire permet l'assemblage des lipides en bicouche lipidique lorsqu'ils sont disposés en milieu aqueux. Les phosphoglycérides dont fait partie la phosphatidylcholine constituent plus de 35%

du poids sec des lipides membranaires ; ce sont des molécules biocompatibles et physiologiques justifiant l'emploi de l'ePC dans notre formulation⁴⁹.

- Le CHOL est un lipide stéroïdien composant environ 20% des membranes cellulaires. Son rôle est primordial car il intervient dans la fluidité ainsi que la stabilité des membranes biologiques⁴⁹ et donc par analogie, de nos liposomes. Une augmentation du taux de CHOL entraîne une diminution de la perméabilité membranaire associée à une rigidité augmentée, favorisant la stabilité des bicouches lipidiques en milieu sérique. Pour notre formulation, une fraction molaire de 30% de cholestérol a été choisie car elle permet d'améliorer leur stabilité in vitro et in vivo⁵⁰.
- Le PEG-MAL est un polymère hydrosoluble conférant le caractère furtif à notre liposome ainsi que sa stabilité dans la circulation sanguine. Il permet principalement d'éviter leur opsonisation ainsi que leur dégradation par le système immunitaire inné. La fonction maléimide a pour rôle de servir de linker lors de la greffe de trastuzumab à la surface de notre liposome. Cependant, cette partie du procédé de synthèse permettant la synthèse d'un liposome de 3^{ème} génération ne sera pas abordée dans ce mémoire.

Tous ces composants se présentent sous forme de poudres conservées à -20°C et sont commercialisés par Sigma Aldrich. Ces ingrédients sont ensuite introduits dans un erlenmeyer et solubilisés dans 5 ml de méthanol. La SM obtenue est ensuite vortexée et soniquée afin d'être homogène et limpide. Il est important de la conserver à l'abri de la lumière par l'utilisation d'une feuille d'aluminium lors du transport car les lipides s'oxydent à la lumière. Une conservation hermétique avec un bouchon et du parafilm est également indispensable car l'évaporation du méthanol fausserait nos résultats en concentrant la SM.

Les lots générés sont caractérisés par différents critères se doivent de répondre à des prérequis fixés en amont afin d'être validés :

- Sa taille et sa capacité à bénéficier de l'EPR *effect* ;
- Son homogénéité morphologique correspondant à un taux de liposomes unilamellaires élevé ;
- Son efficacité d'encapsulation ;
- La stabilité de la taille et de l'efficacité d'encapsulation dans le temps.

A.2. Principe de la Thin Film Method

Cette méthode de préparation des liposomes comporte plusieurs étapes :

- Dissolution des lipides et du PEG dans un solvant organique tel que du chloroforme ou du méthanol.
- Dissolution de la molécule à encapsuler, dans notre cas le docétaxel, dans le solvant de dilution. Des expériences antérieures réalisées au sein du laboratoire suggèrent un ratio molaire optimal compris entre 200:1 et 50:1.
- Évaporation du solvant organique dans un bain marie sous 38°C et sous une pression de 900 mbars pendant 30 minutes. Cette évaporation permet l'obtention d'un film lipidique. Pour cela, la température doit être supérieure à la température critique des lipides.
- Dispersion des lipides dans un solution aqueuse telle que du PBS ou du Glucose 5%.

On obtient alors des liposomes multilamellaires (MLV : *Multilamellar Large Vesicle*). Une étape afin de réduire la taille de nos liposomes et obtenir des liposomes unilamellaires (SUV : *Small unilamellar Vesicle*) est alors nécessaire. Au sein du laboratoire, la technique utilisée était celle de l'extrusion.

Principe de l'extrusion :

Cette technique est un procédé mécanique qui permet d'obtenir des SUV de taille réduite à partir de MLV. Le principe de cette méthode repose sur le passage des liposomes à travers un filtre en membrane de polycarbonate. Un bain-marie est utilisé afin de maintenir une température supérieure à la température critique des lipides, ceci afin de maintenir les liposomes sous forme de fluide. Une pression de 6 bars est appliquée via de l'azote sous forme gazeux afin que les liposomes passent à travers le filtre.

Plusieurs extrusions successives peuvent être répétées afin de réduire la taille des liposomes obtenus. Cependant, le nombre de passage entraîne une diminution du taux de docétaxel encapsulé.

A.3. Principe du microfluidic mixing

Le *microfluidic mixing* permet d'obtenir un mélange minutieux et rapide de plusieurs liquides⁵¹. Ce principe a été démocratisé par la commercialisation d'automates par l'entreprise canadienne *Precision Nanosystems*TM et permet l'obtention de nanoparticules lipidiques (micelles, liposomes...). Dans ces nanoparticules, pourront être encapsulées une large variété de molécules telles que des acides nucléiques, des protéines ou, dans notre cas, de petites molécules cytotoxiques telles que le docétaxel. Ses principaux avantages vis-à-vis de l'ancienne méthode précédemment présentée sont sa facilité d'utilisation ainsi que le gain considérable de temps nécessaire afin de synthétiser un lot de liposomes⁴⁸.

La technologie développée par *Precision Nanosystems*TM se base sur l'utilisation d'automates tels que le NanoAssemblr® Benchtop utilisé au sein du laboratoire. On y insère une cassette à deux entrées [**Figure 21**] : une pour la phase aqueuse, l'autre pour la solution contenant la SM et le docétaxel. Ces cartouches sont composées d'un système de canalicules dans lesquels nos solvants sont mis en contact.

Les liposomes seront produits après plusieurs étapes⁵²:

- Un bloc chauffant est réglé sur la température d'ébullition du solvant (permettant d'améliorer l'homogénéité du lot) ;
- La phase aqueuse et la SM contenant le docétaxel dissout sont injectées dans chaque entrée de la cartouche NanoAssemblr®. Le logiciel inclus avec l'automate permet de contrôler le ratio d'injection des deux phases ainsi que les volumes injectés.
- Sous flux laminaire, les deux phases ne se mélangent pas immédiatement ;
- Des canalicules microscopiques intégrées au canal permettent de contrôler de manière reproductible le mélange des deux flux ;
- Les phases sont alors mélangées rapidement et de façon contrôlée permettant ainsi de produire des nanoparticules de morphologie et de taille homogènes.



Figure 21 : NanoAssemblr Benchtop® : matériel et principe. A. Photo de l'automate ; B. Cartouche utilisée pour la synthèse ; C. Schéma présentant le principe de la microfluidics mixing. Images issues du site Precision NanoSystem®⁵³.

A.4. Principe du NanoAssemblr Benchtop®

Le *Nanoassemblr Benchtop®* est un automate commercialisé par l'entreprise *Precision Nanosystems™* en 2013. Sur le principe du *microfluidics mixing*, il permet la synthèse rapide de plusieurs formes nanovectorielles lipidiques, ainsi que l'encapsulation de divers principes actifs. Comme vu précédemment, différents paramètres peuvent être modifiés et influent sur les propriétés du nanovecteur synthétisé (taille, stabilité, efficacité d'encapsulation...). Des essais ont donc été réalisés afin d'obtenir une morphologie optimale pour notre liposome furtif.

Parmi les paramètres liés à l'automate, on retrouve :

- **Le Total Flow Rate (TFR ; ml/min)** : correspond au débit auquel l'appareil va injecter les différentes phases liquide et organique. Le partage de ce débit entre les phases se fait selon le *Flow Rate Ratio*. La taille des liposomes est inversement proportionnelle à l'augmentation de ce paramètre.⁵⁴
- **Le Flow Rate Ratio (FRR)** : correspond au ratio phase aqueuse/phase organique injecté. La modification du FRR en faveur de la phase organique entraîne une augmentation de la taille des nanoparticules⁴⁸.
- **La phase aqueuse utilisée** : les propriétés et la quantité de phase aqueuse utilisée ont une influence sur les différentes propriétés de la nanoparticule. L'utilisation d'un tampon ionique dans le solvant de dilution peut par exemple permettre d'augmenter l'efficacité d'encapsulation de notre formulation. Cependant, la molarité de ce tampon ajouté a dû être étudiée. En effet, une molarité trop importante de ce dernier peut affecter la stabilité de nos liposomes et impacter négativement leur

structure en favorisant la formation de MLV. Après synthèse, les liposomes sont dilués dans un volume prédéterminé de Glucose 5% (G5%) afin d'augmenter leur stabilité. Un TFR de 8 ml/min et un FRR de 1:2 a permis l'obtention de liposomes de taille adéquate pour le lot validé préalablement à ce travail.

B. Caractérisation des liposomes

B.1. Évaluation de la taille et de la morphologie des nanoparticules

La taille des liposomes synthétisés est un paramètre primordial car il impacte leurs distribution, élimination ainsi que la quantité de cytotoxique pouvant être encapsulée. Notre objectif est que nos nanoparticules soient suffisamment petites afin de bénéficier de l'*EPR effect*⁶, tout en ayant une capacité d'encapsulation du docétaxel suffisante. Nous utilisons donc deux méthodes différentes afin de caractériser la morphologie et la taille :

- Le *light scattering* (ou diffusion dynamique de la lumière)
- La cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM)

Principe du Light Scattering

Le *Light Scattering* est une méthode spectroscopique d'analyse des tailles de particules en suspension dans un liquide. L'analyse est réalisée par un nanosizer et les résultats retranscrits sous forme de pic(s) par un enregistreur. Les pics obtenus nous renseignent sur la distribution (nombre de pic(s)) et la dispersion des tailles (proportionnelle à la largeur du pic) de nos particules. Notre objectif est donc d'obtenir un seul pic, le plus fin possible. La cuve contenant notre lot de liposomes à analyser est placée dans le nanosizer, ce dernier émet un faisceau laser qui va traverser la suspension. Après avoir atteint les particules, ce laser va diffuser dans toutes les directions. Cette diffusion est possible grâce aux mouvements browniens des particules, qui transmettent alors la lumière à des intensités différentes. La mesure à angle fixe de ces fluctuations rapportées à l'intensité totale permet alors de déterminer la vitesse et donc la taille des particules.

Principe de la cryo-microscopie électronique à transmission

La cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) est une technique utilisée afin de caractériser la morphologie et la taille des liposomes. Les échantillons doivent être préalablement traités et disposés sur une grille fine capable de laisser passer le faisceau d'électrons. La grille est alors rapidement plongée dans de l'éthane liquide afin de congeler l'échantillon. Une fois dans le microscope, la grille est maintenue dans de l'azote liquide à -185°C et l'échantillon est alors traversé par un faisceau d'électrons focalisé par son passage successif au travers d'un système de plusieurs lentilles électromagnétiques. Les différents rayonnements produits par la traversée des électrons sont captés et analysés par un détecteur puis traduits en image de bonne résolution. Cette technique présente l'avantage, comparativement à la microscopie électronique à transmission classique, de mieux préserver la structure et de la morphologie des échantillons biologiques.

