

MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIÈRE ET DES COLLECTIVITÉS

Soutenu devant le Jury interrégional

le 20/11/2008

par M. **Thomas TIPHINE**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 6 mai 1987 tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**FORMULATION DE NANOCAPSULES
LIPIDIQUES DE siRNA**

- Président : M. Christian MERLE, Docteur en Pharmacie,
Professeur de Pharmacie Galénique - Nantes
- Membres du jury : M. Jean-Pierre BENOIT, Docteur en Pharmacie,
Professeur de Pharmacie Galénique, Praticien Hospitalier - Angers
- Mme Catherine PASSIRANI, Docteur en Pharmacie,
Maître de Conférences de Pharmacie Galénique - Angers
- M. Jean-Christophe FREVILLE, Docteur en Pharmacie,
Praticien Hospitalier - La Roche Sur Yon
- Mme Dominique NAVAS, Docteur en Pharmacie,
Praticien Hospitalier - Nantes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	II
GLOSSAIRE	VII
ICONOGRAPHIE	IX
Table des figures	X
Table des tableaux	XI
INTRODUCTION	1
INTERFERENCE A ARN ET VECTORISATION DES SIRNA	3
1 Introduction	4
2 Mécanismes de l'interférence à ARN	5
2.1 Molécules effectrices.....	5
2.2 Phase d'initiation.....	5
2.2.1 <i>Précurseurs des miRNA</i>	5
2.2.2 <i>Précurseurs des siRNA</i>	6
2.3 Phase effectrice	7
2.3.1 <i>Formation du complexe effecteur</i>	7
2.3.2 <i>Interaction avec l'ARNm cible</i>	7
3 Interférence à ARN et thérapeutique	9
3.1 Intérêt thérapeutique.....	9
3.2 Stratégies thérapeutiques.....	10
3.2.1 <i>Administration d'un ADN codant pour un précurseur du siRNA</i>	10
3.2.2 <i>Administration d'un ARN</i>	11
3.3 Utilisation des siRNA en thérapeutique	12
3.3.1 <i>Optimisation des siRNA utilisés en thérapeutique</i>	12
3.3.2 <i>Avantages de l'utilisation des siRNA en thérapeutique</i>	12
3.3.3 <i>Limites à l'utilisation thérapeutique des siRNA</i>	13
4 Administration des siRNA	14
4.1 Généralités.....	14
4.2 Administration des siRNA non vectorisés	14
4.2.1 <i>Administration par voie locale</i>	14
4.2.2 <i>Méthodes physiques</i>	14
4.2.3 <i>Modifications chimiques</i>	15
4.3 Vectorisation des siRNA	17
4.3.1 <i>Intérêts et limites de la vectorisation</i>	17
4.3.2 <i>Polymères cationiques</i>	18
4.3.2.1 <i>Atélocollagène</i>	18
4.3.2.2 <i>Chitosan</i>	18

4.3.2.3	Polyéthylèneimine	19
4.3.3	<i>Liposomes</i>	22
4.3.3.1	Liposomes neutres	22
4.3.3.2	Lipoplexes	23
4.3.4	<i>Autres stratégies</i>	25
4.3.4.1	Conjugaison siRNA - macromolécules	25
4.3.4.2	Autres techniques d'encapsulation	27

NANOCAPSULES LIPIDIQUES PREPAREES		
PAR INVERSION DE PHASE.....		28
1	Introduction	29
2	Procédé de préparation des nanocapsules lipidiques	30
2.1	Constituants utilisés.....	30
2.2	Description du procédé.....	32
2.2.1	<i>Formation de la micro-émulsion</i>	32
2.2.2	<i>Formation des nanocapsules</i>	32
2.3	Paramètres du procédé	34
2.3.1	<i>Zone de faisabilité</i>	34
2.3.2	<i>Mécanisme de l'inversion de phase</i>	35
2.3.3	<i>Rôles de la salinité et des cycles de température</i>	35
3	Caractéristiques des LNC.....	36
3.1	Caractéristiques physiques	36
3.1.1	<i>Taille et indice de polydispersité</i>	36
3.1.2	<i>Potentiel zêta</i>	37
3.2	Structure	38
3.3	Stabilité.....	39
3.4	Furtivité	39
3.4.1	<i>Nanocapsules lipidiques non modifiées</i>	39
3.4.1.1	<i>Etudes in vitro</i>	39
3.4.1.2	<i>Etudes in vivo</i>	40
3.4.2	<i>Nanocapsules lipidiques modifiées</i>	40
4	Intérêt et applications	42
4.1	Généralités.....	42
4.1.1	<i>Développement initial</i>	42
4.1.2	<i>Premières applications</i>	42
4.2	Vectorisation d'anticancéreux	43
4.3	Applications à la radiothérapie	44
4.4	Autres applications	46
4.4.1	<i>Immunonanocapsules</i>	46
4.4.2	<i>Encapsulation de complexes d'ADN</i>	46

SYSTEMES GELIFIANTS A BASE D'ALGINATE.....	47
1	Introduction 48
2	Acide alginique et alginates 49
2.1	Origine..... 49
2.2	Structure 50
2.3	Propriétés physico-chimiques 51
2.4	Domaines d'application..... 52
3	Vectorisation et alginates de calcium 55
3.1	Gélification externe 55
3.1.1	<i>Technique par chute de goutte</i> 55
3.1.1.1	Description 55
3.1.1.2	Applications 56
3.1.1.3	Limites 57
3.1.2	<i>Autres techniques de gélification externe</i> 57
3.2	Gélification interne..... 58
3.2.1	<i>Techniques pionnières de gélification interne</i> 58
3.2.2	<i>Emulsification couplée à la gélification interne</i> 59
3.2.2.1	Description de la technique 59
3.2.2.2	Choix du sel de calcium 61
3.2.2.3	Autres paramètres opératoires 62
3.2.2.4	Applications 62
3.2.3	<i>Autres techniques de gélification interne</i> 63
3.3	Autres techniques 64
3.3.1	<i>Etat « pré-gel » de l'alginate de calcium</i> 64
3.3.2	<i>Interaction directe alginate – chitosan</i> 65
CONCLUSION.....	66
BIBLIOGRAPHIE.....	68

GLOSSAIRE

ARNi	interférence à ARN
ARNm	ARN messenger
DLinDMA	dilinoléyloxy-diméthyl-aminopropane
DOPC	dioléoyl-glycéro-phosphatidylcholine
DOPE	dioléoyl-phosphatidyléthanolamine
DOTAP	dioléoyloxypropyl-triméthylammonium
DPhyPE	diphytanoyl-glycéro-phosphatidyléthanolamine
DSPC	distéaroyl-glycéro-phosphatidylcholine
DSPE-PEG	distéaroyl-glycéro-phosphatidyléthanolamine – polyéthylèneglycol
dsRNA	ARN double brin (<i>double stranded RNA</i>)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HS-PEG	hydroxystéarate de polyéthylèneglycol
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LNC	nanocapsules lipidiques
MDR	<i>multi drug resistance</i>
miRNA	micro-ARN
PdI	index de polydispersité
PEG	polyéthylèneglycol
PEG-C-DMA	méthoxy-polyéthylèneglycol-carbamoyl-dimyristyloxy-propylamine
PEI	polyéthylèneimine
PgP	P-glycoprotéine
pre-miRNA	<i>miRNA precursor</i>
pri-miRNA	<i>long primary transcripts</i>
RISC	complexe d'extinction induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RLC	<i>RISC loading complex</i>
shRNA	ARN en épingle à cheveu (<i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	petit ARN interférant (<i>small interfering RNA</i>)
SLN	nanoparticules lipidiques solides
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZIP	zone d'inversion de phase

ICONOGRAPHIE

Table des figures

Figure 1 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase d'initiation conduisant aux miRNA actifs.	6
Figure 2 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase d'initiation conduisant aux siRNA actifs.	6
Figure 3 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase effectrice, formation du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et interaction avec l'ARNm cible.	8
Figure 4 : utilisation de l'interférence à ARN comme outil thérapeutique : administration d'un ADN codant pour un shRNA ou administration d'un ARN double brin.	11
Figure 5 : administration des siRNA non vectorisés : modifications chimiques utilisées, concernant la liaison phosphodiester ou le ribose.	16
Figure 6 : vectorisation des siRNA : structure schématique de nanoplexes.	20
Figure 7 : vectorisation des siRNA : représentation schématique de la conjugaison d'un siRNA au polyéthylène glycol via un pont disulfure.	21
Figure 8 : vectorisation des siRNA : représentation schématique de lipoplexes pégylés.	24
Figure 9 : vectorisation des siRNA : représentation schématique du complexe aptamère-siRNA.	26
Figure 10 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : structure chimique des principaux constituants utilisés : Solutol [®] , Labrafac [®] et Lipoïd [®]	31
Figure 11 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : schématisation du procédé.	33
Figure 12 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : diagramme ternaire définissant la zone de faisabilité des nanocapsules en fonction des quantités d'eau, d'huile et de tensioactif polyéthoxylé pour des quantités de chlorure de sodium et de phospholipides fixées respectivement à 1,75% et 1,5% (p/p).	34
Figure 13 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : image obtenue en microscopie électronique à transmission après coloration négative à l'acide phosphotungstique	36
Figure 14 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : représentation graphique du potentiel zêta de LNC de 49 nm de diamètre : -13,3 mV avec deux pics, respectivement -26,8 mV (58%) et 5 mV (42%).	38
Figure 15 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : structure schématique.	38
Figure 16 : application des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : courbes de survie (modèle de Kaplan-Meyer) de rats portant un gliome 9L et traités à J6 par une injection intratumorale de LNC encapsulant des complexes lipophiles de ¹⁸⁸ Re (¹⁸⁸ Re-SSS LNC).	45
Figure 17 : origine de l'acide alginique : représentation schématique des phases squelettiques et matricielles de la paroi des algues brunes.	49
Figure 18 : structure de l'acide alginique : structure chimique des acides β-D-mannuronique et β-L-guluronique ; structure schématique de l'acide alginique.	51
Figure 19 : propriétés physico-chimiques de l'acide alginique : organisation en « boîte à œufs » du gel d'alginate de calcium, au niveau des blocs G du polysaccharide.	52
Figure 20 : émulsification couplée à la gélification interne : description du procédé.	60

Table des tableaux

Tableau I: caractéristiques des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : formulation, taille moyenne, polydispersité et potentiel zêta moyen des LNC les plus fréquemment préparées.	37
Tableau II : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : demi-vies plasmatiques déterminées chez le rat pour différentes formulations.	41
Tableau III : dérivés de l'acide alginique et additifs alimentaires.	52
Tableau IV : spécialités pharmaceutiques contenant des dérivés de l'acide alginique en tant que principe actif ou comme excipient.	54

INTRODUCTION

L'interférence à ARN est un mécanisme naturel de régulation de l'expression des gènes largement étudié depuis une dizaine d'années, notamment en raison de l'intérêt thérapeutique qu'il suscite. Diverses stratégies ont été proposées pour permettre aux molécules effectrices, les siRNA, d'atteindre le cytoplasme des cellules cibles après administration par voie générale. Le plus souvent, des vecteurs sont utilisés, parfois associés à des modifications chimiques du siRNA.

