



HAL
open science

Nanoparticules d'or ultra petites associées au méthotrexate : synthèse, caractérisation et applications pour le traitement du psoriasis

Valentin Cognet

► **To cite this version:**

Valentin Cognet. Nanoparticules d'or ultra petites associées au méthotrexate : synthèse, caractérisation et applications pour le traitement du psoriasis. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03957482

HAL Id: dumas-03957482

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03957482v1>

Submitted on 26 Jan 2023

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

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



HAL
open science

Nanoparticules d'or ultra petites associées au méthotrexate : synthèse, caractérisation et applications pour le traitement du psoriasis

Valentin Cognet

► **To cite this version:**

Valentin Cognet. Nanoparticules d'or ultra petites associées au méthotrexate : synthèse, caractérisation et applications pour le traitement du psoriasis. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03957482

HAL Id: dumas-03957482

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03957482>

Submitted on 26 Jan 2023

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

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



UFR DE PHARMACIE

Université Clermont Auvergne

Université Clermont Auvergne

UFR de Pharmacie

Année : 2022

N°

Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Présentée et Soutenue Publiquement le 31 Mai 2022 par

Valentin Cognet

**Nanoparticules d'Or Ultrapetites Associées au
Méthotrexate : Synthèse, Caractérisation et
Applications pour le Traitement du Psoriasis**

Directeur de thèse : Dr. Magali Vivier

Jury :

Président :

David Balayssac MCU-PH, Pharmacien, HDR, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres :

Magali Vivier MCU, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Marc Vocanson CR, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, Lyon

Caroline Decombat MCU, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Éric Beysac Professeur, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand



UFR DE PHARMACIE

Université Clermont Auvergne

Université Clermont Auvergne

UFR de Pharmacie

Année : 2022

N°

Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Présentée et Soutenue Publiquement le 31 Mai 2022 par

Valentin Cognet

**Nanoparticules d'Or Ultrapetites Associées au
Méthotrexate : Synthèse, Caractérisation et
Applications pour le Traitement du Psoriasis**

Directeur de thèse : Dr. Magali Vivier

Jury :

Président :

David Balayssac MCU-PH, Pharmacien, HDR, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres :

Magali Vivier MCU, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Marc Vocanson CR, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, Lyon

Caroline Decombat MCU, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Éric Beysac Professeur, Pharmacien, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

À Beatriz.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Midatech Pharma qui a rendu possible cette Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie.

Le temps s'est écoulé depuis que j'ai rejoint l'entreprise en 2013 en tant que stagiaire au cours de la cinquième année de mes études pharmaceutiques. Midatech Pharma m'a ensuite offert la possibilité de revenir en tant que doctorant en 2015 avec une bourse industrielle Marie Skłodowska-Curie (IMMUNOSHAPE). Après avoir obtenu un doctorat de chimie organique et industrielle avec une thèse intitulée *Ultrasmall Glyco-Gold Nanoparticles: Synthesis Optimization, Characterization and Applications in Immune-Cell Targeting*, l'entreprise m'a offert un poste permanent et m'a permis d'évoluer en tant que scientifique et professionnel.

Au cours des derniers mois, j'ai écrit ma thèse d'exercice, qui a aussi pour sujet les nanoparticules d'or, avec l'approbation de Midatech Pharma et je ne pourrais pas être plus reconnaissant de cette opportunité.

Je tiens à remercier mon superviseur, le Dr. Magali Vivier de l'IMoST - Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques de l'UFR de Pharmacie de l'Université Clermont Auvergne, pour l'encadrement de cette thèse.

Je remercie tous mes collègues de Midatech Pharma España et Wales. Plus particulièrement ses managers, Kelly Conlon, Dan Palmer, Paul Seaman, Steve Damment, Dmitry Zamoryakhin et Stephen Stamp pour leur soutien. Une pensée particulière va au laboratoire de transfert de technologie de Bilbao et à mes collègues de Cardiff. Sans leur expérience, leur aide et leurs conseils, rien n'aurait été possible.

Je suis reconnaissant envers Avelino Ferreira, Olivier Martin et Maéva Tartière pour leur précieuse relecture.

Enfin, j'aimerais mentionner Beatriz, ainsi que tous mes amis et ma famille qui m'ont aidé à parcourir le chemin difficile qu'est l'écriture d'une thèse.

Thanks a lot, Muchas gracias, Merci beaucoup...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	v
ABREVIATIONS	vii
INTRODUCTION	1
PSORIASIS	9
1. Épidémiologie	9
2. Symptômes et Physiopathologie	10
3. Modèles de Recherche Préclinique	13
4. Traitements Actuels	13
4.1. Thérapies Topiques	15
4.2. Thérapies Systémiques.....	16
4.3. Photothérapies.....	17
4.4. Produits Biologiques	17
5. Nanothérapies Topiques : la Nanodermatologie	18
METHOTREXATE ET NANOPARTICULES D'OR	21
1. Nanoparticules d'Or.....	21
2. Plateforme Midacore™ de Midatech Pharma.....	25
3. MTC-100244 MTX-GNP Methotrexate Gold Nanoparticles	30
4. État de l'art des Methotrexate Gold Nanoparticles Publiées.....	35
4.1. Résumés des Publications	35
4.2. Discussion et Comparaison avec MTC-100244 MTX-GNP	42
GNP MIDACORE™ : SYNTHÈSE ET CARACTERISATION	45
1. Synthèse de Brust-Schiffirin Modifiée.....	45
2. Post-Fonctionnalisation.....	48
3. Échange de Ligands	49
4. Caractérisation des Nanoparticules d'Or	52
MTC-100244 MTX-GNP : SYNTHÈSE ET CARACTERISATION	57
1. Introduction et Objectifs	57
2. Dérivés de Méthotrexate	59
2.1. Introduction.....	59
2.1.1. Historique du Méthotrexate.....	59
2.1.2. Dérivatisation du Méthotrexate	60

2.2. Résultats	61
2.3. Matériel et Méthodes	63
2.3.1. Synthèse du Dérivé Amine de Méthotrexate MTX-NH ₂	63
2.3.2. Synthèse du Dérivé Disulfure de Méthotrexate (MTX-S) ₂	65
3. Synthèse de MTC-100244 MTX-GNP	67
3.1. Résultats	67
3.1.1. MTC-100011 (α -Galactose-C ₂) ₂₂ (PEG(8)COOH) ₂₂ @Au ₁₀₂	67
3.1.2. MTC-100244 (α -Galactose-C ₂) ₂₂ (PEG(8)COOH) ₁₁ (MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8)) ₁₁ @Au ₁₀₂ ..	67
3.2. Matériel et Méthodes	72
3.2.1. MTC-100011 via Synthèse de Brust-Schiffrin Modifiée	72
3.2.2. MTC-100244 via Post-Fonctionnalisation	72
3.2.3. MTC-100244 via Échange de Ligands.....	73
4. Caractérisation de MTC-100244 MTX-GNP.....	73
4.1. Résultats	73
4.2. Matériel et Méthodes	79
4.2.1. Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) et Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)	79
4.2.2. pH.....	79
4.2.3. Spectrophotométrie UV-Vis.....	79
4.2.4. Microscopie Électronique en Transmission (TEM).....	79
4.2.5. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).....	80
4.2.6. ¹ H NMR (Résonance Magnétique Nucléaire du Proton)	80
4.2.7. Chromatographie d'Exclusion de Taille (SEC).....	80
4.2.8. RPLC-UV (Chromatographie Liquide en Phase Inverse)	80
5. Conclusion et Perspectives.....	82
FORMULATION TOPIQUE - HYDROGEL DE CARBOPOL	85
1. Introduction.....	85
1.1. Vue d'Ensemble du Carbopol	85
1.2. Carbopol et Nanoparticules.....	87
2. MTC-100244 MTX-GNP et Carbopol 980.....	90
2.1. Préparation de l'Hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP avec Carbopol 980	90
2.2. Caractérisation de l'Hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP.....	91
3. Pénétration Cutanée	91
4. Conclusion	93

MTC-100244 MTX-GNP ET CANCER	95
1. Folates, Antifolates et leurs Récepteurs	95
2. MTC-100244 MTX-GNP pour le Traitement du Cancer.....	97
CONCLUSION	103
BIBLIOGRAPHIE.....	107

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Manifestations cliniques des différents types de psoriasis.....	10
Figure 2 : Représentation des différentes couches et sous-couches de la peau.	11
Figure 3 : Stratégie de traitement du psoriasis en fonction de la gravité de la maladie.....	14
Figure 4 : Structures des principales molécules utilisées pour le traitement du psoriasis.	14
Figure 5 : Configuration simplifiée des nanoparticules sphériques.....	22
Figure 6 : Vue schématique des différentes classes de molécules pouvant être greffées dans la couronne des GNP.	23
Figure 7 : Résumé détaillé de la plateforme de Nanoparticules d'Or Midacore™ de Midatech Pharma.	29
Figure 8 : $(\alpha\text{-Galactose-C}_2)_{22}(\text{PEG}(8)\text{COOH})_{11}(\text{MTX-PEG}(3)\text{-NH-CO-PEG}(8))_{11}@\text{Au}_{102}$ MTC-100244 MTX-GNP.	30
Figure 9 : Aspect des formulations topiques de nanoparticules.	31
Figure 10 : Représentation d'une lésion psoriasique au niveau cellulaire avec les composants stromaux et immunitaires et des changements se produisant lors de l'application de l'hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP.....	33
Figure 11 : Modèle murin de psoriasis induit par IMQ : dosage systémique (sous-cutané). ...	33
Figure 12 : Modèle murin de psoriasis induit par IMQ : dosage topique.	34
Figure 13 : Modèle murin de xéno greffe humaine AGR129 : dosage topique.....	34
Figure 14 : Différentes méthodes de fonctionnalisation « covalente » des GNP ultrapetites..	46
Figure 15 : Principe de la synthèse de Brust-Schiffrin et de la purification des GNP ultrapetites à l'échelle pilote.....	47
Figure 16 : Paramètres critiques des GNP.	55
Figure 17 : Structure du Méthotrexate.	60
Figure 18 : Structure des différents dérivés de Méthotrexate.	62
Figure 19 : Voie synthétique pour obtenir les dérivés de Méthotrexate.....	66
Figure 20 : Synthèse de Brust-Schiffrin modifiée de MTC-100011 GNP de base $(\alpha\text{ Galactose-C}_2)_{22}(\text{PEG}(8)\text{COOH})_{22}@\text{Au}_{102}$	69
Figure 21 : Attachement du dérivé amine de Méthotrexate sur MTC-100011 GNP de base par post-fonctionnalisation pour donner MTC-100244 $(\alpha\text{ Galactose-C}_2)_{22}(\text{PEG}(8)\text{COOH})_{11}(\text{MTX-PEG}(3)\text{-NH-CO-PEG}(8))_{11}@\text{Au}_{102}$	70

Figure 22 : Attachement du dérivé thiol de Méthotrexate sur MTC-100011 GNP de base par échange de ligands pour donner MTC-100244 (α Galactose- C_2) ₂₂ (PEG(8)COOH) ₁₁ (MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8)) ₁₁ @Au ₁₀₂	71
Figure 23 : Molécules potentiellement présentes dans la formulation finale de l'hydrogel MTX-GNP de Carbopol 980.	74
Figure 24 : Spectres UV-Vis de MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.	76
Figure 25 : Dimensionnement du noyau par TEM de MTC-100244 après attachement de MTX par échange de ligands.	76
Figure 26 : Diamètre hydrodynamique par DLS de MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.	77
Figure 27 : Caractérisation des ligands par ¹ H NMR (500 MHz, D ₂ O) de MTC-100244 MTX-GNP.....	77
Figure 28 : Chromatogrammes RPLC-UV des particules entières : MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.....	78
Figure 29 : Chromatogrammes SEC des particules entières: MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.....	78
Figure 30 : Différentes voies impliquées dans la pénétration cutané des nanoparticules.....	91
Figure 31 : Potentiels mécanismes d'absorption et devenir intracellulaire de MTC-100244 MTX-GNP.	99
 Tableau 1 : Principales caractéristiques des GNP et techniques d'analyse correspondantes. .	55

ABBREVIATIONS

- 1^{ère}Ge MTX-GNP** Methotrexate Gold Nanoparticles de Première Génération
- ¹H NMR** Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
- 2^{ème}Ge MTX-GNP** Methotrexate Gold Nanoparticles de Deuxième Génération
- 3MPS** 3-mercapto-1-propanesulfonate
- α -Galactose-C₂ 2'-Thioethyl α -D-galactopyranoside**
- API** Ingrédients Pharmaceutiques Actifs
- DHFR** Dihydrofolate Reductase
- DLS** Diffusion Dynamique de la Lumière
- DMSO** Diméthylsulfoxyde
- EDC** 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- EG** Éthylène Glycol
- EPR** Effet de Perméabilité et de Rétention améliorées
- FA** Acide Folique
- FOLR1 = FR α** Folate Receptor Alpha
- FR** Folate Receptor
- GNP** Gold Nanoparticles ou Nanoparticules d'Or
- HAuCl₄** Acide Tétrachloroaurique
- HPLC** Chromatographie Liquide à Haute Performance
- ICP-AES** Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
- ICP-MS** Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
- IL** Interleukines
- IMQ** Imiquimod
- λ** Longueur d'Onde
- LC** Chromatographie Liquide
- LPE** Échange de Ligands ou Ligand Place Exchange
- mAb** Anticorps monoclonaux
- MS** Spectrométrie de Masse
- MTX** Méthotrexate

MTX-GNP Methotrexate Gold Nanoparticles ou Nanoparticules d'Or Associées au Méthotrexate

MTX-NH₂ Dérivé amine de Méthotrexate

(MTX-S)₂ Dérivé disulfure de Méthotrexate

MTX-SH Dérivé thiol de Méthotrexate

MW Masse Molaire

NaBH₄ Borohydrure de Sodium

NHS N-Hydroxysuccinimide

NP Nanoparticules

PABA Acide para-aminobenzoïque

PASI Psoriasis Area and Severity Index

PBS Phosphate-buffered saline

PEG Polyéthylène Glycol

PEG(8)COOH α -Thio- ω -(propionic acid) octa(ethylene glycol)

Prep. HPLC Chromatographie Liquide Haute Performance Préparatoire

RFC Reduced Folate Carrier

RPLC Chromatographie Liquide en Phase Inverse

RT Température Ambiante

SEC Chromatographie d'Exclusion de Taille

TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphine

TEM Microscopie Électronique en Transmission

TNF- α Tumor Necrosis Factor alpha

UV-Vis Ultraviolet-Visible

ZP Potentiel Zêta

INTRODUCTION

Le Méthotrexate (MTX) est un médicament largement utilisé depuis plusieurs décennies pour le traitement de maladies auto-immunes telles que le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde ainsi que divers cancers. Le psoriasis est une maladie chronique sans traitement curatif caractérisée par des lésions cutanées. Le MTX est le principal traitement des psoriasis modérés à sévères, pour lesquels il est utilisé de manière systémique.

Les Nanoparticules d'Or, ou *Gold Nanoparticles* (GNP) en anglais, sont l'une des nombreuses nanoplateformes développées pour une utilisation pharmaceutique ou biomédicale dans un domaine connu sous le nom de nanomédecine. Les GNP peuvent prendre différentes formes ou tailles et sont composées d'un noyau d'or et d'une couronne de molécules organiques appelées ligands qui peuvent être des Ingrédients Pharmaceutiques Actifs (API). La combinaison de nanoparticules d'or avec un API peut améliorer ses propriétés physicochimiques ou biologiques, conduisant à une amélioration de son effet pharmacologique.

La nanoparticule d'or ultrapetite couplée au Méthotrexate MTC-100244 MTX-GNP, un composé développé et breveté par Midatech Pharma dans le cadre de la plateforme Midacore™, est l'élément central de la dissertation.

Incorporé dans un véhicule d'hydrogel, MTC-100244 MTX-GNP a été utilisé avec succès par voie topique pour le traitement du psoriasis chez l'animal. En effet, l'attachement du MTX aux GNP permet de palier sa faible pénétration cutanée qui rendait son utilisation locale impossible. MTC-100244 MTX-GNP permet donc l'administration de concentrations élevées de MTX sur les lésions par voie topique tout en évitant les effets secondaires hors cible liés à son utilisation de manière systémique.

Les résultats très prometteurs de MTC-100244 MTX-GNP dans des modèles précliniques psoriasiques ont abouti à une publication récente d'Özcan *et al.* intitulée *Nanoparticle-Coupled Topical Methotrexate Can Normalize Immune Responses and Induce Tissue Remodeling in Psoriasis*.

Néanmoins, afin d'atteindre le stade clinique, MTC-100244 MTX-GNP nécessite un développement pharmaceutique plus approfondi avec une transposition d'échelle de sa synthèse et une caractérisation plus poussée.

De plus, des essais biologiques additionnels sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et tissulaires impliqués dans l'effet pharmacologique ou la biodistribution du nanomédicament.

Dans cette perspective, un état de l'art est indispensable en ce qui concerne la physiopathologie du psoriasis et ses traitements. De même, la technologie GNP, les stratégies de fonctionnalisation de la couronne, les autres nanoparticules développées avec du MTX ou ayant une application similaire et la formulation topique d'hydrogel doivent être examinées. L'application du composé dans d'autres domaines thérapeutiques majeurs tels que l'oncologie doit également être explorée.

Cette **Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie (PharmD)** se compose de chapitres issus de revues scientifiques et d'un chapitre expérimental de chimie permettant de répondre aux questions sur le potentiel thérapeutique de MTC-100244 MTX-GNP et de résoudre les challenges de son développement pharmaceutique. Ces chapitres sont étayés ci-dessous et développés dans les différentes parties de la thèse.

Pour fournir un contexte clinique, l'épidémiologie et la physiopathologie du psoriasis sont décrites dans le **premier chapitre**. Le psoriasis est une maladie multifactorielle avec à la fois des facteurs génétiques et des déclencheurs environnementaux. La prévalence et la chronicité élevées du psoriasis en font une maladie majeure. Il existe différents types de psoriasis, mais le *psoriasis vulgaris* représente la plupart des cas. Le *psoriasis vulgaris* est caractérisé par des plaques érythémateuses recouvertes de squames épaisses et brillantes ou « écailles argentées ». Le modèle murin de psoriasis induit par l'Imiquimod et les xénogreffes avec de la peau psoriasique humaine sont couramment utilisés pour répliquer la maladie. La peau est la barrière entre le corps et l'environnement et est divisée en couches, elles-mêmes divisées en sous-couches. La couche la plus externe est l'épiderme et la sous-couche la plus externe est le *stratum corneum*. Le psoriasis affecte les différentes couches de la peau, avec une hyperprolifération et une différenciation incomplète des kératinocytes dans le *stratum corneum* ainsi que des infiltrats inflammatoires et une augmentation de la vascularisation dans les couches plus profondes.

À ce jour, un grand choix de traitements est disponible pour traiter le psoriasis, mais aucun n'est curatif. Le choix est basé sur la gravité de la maladie (légère, modérée ou sévère). La norme de soins pour le psoriasis léger à modéré est le traitement topique avec des dermocorticoïdes (par exemple la Bétaméthasone ou le Clobétasol).

Les dermocorticoïdes sont des molécules anti-inflammatoires et ont des effets secondaires limités mais manquent d'efficacité à long terme. Le traitement systémique du psoriasis modéré à sévère est principalement le MTX par voie orale ou parentérale grâce à ses effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. De nouvelles thérapies telles que les anticorps monoclonaux sont maintenant disponibles, mais leurs coûts substantiels en freinent l'adoption généralisée.

La nanodermatologie, l'utilisation de nanoparticules pour la thérapie topique, est donc un domaine attrayant pour améliorer le traitement du psoriasis. Les nanoparticules peuvent améliorer l'efficacité ou l'innocuité des API en modifiant leur solubilité, leur stabilité ou leur devenir *in vivo*. De nombreux exemples utilisant les trois principales classes de nanoparticules (lipidiques, polymériques et métalliques) ont été publiés avec des médicaments commercialisés pour le traitement du psoriasis dont certains avec du MTX.

Les GNP sont évoquées dans le **deuxième chapitre**, en commençant par une description générale de la technologie, puis une présentation de la plateforme Midacore™ développée par Midatech Pharma, et enfin MTC-100244 MTX-GNP. Pour positionner MTC-100244 MTX-GNP, la littérature relative à d'autres MTX-GNP a été examinée en se focalisant sur la structure chimique des composés utilisés et les essais biologiques effectués.

Les propriétés des GNP telles que leur stabilité, leur facilité de synthèse en diverses tailles et formes et leur biocompatibilité en font d'excellents candidats pour une utilisation en nanomédecine. Les GNP sphériques ultrapetites sont généralement obtenues par la synthèse de Brust-Schiffrin. Des couronnes entourent les noyaux d'or et agissent comme des coquilles. Les couronnes peuvent être constituées de pratiquement tout type de molécules organiques appelées ligands. La multivalence, caractérisée par la présence de nombreuses copies d'un ligand, et la multifonctionnalité, qui consiste en la coexistence de différentes entités chimiques, sont deux principes fondamentaux de la couronne, mais celle-ci peut également favoriser l'amélioration de la solubilité, de la furtivité et permettre un ciblage passif ou actif. Les applications couvrent la médecine préventive (diagnostique) et curative et quelques candidats ont atteint les phases d'essais cliniques.

La plateforme Midacore™ de Midatech Pharma se compose d'une bibliothèque de GNP sphériques ultrapetites développées pour la médecine curative humaine. Les ligands sont attachés au noyau par une liaison soufre-or qui génère un ancrage fort.

Typiquement, les GNP de base Midacore™ sont composées d'au moins deux classes de molécules : des carbohydrates (monosaccharides) et des polyéthylène glycols (PEG) courts. Ils favorisent tous deux la stabilité, l'hydrophilie et la biocompatibilité. Le PEG améliore également le blindage des particules, ce qui a un impact positif sur leur devenir *in vivo* (par exemple, augmentation du temps de circulation), et peut être utilisé comme un point d'ancrage. En s'appuyant sur les GNP de base mentionnées ci-dessus, d'autres ligands peuvent être ajoutés à la couronne par deux méthodes : la post-fonctionnalisation et l'échange de ligands. Midacore™ a notamment été utilisé pour développer un vaccin peptidique mais aussi des composés antitumoraux. Certains de ces projets ont atteint des stades cliniques et d'autres, tels que MTC-100244 MTX-GNP, sont en développement préclinique actif.

MTC-100244 MTX-GNP est une nanoparticule avec un noyau de 2 nm avec une couronne composée en moyenne de 11 dérivés de Méthotrexate attachés au noyau par une liaison soufre-or. Le reste de la couronne est composé de PEG court chargé négativement et de dérivés d' α -Galactose. La taille totale de la nanoparticule est inférieure à 10 nm.

Pour son utilisation topique, MTC-100244 MTX-GNP est incorporé dans un hydrogel de Carbopol 980. L'efficacité de l'hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP a été démontrée *in vivo* dans deux modèles murins, surpassant même la norme de soins Daivobet®. Cliniquement, une inhibition supérieure de l'épaississement de la peau et de la fibrose tissulaire ainsi qu'une diminution globale de la gravité des lésions ont été observées. Histologiquement et cellulièrement, des améliorations significatives ont également été constatées telles qu'une inhibition de l'hyperprolifération cellulaire et de la production de cytokines ou la restauration de la différenciation des kératinocytes.

Une vaste revue de la littérature sur les GNP couplées au MTX a été effectuée pour comparer les composés. Les différences de taille des nanoparticules et du mode de liaison du MTX au noyau d'or ont été mises en évidence. Les applications et les essais biologiques effectués par les différents groupes de recherche ont également été résumés.

La plateforme Midacore™ s'appuie sur diverses techniques synthétiques et analytiques décrites dans le **troisième chapitre**. La synthèse de Brust-Schiffrin est la première étape, et parfois la seule, pour obtenir des GNP ultrapetites. Elle implique trois ingrédients essentiels : un sel d'or, des ligands thiols ou disulfures et un réducteur puissant, généralement du borohydrure de sodium. Ce dernier initie la nucléation, un mécanisme qui se traduit par la formation de noyaux d'or que les ligands entourent pour former la couronne.

La synthèse de Brust-Schiffrin est simple, mais son exécution et son optimisation nécessitent un contrôle fin. Par conséquent, des dispositifs de chimie des procédés tels que des réacteurs automatisés sont utilisés.

Une fois les particules synthétisées et purifiées, généralement par ultrafiltration, des modifications ou des ajouts peuvent être effectués dans la couronne. Une méthode, appelée post-fonctionnalisation, utilise des ligands de la couronne comme des points d'ancrage pour ajouter de nouvelles fonctions ou des API par chimie bioorthogonale conventionnelle (fragments complémentaires). Une réaction de post-fonctionnalisation largement utilisée est l'amidation au cours de laquelle une amine et un acide carboxylique peuvent être liés de manière covalente à l'aide de réactifs de couplage.

Une autre voie pour incorporer de nouveaux ligands à la couronne est connue sous le nom d'échange de ligands. Cette méthode nécessite des ligands qui se lient facilement et fortement au noyau. Le ligand entrant remplace (échange) un ligand de la couronne ou remplit les sites vides sur le noyau (remblayage). Les thiols sont très réactifs et la plupart des molécules ajoutées par échange de ligands possèdent ce groupe fonctionnel. Les groupes disulfures peuvent être réduits en thiols en utilisant des composés tels que le Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). La réaction ne nécessite pas de réactifs de couplage et est mécaniquement plus simple que la post-fonctionnalisation.

La caractérisation des GNP est essentielle. Elle est réalisée à l'aide d'un éventail de techniques analytiques complémentaires. Certaines techniques fournissent des informations concernant la taille (noyau ou particule entière) et d'autres permettent de caractériser la couronne. Toutes les techniques doivent être optimisées pour un composé déterminé, tout en étant conçues pour assurer une versatilité maximale.

Contrairement aux sections précédentes, le **quatrième chapitre** est composé de travaux expérimentaux réalisés avec MTC-100244 MTX-GNP. Il est divisé en trois parties correspondant à la synthèse de ligands appelés dérivés de Méthotrexate, à la synthèse de MTC-100244 MTX-GNP et à la caractérisation. L'objectif principal est de remplacer la synthèse de MTC-100244 MTX-GNP via post-fonctionnalisation (MTX-GNP de première génération) utilisée pour la publication d'Özcan *et al.* par l'échange de ligands (MTX-GNP de deuxième génération). En effet, l'attachement du MTX par post-fonctionnalisation à l'aide d'un dérivé de Méthotrexate amine et de l'acide carboxylique d'un PEG de la couronne a un rendement inférieur à 20 %.

L'échange de ligands à l'aide d'un dérivé de Méthotrexate thiol ou disulfure est en théorie plus spécifique, plus simple, plus efficace et plus transposable. Ainsi, un rendement supérieur à 80 % est attendu.

La première étape consiste à obtenir un dérivé de Méthotrexate thiol ou disulfure qui, une fois greffé sur la GNP, possède la même structure que celle obtenue par post-fonctionnalisation. La deuxième étape est le développement d'une synthèse d'échange de ligands pour obtenir le même MTC-100244 MTX-GNP que par post-fonctionnalisation, c'est-à-dire la même taille (noyau et globale), l'attachement d'une quantité égale ou supérieure de MTX avec un rendement amélioré et un ratio similaire entre les ligands. La transposabilité et l'absence d'impuretés sont également critiques. Enfin, un ensemble de techniques analytiques doit être développé et optimisé pour caractériser les composés synthétisés. Les analyses doivent être conçues pour s'assurer que les GNP correspondent aux spécifications définies et minimiser les différences entre les lots.

Le MTX doit être modifié pour être lié de manière covalente aux GNP dans une procédure appelée dérivatisation. Parmi les différentes positions disponibles dans la structure du MTX, le γ -COOH terminal d'acide glutamique est de loin le plus favorable. Le PEG est un ligand idéal pour effectuer la dérivatisation et agir comme un espaceur pour favoriser la liaison du dérivé de Méthotrexate aux GNP. Le PEG améliore également l'hydrophilie et la biocompatibilité. Antérieurement aux travaux décrits dans cette thèse, une synthèse en plusieurs étapes a été réalisée pour obtenir un dérivé MTX avec une chaîne latérale PEG courte de trois unités portant une amine terminale : MTX-NH₂. Les recherches décrites ici utilisent MTX-NH₂ comme intermédiaire pour la synthèse d'un dérivé thiol, MTX-SH, ou disulfure, (MTX-S)₂. Une voie de synthèse a été conçue pour ajouter à MTX-NH₂ une chaîne latérale de PEG plus longue (huit unités) avec une fraction thiol terminale. Le rendement, la pureté et la stabilité ont été évalués.

Une GNP intermédiaire, MTC-100011 GNP de base, a été générée par synthèse de Brust-Schiffrin dans un processus entièrement contrôlé à l'échelle du gramme. MTC-100011 GNP de base est chargé négativement avec un noyau de 2 nm et une couronne de PEG(8)COOH et d' α -Galactose en proportion égale.

MTC-100244 MTX-GNP a été synthétisé par la méthode de post-fonctionnalisation précédemment développée ainsi qu'une nouvelle méthode d'échange de ligands en utilisant respectivement les dérivés MTX-NH₂ et (MTX-S)₂.

MTX-NH₂ a été ajouté en large excès avec des réactifs de couplage. (MTX-S)₂ a été utilisé de manière équimolaire après réduction en MTX-SH à l'aide de TCEP. Les deux réactions ont été effectuées à l'échelle de plusieurs milligrammes. Les paramètres ont été optimisés et étroitement surveillés.

Des techniques analytiques ont été utilisées pour évaluer la monodispersité et la taille ultrapetite des particules. La couronne a également été caractérisée en ce qui concerne la densité, la proportion de ligands et la quantité de MTX. Une dizaine de techniques allant de la chromatographie liquide à la microscopie électronique en transmission ont été utilisées.

La formulation finale pour l'application topique consiste en l'inclusion de MTC-100244 MTX-GNP dans un hydrogel de Carbopol. Ce véhicule est essentiel à l'efficacité. Le **cinquième chapitre** passe en revue les différents types de Carbopol et leur utilisation avec des nanoparticules pour des applications cliniques.

Le Carbopol 980 a été choisi pour sa viscosité élevée, sa clarté, sa tolérance au cisaillement élevée et son innocuité. Une préparation optimale, avec des concentrations et un pH adéquats, est essentielle. C'est pourquoi, un protocole pour fabriquer l'hydrogel et inclure les GNP ainsi que la caractérisation de la formulation finale sont décrits.

L'absorption à travers la peau des API ou des nanoparticules et les paramètres qui l'influencent, tels que l'hydrophilie du médicament ou la charge et la taille des particules, sont également brièvement examinés.

Le traitement du cancer est une autre application majeure du MTX. Le **sixième chapitre** décrit les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués et le potentiel de MTC-100244 MTX-GNP pour améliorer l'efficacité et l'innocuité de l'API. MTX est à la fois un agent de ciblage et une molécule thérapeutique. Ainsi, son attachement aux GNP pourrait augmenter l'absorption dans les cellules cancéreuses en raison de la présentation multivalente du MTX aux Folate Receptors (FR). MTC-100244 MTX-GNP pourrait également réduire la résistance tumorale en augmentant la rétention dans les cellules cancéreuses et éviter les effets secondaires hors cible en empêchant l'absorption dans les cellules saines. Ces hypothèses pourraient être validées par des essais biologiques *in vitro* avec des cellules surexprimant FR.

PSORIASIS

MTC-100244 MTX-GNP a démontré un effet thérapeutique anti-psoriasique dans un modèle préclinique. Dans ce chapitre, l'épidémiologie et la physiopathologie du psoriasis sont décrites tout comme les traitements actuels en fonction de la sévérité de la maladie. Une attention particulière est accordée au Méthotrexate. La nanodermatologie et son potentiel pour l'amélioration de l'arsenal thérapeutique sont aussi évoqués tout comme les modèles précliniques disponibles pour valider l'efficacité ou l'innocuité de nouveaux traitements.

1. Épidémiologie

Le psoriasis est une maladie chronique de la peau qui touche 2 à 5 % de la population mondiale (125 millions de personnes) et plus de 3 millions de personnes en France¹. C'est une maladie **auto-immune multifactorielle**. L'apparition se produit généralement pendant l'enfance ou au début de l'âge adulte et la maladie progresse lentement au fil du temps. La prévalence du psoriasis est plus élevée aux latitudes plus hautes et varie de 0,09 % à 11,43 %. Les hommes et les femmes sont touchés de manière égale, mais l'apparition est généralement plus précoce pour ces dernières².

La maladie a une **composante génétique** puisque 30 % des cas ont des antécédents familiaux (> 70 *loci* génétiques ont été identifiés). Des **déclencheurs environnementaux** tels que des dommages physiques (abrasion, incision ou rasage) et chimiques de la peau ou des infections (par exemple à *Streptococcus pyogenes*) ont été identifiés, tandis que l'exposition au soleil est principalement bénéfique³. L'obésité, le tabagisme et la consommation d'alcool sont également corrélés à une incidence plus élevée de psoriasis. Le stress psychologique et les facteurs endocriniens ont également un impact, avec des apparitions pendant la puberté et la ménopause, tandis que la gravité de la maladie diminue généralement pendant la grossesse. Les médicaments tels que le lithium, les antipaludéens ou les β -bloquants peuvent initier le psoriasis².

Sur le plan économique, le coût par patient était estimé à 4536 € par an en France en 2013 et de 2077 à 13132 \$ pour l'Allemagne, l'Espagne, la France, l'Italie et le Royaume-Uni en 2016⁴. Aux États-Unis, le coût annuel s'élevait à 35,2 milliards de dollars en 2013 selon une estimation conservatrice⁵.

En plus des problèmes physiques directement causés par le psoriasis, l'impact sur la qualité de vie et la santé mentale est également important. L'incurabilité, la faible efficacité, les effets secondaires des traitements, ainsi que la stigmatisation sociale des lésions peuvent conduire à l'anxiété ou à la dépression⁶. La maladie est également souvent associée à des syndromes métaboliques.

2. Symptômes et Physiopathologie

Le psoriasis est classé en différents types en fonction des symptômes cliniques (Figure 1)^{2,6} :

- ***Psoriasis vulgaris*** ou psoriasis en plaques représente 80 % des cas et se caractérise par des plaques érythémateuses localisées recouvertes de squames épaisses et brillantes ou « écailles argentées » qui disparaissent avec le temps. Il affecte principalement les genoux, les coudes ou le cuir chevelu et provoque irritation et sécheresse. La zone touchée varie beaucoup d'un patient à l'autre.
- Le psoriasis unguéal provoque des symptômes sur les ongles tels que des déformations punctiformes, une leuconychie ou une onycholyse.
- ***Psoriasis guttate*** ou psoriasis en gouttes est caractérisé par de petites lésions rouges et est associé à des infections streptococciques.
- Le psoriasis inversé est localisé dans les régions des plis du corps (par exemple : sous les bras) et les lésions ne présentent pas d'écailles.
- Le psoriasis pustuleux est défini par des masses pustuleuses non infectieuses et peut apparaître sur n'importe quelle partie du corps.
- Le psoriasis érythrodermique est la forme la plus rare et la plus dangereuse et provoque une rougeur ardente généralisée.
- L'arthrite psoriasique affecte les articulations avec une infiltration de cellules immunitaires et une hyperplasie synoviale, provoquant douleurs et gonflements.

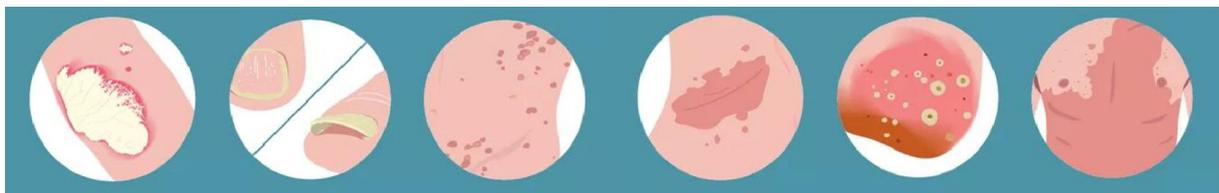


Figure 1 : Manifestations cliniques des différents types de psoriasis⁷. De gauche à droite, *Psoriasis vulgaris*, *psoriasis des ongles*, *psoriasis guttate*, *psoriasis inversé*, *psoriasis pustuleux* et *psoriasis érythrodermique*.

La peau (*cutis*) est une **barrière avec l'environnement** et est l'organe le plus large du corps humain représentant 10-15 % du poids total chez les adultes. Elle protège le reste du corps contre les radiations (UV), les produits chimiques toxiques et les microorganismes⁶. C'est une structure complexe qui peut être divisée en trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, également divisible en sous-couches⁸ (Figure 2). **L'épiderme** est la couche supérieure et est composé de cinq sous-couches allant de la plus superficielle à la plus profonde : le ***stratum corneum*** (couche cornée), le *stratum lucidum* (limité aux paumes et à la plante des pieds), le *stratum granulosum* (caractérisé par des granules de kératohyaline et des kératinocytes en maturation), le *stratum spinosum* et le *stratum basale* (qui contient des cellules souches épidermiques).

Le *stratum corneum* (15-20 μm) est composé de 10 à 20 couches de kératinocytes anucléiques différenciés connus sous le nom de cornéocytes. Les cornéocytes sont entourés d'une matrice de céramides, de cholestérol, d'acides gras et de triglycérides avec une faible teneur en eau qui agit comme une barrière physique.

Le **derme** représente 90 % de la peau et est divisé entre le *stratum papillare* et le *stratum reticulare*. Ces deux couches sont composées de protéines telles que le collagène et l'acide hyaluronique et de cellules, principalement des fibroblastes⁹. Le collagène est une protéine flexible essentielle au soutien mécanique de la peau. Le derme abrite des vaisseaux sanguins, des nerfs et des appendices : follicules pileux, glandes sudoripares et sébacées¹⁰.

L'hypoderme ou tissu sous-cutané joue un rôle d'isolant thermique, d'absorbant de choc et de stockage de nutriments et d'énergie (cellules graisseuses).

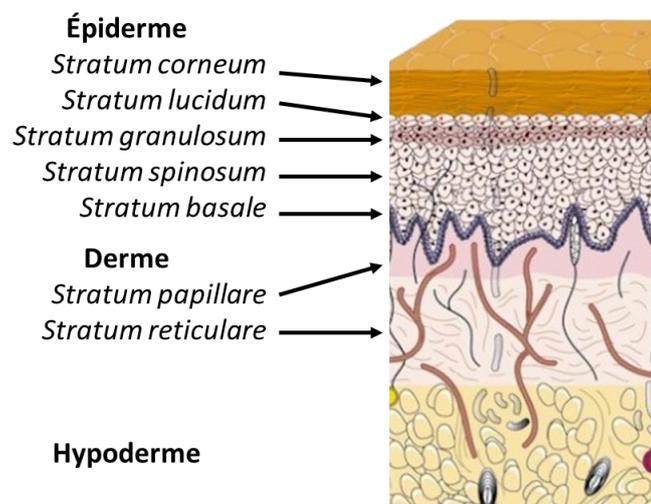


Figure 2 : Représentation des différentes couches et sous-couches de la peau¹¹.

Outre son rôle de barrière physique, la peau est également impliquée dans les mécanismes de sensation (douleur, température, toucher), endocriniens (synthèse de la vitamine D) et homéostatiques (expulsion de l'excès d'eau et de toxines telles que l'ammoniac ou l'urée).