Détermination du taux de SUV

Notre but est d'observer le plus de SUV de morphologie homogène. Afin d'estimer le pourcentage d'évènements unilamellaires pour un lot déterminé, plusieurs images cryo-TEM de ce dernier sont sélectionnées aléatoirement et un minimum de 100 évènements est compté sur les champs sélectionnés :

$$\text{Taux de SUV (\%)} = \frac{\text{nombre de SUV comptés}}{\text{nombre total de liposomes comptés}} \times 100$$

Ce pourcentage est un paramètre important afin de caractériser l'homogénéité de nos lots et la structure de nos nanovecteurs.

B.2. Évaluation de l'efficacité d'encapsulation : dosage par CLHP-UV

L'efficacité d'encapsulation est le pourcentage de principe actif encapsulé au sein de notre nanoparticule. Il est primordial que ce taux soit le plus élevé possible afin d'éviter un mauvais rendement qui équivaldrait à une perte importante de docétaxel. La formule suivante est utilisée afin de le calculer :

$$\text{Efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{docétaxel encapsulé}}{\text{docétaxel total}} \times 100$$

Afin de séparer le docétaxel encapsulé dans notre immunoliposome du docétaxel libre, une étape de centrifugation est réalisée. Pour cela, nous utilisons des vivaspins avec un *cut-off* de 300 kDa et le surnageant après centrifugation correspond au docétaxel encapsulé. Un dosage en chromatographie liquide haute performance couplée à l'UV (CLHP-UV) est ensuite réalisé afin de comparer les concentrations en docétaxel des lots centrifugés et non centrifugés. Le rapport de ces deux concentrations multiplié par cent correspond à la formule présentée ci-dessus. L'efficacité d'encapsulation est importante car elle permet de déterminer la dose de nanovecteurs à administrer.

Principe de la CLHP-UV

La CLHP est une technique de séparation et d'identification des analytes qui repose sur une différence d'affinité des échantillons entre la phase stationnaire et mobile. Elle est également utilisée afin de quantifier les éléments présents dans un mélange. Les échantillons sont poussés par la phase mobile à travers une colonne contenant la phase stationnaire, les composés se répartiront différemment le long de la colonne selon leurs propriétés physico-chimiques et sortiront donc à des temps de rétention différents. Un détecteur UV permet de détecter les analytes à leur sortie de la colonne, c'est pourquoi nous parlons de CHLP-UV.

Conditions chromatographiques

Nous utilisons la méthode de dosage validée au sein du laboratoire en 2014 [Annexe 1]. La gamme utilisée est composée de six niveaux de concentrations allant de 250 à 10.000 ng/ml. La colonne montée sur un appareillage *Agilent* était de type C18 (25cm x 4.6mm x 5µm) avec un débit de 1,8 ml/min. La phase mobile utilisée était constituée d'un mélange acétonitrile/tampon acétate d'ammonium à pH=5 (v:v 47:53). Le volume injecté pour chaque échantillon est de 100 µl et le détecteur UV paramétré pour détecter les composés émettant à la longueur d'onde de 227nm. Afin de compenser de potentielles erreurs ou variations au cours des manipulations et ainsi minimiser le risque d'erreur, 20µl d'un étalon interne, le paclitaxel est ajouté à chaque échantillon. Le paclitaxel a été choisi car il présente des propriétés physico-chimiques très proches de celles de docétaxel tout en ayant un temps de rétention différent.

C. Étude *in vitro* d'efficacité

C.1. Culture cellulaire

Lignée cellulaire

Pour nos manipulations *in vitro*, nous avons utilisé des cellules 4T1 fournies par PerkinElmer® (Bioware® Brite Cell Line 4T1-Red-FLuc). Cette souche cellulaire, issue d'une tumeur mammaire, provient à l'origine d'une souris de souche BALB/c. Ces cellules sont connues pour leur forte capacité à métastaser et n'expriment ni les récepteurs aux oestrogènes, ni à la progestérone, ni à l'HER2. Elles sont donc triples négatives et par cette propriété, ressemblent aux cellules de cancer du sein humain triples négatives. Cependant, afin d'évaluer l'effet du trastuzumab sur des cellules exprimant le récepteur à l'HER2, une partie de nos cellules a été transfectée préalablement au sein du laboratoire afin qu'elles présentent ce récepteur à leur surface. Nos cellules 4T1 sont également transfectées à la luciférase ; cette transfection a été réalisée préalablement à leur achat. Nos essais *in vitro* sont donc réalisés sur deux conditions différentes :

- Les cellules 4T1 luciférase+ triples négatives ;
- Les cellules 4T1 luciférase+ transfectées HER2+.

Principe

Pour cultiver nos cellules, nous avons utilisé le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) avec L-glutamine supplémenté avec :

- 10% de sérum de veau fœtal ;
- 1% de pénicilline/streptomycine ;
- 0.16% de Kanamycine.

Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂, leur manipulation se réalise sous hotte à flux laminaire afin de diminuer les risques de contamination microbienne.

Trypsination

Lorsque nos cellules sont à une confluence de 70/80% dans leur flasque T75, il est nécessaire de les décoller et de les transférer dans une autre flasque afin qu'elles disposent de l'espace nécessaire à leur croissance et ne soient pas en souffrance.

C'est à ces occasions que les cellules sont disponibles afin de réaliser nos expérimentations *in vitro*.

La trypsination se déroule en deux étapes :

- La première consiste, après aspiration du milieu, à rincer nos cellules avec 5ml de PBS/EDTA (EthyleneDiamineTetraAcétique) 0,5 mM à 37°C. Le PBS (*phosphate buffered saline*) est un tampon physiologique permettant l'élimination des restes de milieu contenant des débris cellulaires et divers ions (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ayant la capacité d'inhiber la trypsine. L'EDTA qui est un chélateur du calcium va permettre de fixer et neutraliser les ions restants afin de décoller nos cellules.
- Lors de la seconde étape, 2 ml de trypsine à 37°C sont ajoutés après aspiration du PBS/EDTA.

La trypsine est une protéase isolée du pancréas qui catalyse le clivage des liaisons peptidiques. Son action permet de séparer les cellules entre elles et de les décoller de leur support. Le temps de contact entre les cellules et la trypsine doit être le plus court possible car l'exposition à cette dernière leur est toxique.

Après avoir décollé les cellules, une partie ou la totalité des cellules (selon l'expérience à réaliser) est transféré dans du milieu de culture supplémenté. Il est alors possible de les compter et de les ensemercer.

C.2. Étude de cytotoxicité en 2D : Test au MTT

La prolifération cellulaire se définit comme la multiplication des cellules par suite du phénomène de mitose. Dans le cas des cellules cancéreuses, cette prolifération est anarchique, incontrôlée et illimitée d'où son importance dans la formation de tumeurs. De nombreux cytotoxiques ont pour rôle de cibler cette capacité de prolifération afin de stopper la croissance tumorale. De ce fait, plus une molécule a une efficacité antiproliférative importante, plus elle est active.

Plusieurs tests existent afin d'évaluer la cytotoxicité et l'activité antiproliférative d'une molécule *in vitro*, parmi eux le SRB assay ainsi que les tests au Bleu d'Alamar et au MTT sont considérés comme des références et permettent de déterminer l'IC50 d'un principe actif sur une lignée cellulaire. L'IC50 correspond à la concentration pour laquelle 50% de la population cellulaire meurt et permet de définir les concentrations

à utiliser dans les expériences suivantes, c'est pourquoi ces études doivent être réalisées prioritairement.

Comptage et ensemencement des cellules

Après l'étape de trypsination permettant de les décoller du support de culture, les cellules sont mises en suspension dans du milieu complet. Le nombre de cellules est déterminé via le Z2 Coulter (Beckman Coulter®) après dilution au centième de la suspension cellulaire dans une cuvette adaptée contenant une solution isotonique. Le Z2 Coulter compte le nombre de particules de taille supérieure à 6 µm dans le liquide de dilution et calcule le nombre de cellules par millilitre contenues dans notre suspension.

Ce test nécessite l'ensemencement des cellules sur 7 colonnes de 8 puits. Différentes densités cellulaires ont été testées, allant de 6000 à 20.000 cellules par puits. Afin d'éviter l'effet de bord, les colonnes aux extrémités sont encadrées par un volume équivalent de milieu ou de PBS. Cet effet de bord correspond à l'évaporation des solutions contenues dans les puits les plus externes de notre plaque 96 puits, modifiant ainsi leur croissance cellulaire. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂.

Traitement des cellules

Afin d'étudier l'activité antiproliférative du docétaxel libre et de déterminer son IC₅₀, nous avons traité nos cellules avec une gamme de concentration de cinq niveaux allant de 0,01 à 100 nM [Figure 22]. Les colonnes périphériques (hors effet de bord) correspondent aux témoins et encadrent nos cellules incubées avec les différentes concentrations en docétaxel. Le choix de la gamme se base sur le travail de *J-L. Merlin et al*⁵⁵.

		[Docétaxel] (nM)						
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord
Effet de bord	Témoin	100	10	1	0,1	0,01	Témoin	Effet de bord

Figure 22 : plan de plaque et concentrations utilisées afin de traiter les cellules.

Révélation

Après 72 heures d'exposition, le milieu contenant le docétaxel est retiré et remplacé par 100 μ L d'une solution de MTT solubilisé dans du milieu simple à 0,5 mg/ml. Le MTT (*3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) est une poudre jaune qui, au contact de cellules vivantes, forme des cristaux de formazan par l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. L'ajout de DMSO (Diméthylsulfoxyde) permet de solubiliser ces cristaux qui apparaissent violets. De ce fait, plus un puits est coloré, plus la viabilité cellulaire y est importante. La lecture des plaques se fait via mesure spectrophotométrique à 550 nm par le lecteur de plaque PowerWave XS2 commercialisé par BioTek®.

C.3. Quantification du récepteur HER2 par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de mesurer divers paramètres dans une population de cellules en suspension. Les cellules passent une à une devant un laser ainsi qu'un détecteur captant les lumières émises dans le visible et le fluorescent. La dispersion de la lumière à la suite du passage de chaque cellule est ainsi mesurée dans l'axe du rayon et sous un angle de 90° afin de fournir des informations sur la taille, la viabilité cellulaire et la structure intracellulaire. Le laser permet d'activer un fluorochrome (le cas échéant) et l'intensité de fluorescence peut alors également être corrélée à un phénomène donné. Dans notre cas, la quantification du nombre de récepteur HER2+ par cytométrie en flux a pour but de vérifier si la transfection des cellules 4T1 Luciférase+ avec le récepteur HER2+ ainsi que leur tri (manipulations préalables à ce travail) ont fonctionné. Des quantifications ont été réalisées pendant un mois afin de vérifier la stabilité du transgène dans notre lignée.

