Biologie Aujourd'hui, 206 (4), 237–248 (2012)
© Société de Biologie, 2013
DOI: 10.1051/jbio/2012025

Les nanotechnologies pour la conception de nouveaux médicaments

Patrick Couvreur

Faculté de Pharmacie, UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud 11, 5 rue J.B. Clément, 92296 Chatenay Malabry, France

Auteur correspondant : Patrick Couvreur, patrick.couvreur@u-psud.fr

Reçu le 7 février 2012

Résumé – L'utilisation des nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments constitue une stratégie de recherche susceptible de répondre aux besoins d'innovation pour la découverte de médicaments plus efficaces et répondant à des besoins thérapeutiques insatisfaits. La morphologie, l'organisation supramoléculaire et les propriétés des nanovecteurs, de première, deuxième et troisième génération, utilisés pour l'adressage des médicaments sont tout d'abord présentées. Ces différents nanovecteurs (liposomes, nanoparticules, polymères, etc.) permettent de protéger le médicament de la dégradation par l'environnement biologique, de contrôler la libération de la molécule active par un stimulus externe, d'échapper à la reconnaissance par le système réticulo-endothélial, de contourner les mécanismes de résistance multidrogues de la cellule cancéreuse, et enfin de cibler, de manière spécifique, le médicament sur la cellule malade à l'aide de ligands sélectifs. Des exemples d'applications thérapeutiques des différents types de nanovecteurs sont donnés, principalement dans le domaine du traitement du cancer. Enfin, les futurs challenges des nanotechnologies, en particulier leur utilisation dans le « théragnostique » et la thérapie génique sont discutés brièvement.

Mots clés : Nanotechnologies / nanomédicaments / liposomes / nanoparticules / cancer

Abstract – Nanotechnologies for designing new medicines.

The use of nanotechnologies for the targeted delivery of therapeutic agents is a research strategy which can lead to more efficacious drugs fulfilling unmet medical needs. The morphology, supramolecular organization and properties of first, second and third generation nanocarriers used for the targeted delivery of drugs are discussed. These different nanocarriers (liposomes, nanoparticles, polymers, etc.) may: (I) protect the drug from degradation by the biological environment; (II) allow the controlled delivery of the active molecule by an external stimulus; (III) avoid the recognition of the drug by the reticulo-endothelial system; (IV) overcome multidrug resistance mechanisms of cancer cells and finally (V) very specifically target the therapeutic agent to the diseased cell by means of selective ligands. Some therapeutic applications of these different types of nanocarriers are discussed, especially in the field of cancer therapy. Finally, the future challenges and perspectives of nanotechnologies, especially for "theragnostic" and gene therapy are briefly discussed.

Key words: Nanotechnologies / nanocarriers / liposomes / nanoparticles / cancer

Introduction

Malgré le nombre important de médicaments disponibles sur le marché, il existe encore aujourd'hui de nombreux besoins thérapeutiques insatisfaits. Pour répondre à ces besoins, l'industrie pharmaceutique se doit de développer des médicaments réellement innovants conduisant à une amélioration significative du service médical rendu et au traitement de maladies jusqu'ici sans option thérapeutique.

Article publié par EDP Sciences

Le processus de recherche de nouveaux médicaments au laboratoire a connu, durant les deux dernières décennies, un changement de paradigme, lié à des évolutions à la fois technologiques et conceptuelles qui ont radicalement modifié la manière d'appréhender cette recherche.

Les avancées de la génomique et de la protéomique ont permis d'identifier de nouvelles cibles biologiques originales. La connaissance de la structure tridimensionnelle de certaines cibles moléculaires et la conception plus rationnelle des composés à l'aide de la modélisation moléculaire, l'accès à une large diversité de structures chimiques grâce à la synthèse automatisée à haut débit des composés à l'aide de la chimie combinatoire, ainsi que le développement des techniques de criblage automatisé à haut débit, ont permis d'accélérer la découverte de nouvelles molécules (Scatton, 2009). Par ailleurs, les médicaments dits « biologiques » (anticorps, protéines thérapeutiques, etc.) se sont développés de manière considérable et représentent une part de marché en évolution constante.

Malgré ces avancées conceptuelles et technologiques, le nombre de nouvelles entités moléculaires mises sur le marché a eu plutôt tendance à être stable, voire à régresser durant la dernière décennie (10 à 15 molécules par an en moyenne mises sur le marché aux USA). Cette situation s'explique, au moins en partie, par le fait que les agences d'enregistrement de médicaments imposent aux entreprises de présenter des dossiers de plus en plus importants et complexes avant d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché. Pourtant, en 2011, des signes positifs sont apparus puisque 30 nouveaux médicaments ont été approuvés par la FDA (l'agence américaine d'enregistrement des médicaments), le nombre le plus élevé depuis une décennie (Mullard, 2012) !

Le médicament n'est pas seulement constitué d'un principe actif mais aussi d'une forme galénique permettant d'en optimiser l'administration et la biodisponibilité et d'en maîtriser la vitesse de mise à disposition dans l'organisme. L'essor récent des nanotechnologies a révolutionné la manière d'administrer les médicaments. Parce qu'elles sont à une échelle nanométrique, les nanotechnologies ne sont pas la simple miniaturisation d'objets plus grands, mais elle possèdent des propriétés que l'on ne retrouve qu'à cette échelle de taille. Un médicament administré sous une forme galénique traditionnelle se heurte à de nombreuses barrières physiologiques et il n'est donc pas garanti qu'il atteigne sa cible. On peut pallier ces difficultés en associant le principe actif à un nanovecteur, dont la taille est de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres (soit dix à cent fois plus petit qu'une cellule vivante), et dont le rôle est d'encapsuler (protection de la molécule active contre la dégradation) et de véhiculer efficacement ce principe actif vers sa cible (Couvreur, 2010). La conception de suspensions nanoparticulaires chargées en médicaments permet d'augmenter l'index thérapeutique de nombreux composés (amélioration de l'efficacité, réduction de la toxicité) en les adressant de manière sélective vers les tissus et cellules malades. Elles permettent également l'acheminement de la molécule active vers un organite subcellulaire particulier (cytoplasme, lysosomes, noyau) ou encore le contrôle de la libération du principe actif en réponse à un stimulus externe. Ainsi, les nanovecteurs pourraient contribuer de manière très significative à la diversification de notre arsenal thérapeutique.

Cette revue fait le point sur l'apport des nanotechnologies pour la découverte de nouveaux médicaments.

Morphologie, organisation supramoléculaire et propriétés des nanovecteurs de médicaments

Destinés à être administrés notamment par voie intraveineuse, les nanovecteurs de médicaments (« nanomédicaments ») doivent avoir une taille largement inférieure au micron afin d'éviter les phénomènes thrombo-emboliques à l'injection ; leur diamètre est plus généralement compris entre celui d'un virus et celui d'une bactérie, soit quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. En raison de leur taille, ils seront donc reconnus par l'organisme comme des particules infectieuses exogènes et seront capables de pénétrer à l'intérieur des cellules (Couvreur, 2010).