Un autre rôle important de la peau est la surveillance et la réponse immunitaires qui impliquent une pléthore de cellules des systèmes immunitaires innés et adaptatifs : macrophages, lymphocytes NK, mastocytes, cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et de Langerhans) et différentes populations de lymphocytes. Ensemble, ils forment le **système immunitaire de la peau**.

Les peaux psoriasiques sont généralement plus rigides et caractérisées par une teneur en eau plus faible, une réduction du taux de céramides et d'acides gras et une augmentation du taux de cholestérol.

Dans le psoriasis, **les cellules stromales et immunitaires** jouent un rôle tout aussi important¹². Les marqueurs histopathologiques de la maladie comprennent l'hyperplasie épidermique due à l'hyperprolifération et à la différenciation incomplète/anormale des kératinocytes, des infiltrats inflammatoires et une augmentation de la vascularisation^{13,14}.

L'apparition d'une lésion psoriasique est due à un déclencheur environnemental qui « stresse » l'épiderme et active les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques produisent des cytokines pro-inflammatoires et activent les lymphocytes T-helpers Th1 et Th17. Les T-helpers sécrètent ensuite d'autres cytokines pro-inflammatoires qui alimentent l'inflammation et entraînent une accumulation de macrophages et une vasodilatation. Les macrophages contribuent à leur tour à la boucle d'auto-amplification de l'inflammation. *In fine*, le taux de mitose des kératinocytes est augmenté et provoque la formation de cornéocytes incomplètement développés (avec rétention des noyaux) dans le *stratum corneum* : **parakératose** (que l'on oppose à l'orthokératose). La multiplication et la différenciation incontrôlées des kératinocytes provoque aussi un épaissement anormal du *stratum corneum* : **hyperkératose**¹⁵. La cascade d'inflammation déclenche également une néovascularisation. Les principales cytokines impliquées sont le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) et les Interleukines (IL) IL-12 IL-17 et IL-23¹⁰.

3. Modèles de Recherche Préclinique

Un modèle préclinique *in vivo* commun du psoriasis est le modèle murin de psoriasis induit par IMQ ou *Imiquimod-induced psoriasis murine model* publié par Fits *et al.* en 2009¹⁶. L'Imiquimod (IMQ), un agoniste des Toll-like receptors 7/8, peut induire ou exacerber des lésions semblables au psoriasis. L'IMQ, généralement administré de manière topique, est utilisé pour créer des lésions de type psoriasique qui peuvent être maintenues ou résolues par l'application concomitante ou ultérieure d'une autre formulation. Les expériences durent plusieurs jours et les lésions sont générées sur le dos rasé ou l'oreille des animaux.

Une classification clinique des lésions comprenant trois paramètres (l'érythème, la desquamation et l'épaississement de la peau) est effectuée pour mesurer la gravité. Des investigations histopathologiques avec des coupes tissulaires peuvent être réalisées pour visualiser les altérations épidermiques, la néo-angiogenèse et les infiltrats inflammatoires constitués de lymphocytes T, de neutrophiles et de cellules présentatrices d'antigènes. L'immunochimie peut être utilisée pour identifier et discriminer les cellules (par exemple les clusters de différenciation des lymphocytes : CD3, CD4 ou CD8).

Des modèles précliniques alternatifs incluent l'œdème de patte induit par le carraghénane chez les rats ou les souris. L'injection de carraghénane génère une réponse inflammatoire aiguë avec œdème, hyperalgésie et érythème¹⁷. Les **modèles de xénogreffe avec de la peau psoriasique humaine** greffée sur des souris immunodéprimées¹² ou des nouveaux modèles animaux tels que les souris transgéniques surexprimant TGFβ ont un potentiel translationnel humain plus élevé, mais sont plus coûteux et compliqués à mettre en œuvre.

4. Traitements Actuels

L'arsenal thérapeutique est large, mais **aucun traitement curatif n'est actuellement disponible**. A défaut, les traitements gèrent les symptômes de la maladie en ralentissant l'hyperprolifération des kératinocytes et en diminuant l'inflammation. Les traitements peuvent être divisés en quatre classes : thérapies topiques, photothérapie, thérapies systémiques orales ou parentérales et produits biologiques (Figure 3). Les thérapies topiques, orales et parentérales sont des *small molecules* (Figure 4) tandis que les produits biologiques sont des anticorps monoclonaux¹⁸.

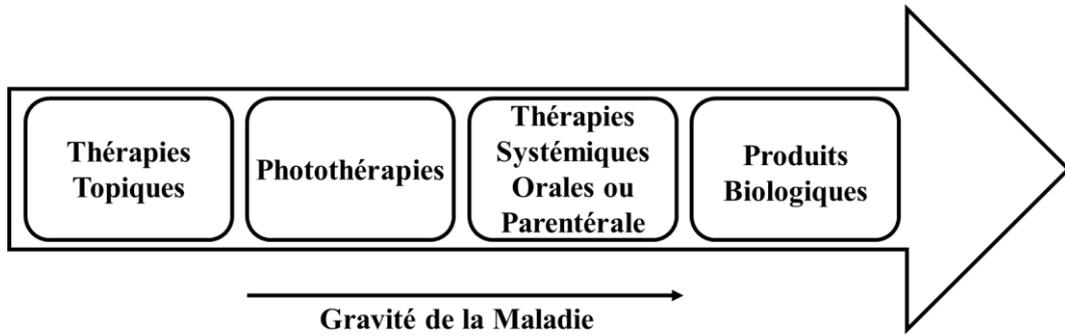
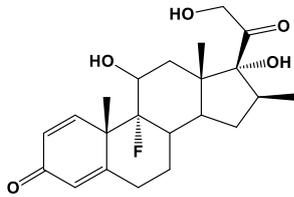
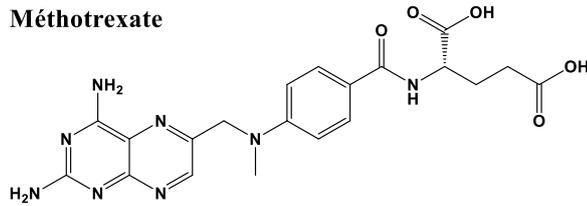


Figure 3 : Stratégie de traitement du psoriasis en fonction de la gravité de la maladie.

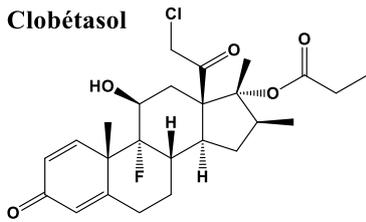
Bétaméthasone



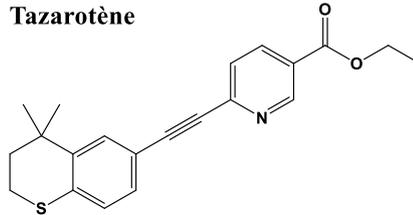
Méthotrexate



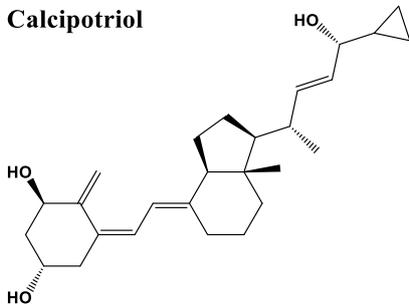
Clobétasol



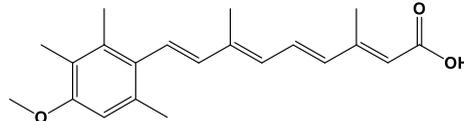
Tazarotène



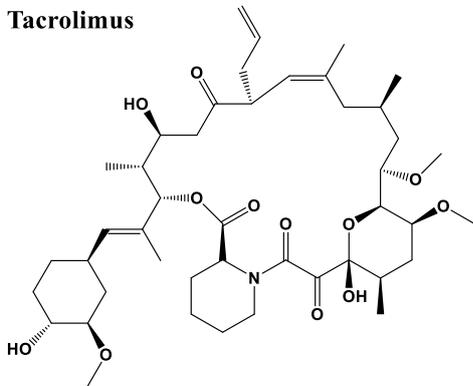
Calcipotriol



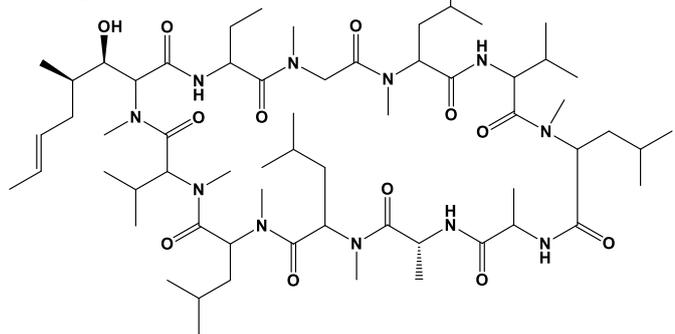
Acitretine



Tacrolimus



Ciclosporine



Apremilast

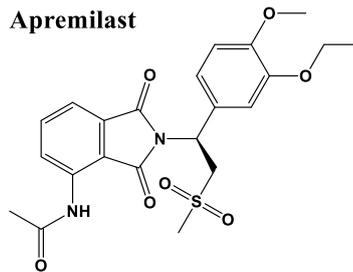


Figure 4 : Structures des principales molécules utilisées pour le traitement du psoriasis.

Le choix thérapeutique dépend de la gravité de la maladie (pourcentage du corps affecté) et du patient (âge, maladies concomitantes, observance). Différentes thérapies peuvent être associées pour améliorer l'efficacité du traitement. Pour mesurer la gravité du psoriasis, le principal indicateur clinique est le score PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*). Le psoriasis peut être classé comme **léger, modéré** ou **sévère**¹⁹.

Les paragraphes suivants décrivent les traitements du psoriasis les plus courants et ne sont pas destinés à être exhaustifs. Il convient également de noter que les molécules, leurs posologies et leurs formulations sont principalement conçus pour traiter le *psoriasis vulgaris*.

4.1. Thérapies Topiques

Le traitement topique est le premier choix pour le psoriasis **léger à modéré** (< 10 % de la surface corporelle affectée). Les **effets secondaires** sont **légers** (érythème, irritation et brûlure de la peau) mais l'**efficacité** est **limitée** (pas d'élimination des lésions à long terme). Cela provoque l'insatisfaction des patients et une mauvaise observance des traitements. Les formes pharmaceutiques les plus courantes sont les pommades, les crèmes et les lotions¹⁰.

La pénétration transcutanée d'un médicament est inversement proportionnelle à l'épaisseur du *stratum corneum* et proportionnelle à la concentration du médicament. Elle est également affectée par ses propriétés physicochimiques. Il n'y a pas de consensus sur l'impact des lésions psoriasiques (amélioration ou entrave à la pénétration). En effet, la perturbation du *stratum corneum* et plus généralement de l'épiderme peut être considérée comme positive car elle devrait altérer la barrière cutanée. D'autre part, l'épaississement des couches supérieures de la peau peut rendre la pénétration des médicaments plus difficile²⁰.

Les **dermocorticoïdes**, également appelés **corticostéroïdes**, ont un effet anti-inflammatoire et inhibent la génération de cytokines pro-inflammatoires au niveau de la transcription des gènes. Ils sont la **norme de soins** pour le psoriasis léger à modéré. Les principaux effets secondaires des dermocorticoïdes sont l'atrophie cutanée et la télangiectasie, tandis que les effets systémiques de l'hypercortisolémie sont définis comme le syndrome de Cushing iatrogène²¹. Les corticostéroïdes sont classés en fonction de leur puissance et une large gamme est disponible, comme la Bétaméthasone Diprosone® (fort) et le Clobétasol Dermoval® (très fort). Ils sont utilisés seuls ou associés à des **analogues de la vitamine D3** (Bétaméthasone et Calcipotriol, Daivobet®) pour combiner l'effet anti-inflammatoire du premier avec l'inhibition de l'hyperprolifération épidermique via l'inhibition des cellules dendritiques et des lymphocytes T épidermiques provoquée par le second¹⁴.

Une autre association est possible avec des **agents kératolytiques** (Bétaméthasone et Acide salicylique, Diprosalic[®]) qui provoquent la desquamation des cornéocytes.

Le **Tacrolimus** Protopic[®] est un immunosuppresseur (inhibiteur de la calcineurine). Il provoque moins d'atrophie cutanée que les stéroïdes, mais est associé à des démangeaisons et sa pénétration cutanée est limitée²¹.

Les autres traitements topiques comprennent le Dithranol, l'Hydroxyurée, les émoullients, le goudron de houille ou des produits phytopharmaceutiques tels que la Curcumine, la Capsaïcine, l'huile de poisson, l'huile d'olive ou l'*Aloe vera*.

4.2. Thérapies Systémiques

Les traitements systémiques sont utilisés pour le psoriasis **modéré à sévère** et associés à des **effets secondaires plus sévères**. Néanmoins, l'observance du patient est plus élevée.

Le **Méthotrexate (MTX)** a été approuvé pour la première fois pour le traitement du psoriasis aux États-Unis en 1972¹⁵ et est maintenant très peu coûteux. Il peut être administré par voie orale ou parentérale. C'est un antimétabolite de l'**Acide Folique (FA)**, également connu sous le nom de vitamine B9. Le MTX a des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives²⁰.

Pour le psoriasis modéré à sévère, le MTX systémique est le traitement de référence. Les comprimés de MTX sont pris chaque semaine à une dose qui varie de 7,5 à 25 mg²². L'administration est associée à des effets secondaires chroniques légers à graves tels que des toux sèches, des nausées, des diarrhées, une hépatotoxicité (fibrose à cirrhose), des ulcérations des muqueuses ou une dépression médullaire. Le MTX interagit avec des médicaments tels que les antibiotiques et est contre-indiqué pendant la grossesse. Le traitement par MTX doit être associé à la surveillance des fonctions rénales et hépatiques²³. La supplémentation en FA aide à réduire les effets secondaires. **L'administration orale** a une biodisponibilité plus faible par rapport à la **voie parentérale** en raison de l'absorption intestinale variable et du premier passage hépatique²⁴.

L'administration topique du MTX, d'autre part, présente une toxicité systémique limitée mais surtout une **très faible efficacité** en raison de sa mauvaise pénétration cutanée. La faible pénétration est due à la nature physicochimique du médicament : hydrophilie (d'un point de vue pharmacologique) et dissociation élevée (ionisation) à pH physiologique qui limitent la diffusion passive à travers la peau.

Par exemple, un gel MTX à 0,25 % testé pour le psoriasis palmoplantaire (une forme compliquée de la maladie) a été bien toléré et accepté, mais n'a pas réussi à éliminer les lésions de manière significative¹⁴.

La **Ciclosporine** Neoral[®] est un médicament immunosuppresseur qui donne des résultats très rapides et des taux de rémission élevés. Il est sans danger pendant la grossesse, mais peut causer une néphrotoxicité, de l'hypertension, des nausées ou des maux de tête. Topiquement, il n'a pas réussi à produire un effet thérapeutique.

Les rétinoïdes (analogues de la vitamine A) ont un effet antiprolifératif sur les kératinocytes. Acitretine Soriatane[®] est un traitement oral systémique, tandis que Tazarotène Tazorac[®] est utilisé par voie topique. L'Acitrétine est tératogène et est donc contre-indiquée pendant la grossesse.

L'**Apremilast** Otezla[®] est une thérapie ciblée de nouvelle génération. C'est un inhibiteur sélectif de l'enzyme phosphodiésterase 4 qui bloque la production spontanée de TNF- α . Contrairement au MTX, au Tacrolimus ou à la Ciclosporine, il n'a été approuvé que récemment (2014 par la Food and Drug Administration aux États-Unis)²⁵. En 2021, il est donc toujours protégé par un brevet et crée une charge financière pour les systèmes de santé en raison de son coût élevé²⁶. Les effets secondaires courants sont la diarrhée, les nausées et les infections.

D'autres traitements systémiques moins courants comprennent les esters d'Acide fumarique ou le Mycophénolate mofétil.

4.3. Photothérapies

La photothérapie consiste en l'exposition de la peau aux rayons UV (290-400 nm). Deux types de thérapies UV sont approuvés : **UV-B** et **PUVA** (psoralène plus UV-A). Le psoralène (Méthoxsalène Méladinine[®]) est un agent photosensibilisant⁸. Les UV-A ont des longueurs d'onde plus longues et pénètrent plus profondément dans la peau. L'efficacité varie fortement d'un patient à l'autre. La photothérapie nécessite beaucoup de temps avec 3 à 5 séances par semaine pendant 2 à 3 mois et les radiations augmentent le risque de développer des mélanomes².

4.4. Produits Biologiques

Les traitements biologiques sont généralement des **Anticorps monoclonaux** (mAb) et diffèrent des *small molecules* conventionnelles par leur poids moléculaire allant de dizaines à centaines de kilodaltons. Ils sont obtenus à partir d'organismes vivants plutôt que par synthèse chimique.

Les produits biologiques appartiennent à la nouvelle génération de produits thérapeutiques ciblés et sont classés par mécanisme d'action. Une large gamme a été approuvée :

- Anti-TNF- α (Infliximab Remicade[®], Adalimumab Humira[®], Etanercept Enbrel[®], Certolizumab Cimzia[®])
- Anti-IL-12/-23 (Ustekinumab Stelara[®])
- Anti-IL-23 (Risakizumab Skyrizi[®], Tildrakizumab Ilumetri[®], Guselkumab Tremfya[®])
- Anti-IL-17 et récepteurs apparentés (Secukinumab Cosentyx[®], Ixekizumab Taltz[®], Brodalumab Kyntheum[®])^{2,8}.

Par rapport aux traitements systémiques traditionnels, les mAb ont une hépatotoxicité, une néphrotoxicité, une toxicité médullaire et une tératogénicité réduite, mais ne peuvent pas être administrés par voie orale²¹. Des tests sanguins spécifiques et de la fonction hépatique doivent être effectués avant de commencer le traitement. Les mAb peuvent augmenter le risque d'infection.

Le principal inconvénient des mAb est le coût colossal des traitements. En 2017 en France, Humira[®] était la première composante de dépenses médicamenteuses avec un coût de 460 millions d'euros tandis qu'Enbrel[®] était classé cinquième avec 235 millions d'euros²⁷.

5. Nanothérapies Topiques : la Nanodermatologie

La nanomédecine est un domaine émergent qui combine la nanotechnologie avec les sciences pharmaceutiques et biomédicales²⁸.

Les nouveaux médicaments, qu'il s'agisse de *small molecules* ou de mAb, font face à de sérieux défis pour démontrer leur supériorité en termes d'efficacité et d'innocuité par rapport aux normes prescrites. De plus, à notre connaissance, toutes les thérapies nouvellement commercialisées sont destinées à un usage systémique alors que les agents topiques ont été négligés au cours des 20 dernières années. Dans ce contexte, les nouvelles formulations topiques à base de **Nanoparticules (NP)** sont une approche prometteuse pour l'amélioration des thérapies actuelles²⁹.

Les NP peuvent améliorer les propriétés physicochimiques des API telles que l'hydrophilie ou la stabilité. Les NP peuvent également modifier les profils pharmacocinétiques et de biodistribution². Par conséquent, la posologie peut être réduite en obtenant une libération prolongée ou un ciblage de tissus ou d'organes.

De même, le profil de sécurité peut être amélioré en réduisant les effets secondaires et hors cible, ce qui permet une augmentation de la posologie.

Les NP peuvent être réparties en trois catégories en fonction de leur nature chimique : les nanoparticules lipidiques, les nanoparticules polymériques et les nanoparticules métalliques⁸. Des exemples de NP publiées sont listés ci-dessous avec les API utilisés entre parenthèses.

Les **nanoparticules lipidiques ou vésiculeuses** sont biodégradables, relativement stables et peu coûteuses. Elles encapsulent des médicaments pour augmenter leur biodisponibilité. Les plus communes et plus anciennes sont les liposomes (MTX, Ciclosporine, Trétinoïne) et se composent de vésicules bicouches entourant un noyau aqueux interne. Les liposomes peuvent incorporer des médicaments hydrophiles dans le noyau aqueux et des médicaments lipophiles dans la bicouche lipidique. Les *solid-lipid nanoparticles* (Ciclosporine, Calcipotriol, Bétaméthasone) sont constituées d'un noyau interne de liquide physiologique entouré d'une couche externe de tensioactifs avec une grande capacité d'incorporation de médicaments. Les *nanostructured lipid carriers* (MTX, Tacrolimus) sont une version améliorée des *solid-lipid nanoparticles* avec une meilleure stabilité et capacité d'encapsulation. Les éthosomes (Tazarotène, Tacrolimus) sont faits d'éthanol et de phospholipides, ce qui améliore la perméation dans le *stratum corneum*. Les autres plateformes comprennent les niosomes (MTX, Acitretin), les transférosomes (MTX, Tazarotène), les émulsomes (Dithranol) ou les cérosomes.

Les **nanoparticules polymériques** sont des structures colloïdales constituées de macromolécules telles que poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PGLA), le polyéthylène glycol (PEG) ou le dextran. Elles sont biocompatibles, non immunogènes, peuvent présenter différentes tailles et formes et ont généralement une longue demi-vie *in vivo*. Les nanoparticules polymériques comprennent les nanomicelles (Ciclosporine, Tacrolimus), les nanoémulsions (Clobétasol, Calcipotriol), les nanosphères (médicament dispersé dans une matrice de polymère), les nanocapsules (médicament enfermé dans une coquille) et les nanogels (MTX). Les nanomicelles sont composées de monomères amphiphiles avec une tête hydrophobe et une longue queue hydrophile qui s'auto-assemblent pour former une structure en forme de couronne. Les dendrimères (par exemple, les Poly(amidoamine) ou PAMAM) sont des macromolécules multivalentes tridimensionnelles hautement ramifiées. Les dendrimères sont constitués de trois composants structurels : un noyau, une structure interne composée de branches et une surface extérieure composée de groupes fonctionnels.

Les **nanoparticules métalliques** peuvent être préparées avec une large gamme de métaux, tels que l'or, l'argent, le platine, le zirconium, le cuivre, le palladium, le fer, le sélénium ou le strontium, et présentent différentes tailles et formes : nanosphères, nanopores, nanotubes, nanotiges, nanocoques, nanoclusters, et nanoétoiles²⁰. La fonctionnalisation est relativement facile et les API peuvent être piégés ou directement conjugués. Elles sont extrêmement stables, biocompatibles et peuvent avoir des capacités de ciblage. La toxicité dépend essentiellement du métal, de l'absorption, de l'excrétion et de la lixiviation des ions métalliques des particules.

La chrysothérapie, qui fait référence aux traitements utilisant des complexes d'or, a été introduite à la fin des années 1920³⁰. Les composés d'or (I) liés à des thiols ou des phosphines sont, par exemple, utilisés contre l'arthrite. Ils sont pris par voie intraveineuse ou orale (Auranofin Ridaura[®]) et, bien que leur mécanisme d'action reste inconnu, une action anti-inflammatoire est observée. L'utilisation de la chrysothérapie a diminué à mesure que de nouveaux traitements ont été introduits et est maintenant marginale.

METHOTREXATE ET NANOPARTICULES D'OR

Les GNP regroupent des composés très variés en taille et en application avec des méthodes de synthèse diverses. Elles ont néanmoins une architecture commune avec un noyau d'or et une couronne de ligands. Les GNP de la plateforme Midacore™ de Midatech Pharma sont sphériques ultrapetites et généralement composées de carbohydrates et de PEG ainsi que d'un API qui détermine l'application thérapeutique. MTC-100244 MTX-GNP est composé d'un dérivé de Méthotrexate, de carbohydrates et de PEG liés de manière covalente au noyau d'or. Les GNP, Midacore™ et MTC-100244 MTX-GNP sont décrits dans ce chapitre. Les travaux réalisés avec des modèles précliniques psoriasiques par Özcan *et al.* qui ont abouti à une publication avec MTC-100244 MTX-GNP sont également présentés. Enfin, une ample revue de la littérature concernant les nanoparticules couplées au Méthotrexate et les composés apparentés a été effectuée afin de les comparer avec MTC-100244 MTX-GNP en termes de composition chimique et d'application biologiques.

1. Nanoparticules d'Or

Les nanoparticules d'or, également appelées AuNP ou **Gold Nanoparticles (GNP)** ont d'excellentes caractéristiques pour une utilisation biotechnologique et clinique : propriétés opto-électroniques, rapport surface/volume élevé, polyvalence, stabilité, facilité de synthèse, biocompatibilité et faible toxicité³¹. Leurs propriétés physicochimiques dépendent de leur taille, de leur forme et de leur couronne organique³². Les GNP (1-100 nm)³³ peuvent être divisées entre clusters (ultrapetits) et colloïdes/cristaux (plus grands) en ce qui concerne leur taille et peuvent présenter différentes formes (sphérique ou anisotrope)³⁴.

Pour leur synthèse, deux approches sont possibles, *top-down* ou *bottom-up*, avec trois types de méthodes : chimique, physique ou biologique^{35,36}.

La synthèse chimique *bottom-up* est la plus ancienne et reste la plus utilisée pour les GNP sphériques³⁷. En bref, les grandes GNP sont généralement synthétisées par la réduction de sels d'or avec du citrate dans une méthode décrite pour la première fois par Turkevich *et al.* en 1951³⁸ et optimisée par Frens *et al.* en 1973³⁹. Les **GNP ultrapetites** (taille du noyau < 5 nm), sont principalement obtenues par **synthèse de Brust-Schiffrin**⁴⁰.

Les GNP ultrapetites sont caractérisées une absence (noyau < 2 nm) ou une faible résonance plasmonique de surface. Pour les GNP sphériques, la bande plasmonique de surface est située autour de 520 nm, mais elle est très sensible à l'environnement⁴¹. Deux autres propriétés typiques des GNP sont la capacité d'éteindre la fluorescence et l'activité redox⁴².

Les GNP sont des plateformes hybrides inorganiques/organiques qui peuvent être divisées en deux parties: le **noyau d'or** (Au^0), régissant le comportement physique, et la **couronne** ou coquille, constituée de matière organique qui dicte le comportement chimique^{43,44}. Deux interfaces peuvent également être définies : noyau-couronne et couronne-environnement (Figure 5).

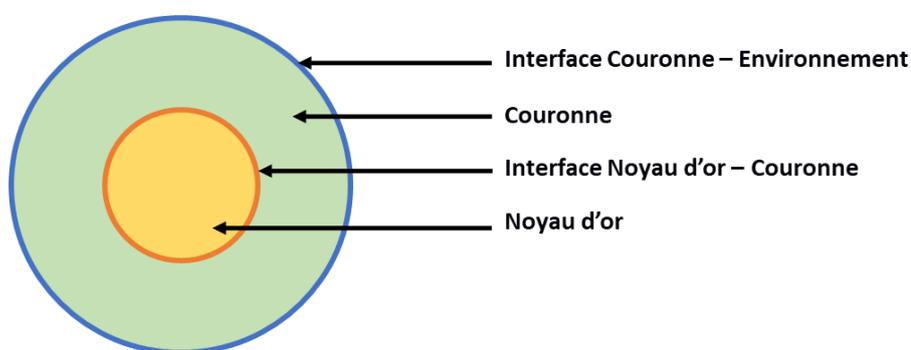


Figure 5 : Configuration simplifiée des nanoparticules sphériques.

La couronne peut être constituée de diverses molécules appelées **ligands**, qui sont liés soit au noyau d'or, soit à un autre ligand. Ils opèrent comme une coquille, interagissant avec l'environnement et assurent la furtivité et la stabilité en empêchant l'agrégation (par exemple, par répulsion électrostatique, hydratation de la surface et exclusion stérique)⁴⁵. L'extrémité externe de la couronne et sa charge sont de la plus haute importance, car elle est en contact direct avec l'environnement et, par conséquent, influence les interactions avec les milieux, les cellules et les autres particules^{46,47}.

En tant que système **multifonctionnel**, les particules peuvent être constituées de plus d'un type de ligand et quatre stratégies peuvent être utilisées pour ajouter des ligands: l'adsorption physique, la liaison électrostatique, la reconnaissance d'affinité spécifique et le couplage covalent⁴².

La liaison entre le noyau d'or et les ligands peut être obtenue grâce à diverses fonctionnalités chimiques telles que l'acide carboxylique, l'amine, la phosphine ou le thiol. La principale forme de jonction covalente est le lien **soufre-or** (S-Au). Les atomes de soufre ont la plus forte interaction avec l'or (200 kJ/mol)⁴⁵.

La liaison S-Au ne peut être déplacée que par un autre thiol, tel que le glutathion intracellulaire⁴⁸, et est peu affectée par l'oxydation. La force de la liaison peut être modulée. Par exemple, les groupes bidentés, tels que le 1,2-dithiane ou le dithiocarbonate (par exemple l'acide lipoïque), augmentent la force de la liaison ligand-or, tandis que les groupes amine ou carboxylate se lient moins fortement^{33,49}. C'est un facteur important, car une liaison plus forte, associée à une couronne plus dense, améliore la stabilité des GNP.

Les GNP sont **multivalentes** et permettent la présentation en grande quantité de **pratiquement tout type de molécule organique** (Figure 6). Les ligands organiques formant la couronne peuvent être des lipides, des peptides, des protéines, des carbohydrates, des acides nucléiques, des API, des sondes (par exemple des fluorophores) ou des polymères (par exemple du PEG)^{36,50}.

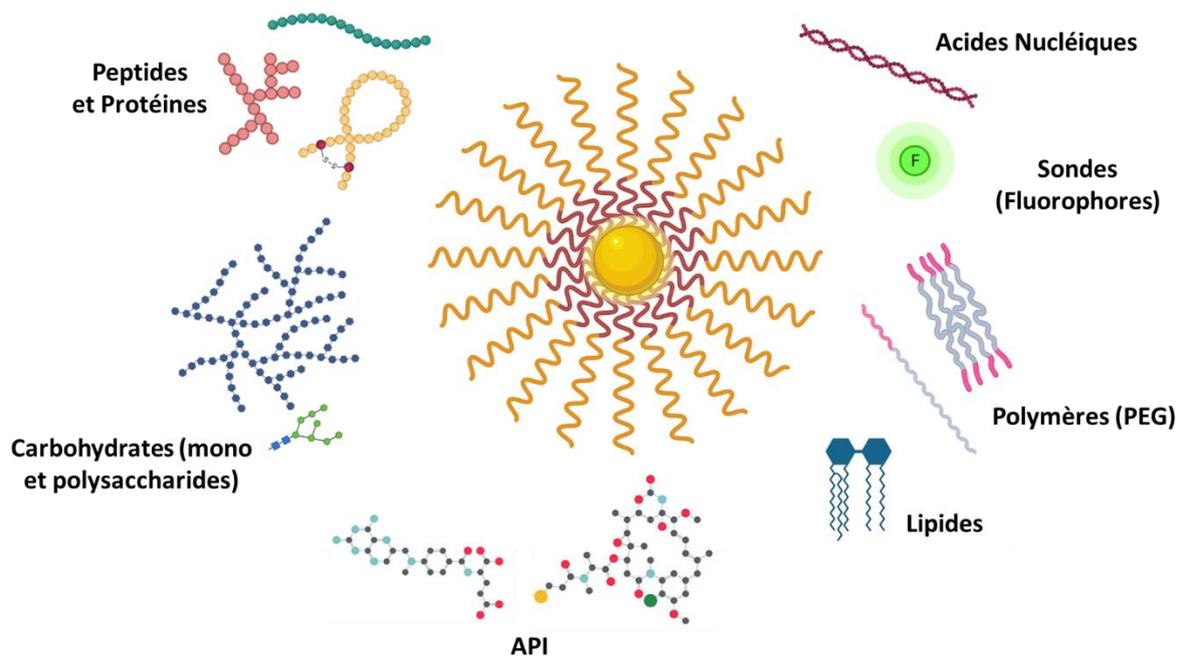


Figure 6 : Vue schématique des différentes classes de molécules pouvant être greffées dans la couronne des GNP.

L'utilisation des GNP pour le traitement du cancer repose sur divers principes et mécanismes qui peuvent également être appliqués à d'autres domaines thérapeutiques^{28,31}:

- Solubilité : permettre la solubilisation aqueuse de molécules hydrophobes.
- Furtivité : camoufler les GNP et les molécules de la couronne pour éviter la clairance par le système réticulo-endothélial (RES), améliorant ainsi la demi-vie.
- Ciblage passif : par l'Effet de Perméabilité et de Rétention améliorées (EPR) dû à la vascularisation plus perméable des tumeurs.

- Ciblage actif : utilisation d'un agent pour cibler des tissus ou améliorer l'absorption cellulaire spécifique (par exemple l'endocytose)⁴³.
- Libération intracellulaire d'API.
- Thérapie photothermique utilisant un laser (généralement proche infrarouge) et la capacité de conversion photothermique des GNP. Thérapie photodynamique utilisant la lumière visible et un photosensibilisateur dans un mécanisme impliquant les espèces réactives de l'oxygène. Radiothérapie utilisant les GNP pour améliorer l'efficacité des rayons gamma ou des rayons X^{36,51}.

Les GNP ont un **large éventail d'applications** du diagnostic à la thérapeutique. Les GNP peuvent être utilisées comme agent de contraste en imagerie biomédicale ou comme capteurs^{52,53,54}. Dans les programmes de recherche thérapeutique, les GNP sont principalement employées pour traiter les infections (par exemple, couplées à des antibiotiques pour les infections bactériennes), les cancers (avec des médicaments antitumoraux attachés et/ou une irradiation) ou comme vaccins (adjuvant avec des carbohydrates ou véhicule)^{32,55}.

En 2016, Bobo *et al.* ont identifié 51 nanomédicaments approuvés par la FDA²⁸. Les nanomédicaments couvrent de nombreuses aires thérapeutiques (cancers, maladies auto-immunes, troubles métaboliques ou infections microbiennes) et plupart d'entre eux sont des nanoparticules polymériques (Glatiramer acetate Copaxone[®] pour le traitement de la sclérose en plaque, Pegfilgrastim Neulasta[®], complément de chimiothérapie pour stimuler la production de neutrophiles), des protéines (Paclitaxel Albumin Abraxane[®], traitement anticancéreux) ou des liposomes combinés à des médicaments ou à des produits biologiques.

En ce qui concerne les nanoparticules métalliques, Nanotherm[®] (MagForce) est constitué de particules d'oxyde de fer. Cliniquement approuvé et utilisé pour traiter les cancers solides tels que le glioblastome, Nanotherm[®] est injecté par voie intratumorale et un champ magnétique est appliqué pour augmenter la température et détruire les cellules cancéreuses⁵⁶. Les particules d'oxyde d'hafnium NBTXR3 (Nanobiotix) font actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement du sarcome des tissus mous⁵⁷.

Bien qu'il n'y ait pas de GNP approuvées commercialement, quelques-unes sont à un stade clinique avancé. CytImmune Sciences a développé CYT-6091 Aurimmune[™], une nanoparticule d'or péglée combinée au TNF- α pour le traitement de tumeurs solides⁵⁸.

Emergex Vaccines dispose de deux vaccins à base de GNP (greffés avec des peptides d'amorçage des cellules T) en phase clinique : naNO-COVID⁵⁹ et naNO-DENGUE⁶⁰. Les candidats cliniques développés par Midatech Pharma sont décrits dans la section suivante.

2. Plateforme Midacore™ de Midatech Pharma

La plateforme GNP Midacore™ de Midatech Pharma a été largement développée et est protégée par une famille de plus de 20 brevets.

Les GNP sont générées par une **synthèse de Brust-Schiffrin** modifiée pour obtenir des particules ultrapetites sphériques non plasmoniques (noyau ≤ 2 nm) et plasmoniques (noyau 3-5 nm). La plateforme est polyvalente et permet une fonctionnalisation avec de nombreux types de ligands (Figure 7).

Les GNP Midacore™ sont généralement basées sur une base avec **deux types de ligands** : un **monosaccharide** non immunogène avec chaîne latérale alkyle courte et un **polyéthylène glycol** court (oligo-éthylène glycol) avec une extrémité fonctionnelle^{61,62,63}. Les monosaccharides sont généralement 2'-Thioethyl α -D-galactopyranoside (**α -Galactose-C₂**) ou 2'-Thioethyl β -D-glucopyranoside (**β -Glucose-C₂**). Les PEG sont principalement α -Thio- ω -(propionic acid) octa(ethylene glycol) (**PEG(8)COOH**, 1-mercapto-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oic acid) ou α -Thio- ω -aminoethyl penta(ethylene glycol) (PEG(5)NH₂, 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol).

Ces deux classes de molécules sont largement utilisées avec les nanoparticules et ont démontré qu'elles avaient d'excellentes caractéristiques pour augmenter la stabilité, l'hydrophilie et la biocompatibilité⁴⁴.

Les **carbohydrates** améliorent la stabilité (évitent l'agrégation), la solubilité, la biocompatibilité, la biodégradabilité et confèrent des propriétés furtives (protéiques répulsives) aux nanoparticules^{64,65}. Il a été démontré que l'utilisation d'un monosaccharide avec une chaîne latérale alkyle courte pour moduler la quantité de PEG sur les GNP ultrapetites a un impact sur l'absorption par les cellules cancéreuses⁶³.

Les **PEG** sont des molécules flexibles (composées d'unités -CH₂-CH₂-O-) formant des bobines fortement hydratées à la surface des particules. Ils sont relativement inertes (non immunogènes) et solubles en milieu aqueux, ainsi que dans la plupart des solvants organiques polaires tels que le Diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le méthanol.

Le PEG possède une forte capacité à stabiliser les particules en empêchant l'agrégation, même à des concentrations ioniques élevées, et les interactions non spécifiques avec les protéines⁶⁶ ou les cellules⁶⁷.

Le PEG améliore les performances des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*, par exemple, le temps de circulation ou la biodisponibilité orale⁶⁸.

Le PEG crée un blindage qui minimise l'opsonisation : attachement aux protéines sériques (par exemple l'albumine sérique humaine et le fibrinogène) qui entraîne la formation d'une couronne protéique autour de la nanoparticule⁶⁹. En effet, la formation d'une couronne protéique augmente la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléaire et favorise la clairance des particules^{70,71,72}.

Le groupe terminal du PEG est essentiel, car il a un impact sur la stabilité et le comportement biologique des particules⁷³. La charge, généralement déterminée par la fonction terminale, est cruciale. Neutre elle fournit le meilleur blindage et positive le plus mauvais. Les particules anioniques négatives (par exemple de PEG avec un acide carboxylique terminal) sont non toxiques⁷⁴. Le groupe fonctionnel terminal du PEG peut en outre être utilisé pour se lier à des molécules possédant une fonction complémentaire⁵⁰.

Le niveau d'hydratation élevé des chaînes PEG entraîne une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules supérieure par rapport à d'autres molécules de même poids moléculaire (par exemple, les peptides, les protéines ou les polysaccharides). Il est donc essentiel de sélectionner une taille, une ramification et une densité de PEG adéquates (faible résultant en une couronne « champignon », élevée entraînant des conformations de « brosse »⁷⁵) pour que la particule bénéficie de ses avantages sans provoquer de perte d'efficacité ou des effets indésirables.