Pour cela, environ 1.000.000 de cellules ont été comptées. Ces dernières ont été séparées dans trois tubes de cytométrie distincts puis incubées à l'abri de la lumière pendant trente minutes sous trois conditions :

- Avec 100 μ L de PBS. Cette condition est notre contrôle négatif ;
- Avec 100 μ L d'un anticorps isotypique afin d'écarter l'hypothèse d'une liaison aspécifique de l'anticorps anti-HER2 avec les cellules ;
- Avec 100 μ L d'anticorps anti-HER2 couplés à un fluorochrome.

Les tubes sont alors disposés dans le Gallios, un cytomètre de flux commercialisé par Beckman Coulter. Le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence est alors mesuré nous permettant, grâce à une gamme d'étalonnage (BD Quantibrite™), de déterminer la quantité moyenne de récepteurs HER2+ à la surface des cellules.

D. Essai de greffe tumorale *in vivo*

D.1. Choix des souris

Les animaux utilisés pour nos expérimentations *in vivo* sont des souris femelles BALB/c immunocompétentes fournies par Charles River car les cellules de tumeur mammaire 4T1 que nous utilisons *in vitro* sont issues d'une souris de cette souche. Le choix de souris immunocompétentes est également un facteur important afin d'évaluer l'effet immunomodulateur de notre nanoparticule.

Réception, conditions de vie et entretien des animaux

Les soixante-dix souris ont été fournies par le laboratoire Charles River et étaient âgées de six semaines lors de leur réception le 14/01/21. Préalablement à toute manipulation, elles ont été stabulées pendant dix jours comme le prévoit la directive 2010/63 relative à l'éthique animale.

Les souris sont cinq par cage qui est changée toutes les semaines. La nourriture et l'eau sont disposées en abondance afin de limiter l'instauration d'une compétition entre les souris ce qui peut impacter négativement leur qualité de vie et leur stress. Les cages sont également enrichies avec un dôme en plastique ainsi qu'avec du coton.

D.2. Greffe de cellules cancéreuses

La lignée cellulaire murine de cancer du sein utilisée est donc la 4T1 luciférase positive et transfectée avec des récepteurs HER2. Ces cellules provenant de souris BALB/c ont été greffées au niveau de la deuxième mamelle afin de ne pas entraver la locomotion de la souris ; cela correspond ainsi à une allogreffe orthotopique.

Les greffes sont réalisées selon le protocole du laboratoire et le nombre de cellules greffées est compris entre 500 000 et 1 500 000 par souris afin de déterminer combien de cellules injecter à nos différents groupes pour la suite du projet. Après avoir compté

le nombre désiré, les cellules sont solubilisées dans 50 µL d'un mélange 40:60 (v:v) de PBS et de matrigel, composé dont le point de fusion est de 25°C lui permettant de se solidifier *in vivo* à 37°C, de maintenir nos cellules au point d'injection et éviter leur propagation. Les souris sont préalablement anesthésiées sous sévoflurane 4% (SevoFlo®) avant l'injection. Après injection, une boule au site de l'injection correspondant à la solidification du matrigel se forme.

D.3. Suivi tumoral post-greffe

Suivi du poids

Les souris sont pesées deux fois par semaine afin de s'assurer d'une absence de perte de poids synonyme de souffrance pour l'animal. En cas de perte de poids supérieure à 10% du poids total, l'animal doit être mis à mort. Le poids de nos souris est resté stable au cours du suivi post-greffe.

Suivi de la croissance tumorale par bioluminescence

La croissance tumorale a été suivie par l'imageur *in vivo* Ivis® Spectrum commercialisé par PerkinElmer®. La bioluminescence émise par les tumeurs est mesurée deux fois par semaine et l'unité de mesure est le photon/ seconde. Après injection intrapéritonéale de 150 µl de luciférine dissoute dans du PBS à une concentration de 20 mg/ml, les souris sont ensuite anesthésiées sous sévoflurane 4% et placées dans l'imageur. La croissance tumorale est mesurée douze minutes après l'injection (temps nécessaire afin d'atteindre le pic de bioluminescence).

Partie VI Résultats

A. Formulation

Les nombreux essais de formulation réalisés sont compilés dans le tableau ci-dessous ; nous avons modifié divers paramètres relatifs au ratio molaire ainsi qu'aux différents paramètres du Nanoassemblr® comprenant la composition de la phase aqueuse, du FRR et du TFR. Par ailleurs, le volume de G5% utilisé afin de diluer nos lots après synthèse a été modifié au cours de nos expériences pour des raisons principalement techniques relatives à la qualité des images de cryo-TEM. La concentration moyenne mesurée en CLHP, le taux d'encapsulation (correspondant à notre rendement) ainsi que l'efficacité d'encapsulation sont également présentés pour chaque formulation testée.

N° de lot	Formulation				Nanoassemblr®			Dilution	CLHP		Taux d'encapsulation (%)	Efficacité d'encapsulation (%)
	Docétaxel (mg)	CH (mg)	PC (mg)	PEG mal. (mg)	Phase aqueuse	Flow rate (ml/min)	Flow rate ratio	Volume de G5% post-synthèse	[docétaxel] (ng/ml)	CV (%)		
BL-ANC2021-1 (N=3)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2	2,4 ml	52311 +/- 3438	6,6	51	88
BL-ANC2021-2 (N=1)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	6	1:3		61423 +/- 2524	4,1	57	100
BL-ANC2021-3 (N=2)	1,9	16	50	3,9	MgSO4 600 mM pH= 4	8	1:2		53962 +/- 9842	18,2	55	80
BL-ANC2021-4 (N=1)	1,9	16	50	3,9	MgSO4 600 mM pH= 4	6	1:2		38658 +/- 3239	8,4	36	72
BL-ANC2021-5 (N=1)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:3		68371 +/- 4884	7,1	72	80
BL-ANC2021-6 (N=1)	3,6	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2		88407 +/- 3934	4,5	51	86
BL-ANC2021-7 (N=3)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2	1,2 ml	72841 +/- 11861	16,3	46	79
BL-ANC2021-8 (N=2)	1,9	16	50	2	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2		73169 +/- 29742	40,6	61	58
BL-ANC2021-9 (N=1)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 7	8	1:2		45759 +/- 2004	4,4	47	45
BL-ANC2021-10 (N=1)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:3		51070 +/- 1285	2,5	47	45
BL-ANC2021-11 (N=2)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 150 mM pH= 4	8	1:2		76430 +/- 17757	24,3	58	85
BL-ANC2021-12 (N=1)	1,9	16	50	2	Glucose 5%/MgSO4 150 mM pH= 4	8	1:2		94792 +/- 4873	5,1	75	81
BL-ANC2021-13 (N=1)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	10	1:2	63023 +/- 1956	3,1	47	83	
BL-ANC2021-14 (N=3)	1,9	16	50	3,9	Glucose 5%/KH2PO4 150mM pH= 7,3	8	1:2	59380 +/- 9647	16,2	37	83	

Tableau 3 : compilation des différents lots testés et dosés en HPLC. Dosages réalisés en triplicate ; **BL-ANC** : Blank-Antibodynanoparticule conjugate, correspond à nos liposomes avant l'étape de greffe de trastuzumab.

Le travail d'optimisation entrepris fut motivé par les résultats obtenus en cryo-TEM. En effet, avoir accès à la cryo-microscopie à transmission, une technologie difficilement disponible est une opportunité unique afin de caractériser la morphologie de nos nanoparticules. Avant cela, le lot BL-ANC2021-1 validé préalablement à ce travail présentait des propriétés idéales pour nous : une efficacité d'encapsulation supérieur à 80%, une bonne reproductibilité lors des dosages par CLHP ainsi qu'une homogénéité de taille lors de l'analyse au light scattering. Cependant, les images obtenues en cryo-TEM montraient une proportion significative de liposomes de morphologie multilamellaire et variable dans notre lot [Figure 23 ; A]. Ce dernier ne répond donc pas à nos critères d'homogénéité et a nécessité la réalisation de nouveaux tests de

formulation afin de l'optimiser. L'objectif de ces tests est d'obtenir des liposomes présentant une concentration en docétaxel et une efficacité d'encapsulation comparable au lot BL-ANC2021-1, avec une amélioration de leur morphologie et du pourcentage de SUV en cryo-TEM. Le cas échéant, une taille compatible avec l'EPR-*effect* (inférieure à 200nm) ainsi qu'une faible dispersion de notre population de liposomes (PDI inférieur à 0,2) doit être observée au Light Scattering.

B. Taille et morphologie des liposomes

B.1. Cryo-TEM

Les données obtenues en cryo-microscopie électronique à transmission sont générées afin d'observer nos liposomes et vérifier leur homogénéité morphologique. Notre premier lot à avoir été observé était le BL-ANC2021-1 :

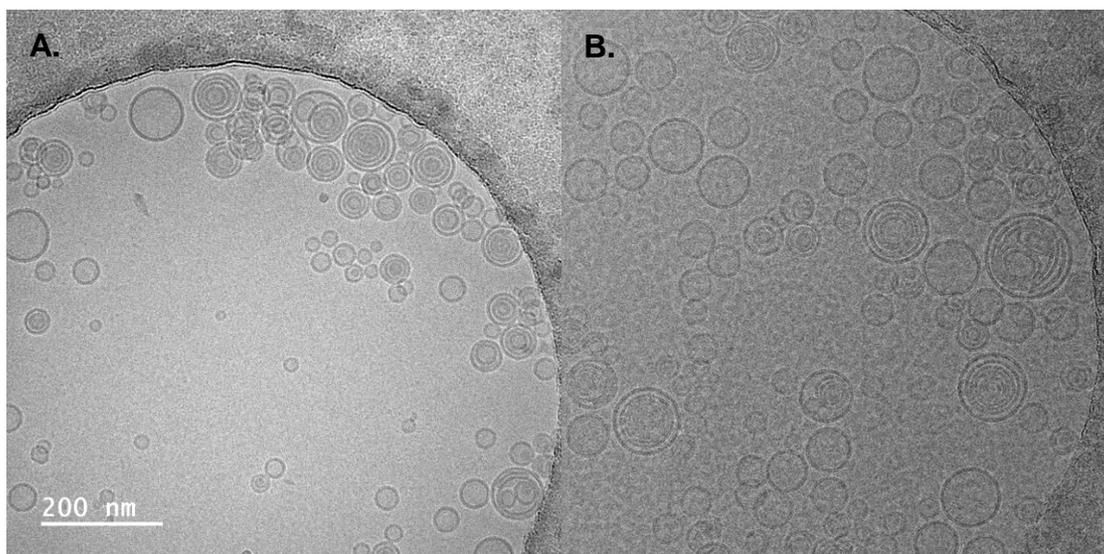


Figure 23 : observation d'image de lots issus de l'analyse par cryo-TEM. A. lot BL-ANC2021-1 ; **B.** lot BL-ANC2021-7

Les résultats obtenus ne sont pas ceux attendus. Nous pouvons observer une importante hétérogénéité entre chaque événement, que ce soit en termes de taille ou de structure car la majorité des liposomes sont des MLV avec un taux de SUV de 45% (n=2) [Figure 23 ; A]. Le docétaxel est une molécule lipophile et, de ce fait, se stocke dans la bicouche lipidique, la multilamellarité peut donc être considérée comme un inconvénient car elle ne permet pas d'avoir des lots reproductibles et homogènes malgré une meilleure rétention de notre cytotoxique. De plus, la synthèse par

NanoAssemblr® fut développée dans l'optique d'obtenir des liposomes unilamellaires ce qui suggère que notre procédé de synthèse peut être amélioré.