Dans le cadre du développement des vecteurs de principes actifs, une méthode originale de préparation de nanocapsules lipidiques par inversion de phase a été mise au point, permettant de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques et ne nécessitant qu'un faible apport énergétique. Les nanocapsules obtenues ont vectorisé avec succès diverses molécules et ont été évaluées dans plusieurs modèles *in vivo*. Leur structure lipophile ne leur permet cependant pas d'encapsuler directement les siRNA hydrophiles.

Les systèmes gélifiants à base de polysaccharides, en particulier les gels d'alginate de calcium, ont été fréquemment utilisés pour immobiliser des cellules vivantes et encapsuler divers principes actifs. Ils pourraient à la fois interagir avec les siRNA et être incorporés dans les nanocapsules lipidiques, ce qui permettrait d'envisager leur utilisation pour adapter la formulation des nanocapsules lipidiques à l'encapsulation des siRNA.

Ce travail consiste en une revue bibliographique concernant trois axes : les mécanismes de l'interférence à ARN et les méthodes d'administration des siRNA ; le procédé de préparation par inversion de phase des nanocapsules lipidiques et enfin les systèmes gélifiants à base d'alginate de calcium.

INTERFERENCE A ARN
ET VECTORISATION
DES siRNA

1 Introduction

L'extinction génique post-transcriptionnelle ou interférence à ARN (ARNi) est un mécanisme cellulaire naturel conservé des plantes aux mammifères [1]. Elle permet la régulation spécifique de l'expression de gènes par extinction de la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines [2].

Dans les années 1990, ce mécanisme a été décrit chez les champignons et les plantes, notamment les pétunias [3, 4]. En 1998, Andrew Fire et Craig Mello ont découvert le phénomène chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [5]. Au cours des années suivantes, les mêmes mécanismes ont été observés chez *Drosophila melanogaster*, *Trypanosoma* puis chez des vertébrés [6]. Huit ans après leur découverte, A. Fire et C. Mello ont été récompensés en 2006 par le prix Nobel de Médecine [2].

Physiologiquement, l'ARNi est impliquée via différentes molécules effectrices dans la régulation de l'expression génétique et dans la différenciation cellulaire [1, 6]. Elle contrôle l'enchaînement des stades larvaires des nématodes et participe à la détermination et au maintien des lignées cellulaires [7]. Elle joue également un rôle majeur dans l'immunité non spécifique, en particulier la lutte antivirale [1]. Sur un plan expérimental, elle est largement utilisée pour découvrir et valider les fonctions des gènes sur des cultures cellulaires comme sur des modèles animaux [8]. Elle représente par ailleurs un outil thérapeutique particulièrement prometteur [8].

2 Mécanismes de l'interférence à ARN

2.1 Molécules effectrices

Les molécules effectrices de l'ARNi sont des ARN double brin possédant 19 à 28 paires de base, regroupés sous le terme de « petits ARN ». Ils sont divisés en petits ARN interférant (siRNA, *small interfering RNA*) et micro ARN (miRNA) [6, 9].

Les siRNA et les miRNA les plus fréquemment rencontrés possèdent respectivement 21 à 25 et 21 à 23 paires de base [6, 9]. Comme il est impossible de les distinguer tant sur un plan biochimique que fonctionnel, la classification repose sur leurs origines [6]. La transformation de précurseurs en siRNA et miRNA constitue la phase d'initiation de l'ARNi, qui est suivie d'une phase effectrice [10].

2.2 Phase d'initiation

Au cours de la phase d'initiation de l'ARNi, le complexe protéique DICER, une enzyme cytoplasmique de type RNase III, transforme des ARN précurseurs en petits ARN actifs. Cette étape permet de distinguer les miRNA des siRNA [9].

2.2.1 Précurseurs des miRNA

Les gènes codant pour les miRNA sont transcrits en pri-miRNA (*long primary transcripts*) par l'ARN polymérase II. Ils possèdent une structure en épingle à cheveu et deux extrémités simple brin. La structure en épingle à cheveu confère à un ARN simple brin une zone double brin au niveau de la boucle. Les pri-miRNA sont ensuite modifiés en pre-miRNA (*miRNA precursor*) par Drosha, une enzyme de type RNase III. Ces précurseurs possèdent 70 paires de base environ et ne conservent que la structure en épingle à cheveu des pri-miRNA. Après export dans le cytoplasme, la boucle monobrin de l'épingle à cheveu des pre-miRNA est clivée par DICER, libérant la zone double brin correspondant au miRNA (figure 1, page 6) [6, 9, 11]. Ce miRNA double brin est une étape transitoire, souvent difficile à détecter du fait de l'enchaînement immédiat avec la phase effectrice [9].

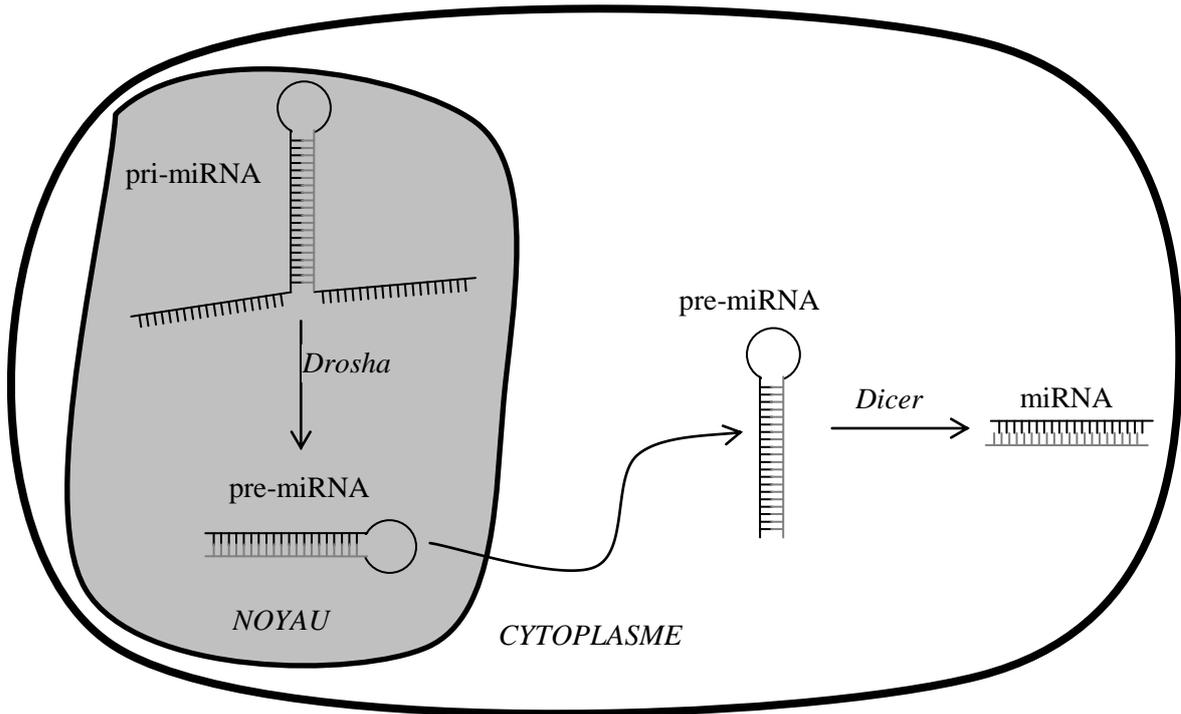


Figure 1 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase d'initiation conduisant aux miRNA actifs. D'après Kim [6] et Liu et coll. [11].

2.2.2 Précurseurs des siRNA

Les siRNA dérivent directement de longs ARN double brin, les dsRNA (*double stranded RNA*). Ils peuvent également dériver d'ARN possédant une structure en épingle à cheveu, les shRNA (*short hairpin RNA*) [9]. Le clivage de ces précurseurs en siRNA est réalisé dans le cytoplasme par le complexe protéique DICER (figure 2, ci-dessous) [6, 9].

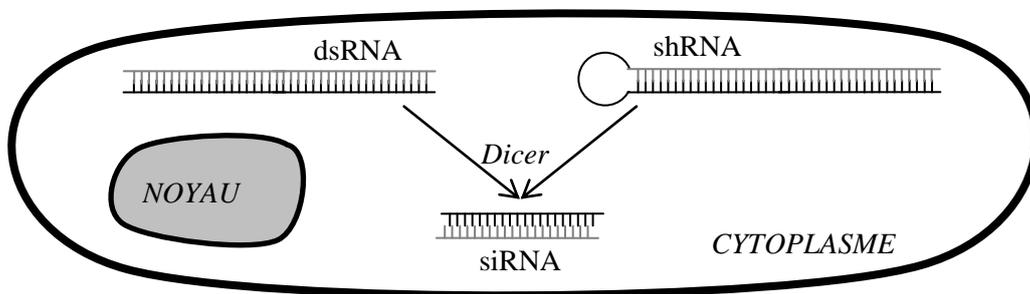


Figure 2 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase d'initiation conduisant aux siRNA actifs. D'après Liu et coll. [11].

2.3 Phase effectrice

2.3.1 Formation du complexe effecteur

La spécificité de régulation de l'ARNi est liée à la reconnaissance d'un ARNm complémentaire du siRNA ou du miRNA [6]. Cette étape nécessite l'incorporation de l'un des brins du siRNA ou du miRNA dans le complexe protéique RISC (*RNA-induced silencing complex*) [9]. Ce brin, dénommé bras guide, est complémentaire à l'ARNm cible. L'autre brin, de séquence identique à l'ARNm cible, est le brin passager [11].