Les PEG dont la Masse Molaire (MW) est supérieur à 60 kDa ne sont pas excrétés par les reins et peuvent s'accumuler dans le foie ou dans les lysosomes d'autres cellules en raison de sa faible biodégradabilité. Une réponse immunitaire contre le PEG avec des anticorps anti-PEG a également été mise en évidence et doit être surveillée⁷⁰. De même, trop de blindage peut réduire l'absorption intracellulaire en altérant des capacités de ciblage. Un long PEG non lié peut être difficile à éliminer d'une solution de nanoparticules et la purification doit donc être soigneusement conçue, en ce qui concerne le choix du procédé, tel que la sonication ou l'ultrafiltration⁷⁶.

Bien que des alternatives, telles que d'autres polymères synthétiques (polyglycérols, polyoxazolines, polyvinylpyrrolidone, polyacrylamides) ou naturels (glycosaminoglycanes : héparine, acide polysialique, acide hyaluronique), ainsi que des zwitterions (composés de fractions chargés positivement et négativement) aient été développées, le PEG reste la référence⁷⁰.

Une fois la particule obtenue, deux stratégies peuvent être employées pour ajouter de nouveaux ligands : la **post-fonctionnalisation**⁷⁷ et l'**échange de ligands**⁷⁸. La post-fonctionnalisation est une réaction où les ligands présents dans la couronne de la GNP réagissent avec des molécules ajoutées en solution suivant les principes de la chimie organique bioorthogonale traditionnelle. L'échange de ligands fait référence à une réaction dans laquelle un ligand thiol ou disulfure est ajouté à une solution de GNP et se lie directement au noyau. En utilisant ces deux approches, un large éventail de composés peut être ajouté à la couronne.

La plateforme MidacoreTM est une « boîte à outils » ou « *toolbox* » et a été utilisée dans différents pipelines de recherche résumés ci-dessous.

Dans le domaine du diabète, les GNP ont été utilisées comme support pour des peptides tels que l'insuline et ses analogues⁷⁹, le glucagon et le glucagon-like peptide^{80,81} ou l'amyline⁸². De l'Insuline-GNP combinée à un système d'administration par voie buccale a été testée jusqu'aux stades cliniques⁸³. Une stratégie d'immunothérapie utilisant l'autoantigène peptidique Proinsulin (C19A3) pour le traitement précoce du diabète de type 1 a également fait l'objet d'essais cliniques^{84,85,86}.

Les applications vaccinales ont également été explorées en utilisant la présentation multivalente de dérivés du mannose (α -Mannose et α -Mannose1,2 α -Mannose) pour le ciblage cellules dendritiques par l'effet glycoside de cluster^{87,88}.

Des immunothérapies à base de peptides ont été développées pour le traitement de cancers^{89,90}. Par exemple, H3.3K27M (histone H3.3 avec mutation de substitution de l'acide aminé lysine 27 à méthionine)⁹¹ a été utilisé pour traiter le gliome pontique intrinsèque diffus (DIPG). De plus, des peptides tels que le cyclic arginine-glycine-aspartic acid (cRGD) peptide [en cours de publication] ou SIKVAV⁹² ont été employés pour cibler les cellules cancéreuses surexprimant des récepteurs de l'intégrine. Un large éventail de molécules antitumorales a également été utilisé (par exemple, la Doxorubicine, l'Irinotécan, les Sels de Platine, le Témazolomide, le Docétaxel ou le Sorafénib)^{93,94}. L'antitubulinique Mertansine (DM1 ou super DM1) a été utilisé pour créer un traitement du carcinome hépatocellulaire (HCC)^{95,96}.

L'intérêt pour les maladies auto-immunes a conduit au développement de **MTC-100244** **MTX-GNP** avec un dérivé de Méthotrexate pour le traitement du psoriasis qui est l'objet de cette **thèse d'exercice**¹².

D'autres applications de Midacore™ comprennent la conjugaison avec des médicaments antibactériens (par exemple, l'Amoxicilline, la Ciprofloxacine, la Rifampicine ou la Vancomycine)⁹⁷ ou des peptides pour traitement prophylactique⁹⁸. Les GNP ont été utilisées pour promouvoir l'absorption cellulaire de peptides afin d'obtenir une réponse cytotoxique des lymphocytes T (CTL)⁹⁹, pour le traitement de l'ostéoporose par le Tériparatide¹⁰⁰ et ont été associées à des acides nucléiques¹⁰¹.

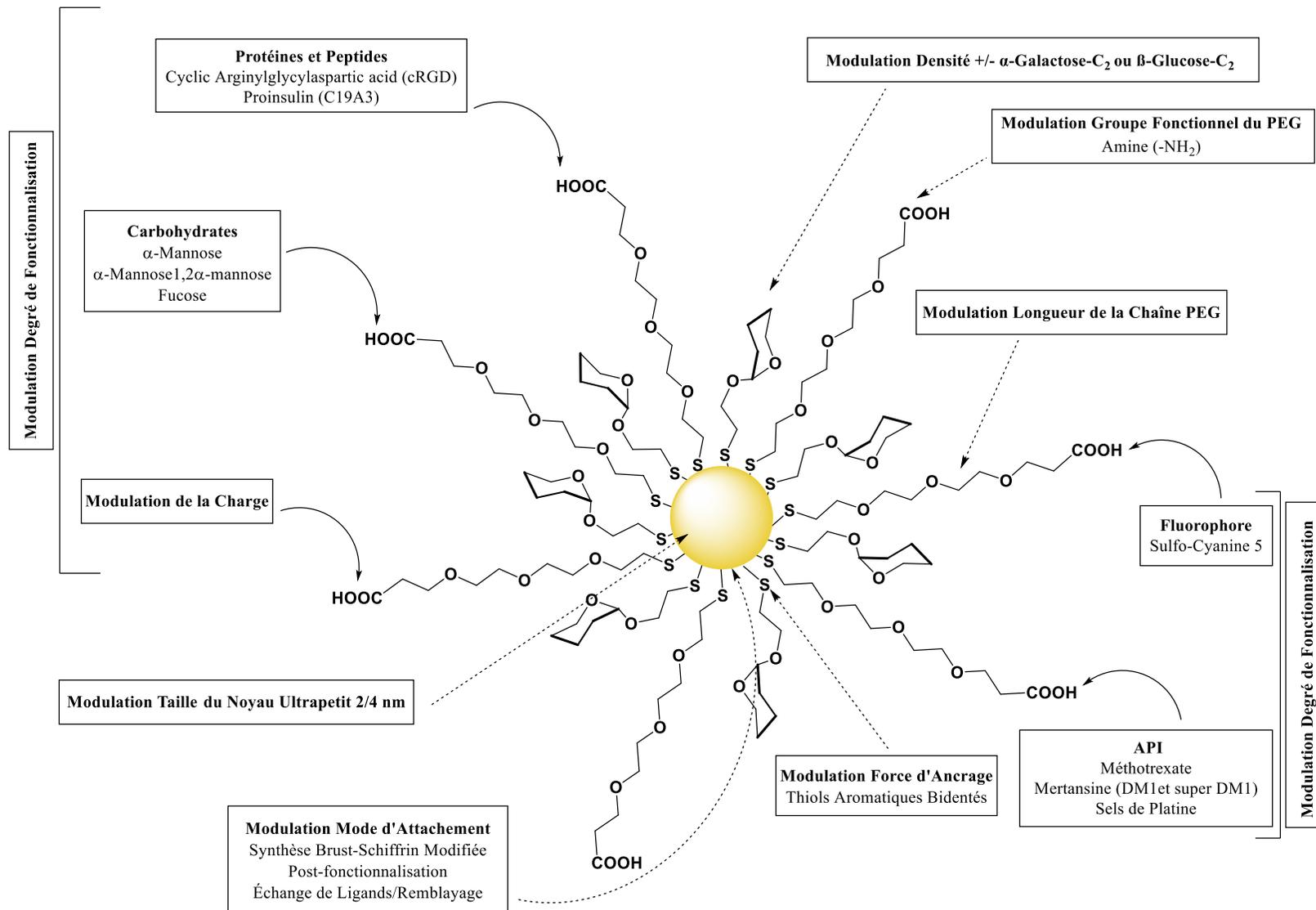


Figure 7 : Résumé détaillé de la plateforme de Nanoparticules d'Or Midacore™ de Midatech Pharma.

3. MTC-100244 MTX-GNP Methotrexate Gold Nanoparticles

Les Nanoparticules d'Or Associées au Méthotrexate ou **Methotrexate Gold Nanoparticles MTC-100244 MTX-GNP** de Midatech Pharma appartiennent à la plateforme Midacore™. Elles consistent en un noyau de 2 nm portant en moyenne 11 **dérivés de Méthotrexate** par GNP (Figure 8). Le dérivé est un MTX modifié avec une chaîne latérale de PEG courte pour obtenir une présentation sur la partie la plus externe de la GNP ainsi avec un fort ancrage au noyau. Le reste de la couronne est constitué d'un monosaccharide (α -Galactose) et d'un PEG court chargé négativement. Les trois types de ligands sont liés de manière covalente au noyau. Le composé MTC-100244 MTX-GNP est représenté par la formule chimique suivante : **(α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂.**

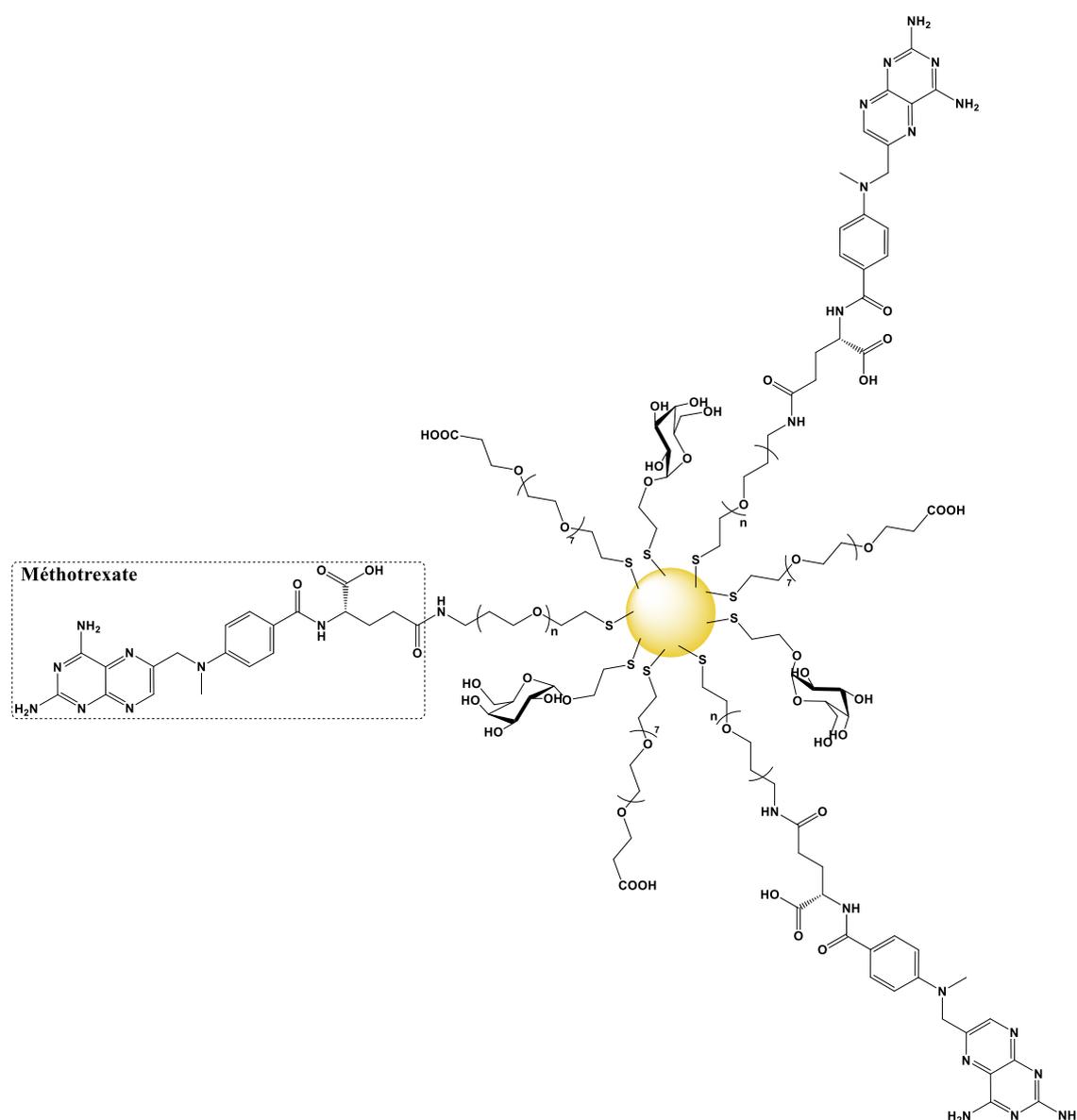


Figure 8 : (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂ MTC-100244 MTX-GNP.

MTC-100244 MTX-GNP est protégé par deux brevets : WO2020120785 *Antifolate-Carrying Nanoparticles and their Use in Medicine*¹⁰² et WO2020120787 *Nanoparticle-Based Therapy of Inflammatory Disorders*¹⁰³. MTC-100244 MTX-GNP est formulé avec un hydrogel de Carbopol 980 pour application topique (Figure 9) (voir chapitre *Formulation Topique - Hydrogel de Carbopol*).



Figure 9 : Aspect des formulations topiques de nanoparticules. (À gauche) MTC-100244 MTX-GNP (α -Galactose- C_2)₂₂(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂ dans un hydrogel de Carbopol 980 (0,5 % p/p d'or). (À droite) MTC-100011 GNP de base (Intermédiaire) sans ligand MTX.

Özcan et al. de l'hôpital universitaire de Zurich ont présenté des preuves biologiques de l'efficacité de MTC-100244 MTX-GNP dans une publication de 2020 intitulée *Nanoparticle-Coupled Topical Methotrexate Can Normalize Immune Responses and Induce Tissue Remodeling in Psoriasis*¹².

Deux modèles précliniques *in vivo* ont été utilisés pour valider l'efficacité de MTC-100244 MTX-GNP. MTC-100244 MTX-GNP a inhibé l'hyperprolifération cellulaire et la production de cytokines, restauré la différenciation des kératinocytes, réduit l'épaississement de la peau et la fibrose tissulaire, entraînant une diminution du phénotype psoriasique et une restauration de l'homéostasie immunitaire de la peau (Figure 10).

Le modèle murin de psoriasis induit par IMQ a été utilisé pour évaluer la tolérance à MTC-100244 MTX-GNP après administration systémique (injections sous-cutanées de la solution de nanoparticules) et locale (application d'un hydrogel). L'efficacité a également été examinée. Une réponse clinique et des changements biomoléculaires significatifs (diminution des lymphocytes T $\gamma\delta$, des lymphocytes T CD4⁺ et des neutrophiles) ont été observés par rapport au placebo et au MTX seul. IMQ (Aldara[®] 5 % crème, 60-70 mg) avait été appliquée sur les oreilles des souris pendant trois jours pour créer des lésions psoriasiques.

L'injection sous-cutanée de MTC-100244 MTX-GNP pendant sept jours (2 mg/kg de MTX, 5,5 mg/kg d'or, concentration définie par la tolérance maximale au MTX) a été bien tolérée et a eu un effet positif sur l'épaississement de la peau et l'infiltration immunitaire (Figure 11).

Pour le modèle topique, le protocole expérimental était similaire, mais la dose de MTC-100244 MTX-GNP était plus élevée (12,5 mg/kg MTX, 37,5 mg/kg d'or). Aucune perte de poids, perturbation des enzymes hépatiques ou perméation cutanée de MTX ou de GNP (présence dans le sérum) n'a été observée. L'effet clinique, d'autre part, a été très significatif car les échantillons traités par MTC-100244 MTX-GNP ressemblaient à une peau non psoriasique (Figure 12).

Le modèle murin de xélogreffe humaine AGR129 a ensuite été utilisé, et MTC-100244 MTX-GNP a été comparé à une norme de soins : Daivobet[®] qui consiste en l'association du puissant dermocorticoïde Bétaméthasone avec l'analogue de la vitamine D3 Calcipotriol. Dans ce modèle, de la peau humaine asymptomatique de patients psoriasiques a été greffée sur des souris. Après 4-8 semaines, des lésions psoriasiques se sont développées spontanément, ce qui rend ce modèle plus réaliste que l'IMQ (Figure 13).

Un traitement topique de deux semaines (21 à 35 jours après la greffe) a montré des améliorations cliniques significatives telles que l'inhibition de l'hyperplasie cutanée, le remodelage des tissus, la réorganisation de la matrice extracellulaire et la régulation à la baisse des processus de cornification et de kératinisation. Les lymphocytes T résidents et la production d'IL-17 ont également été réduits, prouvant que MTC-100244 MTX-GNP agit à la fois sur les composants stromaux et immunitaires. Le séquençage de l'ARN a également démontré une régulation à la baisse des gènes impliqués dans l'inflammation et une régulation à la hausse de ceux impliqués dans la cicatrisation. Pour la plupart des paramètres étudiés, MTC-100244 MTX-GNP a surpassé Daivobet[®]. MTC-100244 MTX-GNP a empêché le développement du phénotype psoriasique, et l'efficacité était comparable à celle des anticorps monoclonaux anti-TNF- α .

Fait intéressant, une GNP sans MTX : MTC-100011 GNP de base, (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₂₂@Au₁₀₂, a également montré une certaine efficacité qui pourrait être liée aux propriétés anti-inflammatoires intrinsèques des GNP.

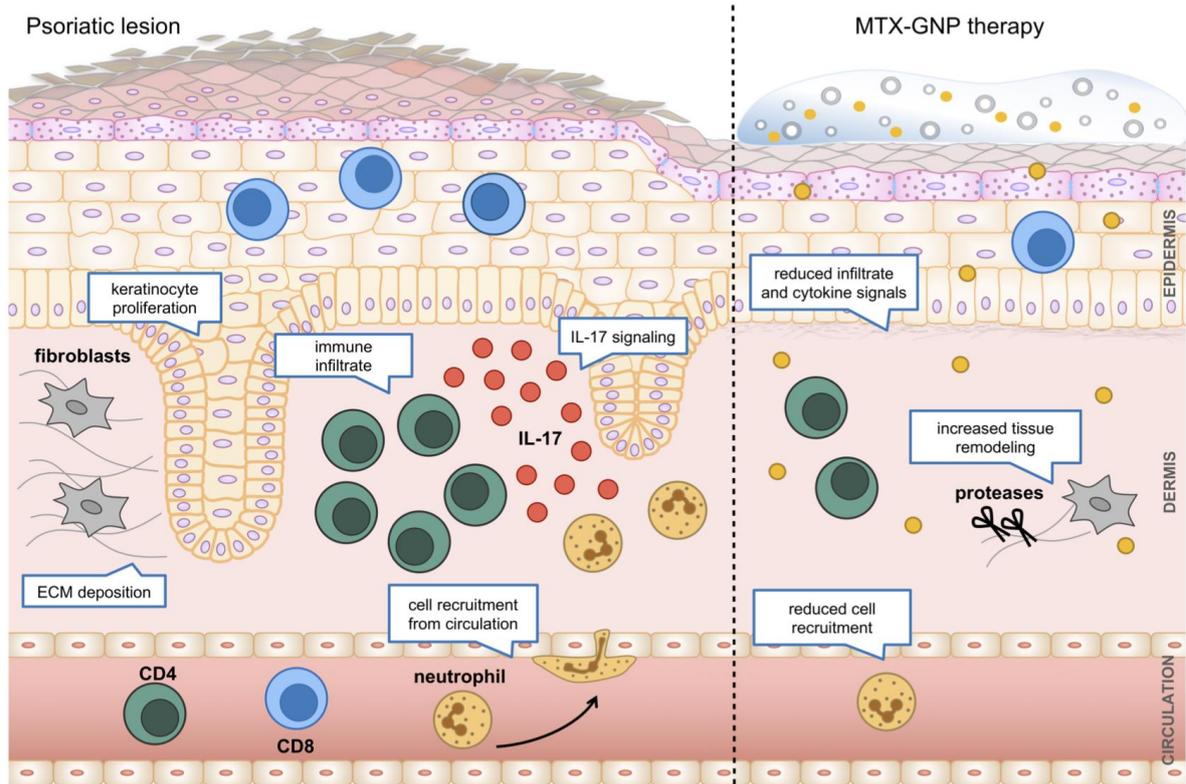


Figure 10 : Représentation d'une lésion psoriasique au niveau cellulaire avec les composants stromaux et immunitaires et des changements se produisant lors de l'application de l'hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP.

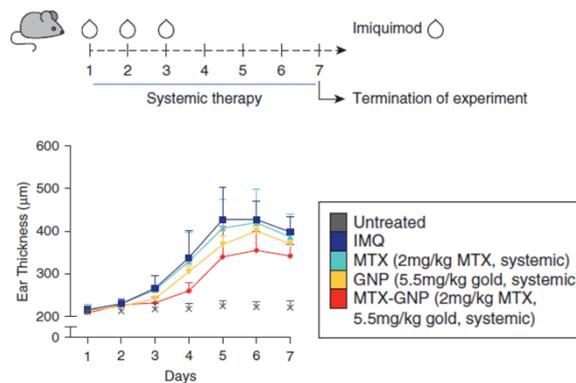


Figure 11 : Modèle murin de psoriasis induit par IMQ : dosage systémique (sous-cutané). Les différents groupes ont été traités avec de l'IMQ pendant trois jours à partir de $t = 0$ pour générer des lésions psoriasiques. À partir de $t = 0$, et pendant sept jours, du MTX (vert), MTC-100011 GNP de base (GNP sans MTX) (jaune) et MTC-100244 MTX-GNP (rouge) ont été injectés quotidiennement ($200 \mu\text{L}$). L'évolution de l'épaisseur de l'oreille a été utilisée comme marqueur clinique du psoriasis. Par rapport au témoin positif IMQ et au MTX libre, une différence significative a été observée avec MTC-100244 MTX-GNP au cours de l'expérience.

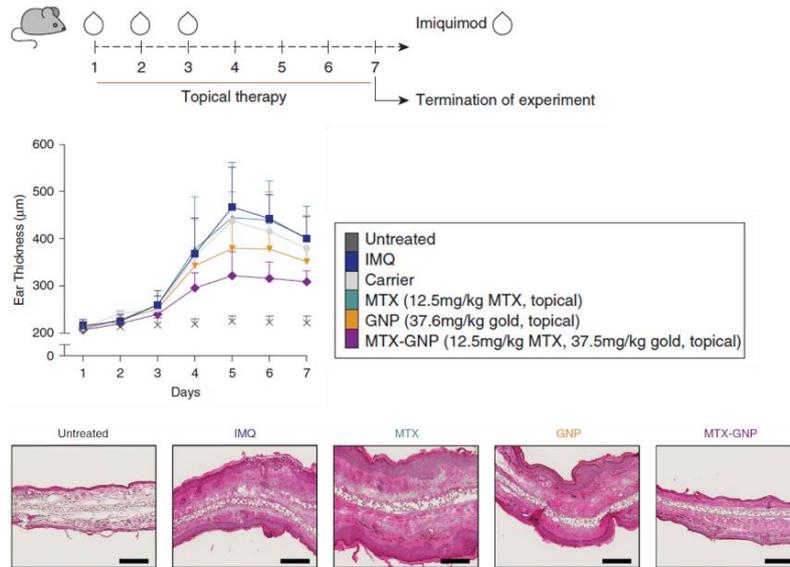


Figure 12 : Modèle murin de psoriasis induit par IMQ : dosage topique. Les différents groupes ont été traités avec de l'IMQ pendant trois jours à partir de $t = 0$ pour générer des lésions psoriasiques. À partir de $t = 0$, et pendant sept jours, un hydrogel de MTX (vert), un hydrogel de MTC-100011 GNP de base (GNP sans MTX) (orange) et un hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP (violet) ont été appliqués quotidiennement ($75 \mu\text{g}$ de gel). L'évolution de l'épaisseur de l'oreille a été utilisée comme marqueur clinique du psoriasis. Par rapport au témoin positif IMQ et au MTX libre, une différence significative a été observée avec MTC-100244 MTX-GNP et MTC-100011 GNP de base au cours de l'expérience. Les images histologiques (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine) du groupe de l'hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP étaient similaires au témoin négatif non traité.

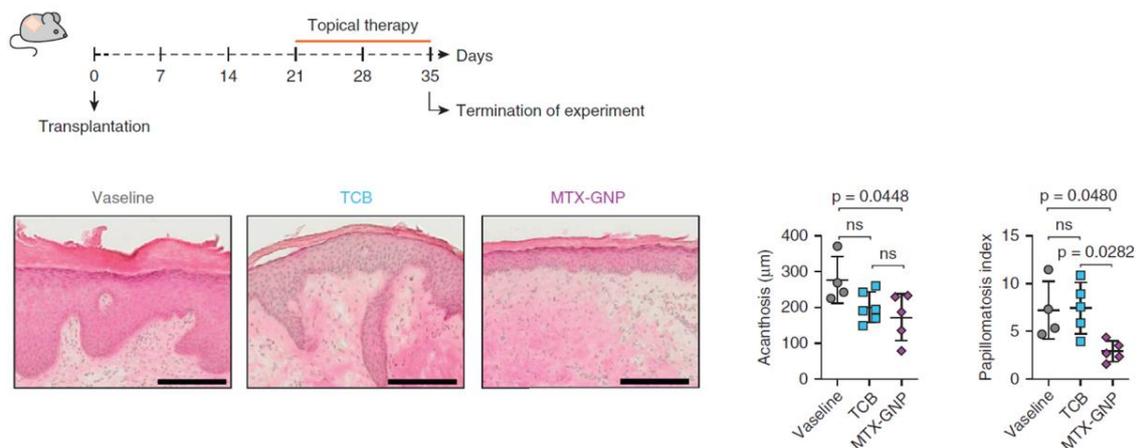


Figure 13 : Modèle murin de xélogreffe humaine AGR129 : dosage topique. À partir de $t = 21$ jours après une greffe de peau humaine de donneurs psoriasiques, et pendant quatorze jours, de la Vaseline (gris), du Daivobet® TCB (bleu) et un hydrogel MTC-100244 MTX-GNP (violet) ont été appliqués quotidiennement. L'évolution de l'acanthose (épaississement de l'épiderme) et la papillomatose (élévation de la surface de la peau) des greffons ont été utilisées comme marqueurs cliniques du psoriasis. Par rapport au contrôle (Vaseline) et au Daivobet®, une différence significative a été observée avec MTC-100244 MTX-GNP. Les images histologiques (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine) du groupe de l'hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP étaient similaires à celles d'une peau saine.

4. État de l'art des Methotrexate Gold Nanoparticles Publiées

Des GNP couplées au MTX ou des composés similaires pour le traitement du psoriasis et de cancers sont évoqués dans de nombreuses publications. Cette section passe en revue les différents composés d'un point de vue chimique, décrivant les différentes plateformes par leur taille, la composition de leur couronne, leur mode de liaison au MTX et les éventuelles dérivatisations. Les essais biomoléculaires et biologiques effectués sont également listés.

4.1. Résumés des Publications

La publication de Chen *et al.* de 2007 est considérée comme le **premier exemple impactant de MTX-GNP**¹⁰⁴. Les GNP (diamètre hydrodynamique **14 nm**) ont été attachées au MTX de **manière non covalente** par liaison des groupes carboxyles au noyau d'or. Le raisonnement derrière le développement d'un MTX-GNP était d'augmenter l'absorption endocytaire par le **Folate Receptor (FR)** et de diminuer l'efflux pour augmenter l'efficacité et réduire la résistance tumorale. Les MTX-GNP ont été obtenus par une méthode Turkevich modifiée³⁸. Le MTX a été ajouté aux GNP purifiées dans le Phosphate-buffered saline (PBS) et le mélange a été incubé à température ambiante pendant la nuit. Des centrifugations répétitives ont été utilisées pour purifier les NP. TEM et DLS ont été utilisés pour le dimensionnement et la spectrophotométrie UV-Vis pour la quantification du MTX. Les MTX-GNP ont été comparés au MTX libre par le biais de modèles de cancéreux *in vitro* et *in vivo* avec des cellules **LL2**. L'afflux et l'efflux ont été mesurés à l'aide de MTX radioactif. Avec la NP, l'absorption cellulaire du MTX était plus élevée et plus rapide, tandis que la cytotoxicité était augmentée. MTX-GNP chez les souris C57BL/6 a été administré à 1,8 mg/kg de MTX quatre fois tous les deux jours puis les animaux ont été sacrifiés deux jours plus tard. MTX-GNP a réussi à supprimer la croissance tumorale chez les souris avec un modèle de **carcinome pulmonaire de Lewis**, alors que le MTX libre n'a eu aucun effet.

Álvarez-González *et al.* ont exposé des MTX-GNP de **20 nm** à des cellules cancéreuses : **HCT-116 (côlon, exprimant FR)** et A549 (poumon, témoin négatif)¹⁰⁵. La liaison au noyau était **non covalente** et utilisait les fractions carboxyliques du MTX pour permettre une libération facile en fonction des changements de pH (les environnements tumoraux sont plus acides) et l'échange avec le glutathion (les niveaux intracellulaires sont plus élevés). La taille a été choisie pour maximiser l'accumulation dans les tumeurs grâce à l'effet EPR.

La stabilité et la fonctionnalisation ont été vérifiées à l'aide de la spectrophotométrie UV-Vis, en évaluant l'absorption maximale de la bande plasmonique des GNP (environ 520 nm) et l'absorbance du MTX dans la région UV proche. La quantité de MTX a été mesurée indirectement par spectrophotométrie à l'aide du surnageant. La stabilité a été mesurée dans l'eau, le PBS et en présence de sérum fœtal bovin. La libération du MTX a été effectuée à différents pH (5,0 et 7,6). Une cytotoxicité *in vitro* s'est produite dès 12 heures pour HCT-116, mais seulement après 48 heures pour A549.

Agabeigi *et al.* ont attaché du FA et du Méthotrexate sur des NP hybrides de silice et d'or (**25 nm**)¹⁰⁶. Les particules ont été utilisées avec des modèles *in vitro* d'absorption et de viabilité cellulaire (MTT) utilisant des **cellules cancéreuses du sein** exprimant FR (**MDA-MB-231 > MCF-7**). Une thérapie photothermique a été utilisée pour augmenter la toxicité des NP en induisant une hyperthermie sous irradiation proche infrarouge (700-1100 nm). L'attachement était **non covalent** et effectué pendant la nuit dans l'obscurité. L'estimation de la quantité liée a été obtenue indirectement par RPLC à l'aide du surnageant (fraction non liée). L'absorption cellulaire (par fluorescence) et la cytotoxicité (24-72 heures) étaient plus élevées pour MDA-MB-231, en corrélation avec une expression plus élevée de FR. Une synergie a également été observée avec les radiations, validant le protocole de thérapie chimio-photothermique.

Gomes *et al.* ont utilisé des MTX-GNP (**20-30 nm**) similaires à Chen *et al.* pour traiter la polyarthrite rhumatoïde avec un modèle *in vivo*¹⁰⁷. La polyarthrite rhumatoïde, comme le psoriasis, est une maladie inflammatoire chronique d'origine auto-immune pour laquelle le traitement de première ligne est le MTX. Elle se caractérise par une hyperplasie synoviale et une inflammation qui endommage le cartilage et d'autres tissus mous dans les articulations, provoquant des douleurs et des déformations. D'autres symptômes systémiques comprennent la fatigue, l'anémie et la perte de poids. MTX-GNP a surpassé **l'effet antiarthritique** du MTX libre chez le rat. Un autre MTX-GNP (100-115 nm, nanocoque) en association avec une irradiation proche infrarouge (700-1100 nm) a montré un effet significatif après une seule injection dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde¹⁰⁸.

Le groupe de Fratoddi du Département de Chimie de l'Université Sapienza de Rome a généré plusieurs publications basées sur des **3MPS-GNP** ultrapetites fonctionnalisées avec du MTX^{19,109,110,111}.

Bessar *et al.* ont d'abord synthétisé une **GNP ultrapetite** très hydrophile en utilisant le **3-mercapto-1-propanesulfonate** (3MPS) comme ligand¹⁹. Le 3MPS est une molécule hydrosoluble de faible MW (178,21 g/mol). Sa fraction thiol se lie de manière covalente au noyau, tandis que le sulfonate présente une charge négative sur la partie externe des particules. Entre les deux, se trouve un propyle rigide. L'attachement du MTX se produit par liaison **non covalente** de ses groupes amines avec les sulfonates du 3MPS. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées en utilisant des 3MPS-GNP avec ou sans MTX. Avec des **kératinocytes** humains primaires, l'absorption cellulaire et la toxicité (exposition de 48 à 72 heures) ont été mesurées, montrant une augmentation des deux lors de la comparaison du MTX avec les MTX-3MPS-GNP. Aucune toxicité n'a été observée pour les GNP sans MTX. L'utilisation d'une crème Locobase (10 % p/p d'or et 1,6 % p/p de MTX) sur un modèle de peau saine de souris C57BL/6 a montré une augmentation de l'absorption de MTX dans l'épiderme et le derme après 24 heures.

La synthèse des 3MPS-GNP a été réalisée par une procédure Brust-Schiffrin similaire à MidacoreTM. Brièvement, une solution aqueuse de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et un excès de 3MPS ont été agités vigoureusement avant l'ajout goutte à goutte d'un excès de NaBH_4 et l'incubation à température ambiante ou à + 4 °C pendant 2-3 heures sous atmosphère inerte. La purification a été réalisée par centrifugation. L'attachement du MTX a été effectué dans l'eau à température ambiante pendant 4 heures pour obtenir un ratio MTX/3MPS-GNP de 20 % p/p. La quantité liée a été mesurée indirectement par spectrophotométrie en utilisant le surnageant (fraction non liée). Une caractérisation limitée de dimensionnement a été effectuée (DLS et UV-Vis).

Fratoddi *et al.* ont ensuite étudié les MTX-3MPS-GNP dans la **formulation de Locobase** avec un **modèle murin de psoriasis induit par IMQ**¹⁰⁹. La notation clinique et les examens histopathologiques des lésions ont montré un effet significatif par rapport aux 3MPS-GNP, alors qu'aucune toxicité systémique n'a été mise en évidence. Le dos rasé des souris (C57BL/6) a reçu pendant six jours 50 mg d'Aldara[®] (crème IMQ à 5 %), suivi de MTX, MTX-3MPS-GNP ou 3MPS-GNP pendant un ou deux jours. La notation clinique basée sur l'érythème cutané, la desquamation et l'épaisseur de la peau ont montré une amélioration avec MTX-3MPS-GNP. L'hyperkératose, la parakératose et l'infiltration des lymphocytes CD3 et CD8 ont été réduites. Des images de TEM ont montré l'internalisation des NP tandis que le MTX dans les couches de la peau a été mesuré par spectrophotométrie. Les résultats prometteurs n'ont pas été confrontés à un traitement de référence et la période de traitement a été courte (deux jours maximum).

L'augmentation de la période de traitement, de la dose ou l'association avec d'autres médicaments anti-psoriasiques sont mentionnées comme des approches pour améliorer l'effet observé.

Les 3MPS-GNP avec ou sans MTX ont ensuite été caractérisées plus en détail pour en étudier la taille, l'agrégation et comprendre le mode de liaison entre le MTX et les GNP¹¹⁰. Les techniques d'analyse supplémentaires comprenaient ¹H NMR et TEM. La monodispersité et la taille ultrapetite (diamètre hydrodynamique de 5 nm) ont été confirmées pour les 3MPS-GNP. L'hypothèse de la nature électrostatique du lien entre le MTX et les NP a également été validée (amine du MTX avec sulfonate des ligands de la couronne). Le dimensionnement des MTX-3MPS-GNP a étonnamment montré une agrégation, avec la formation de clusters d'un diamètre hydrodynamique de **710 nm** et un fort déplacement du maximum de la bande plasmonique de surface.

Les 3MPS-GNP ont également été utilisées pour conjuguer des médicaments antitumoraux suivant le même principe¹¹¹. L'attachement a également provoqué l'agrégation des NP. La lyophilisation-remise en suspension a été étudiée et n'a eu aucun impact significatif sur la taille et l'agrégation des 3MPS-GNP.

Des **MTX-GNP ultrapetits** (taille du noyau **2,6 nm**) ont été synthétisés par Egusa *et al.* pour le traitement de la **leucémie myéloïde**, cancer non solide pour lequel l'effet EPR, et donc une grande taille des particules, n'est pas nécessaire¹¹². La libération du MTX des GNP est censée être basée sur l'échange de ligands avec le glutathion. Une solution aqueuse de GNP de 1 mM Au a été incubée avec du glutathion de 0,5 à 5 mM pour évaluer la libération du MTX et l'agrégation. L'agrégation au fil du temps de stockage et avec différents pH et milieux a également été étudiée. Les MTX-GNP étaient étonnamment stables, sauf à faible pH. Pour synthétiser les GNP, H₂AuCl₄·3H₂O et un excès de MTX dans le méthanol ont été agités vigoureusement avant l'addition goutte à goutte d'un excès de NaBH₄ et l'incubation dans des conditions glaciales pendant 90 minutes pour obtenir un ratio de ~ 25 % p/p MTX/GNP. Le modèle de leucémie myéloïde *in vivo* consistait en l'injection de cellules AML primaires (cellules THP-1 *in vitro*) à des souris immunodéficientes, suivies de traitements bihebdomadaires avec 0,25 mg/kg de MTX pendant 6 semaines. MTX-GNP a surpassé le MTX libre en ce qui concerne la diminution de la charge cellulaire leucémique dans la moelle osseuse et la rate ainsi que l'apparence et le comportement général des souris.

Tran *et al.* ont synthétisé des GNP allant de **3 nm à 20 nm** en utilisant le MTX à la fois comme ligand et agent réducteur¹¹³. Des conditions très alcalines (pH 12,5, NaOH) ont été utilisées pour synthétiser les GNP. Les **GNP les plus petites ont présenté l'effet cytotoxique le plus élevé** avec une différence significative par rapport au MTX libre avec les cellules de choriocarcinome (JAR).

Liu *et al.* ont publié une **GNP ultrapetite** (taille du noyau **2 nm**) fonctionnalisé avec un **PEG bifonctionnel thiol-amine** utilisé pour s'attacher au noyau par des liens S-Au, tandis que du FA était lié de manière **covalente** par amidation de ses acides carboxyliques¹¹⁴. La GNP a été conçue pour être aussi stable que possible avec les liaisons covalentes entre les blocs, l'utilisation de PEG (MW 200-400 g/mol) pour la furtivité et l'hydrophilie et un groupe bidenté (acide lipoïque) pour un ancrage fort au noyau. L'amidation entre l'amine du PEG et le FA pour obtenir un dérivé a été réalisée dans le DMSO avec EDC/NHS comme réactifs de couplage. Cette méthode, bien que connue pour produire 90 % de dérivé γ -COOH, n'est pas régiosélective. La purification du ligand FA-PEG a été effectuée par précipitation/extraction. La GNP a été synthétisée en réduisant $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en présence FA-PEG dans des conditions aqueuses très alcalines avec un excès de NaBH_4 et en agitant pendant la nuit à température ambiante. Les ratios $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ /Ligand et $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ / NaBH_4 pouvaient être aussi bas que 1:1 et 1:3 respectivement, sans impact significatif sur la taille. La GNP est restée stable pendant au moins 18 mois à 4 °C, sur une large plage de pH (7-11) et jusqu'à 50 °C. Le criblage de la longueur du PEG (jusqu'à 2 kDa) et de la fraction terminale (amine, méthoxyle ou carboxyle) a montré qu'elles avaient peu d'impact sur la taille des particules. Un large éventail analytique a été utilisé pour le dimensionnement (TEM, DLS, UV-Vis) et la caractérisation des ligands (LC-MS, ¹H NMR). Un panel de cellules cancéreuses exprimant FR à un niveau élevé (**MDA-MB-231 > MCF-7**), à faible niveau (**HCT-116**) et un témoin négatif (A549) a été utilisé. Aucune toxicité n'a été mise en évidence, et l'absorption a été augmentée avec les cellules surexprimant FR.