Les progrès considérables effectués dans le domaine de la synthèse de nouveaux matériaux (qui doivent être biodégradables et biocompatibles), conjugués aux méthodologies et procédés astucieux utilisés pour la mise en forme de ces matériaux, ont permis de concevoir des nanovecteurs possédant une architecture supramoléculaire variée à base de lipides, de polymères, de matériaux inorganiques ou de matériaux hybrides organiques-inorganiques.

Il existe actuellement de nombreuses plateformes nanotechnologiques utilisées pour la construction de nanovecteurs, dont les principales sont (figure 1) :

1. les liposomes, vésicules lipidiques de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, délimitées par une ou plusieurs bi-couches concentriques de phospholipides ;
2. les nanoparticules à base de polymères, pouvant donner lieu à des systèmes matriciels (« nanosphères ») ou réservoirs (« nanocapsules ») d'une centaine de nanomètres, formés de polymères biodégradables ;
3. les nanoparticules ou nanocapsules lipidiques solides, de taille similaire ;

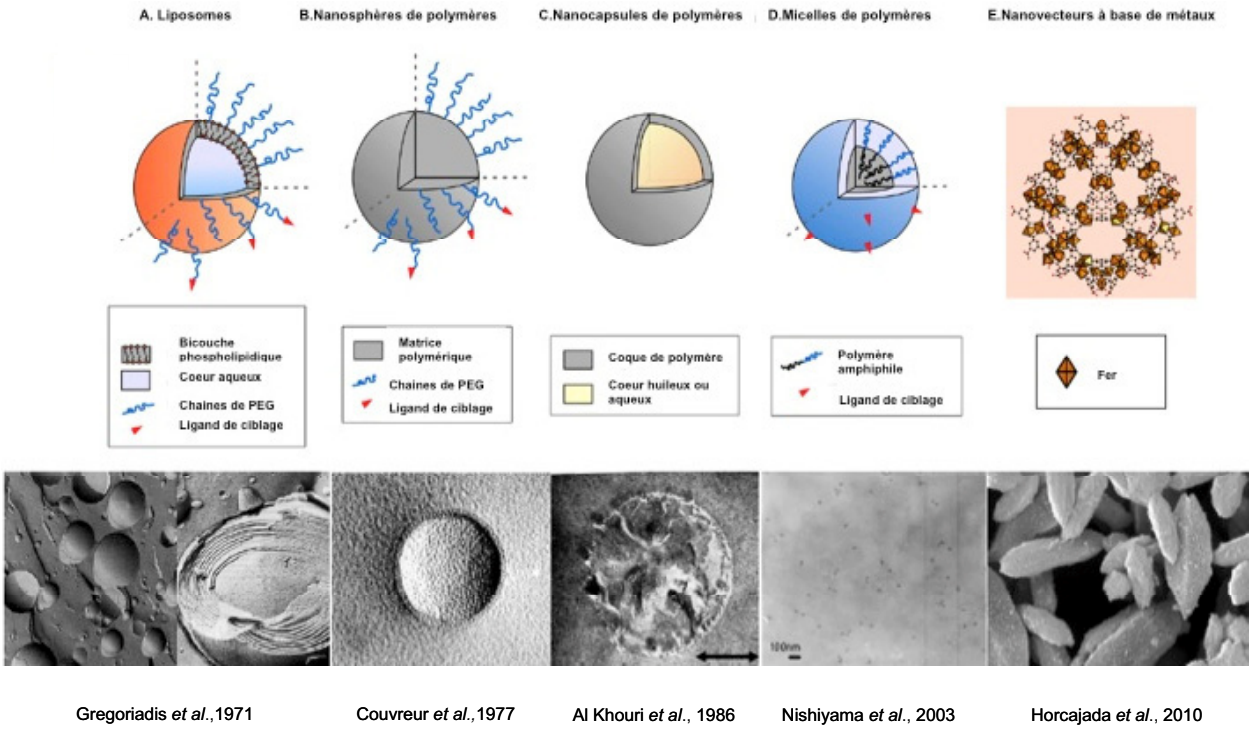


Fig. 1. Architecture des nanotechnologies utilisées pour la vectorisation des médicaments.

4. les nanoparticules métalliques à base d'oxyde de fer, d'une taille de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, utilisées pour l'imagerie des tissus en résonance magnétique nucléaire (RMN) ;
5. les micelles, formées de polymères amphiphiles (*i.e.* possèdant à la fois un groupe hydrophile et hydrophobe) et s'auto-organisant en nanoagrégats de quelques dizaines de nanomètres ;
6. les polymères en étoile (dendrimères) ;
7. les nanoémulsions, etc.

Tous ces vecteurs n'ayant subi aucune modification chimique de leur surface sont dits de « première génération ».

Les nanovecteurs comprennent deux composants principaux : un « cœur » et une « couronne » qu'il est possible d'équiper de fonctionnalités adaptées à l'objectif thérapeutique (Couvreur, 2010) (figure 2).

Le cœur des nanovecteurs permet d'encapsuler des molécules biologiquement actives pour les rendre « invisibles » vis-à-vis des mécanismes de détoxification, comme, par exemple, ceux dont sont équipées les cellules tumorales ou d'encapsuler des molécules fragiles (ADN, ARN interférents, oligonucléotides antisens, protéines, peptides) afin de les protéger de la dégradation enzymatique extracellulaire.

Après administration intraveineuse, tous ces nanovecteurs particulaires sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts par des protéines qui constituent une signature moléculaire indiquant aux macrophages du foie (cellules de Kupffer) et de la rate qu'il s'agit de particules étrangères à l'organisme.

Si cette distribution hépato-splénique peut présenter un intérêt pour le ciblage et le traitement expérimental de pathologies hépatiques (voir plus loin), elle empêche cependant d'atteindre d'autres cibles biologiques. Par un effet de répulsion stérique, il est possible d'éviter l'adsorption des opsonines à la surface des vecteurs en les recouvrant de polymères hydrophiles et flexibles comme les polyéthylèneglycols (PEG). Cet effet de « dysopsonisation » réduit la clairance plasmatique des nanovecteurs en les rendant invisibles pour les macrophages hépatiques. Ces nanotechnologies de « deuxième génération », dites aussi « furtives », séjournent donc beaucoup plus longtemps dans la circulation générale.

L'utilisation de matériaux « intelligents » (polymères ou lipides pH-sensibles) permet également de rendre ces nanosystèmes capables de libérer le principe actif qu'ils véhiculent en réponse à un stimulus externe : modification de pH, de température, de force ionique ou application d'un champ magnétique extracorporel.