Impact des paramètres liés au Nanoassemblr®

Pour les lots BL-ANC2021-2, 4, 5, 10, 13, nous avons étudié l'impact du FRR, du TFR mais aucune amélioration n'a pu être constatée : l'augmentation du FRR à 1:3 a conduit à l'obtention de liposomes beaucoup trop imposants et incompatibles avec l'*EPR effect*, la diminution du TFR a également augmenté la taille.

Afin d'obtenir de meilleures images et faciliter leur observation et leur comptage, il a, par la suite, été choisi de reconstituer nos liposomes avec 1,2 ml de Glucose 5% au lieu de 2,4 ml post-synthèse (lot BL-ANC2021-7). Cette modification a permis d'améliorer les images et la répartition des liposomes sur la grille d'observation en concentrant nos échantillons [**Figure 23 ; B**] et indirectement, d'augmenter la concentration en docétaxel sans avoir à modifier notre pesée comme pour le lot BL-ANC2021-6. Néanmoins, cette modification n'a pas permis d'augmenter significativement le taux de SUV (48 +/- 12 % de SUV ; n=3).

Impact du PEG et du pH

Modifier la pesée de PEG-MAL et le pH de la phase aqueuse (pH = 7 au lieu de 4) n'a entraîné aucune amélioration.

Impact du tampon ionique

Nous avons testé différentes compositions de la phase aqueuse, notamment en testant différents ratios entre le G5% et le MgSO4 : l'utilisation de MgSO4 600 mM comme phase aqueuse a entraîné une augmentation du nombre de MLV. La diminution de l'osmolarité du MgSO4 à 150 mM n'a pas semblé augmenter le nombre de SUV et une forte variabilité inter-occasion fut observée (49 +/- 22 % de SUV ; n=3) [**Figure 24**].

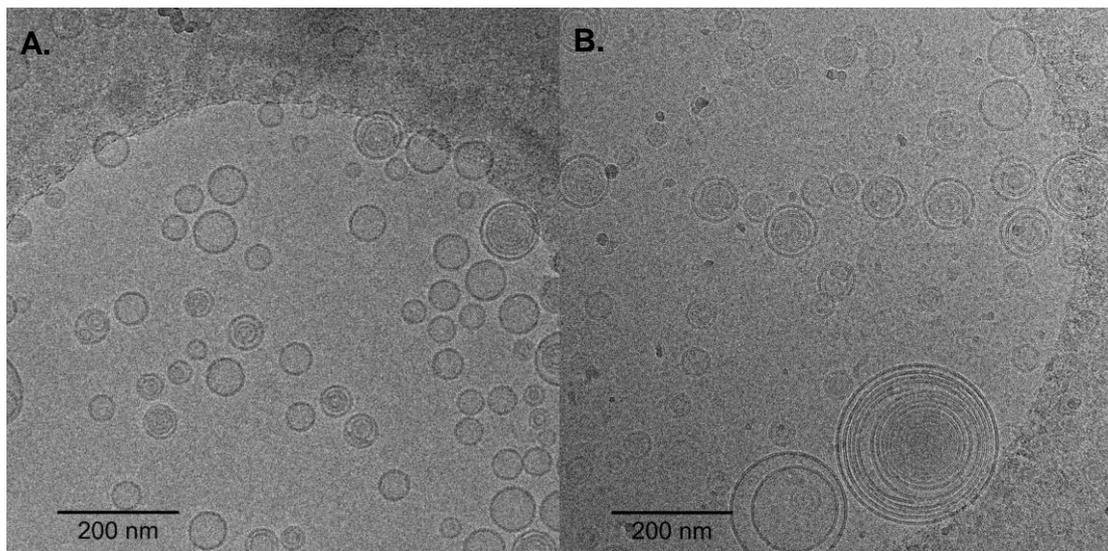


Figure 24 : images du lot BL-ANC2021-11 issues de l'analyse par cryo-TEM.

A. synthétisé le 22/02 : 72% de SUV pour 183 évènements comptés ; **B.** synthétisé le 27/04 : 29% de SUV pour 177 évènements comptés.

Nous avons ensuite remplacé l'ion bivalent Mg^{2+} issu du $MgSO_4$ de notre phase aqueuse par un ion monovalent K^+ provenant du tampon KH_2PO_4 à une concentration de 150 mM car selon notre correspondant expert en formulation de Precision Nanosystem™, les ions bivalents tels que le Mg^{2+} sont considérés fusogéniques et peuvent conduire à la formation de structures lipidiques multilamellaires. Cette modification a permis d'atteindre notre objectif initial qui est d'obtenir une formulation avec un taux de SUV de 99 % (n=3) [Figure 25].

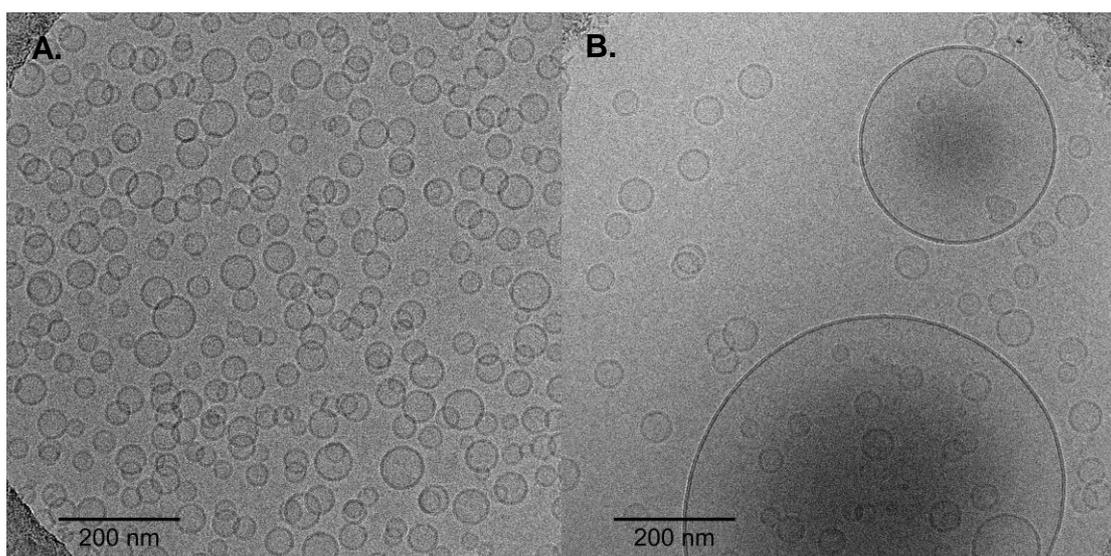


Figure 25 : images du lot BL-ANC2021-14 issues de l'analyse par cryo-TEM. A. SUV ; B. LUV

Les liposomes obtenus sont très homogènes en taille et en structure. Cependant, nous pouvons observer sur certaines images qu'ils ont tendance à fusionner en liposomes de taille élevée (LUV : *large unilamellar vesicle*) même si ce type d'évènement est rare (45 comptés sur 150 champs différents, correspondant à plusieurs milliers de liposomes) [Figure 25 ; B].

Bien qu'à première vue cela puisse être considérée comme un problème, cette propriété confirme leur capacité à pouvoir fusionner avec une bicouche lipidique et donc à être internalisés. Ce lot répond donc à notre prérequis d'homogénéité et est désormais considéré comme notre référence.

B.2. Light scattering

Comparaison entre l'ancien et le nouveau lot de référence

Le lot BL-ANC2021-1 présente une taille moyenne de 122,2 +/- 12,3 nm et le BL-ANC2021-14 une taille de 79,3 +/- 7,3 nm (n=3). Ces tailles sont compatibles avec l'EPR *effect* et la dispersion faible des tailles avec des PDI inférieurs à 0,2 pour chaque lot. Néanmoins, on remarque une nette diminution de taille pour notre nouveau lot, les seules différences dans le procédé de synthèse sont le changement du tampon et de l'osmolarité de ce dernier, démontrant un impact important de l'un de ces paramètres sur la taille de nos liposomes.

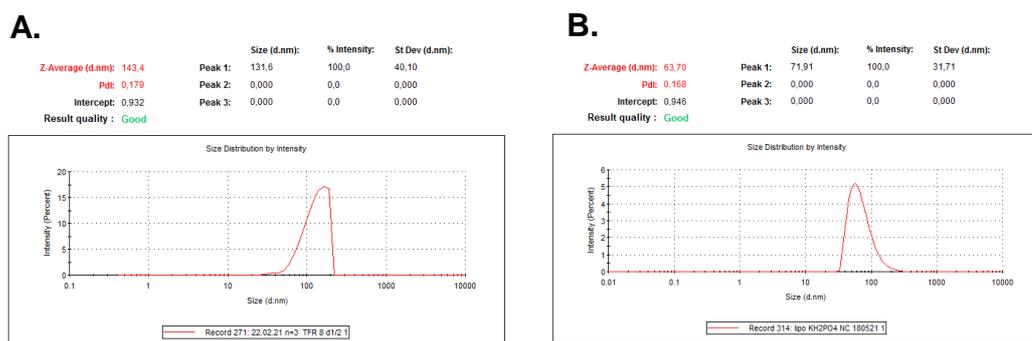


Figure 26 : évaluation de la taille et de la dispersion par light scattering. A. Lot BL-ANC2021-1 ; B. Lot BL-ANC2021-14

Stabilité du lot au cours du temps

Évaluer la stabilité de la taille au cours du temps est indispensable afin de caractériser notre lot de liposomes. Nous avons évalué la stabilité du lot BL-ANC2021-14 au light scattering pendant dix-sept jours et sous deux conditions : non centrifugé [Figure 27 ; A, C] et centrifugé à J0 [Figure 27 ; B, D].