Yücel *et al.* ont utilisé des GNP avec une couronne de glutathion pour **lier de manière covalente** du FA et du MTX : MTX-FA-GNP (diamètre hydrodynamique **11 nm**)¹¹⁵. La synthèse de Brust-Schiffrin a été réalisée dans le méthanol avec du glutathion pour tirer parti de ses différents groupes fonctionnels (acide carboxylique, amine et thiol). Par la suite, EDC et NHS en solution aqueuse ont été utilisés pour lier le FA et le MTX (activation de 2 heures suivie d'une incubation pendant la nuit dans l'obscurité). Un rapport MTX/GNP de 25 % p/p a été obtenu et la NP a été lyophilisée.

La cytotoxicité a été évaluée avec des cellules FR positives, à savoir **U-87 MG** (glioblastome) et **HeLa** (cancer du col de l'utérus), en se concentrant sur les cellules cancéreuses non mammaires, contrairement à la plupart des publications. Les **cellules FR-négatives A549** (carcinome pulmonaire), **PC-3** (carcinome de la prostate) et HEK-293 (rein embryonnaire sain) ont été utilisées comme témoins négatifs. Les cellules FR-positives présentaient une augmentation significative de la toxicité avec MTX-FA-GNP par rapport au MTX libre, contrairement aux cellules FR-négatives. Le MTX libre était toxique pour HEK-293, tandis que le MTX-FA-GNP avait un effet négligeable. MTX-FA-GNP a donc été considéré comme ayant le potentiel d'améliorer l'efficacité thérapeutique, mais aussi de réduire les effets secondaires. La spécificité pour le récepteur a été démontrée par imagerie par fluorescence (GNP marquée à la rhodamine). Il a été constaté que la libération de MTX atteignait un maximum après 7 heures et dépendait du milieu de culture : libération de la plus élevée à la plus faible : DMEM (55 %) > PBS > RPMI 1640 > DMEM/F-12 (22 %). Une libération élevée pour un MTX lié de manière covalente est déroutante et pourrait s'expliquer par la présence de MTX non lié, la faible affinité du glutathion pour le noyau d'or ou le clivage de la liaison amide. Les résultats nécessitent des études supplémentaires puisque l'adsorption de protéines plasmatiques *in vivo* avec la formation d'une couronne protéique est un facteur clé pour le devenir des NP.

Dey *et al.* ont synthétisé un MTX-GNP de très grande taille (diamètre hydrodynamique **187 nm**, chargé négativement) avec une stratégie de liaison **covalente**¹¹⁶. Un dérivé de Méthotrexate a été attaché sur une GNP d'alginate-curcumine et l'activité antitumorale a été évaluée avec des cellules surexprimant FR (**MCF-7**). Une augmentation de la cytotoxicité et de l'absorption cellulaire a été observée. Le dérivé a été conçu avec une chaîne PEG pour réduire l'efflux cellulaire. Les groupes carboxyles du MTX ont été activés avec les réactifs de couplage EDC et NHS dans le PBS. Une quantité équimolaire du **PEG bis(3-aminopropyl)** a été ajoutée au mélange pour obtenir MTX-CO-NH-PEG-NH₂ sans sélectivité concernant les groupes carboxyles du MTX. Les groupes carboxyliques de l'alginate-curcumine-GNP ont été activés et attachés à MTX-CO-NH-PEG-NH₂ avec la procédure décrite ci-dessus dans un tampon carbonate-bicarbonate. Les réactions ont duré quelques heures à température ambiante dans l'obscurité et les purifications ont été effectuées par dialyse. La caractérisation a été réalisée par spectrophotométrie UV-Vis, ¹H NMR, DLS et TEM.

Durgadas *et al.* ont fonctionnalisé une GNP (diamètre hydrodynamique **19 nm**, chargée négativement) avec du MTX lié de manière **covalente** à un ligand PEG. EDC a été utilisé comme réactif de couplage pour lier le MTX à un **PEG bis(3-aminopropyl)** (1900 g/mol)¹¹⁷.

MTX a été dissous dans HCl 0,5 M et, après activation, le pH a été ajusté avec NaOH. Pour obtenir MTX-GNP, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et un excès de MTX-PEG ont été agités vigoureusement avant l'ajout d'un excès de NaBH_4 et l'incubation dans des conditions glaciales pendant 1 heure dans l'obscurité pour empêcher la dégradation et l'agrégation due à l'amine du PEG. La sonication a été utilisée pour disperser les ligands avant la purification. La caractérisation a été réalisée par spectrophotométrie UV-Vis, ^1H NMR, DLS et TEM. La libération du MTX a été évaluée à différents pH : 4,5, 7,4 et 10,5.

Ghorbani *et al.* ont utilisé un **PEG bifonctionnel** lié aux GNP (diamètre hydrodynamique **68 nm**) par un thiol et au MTX par une amine¹¹⁸. Le PEG a été utilisé pour augmenter la stabilité, la résistance à une concentration ionique élevée et le blindage (pour augmenter la demi-vie). La libération du MTX en fonction du pH a été criblée avec des conditions physiologiques (7,4-8, 37 °C), légèrement acides (5,3-7,2, 40 °C), ainsi que celles rencontrées dans les lysosomes (4,5-5,0) et les endosomes (5,0-6,5), afin d'imiter le tissu tumoral et les composants intracellulaires. Une cytotoxicité élevée a été mise en évidence avec **MCF-7**.

Le même groupe a utilisé des GNP fonctionnalisées avec du PEG (diamètre hydrodynamique **78 nm**), auxquelles ils ont ajouté du MTX et deux médicaments antitumoraux (Doxorubicine et 6-Mercaptopurine)¹¹⁹. Le mécanisme était basé sur le pH et la concentration de glutathion qui induisaient la libération des médicaments. La concentration de glutathion est en effet dix fois plus élevée dans ces cellules par rapport aux composants extracellulaires. Quatre lignées de cellules cancéreuses ont été testées pour l'absorption et la viabilité cellulaire. Les cellules ont été choisies en raison du degré d'expression élevé de FR à leur surface : **MDA-MB-231**, **MCF-7** et **HeLa**¹²⁰. A549 a été utilisé comme contrôle. L'expression de FR était corrélée à des absorptions cellulaires et des toxicités plus élevées.

Asadishad *et al.* ont synthétisé des **PEG-GNP** (taille du noyau **5-12 nm**) conjuguées avec du FA et de la Doxorubicine : Doxorubicine-FA-PEG-GNP¹²¹. La cytotoxicité des GNP avec les cellules **KB** (carcinome épithélial) était aussi élevée qu'avec la Doxorubicine libre mais moins importante avec les cellules saines (HFF). Les cellules FR-négatives **A549** présentaient une viabilité cellulaire plus élevée que KB lorsqu'elles étaient traitées par Doxorubicine-FA-GNP, indiquant que les GNP peuvent réduire les effets secondaires hors cible. Pour la synthèse, NaBH_4 a été ajouté à $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ avant l'ajout de ligands pour obtenir un noyau plasmonique. Le PEG homobifonctionnel (acide carboxylique) (1500 g/mol), le FA et la Doxorubicine ont été ajoutés séquentiellement.

Des GNP chargées d'albumine sérique bovine et de MTX ont montré une toxicité et une absorption plus élevées que le MTX libre avec les cellules cancéreuses du sein **MCF-7**¹²².

Des GNP (13-52 nm) fonctionnalisées avec des polyphénols (extraits de la plante *Cornus mas*) ont montré une activité anti-psoriasique avec une amélioration clinique et une diminution des taux de cytokines (TNF- α et IL-12)¹²³.

Des GNP conjuguées avec de petits ARN interférents ont été utilisées avec le modèle murin de psoriasis induit par IMQ (6 jours de traitement)¹²⁴. Les ARN ont été liés aux GNP (12 nm de diamètre hydrodynamique) par échange de ligands sous agitation, puis les étapes suivantes ont été effectuées : sonication, augmentation de la concentration de tampon (NaCl 0,1 à 0,5 M) et ajout de PEG. Le modèle murin IMQ sur la peau du dos et des tests *in vitro* ont démontré une efficacité antiproliférative sans toxicité.

Des MTX-GNP ont été synthétisés par croissance hydrothermale en utilisant de l'acide éthylènediaminetétraméthylène phosphonique pour transformer des nanochaînes en nanosphères avec des groupes phosphoniques chargés négativement¹²⁵.

Des MTX-NP d'argent ont été obtenus par échange avec du citrate et la cytotoxicité a été mesurée avec des cellules **HCT-116** et A549, l'effet étant plus significatif pour les premières¹²⁶.

4.2. Discussion et Comparaison avec MTC-100244 MTX-GNP

L'examen de la littérature montre un intérêt large et contemporain principalement axé sur **l'oncologie** avec des tests *in vitro* et parfois *in vivo* utilisant des cellules surexprimant le Folate Receptor. Il convient de noter que des NP contenant de l'acide folique au lieu du MTX ont été incluses dans cette revue en raison de leur proximité chimique et de leur similitude en termes d'applications. Le raisonnement derrière l'utilisation de MTX-GNP et l'utilisation potentielle de MTC-100244 MTX-GNP pour le traitement des cancers est décrit dans le chapitre *MTC-100244 MTX-GNP et Cancer*.

Comparé aux autres MTX-NP, MTC-100244 MTX-GNP est **plus petit** et a un **ratio MTX à or plus élevé**. La taille de la plupart des NP publiées est d'une dizaine à plusieurs centaines de nanomètres, tandis que MTC-100244 MTX-GNP a une taille de noyau de 2 nm et une taille totale inférieure à 10 nm.

Le ratio MTX/Au dans la littérature, lorsqu'il est mentionné, varie entre 10 et 25 % p/p, tandis que pour MTC-100244 MTX-GNP, il est de 30 à 40 % p/p (rapport molaire de 10 %). Ceci est possible grâce au grand rapport surface/volume des GNP ultrapetites.

L'autre différence principale est le **mode de liaison** du MTX aux NP. Dans la majorité des publications, le MTX est attaché aux NP par des liaisons non covalentes, ce qui entraîne une **stabilité** moindre et une libération rapide du MTX. Alternativement, le MTX est lié de manière covalente sans dérivatisation ou après une dérivatisation non sélective. Une **dérivatisation sélective**, comme c'est le cas pour MTC-100244 MTX-GNP, permet une **altération minimale du pharmacophore** et une bonne **présentation** du MTX sur la partie extérieure des NP favorisant les interactions avec ses récepteurs.

Enfin, MTC-100244 MTX-GNP est spécialement conçu avec une couronne de carbohydrates et de PEG négatif court qui assurent une **hydrosolubilité** et une stabilité importantes tout en limitant la bioaccumulation. L'excrétion et l'**innocuité** ont été démontrées avec d'autres GNP Midacore™ jusqu'aux stades cliniques^{83,84,85,86}.

GNP MIDACORE™ : SYNTHÈSE ET CARACTERISATION

La plateforme Midacore™ repose sur plusieurs méthodes de synthèse et un éventail de techniques analytiques pour sa caractérisation. La synthèse de Brust-Schiffrin permet d'obtenir des particules sphériques ultrapetites fonctionnalisées. Une fois les particules générées par la méthode de Brust-Schiffrin, des synthèses peuvent être effectuées en utilisant les ligands de la couronne comme point d'ancrage : post-fonctionnalisation ou avec des ligands capables de se lier directement au noyau : échange de ligands. Ces trois méthodes sont exposées dans ce chapitre qui contient aussi une partie décrivant les techniques de caractérisation et les différents paramètres étudiés tels que la taille des particules ou la composition de la couronne.

1. Synthèse de Brust-Schiffrin Modifiée

La synthèse de nanoparticules d'or ultrapetites à l'aide de Borohydrure de Sodium (NaBH_4), un puissant agent réducteur, est également connue sous le nom de **synthèse de Brust-Schiffrin**⁴⁰. Depuis sa publication en 1994, la méthode a été largement utilisée et modifiée¹²⁷, néanmoins, les principes de base restent les mêmes³⁷.

Des ligands thiols ou disulfures en présence d'un sel d'or, l'Acide Tétrachloroaurique (HAuCl_4), sont rapidement réduits par NaBH_4 en excès dans une étape appelée **nucléation**. Au fur et à mesure que l'or se réduit pour former le noyau des particules, les ligands créent une couronne, limitant la croissance du noyau par la formation de liaisons soufre-or, dans une étape connue sous le nom de **passivation**¹²⁸.

Les principaux changements apportés à la synthèse originale de Brust-Schiffrin sont la transposition en une seule phase et l'utilisation de solvants aqueux. Notamment, Hussain *et al.* ont modifié la recette en utilisant de l'eau comme solvant¹²⁹ et Penadés *et al.* ont utilisé des carbohydrates pour créer des GNP hydrosolubles¹³⁰.

Les GNP sont des produits complexes, et de nombreux facteurs peuvent influencer leurs caractéristiques physicochimiques. La qualité requise, la reproductibilité et la transposition d'échelle ne peuvent donc être obtenues que par un processus de fabrication entièrement contrôlé, comprenant la synthèse, la purification et une gamme complète de techniques de caractérisation⁴³.

Pour réaliser une synthèse optimale à l'échelle non industrielle, des **réacteurs de paille à l'échelle pilote**, tels que l'Atlas de Syrris, doivent être utilisés pour contrôler les paramètres de la réaction (pH, température, agitation, etc.). La purification peut être effectuée par diverses techniques, telles que la précipitation, l'extraction, la chromatographie, la dialyse et l'ultrafiltration. **L'ultrafiltration**, la plus courante, est une technique de séparation basée sur la taille utilisant une membrane avec un seuil de poids moléculaire (MWCO)¹³¹. Une pression est appliquée entre la solution brute et une membrane, ce qui fait que les contaminants (par exemple, l'excès de ligands, les sels, les sous-produits), plus petits que le seuil de poids moléculaire, traversent la membrane pendant que les GNP sont retenues.

L'ultrafiltration peut prendre diverses formes. Alors que l'Ultrafiltration Centrifuge (filtration sans issue) est la référence pour la R&D (par exemple, l'utilisation de filtres Amicon Ultra de Merck), pour les stades cliniques, l'automatisation et le haut débit à l'aide de systèmes de Filtration à Flux Tangentiel (TFF), tels que le KR2i de Repligen sont requis¹³² (Figure 15).

Après la synthèse de Brust-Schiffrin et la purification, deux méthodes peuvent être utilisées pour ajouter ou modifier les ligands dans la couronne : la post-fonctionnalisation ou l'échange de ligands (Figure 14).

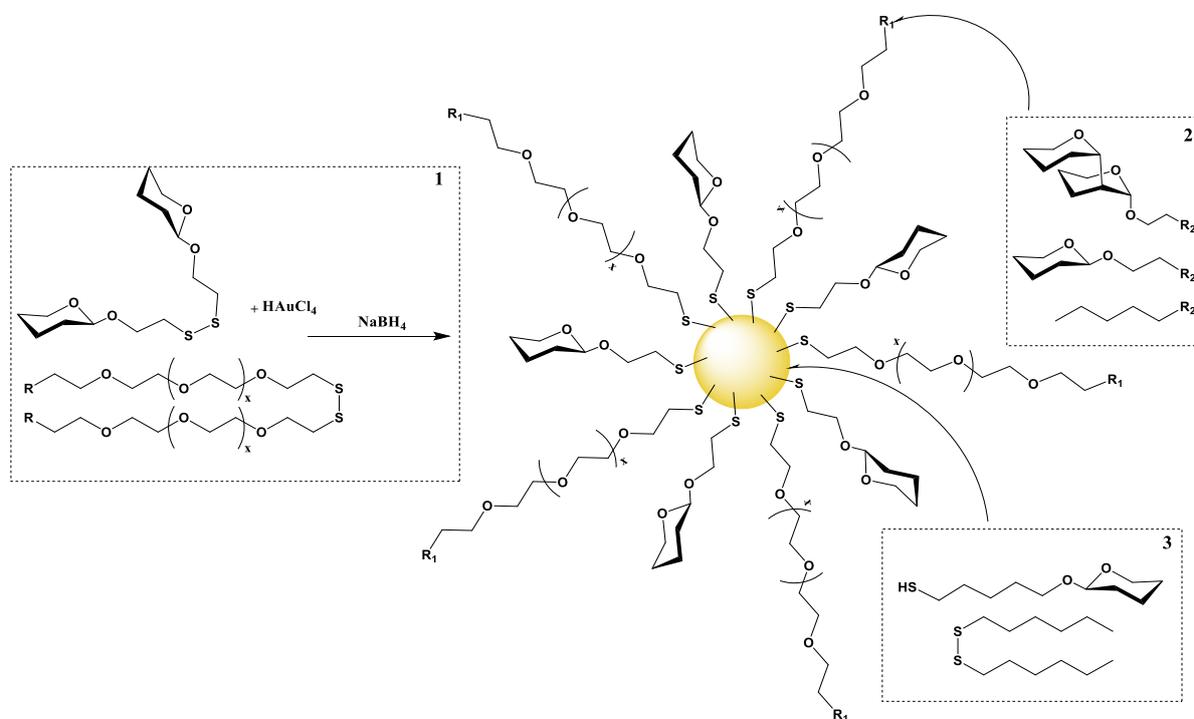


Figure 14 : Différentes méthodes de fonctionnalisation « covalente » des GNP ultrapetites. (1) Synthèse de Brust-Schiffrin modifiée. (2) Post-fonctionnalisation. (3) Échange de ligands.

2. Post-Fonctionnalisation

La post-fonctionnalisation consiste en l'utilisation des ligands de la couronne des GNP comme points d'ancrage pour effectuer des conjugaisons par des voies synthétiques organiques communes avec des molécules portant des groupes fonctionnels complémentaires : la **chimie bioorthogonale**. D'un point de vue synthétique, la post-fonctionnalisation possède l'avantage de permettre un contrôle direct du rapport GNP/ligand à l'aide de simples variations **stœchiométriques**. De plus, les points de fixation sont divers et se trouvent généralement à l'**extrémité externe** des GNP, ce qui facilite la présentation (bonne orientation et séparation du noyau). Différentes molécules peuvent être liées par cette technique, soit en parallèle (addition simultanée), soit étape par étape (addition successive avec purification intermédiaire) pour générer une surface mixte⁷⁷.

L'autre avantage principal des réactions post-fonctionnalisation est la purification. Une fois la réaction considérée comme terminée, la purification est facilement effectuée par ultrafiltration ou dialyse.

Les réactions de bioconjugaison ont été largement optimisées et documentées, conduisant à la création d'une bibliothèque de groupes fonctionnels compatibles avec leurs réactifs d'activation et catalyseurs¹³³. Ces principes ont ensuite été amplement appliqués aux nanoparticules et adaptés aux GNP en ajustant les paramètres des réactions (par exemple les solvants, le pH, la température, les concentrations)¹³⁴.

La **condensation d'amide** est le couplage d'un acide carboxylique à une amine. Les réactions peuvent être réalisées à température ambiante (RT) et sont généralement terminées après quelques heures d'incubation en milieu aqueux ou dans un solvant organique, tel que le DMSO. L'amide a l'avantage d'être très stable.

La condensation d'amide a été largement utilisée pour fonctionnaliser les plateformes multivalentes avec des médicaments^{94,135}, des anticorps¹³⁶, des carbohydrates^{65,137} ou des peptides¹³⁸. Midatech Pharma a, par exemple, utilisé cette stratégie avec succès avec des GNP de 2 nm pour coupler le peptide SIKVAV (pour le ciblage des tumeurs)⁹².

Cette approche nécessite des réactifs d'activation. Parmi les réactifs disponibles dans le commerce¹³⁹, 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et N-Hydroxysuccinimide (NHS) ou N-Hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) sont les plus utilisés et réagissent avec l'acide carboxylique.

Tout d'abord, l'EDC forme un intermédiaire O-acylisourée qui, en se couplant avec le NHS ou le sulfo-NHS, donne un ester (activé) réactif. L'ester activé réagit ensuite avec une amine pour former un amide. Lorsqu'elle est réalisée en milieu aqueux, l'activation de l'acide carboxylique est plus efficace à un pH légèrement acide (5-6), tandis que le couplage avec l'amine l'est à pH neutre (7-8)¹⁴⁰. Un pH alcalin élevé entraîne une baisse très significative de la demi-vie des esters réactifs de quelques heures à quelques minutes. Le sulfo-NHS a l'avantage d'être plus soluble dans l'eau et résistant à l'hydrolyse que le NHS, mais a un encombrement stérique plus élevé.

Pour les GNP possédant des acides carboxyliques, une centrifugation peut être effectuée avant le couplage amide afin d'éliminer l'excès de réactifs d'activation¹³⁸. Dans le cas d'une amino-GNP, la biomolécule qui porte la fraction acide carboxylique doit être incubée avec les réactifs d'activation avant d'être ajoutée aux GNP¹⁴¹. La coprésence de réactifs d'activation et d'amines sur les GNP peut entraîner des réactions secondaires, favorisant la réticulation des amino-GNP¹⁴². Pour cette raison, les timings et les équivalents doivent être choisis avec soin.

3. Échange de Ligands

L'échange de ligands, également connu sous le nom de **Ligand Place Exchange (LPE)**, est l'un des principaux mécanismes pour attacher de manière covalente des ligands à la couronne des GNP^{44,143}. Il a été décrit pour la première fois par Murray *et al.* en 1996¹⁴⁴ puis dans des publications postérieures du même groupe^{78,145}.

Le LPE implique généralement des molécules avec un groupe thiol ou disulfure qui se lient efficacement et fortement au noyau d'or⁷⁸. D'autres fractions sont capables de se lier au noyau d'or, par exemple, les amines, les carboxyles et les phosphines, mais avec une force inférieure. D'autre part, les molécules avec plusieurs thiols, appelées bi ou multidentés, peuvent se lier de manière plus forte. Le LPE implique qu'un ligand présent sur la couronne soit **substitué** par un autre, mais que le mécanisme fait également référence au **remblayage**, au cours duquel un ligand entrant remplit un site vide sur le noyau d'or^{69,146,147}. Le remblayage augmente donc la densité de ligand sur les GNP et peut générer des couronnes très compactes. Ces deux mécanismes coexistent et la prédominance de l'un sur l'autre dépend de divers paramètres, tels que la nature physicochimique des ligands (encombrement stérique ou charge) et la taille ou la forme du noyau¹⁴⁸.

Le LPE, bien qu'il s'agisse d'un processus simple et direct, nécessite un contrôle de la réaction. Les paramètres doivent être réglés et surveillés pour obtenir un produit correspondant aux spécifications souhaitées de manière reproductible. La vitesse d'agitation, le temps d'incubation, la vitesse d'addition des réactifs, les solvants et les tampons, les concentrations, la température et le pH sont parmi les facteurs qui doivent être définis et documentés.

Le choix du solvant est déterminé par la solubilité des ligands et des GNP. Les GNP et les ligands hydrophiles sont généralement dissous dans l'eau, des tampons (par exemple le PBS) ou des solvants organiques polaires, tels que le DMSO¹⁴⁹ ou des alcools (par exemple le méthanol), purs ou sous forme de mélanges aqueux¹⁵⁰.

Progressivement, une position d'équilibre qui dépend de la nature des ligands est atteinte. Dix-huit à soixante-douze heures sont des temps d'incubation courants pour le LPE^{150,151}. Fait intéressant, certaines publications mentionnent le vieillissement des particules comme un facteur influençant le LPE¹⁵². Le temps écoulé entre la synthèse des GNP et l'échange de ligands doit donc être surveillé et aussi similaire que possible entre les lots.

Des températures plus élevées (50 à 90 °C) ont amélioré le profil cinétique du LPE, mais ce paramètre doit être modulé avec précaution pour éviter la dégradation des ligands¹⁵².

Les **thiols** (réaction S_N2) et les **disulfures** (réaction S_N1) peuvent être utilisés pour effectuer le LPE, bien que ces derniers soient considérablement moins étudiés. En effet, les disulfures sont beaucoup moins réactifs que les thiols, ce qui entraîne un échange limité. Un avantage des disulfures dans le cas de l'addition de deux ligands en tant qu'hétérodisulfures par LPE est la génération d'un mélange équimolaire à la surface des particules, tandis que le ratio d'addition de différentes espèces de thiols pour obtenir une proportion égale doit être déterminé expérimentalement. De nombreux thiols ont une faible stabilité et doivent être préparés extemporanément. Il convient de noter que les NP sont capables d'échanger des ligands au fil du temps¹⁴⁸.

Si les thiols ne peuvent pas être obtenus pour des raisons d'approvisionnement ou de stabilité, les disulfures peuvent être réduits extemporanément. **Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)**¹⁵³, un réducteur de liaison disulfure, peut être utilisé dans un rapport équimolaire pour obtenir des thiols.

Groysbeck *et al.* ont utilisé le TCEP avec les mAb Cetuximab et le Bevacizumab pour rompre leurs liaisons disulfures et les greffer par leurs fonctions thiols sur une GNP ultrapetite dans un rapport de 1:1¹⁵⁴. Une solution de TCEP neutre, pH 7.0¹⁵⁵ a été incubée à 37 °C pendant 90 minutes avec les anticorps dans le PBS avant d'être ajoutée aux GNP dans un tampon neutre (HEPES), suivie d'une incubation pendant la nuit. L'ensemble mAb-GNP a conservé une activité *in vitro* avec la liaison au récepteur EGFR et l'absorption par les cellules de glioblastome U-87 MG, ouvrant des perspectives curatives, telles que la radiosensibilisation ciblée.

Une procédure similaire a été utilisée par Levi-Kalisman *et al.* pour conjuguer des protéines et de l'ADN sur une GNP ultrapetite¹⁵⁶.

Le TCEP a été utilisé par Midatech pour lier un dérivé 1,2-dithiolane de la Maytansine (super DM1) à une GNP Midacore^{TM96}. Le composé bidenté, qui offre une liaison très forte au noyau, nécessitait l'ouverture de l'anneau 1,2-dithiolane (réduction du disulfure cyclique). Cela a été obtenu après 2 heures d'incubation avec du TCEP dans un mélange d'eau et de DMSO. Après la conjugaison de 5 molécules de super DM1 aux GNP, la cytotoxicité a été mesurée avec les lignées cellulaires U-87 MG (glioblastome) et Hep3B (carcinome hépatocellulaire) et la tolérance a été évaluée avec un modèle murin. La super-DM1-GNP a montré une tolérance significativement supérieure à celle de la DM1-GNP portant un dérivé thiol de la Maytansine. De même, la conjugaison à la GNP a amélioré la tolérance par rapport à l'API libre. Il convient de noter que le super DM1 a démontré une cytotoxicité étonnamment élevée.

Liu *et* Lu ont utilisé le TCEP pour attacher de l'ADN portant des thiols sur des GNP¹⁵⁷. Dans un protocole très détaillé, ils ont optimisé la concentration et la quantité de TCEP (si un excès important de TCEP est nécessaire, l'utilisation d'une colonne de dessalement Sep-Pak est conseillée), les tampons pour la réaction (acétate pH 5,2), la température (ambiante) et les temps d'incubation : 1 heure pour réduire le disulfure et pendant la nuit pour lier l'ADN aux GNP. Le protocole insiste également sur l'importance du nettoyage à *l'aqua regia* avant la synthèse des GNP et de l'hydroxyde de sodium concentré avant le LPE pour assurer la qualité et la reproductibilité.

Le TCEP doit néanmoins être **utilisé avec précaution** car il peut également libérer les ligands de la couronne et digérer du noyau d'or lorsqu'il est utilisé en trop grand excès⁸⁷.

Les ligands utilisés pour le LPE ne doivent pas être trop hydrophobes ou avoir tendance à flocculer, afin d'éviter l'agrégation des particules lors de l'attachement. Les groupes chargés auront un impact sur le LPE et la charge nette globale des NP. Par exemple, un ammonium chargé positivement à proximité d'un thiol accélère le LPE. Les ligands de MW élevé ont un impact positif sur la prévention de l'agrégation, mais sont moins susceptibles d'être échangés que leurs homologues plus petits. Un autre paramètre qui peut avoir un impact sur les NP est la formation de liaisons hydrogène entre les ligands¹⁵⁸.

Le pH a un impact sur le LPE, car il affecte des groupes tels que les carboxyles, les amines et les thiols. L'agrégation réversible due aux protonations des acides carboxyliques peut être évitée en utilisant le tampon ou en ajustant le pH avec un acide ou une base en fonction du pKa¹⁵⁸.

Le *digestive ripening*, aussi appelé *size focusing*, un phénomène qui peut se produire en présence d'un excès de ligands thiols, est connu pour réduire la distribution de taille en convertissant les nanoparticules polydispersées en populations presque monodispersées (survie des clusters les plus robustes). Le mécanisme impliquerait la digestion des plus grosses particules, la dissolution des plus petites et la redéposition de clusters sur les particules de taille moyenne jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint^{159,160}.

4. Caractérisation des Nanoparticules d'Or

La caractérisation des GNP nécessite un large éventail de techniques analytiques^{161,162,163,164}. Des lignes directrices pour le développement clinique de la nanomédecine ont été élaborées par le Nanotechnology Characterization Laboratory, une branche du National Institutes of Health¹⁶⁵.

Des techniques telles que la microscopie électronique en transmission et la spectrophotométrie ultraviolet-visible informent sur la taille et la forme du noyau, tandis que la diffusion dynamique de la lumière et la chromatographie d'exclusion de taille sont utilisées pour caractériser la taille totale des particules.

En ce qui concerne la couronne, des techniques telles que la chromatographie liquide en phase inverse, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire sont employées pour identifier et quantifier les ligands. Les analyses élémentaires permettent de déterminer la composition atomique, essentielle pour mesurer les concentrations et les ratios.

Le reste des techniques se compose de l'aspect visuel (la couleur d'une solution de GNP dépend de la taille du noyau), du pH et de la détermination de la charge superficielle, connue sous le nom de potentiel zêta.

Pour chaque technique, des paramètres tels que la sensibilité, la limite de détection ou la versatilité doivent être connus. Les informations qu'elles apportent individuellement doivent être comparées pour une interprétation appropriée.

La spectroscopie par **Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (^1H NMR)** permet l'identification et la quantification relative des ligands de la couronne et de leurs impuretés¹⁶⁶. Elle a l'avantage de pouvoir détecter toutes les espèces organiques avec des atomes d'hydrogène. L'intégration de l'aire de pics bien résolus correspondant aux ligands permet de déterminer les ratios.

La **Chromatographie Liquide (LC)** est un outil analytique puissant pour caractériser à la fois les GNP entières mais aussi les ligands de la couronne après la digestion des particules et leur libération. La séparation basée sur la polarité est généralement effectuée par **Chromatographie Liquide en Phase Inverse (RPLC)**⁹⁵, tandis que la séparation basée sur la taille est accomplie par **Chromatographie d'Exclusion de Taille (SEC)**¹⁶⁷. Les détecteurs UV-Vis sont les plus courants. La LC peut être utilisée en combinaison avec la **Spectrométrie de Masse (LC-MS)**.

Les **techniques d'analyse élémentaire ICP-AES** (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry) et **ICP-MS** (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) sont utilisées pour mesurer la composition atomique et la concentration des échantillons. En utilisant le rapport soufre/or, la densité de ligands peut être déterminée. En effet, les ligands possèdent généralement un atome de soufre en raison leur fonction thiol^{168,169}.

La **spectrophotométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)** est utilisée pour obtenir des informations sur la taille, la forme, la distribution et l'agglomération des GNP, en étudiant l'intensité de la bande plasmonique de surface et son maximum (à 520 nm, pour les GNP sphériques)¹⁷⁰. L'UV-Vis est une technique analytique très sensible qui peut détecter des différences minimales (variations d'intensité ou des maximums locaux et déplacements du spectre) entre les lots et des changements au fil du temps ou après un cycle de lyophilisation et de remise en suspension¹⁵⁸.

La **Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)** est largement utilisée pour obtenir le diamètre et la distribution hydrodynamique des particules, ainsi que des informations sur la polydispersité¹⁷¹.

La **Microscopie Électronique en Transmission (TEM)** détermine la taille, la forme, la distribution et l'agglomération des noyaux d'or des particules. Il ne s'agit pas d'une méthode spectroscopique. On peut donc visualiser la présence de GNP par détection directe³⁴.

Le **Potentiel Zêta (ZP)** mesure la charge superficielle des particules et est une valeur prédictive de la stabilité de la solution.

Le **pH** dépend des ligands et varie en fonction de la concentration.

Les principales caractéristiques des GNP et les techniques d'analyse utilisées pour les mesurer sont présentées dans le Tableau 1 et la Figure 16.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des GNP et techniques d'analyse correspondantes^{2,7,8}.

Paramètre étudié	Technique Analytique
Taille, forme, distribution, agglomération	TEM, DLS, SEC
Détection (image du noyau d'or)	TEM
Composition élémentaire, concentration	ICP-AES, ICP-MS
Composition de la couronne, densité des ligands, arrangement	ICP-MS, ICP-AES, NMR (¹ H NMR), pH, RPLC, MS
Charge superficielle	ZP

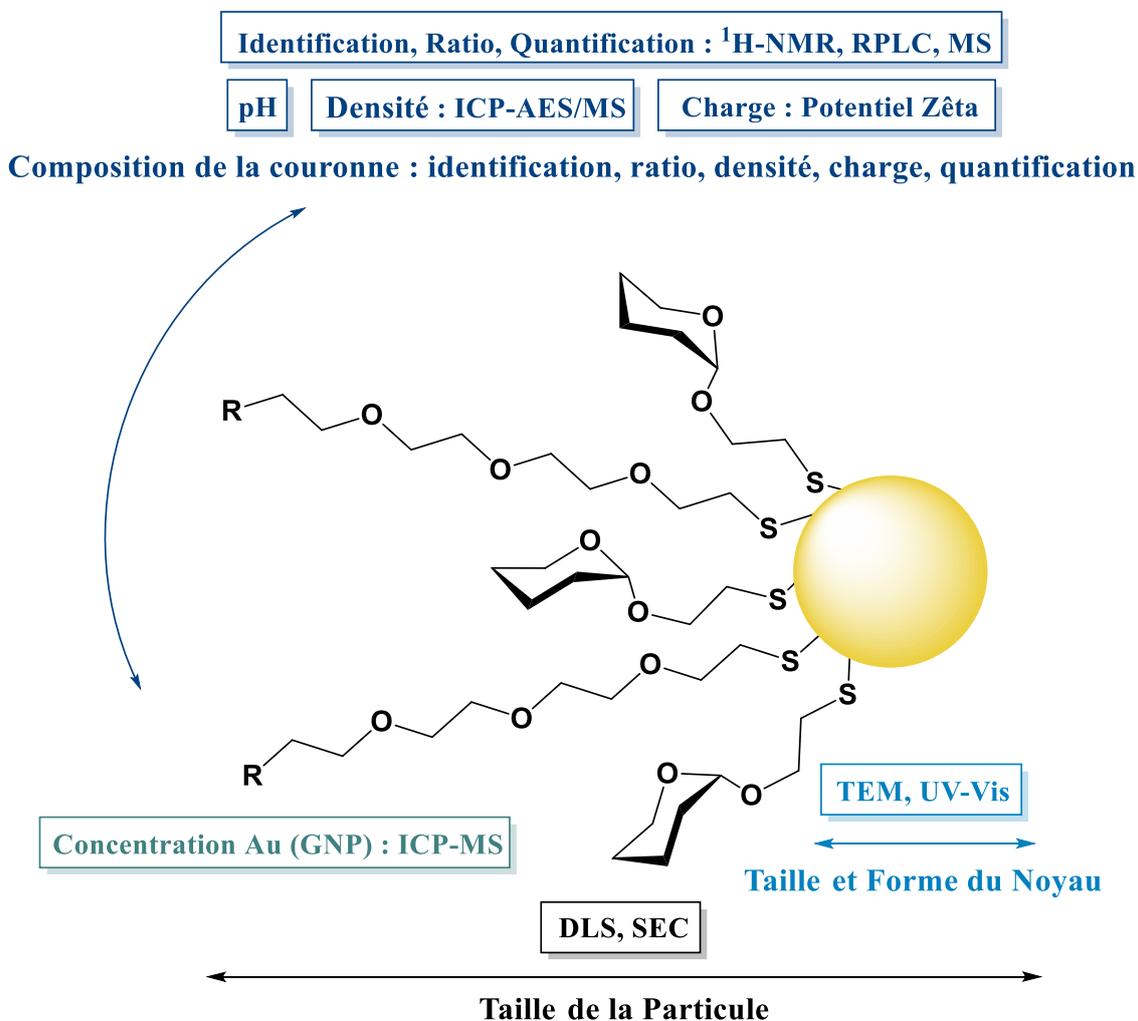


Figure 16 : Paramètres critiques des GNP : taille et forme du noyau, taille de la particule et composition de la couronne avec les techniques analytiques respectives utilisées pour la caractérisation.

MTC-100244 MTX-GNP : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION

Ce chapitre se compose du travail expérimental de chimie effectué pour le développement pharmaceutique de MTC-100244 MTX-GNP. La synthèse de MTC-100244 MTX-GNP est modifiée de manière à augmenter significativement le rendement d'attachement du Méthotrexate en remplaçant l'étape de post-fonctionnalisation (attachement aux ligands PEG de la couronne) par un échange de ligands (ancrage directement sur le noyau). Pour cela, un dérivé soufré de Méthotrexate est synthétisé puis utilisé pour obtenir un échange de ligands optimisé répondant aux critères de qualité et de rendement fixés. Ceux-ci sont évalués en utilisant un éventail analytique mis en place pour MTC-100244 MTX-GNP.

1. Introduction et Objectifs

L'objectif est d'obtenir MTC-100244 MTX-GNP en utilisant la **stratégie d'échange de ligands (LPE) au lieu de la post-fonctionnalisation** tout en conservant le même profil de qualité cible du produit (QTPP) et donc les mêmes attributs de qualité critiques (CQA). MTC-100244 MTX-GNP obtenu par post-fonctionnalisation sera désigné comme Methotrexate Gold Nanoparticles de Première Génération (**1^{ère}Ge MTX-GNP**) et par LPE comme Methotrexate Gold Nanoparticles de Deuxième Génération (**2^{ème}Ge MTX-GNP**).

La 2^{ème}Ge MTX-GNP devra avoir des propriétés physicochimiques similaires à la 1^{ère}Ge MTX-GNP, concernant la taille, la forme et la distribution du noyau et de la particule entière. La couronne devra être composée de ligands avec une densité et un ratio similaires. La quantité de Méthotrexate définie par un rapport MTX/Au de 30 % p/p pour la 1^{ère}Ge MTX-GNP devra être égale ou supérieure. La pureté et stabilité devront être équivalentes ou supérieures. Les particules devront, par ailleurs, être parfaitement hydrosolubles.