Il est aussi possible d'associer au sein d'un même nanovecteur deux ou plusieurs molécules agissant sur des cibles différentes (mais complémentaires) d'une même pathologie (par exemple, un agent

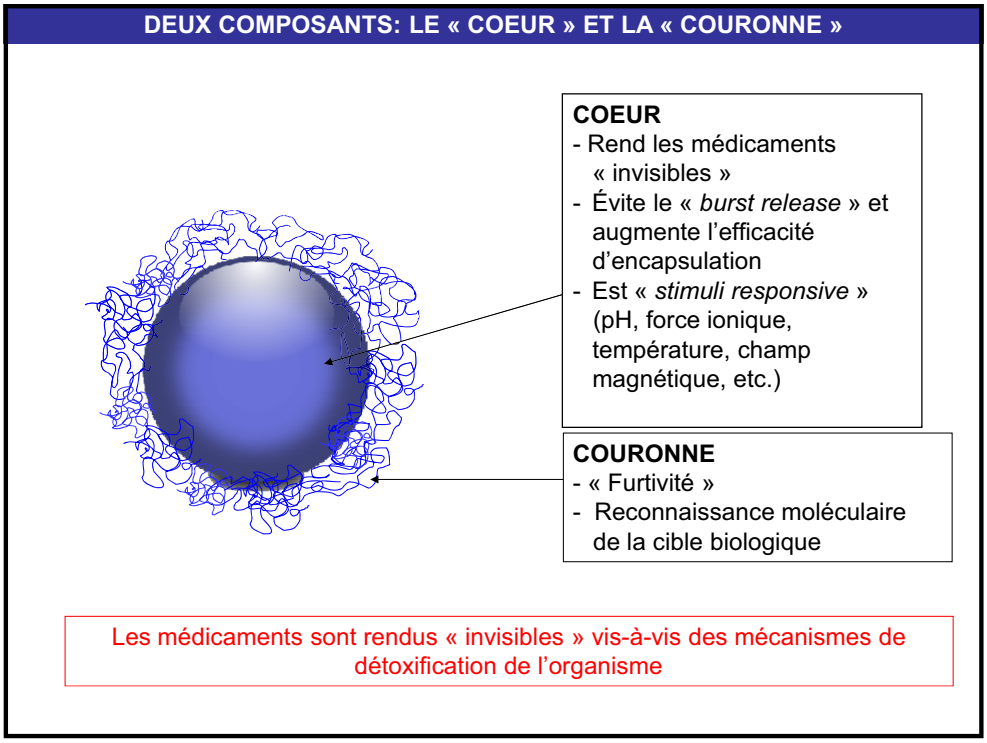


Fig. 2. Représentation schématique des deux principaux éléments susceptibles de doter les nanovecteurs de fonctionnalités « intelligentes » : le cœur et la couronne.

anti-angiogénique et un intercalant de l'ADN pour le traitement de certains cancers).

Enfin, la fonctionnalisation des nano-objets peut être réalisée pour le ciblage actif d'un tissu ou d'une cellule cible. Ces vecteurs de « troisième génération » portent des ligands capables de reconnaître de manière sélective et avec une forte affinité les cibles biologiques (récepteurs par exemple) qui s'expriment à la surface des cellules malades visées. De nature moléculaire (vitamines, hormones) ou macromoléculaires (peptides, anticorps), ces ligands sont généralement fixés à l'extrémité des PEG pour les rendre accessibles.

Les interactions nanovecteurs/cellules sont importantes à connaître car, beaucoup de cibles biologiques étant intracellulaires, les voies de pénétration dans la cellule ainsi que le trafic intracellulaire vont influencer l'effet thérapeutique.

En fonction de la nature des nanoparticules, de la voie d'administration et des cellules concernées, le nanovecteur va utiliser différentes voies d'internalisation pour pénétrer dans la cellule : la phagocytose, l'endocytose par la voie des clathrines ou des *caveolae*, ou encore la macropinocytose (Hillaireau & Couvreur, 2009). Ainsi, les cellules endothéliales et épithéliales semblent favoriser la pénétration intracellulaire des nanovecteurs par la voie de l'endocytose *via* les clathrines, alors que les macrophages utilisent plutôt la voie de la phagocytose. La charge de surface du nanovecteur joue aussi un rôle important : les nanoparticules cationiques sont internalisées plus efficacement par les cellules que les nanoparticules anioniques, en raison de l'effet d'attraction ou de répulsion avec la membrane cellulaire chargée négativement. D'autre part, il a été montré que plus les particules sont petites, plus elles sont internalisées en grand nombre par les cellules alors qu'en poids, le nanomatériau internalisé peut-être plus important avec des nanoparticules de taille moyenne (environ une centaine de nanomètres).

L'élaboration d'une stratégie de vectorisation nécessite d'avoir une connaissance approfondie : i) de la stabilité/instabilité du médicament vectorisé dans le milieu acide et riche en enzymes des lysosomes intracellulaires et ii) de la cible pharmacologique intracellulaire à atteindre (cytoplasme, endolysosomes ou noyau cellulaire). Par exemple, la thérapie génique à l'aide d'un ADN thérapeutique nécessite d'acheminer celui-ci jusqu'au noyau cellulaire, tandis que l'administration de petits ARN interférents (siRNA) impose une localisation cytoplasmique afin de permettre la reconnaissance du messager et l'inhibition du gène. Dans les deux cas, la séquestration dans les lysosomes doit être évitée. On comprend donc la nécessité de développer des nanovecteurs « intelligents », capables

de contrôler la délivrance du composé transporté dans le compartiment sub-cellulaire adéquat.

Applications thérapeutiques des nanovecteurs de première génération

Bien que le champ des applications thérapeutiques soit vaste, le traitement du cancer constitue une indication privilégiée pour l'utilisation des nanotechnologies comme vecteurs de médicaments.

En effet, les traitements actuels font appel à des molécules souvent peu spécifiques qui, en se distribuant dans les tissus sains, induisent des toxicités importantes, souvent rédhibitoires. D'autre part, de nombreuses pathologies néoplasiques s'avèrent résistantes aux traitements ce qui, dans certains cas, prive les patients de toute possibilité thérapeutique.

On observe que lors de leur administration par voie intraveineuse à un animal, ces vecteurs de première génération se concentrent essentiellement au niveau du système réticulo-endothélial, en particulier dans le foie. Ce phénomène est essentiellement dû au fait qu'ils présentent une surface spécifique considérable, sur laquelle viennent s'adsorber les opsonines plasmatiques, qui sont ensuite reconnues sélectivement par les macrophages du foie. Ces derniers viennent alors interagir avec les nanovecteurs : ceci explique pourquoi les nanovecteurs de première génération se concentrent rapidement au niveau hépatique.

Bien que cela puisse être considéré comme un inconvénient, on peut aussi en tirer avantage dans la mesure où ces nanovecteurs peuvent constituer de véritables navettes pour amener de manière sélective des médicaments au niveau du tissu hépatique ; de cette manière, il est possible de traiter efficacement les pathologies sévères du foie, telles que l'hépatocarcinome résistant, ou encore les métastases hépatiques. En vue de cette application, la doxorubicine, un agent anti-cancéreux intercalant de l'ADN, a été encapsulée dans des nanoparticules préparées à partir d'un polymère biodégradable, le polyalkylcyanoacrylate (PHCA), matériau utilisé comme colle chirurgicale.

Ce concept a été validé avec succès sur un modèle murin de métastases hépatiques (Chiannilkulchai, 1990).

Les résultats montrent que dans le cas d'un traitement par la doxorubicine sous une forme galénique traditionnelle, le nombre de métastases diminue en fonction de la dose, mais aux fortes doses ayant une bonne efficacité, certains animaux meurent du fait de la toxicité cardiaque bien connue du composé ; en d'autres termes l'index thérapeutique (rapport entre la dose pharmacologiquement active et la dose toxique) est extrêmement étroit. Par contre, si l'on encapsule la doxorubicine, on observe, d'une part, que sa concentration hépatique est fortement accrue et, d'autre part, qu'il est possible de débarrasser les animaux de la quasi-totalité de leurs métastases tout en réduisant considérablement la toxicité cardiaque du produit. Ainsi, du fait de la vectorisation, le médicament est mieux concentré au niveau de l'organe cible et sa toxicité est réduite, ce qui augmente fortement son index thérapeutique.