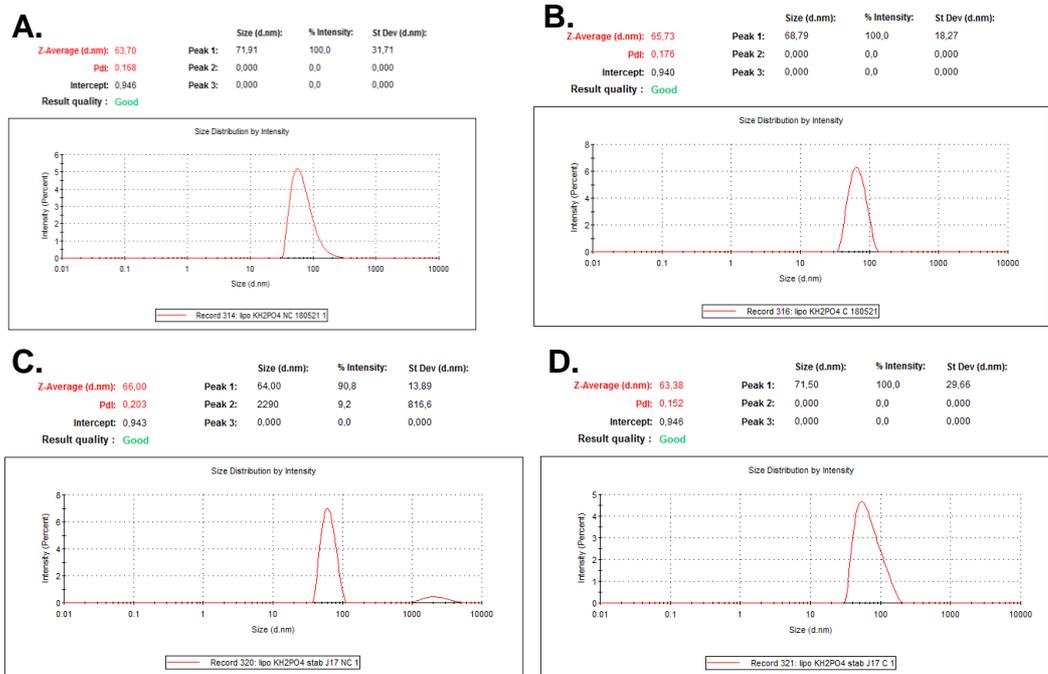


Figure 27 : suivi de la stabilité au cours du temps du lot BL-ANC2021-14 par light scattering. A. Lot BL-ANC2021-14 non centrifugé à J0 ; B. Lot BL-ANC2021-14 centrifugé à J0 ; C. Lot BL-ANC2021-14 non centrifugé à J17 ; D. Lot BL-ANC2021-14 centrifugé à J17.

Les données montrent une bonne stabilité de la taille avec un PDI acceptable au bout de dix-sept jours pour le lot centrifugé et une augmentation du PDI pour le lot non centrifugé. Ces résultats semblent indiquer une meilleure stabilité du lot centrifugé au cours du temps et convergent avec l'observation de LUV observées en cryo-TEM : on y observe l'émergence d'une seconde population de taille de l'ordre du micromètre pour le lot non centrifugé [Figure 27 ; C]. Ces résultats sont cependant à confirmer car ce suivi de la stabilité n'a été réalisé qu'en n=1.

Substitution du méthanol par l'éthanol : tests préliminaires

Les résultats obtenus pour notre lot BL-ANC2021-14 sont positifs, avec une stabilité et une morphologie largement supérieures à ce qui était observé préalablement. Néanmoins, la toxicité importante du méthanol (solvant de classe 2 ; sa concentration ne doit pas excéder 3000 ppm selon les limites fixées par l'ICH ⁵⁶) le rend incompatible avec une potentielle transposition en clinique. L'option que nous privilégions est la formulation de nos lots avec de l'éthanol, un solvant moins toxique. Des résultats obtenus au sein du laboratoire avant nos expérimentations ont montré une efficacité d'encapsulation plus faible dans l'éthanol, mais le docétaxel était dissout dans la phase aqueuse et non la phase organique comme actuellement. La maîtrise acquise autour de notre procédé de synthèse ces derniers mois pourrait nous permettre de générer des lots en accord avec nos prérequis et présentant une toxicité inférieure.

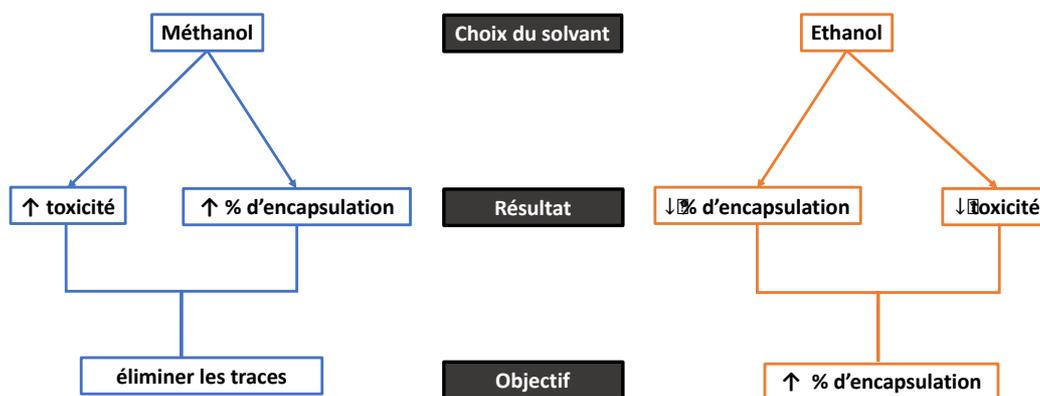


Figure 28 : avantages, inconvénients et objectifs selon le choix du solvant.

Le premier lot généré après substitution de méthanol par de l'éthanol a présenté une incompatibilité avec l'EPR *effect* lors de l'analyse au light scattering (taille moyenne de 954 nm et PDI = 1,000) [Figure 29 ; A]. La modification du bloc chauffant de 65°C (température d'ébullition du méthanol) à 78,5°C (celle de l'éthanol) a permis d'améliorer nos résultats avec une diminution de la taille moyenne et une amélioration du PDI mais les résultats restent insuffisants [Figure 29 ; B]. La modification de la température du bloc chauffant a cependant été conservée. Deux lots modifiés au niveau du TFR et du FRR (Figure 29 ; C, D) ont ensuite été réalisés et présentent des caractéristiques de taille et de dispersion satisfaisantes. Néanmoins, ces résultats sont à confirmer car l'expérience n'a été réalisée qu'en n=1 ; l'évaluation de l'efficacité d'encapsulation et de la morphologie en cryo-TEM est également indispensable.

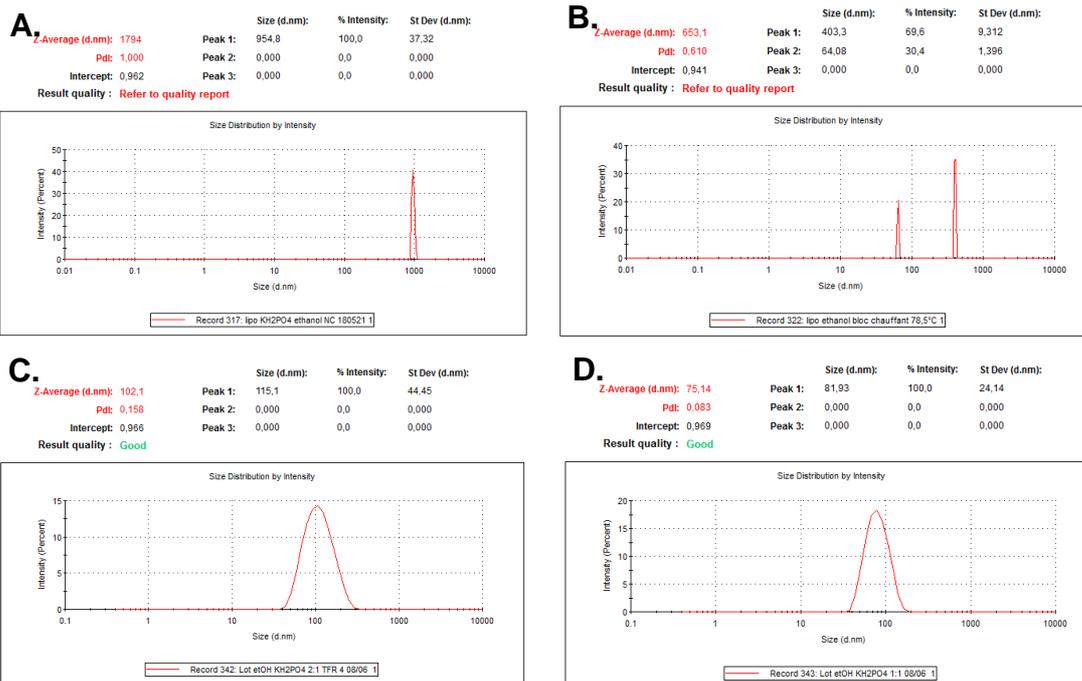


Figure 29 : taille et dispersion de lots formulés à l'éthanol évalués par light scattering. A. Substitution du méthanol par l'éthanol (température du bloc chauffant réglée sur 65°C) ; **B.** modification de la température du bloc chauffant (78,5°C) ; **C.** Modification de la température (78,5°), du TFR (4ml/min) et du FRR (2:1) ; **D.** Modification de la température (78,5°) et du FRR (1:1).

C. Analyse par CLHP

Seuls les lots BL-ANC2021-1, BL-ANC2021-7, BL-ANC2021-14 sont dosés en n=3 minimum et sont considérés pour l'interprétation des données. Les autres lots n'ont pas été approfondis car les données concernant leur taille et leur morphologie n'étaient pas compatibles avec nos attentes, ou non supérieures aux lots cités ci-dessus.

N° de lot	Nanoassemblé®			Dilution	CLHP		Taux d'encapsulation (%)	Efficacité d'encapsulation (%)
	Phase aqueuse	Flow rate (ml/min)	Flow rate ratio		[docétaxel] (ng/ml)	CV (%)		
BL-ANC2021-1 (N=3)	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2	2,4 ml	52311 +/- 3438	6,6	51	88
BL-ANC2021-7 (N=3)	Glucose 5%/MgSO4 300 mM pH= 4	8	1:2	1,2 ml	72841 +/- 11861	16,3	46	79
BL-ANC2021-14 (N=3)	Glucose 5%/KH2PO4 150mM pH= 7,3	8	1:2		59380 +/- 9647	16,2	37	83

Tableau 4 : lots dosés en n=3. Dosages réalisés en triplicate.

C.1. Concentrations en docétaxel

Le lot BL-ANC2021-1 présente une très bonne reproductibilité, cela pourrait s'expliquer par le fait que le volume de reconstitution utilisé est supérieur à celui des lots BL-ANC2021-7 et BL-ANC2021-14. La dilution de nos liposomes peut améliorer leur répartition dans la solution de nanomédicaments et l'homogénéité des prises d'essai lors du dosage. Cependant, le fait que ce lot soit plus dilué entraîne une diminution des concentrations en docétaxel [Tableau 4].

C.2. Efficacité d'encapsulation

Au vu du caractère lipophile du docétaxel, une efficacité d'encapsulation élevée est recherchée. Nous pouvons constater que nos trois formulations permettent une encapsulation du docétaxel conforme au standard fixé au sein du laboratoire c'est-à-dire supérieur ou proche des 80%.