Le maintien des attributs de qualité critiques de la 2^{ème}Ge MTX-GNP garantiront des performances biologiques d'innocuité et d'efficacité identiques avec une pharmacocinétique (par exemple la pénétration cutanée) et une biodistribution (ciblage) comparables¹⁷².

Par rapport à la post-fonctionnalisation, l'échange de ligands présente plusieurs avantages.

L'échange de ligands est **spécifique**, car il implique des thiols et des disulfures qui ne peuvent se lier qu'au noyau d'or. La réticulation entre les nombreux groupes fonctionnels du MTX (amine, carboxyle, acyle ou ptéridine) serait donc évitée¹²⁵. Cela limite la probabilité de formation d'impuretés par agrégation de particules et l'altération des pharmacophores, par exemple, la formation d'amides indésirables ou la réticulation entre les amines qui a lieu sur des surfaces denses^{44,142}.

L'échange de ligands est aussi **plus simple**. Il n'implique pas de réactifs de couplage (comme EDC et NHS pour la post-fonctionnalisation par amidation) ou de catalyseurs, ce qui réduit le risque de produits secondaires ou résiduels (EDC est modérément toxique et peut causer une irritation¹⁷³). Contrairement au couplage amide, l'échange de ligands ne nécessite pas de contrôle très précis du pH et n'inclut pas de timings stricts en raison par exemple de l'hydrolyse des esters réactifs de NHS.

La post-fonctionnalisation nécessite un excès de ligands et se caractérise donc par **de faibles rendements**. La synthèse de la 1^{ère}Ge MTX-GNP par post-fonctionnalisation a un rendement inférieur à 20 % qui est incompatible avec le développement d'un produit pharmaceutique d'un point de vue économique et environnemental. L'objectif par l'échange de ligands avec la 2^{ème}Ge MTX-GNP est un rendement supérieur 80 %.

La **première étape** est la synthèse **d'un dérivé thiol ou disulfure de Méthotrexate, MTX-SH ou (MTX-S)₂**, respectivement, pour effectuer des réactions d'échange de ligands. La structure finale du ligand sur la GNP doit être la même pour les deux générations. Pour cette raison, une molécule correspondant à la condensation du **dérivé amine de Méthotrexate MTX-NH₂** et du PEG(8)COOH (de la couronne) qui se lient lors de la post-fonctionnalisation doit être synthétisée. MTX-SH doit être un dérivé γ -COOH du Méthotrexate avec la chaîne latérale suivante : (O-CH₂-CH₂)₃-NH-CO-(O-CH₂-CH₂)₈-SH (ou le disulfure).

La **deuxième étape** est le développement d'un **échange de ligands transposable et reproductible** utilisant MTX-SH ou (MTX-S)₂. La nouvelle méthode devra être optimisée pour attacher une quantité identique ou supérieure de MTX tout en maintenant le reste des caractéristiques de la particule identiques. De plus, l'échange de ligands devra être **plus efficace**, c'est-à-dire sans excès de MTX. Le paramètre clé est la quantité de MTX sur les GNP qui est mesurée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

La taille et l'agrégation des GNP seront aussi surveillées à l'aide de spectrophotométrie UV-Vis, TEM, DLS, RPLC et SEC. Le ratio des ligands dans la couronne sera déterminé par ^1H NMR.

2. Dérivés de Méthotrexate

2.1. Introduction

2.1.1. Historique du Méthotrexate

Le Méthotrexate (MTX), également appelé Améthoptérine, (2S)-2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl-methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid) est un médicament puissant utilisé pour traiter des cancers et des maladies auto-immunes, à savoir la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis. Il a été synthétisé pour la première fois par Seeger *et al.* en 1949¹⁷⁴. Depuis lors, la synthèse a été améliorée pour augmenter le rendement, la pureté et la transposition à grande échelle. De nombreux analogues ont également été conçus¹⁷⁵.

La biodisponibilité orale du MTX est de 85 % et la demi-vie est de 7 heures après administration orale, sous-cutanée ou intramusculaire. Il est principalement éliminé, inchangé, dans l'urine²³.

MTX est un **antimétabolite dérivé de l'acide folique (FA)**. Les deux molécules partagent une structure de base commune composée de trois sous-unités : un cycle ptéridine, un acide para-aminobenzoïque (PABA) et un acide glutamique. Le centre chiral de l'acide glutamique a une configuration L (Figure 17). MTX possède deux amines primaires sur le cycle ptéridine et deux acides carboxyliques dans l'acide glutamique, un proximal, ou α , et un autre terminal, ou γ ^{175,176}. Le MW du MTX est 454,45 g/mol. Les différences chimiques entre le MTX et le FA sont la substitution d'un groupe hydroxyle par une amine sur le cycle ptéridine et une N-méthylation dans la région PABA¹⁷⁶.

Le MTX peut être couplé à des macromolécules pour améliorer ses propriétés physicochimiques (augmentation de la solubilité dans l'eau), sa pharmacocinétique (demi-vie plus longue, libération prolongée) ou sa biodistribution (ciblage passif ou actif). Ces modifications visent à améliorer les performances de la molécule en abaissant la dose minimale efficace, en élargissant l'index thérapeutique, en diminuant les effets hors cible ou en réduisant la résistance cellulaire¹⁷⁶.

Par conséquent, la conjugaison avec des nanoparticules d'or a été investiguée par Midatech Pharma pour améliorer la très faible pénétration cutanée du MTX lorsqu'il est appliqué sur la peau¹².

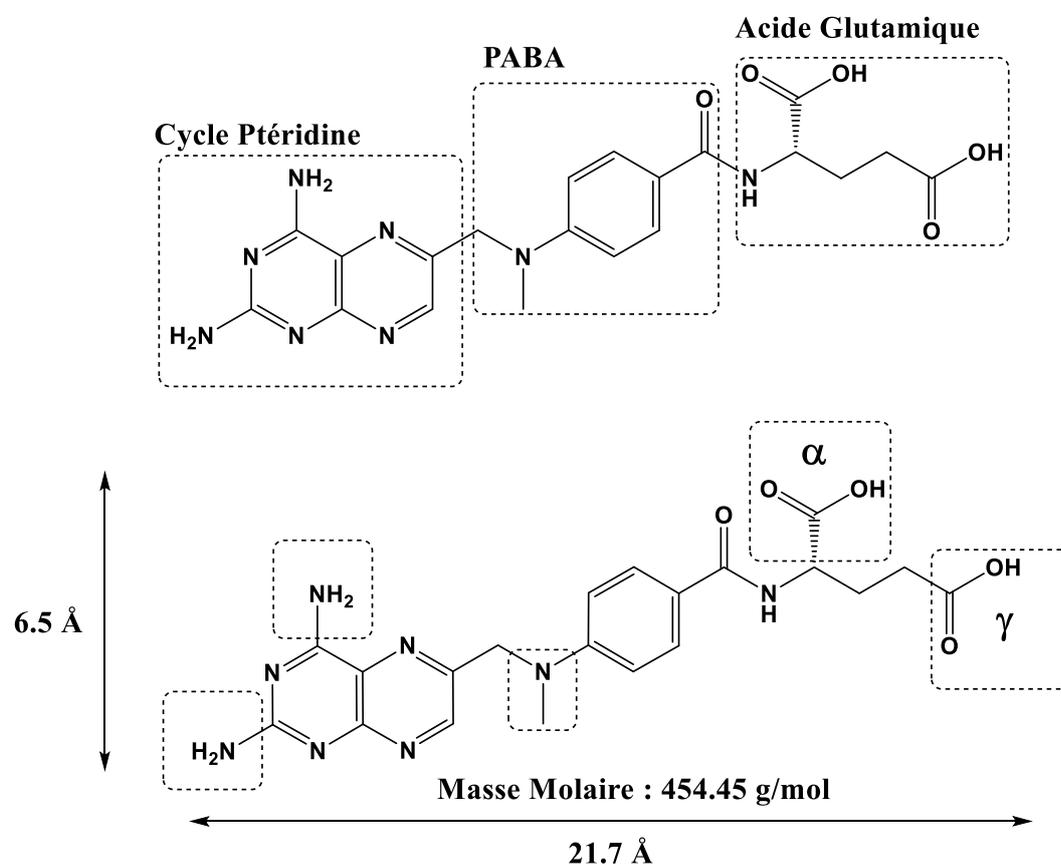


Figure 17 : Structure du Méthotrexate. (Haut) Différentes sous-unités : cycle ptéridine, acide para-aminobenzoïque (PABA) et acide glutamique. (Bas) Fractions amine et acide carboxylique (α -COOH et γ -COOH).

2.1.2. Dérivatisation du Méthotrexate

Le MTX sur MTC-100244 MTX-GNP est un **dérivé lié de manière covalente au noyau**^{102,103}. Cette approche est fondamentalement différente par rapport aux méthodes décrites dans la littérature, qui reposent sur la liaison sans modification du MTX au noyau d'or ou aux ligands de la couronne à travers ses fractions carboxyles ou amines^{19,104}.

Les dérivés d'API offrent plusieurs avantages, mais ils doivent être conçus avec soin pour préserver les propriétés physicochimiques et pharmacologiques de la molécule originelle. La dérivatisation d'un API ne doit par exemple pas diminuer de manière significative l'affinité pour ses récepteurs¹⁷⁷.

Les modifications du MTX peuvent être effectuées à l'aide de ses fractions amine ou acide carboxylique. Il a été établi que la dérivatisation des amines abroge presque complètement la liaison du MTX à ses cibles¹⁷⁸.

Au contraire, la dérivatisation des carboxylates a un effet plus faible sur l'affinité. Des deux carboxylates, le **γ -COOH terminal** est la position préférentielle par rapport au proximal α -COOH^{177,179}. L'utilisation d'un groupe protecteur sur le groupe α -COOH lors de la synthèse permet une **dérivatisation sélective** et empêche la racémisation du centre chiral pour obtenir uniquement l'énantiomère L-Méthotrexate (Figure 17).

Les ligands linéaires longs tels que le **PEG** sont la référence pour la dérivatisation. Le PEG agit comme un espaceur pour éviter les problèmes d'encombrement stérique. Cela permet une liaison efficace aux GNP, soit directement au noyau, soit à un autre ligand de la couronne. Le PEG évite la dissimulation du médicament dans la couronne et permet une présentation correcte de l'API sur la partie externe des GNP facilitant la reconnaissance par les récepteurs extracellulaires et les cibles intracellulaires¹⁸⁰. La conjugaison au PEG améliore également l'hydrophilie, la stabilité et la biocompatibilité⁴⁴. Un dérivé de Méthotrexate et une GNP hydrophiles peuvent donc être couplés en utilisant de l'eau ou des tampons aqueux au lieu de solvants organiques toxiques (par exemple, le méthanol) ou de solvants qui causent des problèmes de procédés en aval (par exemple, le DMSO).

Fait intéressant, le couplage du MTX avec le PEG génère un composé dont la structure ressemble aux polyglutamates de Méthotrexate. Les polyglutamates de Méthotrexate sont synthétisés dans les cellules par l'enzyme folylpolyglutamate synthetase par polymérisation de résidus d'acide glutamique. La polyglutamation améliore la rétention du MTX dans les cellules et augmente généralement l'affinité pour les substrats du médicament¹⁸¹.

2.2. Résultats

Les dérivés de Méthotrexate amine MTX-NH₂ et disulfure (MTX-S)₂ ont été générés par une **synthèse organique en plusieurs étapes** sous forme de solides jaunes-oranges hydrosolubles (Figure 18). MTX-NH₂ (MW : 656,75 g/mol) a été synthétisé en quatre étapes et a été utilisé comme intermédiaire pour produire (MTX-S)₂ (MW : 2192,57 g/mol). (MTX-S)₂ a nécessité deux étapes supplémentaires, pour un total de six étapes (Figure 19).

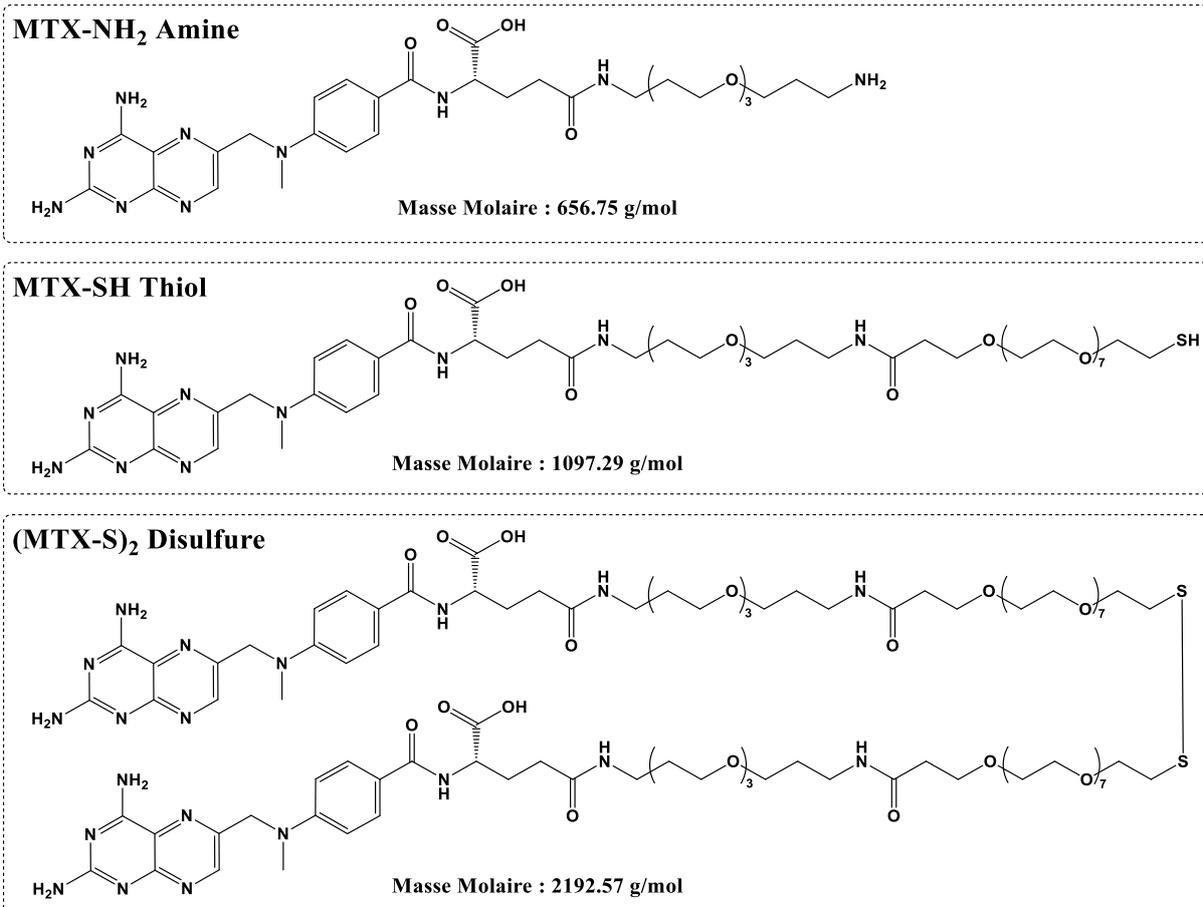


Figure 18 : Structure des différents dérivés de Méthotrexate. MTX-NH₂ avec une chaîne latérale γ -CO-R composée de 3 unités EG et d'une amine terminale. MTX-SH et (MTX-S)₂, respectivement monomère thiol et dimère disulfure, avec des chaînes latérales composées de 3 plus 8 unités EG reliées par une liaison amide.

Les deux premières étapes, (a) et (b), consistaient en la synthèse de **MTX α -tert-butyl ester (5)** à l'aide de blocs de construction pour chacune des trois sous-unités de la molécule : le cycle ptéridine, le PABA et l'acide glutamique. Le carboxylate α proximal de l'acide L-glutamique était protégé pour permettre une réactivité sélective du groupe γ terminal (4).

La troisième étape (c) correspondait à l'addition d'une chaîne latérale de PEG constituée de 3 monomères d'éthylène glycol (EG) pour former le dérivé par couplage amide avec le groupe γ terminal du MTX.

La quatrième étape (d) consistait à éliminer les groupes protecteurs (de l'amine terminal du PEG et du carboxylate α proximal) pour obtenir **MTX-NH₂ sous forme de sel d'hydrochlorate (8)**.

Lors de la cinquième étape (e), MTX-NH₂ a été conjugué avec un autre PEG pour allonger (addition de 8 EG) et changer la fonction terminale de la chaîne latérale en thioacétate.

La dernière étape (f) était une déprotection du thioacétate terminal du PEG suivie d'une oxydation spontanée du thiol MTX-SH nouvellement synthétisé pour obtenir la molécule finale disulfure (MTX-S)₂ (11). La pureté de (MTX-S)₂ par LC-MS et ¹H NMR était supérieure à 95 % et des centaines de milligrammes ont été obtenus.

2.3. Matériel et Méthodes

Les rendements et les puretés ont été déterminés par LC-MS et ¹H NMR pour la plupart des composés.

2.3.1. Synthèse du Dérivé Amine de Méthotrexate MTX-NH₂

Deux molécules disponibles dans le commerce ont été utilisées pour construire la structure de base (a) suivant un protocole défini par Andersen *et al.*¹⁸². 2,4 Diamino-6-(hydroxyméthyl)pteridine hydrochloride (1) et 4-(Méthylamino)benzoic acid (2) étaient respectivement les éléments constitutifs de **cycle ptéridine** et du **PABA**^{175,176}.

2,4 Diamino-6-(hydroxyméthyl)pteridine hydrochloride et un excès de Triphenylphosphine (PPh₃) ont été dissous dans du Diméthylacétamide (DMA) anhydre. De la Bromine (Br₂) a été ajoutée goutte à goutte à 0 °C sous atmosphère inerte (N₂) pour générer un composé α-bromo par **halogénéation**. Après une incubation sous agitation pendant la nuit à température ambiante, 6-(Bromométhyl)pteridine-2,4-diamine hydrobromide a été obtenu comme produit principal. 4-(Méthylamino)benzoic acid, équimolaire ou en excès, a ensuite été ajouté au mélange avec la base organique N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) pour effectuer une **substitution nucléophile** de son groupe méthylamino. Après une incubation sous agitation pendant la nuit à 65 °C, plusieurs étapes de précipitation/extraction ont été effectuées. L'ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) a précipité des contaminants et le filtrat a été récupéré. Ensuite, une extraction avec de l'acide acétique a été réalisée et la phase organique a été éliminée. L'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) à la phase aqueuse a généré un précipité (pH 4). Après plusieurs lavages à l'eau et concentrations *in vacuo*, le produit brut 4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylméthyl)-N-méthylamino]benzoic acid (3) a été obtenu sous forme de solide jaune.

La deuxième étape (b) consistait à ajouter la troisième partie de la structure de base du MTX, le **Glutamate**¹⁷⁵, avec α-COOH protégé par un ester de tert-butyl, via **couplage amide**.

4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino]benzoic acid (**3**) a été dissout dans du Dimethylformamide (DMF) anhydre et incubé avec un excès de la base organique Triéthylamine (TEA). (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate¹⁸³ (PyBOP) ou de O-(2-Oxo-1(2H)pyridyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate¹⁸⁴ (TPTU) en excès ont été utilisés comme réactifs de couplage.

Après 2 heures d'incubation sous agitation à température ambiante, un léger excès de L-Glutamic acid α -tert-butyl ester (**4**) a été ajouté et le mélange a été agité pendant la nuit à température ambiante. Le produit a été filtré et purifié par Chromatographie Liquide Haute Performance Préparatoire (**prep. HPLC**) sur une colonne Luna[®] C18 100 Å (250 × 50 mm, 15 μ m) (Phenomenex). Solvants de la phase mobile : A : 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) dans H₂O ; B : acétonitrile. Conditions d'élution : 0-20 min, gradient linéaire 15-45 % B. Le produit final Methotrexate α -tert-butyl ester : (S)-5-(Tert-butoxy)-4-(4-(((2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl)(methyl)amino)benzamido)-5-oxopentanoic acid (**5**) a été obtenu sous forme de solide jaune avec un rendement de 31 % et une pureté de 96 % (LC-MS).

Au cours de la troisième étape (**c**), Methotrexate α -tert-butyl ester (**5**) a été incubé dans le Dichloromethane (DCM) avec du TEA et du N-Boc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (**6**)¹⁸⁵. Du Propylphosphonic anhydride T3P[®] a été ajouté et le mélange a été agité pendant 12 heures à 10 °C pour effectuer un **couplage amide** avec la **chaîne PEG**. Le produit a été concentré *in vacuo* et une chromatographie sur colonne (SiO₂, éther de pétrole/acétate d'éthyle, 10:1 à 0:1) a été effectuée pour obtenir le composé protégé (**7**) (MTX-NH₂ avec un α -tert-butyl ester sur le Glutamate et un Boc sur l'amine à l'extrémité de la chaîne latérale) sous forme de solide jaune avec un rendement de 59 % (LC-MS).

Pour obtenir MTX-NH₂, une quatrième étape (**d**) a été effectuée afin d'**éliminer des groupes protecteurs**. Le composé protégé a été dissout dans du DCM et incubé avec du HCl dans du Dioxane. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante sous agitation, le produit a été concentré *in vacuo* à basse température et lyophilisé pour obtenir le produit final, un sel monochlorhydrate MTX-NH₂ · HCl (**8**) sous forme de solide orange légèrement hygroscopique avec un rendement quantitatif et une pureté de 98 % (LC-MS). HCl est connu pour améliorer la solubilité dans l'eau du MTX¹¹⁰.

MTX-NH₂ · HCl et les intermédiaires ont été obtenus avec de bonnes puretés et des rendements acceptables. Le produit final est stable sous atmosphère inerte mais se décompose lors de l'exposition au TFA. Ainsi, HCl a été utilisé au cours de la quatrième étape (**d**). Pour éviter la dégradation du produit, des températures basses lors des synthèses et pendant les évaporations *in vacuo* des solvants ont été utilisées. Connaissant la sensibilité à la lumière de MTX¹⁸⁶, l'exposition a été minimisée.

2.3.2. Synthèse du Dérivé Disulfure de Méthotrexate (MTX-S)₂

Pour effectuer la cinquième étape (**e**), un α -Thio- ω -(propionic acid) octa(ethylene glycol) modifié a été utilisé. Le thiol était protégé par un acétate et l'acide carboxylique activé par un ester de fluorophényle : pentafluorophenyl (PFP) ester¹³³. Les esters de fluorophényle ont une bonne réactivité avec les amines à un pH légèrement alcalin (7-9, par exemple : bicarbonate de sodium 0,1 M) et sont moins sujets à l'hydrolyse que les esters de NHS.

MTX-NH₂ · HCl (**8**) a été incubé dans du DMF avec du TEA et un léger excès de α -Acetylthio- ω -(Pentafluorophenyl propionate) octa(ethylene glycol) (**9**). Le mélange a été agité pendant 12 heures à 10 °C pour effectuer un **couplage amide** avec la **chaîne PEG**. Le produit a été filtré et une prep. HPLC a été effectuée sur une colonne Luna[®] C18 100 Å (250 × 50 mm, 10 μm) (Phenomenex). Solvants de la phase mobile : A : 0,1 % TFA dans H₂O ; B : acétonitrile. Conditions d'élution : 0-10 min, gradient linéaire 20-60 % B. Le composé protégé MTX-SAc (**10**) (thioacétate à l'extrémité de la chaîne latérale de PEG) a été obtenu sous forme d'huile jaune avec un rendement de 47 % (LC-MS).

Au cours d'une sixième et dernière étape (**f**), MTX-SAc (**10**) a été **déprotégé** dans du méthanol avec un excès de méthanolate de sodium (MeONa) sous O₂ (15 psi). Le mélange a été agité pendant 16 heures à 10 °C. Le produit a été filtré, concentré sous pression réduite et une prep. HPLC a été effectuée sur une colonne Kinetex[®] EVO C18 100 Å (150 × 30 mm, 5 μm) (Phenomenex). Solvants de la phase mobile : A : 0,04 % HCl dans H₂O ; B : acétonitrile. Conditions d'élution : 0-20 min, gradient linéaire 5-30 % B. MTX-SH s'oxyde naturellement lors de la déprotection pour former le disulfure (MTX-S)₂ (**11**) sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 24 % et une pureté de 99 % (LC-MS). Parfois, un acide sulfénique MTX-SOH (intermédiaire d'oxydation vers la formation de disulfures¹⁸⁷) a été observé, mais il était consommé après lyophilisation ou pendant le stockage sous atmosphère inerte pour donner du (MTX-S)₂ pur.

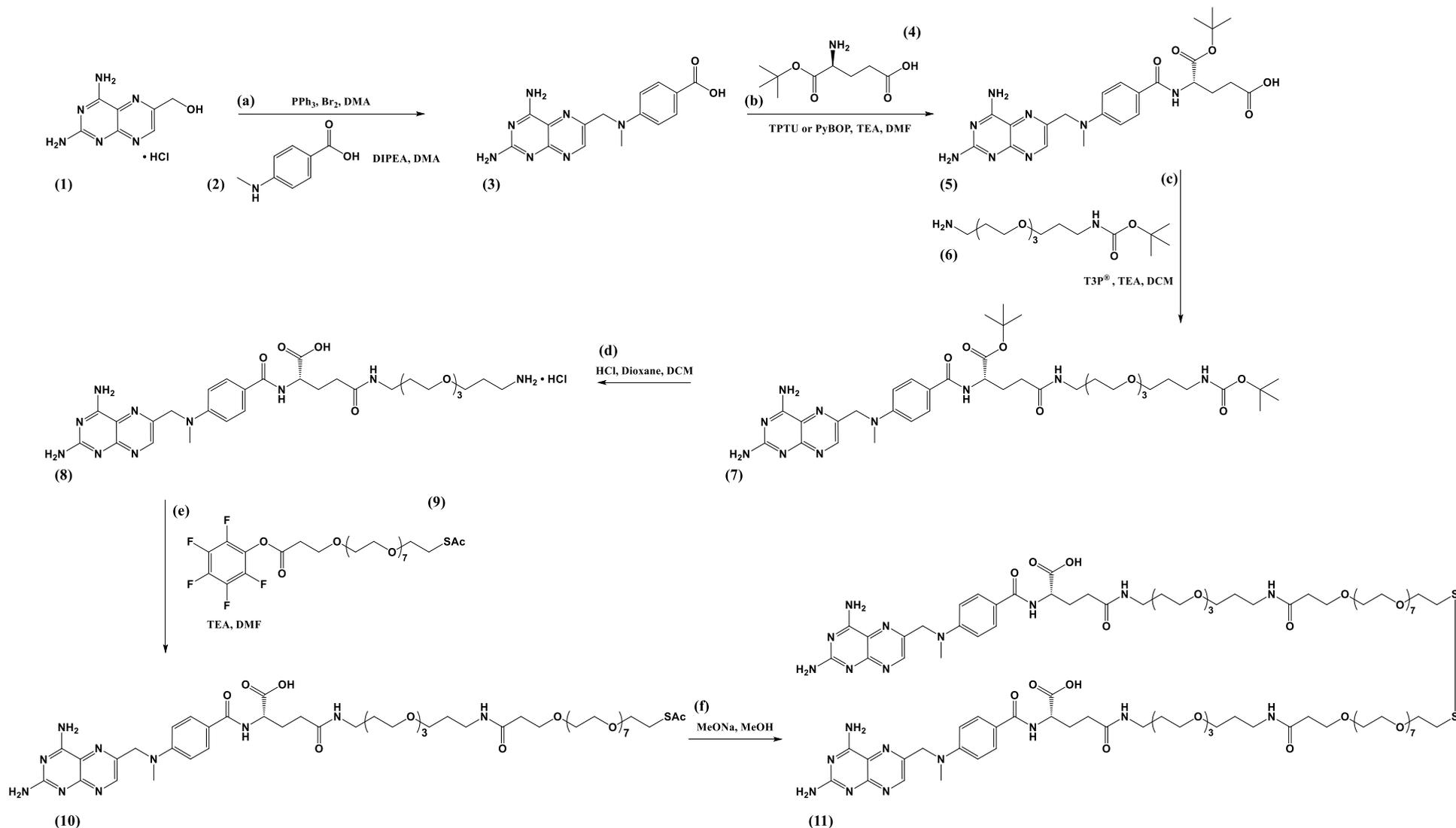


Figure 19 : Voie synthétique pour obtenir les dérivés de Méthotrexate. (a) Premièrement, 2,4 Diamino-6-(hydroxyméthyl)pteridine hydrochloride (1) avec PPh₃ et Br₂ dans du DMA, 0 °C puis RT, pendant la nuit. Deuxièmement, 4-(Méthylamino)benzoic acid (2) et DIPEA, 65 °C, pendant la nuit. (b) Premièrement, 4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylméthyl)-N-méthylamino]benzoic acid (3) avec TPTU ou PyBOP et TEA dans du DMF, RT, 2 h. Deuxièmement, L-Glutamic acid α -tert-butyl ester (4), RT, pendant la nuit. (c) Methotrexate α -tert-butyl (5) avec N-Boc-4,7,10-trioxo-1,13-tridecanediamine (6), Propylphosphonic anhydride T3P® et TEA dans du DCM, 10 °C, 12 h. (d) Composé protégé (7) avec HCl/Dioxane dans du DCM, RT, 30 min. (e) MTX-NH₂ (8) avec α -Acetylthio- ω -(Pentafluorophenyl propionate) octa(ethylene glycol) (9) et TEA dans du DMF, 10 °C, 12 h. (f) MTX-SAc (10) avec MeONa dans du MeOH, O₂, 10 °C, 16 h. (11) (MTX-S)₂.

3. Synthèse de MTC-100244 MTX-GNP

Les principes de la synthèse de Brust-Schiffrin, de la post-fonctionnalisation et de l'échange de ligands sont décrits dans le chapitre *GNP MidacoreTM : Synthèse et Caractérisation*.

3.1. Résultats

3.1.1. MTC-100011 (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₂₂@Au₁₀₂

MTC-100011 (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₂₂@Au₁₀₂, **GNP de base ou Intermédiaire**, a été synthétisé en milieu aqueux en utilisant NaBH₄ pour former une GNP ultrapetite par une méthode **Brust-Schiffrin** modifiée. Tout d'abord, HAuCl₄ et un léger excès de ligands disulfure ont été dissous dans l'eau et la solution a été alcalinisée avec de l'hydroxyde de sodium. Deux espèces de ligands ont été utilisées : le monosaccharide 2'-Thioethyl α -D-galactopyranoside (α -Galactose-C₂) et l'oligo-éthylène glycol fonctionnalisé avec un acide carboxylique terminal α -Thio- ω -(propionic acid) octa(ethylene glycol) (PEG(8)COOH) en quantité pour obtenir un rapport molaire 1:1 sur la GNP. Deuxièmement, un excès de NaBH₄ a été ajouté rapidement. HAuCl₄ a été instantanément réduit et des noyaux GNP ont été créés (nucléation), tandis que les ligands ont formé des couronnes pour arrêter la croissance et stabiliser les particules. Troisièmement, une phase de passivation, avec une réorganisation des particules en présence de l'excès de ligands et de NaBH₄, a fait mûrir les particules. Enfin, la purification par ultrafiltration a éliminé les contaminants et arrêté la réaction pour produire les particules hydrosolubles ultrapetites fonctionnalisées (Figure 20). La réaction a été réalisée à l'échelle du gramme.

Jadzinsky *et al.* ont postulé que les GNP avec un noyau de 2 nm étaient composées de 44 ligands et de 102 atomes Au^{188,189}. Levi-Kalisman *et al.* ont confirmé ce modèle à l'aide de techniques analytiques, à savoir la spectroscopie de masse (ESI et MALDI-TOF)¹⁵⁶. Ainsi, la particule est définie comme (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₂₂@Au₁₀₂ en utilisant la formule suivante : (Ligand A)_x(Ligand B)_y@Au₁₀₂, avec $x + y = 44$ et $x = y$.

3.1.2. MTC-100244



MTC-100244 (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂ **MTX-GNP** a été obtenu par post-fonctionnalisation et échange de ligands à l'aide d'un dérivé de Méthotrexate amine ou thiol et de MTC-100011 GNP de base. Les réactions ont été réalisées à l'échelle de centaines de milligrammes. MTC-100244 MTX-GNP est hydrosoluble.

Les équivalents des réactifs ont été définis à l'aide de la formule de Jadzinsky *et al.* Pour la post-fonctionnalisation, la concentration molaire d'or a été divisée par le nombre théorique d'atomes d'or par particule (102) pour obtenir une quantité molaire de GNP et multipliée par le nombre de PEG(8)COOH (22) qui peuvent se lier au dérivé amine. Les équivalents pour l'échange de ligands ont été calculés en utilisant uniquement le nombre d'atomes d'or pour obtenir une quantité molaire de GNP car le dérivé thiol se lie directement au noyau.

La **post-fonctionnalisation** a été réalisée en utilisant l'acide carboxylique terminal des PEG(8)COOH (point d'ancrage) de la couronne des GNP pour se lier à MTX-NH₂¹⁹⁰. La réaction était composée en deux étapes. Tout d'abord, l'acide carboxylique a été activé en tant qu'ester réactif en utilisant les réactifs de couplage EDC et NHS (3 et 6 équivalents par PEG(8)COOH) en excès dans des conditions légèrement acides pendant deux heures sous agitation^{139,140}. Deuxièmement, un excès de MTX-NH₂ (77 MTX par GNP ou 3,5 par PEG(8)COOH) a été dissous dans des conditions neutres et rapidement ajouté au mélange contenant les GNP activées. La formation de la liaison amide a eu lieu à pH neutre avec une fenêtre étroite (6,8-7,2), pendant la nuit à température ambiante dans l'obscurité avec agitation rapide (Figure 21). Le rendement d'attachement du MTX était inférieur à 20 % et le ratio MTX/Au d'environ 30 % (p/p).

L'échange de ligands nécessite un ligand qui peut s'ancrer directement au noyau des GNP par le biais d'une liaison soufre-or (S-Au). La réaction a nécessité deux étapes. Tout d'abord, (MTX-S)₂ a été facilement réduit pour former deux thiols MTX-SH en utilisant une quantité équimolaire de TCEP dans des conditions neutres à 37 °C pendant 2 heures sous agitation dans l'obscurité. Deuxièmement, MTX-SH a été ajouté aux GNP en utilisant approximativement la quantité cible d'attachement (13 MTX par GNP). La liaison au noyau a eu lieu à un pH légèrement acide avec une large fenêtre (6,0-7,0), pendant la nuit à température ambiante dans l'obscurité sous agitation rapide (Figure 22). Le rendement d'attachement du MTX était quantitatif (100 %) et le ratio MTX/Au supérieur à 40 % (p/p). L'absence de perte détectable de matière après filtration de 0,22 µm (la membrane filtrante était claire) était un indicateur positif de la non occurrence d'agrégation pendant la synthèse¹⁵⁸.

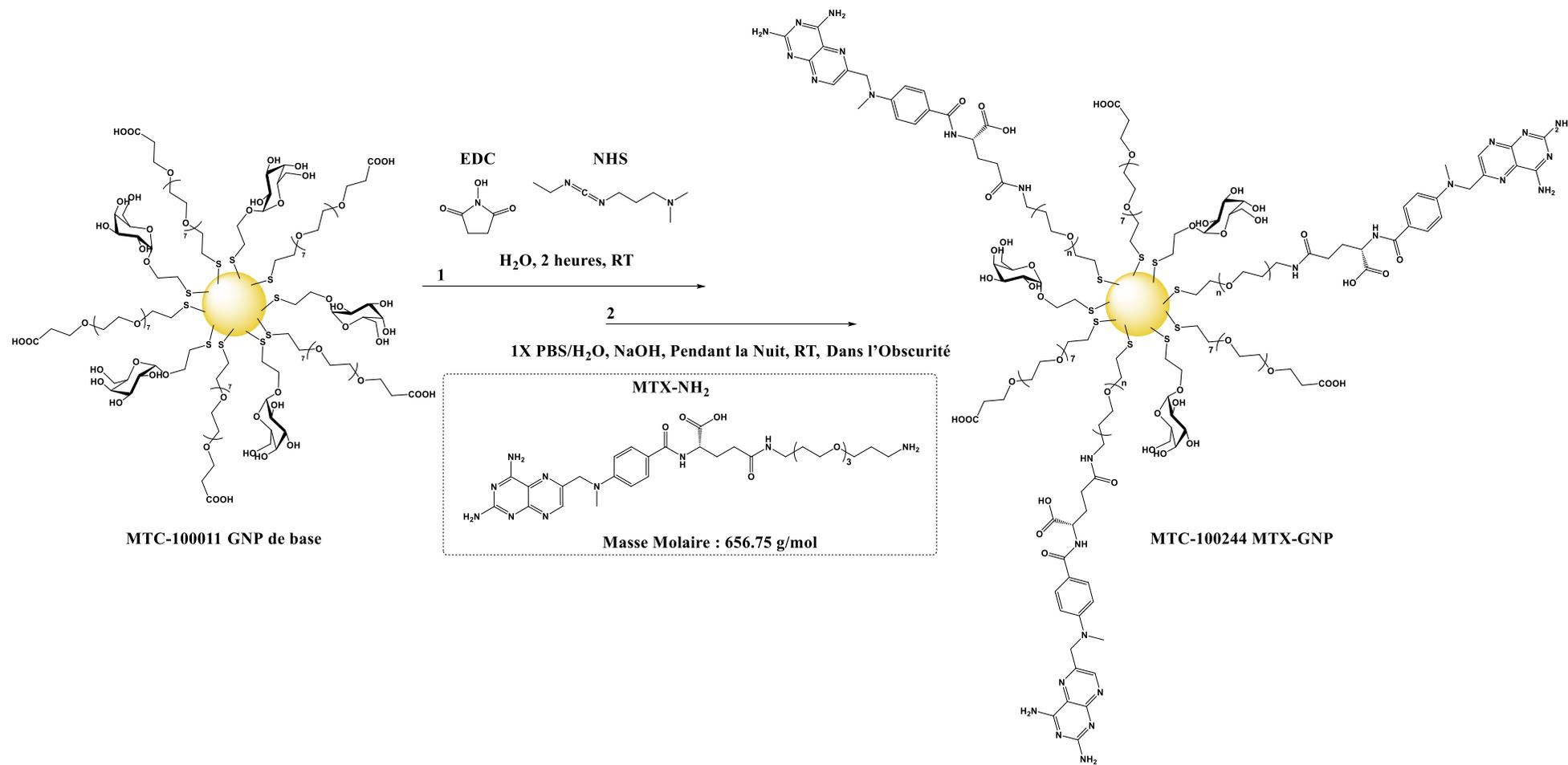


Figure 21 : Attachement du dérivé amine de Méthotrexate sur MTC-100011 GNP de base par post-fonctionnalisation pour donner MTC-100244 (α Galactose- C_{22})(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂.