Ces mêmes nanoparticules de PHCA permettent aussi d'encapsuler les molécules biologiquement actives pour les rendre « invisibles » vis-à-vis des mécanismes de détoxification (résistance « multidrogues ») dont sont équipées les cellules tumorales (Colin de Verdière, 1997). Cette résistance est due à la présence de plusieurs glycoprotéines membranaires d'efflux, comme la P-glycoprotéine (P-gp) ou la MRP (*Multidrogue-Resistant P-glycoprotein*) situées au niveau de la membrane des cellules cancéreuses, qui expulsent le médicament à l'extérieur de la cellule. Cela peut être assimilé à un mécanisme de défense naturelle de la cellule cancéreuse qui se « détoxifie ». Cette résistance dite « multi-drogue » (MDR) rend inopérants la plupart des traitements chimiothérapeutiques classiques.

Afin de contourner ce mécanisme de résistance, nous avons donc utilisé les nanoparticules de PHCA chargées en doxorubicine. Sous cette forme, les protéines d'efflux ne peuvent plus reconnaître la doxorubicine, et les cellules cancéreuses redeviennent ainsi sensibles au médicament. Ce concept a été validé au laboratoire dans un hépatocarcinome humain en culture présentant le phénotype de résistance multidrogue. Lorsque ces cellules cancéreuses sont incubées en présence de concentrations croissantes de doxorubicine seule, pratiquement aucune activité antitumorale n'a été observée alors que vectorisée, la molécule a présenté une cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Des tests ont également été menés *in vivo* sur un modèle d'hépatocarcinome multi-résistant chez la souris transgénique. Les résultats ont montré que seules les nanoparticules de PHCA chargées en doxorubicine induisent l'apoptose des cellules cancéreuses, alors que l'introduction de doxorubicine sous forme d'une simple solution conduit à un niveau d'apoptose faible, similaire à celui observé lors de l'administration de nanoparticules sans anticancéreux ou lors de l'administration d'un placebo (Barraud, 2005).

À la suite de ces résultats précliniques, ce nanomédicament à base de doxorubicine est entré en phase III d'expérimentation clinique multicentrique pour le traitement du cancer primitif du foie (Société Bioalliance). Les premiers résultats sont encourageants puisque les patients montrent un taux de survie de 88,9 % après 18 mois de traitement par le

nanomédicament, nettement plus élevé que chez ceux qui ont reçu le traitement standard (54,5 %).

L'utilisation de matériaux « intelligents » et sensibles à un stimulus physique ou chimique permet de construire le « cœur » de nanomédicaments et de contrôler la libération du principe actif dans le temps et dans l'espace. Ainsi, des polymères ou lipides pH-sensibles (comme le N-isopropylacrylamide, la polyhistidine ou la dioléylphosphatidylcholine) sont capables d'induire le relargage du médicament dans des compartiments biologiques caractérisés par une diminution de pH, comme les tumeurs au niveau tissulaire ou les endolysosomes au niveau cellulaire. L'emploi de lipides ayant une transition de température un peu supérieure à la température du corps (40 °C) permet, par ailleurs, la délivrance ciblée dans une zone de l'organisme soumise à une hyperthermie localisée.

Il est aussi possible d'équiper le « cœur » des nanovecteurs avec des particules d'oxyde de fer, qui répondent à un champ magnétique extracorporel. C'est ce qui a été réalisé récemment pour le guidage d'un anticancéreux (la gemcitabine) dans un modèle murin de xénogreffe (tumeur transplantée) (Arias, 2011). Pratiquement, des nanoparticules magnétiques ultra-fines (d'une taille de quelques nanomètres) ont été piégées dans une nanomatrice (d'une taille d'une centaine de nanomètres) constituée d'un lipide naturel (le squalène, voir plus loin) couplé à la gemcitabine. Ces nanoconstructions sont injectées par voie intraveineuse pendant qu'un aimant est placé au niveau de la tumeur. L'inhibition de la croissance tumorale est spectaculaire et peut être suivie par imagerie en résonance magnétique nucléaire (RMN) grâce à la présence des particules d'oxyde de fer qui, au sein de la nanomatrice lipidique, induisent une diminution du signal T2. Le « cœur » de ce nanovecteur est donc équipé d'une double fonctionnalité : thérapeutique et diagnostique (« nanothéragnostique »). Ce concept encore expérimental ouvre la voie de la médecine personnalisée.

Applications thérapeutiques des nanovecteurs de deuxième génération (vectorisation passive)

Le tropisme hépatique des vecteurs dits de « première génération » peut être mis à profit pour adresser des médicaments au niveau du foie et traiter ainsi de nombreuses pathologies hépatiques (métastases hépatiques, hépatocarcinome, mais aussi leishmaniose viscérale, maladie de Gaucher, etc.). Dans le cas des cancers hépatiques, il s'agit, toutefois, d'un ciblage indirect puisque le médicament anticancéreux est livré d'abord aux cellules de Kupffer du foie, qui jouent ainsi le rôle de réservoir de médicament. Celui-ci peut alors diffuser dans l'ensemble du tissu et notamment vers les cellules néoplasiques.

Si l'on veut atteindre des tissus extra-hépatiques, il sera, en revanche, nécessaire d'empêcher les phénomènes d'opsonisation afin de réduire la capture massive par le système réticulo-endothélial.

On peut pour cela modifier la « couronne » (figure 2) en décorant sa surface à l'aide de polymères hydrophiles et flexibles comme les PEG (on parle alors de « PEGylation »), capables de ce fait de repousser les opsonines par répulsion stérique (figure 3). Après administration intraveineuse, ces nanosystèmes « PEGylés » vont acquérir, au contraire des nanovecteurs non PEGylés, un temps de circulation prolongé et leur capture hépatique sera réduite, leur permettant de cibler d'autres tumeurs. Le caractère « furtif » (absence de reconnaissance par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse) de ces vecteurs dits de « deuxième génération » sera d'autant plus prononcé que les nanotechnologies employées sont de faible taille. D'autre part, la durée de la résidence vasculaire dépendra à la fois de la longueur des chaînes de PEG et de leur densité de surface.

Dans un tissu sain, l'endothélium vasculaire est jointif, ce qui empêche les nanovecteurs de pénétrer dans ce tissu. Au contraire, les vecteurs « furtifs », à rémanence vasculaire prolongée, sont capables de traverser l'endothélium vasculaire rendu plus perméable par la réaction inflammatoire associée à un foyer infectieux ou à la présence d'une tumeur (figure 3). Cet effet de perméabilité et de rétention tissulaire (appelé effet « EPR » par les anglo-saxons pour *Enhanced and Permeability Retention Effect*) permet donc le ciblage de tumeurs localisées hors du territoire hépato-splénique. Certains l'appellent aussi « vectorisation passive » car elle résulte d'un effet mécanique et spontané de translocation à travers la paroi des vaisseaux du tissu cible. Ainsi, dès le début des années 1990, les équipes de Dimitri Papahajopoulos (Université de San Francisco, USA) (Woodle, 1992) et d'Alberto Gabizon (Hadassah Medical Center, Jérusalem) (Gabizon, 1993) ont montré que des liposomes PEGylés, chargés en médicaments anticancéreux, avaient une efficacité remarquable dans le traitement de tumeurs expérimentales solides. Cette découverte a abouti à la mise sur le marché du Doxil® (liposomes de doxorubicine).