Dans un premier temps, le siRNA ou le miRNA interagit avec des protéines du complexe RISC pour former un pré-complexe RLC (*RISC loading complex*), entraînant la séparation des brins et la dégradation du brin passager (figure 3, page 8) [6, 9, 11]. Après assemblage séquentiel d'autres protéines, le complexe activé (RISC*) est formé. La partie centrale de RISC* est constituée de l'interaction entre l'enzyme Argonaute et le brin guide (figure 3, page 8) [11, 12].

2.3.2 Interaction avec l'ARNm cible

Le complexe activé RISC* peut se lier à l'ARNm complémentaire du brin guide du siRNA ou du miRNA grâce à une hybridation spécifique des séquences nucléotidiques (figure 3, page 8) [12]. Chez les plantes, une complémentarité parfaite, c'est-à-dire un appariement de la totalité du brin, semble indispensable. Chez l'animal, l'appariement ne nécessite que quelques bases, correspondant aux positions 2 à 7 de l'extrémité 5' du siRNA ou du miRNA [6, 11].

Dans le cas d'un appariement total ou presque total, l'ARNm subit un clivage enzymatique, tandis que le siRNA ou le miRNA demeurent intacts [6, 11]. Les fragments d'ARNm relargués dans le cytoplasme sont ensuite dégradés par des nucléases [11]. Si l'appariement n'est que partiel, l'interaction entre RISC* et l'ARNm entraîne une répression de la translation (figure 3, page 8) [6, 11]. Dans les deux cas, la traduction de l'ARNm en protéine est inhibée. Par ailleurs, le complexe RISC* peut agir sur un autre ARNm après libération des fragments d'un premier ARNm clivé.

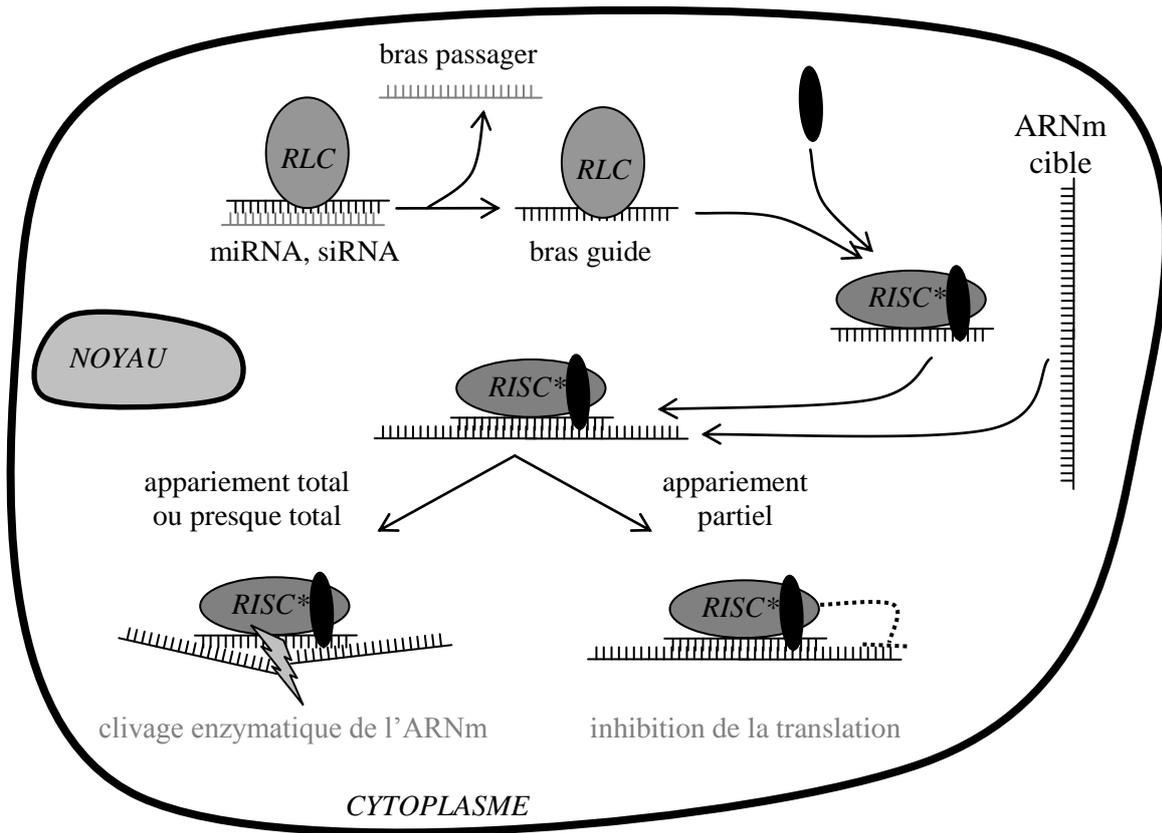


Figure 3 : mécanismes cellulaires de l'interférence à ARN : phase effectrice, formation du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et interaction avec l'ARNm cible. D'après Kim [6] et Liu et coll. [11].

3 Interférence à ARN et thérapeutique

3.1 Intérêt thérapeutique

Les molécules effectrices de l'ARNi peuvent être des cibles thérapeutiques. En effet, des dysfonctionnements des miRNA semblent impliqués dans l'origine de différentes pathologies. Ils interviennent dans le développement des cancers par perturbation des mécanismes de développement cellulaire et pourraient être responsables de maladies telles que le syndrome de Gilles de la Tourette. A l'inverse, d'autres miRNA agissent comme des suppresseurs de tumeur. Pour modifier l'évolution de ces pathologies, il est donc envisageable d'agir sur les mécanismes de l'ARNi, en particulier par l'utilisation d'inhibiteurs antisens [7].

Cependant, l'ARNi est le plus souvent envisagée comme un outil thérapeutique, particulièrement intéressant du fait de sa capacité à cibler spécifiquement l'expression d'un gène d'intérêt. De nombreuses recherches ont été menées *in vitro* puis chez l'animal, en particulier dans les domaines du cancer, des infections virales et des maladies génétiques [10, 12].

Un premier essai clinique de phase II est mené chez l'homme depuis fin 2004. Il évalue le siRNA Cand5 (bévasiranib), ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), en administration intra-vitréenne dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. D'autres études précliniques et essais de phase I ont également débuté [2].

3.2 Stratégies thérapeutiques

L'utilisation de l'ARNi comme outil thérapeutique peut donner lieu à deux stratégies distinctes. Elles consistent soit à viser l'extinction stable de l'expression du gène ciblé en administrant un ADN codant pour un précurseur du siRNA, soit à viser une extinction transitoire en administrant directement un ARN double brin (figure 4, page 11) [10, 12].

3.2.1 Administration d'un ADN codant pour un précurseur du siRNA

L'administration d'un ADN codant pour un précurseur des siRNA, le plus souvent un shRNA, permet d'obtenir une expression stable du siRNA dans les cellules transfectées [10]. L'ADN est administré sous forme de cassette d'expression intégrée à un plasmide, à un virus ou à une particule virale inerte (figure 4, page 11). Les différentes techniques développées pour la thérapie génique peuvent être utilisées pour transfecter les cellules cibles. Une fois intégré au génome, l'ADN sera transcrit en un shRNA puis exporté dans le cytoplasme comme les précurseurs des miRNA et enfin converti en siRNA par le système protéique DICER [10, 12].

Les vecteurs viraux les plus utilisés sont les adénovirus, les virus associés aux adénovirus et les rétrovirus, en particulier les lentivirus. Ces derniers permettent l'intégration de l'ADN vectorisé au génome de la cellule, et sont capables de transfecter des cellules qui ne se divisent pas, ce qui présente un intérêt pour le traitement des pathologies virales [10]. Parmi les nombreux exemples publiés, une équipe allemande a développé un vecteur utilisant un amplicon du virus *Herpes simplex* de type 1 (HSV-1) et l'a évalué *in vitro* et *in vivo*. Outre sa capacité à vectoriser des séquences codantes de grande taille, ce vecteur n'inclut aucun gène viral et ne nécessite pas l'association à d'autres virus pour être efficace. Ces différentes caractéristiques augmentent sa sécurité d'emploi [13, 14].

Cette stratégie d'administration des siRNA est apparentée à la thérapie génique et ne sera pas développée par la suite.

3.2.2 Administration d'un ARN

L'autre possibilité thérapeutique consiste à administrer un ARN double brin, qu'il s'agisse du siRNA ou d'un précurseur (dsRNA) qui sera converti en siRNA par DICER (figure 4, ci-dessous) [12].

Les dsRNA sont cependant responsables d'une activation de la réponse immunitaire non spécifique à interféron, entraînant une destruction massive des ARN présents dans la cellule. Ce phénomène est particulièrement marqué lorsque la séquence d'ARN possède plus de 30 paires de bases. Par conséquent, cette stratégie a été largement abandonnée au profit de l'administration du siRNA et non d'un de ses précurseurs [10, 15].