En comparant les lot BL-ANC2021-1 et BL-ANC2021-7 dont la seule différence est le volume de G5% ajouté post-synthèse, nous constatons une supériorité du premier cité (BL-ANC2021-1 : 88% d'encapsulation vs. BL-ANC2021-7 : 79%) ce qui suggère qu'une dilution plus importante de nos liposomes améliore leur encapsulation. Notre nouveau lot de référence, le BL-ANC2021-14 présente un taux supérieur au lot BL-ANC201-7 avec 83% d'encapsulation.

C.3. Rendement et taux d'encapsulation

Nous avons également observé que le taux d'encapsulation, correspondant à la concentration mesurée sur la théorique, du lot BL-ANC2021-14 est inférieur à aux deux lots cités précédemment (37% vs. 51% pour BL-ANC2021-1 et 46% pour BL-ANC2021-7). Cela suggère qu'une amélioration de notre rendement est possible ; une augmentation de l'osmolarité du tampon KH₂PO₄ de 150 mM à 300 mM, pourrait permettre d'augmenter cette valeur ainsi que la concentration de docétaxel encapsulé⁵⁰.

Le rôle du tampon ionique est d'améliorer la pénétration de notre cytotoxique dans notre nanoparticule en créant un gradient de potentiel en encapsulant des ions dans le liposome. Cependant, des concentration trop importante de ce dernier pourrait altérer la stabilité de notre lot. Des tests complémentaires permettraient d'affirmer ou infirmer notre hypothèse.

D. Étude *in vitro* d'efficacité

D.1. Étude de cytotoxicité en 2D : Test au MTT

Initialement, les lignées 4T1 luciférase+ et 4T1 luciférase+HER2+ ont été ensemencées dans des plaques 2D 96 puits TPP® à une densité de 6000 cellules/puits comme suggérée par la bibliographie. Malgré de nombreuses répétitions de cette expérience, les résultats obtenus n'étaient pas ceux escomptés : la viabilité cellulaire était très faible dans l'ensemble de nos puits (absorbance inférieure à 1 dans les puits témoins) et variable pour une condition donnée, témoins compris [Figure 30].

Effet de bord	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	Effet de bord
	0,151	0,167	0,247	0,333	0,317	0,268	0,2	
Effet de bord	0,335	0,177	0,239	0,333	0,324	0,43	0,318	Effet de bord
Effet de bord	0,402	0,209	0,209	0,361	0,419	0,567	0,384	Effet de bord
Effet de bord	0,346	0,255	0,241	0,414	0,281	0,442	0,391	Effet de bord
Effet de bord	0,198	0,21	0,342	0,452	0,467	0,439	0,398	Effet de bord
Effet de bord	0,398	0,168	0,301	0,4	0,38	0,619	0,483	Effet de bord
Effet de bord	0,268	0,243	0,421	0,345	0,516	0,533	0,447	Effet de bord
Effet de bord	0,253	0,254	0,413	0,541	0,487	0,675	0,34	Effet de bord
	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	
Effet de bord	0,303	0,194	0,333	0,332	0,386	0,383	0,383	Effet de bord
Effet de bord	0,23	0,136	0,363	0,37	0,313	0,336	0,313	Effet de bord
Effet de bord	0,284	0,212	0,282	0,332	0,425	0,313	0,455	Effet de bord
Effet de bord	0,233	0,202	0,232	0,363	0,387	0,384	0,375	Effet de bord
Effet de bord	0,285	0,178	0,2	0,329	0,371	0,408	0,459	Effet de bord
Effet de bord	0,239	0,187	0,269	0,392	0,319	0,362	0,348	Effet de bord
Effet de bord	0,214	0,152	0,262	0,344	0,315	0,416	1,034	Effet de bord
Effet de bord	0,145	0,124	0,328	0,433	0,375	0,312	0,343	Effet de bord
	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	

Figure 30 : duplicate de plaques 4T1 luciférase + HER2+. Ensemencement avec 6000 cellules/puits dans des plaques 2D TPP® en duplicate

Nous avons recherché les causes potentielles de cet échec :

- Lié au manipulateur : plusieurs manipulateurs ont observé les cellules au microscope optique après l'ensemencement et réalisé l'expérience.
- Lié à la méthode d'aspiration des cellules : les cellules ont été aspirées avec une méthode moins brusque qu'initialement (avec des cônes à la place des pipettes pasteurs).
- Temps de contact avec la trypsine : le temps de contact avec le PBS a été allongé pendant huit à dix minutes afin de mieux dissocier nos cellules. Cela a permis de minimiser le temps de contact avec la trypsine à seulement quelques secondes au lieu de deux minutes minimum initialement.
- Lié au nombre de cellules ensemencées : des plaques ont été ensemencées à des densités allant de 6000 à 20.000 cellules/puits.
- Incompatibilité avec le support de culture : l'expérience a été réalisée dans des plaques 2D Falcon® ainsi que dans des plaques 2D Immuno Corning® Costar®.

L'aspect de nos cellules au microscope optique a semblé être amélioré par la diminution du temps de contact avec la trypsine. Lors du test d'ensemencement, la

densité de 15.000 cellules/puits était celle pour laquelle la densité optique dans nos puits était la plus homogène pour les deux lignées. Même si aucune des modifications n'a permis d'avoir les résultats escomptés par manque de reproductibilité inter-plaques et inter-occasion, nous avons réussi à obtenir un effet-dose du docétaxel acceptable dans les plaques 2D Immuno Corning® Costar® à la densité citée ci-dessus [Figure 31].

L'IC50 obtenue pour cette manipulation était : 66 nM pour la lignée 4T1 luciférase + et 52 nM pour la lignée 4T1 luciférase+ HER2+. Bien que non significatifs car les données obtenues n'ont pu être validées qu'en n=1, ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus au sein de ce laboratoire par le Dr. Anne Rodallec en 2020 : 44 ± 22 nM pour les 4T1 luciférase+ et 38 ± 20 nM pour les 4T1 luciférase+ HER+ (n=3).

	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	
Effet de bord	1,848	0,713	1,171	1,251	1,37	2,214	2,127	Effet de bord
Effet de bord	1,818	0,564	1,08	1,09	1,25	2,099	1,922	Effet de bord
Effet de bord	2,627	0,811	1,295	1,266	1,283	2,007	2,106	Effet de bord
Effet de bord	2,969	0,848	1,374	1,259	1,352	1,876	2,203	Effet de bord
Effet de bord	2,792	0,934	1,295	1,279	1,333	1,599	2,179	Effet de bord
Effet de bord	2,55	0,801	1,374	1,309	1,318	1,487	2,382	Effet de bord
Effet de bord	2,539	0,707	1,24	1,425	1,684	1,834	2,304	Effet de bord
Effet de bord	2,371	0,623	1,436	1,545	2,192	1,853	1,669	Effet de bord
	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	

	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	
Effet de bord	1,505	0,796	1,199	1,236	1,289	2,535	2,011	Effet de bord
Effet de bord	1,722	0,768	1,159	1,256	1,392	2,349	1,721	Effet de bord
Effet de bord	2,412	0,941	1,273	1,324	1,284	2,147	1,43	Effet de bord
Effet de bord	2,605	0,933	1,181	1,484	1,18	2,181	1,427	Effet de bord
Effet de bord	2,557	0,914	1,023	1,465	1,139	2,068	1,378	Effet de bord
Effet de bord	2,522	0,893	1,285	1,376	1,412	1,641	1,261	Effet de bord
Effet de bord	2,142	0,921	1,35	1,408	1,321	1,98	1,295	Effet de bord
Effet de bord	1,952	0,633	1,199	0,991	0,659	2,036	2,433	Effet de bord
	Témoin	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM	0,01 nM	Témoin	

Figure 31 : *duplicate de plaques 4T1 luciférase + HER2+. Ensemencement avec 15000 cellules/puits dans des plaques 2D Immuno Corning® Costar® en duplicate.*

D.2. Quantification du récepteur HER2

Les cellules de la lignée 4T1 luciférase+HER2+ présentant la plus forte expression du récepteur HER2 ont été sélectionnées par cytométrie de flux quatorze jours avant le début de la quantification. Lors de la première quantification du 01/02/2021, nous avons déterminé une moyenne de 147.470 récepteurs par cellule pour notre lignée HER2+ confirmant ainsi leur statut [Figure 32 ; A]. Cependant, nous avons constaté une dérive de notre lignée au cours du temps, se traduisant par une perte importante de l'expression du récepteur HER2+ vingt-huit jours plus tard (seulement 17611 récepteurs exprimés) [Figure 32 ; C]. Ces résultats suggèrent une instabilité du vecteur transfecté entraînant une hétérogénéité dans notre population de cellules malgré le tri préalable.

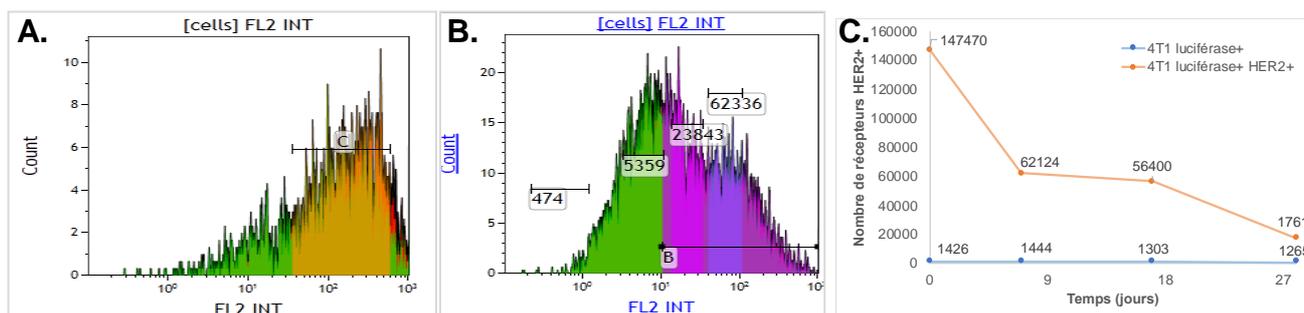


Figure 32 : suivi quantitatif du nombre de récepteurs HER2 exprimé par la lignée 4T1 luciférase+ HER2+ au cours du temps. A. Intensité de fluorescence émise par les cellules 4T1 Luc+ HER2+ le 01/02/2021 ; B. le 01/03/2021 ; C. Graphique illustrant le nombre de récepteurs HER2 exprimé en fonction du temps.

E. Essai de greffe tumorale *in vivo*

E.1. Évaluation du nombre de cellules à greffer

Afin de déterminer combien de cellules greffer pour les prochaines expérimentations *in vivo*, nous avons greffé plusieurs souris avec différentes quantités de cellules 4T1 luciférase+HER2+ :

- 2 souris greffées avec 500.000 cellules ;
- 4 souris greffées avec 1.000.000 cellules ;
- 2 souris greffées avec 1.500.000 cellules.