L'effet « EPR » a été également observé dans un modèle expérimental de gliome (qui présente une vascularisation importante) chez le rat. Ainsi, lorsque l'on administre des nanoparticules PEGylées de polyalkylcyanoacrylate, on observe au cours du temps leur accumulation sélective au niveau de la tumeur, sans qu'aucune translocation de ces nanosphères ne soit observée dans l'hémisphère sain controlatéral (Brigger, 2002).

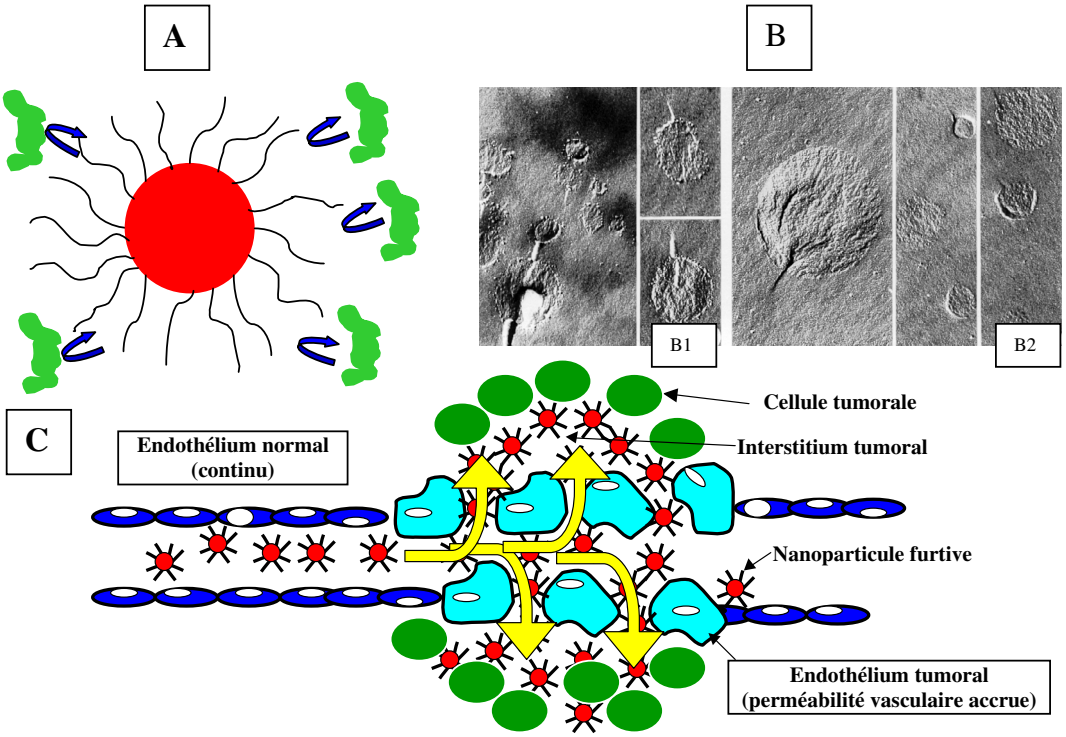


Fig. 3. Représentation schématique du concept de répulsion stérique qui évite l'opsonisation et la reconnaissance par les macrophages (vecteurs de 2^{e} génération) (A) ; lorsque les nanoparticules ne sont pas décorées de PEG, on peut observer en microscopie électronique qu'elles sont recouvertes par les protéines du sérum (B1, la surface des particules est granuleuse) ; au contraire, lorsqu'elles sont recouvertes de PEG, elles exercent un effet de répulsion vis-à-vis des protéines plasmatiques (B2, la surface des particules est lisse) (d'après Peracchia *et al.*, 1999). Ces particules sont alors capables de diffuser sélectivement à travers l'endothélium vasculaire tumoral dont la perméabilité est accrue et ainsi atteindre le tissu tumoral (C).

L'adressage de nanomédicaments par effet « EPR » au niveau de tissus sanctuaires est également possible dans d'autres pathologies où l'on observe une réaction inflammatoire et une rupture de la barrière hémato-méningée, comme cela a été montré dans le cas de l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) chez le rongeur. Dans ce modèle, l'administration de nanoparticules PEGylées entraîne leur accumulation au niveau de la moelle épinière et, dans une moindre mesure, au niveau des tubercules quadrijumeaux, du cervelet et du cortex cérébral, zones où se localise la réaction inflammatoire (Calvo, 2002).

Applications thérapeutiques des nanovecteurs de troisième génération (vectorisation active)

Les résultats précédents montrent le bon ciblage des tissus malades par les nanovecteurs de deuxième génération grâce à l'effet EPR. Cependant, si ces vecteurs peuvent permettre de véhiculer sélectivement des médicaments au niveau des tissus cancéreux, ils ne restent, cependant, que dans l'espace interstitiel et ne pénètrent pas dans la cellule tumorale. Un nouveau type de nanovecteur dit de « troisième génération » a été conçu afin de pénétrer à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi de véhiculer les médicaments vers des cibles intracellulaires.

Pour ce faire, on peut équiper les nanovecteurs de ligands capables de reconnaître des récepteurs spécifiques afin de pouvoir délivrer les médicaments qu'ils transportent à l'intérieur de la cellule cible (figure 4). Il est nécessaire de choisir des cibles moléculaires qui, exprimées à la surface des cellules, soient susceptibles d'être endocytées par celles-ci après interaction avec le ligand. Il s'agit d'une fonctionnalité supplémentaire, qui pourra être attribuée à la « couronne » du nanovecteur.

Dans le cancer de l'ovaire, par exemple, il est maintenant bien établi que les cellules cancéreuses surexpriment le récepteur à l'acide folique. Après liaison du ligand à son récepteur, le complexe récepteur-acide folique est internalisé par la cellule dans un endosome

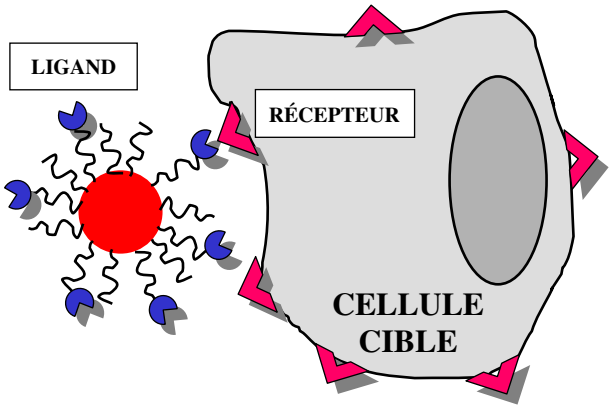


Fig. 4. Représentation schématique d'un nanovecteur équipé d'un ligand (anticorps, protéine, petite molécule) capable de reconnaître un récepteur exprimé à la surface de la cellule cible (vecteurs de troisième génération).

intracellulaire et le ligand libéré ensuite à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène naturel peut être judicieusement utilisé comme moyen de routage pour permettre à des nanoparticules de troisième génération, vectorisées avec de l'acide folique, de délivrer leur principe actif dans la cellule cancéreuse (Sonvico, 2005).