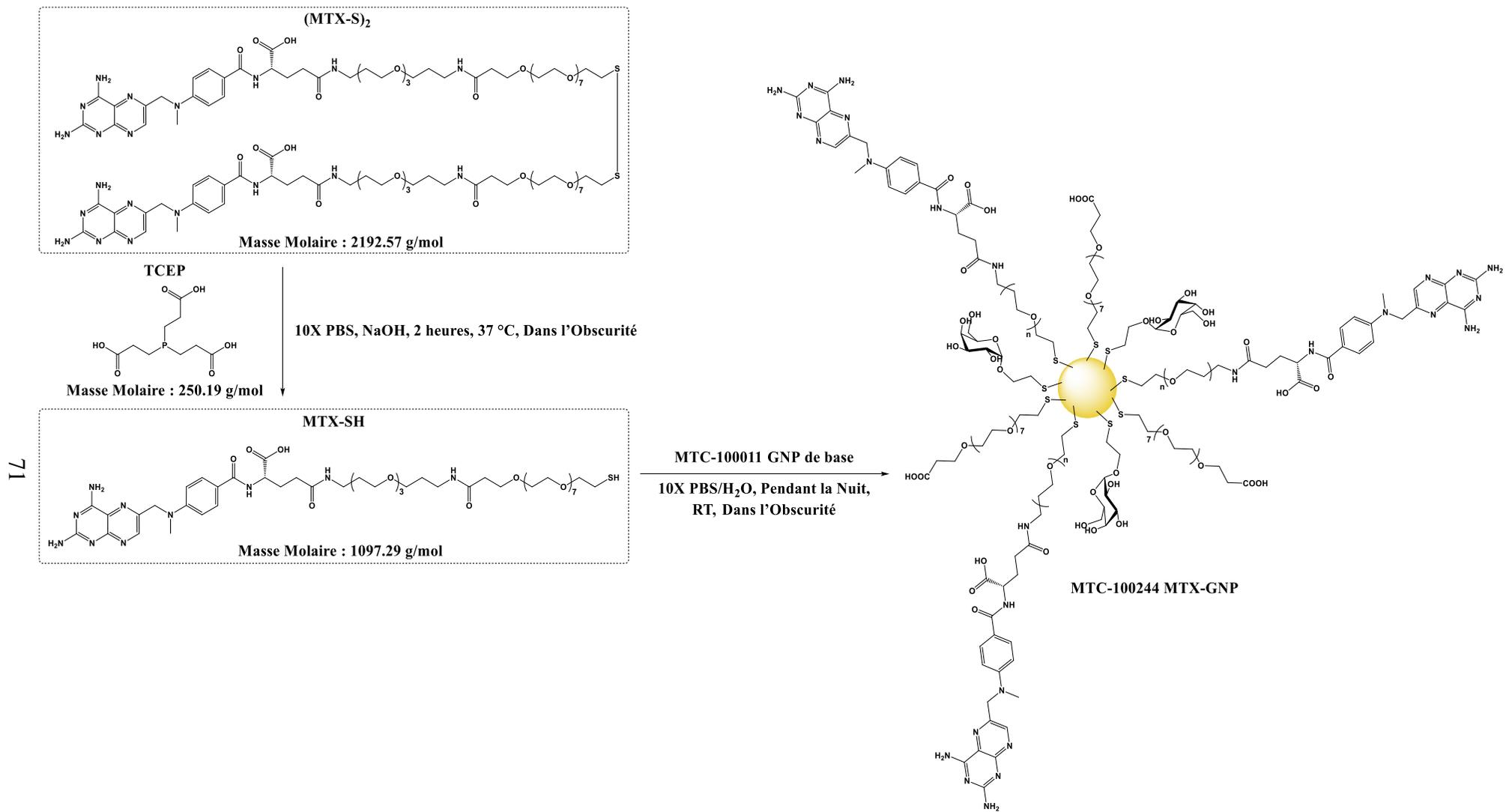


Figure 22 : Attachement du dérivé thiol de Méthotrexate sur MTC-100011 GNP de base par échange de ligands pour donner MTC-10024 (α -Galactose-C₂)₂₂(PEG(8)COOH)₁₁(MTX-PEG(3)-NH-CO-PEG(8))₁₁@Au₁₀₂.

3.2. Matériel et Méthodes

3.2.1. MTC-100011 via Synthèse de Brust-Schiffrin Modifiée

La synthèse a été réalisée avec une méthode de Brust-Schiffrin modifiée, en utilisant un réacteur Atlas de Syrris avec une cuve torisphérique gainée de 1 L et un agitateur *blade propeller* (500-50 mm). La réaction a été réalisée à 18 °C avec agitation rapide (750 tr/min). Le temps, le pH et la température ont été surveillés en permanence. H₂O (Ultrapure, MilliQ) était le solvant pour la synthèse et la purification. Les différents réactifs ont été ajoutés depuis le haut du réacteur en quelques minutes (~ 15 min) à l'aide d'un entonnoir (150-80-8 mm). Les ligands disulfures 1-mercapto-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oic acid (PEG(8)COOH, 0,40 équivalent, 3718 mg, 4,063 mmol, 365 mL, Acadechem) et 2'-Thioethyl α -D-galactopyranoside (α -Galactose-C₂, 0,35 équivalent, 1701 mg, 3,555 mmol, 365 mL, Galchimia) ont été versés dans un rapport molaire de 53:47. H₂AuCl₄·3H₂O (1 équivalent, 4000 mg, 10,157 mmol, 35 mL, Sigma-Aldrich) a ensuite été ajouté. Une solution aqueuse de NaOH (~ 35 mL NaOH 2 M) a été utilisée pour moduler le pH à 12,0-12,3. NaBH₄ fraîchement préparé et en excès (2 M dans NaOH 0,1 M, 10 équivalents, 3842 mg, 101,57 mmol, 50 mL, Appli Chem) a été rapidement ajouté pour initier la nucléation des particules. Après l'ajout de tous les réactifs, la vitesse d'agitation a été abaissée à 550 tr/min et la réaction a incubé pendant 60 minutes. La concentration d'or était de 2,35 mg/mL (11,9 mM) et le volume final de la réaction correspondait à 85 % de la capacité du réacteur. La purification a été réalisée avec un système de filtration à flux tangentiel KR2i de Repligen à l'aide d'un filtre à fibres creuses avec un seuil de poids moléculaire de 10 kDa. Le protocole de purification consistait en de la diafiltration et de la concentration. Le produit final a été filtré avec une membrane de 0,22 μ m et dilué dans l'eau avec une cible [Au] de 5 à 10 mg/mL.

3.2.2. MTC-100244 via Post-Fonctionnalisation

Les réactifs de couplage Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 3 équivalents par PEG(8)COOH, 94,5 mg, 492,76 μ mol, 2,5 mL, Sigma-Aldrich) et N-Hydroxysuccinimide (NHS, 6 équivalents par PEG(8)COOH, 113,4 mg, 985,52 μ mol, 2,5 mL, Sigma-Aldrich) dans H₂O ont été mélangés et ajoutés à une solution de MTC-100011 GNP de base (150,0 mg Au, 761,54 μ mol Au, 164,25 μ mol PEG(8)COOH, 7,5 mg/mL Au). Le mélange (pH 5,0-6,0) a été agité à 600 tr/min pendant 2 heures à température ambiante. MTX-NH₂ (3,5 équivalents par PEG(8)COOH, 377,6 mg, 574,89 μ mol, 100 mL, Selvita) a été dissous dans du PBS 1X (Fisher Scientific) et le pH a été ajusté à 6,8-7,2 en utilisant du NaOH 2 M.

La solution neutralisée de MTX-NH₂ a ensuite été rapidement ajoutée à la particule activée. Le pH a été réajusté à 6,8-7,2 à l'aide de NaOH 2 M et la solution a été agitée à 600 tr/min pendant la nuit à température ambiante dans l'obscurité. La purification a été effectuée via au moins cinq cycles d'ultrafiltration centrifuge avec des filtres Amicon Ultra de 10 kDa (Merck). Le produit final a été filtré avec une membrane de 0,22 µm et dilué dans l'eau avec une cible [Au] de 5 à 10 mg/mL.

3.2.3. MTC-100244 via Échange de Ligands

(MTX-S)₂ (6,5 équivalents par GNP, 156,1 mg, 71,18 µmol, 50 mL, WuXi AppTec) a été dissous dans du PBS 10X (Fisher Scientific). Le pH a été ajusté à 6,0-7,0 en utilisant NaOH 2 M pour obtenir une solution jaune clair complètement dissoute. Une solution de TCEP 0,05 M (6,4 équivalents par GNP, 70,08 µmol, 1,4 mL), obtenue par dilution de TCEP 0,5 M, pH 7,0 (Merck), a été ajoutée à la solution neutralisée de (MTX-S)₂. Le mélange a été agité à 600 tr/min pendant 2 heures dans l'obscurité à 37 °C. La solution contenant du MTX-SH et du TCEP oxydé a été ajoutée lentement et progressivement (5 mL toutes les 30 secondes) à une solution de MTC-100011 GNP de base (220,0 mg Au, 1116,9 µmol Au, 10,95 µmol GNP, 11,0 mg/mL Au). Le mélange a été agité à 600 tr/min pendant la nuit dans l'obscurité à température ambiante (pH 6,0-7,0). La purification a été réalisée via au moins cinq cycles d'ultrafiltration centrifuge avec des filtres Amicon Ultra de 10 kDa (Merck). Le produit final a été filtré avec une membrane de 0,22 µm et dilué dans l'eau avec une cible [Au] de 5 à 10 mg/mL.

4. Caractérisation de MTC-100244 MTX-GNP

4.1. Résultats

Une gamme complète de techniques optimisées a été conçue pour caractériser MTC-100244 MTX-GNP et MTC-100011 GNP de base. Une caractérisation partielle a également été réalisée avec la formulation finale d'hydrogel.

Aspect visuel. Toutes les solutions étaient exemptes d'agrégats ou de particules visibles et leur couleur brun foncé correspondait aux GNP ultrapetites non plasmoniques.

Une **analyse élémentaire** a été effectuée par ICP-MS et ICP-AES pour quantifier la concentration d'or et approximer la concentration de GNP. La quantification du soufre a été utilisée pour estimer la densité de ligands par le rapport molaire S/Au. Pour MTC-100011 et MTC-100244 synthétisé par post-fonctionnalisation le rapport n'a jamais dépassé 0,49.

Avec MTC-100244 synthétisé par LPE il était de 0,55, validant la prédominance du mécanisme de remblayage sur l'échange. La quantité de sodium était essentiellement liée aux sels de carboxylate. La surveillance du bore et du phosphore a permis de s'assurer de l'élimination complète du NaBH₄ et du TCEP, respectivement (Figure 23).

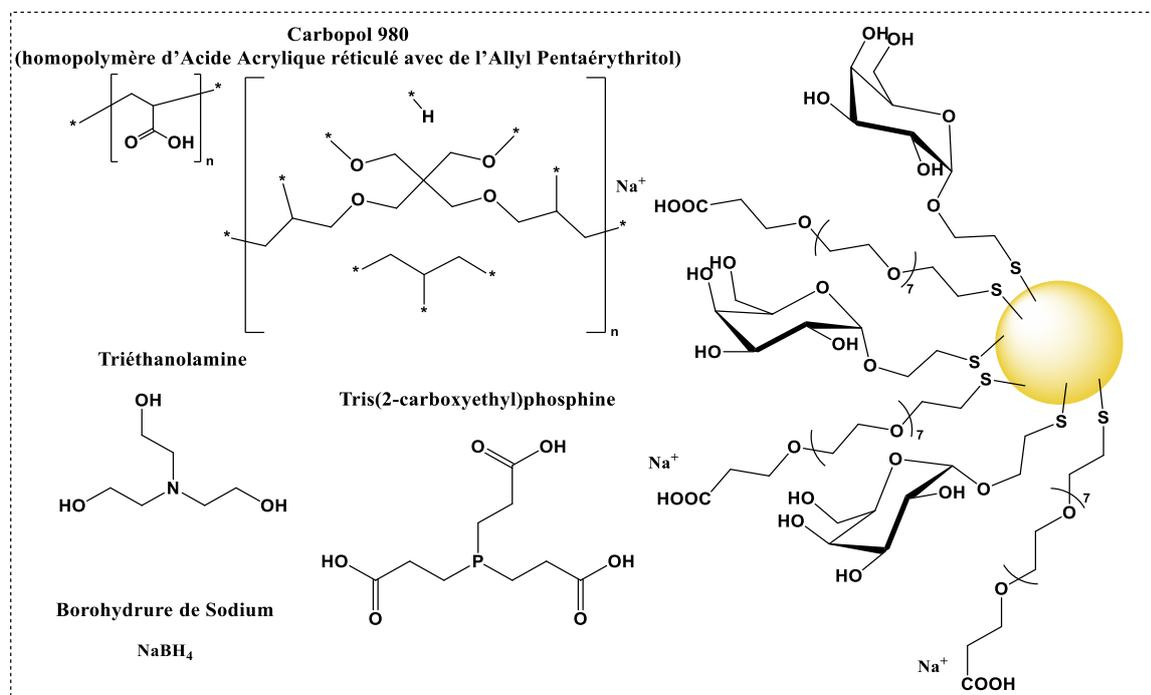


Figure 23 : Molécules potentiellement présentes dans la formulation finale de l'hydrogel MTX-GNP de Carbopol 980. Les éléments sont détectés et quantifiés par ICP-MS et ICP-AES.

Le **pH** de MTC-100244 MTX-GNP était neutre à légèrement alcalin (6,0-7,5).

Les **spectres UV-Vis** des nanoparticules n'ont montré aucun signe d'agrégation et ont validé la taille ultrapetite du noyau avec l'absence de bande plasmonique de surface à 520 nm. MTX sur MTC-100244 MTX-GNP était visible avec un maximum local de 297 nm qui était plus élevé par LPE que par post-fonctionnalisation (Figure 24).

Le dimensionnement du noyau par **TEM** a mis en évidence une population monodispersée avec une taille moyenne du noyau inférieure à 2 nm (1,7-1,9 nm) pour toutes les particules. Les MTC-100244 MTX-GNP obtenus par LPE avaient une dispersion étroite allant de 1 à 3 nm (Figure 25).

Potentiel Zêta. MTC-100244 MTX-GNP et l'intermédiaire GNP de base étaient chargés négativement.

Le dimensionnement par **DLS** a montré une augmentation du diamètre hydrodynamique lors de l'attachement du MTX sur les GNP de 4,1 à 5,0-5,3 nm en moyenne. Tous les lots étaient monodispersés. La hauteur maximale du pic était similaire après post-fonctionnalisation et échange de ligands, mais la dispersion était plus étroite pour ce dernier. La population de MTC-100244 MTX-GNP obtenue par post-fonctionnalisation présentait en effet une « queue » jusqu'à 12 nm (Figure 26).

¹H NMR. Les GNP ont été traitées à l'aide d'une solution de cyanure de potassium dans de l'hydroxyde de potassium (KCN/KOH) pour digérer le noyau et libérer les ligands. Des signaux appartenant aux différents ligands ont été choisis en fonction de leur résolution et leurs aires ont été utilisées pour déterminer les quantités relatives (aires divisées par le nombre de protons intégrés). α -Galactose-C₂ δ 4,99 (d, 1H, H-1). PEG(8)COOH δ 2,49 (t, 2H, -CH₂-COOH). MTX δ 7,72 (m, 2H, -Ph) et δ 6,91 (m, 2H, -Ph) (Figure 27).

Les analyses ¹H NMR ont ensuite été adaptées au modèle de Jadzinsky *et al*¹⁸⁸ avec une quantité totale de 44 ligands par GNP. Un rapport molaire 1:1 entre α -Galactose-C₂ et PEG(8)COOH a été obtenu pour MTC-100011. En ce qui concerne MTC-100244, le dérivé de Méthotrexate représentait 16 % de la couronne par post-fonctionnalisation et 19 % par LPE.

RPLC-UV. Les GNP ont été **traitées** à l'aide du TCEP, un réducteur de liaison disulfure, pour digérer la particule et empêcher l'oxydation spontanée des thiols des ligands après libération du noyau. L'identification et la quantification du dérivé thiol de Méthotrexate (MTX-SH) (MW 1097,29 g/mol) ont été effectuées à une longueur d'onde (λ) de 305 nm avec du Méthotrexate (MW 454,44 g/mol, temps de rétention relatif : 0.87) comme étalon. La concentration a été rapportée en milligrammes de Méthotrexate et non pas de dérivé. Le rapport massique MTX/Au a été utilisé pour quantifier l'attachement qui était respectivement de 29 % (p/p) par post-fonctionnalisation à 42 % (p/p) par LPE. Il convient de noter que le rendement de l'échange de ligands était supérieur à 100 %. Cela pourrait être dû au fait que (MTX-S)₂ a été dissous en utilisant la quantité indiquée par le fournisseur sans pondération interne (échantillonnage impossible sans perdre une grande quantité de matière) ou à une déviation analytique.

Des GNP **non traitées** ont été injectées en utilisant la même méthode RPLC-UV pour valider la monodispersité des nanoparticules entières. L'attachement du MTX a déplacé le temps de rétention des particules en changeant la polarité globale (Figure 28) (λ 276 nm, temps de rétention relatif : 0.94).

L'absence de dérivés de Méthotrexate libre, MTX-NH₂, MTX-SH ou (MTX-S)₂, a été évaluée à λ 305 nm.

SEC. Les nanoparticules non traitées ont été détectées à l'aide d'un détecteur UV à λ 220 nm. Les GNP étaient monodispersées avec une distribution de taille symétrique. Aucun changement significatif du temps de rétention n'a été observé après l'attachement du MTX (Figure 29).

Figure 24 : Spectres UV-Vis (λ 220-700 nm) de MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.

Figure 25 : Dimensionnement du noyau par TEM de MTC-100244 après attachement de MTX par échange de ligands.

Figure 28 : Chromatogrammes RPLC-UV des particules entières (λ 276 nm) : MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.

Figure 29 : Chromatogrammes SEC des particules entières (λ 220 nm) : MTC-100011 et MTC-100244 après attachement de MTX par post-fonctionnalisation et échange de ligands.

4.2. Matériel et Méthodes

4.2.1. Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) et Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

Les solutions et les hydrogels de GNP ont été digérés dans *l'aqua regia* avec le système de digestion par micro-ondes Multiwave Go d'Anton Paar. L'analyse élémentaire a été réalisée à l'aide de 7700x ou 7900 ICP-MS d'Agilent pour l'or (Au) et de iCAP7600 Duo ICP-OES de Thermo Scientific pour le soufre (S), le sodium (Na), le bore (B) et le phosphore (P). Les analyses ont été effectuées par LGC (Cambridge, UK).

4.2.2. pH

Le pH-mètre SevenExcellence™ et l'électrode InLab Ultra-Micro-ISM de Mettler Toledo ont été utilisés.

4.2.3. Spectrophotométrie UV-Vis

Les spectres UV-Vis (λ 220-700 nm) ont été obtenus à l'aide du spectrophotomètre Ultrospec 6300 Pro UV-Vis d'Amersham Biosciences avec une cuvette de quartz (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au, dilué dans l'eau).

4.2.4. Microscopie Électronique en Transmission (TEM)

Les échantillons ont été préparés dans des conditions ambiantes en desséchant une gouttelette de 0,35 μL d'une solution aqueuse de GNP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au) sur une surface de film de carbone hydrophile.

Des supports de film ultramince de type #01824 (Ted Pella) ont été utilisés. L'hydrophilisation a été réalisée pendant 2 minutes avec un traitement à forte décharge lumineuse de 25 mA dans une chambre à plasma K100X (Quorum Technologies). Les images ont été acquises avec un microscope électronique en transmission de type JEM-2100F [Modèle EM-20014, UHR, 200 kV] (JEOL) équipé d'un appareil photo numérique de type F-216 (TVIPS). Habituellement, des images à champ de vision large à un grossissement de 150 k ont été assemblées avec l'utilitaire spotscan du logiciel TVIPS EMMENU4 à partir d'une matrice d'images 4x4 basée sur le décalage de faisceau. Les analyses ont été effectuées par CIC BiomaGUNE (San Sebastian, Espagne). Le traitement des données a été effectué à l'aide du programme ImageJ.

4.2.5. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

Les mesures de taille (diamètre hydrodynamique) ont été effectuées avec le Zetasizer Nano-ZS de Malvern Panalytical. La taille a été exprimée en volume (%) avec une moyenne de 3 mesures prises à 25 °C avec un angle de diffusion de 173 degrés dans une cuvette en plastique (200 µg/mL Au, diluée dans le PBS 10X). Le potentiel zêta a été mesuré à la même concentration, mais en utilisant l'eau comme diluant.

4.2.6. ¹H NMR (Résonance Magnétique Nucléaire du Proton)

Une quantité de GNP équivalente à 5 mg Au a été incubée avec 600 µL de KCN 0,3 M dans KOH 0,1 M (solvant D₂O) après élimination de H₂O par lyophilisation. Les particules ont été incubées à 40 °C pendant 2 heures avec une forte agitation (950 tr/min) pour éviter l'agglomération. La digestion a été considérée comme complète lorsque, visuellement, une solution transparente sans précipité a été obtenue. Les expériences ont été réalisées à 298 K sur un spectromètre AVANCE III 500 de Bruker par CIC BiomaGUNE (San Sebastian, Espagne) (500 MHz, D₂O). Le traitement des données a été effectué à l'aide de MestReNova 14.2.1.

4.2.7. Chromatographie d'Exclusion de Taille (SEC)

Les expériences ont été réalisées avec le système HPLC 1260 Infinity d'Agilent. Le traitement des données a été accompli avec le logiciel OpenLab CDS. Les séparations ont été effectuées sur une colonne AdvanceBio SEC 130 Å (150 × 4,6 mm, 2,7 µm) et une colonne de garde AdvanceBio SEC 130 Å (50 × 4,6 mm, 2,7 µm) (Agilent). Solvant de la phase mobile : dodécylsulfate de sodium 10 mM. Le lavage a été effectué en injectant 5 µL de KCN 0,3 M dans KOH 0,1 M, pour digérer les éventuels résidus de particules, puis H₂O deux fois. Le débit était de 350 µL/min et le volume d'injection de 10 µL. Le système fonctionnait à 25 °C. La longueur d'onde de détection était de 220 nm.

4.2.8. RPLC-UV (Chromatographie Liquide en Phase Inverse)

Les expériences ont été réalisées avec le système HPLC 1260 Infinity d'Agilent. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel OpenLab CDS. Les séparations ont été effectuées sur une colonne XSelect CSH C18 130 Å (150 × 4,6 mm, 3,5 µm) et une colonne de garde XSelect CSH C18 VanGuard 130 Å (5 × 3,9 mm, 3,5 µm) (Waters). Solvants de la phase mobile : A : 0,1 % TFA dans H₂O ; B : 0,1 % TFA dans l'acétonitrile. Conditions d'élution : 0-1,5 min, 5 % B isocratique ; 1,5-9 min, gradient linéaire 5-98 % B ; 9-11,5 min, 98 % B isocratique ; lavage et reconditionnement de la colonne.

Le lavage a été effectué en injectant 20 μL de KCN 0,3 M dans KOH 0,1 M, pour digérer les éventuels résidus de particules, puis H_2O deux fois. Le débit était de 1 mL/min et le volume d'injection de 20 μL . Le système fonctionnait à 35 °C. Les longueurs d'onde de détection étaient de 276 et 305 nm.

Des solutions aqueuses de GNP (125 $\mu\text{g/mL Au}$) ont été injectées directement dans le système pour déterminer la polarité des particules entières et détecter les ligands libres. Pour mesurer les concentrations de MTX, les prétraitements suivants ont été utilisés. Méthotrexate Pharmaceutical Secondary Standard ; Certified Reference Material (Merck) a été utilisé comme standard.

Pour les solutions de GNP, la quantité équivalente à 450 $\mu\text{g Au}$ a été incubée avec 20 μL de TCEP 0,5 M, 250 μL de DMSO et H_2O jusqu'à 1 mL. Le mélange a été effectué par vortex. Les particules ont été incubées à 40 °C pendant 2 heures avec une forte agitation pour éviter l'agglomération (950 tr/min). La digestion a été considérée comme complète lorsque, visuellement, une solution transparente sans précipité a été obtenue.

Pour les formulations d'hydrogel, 25 mg de gel (5 mg Au/g) a été dissous avec 375 μL de H_2O et vortexé jusqu'à dissolution complète. Ensuite, 375 μL de TFA à 0,4 % dans l'acétonitrile et 250 μL de DMSO ont été ajoutés. La solution a été agitée, puis centrifugée (17 000 g, 15 min). Un précipité s'est formé et le surnageant a été récupéré (> 97 % en volume). La teneur du précipité en or a été analysée, et les résultats obtenus ont indiqué qu'il contenait moins de 1 % de l'or présent dans le gel aliquoté. 20 μL d'une solution de TCEP de 0,5 M ont été ajoutés au surnageant et le mélange a été incubé à 40 °C pendant 2 heures avec une forte agitation (950 tr/min) pour éviter l'agglomération. La digestion a été considérée comme complète lorsque, visuellement, une solution transparente sans précipité a été obtenue.

5. Conclusion et Perspectives

La synthèse d'un **dérivé de Méthotrexate** sous forme de **disulfure (MTX-S)₂** a été réalisée en six étapes. Les réactions et les purifications ont donné un produit pur en quantité suffisante pour effectuer les réactions en aval avec les GNP, la caractérisation et fournir du matériel pour les essais précliniques *in vitro* et *in vivo*. De plus, la voie synthétique est transposable à des quantités de plusieurs grammes.

Les étapes (c), (e) et (f) reposent néanmoins sur de prep. HPLC et doivent être optimisées en la remplaçant si possible par la précipitation, la filtration, l'extraction ou le lavage pour améliorer la transposition à grande échelle¹¹⁴. Par exemple, puisque la dernière étape (f) de la réaction est quantitative, la purification pourrait se dispenser de prep. HPLC en utilisant la résine échangeuse d'ions Amberlite IR-120 (H+) pour neutraliser le méthanolate de sodium et purifier le composé final par filtration et concentration¹⁹¹.

L'oxydation du thiol en disulfure lors de la déprotection du thioacétate (f) est vraisemblablement due à sa forte réactivité, en raison de la faible entrave stérique dans son voisinage (la chaîne PEG agit comme un espaceur avec MTX). La prévention de la formation de disulfures pourrait être étudiée en modifiant la température ou le pH, avec un contrôle plus strict de l'absence d'oxygène ou en éliminant totalement les résidus d'ions métalliques¹⁹². Néanmoins, l'obtention d'un disulfure comme seul produit de la réaction n'est pas problématique car le TCEP, un réducteur, peut être utilisé pour obtenir facilement des thiols avant la réaction avec les GNP. L'acide sulfénique, en revanche, ne doit être qu'un intermédiaire du disulfure et l'absence d'autres espèces oxydées non réversibles, à savoir l'acide sulfinique (MTX-SO₂H), l'acide sulfonique (MTX-SO₃H) et les produits secondaires tels que le thiosulfinate et le sulfenamide doit être évaluée¹⁹³.

La **synthèse** de la **2^{ème}Ge MTX-GNP** par échange de ligands à l'aide du disulfure (MTX-S)₂ a été réalisée sur une échelle de plusieurs centaines de milligrammes afin de fournir MTC-100244 MTX-GNP pour des essais précliniques. La GNP intermédiaire (MTC-100011 GNP de base) et MTC-100244 MTX-GNP ont été synthétisés en suivant un contrôle de fabrication strict pour assurer la reproductibilité et une transposition facile à la fabrication aux normes de Bonnes Pratiques de Fabrication.

Par rapport à la **1^{ère}Ge MTX-GNP** (synthèse par post-fonctionnalisation), le **rendement** d'attachement du dérivé de Méthotrexate a été massivement améliorée, passant de moins de 20 % à approximativement 100 %.

La nouvelle méthode synthétique est non seulement plus efficace, mais aussi plus **transposable à grande échelle** (fenêtre de pH plus large, timings moins strict) et plus propre, avec **moins d'impuretés** générées (absence de réactifs de couplage pouvant favoriser la réticulation et l'agrégation). TCEP a été utilisé pour réduire (MTX-S)₂ en MTX-SH avant ajout aux GNP. MTX-SH s'est avéré très réactif et le TCEP n'a pas affecté négativement la qualité de MTC-100244 MTX-GNP (pas de digestion ou d'agrégation, élimination complète après purification).

Le **ratio MTX/Au** a également été amélioré par l'échange de ligands, passant d'environ 30 % à plus de 40 %. Dans les deux cas, le ratio est très élevé par rapport aux autres NP (voir section *État de l'art des Methotrexate Gold Nanoparticles Publiées*), en raison de la taille ultrapetite des GNP Midacore™. Néanmoins, l'augmentation du rapport MTX/Au par échange de ligands pourrait améliorer plus encore les performances biologiques de MTC-100244 MTX-GNP.

L'étape suivante est la transposition à grande échelle avec la synthèse de plusieurs grammes de MTC-100244 MTX-GNP par échange de ligands.

L'éventail de caractérisation a également été développé pour examiner le produit final et les intermédiaires. Composé d'une dizaine de techniques analytiques complémentaires, il a permis de caractériser les paramètres critiques des GNP.

TEM et UV-Vis ont été utilisés pour dimensionner le noyau tandis que DLS et SEC ont mesuré la particule entière. Outre la taille, la monodispersité et l'absence d'agrégation ont également été évaluées en utilisant la combinaison de ces quatre techniques.

RPLC-UV, ¹H NMR et les analyses élémentaires ont été utilisées pour caractériser la couronne de ligands. RPLC-UV a permis de quantifier le dérivé de Méthotrexate tandis que la combinaison de ¹H NMR et des analyses élémentaires a fourni des informations sur le rapport entre les différents ligands et leur densité.

La plateforme analytique complète telle que décrite permet la détection de changements infimes intra- ou inter-lots. Individuellement et collectivement, les techniques sont prêtes à soutenir les prochaines étapes de développement du produit. Néanmoins, d'autres méthodes pourraient être ajoutées, telles que l'utilisation d'autres détecteurs pour la LC. La MS et la *Charged Aerosol Detection* (CAD) ont par exemple été utilisées pour identifier et quantifier tous les ligands de la couronne dans une seule méthode chromatographique⁸⁷.

FORMULATION TOPIQUE - HYDROGEL DE CARBOPOL

MTC-100244 MTX-GNP nécessite un véhicule pour son utilisation locale par voie topique. Les hydrogels de Carbopol sont des formulations adaptées car MTC-100244 MTX-GNP est hydrosoluble. Du Carbopol 980 a été utilisé dans la publication Özcan *et al.* pour l'application des nanoparticules sur des lésions psoriasiques chez l'animal. Les différents Carbopol disponibles, leurs modalités de synthèse et de caractérisation ainsi que d'autres nanoformulations topiques sont passés en revue dans ce chapitre. Les principes de la pénétration cutanée et l'impact des GNP ultrapetites sont aussi évoqués.

1. Introduction

Tout produit pharmaceutique a besoin d'une formulation ou d'un véhicule sur mesure pour être administré. Pour les voies systémiques, par exemple, intraveineuses, intradermiques ou sous-cutanées, une dilution dans un tampon biocompatible tel que le chlorure de sodium, une solution saline tamponnée au phosphate ou de l'eau pour injection doit être effectuée^{85,194}.

L'administration topique, en revanche, nécessite une formulation plus complexe et le choix du véhicule est essentiel pour une efficacité optimale des composés API-NP. Par exemple, les NP peuvent être incorporées dans des formes posologiques semi-solides telles que des **hydrogels** ou utilisées dans un spray pour éviter les frottements.

Contrairement aux crèmes conventionnelles, les hydrogels ont l'avantage d'être **non collants** et de ne pas former de films gras. Ils **s'évaporent** rapidement et contribuent à l'**hydratation** de la peau. Cela améliore l'acceptabilité du patient et l'observance du traitement. De plus, les pommades lipophiles souffrent d'une répartition limitée du médicament de la formulation vers la peau¹³.

1.1. Vue d'Ensemble du Carbopol

Les polymères Carbopol de Lubrizol sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique comme excipients pour des applications topiques telles que des gels ou des crèmes¹⁹⁵. Lubrizol fournit une large gamme de polymères Carbopol qui diffèrent par leur composition et leur processus de synthèse.

Le Carbopol est composé d'acides polyacryliques de haut poids moléculaire qui agissent comme stabilisants, épaississants et modificateurs de rhéologie. Ils sont très solubles dans l'eau et les solvants polaires.

Le Carbopol peut être composé d'homopolymères (acide acrylique réticulé avec du saccharose allylique ou du pentaérythritol allylique), de copolymères (acide acrylique et acrylate d'alkyle C10-C30 réticulés avec du pentaérythritol allylique) ou d'interpolymères (homopolymère carbomère ou copolymère contenant un copolymère bloc de PEG et une longue chaîne d'ester d'acide alkylique).

Les polymères traditionnels sont synthétisés à l'aide de benzène et peuvent contenir des traces du composé cancérigène. La nouvelle génération utilise de l'acétate d'éthyle ou un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane comme solvants, et doit être préférée lors du développement de nouvelles formulations.

Le Carbopol présente des viscosités, des clartés, des tolérances ioniques ou au cisaillement distinctes selon sa composition. Une viscosité optimale est essentielle et affecte le taux de libération, de diffusion et la biocompatibilité du médicament. La rigidification diminue généralement le taux de libération¹⁹⁶.

Parmi les polymères de nouvelle génération, le **Carbopol 980** est adapté pour fabriquer un **hydrogel clair**. Il possède une viscosité relativement élevée, une grande clarté et une tolérance élevée au cisaillement. Le Carbopol 980 est un homopolymère composé d'acide acrylique réticulé avec de l'allyl pentaérythritol¹⁹⁷.

D'autres polymères, tels que Carbopol 974P ou EDT 2020, ont une viscosité et une tolérance au cisaillement inférieures à celles de 980, mais la tolérance ionique d'EDT 2020 est supérieure à 980. Le Carbopol 934 a les mêmes propriétés que le 974P, mais est considéré comme un polymère obsolète puisque sa synthèse implique du benzène. Un gel clair ne peut pas être obtenu avec le 974P. Le Carbopol doit donc être choisi avec soin pour obtenir la formulation optimale.

Le Carbopol 980 répond aux critères définis par la Pharmacopée Européenne et présente un très faible potentiel de toxicité et d'irritation. Sa concentration dans la formulation finale peut varier de 0,5 à 3 % en poids (p/p). Il est stable pendant deux ans lorsqu'il est stocké dans des récipients hermétiques, protégé de l'humidité et des températures excessives¹⁹⁸.

1.2. Carbopol et Nanoparticules

MTC-100244 MTX-GNP en solution aqueuse a une très faible viscosité et du Carbopol 980 a donc été utilisé comme véhicule pour l'administration topique. Le choix du Carbopol 980, de sa concentration et de son pH ont été étayés par la revue de littérature suivante.

Gabriel *et al.* ont utilisé du **Carbopol EDT 2020** (0,6 % p/p, pH 5,5 ajusté avec du NaOH, viscosité 20-25 Pa·s) avec une formulation de **nanoparticules polymériques** pour améliorer l'administration de **Tacrolimus**¹³. L'hydrogel de Tacrolimus-NP (0,1 % de Tacrolimus p/p) a été comparé à deux traitements disponibles dans le commerce : le Protopic® (une pommade contenant du Tacrolimus) et le Clobétasol en utilisant un modèle murin de psoriasis induit par **IMQ**. Le **dos rasé** des souris (C57BL/6) a reçu pendant **quatre jours** 120 mg d'Aldara® (crème IMQ), suivi de 40 mg/cm²/animal de traitement ou de contrôle **cinq heures après** l'application d'IMQ. La notation clinique a été réalisée en fonction de l'érythème cutané, de la desquamation et de l'épaisseur de la peau. L'histopathologie de l'épiderme et du derme a montré un dépôt accru dans *le stratum corneum*, l'épiderme viable et le derme supérieur, mais aucune perméation cutanée. Les effets systémiques ont également été surveillés (par exemple le rapport entre la rate et le poids corporel). La formulation de Tacrolimus-NP a été bien tolérée. La concentration de Tacrolimus formulé avec la NP dans la peau enflammée a été augmentée par rapport au contrôle Protopic®. De plus, l'efficacité clinique était similaire à celle du Clobétasol.

Carbopol EDT 2020 (0,25-0,5 % p/p, pH 6-6,5 ajusté avec de la triéthanolamine, viscosité 20-30 Pa·s, étalement 4,2-2,2 cm) a été utilisé par Avasatthi *et al.* avec une formulation de **nanoparticules lipidiques** pour améliorer l'administration du **MTX**¹⁵. L'hydrogel de MTX-NP (complété par des conservateurs tels que des parabènes et l'EDTA) a été comparé au MTX. À l'aide d'un modèle murin **IMQ**, le **dos rasé** des souris (BALB/c) a reçu pendant **dix jours** 62,5 mg d'ImiquadTM (5 % p/p de crème IMQ), suivi de **7 jours** avec le traitement ou les témoins. Le score PASI clinique a été déterminé et les changements histopathologiques (hyperkératose, orthokératose et parakératose) ont été surveillés. Le groupe traité avec le gel de MTX-NP présentait le PASI le plus bas, ainsi qu'une structure cutanée normale.

Kaur *et al.* ont utilisé du **Carbopol 980** (1,5 % p/p, pH 6,8 ajusté avec NaOH) avec une **nanoémulsion** pour améliorer l'administration de **Clobétasol** (0,05 % p/p) en association avec du **Calcipotriol** (0,005 % p/p)¹⁹⁹. Des antioxydants et des conservateurs (parabènes) ont également été ajoutés.

L'absorption cellulaire et la viabilité ont été évaluées à l'aide de cellules HaCaT (kératinocytes), tandis que la perméation cutanée a été mesurée avec des **cellules de diffusion Franz** sur de la peau d'oreille porcine. Dans un modèle murin **IMQ**, le **dos rasé et l'oreille** gauche de souris (BALB/c) ont reçu tous les **matins** pendant **six jours** de la crème IMQ (5 % p/p). Le traitement et les contrôles (0,05 % p/p de gel de Dipropionate de Bétaméthasone, Betagel[®]) étaient appliqués le **soir**. La notation clinique a été réalisée en fonction de l'érythème cutané, de la desquamation et de l'épaisseur de la peau. Les effets systémiques (par exemple le rapport entre la rate et le poids corporel) et les marqueurs de l'inflammation (taux de TNF- α et d'IL-6) ont également été étudiés. L'innocuité de la formulation a été déterminée à l'aide d'un modèle d'irritation cutanée *in vivo*. Tous les scores cliniques ont montré une activité anti-psoriasique plus élevée du gel de NP par rapport aux médicaments libres et à la formulation commerciale. L'absorption cellulaire et la pénétration cutanée ont été améliorées, mais aucune perméation et une irritation cutanée négligeable ont été observées avec les NP.

Carbopol 980 (1 % p/p, pH 6 apparemment ajusté avec de la triéthylamine, bien que non recommandé) a été utilisé comme véhicule pour un **nanolipidgel** par Wavikar *et al.*²⁰⁰. La viscosité, l'étalement et l'adhérence ont été soigneusement mesurés. La perméation cutanée *in vitro* a été réalisée à l'aide de cellules de Keshary Chien modifiées et l'irritation cutanée a été évaluée sur des lapins.