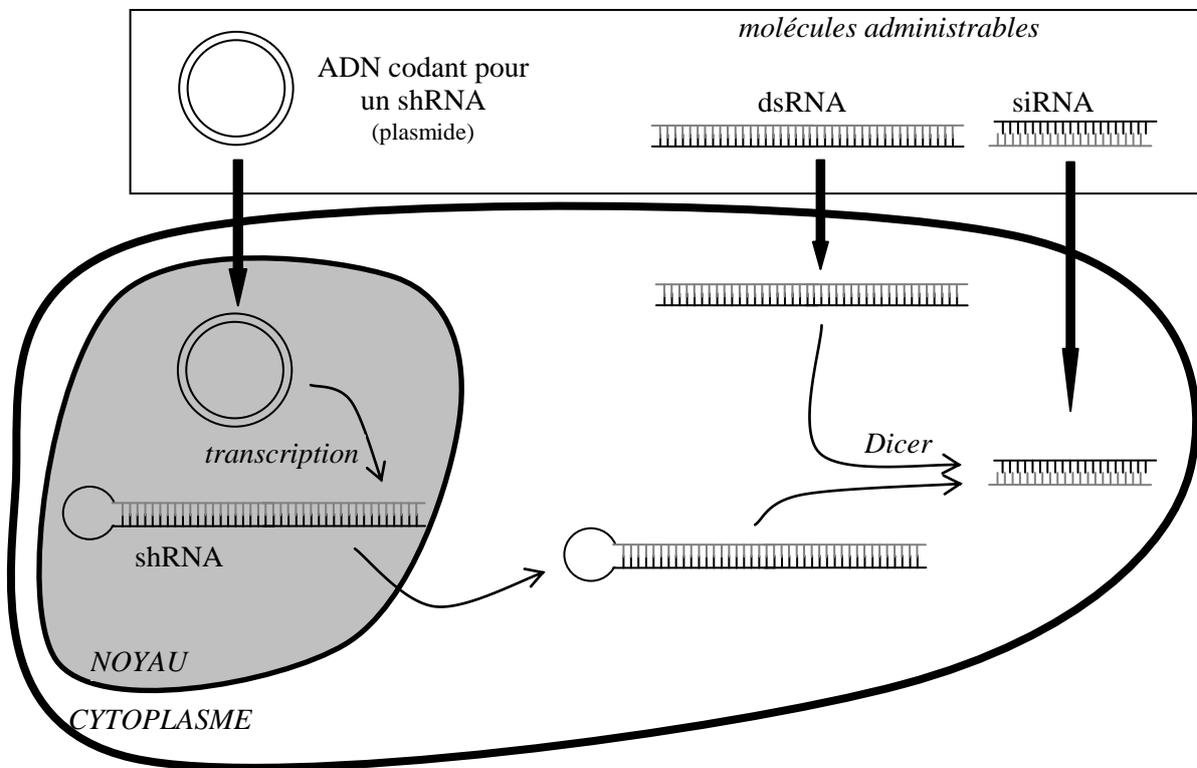


Figure 4 : utilisation de l'interférence à ARN comme outil thérapeutique : administration d'un ADN codant pour un shRNA ou administration d'un ARN double brin. D'après Aigner [12].

3.3 Utilisation des siRNA en thérapeutique

3.3.1 *Optimisation des siRNA utilisés en thérapeutique*

De nombreuses données sont disponibles pour optimiser les séquences nucléotidiques des siRNA afin de garantir leur efficacité et de minimiser la réponse immunitaire induite [16]. Dans ce but, des études systématiques ont proposé des algorithmes permettant de prédire la fonctionnalité d'un siRNA en fonction de sa séquence nucléotidique [17, 18]. Différents paramètres particulièrement favorables à l'activité ont été mis en évidence :

- ~ une longueur de 19 à 21 paires de bases [12],
- ~ une proportion de guanine et cytosine comprise entre 30 et 55% environ [17, 18],
- ~ la capacité du siRNA à former des structures secondaires (épingle à cheveu) [17, 18],
- ~ l'existence de deux extrémités libres (deux à trois nucléotides non appariés à l'extrémité de chaque brin) présentant une dissymétrie [12, 17, 19],
- ~ la présence d'une base spécifique à certaines positions du bras guide [18].

3.3.2 *Avantages de l'utilisation des siRNA en thérapeutique*

Par rapport à l'utilisation d'un ADN codant pour un shRNA, l'administration d'un siRNA diminue le risque d'effets indésirables. En effet, cette technique ne nécessite ni intégration au génome ni utilisation de vecteurs viraux. De plus, une localisation cytoplasmique est suffisante pour qu'un siRNA exerce son action, alors que l'ADN doit atteindre le noyau des cellules cibles [12].

3.3.3 Limites à l'utilisation thérapeutique des siRNA

Les siRNA sont des polyanions dont le poids moléculaire est de 30 000 Da environ. Administrés nus, c'est-à-dire injectés directement dans la circulation sanguine, leur demi-vie est extrêmement courte. Ils sont rapidement éliminés par le rein ou captés par le foie [16] et sont sujets à une dégradation plasmatique rapide par les nucléases circulantes [15]. Du fait de leur charge, ils franchissent difficilement les membranes cellulaires.

Une fois libérés dans le cytoplasme, les siRNA entrent en compétition avec les ARN endogènes. Ils sont donc susceptibles de saturer les mécanismes cellulaires et de perturber la régulation physiologique de l'expression des gènes par les miRNA et les siRNA [10]. Ils peuvent également être à l'origine d'une réponse immunitaire non spécifique, comme les dsRNA [10]. Malgré une spécificité théorique absolue par complémentarité de séquence, les siRNA éteignent en pratique l'expression de différents gènes. En effet, ils peuvent présenter une homologie partielle avec un ARNm ou posséder une séquence semblable à celle d'un miRNA physiologique [10]. D'autre part, toute modification de la structure du siRNA peut induire une modification de l'activité par perte de la complémentarité avec l'ARNm cible, même si certaines mutations dans la zone d'appariement n'affectent pas l'activité [15, 17]. En tout état de cause, l'extrémité 3' du siRNA semble beaucoup moins tolérer les mutations que l'extrémité 5' [20]. Enfin, les siRNA ont une durée d'action relativement courte dans les cellules en division, de l'ordre de trois à cinq jours, essentiellement par effet de dilution [10].

4 Administration des siRNA

4.1 Généralités

Si les siRNA apparaissent particulièrement prometteurs en thérapeutique, il demeure indispensable d'étudier attentivement leur structure pour garantir leur efficacité tout en limitant les effets non spécifiques. Il est par ailleurs nécessaire d'optimiser leur capacité à atteindre les cellules cibles [21].

Outre l'administration par voie locale et quelques méthodes physiques, des modifications chimiques des siRNA ont été fréquemment réalisées, ainsi que l'utilisation de différents vecteurs. Ces deux dernières stratégies ont été régulièrement associées.

4.2 Administration des siRNA non vectorisés

4.2.1 Administration par voie locale

Par voie locale, les siRNA nus peuvent être utilisés à des doses relativement faibles, minimisant de ce fait le risque de capture hépatique ou rénale ainsi que les effets non spécifiques tout en garantissant la délivrance des molécules actives aux cellules cibles. Cette approche invasive, limitée à des tissus aisément accessibles, a été utilisée pour les voies intraoculaire, intrathécale et intratumorale [12, 21]. Des siRNA non modifiés ont également été utilisés avec succès par voie topique [21].

4.2.2 Méthodes physiques

Par voie générale, la transfection hydrodynamique a été largement utilisée, en particulier chez la souris. Elle consiste à injecter rapidement (20 s environ), à forte pression, de grands volumes (2 ml au moins) de solution contenant le siRNA. Elle permet d'obtenir une efficacité dans les principaux organes, vraisemblablement par une augmentation transitoire de la perméabilité membranaire. Cette technique est cependant responsable d'effets indésirables et n'est pas applicable chez l'homme [12, 16].

D'autres méthodes physiques ont été décrites. L'électroporation a été utilisée pour faire pénétrer les siRNA dans les cellules, *in vitro* mais également *in vivo* [21, 22]. La sonoporation, c'est-à-dire l'utilisation des ultrasons pour induire la délivrance intracellulaire du siRNA, a été testée *in vitro* [23] et par voie transthoracique chez la souris [21].

4.2.3 Modifications chimiques

Pour augmenter la stabilité du double brin, la résistance face aux nucléases et optimiser l'activité des siRNA, diverses modifications chimiques ont été envisagées [16, 21, 22].

Dans un premier temps, la liaison phosphodiester a été remplacée par un phosphorothiol (figure 5, page 16). Ce changement augmente la stabilité du siRNA et améliore la liaison aux protéines plasmatiques, qui confèrent une protection contre les nucléases. Des phénomènes de toxicité ou de perte d'activité ont été décrits, la cytotoxicité étant particulièrement marquée en cas de modification de tous les phosphodiesters en phosphorothioles [20]. Ce type de siRNA reste très utilisé [16, 22], même si des siRNA à liaison boranophosphate (figure 5, page 16) ont été synthétisés plus récemment et sont apparus plus stables et plus puissants que les siRNA non modifiés [22]. Ces liaisons boranophosphates sont cependant beaucoup plus difficiles à réaliser que les phosphorothioles [21].

Une autre voie explorée consiste à modifier le ribose, en particulier l'hydroxyl en position 2'. De nombreux dérivés ont été synthétisés, en particulier 2'-O-méthyl, 2'-déoxy-2'-fluoro, ainsi que des LNA (*locked nucleic acid*) possédant une liaison méthyle entre l'oxygène en position 2' et le carbone en 4' (figure 5, page 16). Ces différentes structures permettent de conserver l'activité du siRNA et d'améliorer sa stabilité face aux nucléases [16, 22].

Toutefois, il reste à déterminer quelles proportions de liaisons phosphodiesters ou de pentoses doivent être modifiées, sur un seul brin ou sur les deux, pour optimiser la stabilité tout en conservant la spécificité du siRNA [16]. Il est cependant établi que l'extrémité 5' du siRNA semble la plus sensible aux modifications chimiques [20] et que l'alkylation des deux extrémités entraîne une perte complète d'activité [20].