Un autre exemple est celui de la décoration de nanoparticules de chitosan à l'aide de l'anticorps OX-26, capable de reconnaître le récepteur de la transferrine au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-méningée. Avec l'équipe de Turgay Dalkara (Hacettepe University, Turquie), nous avons montré qu'il était possible d'encapsuler dans ces vecteurs un peptide inhibiteur de la voie de la caspase-3 (le Z-DEVD-FMK) et de l'adresser au niveau cérébral afin de traiter efficacement l'ischémie cérébrale focale chez le rat (Karatas *et al.,* 2009). Ainsi, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale avec reperfusion, induit par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, l'administration du peptide anti-caspase à l'aide de ce nanovecteur a réduit de près de 45 % la taille de la zone infarcie et diminué du même ordre le déficit neurologique chez ces animaux.

La construction de tels nanovecteurs est délicate, car les chaînes de PEG nécessaires pour éviter la capture hépatique peuvent, par encombrement stérique, empêcher les anticorps de reconnaître l'antigène correspondant. Inversement, une trop forte densité d'anticorps à la surface des nanovecteurs peut recréer un environnement hydrophobe, à nouveau favorable à l'opsonisation et à l'activation du complément. C'est dans ce contexte que le concept astucieux de « double vectorisation » a été imaginé par le groupe de Vladimir Torchilin (Nothern University, Boston) (Torchilin, 2006). Ces vecteurs sont : i) recouverts de PEG *via* une liaison hydrolysable à pH acide et ii) fonctionnalisés à l'aide de ligands internalisables par la cellule (*i.e.* le peptide tat, l'acide folique ou la transferrine). Dans le compartiment sanguin, la fonction d'internalisation cellulaire est masquée par les chaînes de PEG qui réalisent la vectorisation passive du composé anticancéreux vers le tissu tumoral *via* l'effet EPR. Lorsque la cible est atteinte, l'hydrolyse de la liaison a pour effet, en libérant le PEG, de démasquer la fonction de pénétration cellulaire.

Vers de nouveaux nanovecteurs

En dépit des progrès considérables réalisés dans le domaine des nanomédicaments, force est de constater qu'il n'existe pas de plate-forme universelle pour la vectorisation des médicaments et que d'importants verrous technologiques subsistent, parmi lesquels il convient de citer :

1. le faible pouvoir d'encapsulation des systèmes nanoparticulaires, qui ne dépasse généralement pas 5 % (exprimé en % du poids de principe actif par rapport au poids du matériau vecteur) ;
2. la libération trop rapide du médicament encapsulé (« *burst release* »), correspondant au relargage, en quelques minutes, de la fraction de médicament simplement adsorbée à la surface du nanovecteur ;
3. la difficulté d'obtenir des matériaux synthétiques peu toxiques, biodégradables, et non immunogènes.

Ces difficultés expliquent le nombre encore limité de nanomédicaments ayant abouti à une mise sur le marché. Il est donc plus que jamais nécessaire d'expérimenter de nouvelles idées et de nouveaux concepts susceptibles de conduire à la découverte de nouveaux matériaux biocompatibles, biodégradables et plus efficaces.

C'est dans ce contexte que nous avons eu l'idée de tirer profit de la conformation moléculaire compacte du squalène (un lipide précurseur du cholestérol) pour obtenir des systèmes nanoparticulaires en couplant cette molécule à des analogues nucléosidiques possédant une activité antitumorale ou antivirale (Couvreur, 2006). Les nanomédicaments squalénés ainsi obtenus se sont révélés beaucoup plus efficaces que les molécules mères. En effet, ces nanosystèmes (I) peuvent être administrés non seulement par voie intraveineuse mais aussi par voie orale ; (II) favorisent la pénétration intracellulaire des analogues nucléosidiques ; (III) facilitent leur passage transmembranaire et (IV) les protègent de la dégradation/métabolisation.

Le concept de squalénisation a été initialement appliqué à la gemcitabine, un anticancéreux majeur qui, comme la cytidine, s'incorpore dans le métabolisme des bases pyrimidiques et perturbe, par divers mécanismes, la synthèse de l'ADN. La quantité

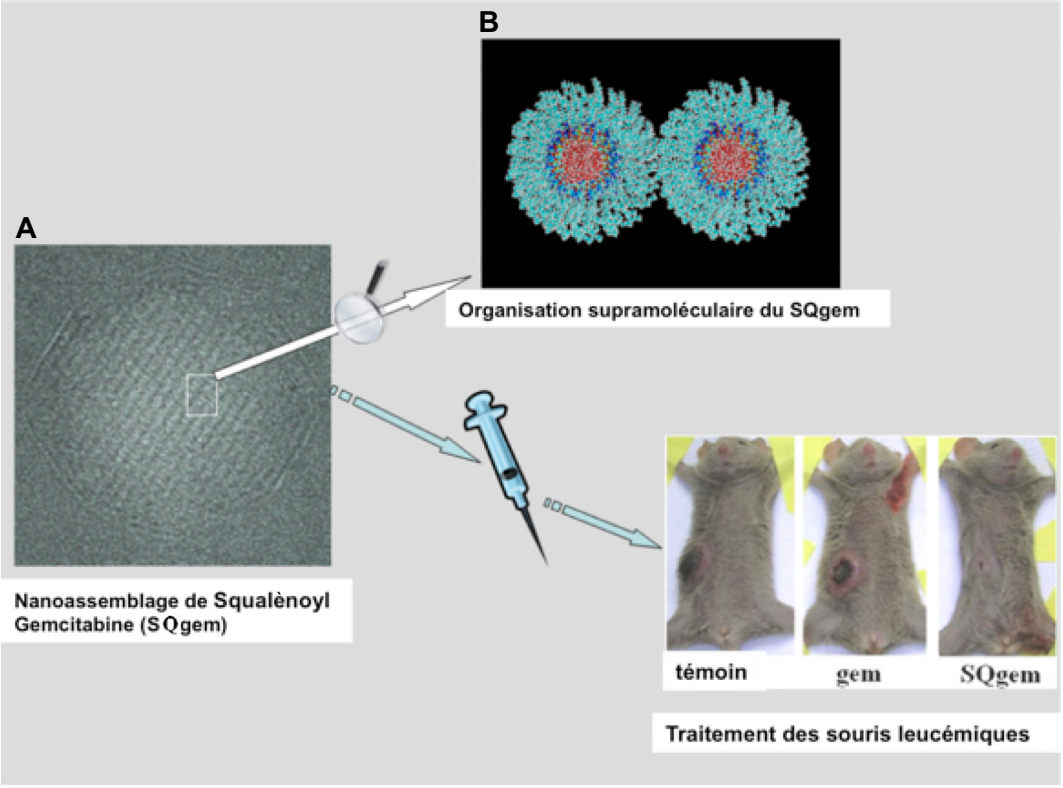


Fig. 5. Aspect des nanoparticules de gemcitabine-squalène en cryomicroscopie électronique (A) et représentation de l'organisation supramoléculaire en modélisation moléculaire (B). L'efficacité du traitement est évaluée dans un modèle murin 25 jours après la greffe des cellules tumorales par voie sous-cutanée et injection intraveineuse des nanoparticules de gemcitabine-squalène (SQgem) ou de gemcitabine libre (gem). Les souris non traitées sont utilisées comme témoins. D'après Couvreur *et al.*, (2008) (*Copyright* Small, 2008).

de gemcitabine véhiculée par ces nano-objets est de 41 %, soit un pouvoir de charge cinq fois supérieur au meilleur résultat de la littérature avec les liposomes.