Panonnummal *et al.* ont utilisé un **Carbopol** ou un **nanogel** de chitine avec du **MTX**³. Les cellules HaCaT et THP-1 ont été utilisées pour les tests d'absorption cellulaire et de viabilité. La perméation cutanée a été mesurée avec des **cellules de diffusion Franz** sur de la peau d'oreille porcine. La quantification du MTX a été effectuée par RPLC. Une expérience murine (souris BALB/c) de psoriasis induit par **IMQ** a été réalisée pendant trois semaines en utilisant des scores PASI et histologiques pour mesurer la gravité des lésions psoriasiques, tandis que des échantillons sanguins ainsi que le poids des animaux et de leur rate ont été utilisés pour évaluer la toxicité systémique. L'IMQ a été appliqué sur la **peau du dos** pendant **7 jours** et les traitements pendant les **20 jours** suivants. L'IMQ a également été réintroduit 3 fois pendant 3 jours. MTX-NP ont montré une pénétration accrue dans les couches profondes de la peau. La charge positive du nanogel pourrait avoir eu un effet positif car les interactions électrostatiques améliorent la pénétration cutanée. Les résultats *in vivo* ont montré une amélioration clinique majeure avec le gel de MTX-NP sans effets secondaires significatifs.

Carbopol 974P (1 % p/p, pH 6,2-6,8 ajusté avec de la triéthanolamine, viscosité 9,75 Pa·s, étalement 5,3 g cm/s, semi-transparent) a été utilisé par Bikkad *et al.* avec des ***solid-lipid nanoparticles*** encapsulant un **corticoïde** pour améliorer l'efficacité et minimiser les effets secondaires¹⁹⁶. Le polymère a été choisi en fonction de sa compatibilité avec la NP et de ses caractéristiques (viscosité et étalement). Des conservateurs (parabènes) ont été ajoutés à la formulation. Différentes concentrations ont été examinées et une agitation magnétique pendant la nuit a été utilisée pour assurer la dispersion homogène et l'absence d'air piégé. L'aspect visuel, le pH, la viscosité et l'étalement (études rhéologiques) ont été déterminés. Des **cellules de diffusion Franz** avec de la peau de cadavre humain ont été utilisées pour analyser la perméation/rétention des formulations dans la peau. Un test d'irritation cutanée sur des lapins a également été effectué. La formulation de NP a montré une faible irritation et une performance supérieure *in vitro* : réduction de la perméation cutanée et augmentation du dépôt après 12 heures. La stabilité de la formulation lors de cycles de congélation-décongélation a également été évaluée.

Carbopol 934 (1-1,5 % p/p) a été utilisé par Raza *et al.* pour formuler des **émulsomes** avec du Dithranol²⁰¹ et des **liposomes**, des ***solid-lipid nanoparticles***, des ***nanostructured lipid carriers*** et des **éthosomes** avec un rétinoïde (Trétinoïne)²⁰². Le groupe a mesuré l'activité anti-psoriasique avec son modèle de queue de souris à la recherche d'une orthokératose dans une zone normalement caractérisée par une parakératose. Les souris LACA ont reçu les formulations quotidiennement pendant trois semaines. L'effet anti-psoriasique des nanoparticules était constamment supérieur aux produits commercialisés.

Carbopol 934 (1,5% p/p, pH 5,5-7,4 ajusté avec NaOH) a été utilisé par Ferreira *et al.* avec des **particules lipidiques**²⁴. **MTX** a été encapsulé et le mAb anti-TNF- α Etanercept ancré à la surface de la NP. Le but de l'association était l'obtention d'un effet synergétique similaire à l'association des dermocorticoïdes avec les analogues de la vitamine D3. Différentes concentrations de Carbopol (0,5-2 %) ont été testées avec les MTX-NP et le MTX libre. 1,5 % p/p a été choisi après des analyses de viscosité et d'étalement. La RPLC a été utilisée pour quantifier le MTX encapsulé et *in vitro*. Les cellules HaCaT (kératinocytes) et L9329 (fibroblastes) ont été utilisées pour déterminer la viabilité cellulaire. En utilisant des **cellules de diffusion Franz**, trois modèles de perméation cutanée *in vitro* ont été testés : la peau d'oreille de porc, la peau saine humaine et la peau psoriasique. Tous ont montré une accumulation accrue de MTX dans la peau avec une perméation réduite.

2. MTC-100244 MTX-GNP et Carbopol 980

2.1. Préparation de l'Hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP avec Carbopol 980

Les préparations de Carbopol nécessitent un protocole défini pour éviter les défauts de dispersion qui peuvent survenir lors de l'ajout de solvant²⁰³. Un ajout ou un mélange inapproprié peut entraîner la formation d'amas de particules insolubles ayant pour conséquence un gel avec une viscosité réduite. Un mélangeur motorisé avec un *open-blade impeller* à une vitesse de 800-1200 tr/min est recommandé pour l'agitation à l'échelle R&D. La procédure consiste en l'ajout lent du polymère sec au solvant, suivi d'un mélange à vitesse réduite pour éviter un piégeage d'air excessif. Ensuite, une base alcaline (NaOH) ou amine organique (triéthanolamine) doit être ajoutée lentement pour neutraliser le pH du mélange de 2,5-3,5 à 6,5-7,5²⁰⁴. Les rapports habituels entre la base et le Carbopol sont respectivement de 1,5/1,0 pour la triéthanolamine et 2,3/1,0 pour le NaOH à 18 %. Une neutralisation correcte est essentielle pour obtenir la viscosité optimale car le polymère neutralisé subit une réticulation. 0,5 % p/p de HCl peut être utilisé pour briser la mousse qui se forme lors de l'échantillonnage du polymère.

Les spécifications finales de formulation topique de MTC-100244 MTX-GNP sont **1,0 % p/p de Carbopol 980** neutralisé avec de la **triéthanolamine, 0,5 à 1,0 % p/p d'or** (5 à 10 mg Au par g de gel) et **0,15 à 0,50 % p/p de MTX** (1,5 à 5,0 mg de MTX par g de gel). Le ratio MTX/Au dépend de la quantité attachée à MTC-100244 MTX-GNP.

Les formulations de MTC-100244 MTX-GNP avec 0,5 ou 1,0 % p/p d'or sont obtenues de la manière suivante. La solution de MTC-100244 MTX-GNP pour addition au gel est obtenue par ultrafiltration centrifuge à l'aide de filtres Amicon 10 kDa (Merck). Une quantité connue d'or est ajoutée aux filtres et les GNP sont centrifugées. Le filtrat est redilué à l'aide d'une balance tarée pour obtenir la concentration cible de 10 ou 20 mg/mL Au. Un gel de Carbopol 980 2,0 % p/p est synthétisé par addition lente de 1 g de polymère dans 48 mL d'eau dans un récipient agité à 500 tr/min. Après une incubation d'une nuit, le gel trouble est lentement neutralisé (pH 6,8-7,2), tout en remuant à basse vitesse, avec de la triéthanolamine (1-2 mL). Ensuite, éventuellement, de l'eau jusqu'à 50 mL est ajoutée pour produire un gel neutre et clair de Carbopol 980. La solution de GNP avec une concentration d'or de 10 ou 20 mg/mL est finalement ajoutée au gel neutralisé dans un rapport de 1:1 p/p. Le pH est contrôlé après chaque étape.

2.2. Caractérisation de l'Hydrogel de MTC-100244 MTX-GNP

La caractérisation habituelle des gels de NP comprend la quantification de l'API par LC-MS, le dimensionnement des particules par DLS et TEM, le pH et la mesure rhéométrique de la viscosité et de l'étalement^{13,15,199}. Les NP doivent avoir une taille similaire en solution et dans le gel et ne présenter aucun signe d'agrégation. Le pH du gel doit être neutre et stable après l'ajout des NP. La viscosité doit correspondre aux spécifications édictées par le fournisseur. L'étalement est généralement affectée par l'ajout des NP. L'aspect visuel, à savoir la couleur ou la consistance, doit également être inspecté et reporté.

3. Pénétration Cutanée

La diffusion passive des molécules à travers la peau est le principal mécanisme impliqué dans la pénétration cutanée. Il peut se produire par trois voies distinctes : intercellulaire, intracellulaire et appendiculaire, c'est-à-dire, à travers les follicules pileux, les glandes sébacées et les canaux sudoripares (Figure 30)^{10,205}. Un transport actif peut également s'effectuer par l'intermédiaire de transporteurs de protéines.

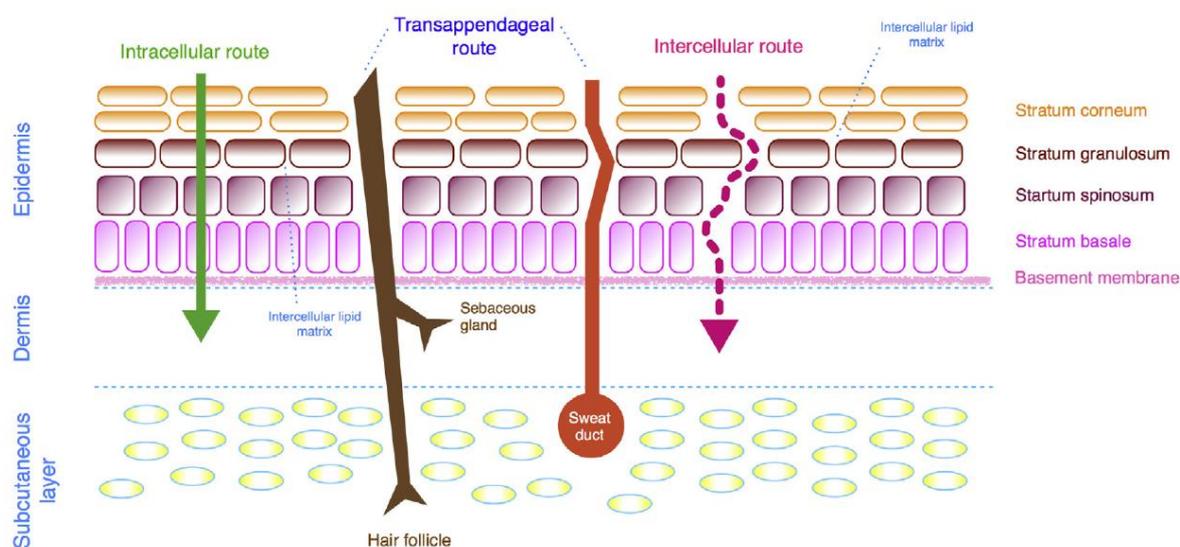


Figure 30 : Différentes voies impliquées dans la pénétration cutanée des nanoparticules²⁰⁵.

La couche supérieure de l'épiderme, le *stratum corneum*, empêche l'entrée de molécules d'un MW supérieur à 500 g/mol (0,5 kDa). Le MTX est proche de cette limite (454,44 g/mol), et possède un MW similaire aux corticostéroïdes Clobétasol (466,97 g/mol) et Bétaméthasone (392,46 g/mol). Néanmoins, contrairement aux corticostéroïdes, son hydrophilie et ionisation à pH physiologique contribuent à sa mauvaise absorption cutanée.

Selon Jadzinsky *et al.*, une GNP avec un noyau de 2 nm est composée en moyenne de 44 ligands et de 102 atomes d'or dans le noyau⁵⁵. En utilisant l'estimation la plus conservatrice supposant que 100 % de la couronne de MTC-100244 MTX-GNP est composée du ligand qui a le MW le plus faible (α -Galactose-C₂, 240,27 g/mol), le MW total des GNP serait supérieur à 30 kDa.

La **pénétration** cutanée doit être optimale et atteindre les couches les plus profondes de l'épiderme ou du derme, mais la **perméation** doit être minimale pour réduire les effets secondaires systémiques. Des exhausteurs de pénétration tels que le propylène glycol ou le DMSO peuvent être utilisés¹⁰.

Une peau saine ou endommagée ne réagira pas avec les GNP de la même manière, car un *stratum corneum* perturbé peut laisser passer les molécules intercellulairement (jonctions serrées lâches) et a un renouvellement plus élevé des kératinocytes¹⁰.

L'analyse élémentaire (teneur en or, par ICP-AES) et des images de coupes transversales cutanées (par TEM) sont utilisées pour localiser et quantifier la quantité de GNP dans les différentes couches de la peau²⁰⁶. Les **cellules de diffusion de Franz** sont un modèle *in vitro* commun pour étudier la pénétration et la perméation²⁰⁷. Les expériences *in vivo* avec des modèles animaux comme le modèle murin de psoriasis induit par **IMQ** ont l'avantage d'être plus représentatives d'une réalité clinique mais ont un coût économique et éthique plus élevé.

La pénétration des GNP dans la peau est influencée par leurs propriétés physicochimiques telles que la taille, la forme, la charge et les ligands dans la couronne. Les GNP ont l'avantage d'être généralement non toxiques et de ne pas provoquer de sensibilisation ou de libération d'ions. L'interaction avec les milieux biologiques doit être soigneusement évaluée, car l'adsorption sur les protéines ou l'agrégation peut avoir lieu. Cela peut modifier la taille (passage de la taille primaire à secondaire) ou altérer les propriétés des particules. Ces changements doivent être évalués en utilisant des solutions de milieux physiologiques (contenant des macromolécules avec différents groupes fonctionnels) ou de la sueur synthétique (contenant des électrolytes)²⁰⁵. Les données sont parfois contradictoires, mais certaines conclusions peuvent être tirées. La pénétration est plus élevée dans la peau endommagée par rapport à une peau saine²⁰⁶. Les particules plus petites ont tendance à pénétrer plus profondément et en plus grand nombre que leurs homologues plus grandes. D'autres paramètres critiques comprennent la posologie, le véhicule ou la méthode pour obtenir une peau endommagée (dommages chimiques et mécaniques ou biopsies de lésions)²⁰⁸.

Fernandes *et al.* ont utilisé des nanosphères et des nanotiges recouvertes de PEG avec une amine (positive) ou un acide carboxylique terminal (négative). Les GNP positives et les nanotiges ont pénétré la peau en plus grand nombre²⁰⁸. Gupta *et Rai* ont modélisé la pénétration de GNP ultrapetites (2-6 nm) et ont révélé que les plus petites devraient pénétrer davantage. Ils ont également prédit que la pénétration du GNP ultrapetites ne devrait pas perturber la peau saine²⁰⁹. Le même groupe a postulé que les GNP ultrapetites chargées négativement présenteraient moins de pénétration que les particules neutres²¹⁰. Lin *et al.* avec un modèle de GNP ultrapetites ont défini la charge comme un paramètre critique qui doit être finement réglé pour obtenir une interaction avec la membrane cellulaire et une absorption sans provoquer de perturbation et de toxicité de la membrane²¹¹. Le consensus est que l'absorption de particules chargées positivement est plus élevée en raison des interactions avec les membranes cellulaires chargées négativement.

4. Conclusion

L'examen des différentes formulations d'hydrogel de Carbopol montre que 1 % p/p de Carbopol 980 utilisé pour la **formulation** de MTC-100244 MTX-GNP est **conforme** à la littérature et aux instructions du fabricant. Néanmoins, il ouvre des **perspectives d'optimisation** de la formulation en changeant le type de Carbopol et sa concentration et en utilisant la caractérisation rhéologique pour mesurer la viscosité et l'étalement. Un autre paramètre important qui peut être modifié est la concentration de MTX-GNP dans le gel qui est de 0,5 ou 1,0 % p/p d'or mais pourrait sans doute être augmentée jusqu'à 2 % p/p d'or. De plus, l'ajout d'un autre API dans le gel, libre ou lié aux NP, pourrait améliorer l'efficacité en utilisant des mécanismes d'action synergétiques.

Le **modèle murin de psoriasis induit par IMQ** est souvent utilisé pour tester les formulations et a montré que le protocole expérimental d'Özcan *et al.*¹² (publication avec MTC-100244 MTX-GNP) était conforme aux pratiques standards. Néanmoins, dans presque toutes les publications, l'emplacement des lésions était sur le dos des souris plutôt que l'oreille.

En ce qui concerne MTC-100244 MTX-GNP, la **taille ultrapetite** est parfaitement adaptée pour permettre une pénétration dans la peau sans perturbation. MTX-GNP permet l'utilisation topique du MTX en modifiant ses propriétés physicochimiques. Des **modèles biologiques** sont néanmoins nécessaires (par exemple, des **cellules de diffusion de Franz**) pour mieux comprendre le niveau de pénétration, de perméation et d'accumulation du MTX et des GNP dans la peau, ainsi que les différences entre les peaux saines et psoriasiques.

MTC-100244 MTX-GNP ET CANCER

L'oncologie est une autre application majeure du Méthotrexate. Par rapport au psoriasis et à la polyarthrite rhumatoïde, les doses sont supérieures et l'effet est antinéoplasique au lieu d'être anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Ce chapitre explique les mécanismes impliqués dans l'effet anticancéreux du Méthotrexate. De plus, le potentiel oncologique de MTC-100244 MTX-GNP et les essais réalisables pour le valider sont évoqués. En effet, la combinaison pourrait augmenter l'efficacité du MTX ou en améliorer l'innocuité à travers des mécanismes tels que le ciblage des cellules cancéreuses.

1. Folates, Antifolates et leurs Récepteurs

Les folates et les antifolates, tels que le MTX, sont internalisés par les cellules suivant différents mécanismes de transport en fonction de l'organe, du type cellulaire et de la nature saine ou cancéreuse des cellules²¹². Les folates sont essentiels aux cycles métaboliques, mais ne peuvent pas être synthétisés par les eucaryotes, ce qui rend leur assimilation essentielle à la survie cellulaire. Perturber le métabolisme du folate et *in fine* le métabolisme et la division des cellules est donc une approche de chimiothérapie courante¹⁷⁵. Les antifolates sont des antimétabolites qui partagent une structure avec l'Acide Folique (FA) et possèdent les mêmes mécanismes d'entrée et les mêmes cibles¹⁸¹.

Le MTX est utilisé pour le traitement du cancer depuis 1949. Actuellement, les indications couvrent le cancer du sein, le cancer de la tête et du cou, le cancer du poumon, les leucémies, les lymphomes et l'ostéosarcome^{213,214}. Les **doses** utilisées pour obtenir l'effet antinéoplasique cytotoxique sont supérieures au seuil anti-inflammatoire pour le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde, respectivement 1 à 5 g par semaine et 7,5 à 25 mg par semaine²¹⁵. **À fortes doses**, le MTX affecte la synthèse de l'ADN. Le MTX inhibe l'enzyme cytosolique **Dihydrofolate Reductase** (DHFR) qui réduit le folate en tétrahydrofolate. Les cellules sont alors incapables de générer le N⁵,N¹⁰-methylene tetrahydrofolate qui est nécessaire à la synthèse du monomère d'ADN désoxythymidine monophosphate. À faibles doses, on pense que l'effet pharmacologique est dû à l'inhibition de l'enzyme Aminoimidazole-Carboxamide Ribonucleoside (AICAR) Transformylase, provoquant une accumulation d'AICAR et *in fine* d'adénosine ce qui a des effets anti-inflammatoires²¹⁶.

Une **résistance** au MTX et aux autres antifolates peut survenir. La résistance est principalement due à des modifications métaboliques des cellules cancéreuses, telles qu'une réduction de l'absorption du MTX, une réduction de la polyglutamation du MTX (un mécanisme qui augmente le temps de rétention des antifolates dans les cellules), une augmentation de l'efflux, des changements dans les enzymes cibles ou des modifications des mécanismes d'internalisation¹⁷⁵.

L'internalisation se fait par le biais de deux principaux mécanismes distincts¹⁷⁸:

- Transport par des canaux membranaires : **Reduced Folate Carrier (RFC)**
- Endocytose médiée par des récepteurs : **Folate Receptor (FR)**.

RFC et FR fonctionnent indépendamment, possèdent des affinités différentes pour le FA et les antifolates, et ont une distribution tissulaire différente.

RFC (60 kDa) est un transporteur bidirectionnel. L'influx est un transport concentratif (gradient), tandis que l'efflux nécessite de l'énergie. L'affinité de RFC pour le FA est plus faible par rapport au MTX (K_m de 200-400 μM et 1-10 μM , respectivement). RFC est le principal mécanisme d'efflux des folates. RFC est présent dans tous les tissus sains.

FR (38-40 kDa) nécessite de l'énergie et reste actif en dessous du pH physiologique (jusqu'à pH 5). Les FR forment souvent des clusters à la surface des cellules. L'affinité de FR pour le FA est supérieure au MTX (K_m de 1-10 nM et 10-300 nM, respectivement).

FR est la voie de transport prédominante à faible niveau sanguin de MTX (100-500 nM), tandis que RFC est la voie principale pour des concentrations plus élevées (1-10 μM), en raison de son rythme de recyclage plus rapide. Trois isoformes de FR ont été décrites : alpha, bêta et gamma.

FR α , également connu sous le nom de **FOLR1**, est surexprimé dans des tumeurs telles que les carcinomes de l'ovaire, du sein, des poumons et des reins, mais son expression est très limitée dans les cellules saines. Il est limité à la surface apicale de l'épithélium (non exposée à la circulation sanguine) de quelques tissus sains : les reins, les poumons, la thyroïde, le plexus choroïde et le placenta.

FR β (FOLR2) est présent sur les macrophages activés et participe aux maladies inflammatoires et auto-immunes, ainsi qu'à certains cancers par sa présence sur les Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM) qui suppriment la réponse immunitaire contre la tumeur et favorisent la croissance et la formation de métastases¹⁷⁷.

FR γ (FOLR3) est une protéine sécrétée dans la circulation sanguine²¹⁷.

Le MTX est un acide dicarboxylique faible avec des valeurs de pKa de 4,8 et 5,5²³. En dessus de ces valeurs, les acides carboxyliques sont déprotonés. Cette caractéristique chimique signifie qu'à pH physiologique, le MTX ne peut pas traverser passivement les membranes cellulaires, laissant les deux récepteurs mentionnés ci-dessus comme les uniques voies pour son absorption cellulaire¹⁷.

L'expression de FR et RFC est modulée par des *stimuli* internes et externes, tels que l'exposition aux médicaments chimiothérapeutiques. Les modifications peuvent être quantitatives, telles que l'augmentation ou la diminution de l'expression des récepteurs, ou qualitatives, avec des altérations structurelles qui modifient l'affinité pour les substrats. La diminution de l'expression de RFC conjuguée à l'augmentation de FR est un mécanisme de résistance aux antifolates (l'absorption du MTX se faisant principalement via le RFC) et une adaptation au besoin accrue en folates des cellules cancéreuses pour soutenir leur hypermétabolisme.

2. MTC-100244 MTX-GNP pour le Traitement du Cancer

Les publications utilisant le MTX associé aux nanoparticules pour le traitement du cancer ont démontré la validité de cette approche pour **améliorer son efficacité et son innocuité**. Des études ont été menées avec des nanoparticules de nombreux types, telles que des nanoparticules polymériques, métalliques ou lipidiques/vésiculaires (voir section *État de l'art des Methotrexate Gold Nanoparticles Publiées*)¹⁷⁶. On peut aussi s'attendre à une augmentation de la **demi-vie** du MTX (7 heures) et de l'**index thérapeutique** avec MTC-100244 MTX-GNP.

Le MTX combiné aux NP peut être considéré **à la fois comme un agent de ciblage et un agent thérapeutique**²¹⁸ (Figure 31). Cette double propriété est un avantage majeur par rapport aux autres molécules utilisées pour cibler les cellules cancéreuses. Les cell-penetrating peptides (CPP) améliorent l'absorption à travers les membranes cellulaires⁴⁴ et le cyclic arginine-glycine-aspartic acid (cRGD) peptide cible l'intégrine $\alpha V\beta 3$, un récepteur surexprimé dans une variété de cancers^{28,151}. Néanmoins, ils ne provoquent pas de cytotoxicité, et un deuxième ligand doit être ajouté pour induire la mort cellulaire. Le FA fait face au même problème car il ne peut qu'augmenter le ciblage et l'adsorption.

MTC-100244 MTX-GNP pourrait, de plus, être une stratégie pour **réduire les effets secondaires**. MTC-100244 MTX-GNP **ne devrait pas pénétrer dans les cellules via RFC** en raison de sa taille et, par conséquent, l'absorption dans les cellules saines devrait être très limitée, améliorant ainsi la tolérance. C'est un avantage majeur puisque le but de la chimiothérapie est de détruire les cellules malignes avec des dommages limités aux tissus sains.

La présentation **multivalente** du MTX dans la couronne des GNP pourrait augmenter l'absorption médiée par FR par endocytose via la liaison de plusieurs unités de MTX aux récepteurs FR exprimés en clusters sur la membrane cellulaire. Cette augmentation de l'absorption pourrait se traduire par **une cytotoxicité plus élevée** que le MTX libre à la même dose.

De plus, on pense que le dérivé thiol MTX-SH est principalement **libéré** de la couronne des GNP **intracellulairement** par échange avec le glutathion dans l'endosome/lysosome tardif après absorption par FR^{48,177}. MTX-SH pourrait ne pas subir autant d'**efflux** (dont l'augmentation du mécanisme de **résistance** des tumeurs au Méthotrexate) que le MTX par RFC, en raison de sa structure proche du **Méthotrexate polyglutamé**. Comme cela a été décrit dans la section *Dérivés de Méthotrexate*, la dérivatisation a été conçue pour réduire l'encombrement stérique et minimiser la réduction de l'affinité avec les cibles.

L'excrétion de MTC-100244 MTX-GNP devrait principalement avoir lieu par les reins dans l'urine. Aucune toxicité due à la bioaccumulation des NP n'est attendue en raison de la taille ultrapetite des particules (à la fois le noyau et l'ensemble)²¹⁹.

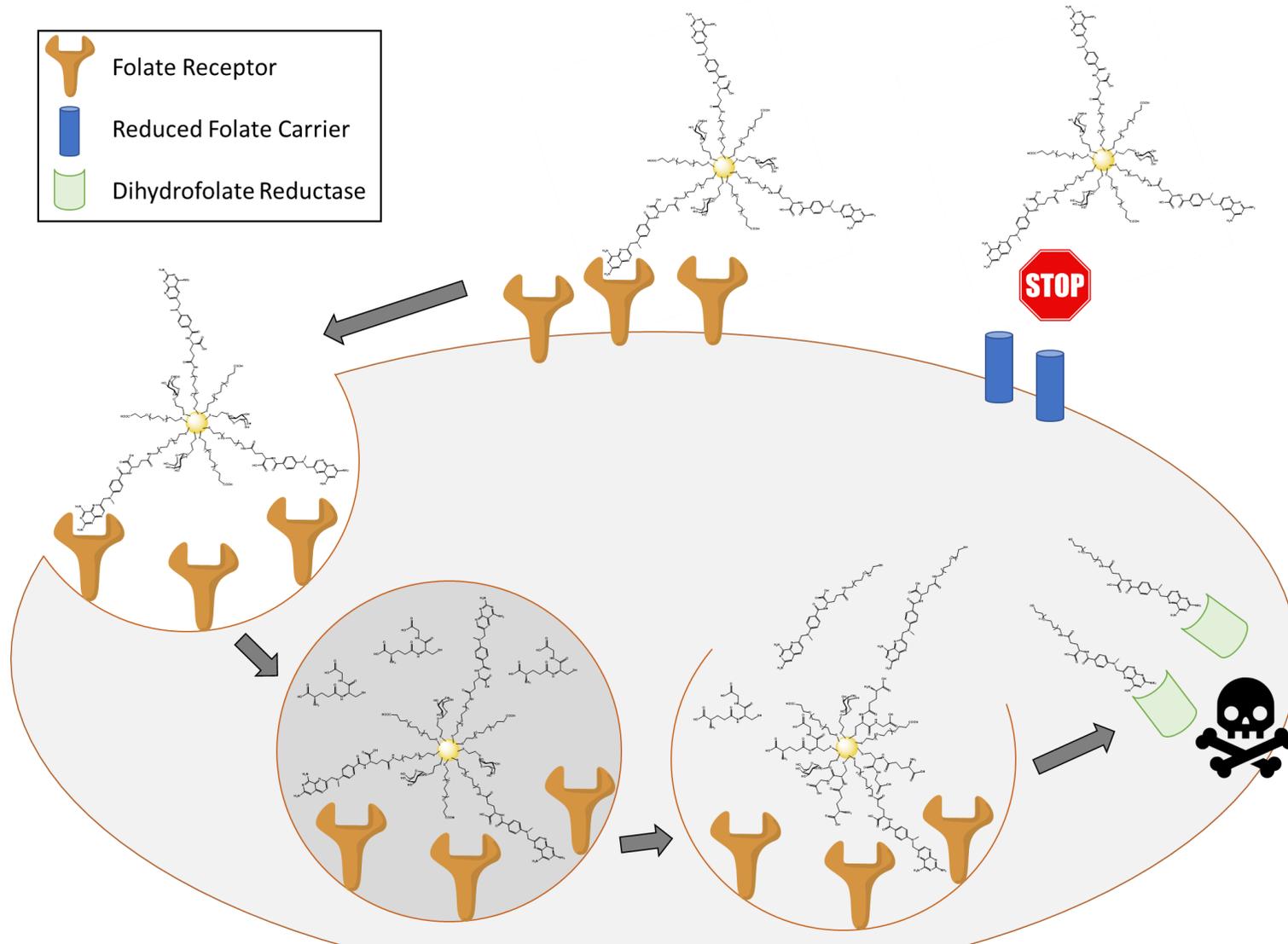


Figure 31 : Potentiels mécanismes d'absorption et devenir intracellulaire de MTC-100244 MTX-GNP. MTC-100244 MTX-GNP, contrairement au MTX, ne devrait pas être en mesure de passer à travers RFC pour pénétrer dans les cellules. La liaison aux FR devrait déclencher une endocytose potentiellement améliorée par un effet de cluster. Dans l'endosome, le dérivé thiol de Méthotrexate serait libéré par échange de ligands avec le glutathion. Le dérivé de Méthotrexate libre se lierait ensuite à l'enzyme Dihydrofolate Reductase et favoriserait la mort cellulaire. L'efflux du dérivé de Méthotrexate est censé être plus limité que pour le MTX en raison de sa structure « polyglutamée ».

Pour étudier le potentiel de MTC-100244 MTX-GNP dans le traitement du cancer, il est nécessaire d'utiliser des modèles *in vitro* et *in vivo* adéquats avec des cellules surexprimant FR α et se développant rapidement dans les modèles de xénogreffes. Les **cellules KB**, dérivées d'un cancer du col de l'utérus, sont considérées comme le standard en raison de leur **niveau élevé d'expression de FR α** , de leur croissance rapide et de leur facilité de culture^{121,218,220,221}. Les cellules ovariennes sont également particulièrement intéressantes, puisque 90 % des cas cliniques surexpriment FR α ²²². D'autres lignées cellulaires cancéreuses FR α positives comprennent les cancers du col de l'utérus (HeLa^{104,115,119,218,220}, KB-V1 (multirésistant, dérivé de KB)), les cancers ovariens (IGROV-1, SKOV-3, SKOV-3.ip), les choriocarcinomes (JAR, BeWo) et les cancers de l'endomètre (EFE-184). Toutes ces lignées cellulaires peuvent se développer dans des milieux appauvris en folate. Le niveau d'expression FR du plus élevé au plus bas est KB > KB-V1 > SKOV-3.ip > IGROV-1 > HeLa ~ SKOV-3 ~ JAR > BeWo > EFE-184. KB et KB-V1 sont les lignées cellulaires les plus agressives dans les modèles de xénogreffes, tandis que HeLa et SKOV-3 se développent très lentement²²⁰. Les cellules cancéreuses du sein **MDA-MB-231**^{106,114,119,120} et **MCF-7**^{106,114,116,118,119,120,122,218} ou les cellules cancéreuses colorectales **HCT-116**^{105,114,126} sont les plus utilisées dans les études impliquant les MTX-NP pour les applications oncologiques (voir section *État de l'art des Methotrexate Gold Nanoparticles Publiées*). Le consensus concernant le niveau d'expression de FR α est le suivant : MDA-MB-231 > MCF-7 > HCT-116.

In vitro, les contrôles avec des agonistes de FR α et de RFC sont également essentiels : le FA peut être utilisé pour le premier et le folinate de calcium pour le second¹⁷⁸. **A549**^{105,114,115,119,125,126} (carcinome du poumon) et PC-3 (carcinome de la prostate)^{104,115} sont les cellules de **contrôle FR négatives** les plus utilisées.

Des tests cytostatiques de MTC-100244 MTX-GNP avec des cellules qui ne surexprime pas FR α : U-87 MG (glioblastome) et Hep3B (carcinome hépatocellulaire) ont déjà montré une efficacité¹⁰².

L'absorption cellulaire peut être mesurée à l'aide d'une analyse élémentaire pour quantifier l'or internalisé ou via une molécule de fluorescence associée à la couronne des GNP. Les tests XTT et MTT sont utilisés pour mesurer la cytotoxicité.

Des tests biomoléculaires peuvent être utilisés pour déterminer l'affinité des NP envers FR α ou l'inhibition de l'enzyme DHFR²¹⁸.

Des protéines FOLR1 et FOLR2 recombinants peuvent être greffées sur des capteurs sur puce pour quantifier l'affinité de liaison avec MTC-100244 MTX-GNP et mesurer sa cinétique à l'aide de techniques telles que la résonance plasmonique de surface (SPR) ou l'interférométrie à biocouche (BLI). Ces techniques peuvent non seulement valider la présence d'une liaison significative, mais permettent également le criblage et le triage de différentes molécules candidates avec, par exemple, une taille, une valence ou un design de ligand différent. Les taux d'association et de dissociation qui sont essentiels à l'efficacité des systèmes multivalents peuvent être mesurés. Les taux de dissociation lents associés aux plateformes multivalentes peuvent être un avantage car les NP ne se détachent pas facilement des récepteurs. Une liaison non spécifique peut également être mesurée.

La DHFR est une enzyme cytosolique qui catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate. C'est la cible principale du MTX, et un test d'inhibition enzymatique peut être effectué pour comparer les NP. L'inhibition de DHFR est un test court et simple, mais essentiel pour valider l'activité des dérivés de Méthotrexate ou des MTX-GNP afin d'optimiser leur conception.

Des tests d'inhibition enzymatique peuvent également être effectués avec des cibles secondaires du MTX telles que la Thymidylate Synthase et la Deoxycytidine Kinase.

Une fois validée par des méthodes biomoléculaires et de biologie *in vitro*, la pertinence de la plateforme NP doit être validée *in vivo* avec des modèles précliniques tels que les xéno greffes.

Au cours de cette étape, le choix de la **voie d'administration** est critique. L'administration systémique expose toutes les cellules et, bien que l'on pense qu'un ciblage passif de la tumeur par effet EPR se produit, les effets hors cible ne peuvent être complètement évités, limitant la posologie. L'administration intratumorale peut être une solution, avec la perfusion directe dans la zone ciblée sans circulation systémique préalable²²³. Des Méthotrexate-NP ont été injectées par voie intratumorale et ont montré une efficacité dans un modèle murin avec une approche décrite comme de la nanochimiothérapie²²⁴. Les tumeurs liquides (leucémies et lymphomes) pourraient également être une indication, car aucun ciblage tissulaire n'est nécessaire et le MTX est indiqué pour ces pathologies.

Des **méthodes de synergie** utilisant la toxicité du MTX et **l'irradiation** des tumeurs pour tirer parti des propriétés sensibilisantes du noyau d'or sont prometteuses comme l'ont démontré Agabeigi *et al.* avec des FA-MTX-NP en utilisant MDA-MB-231 et MCF-7¹⁰⁶. Des nanoparticules ultrapetites porteuses de FA ont aussi montré des résultats encourageants *in vitro* avec des cellules HeLa et MCF-7 après une exposition à de la lumière pulsée²²⁵.

Des FA-NP ont été utilisées pour générer des dommages à la membrane cellulaire par hyperthermie qui ont entraîné une sensibilité plus élevée lors de l'ajout ultérieur de la molécule cytotoxique Cyclophosphamide avec les cellules MDA-MB-231²²⁶.

La **co-administration** de MTX et d'un autre médicament cytotoxique lié aux NP par un groupe thiol ou disulfure présente un intérêt particulier. En effet, ces molécules peuvent être directement ancrées au noyau des GNP sans modification et libérées par échange avec le glutathion intracellulaire. Cette catégorie comprend des médicaments tels que le prometteur taxoïde Vintafolide (un dérivé disulfure de la Vinblastine) et le maytansinoïde Mertansine (DM1)^{95,177}.

Pour résumer, le MTX couplé à une plateforme GNP pourrait améliorer les propriétés physicochimiques et biologiques du médicament ou de créer des approches synergétiques, ce qui en fait un composé très attrayant dans le domaine de l'oncologie.

CONCLUSION

Cette Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie (PharmD) est composée de plusieurs revues de la littérature scientifique et d'une partie expérimentale de chimie organique et analytique. Le sujet principal est les nanoparticules d'or couplées au Méthotrexate. En particulier Midacore™, la plateforme de nanoparticules d'or sphériques ultrapetites développée par Midatech Pharma, et le composé MTC-100244 MTX-GNP, qui a été utilisé avec succès dans un modèle préclinique du psoriasis.

L'épidémiologie et la physiopathologie du psoriasis ont mis en évidence le fardeau clinique important et l'impact économique substantiel de la maladie. La chronicité du psoriasis est due à l'absence de traitements curatifs. Bien que de nombreux traitements aient été développés, ils souffrent tous d'inconvénients majeurs. Les traitements topiques avec des corticostéroïdes manquent d'efficacité à long terme. Les traitements systémiques, parmi lesquels le Méthotrexate, génèrent des effets secondaires. La majeure partie de l'arsenal thérapeutique est ancienne et les nouvelles thérapies, comme les anticorps monoclonaux, ne sont pas couramment utilisées en raison de leur prix prohibitif ou de la nécessité d'administration parentérale. Dans ce contexte, il a été démontré que la nanodermatologie a un grand potentiel pour améliorer l'administration topique de médicaments déjà approuvés tels que le Méthotrexate.

Les nanoparticules d'or sont très diverses en taille et en composition de couronne. Elles sont multivalentes et peuvent être multifonctionnelles. Les particules sphériques ultrapetites sont généralement obtenues par une synthèse de Brust-Schiffrin. MTC-100244 MTX-GNP appartient à cette famille et est composé d'un noyau d'or et de multiples copies de divers ligands : un dérivé du monosaccharide α -Galactose, un polyéthylène glycol court chargé négativement et un dérivé de Méthotrexate, tous liés de manière covalente au noyau. MTC-100244 MTX-GNP a été conçu avec ces trois ligands dans le cadre des pipelines de recherche Midacore™. Incorporés dans un hydrogel, MTC-100244 MTX-GNP a été testé topiquement dans des modèles psoriasiques précliniques *in vivo*. Une amélioration des marqueurs cliniques, histologiques et biologiques par rapport au Méthotrexate seul et à la norme de soins de corticostéroïdes topiques a été observée.

Une revue d'autres nanoparticules couplées au Méthotrexate a mis en évidence l'intérêt scientifique pour l'utilisation du médicament avec des plateformes de nanoparticules ainsi que les avantages de MTC-100244 MTX-GNP. En effet, la plupart des nanoparticules n'étaient pas ultrapetites et le Méthotrexate n'était généralement pas modifié et donc pas lié de manière covalente aux nanoparticules. Par conséquent, la quantité de Méthotrexate attachée (ratio entre le Méthotrexate et l'or) était moins importante et la stabilité des nanoparticules plus faible. Contrairement à MTC-100244 MTX-GNP, l'oncologie était l'application principale dans les publications.