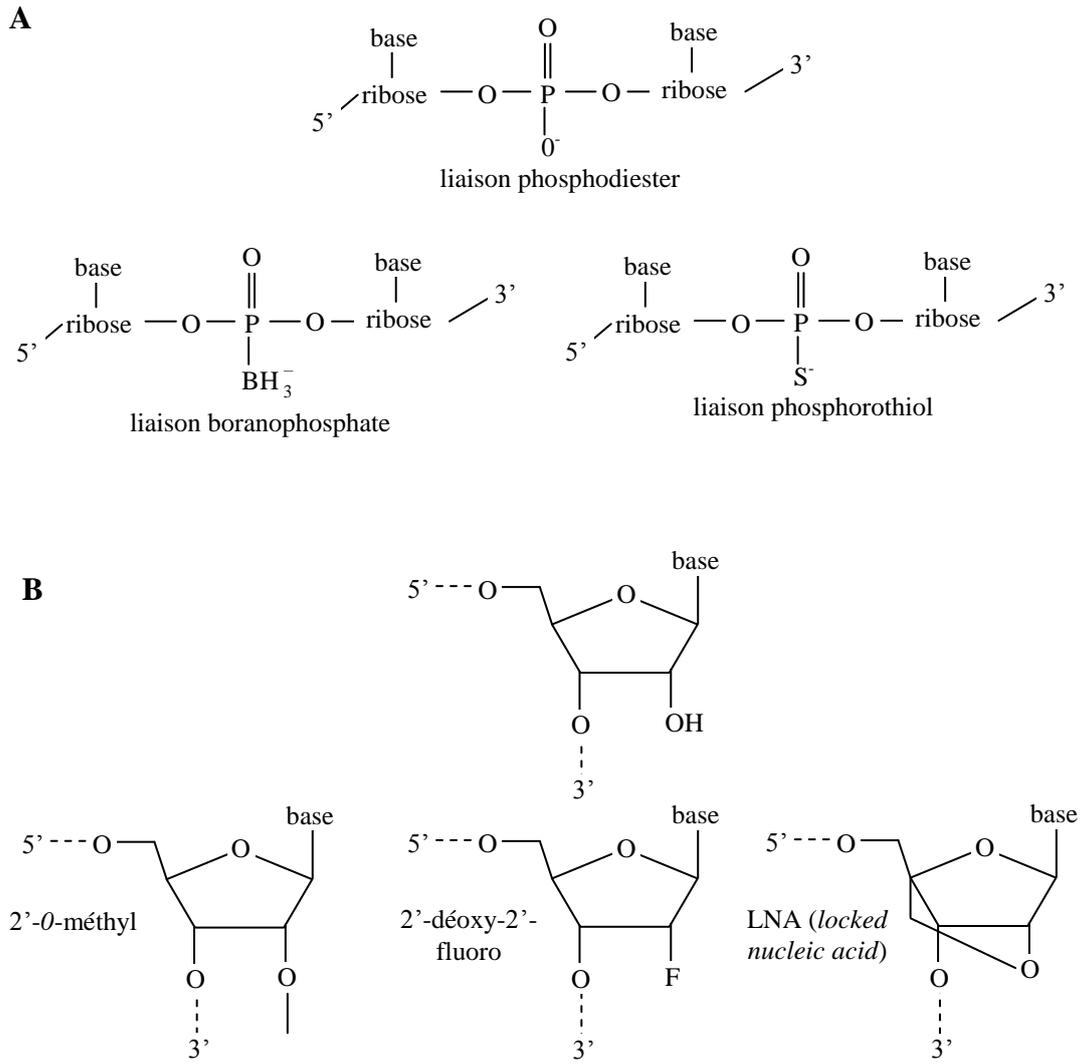


Figure 5 : administration des siRNA non vectorisés : modifications chimiques utilisées, concernant la liaison phosphodiester (A) ou le ribose (B). D'après Toub et coll. [22].

4.3 Vectorisation des siRNA

4.3.1 Intérêts et limites de la vectorisation

Malgré les améliorations apportées par les modifications chimiques, l'administration directe des siRNA dans le flux sanguin reste liée à une efficacité thérapeutique modérée [21]. Pour pallier à ces difficultés, différentes stratégies de vectorisation ont été développées, parfois couplées aux modifications chimiques.

Les vecteurs ont pour objectifs principaux de protéger les siRNA de la dégradation enzymatique dans le plasma, de limiter leur excrétion rénale, de faciliter l'endocytose et de permettre la libération cytoplasmique de la molécule intacte [15, 16]. Les stratégies de vectorisation des siRNA sont essentiellement inspirées des techniques non virales développées pour la thérapie génique, avec en particulier l'écrantage des charges négatives du siRNA par des polycations [24]. Cependant, si une charge globale positive du système favorise l'interaction avec la membrane cellulaire, elle peut également augmenter l'opsonisation, c'est-à-dire l'adsorption de protéines plasmatiques sur le vecteur, responsable de la phagocytose. Pour une administration systémique, le vecteur idéal doit donc présenter une charge globale faiblement positive ou neutre, mais également une taille suffisamment faible pour permettre l'endocytose (150 nm maximum). Il doit être stable et furtif dans la circulation pour ne pas être phagocyté, tout en permettant une capture cellulaire et une dégradation endosomiale afin de libérer la molécule active. Par ailleurs, il sera composé préférentiellement de molécules biodégradables [15, 25].

Outre les qualités du vecteur pour protéger le siRNA et lui permettre d'atteindre sa cible, il faut cependant tenir compte de sa toxicité propre. Diverses études de toxicogénomique ont évalué l'impact des polymères cationiques, des lipides cationiques et des polymères non ioniques sur l'expression des gènes. Toutes ces molécules activent ou répriment de très nombreux gènes, entraînant potentiellement des interférences avec l'action du siRNA transporté ou des effets cliniques propres [2].

Comme nous allons le voir, les vecteurs les plus utilisés ont été préparés avec des polymères cationiques, mais de nombreux autres systèmes ont été évalués : liposomes à base de lipides neutres ou de lipides cationiques, stratégies variées de conjugaison ou de nano-encapsulation.

4.3.2 Polymères cationiques

Différents polymères cationiques ont été utilisés en thérapie génique. Ils peuvent être d'origine naturelle, comme le chitosan ou l'atélocollagène, ou synthétiques, tels que la polyéthylèneimine (PEI), la poly-L-lysine ou les dendrimères [16, 24]. Seuls certains de ces polymères ont été utilisés pour vectoriser des siRNA. Comme pour les complexes formés avec l'ADN, on parle alors de polyplexes [22].

4.3.2.1 Atélocollagène

Parmi les polymères naturels, l'atélocollagène est un dérivé hautement purifié du collagène bovin de type I, obtenu par traitement par la pepsine. Il est moins immunogène que le collagène et conserve ses propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité. La taille des complexes qu'il forme avec les siRNA peut être ajustée entre 200 nm et 10 µm en modifiant les proportions des deux constituants principaux, en adaptant le mode de mélange ou en introduisant des additifs [26].

Des complexes atélocollagène / siRNA ont été évalués par voie intraveineuse sur des modèles de métastases osseuses chez la souris. Une augmentation de la quantité de siRNA délivrée aux cellules tumorales mais aussi aux principaux organes (foie, poumon, rein et rate) a été mise en évidence par rapport aux siRNA nus. Ces complexes ont diminué la croissance des métastases sans augmenter la réponse immunitaire non spécifique à interféron [27].

4.3.2.2 Chitosan

Une équipe anglaise a publié en 2006 les résultats de l'évaluation *in vitro* de complexes chitosan / siRNA. Des nanoparticules ont été préparées par gélification ionique en présence de tripolyphosphate. Les siRNA ont été soit inclus dans les nanoparticules, soit adsorbés à la surface de celles-ci. Selon le type de chitosan utilisé, les nanoparticules ont mesuré entre 275 et 700 nm de diamètre environ. Des complexes directs entre le chitosan et les siRNA, mesurant entre 200 et 500 nm de diamètre environ, ont également été évalués. L'efficacité de la transfection cellulaire par le siRNA s'est révélée dépendante de la méthode de préparation retenue : les siRNA encapsulés au sein des nanoparticules obtenues par la gélification ionique ont conduit aux meilleurs résultats. Cette observation a été attribuée à une meilleure protection des siRNA face aux nucléases plasmatiques [28].

4.3.2.3 Polyéthylèneimine

La PEI est le polymère artificiel le plus étudié pour la formation de polyplexes et est considéré comme le plus efficace pour la transfection de gènes. L'efficacité dépend de la structure et de la masse molaire de la PEI, du rapport azote / phosphore (N/P) du complexe formé et de la quantité d'acide nucléique complexé [16].

Dès 2004, une équipe américaine a évalué des complexes PEI / siRNA dans un modèle d'infection grippale à virus *Influenza* de type A chez la souris. Les complexes présentant un rapport N/P égal à 5 ont été formés par simple mélange à température ambiante. Une captation préférentielle des complexes par les poumons a été mise en évidence. Leur efficacité a été démontrée en prophylaxie de l'infection, avec une production virale réduite de dix fois environ par rapport à des souris non traitées. La production de virus au niveau pulmonaire a également été réduite de façon dose-dépendante lors d'un essai curatif [29].

En 2005, une équipe allemande a préparé des complexes entre un siRNA et de la PEI de bas poids moléculaire, avec un rapport N/P égal à 10. *In vitro*, ces complexes ont protégé le siRNA de la dégradation sérique et ont permis son internalisation par les cellules. Ils ont également été évalués dans un modèle de carcinome ovarien (cellules humaines SKOV-3) sous-cutané chez la souris. Leur résistance à la dégradation et leur capacité à atteindre les cellules cibles ont été confirmées après injection intrapéritonéale. Ils ont également permis de réduire la taille des tumeurs alors que les siRNA nus se sont avérés inactifs [30].

Une autre alternative a consisté à conjuguer le bras passager d'un siRNA au PEG via un pont disulfure créé à partir d'un groupe pyridyldisulfite (figure 7, ci-dessous). Ce siRNA pégylé a été utilisé pour former un complexe polyélectrolytique avec une PEI ramifiée. La stabilité de ce complexe dans le sérum a été démontrée *in vitro*, avec une absence de dégradation par les nucléases pendant 48 heures. Le clivage intracellulaire de la liaison PEG / siRNA a été mis en évidence dans un milieu tampon en présence de glutathion pour mimer les conditions cytoplasmiques. L'activité a été évaluée sur des cellules humaines de cancer de la prostate (PC-3). L'expression du VEGF a été réduite, avec un effet majoré par l'augmentation du rapport N/P et par l'augmentation de la dose de siRNA. Ce complexe s'est également révélé plus actif qu'un complexe siRNA non pégylé / PEI [32].

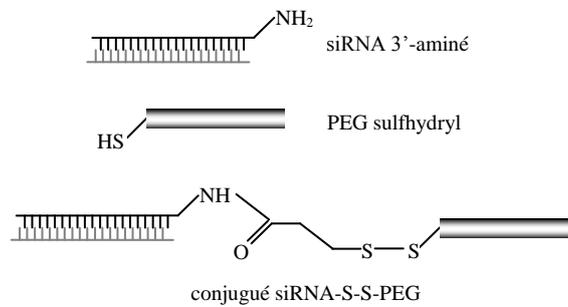


Figure 7 : vectorisation des siRNA : représentation schématique de la conjugaison d'un siRNA au polyéthylèneglycol via un pont disulfure. Adapté d'après Kim et coll. [32].

4.3.3 *Liposomes*

Les liposomes sont des structures lipidiques très utilisées en thérapie génique. L'efficacité de la transfection dépend de la charge des lipides utilisés, du rapport des charges et de la taille du complexe formé, ainsi que de la quantité d'acide nucléique complexé [16].

4.3.3.1 *Liposomes neutres*

Les liposomes neutres sont préparés à partir de différents lipides non chargés [16].