Ce nanomédicament à base de gemcitabine-squalène a donné lieu à des résultats spectaculaires *in vitro* sur des lignées de cellules tumorales humaines (MCF-7 et KB). *In vivo*, les nanoparticules de gemcitabine-squalène se sont avérées également beaucoup plus efficaces que la gemcitabine sur un modèle murin de xénogreffe de tumeurs solides (panc-1, L-1210 et P388), ainsi que sur des modèles murins de leucémies agressives métastatiques (en particulier, leucémie L-1210) (Reddy, 2008, 2009).

Dans le modèle murin agressif de leucémie L-1210, les cellules cancéreuses sont injectées par voie intraveineuse aux souris, qui sont ensuite traitées par la même voie avec les composés à étudier. Les souris non traitées meurent au bout de vingt jours, traduisant l'agressivité de cette tumeur liquide. Chez les souris traitées par la gemcitabine libre à la dose maximale tolérée de 100 mg/kg, la survie des souris est prolongée en moyenne de 50 % mais aucun survivant à long terme (> 45 jours) n'est observé. Par contre, les particules de gemcitabine-squalène injectées à une dose cinq fois moindre que la gemcitabine libre réduisent considérablement la mortalité à long terme (75 % de survivants) (Reddy, 2008).

La technologie de squalénisation a également été évaluée sur des tumeurs localisées. Dans ce modèle murin, les cellules cancéreuses ont été injectées par voie sous-cutanée et l'évolution du volume tumoral a été suivie. Chez les souris non traitées, le volume tumoral croît de manière très rapide. Le traitement par la gemcitabine libre (à la dose de 100 mg/kg) ne modifie pas la croissance tumorale ; par contre, chez les souris traitées par voie intraveineuse par les nanoparticules de gemcitabine-squalène, on observe une diminution de la masse tumorale, et après dix jours, la tumeur a totalement disparu (figure 5).

Ce nanomédicament est donc beaucoup plus efficace que la gemcitabine sur des tumeurs résistantes.

Des études complémentaires menées *in vitro* et *in vivo* ont permis d'expliquer la meilleure activité anticancéreuse des nanoparticules squalénées par (I) un

ciblage du foie, de la rate et des poumons, qui sont les principaux sites métastatiques ; (II) une pénétration intracellulaire accrue ; (III) une activation sélective de la pro-drogue par la cathepsine B, enzyme qui est présente en grande quantité dans les cellules cancéreuses ; et (IV) une meilleure phosphorylation de la gemcitabine quand elle est délivrée aux cellules sous forme de nanoparticules squalénées (Bildstein, 2010).

Le concept de squalénisation a également été appliqué à d'autres analogues nucléosidiques à activité anti-virale (Bekkara-Aounallah, 2008), comme l'anti-VIH AZT ou la didanosine (ddI). Quel que soit le mode de liaison au squalène (sur le sucre ou sur l'hétérocycle), ces molécules s'auto-organisent dans l'eau sous forme de nanoparticules de 100−200 nm de diamètre (figure 5).

La ddI squalénisée ainsi obtenue a été testée sur des lymphocytes humains originaires de trois donneurs différents infectés par le VIH. Sur une souche sensible, on observe que les nanoparticules de ddI-squalène sont quatre fois plus efficaces comparativement à la ddI incubée sous forme libre. Plus intéressante encore est l'observation qui a été faite avec des souches résistantes de VIH, en particulier la souche 146, pour laquelle l'incubation de la ddI sous forme de nanoparticules squalénisées conduit à une efficacité dix fois plus importante que la ddI sous forme libre.

Conclusions et perspectives

Les nanomédicaments constituent une nouvelle forme prometteuse de médicaments pour le traitement de certains cancers, de certaines maladies infectieuses ou pour le diagnostic. Les résultats obtenus ont déjà dépassé le stade de la curiosité de laboratoire, puisque des nanomédicaments sont aujourd'hui à la disposition des patients pour le traitement de cancers (Doxil®, Abraxane®, Daunoxone®), de certaines maladies infectieuses (Ambisome® et Amphocil®) ou pour le diagnostic (Endorem® et Sinerem®), tandis que d'autres sont au stade d'études cliniques de phase I, II ou III.

Il se prépare actuellement au laboratoire des nanovecteurs de « deuxième génération » capables d'acheminer avec précision des principes actifs vers les régions cibles mais aussi des nanovecteurs de « troisième génération » capables de cibler spécifiquement les cellules malades ; un bon nombre de ces nanoparticules ont montré des résultats très encourageants dans des modèles expérimentaux chez l'animal et devraient permettre de répondre au besoin d'innovation pour la découverte de médicaments plus efficaces.

Cette revue a fait le point sur les principales avancées réalisées pour la vectorisation de molécules biologiquement actives après injection intravasculaire. Les micro- et nanotechnologies peuvent également être utilisées pour l'administration par voie orale d'antigènes en vue d'accroître la réponse immunitaire systémique ou d'induire une réponse muqueuse de type IgA : I) en protégeant l'antigène de la dégradation ; II) en permettant sa libération filée, ce qui augmente le temps d'exposition de celui-ci vis-à-vis des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes ; III) en facilitant la phagocytose par les macrophages et les cellules dendritiques ; IV) enfin en stimulant le système immunitaire *via* la production de cytokines. Le développement de vaccins efficaces par voie orale est l'un des challenges importants de ce domaine de recherche.

Douées de propriétés paramagnétiques et superparamagnétiques, les nanoparticules d'oxyde de fer ultrafines (USPIO) sont utilisées pour augmenter le contraste (diminution du signal T2) dans l'imagerie des tissus par résonance magnétique (IRM). Elles peuvent être utilisées telles quelles (Endorem®, Sinerem®) ou bien être incorporées dans d'autres vecteurs comme il a été montré ci-dessus. En clinique, les USPIO permettent d'améliorer de manière spectaculaire le contraste et la résolution des images obtenues par IRM. Par exemple, l'emploi des nanoparticules d'oxyde de fer pour le diagnostic des tumeurs hépatiques permet la détection par IRM de nodules d'un diamètre de seulement 2 mm. La distinction entre un ganglion sain ou métastasé peut aussi être faite grâce aux USPIO, par exemple dans l'évaluation des atteintes ganglionnaires du cancer de la prostate.