La synthèse de Brust-Schiffrin repose sur un réducteur puissant, le borohydrure de sodium, pour nucléer les particules en présence et d'un sel d'or et de ligands qui forment la couronne. Les nanoparticules sont obtenues à l'aide d'un réacteur de paillasse et purifiées par ultrafiltration. Les ligands peuvent être incorporés soit pendant l'étape de Brust-Schiffrin, soit ultérieurement par post-fonctionnalisation ou échange de ligands. La post-fonctionnalisation utilise des ligands de la couronne comme points d'ancrage, tandis que l'échange de ligands consiste en l'ajout de ligands qui se lient directement au noyau. La caractérisation repose sur un large éventail de techniques complémentaires permettant le dimensionnement des particules ou l'identification et la quantification des ligands.

Lors des précédentes études précliniques, MTC-100244 MTX-GNP était obtenu via un processus en deux étapes par synthèse de Brust-Schiffrin et post-fonctionnalisation. Au cours de la première étape, une GNP de base avec de l' α -Galactose et un polyéthylène glycol court chargé négativement était obtenue. Un dérivé amine du Méthotrexate utilisé en excès était ensuite lié au polyéthylène glycol de la couronne de la GNP de base.

L'objectif expérimental de cette thèse était de remplacer l'étape de post-fonctionnalisation par l'échange de ligands pour améliorer le très faible rendement et permettre la transposition à grande échelle afin de poursuivre le développement pharmaceutique de MTC-100244 MTX-GNP.

Tout d'abord, un dérivé soufré du Méthotrexate a été conçu de manière à obtenir la même structure finale que par post-fonctionnalisation. Un composé dimérique disulfure a été obtenu par une synthèse en six étapes. Le dérivé disulfure de Méthotrexate a ensuite été réduit en deux thiols par du Tris(2-carboxyethyl)phosphine et ajouté à la GNP de base pour effectuer la réaction d'échange de ligands en milieu aqueux à pH neutre.

Le rendement de la réaction était quantitatif puisque presque tous les dérivés de Méthotrexate se sont liés au noyau d'or. De plus, comme l'échange de ligands est simple et spécifique, la réaction n'a pas généré d'impuretés. Étonnamment, l'attachement maximal du Méthotrexate par échange de ligands était supérieur de 30 % à celui observé par post-fonctionnalisation, engendrant un composé potentiellement plus puissant.

La partie expérimentale s'est également composée du développement d'un éventail analytique complet et polyvalent. Le dimensionnement des noyaux (microscopie électronique en transmission) et des particules entières (diffusion dynamique de la lumière et chromatographie d'exclusion de taille) a été effectué. Le rapport des ligands dans la couronne (résonance magnétique nucléaire du proton) et la quantité de Méthotrexate (chromatographie en phase inverse) ont également été déterminés.

Les méthodes de dimensionnement ont confirmé la taille ultrapetite et démontré l'extrême monodispersité de MTC-100244 MTX-GNP synthétisé par échange de ligands. La chromatographie en phase inverse a permis de quantifier l'attachement de Méthotrexate et de vérifier l'absence d'impuretés. La quantité de Méthotrexate plus élevée par échange de ligands était la seule différence significative, tandis que tous les autres paramètres de qualité de MTC-100244 MTX-GNP étaient les mêmes que ceux obtenus par post-fonctionnalisation.

Étant donné qu'une formulation d'hydrogel de Carbopol 980 est utilisée comme véhicule pour l'administration topique de MTC-100244 MTX-GNP, différentes formulations d'hydrogel contenant des nanoparticules ainsi que les instructions du fabricant ont été examinées. Le Carbopol 980, sa concentration et la concentration de MTC-100244 MTX-GNP étaient conformes aux pratiques actuelles. Il a été démontré que les nanoparticules ultrapetites sont idéales pour la pénétration cutanée mais que des études complémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser le gel et comprendre les mécanismes biologiques tels que la biodistribution du Méthotrexate et des nanoparticules lors de l'application.

L'oncologie est l'une des principales applications du Méthotrexate. La combinaison du médicament avec des nanoparticules pourrait améliorer son efficacité et sa sécurité dans ce domaine. Par exemple, la présentation multivalente apportée par les nanoparticules d'or ultrapetites pourrait augmenter l'absorption cellulaire.

Une absorption sélective due à la taille des particules et une rétention intracellulaire plus élevée pourraient également se produire et pourraient aider à réduire respectivement les effets secondaires hors cible et la résistance tumorale. Dans ce contexte, des études utilisant MTC-100244 MTX-GNP en tant qu'agent antitumoral pourraient être effectuées afin d'offrir une autre indication thérapeutique au nanomédicament.

Pour conclure, cette thèse a validé le potentiel clinique des plateformes de nanoparticules, en particulier MTC-100244 MTX-GNP, pour le traitement du psoriasis par voie topique. Les revues de littérature et les travaux expérimentaux effectués ont participé au développement d'un médicament nanodermatologique innovant pour la médecine humaine.

Le Doyen de la Faculté,

Pr. Christiane Forestier

Le Président du Jury,

Dr. David Balayssac

BIBLIOGRAPHIE

1. Maunoury, F. *et al.* Coûts annuels de prise en charge des patients atteints de psoriasis traités par topiques en France. *J. Gest. Econ. Medicales* Vol. 31, 457–472 (2013).
2. Bakshi, H. *et al.* Treatment of Psoriasis: A Comprehensive Review of Entire Therapies. *Curr. Drug Saf.* 15, 82–104 (2020).
3. Panonnummal, R. & Sabitha, M. Anti-psoriatic and toxicity evaluation of methotrexate loaded chitin nanogel in imiquimod induced mice model. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 245–258 (2018).
4. Burgos-Pol, R. *et al.* The Cost of Psoriasis and Psoriatic Arthritis in 5 European Countries: A Systematic Review. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl. Ed.* 107, 577–590 (2016).
5. Kersh, D. *et al.* The Annual Economic Burden of Psoriasis. *J. Psoriasis Psoriatic Arthritis* 1, 112–122 (2016).
6. Todke, P. & Shah, V. H. Psoriasis: implication to disease and therapeutic strategies, with an emphasis on drug delivery approaches. *Int. J. Dermatol.* 57, 1387–1402 (2018).
7. Symptoms of Psoriasis - Verywell Health. *Verywell Health* <https://www.verywellhealth.com/psoriasis-symptoms-2788277>.
8. Damiani, G. *et al.* Nanodermatology-based solutions for psoriasis: State-of-the art and future prospects. *Dermatol. Ther.* 32, e13113 (2019).
9. Understanding The Role Of The Hypodermis Layer Of Your Skin. *SkinKraft* <https://skinkraft.com/blogs/articles/hypodermis-layer>.
10. Singhvi, G. *et al.* Chapter 4 - Nanocarriers for topical delivery in psoriasis. in *Delivery of Drugs* (ed. Shegokar, R.) 75–96 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-817776-1.00004-3.
11. Skin Anatomy 101. *cosmotruth* <https://cosmotruth.wordpress.com/2013/07/08/skin-anatomy-101/> (2013).
12. Özcan, A. *et al.* Nanoparticle-Coupled Topical Methotrexate Can Normalize Immune Responses and Induce Tissue Remodeling in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 140, 1003–10140 (2020).
13. Gabriel, D. *et al.* Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. *J. Controlled Release* 242, 16–24 (2016).
14. Kumar, B. *et al.* Topical 0.25% Methotrexate Gel in a Hydrogel Base for Palmoplantar Psoriasis. *J. Dermatol.* 31, 798–801 (2004).

15. Avasatthi, V. *et al.* A novel nanogel formulation of methotrexate for topical treatment of psoriasis: optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* 21, 554–562 (2016).
16. Fits, L. van der *et al.* Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* 182, 5836–5845 (2009).
17. Morris, C. J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. in *Inflammation Protocols* (eds. Winyard, P. G. & Willoughby, D. A.) 115–121 (Humana Press, 2003). doi:10.1385/1-59259-374-7:115.
18. Psoriasis - symptômes, causes, traitements et prévention - VIDAL. VIDAL <https://www.vidal.fr/maladies/peau-cheveux-ongles/psoriasis.html>.
19. Bessar, H. *et al.* Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141, 141–147 (2016).
20. Fereig, S. A. *et al.* Tackling the various classes of nano-therapeutics employed in topical therapy of psoriasis. *Drug Deliv.* 27, 662–680 (2020).
21. Murphy, E. C. *et al.* Nanotechnology for Psoriasis Therapy. *Curr. Dermatol. Rep.* 8, 14–25 (2019).
22. Méthotrexate Bellon. Vidal <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/methotrexate-bellon-18689.html>.
23. Pile, K. D. & Graham, G. G. Methotrexate. in *Compendium of Inflammatory Diseases* (ed. Parnham, M. J.) 934–942 (Springer, 2016). doi:10.1007/978-3-7643-8550-7_47.
24. Ferreira, M. *et al.* Topical co-delivery of methotrexate and etanercept using lipid nanoparticles: A targeted approach for psoriasis management. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 159, 23–29 (2017).
25. Oral OTEZLA® (apremilast) Approved by the U.S. Food and Drug Administration for the Treatment of Patients with Moderate to Severe Plaque Psoriasis. <https://ir.celgene.com/press-releases-archive/press-release-details/2014/Oral-OTEZLA-apremilast-Approved-by-the-US-Food-and-Drug-Administration-for-the-Treatment-of-Patients-with-Moderate-to-Severe-Plaque-Psoriasis/default.aspx>.
26. Amgen Reports Fourth Quarter And Full Year 2020 Financial Results | Amgen Inc. <https://investors.amgen.com/news-releases/news-release-details/amgen-reports-fourth-quarter-and-full-year-2020-financial/>.
27. Quels sont les 10 médicaments qui coûtent le plus cher à la Sécu? <https://sante.lefigaro.fr/article/quels-sont-les-10-medicaments-qui-coutent-le-plus-cher-a-la-secu-/> (2017).

28. Bobo, D. *et al.* Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 33, 2373–2387 (2016).
29. Sindrilaru, A. *et al.* How can nanoparticle-based technologies revolutionize the topical therapy in psoriasis? *Exp. Dermatol.* 29, 1097–1103 (2020).
30. Messori, L. & Marcon, G. Gold complexes in the treatment of rheumatoid arthritis. *Met. Ions Biol. Syst.* 41, 279–304 (2004).
31. Singh, P. *et al.* Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1979 (2018).
32. Yaqoob, S. B. *et al.* Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Front. Chem.* 8, (2020).
33. Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293–346 (2004).
34. EUSMI / European Soft Matter Infrastructure. <https://eusmi-h2020.eu/access/wp4/NSL-BIOMA> (2020).
35. Elahi, N. *et al.* Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* 184, 537–556 (2018).
36. Hu, X. *et al.* Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, (2020).
37. Zhao, P. *et al.* State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord. Chem. Rev.* 257, 638–665 (2013).
38. Turkevich, J. *et al.* A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–75 (1951).
39. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 241, 20–22 (1973).
40. Brust, M. *et al.* Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 801–802 (1994).
41. Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1759–1782 (2009).
42. Yeh, Y.-C. *et al.* Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* 4, 1871–1880 (2012).
43. Arvizo, R. *et al.* Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 753–763 (2010).

44. Heuer-Jungemann, A. *et al.* The Role of Ligands in the Chemical Synthesis and Applications of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 119, 4819–4880 (2019).
45. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* 368, 1333–1383 (2010).
46. Jia, Y.-P. *et al.* The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* 28, 691–702 (2017).
47. Guerrini, L. *et al.* Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials* 11, 1154 (2018).
48. Hong, R. *et al.* Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1078–1079 (2006).
49. Vigderman, L. & Zubarev, E. R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 663–676 (2013).
50. Conde, J. *et al.* Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* 2, 48 (2014).
51. Dykman, L. A. & Khlebtsov, N. G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* 3, 34–55 (2011).
52. Peixoto de Almeida, M. *et al.* Chapter 13 - Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. in *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 66 529–567 (Elsevier, 2014).
53. Nune, S. K. *et al.* Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 1175–1194 (2009).
54. Saha, K. *et al.* Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* 112, 2739–2779 (2012).
55. Carabineiro, S. A. C. Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines. *Molecules* 22, 857 (2017).
56. Magforce - The Nanomedicine Company. <https://magforce.com>.
57. Nanobiotix. *Nanobiotix* <https://www.nanobiotix.com>.
58. Cytimmune Sciences. *Cytimmune Sciences* <https://www.cytimmune.com>.
59. Emergex Vaccines Holding Ltd. *A Phase-I, Double-blind, Randomized, Vehicle-controlled, Dose-finding, Safety Study of a Synthetic Nanoparticle-based, T Cell Priming Peptide Vaccine Against Coronavirus COVID-19 in Healthy Adults in Switzerland.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05113862> (2021).

60. Emergex Vaccines Holding Ltd. *naNO-DENGUE: A Phase I Double-blind, Randomised, Vehicle-controlled, Dose-finding, Safety Study of a Synthetic Nanoparticle-based T-Cell Priming Peptide Vaccine Against Dengue Virus in Healthy Adults in Switzerland*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04935801> (2021).
61. Penades, S. *et al.* Nanoparticles - US8790934B2. (2014).
62. Golding, J. *et al.* Nanoparticles and their use in cancer therapy - US20170340665A1. (2017).
63. Lund, T. *et al.* The influence of ligand organization on the rate of uptake of gold nanoparticles by colorectal cancer cells. *Biomaterials* 32, 9776–9784 (2011).
64. de la Fuente, J. M. & Penadés, S. Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 636–651 (2006).
65. Kang, B. *et al.* Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction. *Chem. Soc. Rev.* 44, 8301–8325 (2015).
66. Charbgoon, F. *et al.* Gold nanoparticle should understand protein corona for being a clinical nanomaterial. *J. Controlled Release* 272, 39–53 (2018).
67. Manson, J. *et al.* Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. *Gold Bull.* 44, 99–105 (2011).
68. Alalaiwe, A. *et al.* Influence of PEG coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats. *Drug Deliv.* 24, 591–598 (2017).
69. Sanchez-Cano, C. & Carril, M. Recent Developments in the Design of Non-Biofouling Coatings for Nanoparticles and Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1007 (2020).
70. Hoang Thi, T. T. *et al.* The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers* 12, 298 (2020).
71. Desai, N. Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. *AAPS J.* 14, 282–295 (2012).
72. Uz, M. *et al.* Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle–Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis, and DNA Damage. *Langmuir* 32, 5997–6009 (2016).
73. Arvizo, R. R. *et al.* Modulating Pharmacokinetics, Tumor Uptake and Biodistribution by Engineered Nanoparticles. *Plos One* 6, 1–6 (2011).
74. Goodman, C. M. *et al.* Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897–900 (2004).

75. Liu, H. *et al.* Control of Surface Ligand Density on PEGylated Gold Nanoparticles for Optimized Cancer Cell Uptake. *Part. Part. Syst. Charact.* 32, 197–204 (2015).
76. Lupusoru, R. V. *et al.* Effect of TAT-DOX-PEG irradiated gold nanoparticles conjugates on human osteosarcoma cells. *Sci. Rep.* 10, 6591 (2020).
77. Algar, W. R. *et al.* The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjug. Chem.* 22, 825–858 (2011).
78. Hostetler, M. J. *et al.* Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir* 15, 3782–3789 (1999).
79. Rademacher, T. & Mous, J. Nanoparticle-insulin and insulin analogue compositions - US20150216942A1. (2015).
80. Williams, P. *et al.* Combination peptide-nanoparticles and delivery systems incorporating same - US9474687B2. (2016).
81. Rademacher, T. Nanoparticle glucagon compositions - US20150216940A1. (2015).
82. Rademacher, T. & Williams, P. Nanoparticle peptide compositions - US9114082B2. (2015).
83. Sheridan, C. Proof of concept for next-generation nanoparticle drugs in humans. *Nat. Biotechnol.* 30, 471–472 (2012).
84. McAteer, M. *et al.* Nanoparticle-Based Antigen Specific Immunotherapy - US20180177891A1. (2018).
85. Dul, M. *et al.* Conjugation of a peptide autoantigen to gold nanoparticles for intradermally administered antigen specific immunotherapy. *Int. J. Pharm.* 562, 303–312 (2019).
86. Enhanced Epidermal Antigen Specific Immunotherapy Trial - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02837094> (2020).
87. Cognet, V. L. Ultrasmall Glyco-Gold Nanoparticles: Synthesis Optimization, Characterization and Applications in Immune-Cell Targeting. (University of the Basque Country, 2020).
88. Lundquist, J. J. & Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* 102, 555–578 (2002).
89. Rademacher, T. & Philip, R. Nanoparticle tumour vaccines - US20140248360A1. (2014).
90. Himmler, G. *et al.* Nanoparticles comprising antigens and adjuvants, and immunogenic structures - US9079765B2. (2015).

91. H3.3K27M-specific Peptide Vaccine (Code C132684). https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/pages/concept_details.jsf?dictionary=NCI_Thesaurus&version=20.02d&code=C132684&ns=ncit&type=properties&key=null&b=1&n=0&vse=null (2020).
92. Roskamp, M. *et al.* SIKVAV peptide functionalized ultra-small gold nanoparticles for selective targeting of $\alpha 6\beta 1$ integrin in hepatocellular carcinoma. *J. Phys. Conf. Ser.* 829, 012017 (2017).
93. Garcia Barrientos, A. & de Torres Domínguez, E. Nanoparticle-based liver-targeting therapy and imaging - GB2541166A. (2017).
94. Ma, P. *et al.* Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery. *Mater. Today* 18, 554–564 (2015).
95. Hale, S. J. M. *et al.* DM1 Loaded Ultrasmall Gold Nanoparticles Display Significant Efficacy and Improved Tolerability in Murine Models of Hepatocellular Carcinoma. *Bioconjug. Chem.* 30, 703–713 (2019).
96. Porter, J. *et al.* A highly potent maytansinoid analogue and its use as a cytotoxic therapeutic agent in gold nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30, 127634 (2020).
97. Rademacher, T. W. *et al.* Nanoparticles comprising antibacterial ligands - US9034380B2. (2015).
98. Rademacher, T. W. & Williams, P. Nanoparticles for providing immune responses against infectious agents - US8895023B2. (2014).
99. Rademacher, T. & Williams, P. Nanoparticle-peptide compositions - US9598479B2. (2017).
100. Rademacher, T. & Williams, P. Nanoparticle peptide compositions - US20140248365A1. (2014).
101. Rademacher, T. W. *et al.* Nanoparticles Comprising Rna Ligands - US20080213177A1. (2008).
102. Mcateer, M. *et al.* Antifolate-Carrying Nanoparticles and Their Use in Medicine. (2020).
103. Mcateer, M. *et al.* Nanoparticle-Based Therapy of Inflammatory Disorders. (2020).
104. Chen, Y.-H. *et al.* Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model. *Mol. Pharm.* 4, 713–722 (2007).
105. Álvarez-González, B. *et al.* Methotrexate Gold Nanocarriers: Loading and Release Study: Its Activity in Colon and Lung Cancer Cells. *Molecules* 25, 6049 (2020).

106. Agabeigi, R. *et al.* Novel Chemo-Photothermal Therapy in Breast Cancer Using Methotrexate-Loaded Folic Acid Conjugated Au@SiO₂ Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 15, 1–14 (2020).
107. Gomes, A. *et al.* Evaluation of Anti-Arthritic Property of Methotrexate Conjugated Gold Nanoparticle on Experimental Animal Models. *J. Nanopharmaceutics Drug Deliv.* 1, 206–211 (2013).
108. Ha, Y.-J. *et al.* Methotrexate-loaded multifunctional nanoparticles with near-infrared irradiation for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 22, 1–13 (2020).
109. Fratoddi, I. *et al.* Effects of topical methotrexate loaded gold nanoparticle in cutaneous inflammatory mouse model. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 17, 276–286 (2019).
110. Cerra, S. *et al.* Insights about the interaction of methotrexate loaded hydrophilic gold nanoparticles: Spectroscopic, morphological and structural characterizations. *Mater. Sci. Eng. C* 117, 111337 (2020).
111. Fratoddi, I. *et al.* Highly Hydrophilic Gold Nanoparticles as Carrier for Anticancer Copper(I) Complexes: Loading and Release Studies for Biomedical Applications. *Nanomaterials* 9, 772 (2019).
112. Egusa, S. *et al.* Ligand exchange on gold nanoparticles for drug delivery and enhanced therapeutic index evaluated in acute myeloid leukemia models. *Exp. Biol. Med.* 239, 853–861 (2014).
113. Tran, N. T. T. *et al.* Synthesis of methotrexate-conjugated gold nanoparticles with enhanced cancer therapeutic effect. *Biochem. Eng. J.* 78, 175–180 (2013).
114. Liu, Z. *et al.* Synthesis of folic acid functionalized gold nanoclusters for targeting folate receptor-positive cells. *Nanotechnology* (2019) doi:10.1088/1361-6528/ab437c.
115. Yücel, O. *et al.* Folic acid-modified methotrexate-conjugated gold nanoparticles as nano-sized trojans for drug delivery to folate receptor-positive cancer cells. *Nanotechnology* 31, 355101 (2020).
116. Dey, S. *et al.* Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug carrier: Evaluation of cellular interactions and hemolytic potential. *Carbohydr. Polym.* 136, 71–80 (2016).
117. Durgadas, C. V. *et al.* Aggregation of gold nanoparticles followed by methotrexate release enables Raman imaging of drug delivery into cancer cells. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1127 (2012).
118. Ghorbani, M. & Hamishehkar, H. Decoration of gold nanoparticles with thiolated pH-responsive polymeric (PEG-b-p(2-dimethylamio ethyl methacrylate-co-itaconic acid) shell: A novel platform for targeting of anticancer agent. *Mater. Sci. Eng. C* 81, 561–570 (2017).

119. Ghorbani, M. & Hamishehkar, H. Redox and pH-responsive gold nanoparticles as a new platform for simultaneous triple anti-cancer drugs targeting. *Int. J. Pharm.* 520, 126–138 (2017).
120. Mamaeva, V. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Targeted Inhibition of Notch Signaling in Cancer. *Mol. Ther.* 19, 1538–1546 (2011).
121. Asadishad, B. *et al.* Folate-Receptor-Targeted Delivery of Doxorubicin Using Polyethylene Glycol-Functionalized Gold Nanoparticles. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 1958–1963 (2010).
122. Murawala, P. *et al.* In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: Effective carrier of anticancer drug Methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C* 34, 158–167 (2014).
123. Crisan, D. *et al.* Topical silver and gold nanoparticles complexed with Cornus mas suppress inflammation in human psoriasis plaques by inhibiting NF- κ B activity. *Exp. Dermatol.* 27, 1166–1169 (2018).
124. Nemati, H. *et al.* Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. *J. Controlled Release* 268, 259–268 (2017).
125. Wang, W.-Y. *et al.* Novel morphology change of Au-Methotrexate conjugates: From nanochains to discrete nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 515, 221–232 (2016).
126. Rozalen, M. *et al.* Synthesis of controlled-size silver nanoparticles for the administration of methotrexate drug and its activity in colon and lung cancer cells. *RSC Adv.* 10, 10646–10660 (2020).
127. Brust, M. *et al.* Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1655–1656 (1995).
128. Liu, X. *et al.* Kinetic study of gold nanoparticle growth in solution by Brust-Schiffrin reaction. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 1054–1059 (2006).
129. Hussain, I. *et al.* Size-Controlled Synthesis of Near-Monodisperse Gold Nanoparticles in the 1–4 nm Range Using Polymeric Stabilizers. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 16398–16399 (2005).
130. Fuente, J. M. de la *et al.* Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2257–2261 (2001).
131. Van Reis, R. & Zydney, A. Membrane separations in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 208–211 (2001).
132. Sweeney, S. F. *et al.* Rapid Purification and Size Separation of Gold Nanoparticles via Diafiltration. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3190–3197 (2006).

133. Hermanson, G. T. Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation. in *Bioconjugate Techniques (Third edition)* 229–258 (Academic Press, 2013).
134. Froimowicz, P. *et al.* Surface-Functionalized Particles: From their Design and Synthesis to Materials Science and Bio-Applications. *Curr. Org. Chem.* 17, 900–912 (2013).
135. Santiago, T. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering investigation of targeted delivery and controlled release of gemcitabine. *Int. J. Nanomedicine* 12, 7763–7776 (2017).
136. Jazayeri, M. H. *et al.* Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sens. Bio-Sens. Res.* 9, 17–22 (2016).
137. Farr, T. D. *et al.* Imaging Early Endothelial Inflammation Following Stroke by Core Shell Silica Superparamagnetic Glyconanoparticles That Target Selectin. *Nano Lett.* 14, 2130–2134 (2014).
138. Wu, R. H. *et al.* A Facile Route to Tailoring Peptide-Stabilized Gold Nanoparticles Using Glutathione as a Synthon. *Molecules* 19, 6754–6775 (2014).
139. Coupling Reagents - Bachem.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiLrq-GxpTcAhWE7BQKHedNAc0QFjAAegQIABAC&url=http%3A%2F%2Fdocuments.bachem.com%2Fcoupling_reagents.pdf&usq=AOvVaw2X9eeVIXp7UYA51vIWzEBI
140. NHS and Sulfo NHS - Thermo Fisher Scientific.
<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24525>.
141. Masereel, B. *et al.* Antibody immobilization on gold nanoparticles coated layer-by-layer with polyelectrolytes. *J. Nanoparticle Res.* 13, 1573–1580 (2011).
142. Graça, V. C. *et al.* Ethylenediamine-Derived Chromatographic Ligand to Separate BSA, Lysozyme, and RNase A. *Chromatographia* 77, 1529–1537 (2014).
143. Poonthiyil, V. *et al.* Recent applications of click chemistry for the functionalization of gold nanoparticles and their conversion to glyco-gold nanoparticles. *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 11–24 (2018).
144. Hostetler, M. J. *et al.* Monolayers in Three Dimensions: Synthesis and Electrochemistry of ω -Functionalized Alkanethiolate-Stabilized Gold Cluster Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 4212–4213 (1996).
145. Templeton, A. C. *et al.* Reactivity of Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules: Steric Effects. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1906–1911 (1998).
146. Smith, A. M. *et al.* Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* 87, 2771–2778 (2015).

147. Dai, Q. *et al.* Polyethylene Glycol Backfilling Mitigates the Negative Impact of the Protein Corona on Nanoparticle Cell Targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 5093–5096 (2014).
148. Caragheorghopol, A. & Chechik, V. Mechanistic aspects of ligand exchange in Au nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 5029–5041 (2008).
149. DMSO Physical Properties. *Gaylord Chemical* <https://www.gaylordchemical.com/literature/dmsso-physical-properties/> (2019).
150. Duchesne, L. *et al.* Robust Ligand Shells for Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Langmuir* 24, 13572–13580 (2008).
151. Mohebbi, S. *et al.* RGD-HK Peptide-Functionalized Gold Nanorods Emerge as Targeted Biocompatible Nanocarriers for Biomedical Applications. *Nanoscale Res. Lett.* 14, 13 (2019).
152. Ma, Y. & Chechik, V. Aging of Gold Nanoparticles: Ligand Exchange with Disulfides. (2011) doi:10.1021/la202035x.
153. Pierce TCEP-HCl - Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20490> (2016).
154. Groybeck, N. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2.4 nm thiolate-protected gold nanoparticles conjugated to Cetuximab for targeting glioblastoma cancer cells via the EGFR. *Nanotechnology* 30, 184005 (2019).
155. Bond-Breaker TCEP Solution, Neutral pH - Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/77720> (2016).
156. Levi-Kalisman, Y. *et al.* Synthesis and Characterization of Au₁₀₂(p-MBA)₄₄ Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2976–2982 (2011).
157. Liu, J. & Lu, Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. *Nat. Protoc.* 1, 246–252 (2006).
158. Lévy, R. *et al.* Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10076–10084 (2004).
159. Jin, R. *et al.* Size Focusing: A Methodology for Synthesizing Atomically Precise Gold Nanoclusters. *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 2903–2910 (2010).
160. Shimpi, J. R. *et al.* Digestive Ripening: A Fine Chemical Machining Process on the Nanoscale. *Langmuir* 33, 9491–9507 (2017).
161. Tsai, D.-H. *et al.* Orthogonal analysis of functional gold nanoparticles for biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8411–8422 (2015).

162. Mourdikoudis, S. *et al.* Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* 10, 12871–12934 (2018).
163. Kumar, A. & Dixit, C. K. 3 - Methods for characterization of nanoparticles. in *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* 43–58 (Woodhead Publishing, 2017).
164. Colangelo, E. *et al.* Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* 28, 11–22 (2017).
165. Home | Nanotechnology Characterization Lab (NCL). <https://ncl.cancer.gov/>.
166. Marbella, L. E. & Millstone, J. E. NMR Techniques for Noble Metal Nanoparticles. *Chem. Mater.* 27, 2721–2739 (2015).
167. Pitkänen, L. & Striegel, A. M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *Trends Anal. Chem. TRAC* 80, 311–320 (2016).
168. Elzey, S. *et al.* Quantification of ligand packing density on gold nanoparticles using ICP-OES. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 145–149 (2012).
169. Hinterwirth, H. *et al.* Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *ACS Nano* 7, 1129–1136 (2013).
170. Alvarez, M. M. *et al.* Optical Absorption Spectra of Nanocrystal Gold Molecules. *J. Phys. Chem. B* 101, 3706–3712 (1997).
171. Zheng, T. *et al.* Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 21585–21594 (2016).
172. Rapalli, V. K. *et al.* Chapter 13 - Application of QbD Principles in Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems. in *Pharmaceutical Quality by Design* (eds. Beg, S. & Hasnain, M. S.) 255–296 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-815799-2.00014-9.
173. Safety Data Sheet EDC - Thermo Fisher. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2FSDS%2F77149_MTR-EULT_BE.pdf&title=NzcxNDk= (2021).
174. Seeger, D. R. *et al.* Analogs of pteroylglutamic acid. III. 4-Amino derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 1753–1758 (1949).
175. Rahman, L. K. A. & Chhabra, S. R. The chemistry of methotrexate and its analogues. *Med. Res. Rev.* 8, 95–155 (1988).

176. Choi, G. *et al.* Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery. *Coord. Chem. Rev.* 359, 32–51 (2018).
177. Fernández, M. *et al.* Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem. Sci.* 9, 790–810 (2018).
178. Nogueira, E. *et al.* Internalization of Methotrexate Conjugates by Folate Receptor- α . *Biochemistry* 57, 6780–6786 (2018).
179. Riebeseel, K. *et al.* Polyethylene Glycol Conjugates of Methotrexate Varying in Their Molecular Weight from MW 750 to MW 40000: Synthesis, Characterization, and Structure–Activity Relationships in Vitro and in Vivo. *Bioconjug. Chem.* 13, 773–785 (2002).
180. Byamba, D. *et al.* Skin-penetrating methotrexate alleviates imiquimod-induced psoriasiform dermatitis via decreasing IL-17-producing gamma delta T cells. *Exp. Dermatol.* 23, 492–496 (2014).
181. Brzezińska, A. *et al.* Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochim. Pol.* 47, 735–749 (2000).
182. Andersen, N. S. *et al.* Methotrexate prodrugs sensitive to reactive oxygen species for the improved treatment of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Med. Chem.* 156, 738–746 (2018).
183. Nagy, A. *et al.* Selective coupling of methotrexate to peptide hormone carriers through a gamma-carboxamide linkage of its glutamic acid moiety: benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate activation in salt coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6373–6376 (1993).
184. Francis, C. L. *et al.* Total Synthesis of Methotrexate- γ -TRIS-Fatty Acid Conjugates. *Aust. J. Chem.* 55, 635–645 (2002).
185. Risseeuw, M. D. P. *et al.* A “Clickable” MTX Reagent as a Practical Tool for Profiling Small-Molecule–Intracellular Target Interactions via MASPIT. *ChemMedChem* 8, 521–526 (2013).
186. University of Illinois at Chicago College of Pharmacy, D. I. G. Light-Sensitive Injectable Prescription Drugs. *Hosp. Pharm.* 49, 136–163 (2014).
187. Nagy, P. Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1623–1641 (2012).
188. Jadzinsky, P. D. *et al.* Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution. *Science* 318, 430–433 (2007).

189. Zhang, J. *et al.* Synthesis and characterization of size-controlled atomically precise gold clusters. *Phys. Sci. Rev.* 3, (2018).
190. Bartczak, D. & Kanaras, A. G. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir* 27, 10119–10123 (2011).
191. Gómez-García, M. *et al.* Comparative studies on lectin–carbohydrate interactions in low and high density homo- and heteroglycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* 8, 1849–1860 (2010).
192. Stevens, R. *et al.* The stabilities of various thiol compounds used in protein purifications. *Biochem. Educ.* 11, 70–70 (1983).
193. Turell, L. *et al.* Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 42, 305–311 (2009).
194. Singh, R. K. *et al.* Using gold nanoparticles for enhanced intradermal delivery of poorly soluble auto-antigenic peptides. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 32, 102321 (2021).
195. Carbopol® Polymer Excipients - Homopolymers, Copolymers & Interpolymers - Lubrizol. <https://www.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Excipients/Carbopol-Polymer-Products>.
196. Bikkad, M. L. *et al.* Halobetasol propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *J. Liposome Res.* 24, 113–123 (2014).
197. Carbomer Homopolymer Type C (Allyl Pentaerythritol Crosslinked) Carbopol 980 - NCATS Inxight: Drugs. <https://drugs.ncats.io/drug/4Q93RCW27E>.
198. Carbopol® 980 NF Polymer - Thickener For Clear Aqueous & Hydroalcoholic Gels - Lubrizol. <https://www.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Excipients/Carbopol-Polymer-Products/Carbopol-980-NF-Polymer>.
199. Kaur, A. *et al.* Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 1473–1482 (2017).
200. Wavikar, P. & Vavia, P. Nanolipidgel for Enhanced Skin Deposition and Improved Antifungal Activity. *AAPS PharmSciTech* 14, 222–233 (2013).
201. Raza, K. *et al.* Improved therapeutic performance of dithranol against psoriasis employing systematically optimized nanoemulsomes. *J. Microencapsul.* 30, 225–236 (2013).

202. Raza, K. *et al.* Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. *Int. J. Pharm.* 456, 65–72 (2013).
203. Dispersion Techniques for Carbopol Polymers - Technical data Sheet - Lubrizol.
204. Neutralizing Carbopol and Pemulen Polymers in Aqueous and Hydroalcoholic Systems - Technical data Sheet - Lubrizol.
205. Larese Filon, F. *et al.* Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 310–322 (2015).
206. Filon, F. L. *et al.* Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. *Nanotoxicology* 5, 493–501 (2011).
207. Franz, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *J. Invest. Dermatol.* 64, 190–195 (1975).
208. Fernandes, R. *et al.* Interactions of Skin with Gold Nanoparticles of Different Surface Charge, Shape, and Functionality. *Small* 11, 713–721 (2015).
209. Gupta, R. & Rai, B. Penetration of Gold Nanoparticles through Human Skin: Unraveling Its Mechanisms at the Molecular Scale. *J. Phys. Chem. B* 120, 7133–7142 (2016).
210. Gupta, R. & Rai, B. Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Sci. Rep.* 7, 45292 (2017).
211. Lin, J. *et al.* Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. *ACS Nano* 4, 5421–5429 (2010).
212. Gonen, N. & Assaraf, Y. G. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 15, 183–210 (2012).
213. Methotrexate Monograph for Professionals. *Drugs.com* <https://www.drugs.com/monograph/methotrexate.html>.
214. Methotrexate Sodium - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/methotrexate> (2008).
215. Koźmiński, P. *et al.* Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3483 (2020).
216. Salway, J. G. *Metabolism at a Glance*. (John Wiley & Sons, 2017).
217. Corona, G. *et al.* Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 75, 125–133 (1998).

218. Wong, P. T. & Choi, S. K. Mechanisms and Implications of Dual-Acting Methotrexate in Folate-Targeted Nanotherapeutic Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1772–1790 (2015).
219. Naz, F. *et al.* Biokinetics of ultrafine gold nanoparticles (AuNPs) relating to redistribution and urinary excretion: a long-term in vivo study. *J. Drug Target.* 24, 720–729 (2016).
220. Siwowska, K. *et al.* Folate Receptor-Positive Gynecological Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceuticals* 10, 72 (2017).
221. Sonvico, F. *et al.* Establishment of an in vitro model expressing the folate receptor for the investigation of targeted delivery systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 15, 407–410 (2005).
222. FOLR1 mRNA expression - Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). <https://portals.broadinstitute.org/ccle/page?gene=FOLR1> (2021).
223. Zwicke, G. L. *et al.* Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev.* 3, 18496 (2012).
224. Stapf, M. *et al.* Methotrexate-coupled nanoparticles and magnetic nanochemothermia for the relapse-free treatment of T24 bladder tumors. *Int. J. Nanomedicine* 12, 2793–2811 (2017).
225. Mansoori, G. A. *et al.* A Comparative Study of Two Folate-Conjugated Gold Nanoparticles for Cancer Nanotechnology Applications. *Cancers* 2, 1911–1928 (2010).
226. Banu, H. *et al.* Thermal Chemosensitization of Breast Cancer Cells to Cyclophosphamide Treatment Using Folate Receptor Targeted Gold Nanoparticles. *Plasmonics* 9, 1341–1349 (2014).

Thèse d'Exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Valentin Laurent Cognet

Nanoparticules d'Or Ultrapetites Associées au Méthotrexate : Synthèse, Caractérisation et Applications pour le Traitement du Psoriasis

Le Méthotrexate est commercialisé depuis des décennies, principalement pour le traitement du psoriasis, une maladie auto-immune chronique qui touche des millions de personnes. De nombreux traitements sont disponibles, mais aucun d'entre eux n'est curatif et ils présentent tous des inconvénients majeurs. Le Méthotrexate est couramment utilisé par voie systémique, mais provoque des effets secondaires hors cible et ne peut pas être utilisé par voie topique en raison de sa faible pénétration cutanée. Les nanoparticules d'or peuvent améliorer l'efficacité et la sécurité des médicaments en modifiant leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. Cette thèse décrit le développement de nanoparticules d'or ultrapetites possédant du Méthotrexate dans leur couronne pour le traitement topique du psoriasis, en particulier le composé MTC-100244 MTX-GNP conçu par Midatech Pharma dans le cadre de sa plateforme Midacore™. La physiopathologie du psoriasis, les traitements disponibles et les nanothérapies publiées sont examinés pour évaluer le potentiel thérapeutique et commercial de MTC-100244 MTX-GNP. La synthèse des nanoparticules d'or ultrapetites repose sur diverses méthodes telles que la synthèse de Brust-Schiffrin pour générer les particules et, éventuellement, la post-fonctionnalisation ou l'échange de ligands. L'efficacité de MTC-100244 MTX-GNP a été démontrée avec des modèles précliniques *in vivo*. Toutefois, la méthode d'attachement du Méthotrexate par post-fonctionnalisation est très inefficace et doit être remplacée. Une partie expérimentale décrit le développement pharmaceutique réalisé pour créer un dérivé de Méthotrexate adapté à l'échange de ligands et l'optimisation de cette méthode pour obtenir un rendement quantitatif. Un éventail de caractérisation complet est également présenté. Enfin, le véhicule d'hydrogel utilisé pour l'administration topique et le potentiel de MTC-100244 MTX-GNP dans le domaine oncologique sont examinés.

Mots-Clés

Nanoparticules d'Or Ultrapetites, Fonctionnalisation, Méthotrexate, Échange de Ligands, Psoriasis, Administration Topique, Hydrogel, Développement Pharmaceutique.