En 2005, une équipe américaine a formé des liposomes neutres avec de la dioleoyl-glycéro-phosphatidylcholine (DOPC) stabilisée par un tensio-actif. Un siRNA ciblant le gène *EphA2*, hyper-exprimé par plusieurs tumeurs humaines, a été incorporé à ces structures avec un rendement de 65% environ. Administré par voie intraveineuse dans un modèle murin de carcinome ovarien intrapéritonéal, le siRNA vectorisé a permis une réduction de la taille des tumeurs par rapport au siRNA nu [33].

Des liposomes plus complexes ont été préparés avec de la distéaroyl-glycéro-phosphatidylcholine (DSPC, 10%), du dilinoléyloxy-diméthyl-aminopropane (DLinDMA, 40%), de la méthoxy-polyéthylèneglycol-carbamoyl-dimyristyloxy-propylamine (PEG-C-DMA, 2%) et du cholestérol (48%). Ils ont été utilisés pour vectoriser un siRNA ciblant l'apolipoprotéine B, administré par voie intraveineuse chez le singe *Cynomolgus*. Ils ont présenté une demi-vie de 72 min environ et ont montré un effet dose dépendant [34].

4.3.3.2 *Lipoplexes*

Des lipides chargés positivement ont également servi à préparer des liposomes, nommés lipoplexes par analogie avec les systèmes polymériques [22]. Ces lipides doivent faciliter le franchissement de la membrane cellulaire par le vecteur [35]. De très nombreuses études leurs ont été consacrées.

Le premier exemple publié date de 2003. Une équipe norvégienne a évalué un complexe entre un siRNA anti-TNF- α et le dioléoyloxypropyl-triméthylammonium (DOTAP) en injection intraveineuse et intrapéritonéale chez la souris. Ce traitement a inhibé la synthèse de TNF- α induite par les lipopolysaccharides et a apporté un effet protecteur vis-à-vis du sepsis provoqué chez la souris [36]. Sur la base de cette étude, des liposomes à base de DOTAP ont également été utilisés pour inhiber l'expression des récepteurs V2 à la vasopressine après injection intraveineuse chez la souris [35].

En 2004, le liposome cationique LIC-101, composé de phosphatidylcholine d'œuf et de 2-*O*-(2-diéthylaminoéthyl)-carbamoyle-1,3-*O*-dioléylglycérol, a été utilisé pour vectoriser des siRNA dans un modèle de métastases hépatiques chez la souris. Après administration intraveineuse, ces lipoplexes ont montré une activité antitumorale marquée et une toxicité moindre que d'autres lipides cationiques [37].

En 2006, une équipe japonaise a préparé des liposomes cationiques galactosylés à partir de dioléoyl-phosphatidyléthanolamine (DOPE) et de galactosyl-C4-cholestérol, dans un rapport de 3 à 2. Après complexation avec le siRNA, ces liposomes ont mesuré environ 50 nm de diamètre, avec un potentiel zêta de 36 mV environ. Ces structures ont permis d'augmenter le temps de présence des siRNA dans le plasma murin et de réduire leur excrétion rénale, par comparaison à des siRNA nus. Le ciblage des cellules parenchymateuses du foie a été confirmé chez la souris [38].

La même année, une équipe allemande a encapsulé des siRNA présentant des nucléotides 2'-*O*-méthylés dans des lipoplexes pégylés composés d'un lipide cationique, l'acide arginyl-diaminopropionique *N*-palmityl-*N*-oléyl-amide (50%), d'un phospholipide neutre (lipide « helper », DPhyPE, diphytanoyl-glycéro-phosphatidyléthanolamine, 49%) et d'un lipide pégylé (DSPE-PEG, distéaroyl-glycéro-phosphatidyléthanolamine-polyéthylène glycol, 1%). Les lipoplexes obtenus ont mesuré 120 nm de diamètre environ, avec un potentiel zêta de 46 mV environ (figure 8, ci-dessous) [39]. Ils ont été évalués sur différents modèles de xénogreffes de tumeurs chez la souris après injection intraveineuse. Le ciblage du cytoplasme des cellules endothéliales vasculaires des tumeurs avec conservation de la fonctionnalité du siRNA a été mis en évidence. L'inhibition de l'expression de CD31 a été démontrée au niveau des vaisseaux tumoraux sans toxicité particulière malgré des administrations journalières [40].

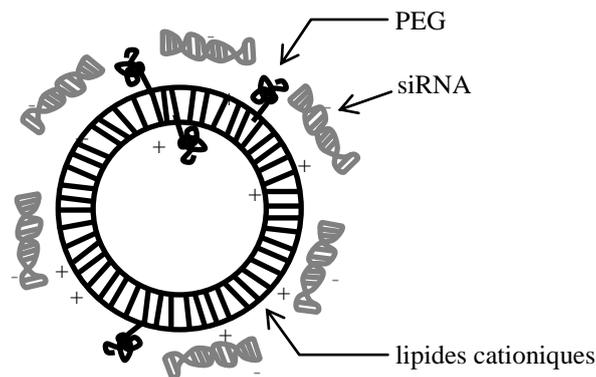


Figure 8 : vectorisation des siRNA : représentation schématique de lipoplexes pégylés. Les liposomes sont formés avec un lipide cationique, un lipide « helper » et un lipide pégylé. Les siRNA sont complexés par interactions électrostatiques avec les lipides cationiques. D'après Santel et coll. [39].

En 2007, des liposomes à base de DOTAP et de cholestérol ont été associés à de la transferrine afin d'augmenter leur internalisation par les cellules cancéreuses. Ces structures ont conféré une protection au siRNA vectorisé vis-à-vis des nucléases sériques. La présence de transferrine a augmenté l'action des siRNA sur des cultures de lignées cancéreuses (U-373 et Huh-7). Un rapport de charge de 3 (+) pour 2 (-) s'est révélé optimal pour l'activité. Ces liposomes ont présenté une cytotoxicité négligeable [41].

Des dérivés lipidiques d'aminoglycosides (kanamycine A, paromomycine, néomycine) ont également été synthétisés pour encapsuler des siRNA. Les complexes formés ont présenté des structures multilamellaires ou des structures en grappe. La transfection des siRNA et l'extinction de l'expression des gènes cibles a été confirmée *in vitro* [42].

Des combinaisons entre les stratégies polymériques et lipidiques ont également été décrites, sous le nom de lipopolyplexes. Ces formulations combinent des lipides cationiques avec de l'histone, de la poly-L-lysine ou de la protamine [22].

4.3.4 *Autres stratégies*

En parallèle à ces stratégies de vectorisation inspirées de celles utilisées en thérapie géniques, en particulier les polyplexes et les lipoplexes, d'autres techniques plus spécifiques aux siRNA ont été proposées.

4.3.4.1 Conjugaison siRNA - macromolécules

Un premier groupe de techniques s'attache à conjuguer une macromolécule directement au siRNA pour le protéger de la dégradation et augmenter sa capacité à atteindre l'espace intracellulaire.

Une équipe a fixé des molécules de cholestérol sur un siRNA modifié (liaisons phosphorothioles et nucléotides 2'-O-méthylés) via une liaison pyrrolidine – acide aminocaproïque. Ce greffage a amélioré les paramètres pharmacocinétiques du siRNA après administration chez le rat, vraisemblablement du fait de l'augmentation de la liaison aux protéines plasmatiques. Une meilleure stabilité a été mise en évidence *in vitro* dans le sérum humain. Enfin, la pénétration dans les cellules cibles a également été augmentée. Le devenir intracellulaire du cholestérol n'a pas été exploré, mais ce siRNA modifié a diminué l'expression du gène de l'apolipoprotéine B après injection chez la souris de façon plus marquée que les témoins sans cholestérol [43].

Une molécule chimérique composée intégralement d'ARN a été développée : elle a associé le siRNA et un aptamère, c'est-à-dire un ARN capable de se lier à des récepteurs extracellulaires (figure 9, ci-dessous). La capacité de liaison à ces récepteurs a été mise en évidence *in vitro*. Par voie intratumorale, cette approche a également permis de réduire le volume de tumeurs prostatiques xénogreffées à des souris [44].

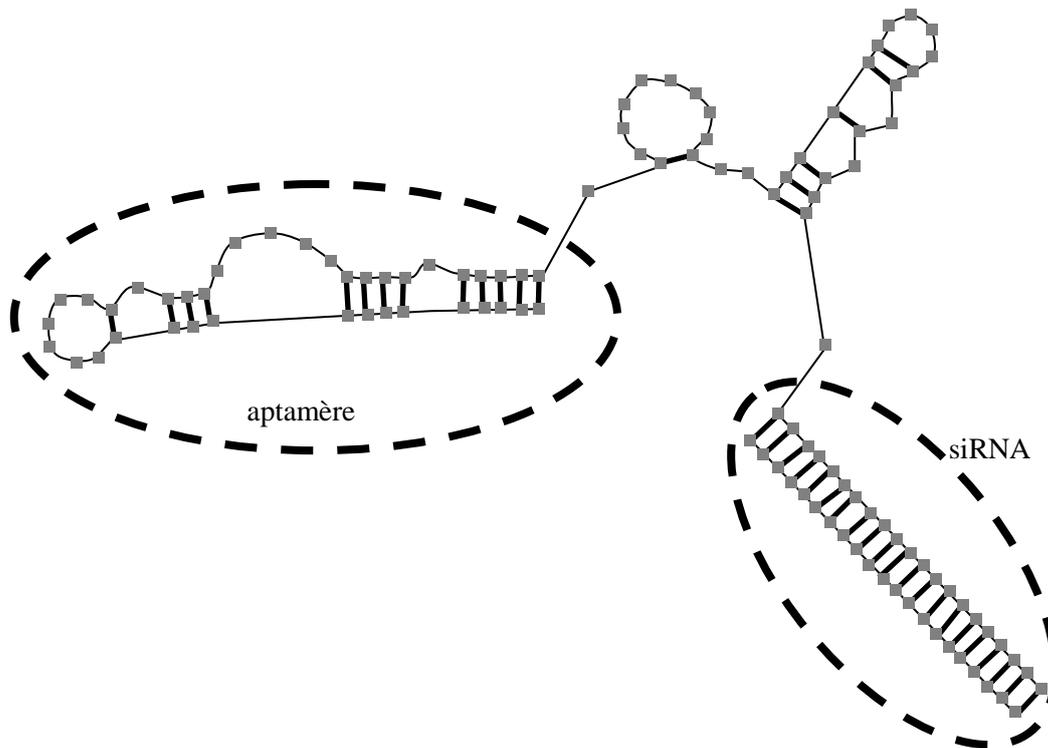


Figure 9 : vectorisation des siRNA : représentation schématique du complexe aptamère-siRNA. Les carrés gris représentent les bases, les traits fins les liaisons covalentes et les traits épais l'appariement entre les bases. Adapté d'après McNamara et coll. [44].