Semi-conducteurs et de nature nanoparticulaire (7 à 15 nm de diamètre), les *quantum dots* sont d'autres agents de contraste qui présentent de remarquables propriétés de fluorescence. Ces nanocristaux enrobés par un agent stabilisant permettent ainsi de réaliser de l'imagerie photonique *in vivo* sur l'animal éveillé. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, les données concernant la toxicité des *quantum dots* ne permettent pas encore d'envisager des applications diagnostiques chez l'Homme.

L'utilisation de vecteurs galéniques pour la thérapie génique constitue un autre domaine d'investigation passionnant. Ces vecteurs non-viraux sont une alternative prometteuse à l'utilisation des virus pour la transfection des acides nucléiques (de Martimprey, 2008). Des stratégies biomimétiques permettront peut-être, à l'avenir, d'aboutir à des vecteurs aussi efficaces que les virus, sans en avoir les inconvénients (immunogénicité, réveil d'oncogènes, etc.).

Les avancées scientifiques et technologiques réalisées dans le domaine des nanomédicaments ont bénéficié de la convergence de nombreuses disciplines : chimie des matériaux, physico-chimie des colloïdes, formulation galénique, biologie moléculaire

et cellulaire, pharmacologie et toxicologie. Une telle approche trans-disciplinaire est indispensable pour répondre aux nombreux besoins thérapeutiques encore insatisfaits.

Remerciements. Ce texte a été rédigé par le Dr Bernard Scatton (Vice-Président de la Société de Biologie) grâce aux notes prises pendant la conférence de P. Couvreur.

Références

Al Khouri, F.H., Roblot-Treupel L., Devissaguet J.P., Puisieux F., An original procedure for preparing nanocapsules of polyalkylcyanoacrylates for interfacial polymerization. *Pharm Acta Helv*, 1986, 61, 274−281.

Arias J.L., Reddy L.H., Othman M., Gillet B., Desmaële D., Zouhiri F., Dosio F., Gref R., Couvreur P., Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano*, 2011, 22, 1513−1521.

Barraud L., Merle P., Soma E., Lefrançois L., Guerret S., Chevallier M., Dubernet C., Couvreur P., Trépo C., Vitvitski L., Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J Hepathology*, 2005, 42, 736−743.

Bekkara-Aounallah F., Gref R., Othman M., Reddy L.H., Pili B., Allain V., Bourgaux C., Hillaireau H., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Nicolas J., Chafi N., Couvreur P., Novel PEGylated nanoassemblies made of self-assembled squalenoyl nucleoside analogues. *Adv Funct Materials*, 2008, 18, 3715−3725.

Bildstein L., Dubernet C., Marsaud V., Chacun H., Nicolas V., Gueutin C., Sarasin A., Bénech H., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P., Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: An original drug delivery pathway. *J Control Rel*, 2010, 147, 163−170.

Brigger I., Morizet J., Aubert G., Chacun H., Terrier-Lacombe M.J., Couvreur P., Vassal G., Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303, 928−936.

Calvo P., Gouritin B., Villarroya H., Eclancher F., Giannavola C., Klein C., Andreux J.P., Couvreur P., Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur J Neurosci*, 2002, 15, 1317−1326.

Chiannilkulchai N., Ammoury B., Caillou J.P., Devissaguet P., Couvreur P., Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1990, 26, 122−126.

Colin de Verdière A., Dubernet C., Némati F., Soma E., Appel M., Ferté J., Bernard S., Puisieux F., Couvreur P., Reversion of the multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: mechanism of action. *Brit J Cancer*, 1997, 76, 198−205.

Couvreur P., « *Les nanotechnologies peuvent-elles contribuer à traiter des maladies sévères ?* » Leçon inaugurale du Collège de France, Fayard 2010.

Couvreur P., Tulkens P., Roland M., Trouet A., Speiser P., Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier., *FEBS Lett*, 1977, 84, 323−326.

Couvreur P., Stella B., Reddy L.H., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir M., Cattel L., Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano Lett*, 2006, 6, 2544−2548.

Couvreur P., Reddy L.H., Mangenot S., Poupaert J.H., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Pili B., Bourgaux C., Amenitsch H., Ollivon M., Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small*, 2008, 42, 247−53.

de Martimprey H., Bertrand J.R., Fusco A., Santoro M., Couvreur P., Vauthier C., Malvy C., siRNA nanoformulation against the Ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an *in vivo* model of papillary thyroid carcinoma. *Nucl Ac Res*, 2008, 36, 1093−1094.

Gabizon A.A., Barenholz Y., Bialer M., Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharm Res*, 1993, 10, 703−708.

Gregoriadis G., Leathwood P.D., Ryman B.E., Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett*, 1971, 14, 95−99.

Hillaireau H., Couvreur P., Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66, 2873−2896.

Horcajada P., Chalati T., Serre C., Gillet B., Sebrie C., Baati T., Eubank J.F., Heurtaux D., Clayette P., Kreuz C., Chang J.S., Hwang Y.K., Marsaud V., Bories P.N., Cynober L., Gil S., Férey G., Couvreur P., Gref R., Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature Mater*, 2010, 9, 172−178.

Karatas H., Aktas Y., Gursoy-Ozdemir Y., Bodur E., Yemisci M., Caban S., Vural A., Pinarbasli O., Capan Y., Fernandez-Megia E., Novoa-Carballal R., Riguera R., Andrieux K., Couvreur P., Dalkara T., A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci*, 2009, 29, 13761−13769.

Nishiyama N., Okazaki S., Cabral H., Miyamoto M., Kato Y., Sugiyama Y., Nishio K., Matsumura Y., Kataoka K., Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res*, 2003, 63, 8977−8983.

Mullard A., 2011 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11, 91.

Peracchia M.T., Harnisch S., Pinto-Alphandary H., Gulik A., Dedieu J.C., Desmaële D., d'Angelo J., Müller R.H., Couvreur P., Visualization of *in vitro* protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*, 1999, 20, 14, 1269−1275.

Reddy L.H., Marque P.E., Dubernet C., Lepêtre-Mouelhi S., Dësmaele D., Couvreur P., Preclinical toxicology (sub-acute and acute) and efficacy of a new squalenoyl gemcitabine anticancer nanomedicine. *J Pharm Exp Ther*, 2008, 325, 484−490.

Reddy L.H., Renoir J.M., Marsaud V., Lepêtre-Mouelhi S., Dësmaele D., Couvreur P., Anticancer efficacy of squalenoyl Gemcitabine nanomedicine on 60 human tumor cell panel and on experimental tumor. *Mol Pharm*, 6, 2009, 1526−1535.

Scatton B., Le processus de découverte du médicament dans l'industrie pharmaceutique. *J Soc Biol*, 2009, 203, 249−269.

Sonvico F., Mornet S., Vasseur S., Dubernet C., Jaillard D., Degrouard J., Hoebeke J., Duguet E., Colombo P., Couvreur P., Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and *in vitro* experiments. *Bioconjug Chem*, 2005, 16, 1181−1188.

Torchilin V., Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Del Rev*, 2006, 58, 1532−1555.

Woodle M.C., Matthay K.K., Newman M.S., Hidayat J.E., Collins L.R., Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1105, 193−200.