Les données de bioluminescences semi-quantitatives collectées ne sont pas en accord avec ce qui est souhaité. En effet, il est nécessaire que les cellules soient en phase de croissance exponentielle avant de les traiter, mais nous n'avons observé qu'une stagnation suivie d'une décroissance du nombre de photons/ seconde au cours du temps [Figure 33].

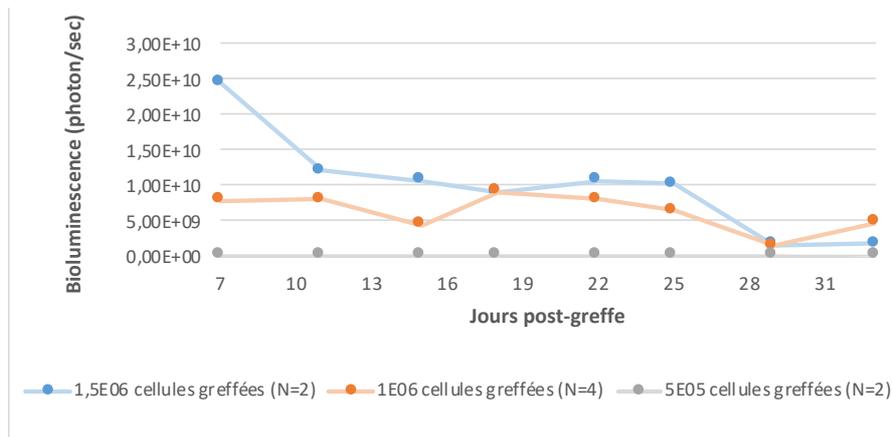


Figure 33 : suivi semi-quantitatif de la croissance tumorale par bioluminescence.

Ces résultats sont en contradiction avec l'observation macroscopique de nos tumeurs qui n'ont cessé de croître pour un nombre de cellules greffées supérieur ou égal à 1.000.000 de cellules. Plusieurs hypothèses ont été émises :

- La perte de fluorescence de nos cellules au cours du temps liée à la potentielle instabilité du transgène.
- L'immunogénicité trop importante des cellules 4T1 fournies par PerkinElmer®.

Après discussion avec nos correspondants de PerkinElmer®, la seconde hypothèse a été retenue comme la plus probable. En effet, le transgène utilisé pour l'expression de la luciférase dans les cellules de leur lignée 4T1 est considéré comme très immunogène, augmentant ainsi leur prise en charge immune et les rendant incompatibles avec la greffe sur des souris immunocompétentes telles que les Balb/c.

Partie VII Discussion et perspectives

Ce travail expérimental visant à optimiser une forme liposomale aux propriétés anticancéreuses a permis de formuler un lot répondant à nos critères d'acceptabilité en ce qui concerne :

- Sa taille et sa capacité à bénéficier de l'EPR *effect* ;
- Son homogénéité ;
- Son efficacité d'encapsulation ;
- Sa stabilité.

En effet, le lot BL-ANC2021-14 présente un taux de SUV et une homogénéité en cryo-TEM bien supérieurs au lot BL-ANC2021-1, notre lot de référence avant le début de ce travail sans détériorer son efficacité d'encapsulation. De plus, les images en cryo-TEM à J7, J14 et J21 post-synthèse [Annexe 2] montrent une population de liposomes d'aspect similaire aux lots observés à J0 confirmant la stabilité observée au light scattering. La bonne reproductibilité concernant les différents critères cités ci-dessus confirme notamment la robustesse de notre procédé de synthèse par *microfluidic mixing*. Néanmoins, la présence de méthanol dans notre formulation limite ses potentielles applications clinique : son élimination ou une modification du solvant de dilution est nécessaires afin de répondre aux objectifs fixés au sein du laboratoire. Les résultats de nos expériences visant à le substituer avec de l'éthanol sont encourageant mais ces travaux sont encore préliminaires.

D'un point de vue personnel, ce travail m'a permis de mieux appréhender les prérequis indispensables à la formulation d'une nanoparticule à visée thérapeutique. J'ai eu l'opportunité de générer plusieurs dizaines de lots de liposomes et d'appréhender les étapes critiques lors de chaque manipulation visant à les caractériser. Pour le laboratoire, les données générées ont également amélioré la compréhension globale du procédé de synthèse ainsi que l'impact de chaque paramètre. Concernant la suite du projet, la formulation d'un immunoliposome de 3^{ème} génération est indispensable et nécessitera une étape de greffe de trastuzumab à la surface de nos nanoparticules. Les critères d'acceptabilité de notre nanovecteur devront être réévalués après cette dernière.

A propos de la mise au point de nos expérimentations *in vitro* : malgré de nombreux tests de cytotoxicité réalisés, les résultats obtenus n'étaient pas ceux escomptés et sont inexploitable. Nous avons conclu à une instabilité des lignées 4T1 luciférase+ et 4T1 luciférase+ HER2+. Des cellules 4T1 luciférase+ (CRL-2539-LUC2™) ont donc été commandées à un autre fournisseur, l'ATTC® (*American Type Culture Collection*). Nos tests de cytotoxicité seront répétés à la réception de ces nouvelles cellules afin de déterminer l'IC50 du docétaxel libre et de nos liposomes. Par ailleurs, afin d'améliorer la stabilité de notre transgène, la transfection du gène HER2+ sera réalisée par la sélection d'un clone qui sera ensuite amplifié. Pour les cellules utilisées au cours de cette étude, la population de cellules exprimant le plus HER2+ avait été sélectionnée (sélection en *bulk*). Cette technique peut avoir pour inconvénient d'obtenir un ensemble hétérogène de cellules expliquant potentiellement leur dérive rapide lors des quantifications HER2+ successives.

Des problèmes ont également été constatés pour la partie *in vivo* ; les cellules greffées sur les souris BALB/c ont été naturellement éliminées par leur système immunitaire malgré des quantités de cellules greffées très importantes, probablement à cause de l'incompatibilité entre la luciférase transfectée dans la souche Bioware® Brite Cell Line 4T1-Red-FLuc commercialisée par PerkinElmer® et les modèles syngéniques. À la suite de plusieurs plaintes, cette incompatibilité a par ailleurs été récemment indiquée sur leur site web. Cette luciférase est trop immunogène limitant son utilisation à la greffe à des espèces murines immunodéprimées. La suite du travail à réaliser concernant l'*in vivo* consistera à réaliser les greffes avec nos cellules commandées à l'ATTC®.

Bien que non exploitables, les données *in vitro* et *in vivo* collectées s'inscrivent dans le processus de mise au point préliminaire de notre projet visant à évaluer les propriétés immunomodulatrices d'un immunoliposome de 3^{ème} génération.

Partie VIII Bibliographie

1. Rodallec A, Sicard G, Fanciullino R, Benzekry S, Lacarelle B, Milano G, et al. Turning cold tumors into hot tumors: harnessing the potential of tumor immunity using nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2018;1–9.
2. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1979;31:331–332.
3. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews* 2020;86:102017.
4. Jain RK. Delivery of Novel Therapeutic Agents in Tumors: Physiological Barriers and Strategies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1990;81:570–576.
5. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008;69:1–9.
6. Rodallec A, Benzekry S, Lacarelle B, Ciccolini J, Fanciullino R. Pharmacokinetics variability: Why nanoparticles are not just magic-bullets in oncology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2018;129:1–12.
7. Zamboni WC, Ramalingam S, Friedland DM, Edwards RP, Stoller RG, Strychor S, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of Pegylated Liposomal CKD-602 in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research* 2009;15:1466–1472.
8. Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:1317–1324.
9. Sousa F, Dhaliwal HK, Gattacceca F, Sarmiento B, Amiji MM. Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 2019;309:37–47.
10. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018;10:57.
11. Desai N, Trieu V, Damascelli B, Soon-Shiong P. SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients. *Translational Oncology* 2009;2:59–64.
12. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *The New England journal of medicine* 2013;369:1691–1703.
13. Etienne C, (GEPK) LG des enseignants de P. Pharmacocinétique : les fondamentaux.. EDIMARK. .
14. Davis ME, Chen Z (Georgia), Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, 2008;7:771–782.
15. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, 2010;9:615–627.
16. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021;20:101–124.
17. Wang J, Potocny AM, Rosenthal J, Day ES. Gold Nanoshell-Linear Tetrapyrrole

- Conjugates for Near Infrared-Activated Dual Photodynamic and Photothermal Therapies. *ACS Omega* 2020;5:926–940.
18. Xu C, Nam J, Hong H, Xu Y, Moon JJ. Positron Emission Tomography-Guided Photodynamic Therapy with Biodegradable Mesoporous Silica Nanoparticles for Personalized Cancer Immunotherapy. *ACS Nano* 2019;13:12148–12161.
 19. Drago JZ, Modi S, Chandarlapaty S. Unlocking the potential of antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021;18:327–344.
 20. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MMC, Lenox J, Cerveny CG, et al. Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. :9.
 21. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release* 2015;200:138–157.
 22. Sicard G. Actualité sur la prise en charge du cancer du sein : intérêt du développement d'un vecteur de troisième génération. [Universitaire] Marseille: Aix-Marseille Université, 2016.
 23. Sawant RR, Torchilin VP. Challenges in Development of Targeted Liposomal Therapeutics. *The AAPS Journal* 2012;14:303–315.
 24. European Medicines Agency. Résumé des caractéristiques du produit - Depocyte. .
 25. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 2017;9:12.
 26. Ye Q, Asherman J, Stevenson M, Brownson E, Katre NV. DepoFoam™ technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. *Journal of Controlled Release* 2000;64:155–166.
 27. European Medicines Agency. Résumé des caractéristiques du produit - Myocet. .
 28. Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Résumé des caractéristiques du produit - Doxorubicine Teva. . Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/frames.php?specid=69864919&typedoc=R&ref=R0163160.htm>
 29. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A Comparison of Liposomal Formulations of Doxorubicin with Drug Administered in Free Form. *Drug Safety* 2001;24:903–920.
 30. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - Marqibo. .
 31. Rodriguez MA, Pytlik R, Kozak T, Chhanabhai M, Gascoyne R, Lu B, et al. Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2009;115:3475–3482.
 32. Mayer LD, Tardi P, Louie AC. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *International Journal of Nanomedicine* 2019;Volume 14:3819–3830.
 33. European Medicines Agency. Résumé des caractéristiques du produit - Vyxeos. .
 34. Yeh M-K, Hsin-I Chang, Ming-Yen Cheng. Clinical development of liposome based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine* 2011;49.
 35. 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.
 36. European Medicines Agency. Résumé des caractéristiques du produit - Caelyx. .
 37. European Medicines Agency. Résumé des caractéristiques du produit - Onivyde. .
 38. Talkin' Toxins: From Coley's to Modern Cancer Immunotherapy. .
 39. Eno, MS, PA-C J. Immunotherapy Through the Years. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 2017;8.
 40. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression.