4.3.4.2 Autres techniques d'encapsulation

Parmi les autres stratégies développées, une équipe a encapsulé des siRNA dans des cyclodextrines chargées positivement et leur a adjoint un conjugué adamantane – PEG – transferrine pour cibler les cellules hyper-exprimant le récepteur à la transferrine. Des études *in vitro* ont confirmé le ciblage cellulaire et l'efficacité du siRNA sur le gène cible. Ces complexes ont prouvé leur efficacité après administration intraveineuse pour diminuer la croissance tumorale dans un modèle murin de sarcome d'Ewing métastasé. Chez des animaux immunocompétents, aucun effet indésirable hépatique ou rénal ou activation de la réponse immunitaire n'a été mis en évidence [45].

Plus récemment, des nanocapsules polymériques à cœur aqueux ont été évaluées sur le même modèle animal. Constituées de polyisobutylcyanoacrylate, elles ont présenté un diamètre de 325 nm environ et un potentiel zêta de -28 mV environ. La localisation cytoplasmique de ces nanocapsules a été confirmée *in vitro*. Après administration intratumorale, elles ont démontré leur efficacité *in vivo* en inhibant la croissance tumorale par rapport aux différents témoins [46].

L'association électrostatique entre un siRNA et le peptide MPG a conduit à des nanoparticules de 200 nm de diamètre environ, formées par interaction de 10 à 20 molécules de peptide. Ce peptide MPG comporte un domaine hydrophobe capable d'interagir avec la membrane cellulaire et de provoquer l'internalisation des nanoparticules, avant libération intracellulaire du siRNA. Ce système a été évalué *in vitro* dans différents modèles cellulaires, mais également *in vivo* [47].

Une protéine de fusion entre le fragment Fab d'un anticorps dirigé contre une protéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la protamine a été utilisée pour vectoriser des siRNA. Ce système a prouvé sa spécificité *in vitro* et *in vivo* pour ne délivrer le siRNA qu'aux cellules exprimant la protéine d'enveloppe du VIH. La fonctionnalité des siRNA ainsi administrés a été confirmée dans plusieurs modèles, mais la pharmacocinétique de ces complexes n'a pas été étudiée. [48].

**NANOCAPSULES
LIPIDIQUES PREPAREES
PAR INVERSION DE PHASE**

1 Introduction

En thérapeutique, les vecteurs sont destinés à améliorer les paramètres de l'étape de distribution du principe actif dans l'organisme. Ils permettent de masquer les propriétés de la molécule active pendant cette étape, la protègent des dégradations chimiques et biologiques, modifient et améliorent sa libération et sa capacité à atteindre sa cible [49].

Parmi les nombreux vecteurs développés, plusieurs possèdent une structure lipidique. Il s'agit des liposomes, des micelles, des nano-émulsions et des micro-émulsions, des nanoparticules lipidiques solides (SLN) et des nanocapsules lipidiques (LNC). Le principal avantage de ces systèmes est leur faible toxicité liée à l'utilisation de lipides physiologiques, cires, triglycérides ou phospholipides. Selon leur structure, ils sont capables de vectoriser des molécules lipophiles ou hydrophiles. Leur petite taille permet leur diffusion tissulaire et leur endocytose, et ils peuvent cibler la libération des molécules transportées via l'adjonction de ligands. Cependant, les lipides sont sujets à des modifications physico-chimiques qui peuvent conduire à une dénaturation du vecteur. Ainsi, des changements de structure, des capacités d'encapsulation et de relargage, des propriétés interfaciales ou du devenir *in vivo* peuvent être observés. Le contrôle de la taille et son évolution lors du stockage et de l'administration sont également des paramètres critiques [49].

Les nanoparticules lipidiques peuvent être préparées par de nombreux procédés tels que l'homogénéisation haute pression, la dispersion à chaud d'une micro-émulsion ou l'émulsification par microcanal, mais certains de ces procédés requièrent des solvants organiques ou des apports énergétiques importants [50, 51]. Récemment, une technique par inversion de phase a été décrite par Heurtault *et coll.* au sein de l'unité INSERM U646 de l'université d'Angers [51, 52].

2 Procédé de préparation des nanocapsules lipidiques

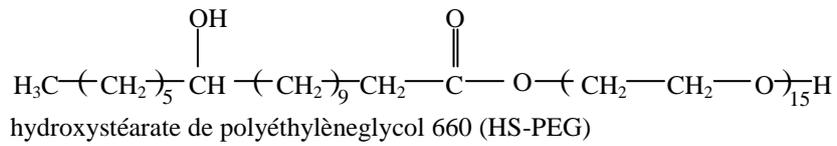
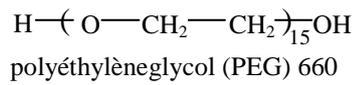
2.1 Constituants utilisés

Les trois principaux composés utilisés pour la préparation des nanocapsules lipidiques obtenues par ce procédé sont une huile, un tensioactif non ionique et de l'eau. L'huile utilisée est le Labrafac[®] WL 1349, constituée essentiellement de triglycérides à chaînes moyennes, les acides capryliques (chaîne en C8) et capriques (chaîne en C10). Le tensioactif non ionique est un dérivé fortement polyéthoxylé, le Solutol[®] HS 15, comportant principalement du polyéthylène glycol 660 (PEG, 30%) et du PEG 660-12-hydroxystéarate (HS-PEG, 70%) (figure 10, page 31) [52].

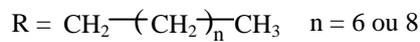
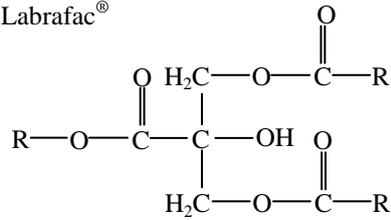
Du chlorure de sodium et un tensioactif phospholipidique en faible proportion sont également utilisés. Ce tensioactif est le Lipoïd[®] S75-3, une lécithine de soja contenant environ 69% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidyléthanolamine (figure 10, page 31) [52, 53, 54].

Tous ces composants ont été approuvés pour une administration par voie orale, topique ou parentérale par la FDA (*Food and Drug Administration*) [25].

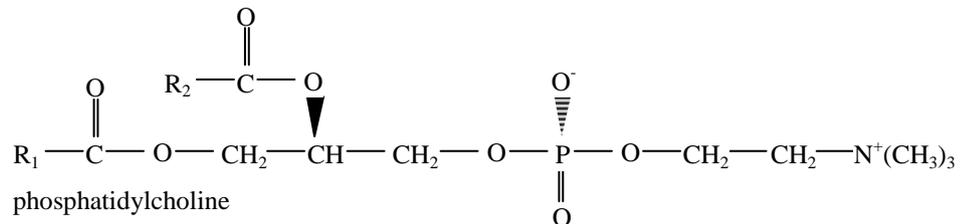
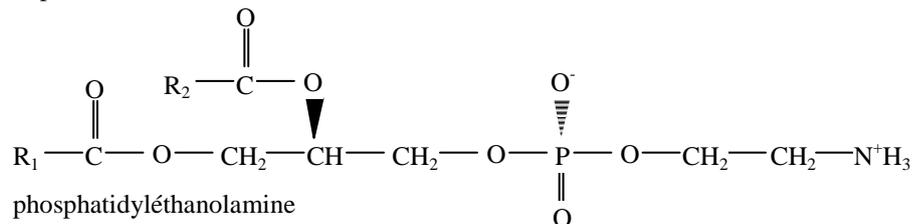
Solutol®



Labrafac®



Lipoïd®



R₁ et R₂ = acides gras (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3)

Figure 10 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : structure chimique des principaux constituants utilisés : Solutol®, Labrafac® et Lipoïd®. D'après Vonarbourg et coll. [55].

2.2 Description du procédé

La préparation des LNC est réalisée en deux étapes [52] :

- ~ formation d'une micro-émulsion par inversions de phase successives ;
- ~ déstructuration de cette micro-émulsion pour former les LNC proprement dites.

2.2.1 Formation de la micro-émulsion

La micro-émulsion est préparée par plusieurs inversions de phase entre une émulsion huile dans eau (H/E) et une émulsion eau dans huile (E/H). Ces inversions de phase sont réalisées par des cycles de chauffage et de refroidissement (figure 11, page 33) [51, 52].

L'inversion de phase s'accompagne d'un changement macroscopique du système, plus ou moins visible selon les proportions de chaque constituant. La zone d'inversion de phase (ZIP) peut être déterminée par suivi conductimétrique. Une conductivité très faible ($< 10^{-2} \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) identifie une émulsion E/H, tandis qu'une conductivité plus forte traduit une émulsion H/E. Cette étude permet de déterminer les températures de début et de fin d'inversion de phase (T_1 et T_2) ainsi que la température à atteindre avant dilution du système (T_d) (figure 11, page 33). Au cours de la ZIP, le système se présente sous la forme d'une micro-émulsion bicontinue [56].

Pour une formulation donnée, les constituants sont mélangés sous agitation magnétique douce. Après homogénéisation, le système est progressivement chauffé jusqu'à la température maximale ($T_{\text{max}} > T_2$), puis refroidi jusqu'à la température minimale ($T_{\text{min}} < T_1$). Classiquement, trois cycles sont ainsi réalisés entre T_{min} et T_{max} [51, 52, 54].

2.2.2 Formation des nanocapsules

Après la réalisation de trois cycles de température, le système est refroidi jusqu'à une température T_d comprise dans la ZIP ($T_1 < T_d < T_2$). Il est alors figé par dilution brutale dans un grand volume d'eau froide (figure 11, page 33) [51, 52]. Les nanocapsules lipidiques obtenues sont en suspension dans la phase externe aqueuse.

Cette technique permet d'obtenir des nanocapsules sans avoir recours à un solvant organique et sans consommation importante d'énergie [52].