Immunity 2009;30:636–645.

41. Qi J, Jin F, Xu X, Du Y. Combination Cancer Immunotherapy of Nanoparticle-Based Immunogenic Cell Death Inducers and Immune Checkpoint Inhibitors. *International Journal of Nanomedicine* 2021;Volume 16:1435–1456.
42. Shi Y, Lammers T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. *Accounts of chemical research* 2019;52:1543–1554.
43. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Frontiers in Oncology* 2020;9:1512.
44. Millrud CR, Mehmeti M, Leandersson K. Docetaxel promotes the generation of anti-tumorigenic human macrophages. *Experimental Cell Research* 2018;362:525–531.
45. Shao K, Singha S, Clemente-Casares X, Tsai S, Yang Y, Santamaria P. Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer. *ACS Nano* 2015;9:16–30.
46. Carpentier AF. Immunothérapie des cancers par oligonucléotides immunostimulants. *médecine/sciences* 2005;21:73–77.
47. Rodallec A, Brunel J-M, Giacometti S, Maccario H, Correard F, Mas E, et al. Docetaxel-trastuzumab stealth immunoliposome: development and in vitro proof of concept studies in breast cancer. *International Journal of Nanomedicine* 2018;Volume 13:3451–3465.
48. Shah VM, Nguyen DX, Patel P, Cote B, Al-Fatease A, Pham Y, et al. Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up purposes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2019;18:146–156.
49. Cau P, Seïte R. Cours de Biologie cellulaire - 5e édition.. ellipses. .
50. Delattre J, Puisieux F, Couvreur P, Philippot J-R, Schuber F. Les liposomes Aspects technologiques, biologiques et pharmaceutiques.. Les Editions INSERM. .
51. Lee C-Y, Chang C-L, Wang Y-N, Fu L-M. Microfluidic Mixing: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 2011;12:3263–3287.
52. Kotouček J, Hubatka F, Mašek J, Kulich P, Velínská K, Bezděková J, et al. Preparation of nanoliposomes by microfluidic mixing in herring-bone channel and the role of membrane fluidity in liposomes formation. *Scientific Reports* Nature Publishing Group, 2020;10:5595.
53. Precision NanoSystems - Create Transformative Medicines. . Available from: <https://www.precisionnanosystems.com/>.
54. Carugo D, Bottaro E, Owen J, Stride E, Nastruzzi C. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific Reports* Nature Publishing Group, 2016;6:25876.
55. Merlin J-L, Barberi-Heyob M, Bachmann N. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Annals of Oncology* 2002;13:1743–1748.
56. Webb C, Khadke S, Tandrup Schmidt S, Roces CB, Forbes N, Berrie G, et al. The Impact of Solvent Selection: Strategies to Guide the Manufacturing of Liposomes Using Microfluidics. *Pharmaceutics* 2019;11:653.

Partie IX Annexes

ANNEXE 1 : Dosage du docétaxel par CLHP couplé à la détection UV

1- Objet

Décrire la procédure du dosage docétaxel par CLHP couplée à la détection UV.

2- Contenu

2.1- Réactifs

- **Tampon acétate d'ammonium 35 nM pH 5** : 2,7 g de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ dans 1000 ml d'eau MiliQ. Le pH est ajusté à 5 par de l'Acide Acétique.
- **Phase mobile** : 530 ml de tampon acétate d'ammonium + 470 ml d'acétonitrile.
- **Phase de rinçage** : 250 ml d'eau MiliQ + 250 ml d'acétonitrile.

2.2- Opération de contrôle

2.2.1 Solutions standards

- **SM Docétaxel 1000 $\mu\text{g/ml}$** : 5 mg de poudre dans fiole jaugée + 5 ml de méthanol. Dilution dans le méthanol.
- **SM Paclitaxel (EI) 1000 $\mu\text{g/ml}$** : 5 mg de poudre dans fiole jaugée + 5 ml de méthanol. Dilution dans le méthanol.

Les SM sont aliquotées et conservées dans le congélateur.

Deux dilutions en cascade de la SM de docétaxel et une dilution au 1/10^{ème} du Paclitaxel (EI) (50 μl de SM qsp 500 μl de méthanol) sont réalisées le jour même du dosage.

Injection de solution pure de docétaxel : 10 μl

2.2.2 Obtention des droites d'étalonnage et contrôles de qualité

2.2.2.1 Préparation de la gamme

La gamme se préparera dans des tubes en verre de 7ml

	Blanc	A	B	C	D	E	F		CQH
Conc. (ng/ml)		250	500	1000	2500	5000	10000	400	7500
Méthanol (μl)	1000	975	950	900	975	950	900	960	925
Docétaxel (μl) 1/10 ^{ème} 1/100 ^{ème}		25	50	100	25	50	100	40	75
Paclitaxel (μl) 1/10 ^{ème}	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Chaque échantillon à analyser présente un volume de 1ml, auquel il faut ajouter 20 µL d'EI (Paclitaxel) dilué au 1/10.

2.2.2.2 Évaporation et récupération des échantillons et de la gamme

Longueur d'onde	Débit	Volume injection	Run time	Temps de rétention moyens	Méthode
$\lambda = 227 \text{ nm}$	1,8 ml/mn	100 µl	30 mn	Docétaxel = 11min Paclitaxel (EI) = 13-14 min	DOCE

- Evaporer à l'aide de l'évaporateur à air, attendre que le tube soit bien sec, mais attention ne pas le laisser évaporer trop longtemps car risque de dégradation des échantillons.
- Récupérer par 200 µL de phase mobile
- Vortexer 5 secondes
- Transférer dans des microvials d'injection

2.3- Méthodologie

2.3.1 Appareil et conditions chromatographiques

Le dosage est réalisé sur HP séries 1100 ; logiciel ChemStation
Colonne C 18 (25 cm x 4,6 mm ; 5 µm)
Voie A : 100% de phase mobile

2.3.2 Conditionnement de la colonne

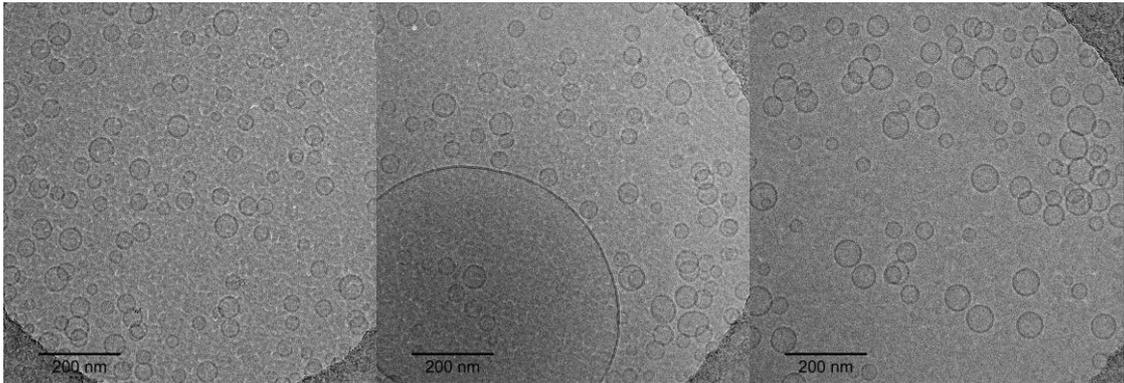
Conditionner la colonne pendant 45 minutes au minimum dans les même conditions que présentaient précédemment.
Après 45 minutes, placer l'appareillage en circuit.

2.3.3 Injecter la solution pure

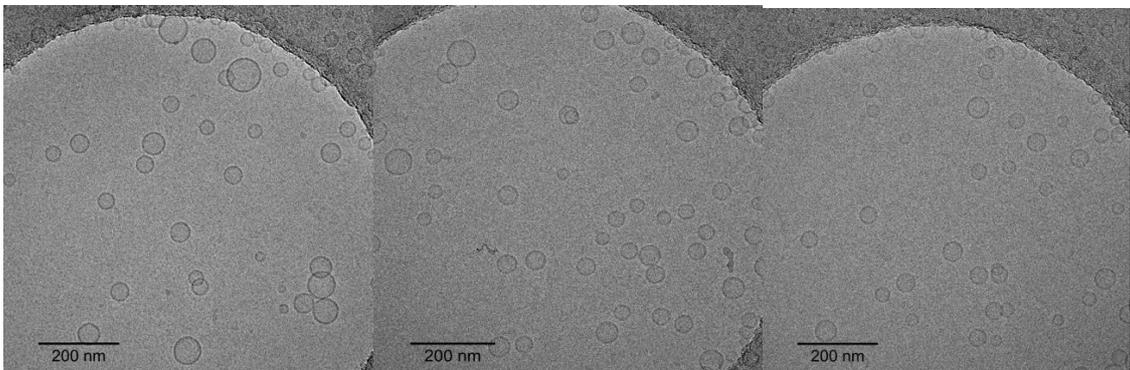
SP : 100µl de Docétaxel à 1000µg/ml + 100µl de Paclitaxel à 1000µg/ml
Injecter 10 µl
Noter sur le carnet de vie les Temps de rétention et hauteurs obtenus.

➔ Le dosage peut alors être lancé.

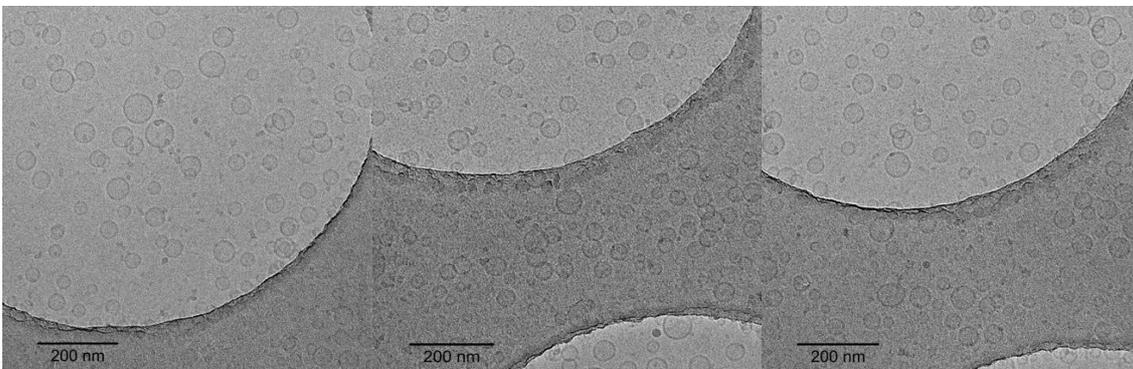
ANNEXE 2 : Images cryo-TEM ; test de stabilité



Lots BL-ANC2021-14 — J7



Lots BL-ANC2021-14 — J14



Lots BL-ANC2021-14 — J21

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.