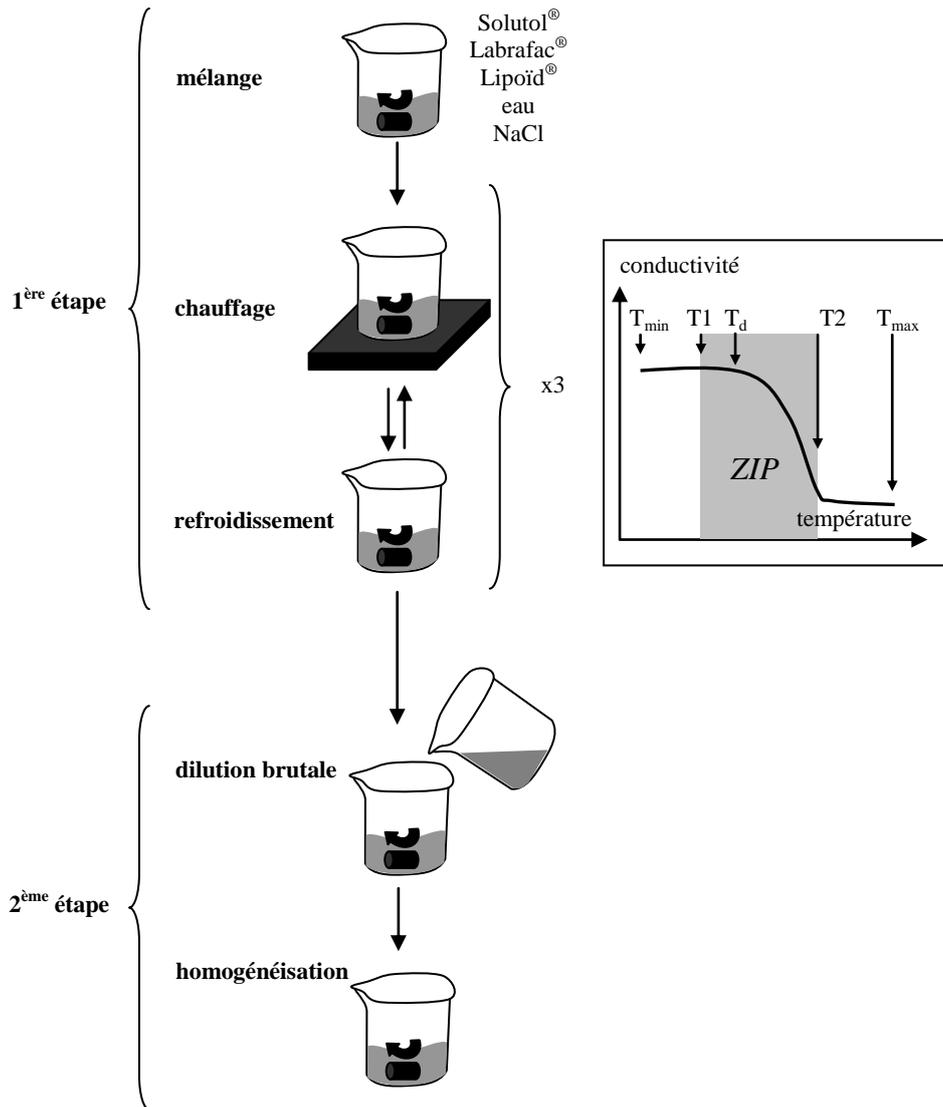


Figure 11 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : schématisation du procédé. En encadré, le suivi conductimétrique des inversions de phase en fonction du temps, déterminant les températures de début et de fin d'inversion de phase (T_1 et T_2), la température de dilution du système (T_d) et les températures minimales (T_{min}) et maximales (T_{max}) à atteindre au cours des cycles. D'après Heurtault et coll. [52].

2.3 Paramètres du procédé

Le procédé de préparation des LNC par inversion de phase peut être contrôlé par la modulation de différents paramètres, en particulier les proportions de chaque constituant, la nature du tensioactif polyéthoxylé, la salinité et le nombre de cycles de température.

2.3.1 Zone de faisabilité

Lors de la mise au point initiale du procédé, une étude systématique a mis en évidence la zone de faisabilité au sein de laquelle des nanocapsules peuvent être obtenues quelques soient les proportions d'eau, d'huile et de tensioactif polyéthoxylé. Cette zone est généralement représentée sur un diagramme ternaire eau / huile / tensioactif polyéthoxylé, pour des quantités de chlorure de sodium et de phospholipides fixées (figure 12, ci-dessous). Des nanocapsules peuvent être obtenues pour des quantités comprises entre 10 et 40% de tensioactif polyéthoxylé, entre 35 et 80% d'eau et entre 10 et 25% d'huile [52, 57].

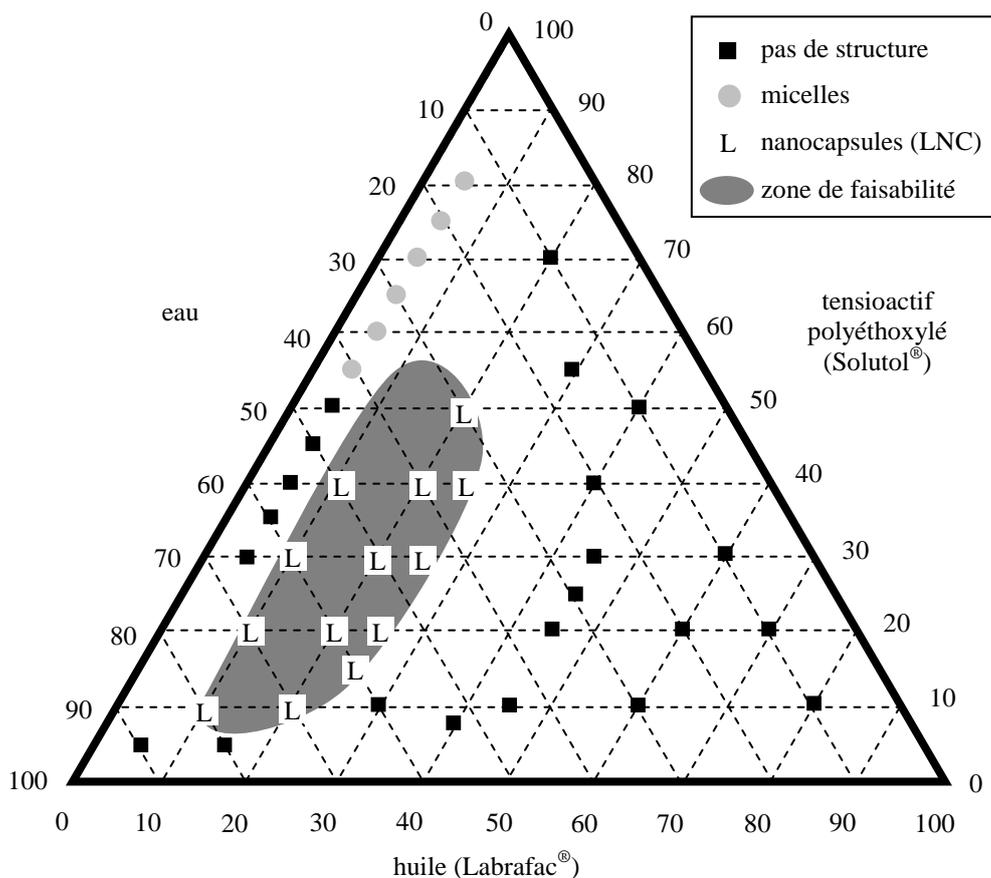


Figure 12 : préparation des nanocapsules lipidiques par inversion de phase : diagramme ternaire définissant la zone de faisabilité des nanocapsules en fonction des quantités d'eau, d'huile et de tensioactif polyéthoxylé pour des quantités de chlorure de sodium et de phospholipides fixées respectivement à 1,75% et 1,5% (p/p). D'après Heurtault et coll. [52].

2.3.2 Mécanisme de l'inversion de phase

L'inversion de phase est régie par les modifications de solubilité du tensioactif polyéthoxylé (Solutol[®]) en fonction de la température. Ces variations de solubilité sont liées aux différents degrés d'hydratation des groupements oxyde d'éthylène [58].

A faible température, les dérivés polyéthoxylés sont hydrosolubles : des moments dipolaires induits permettent l'établissement de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les radicaux oxyde d'éthylène. Lors du chauffage au-dessus d'une température critique, l'agitation thermique provoque la disparition des moments dipolaires induits et les dérivés polyéthoxylés deviennent liposolubles. Cette température critique dépend du composé utilisé [56, 58]. Les températures à atteindre dans la zone d'inversion de température peuvent donc être modulées en modifiant le tensioactif polyéthoxylé utilisé, pour une salinité du milieu fixée [58]. De même, l'augmentation de la quantité de tensioactif polyéthoxylé diminue la température d'inversion de phase [56].

2.3.3 Rôles de la salinité et des cycles de température

La concentration de la phase aqueuse en chlorure de sodium, ou salinité, modifie la solubilité du tensioactif polyéthoxylé (Solutol[®]) et donc la température d'inversion de phase du système. Ce paramètre permet par conséquent de moduler les températures à atteindre pour structurer la micro-émulsion au cours de la première étape de la formation des LNC. Ainsi, une augmentation de la salinité permet de diminuer les températures nécessaires à l'inversion de phase [58].

Les cycles de température permettent de stabiliser la micro-émulsion, en fonction de la quantité de tensioactif polyéthoxylé présent. Plus cette quantité est faible, plus un nombre élevé de cycles doit être réalisé pour garantir la taille et la monodispersité des LNC. Le nombre de cycles apparaît donc comme un paramètre crucial de la formulation [54]. Au sein de la zone de faisabilité, l'augmentation du nombre de cycles au-delà des trois réalisés classiquement n'apporte pas d'avantage en termes de réduction de la taille ou de la polydispersité des nanocapsules. Cependant, pour certaines proportions de constituants, un ou deux cycles suffisent pour garantir les caractéristiques finales des LNC [54].

Ces éléments permettent donc de moduler le procédé en diminuant les températures ou le nombre de cycles, afin d'encapsuler des molécules plus ou moins thermosensibles.

3 Caractéristiques des LNC

3.1 Caractéristiques physiques

3.1.1 Taille et indice de polydispersité

Dans la zone de faisabilité, les nanocapsules obtenues ont une taille variant de 20 à 100 nm. Elles présentent un index de polydispersité (PDI) compris entre 0,05 et 0,15. Leur taille et leur PDI sont modélisables en fonction de la composition de la formulation [57].

Toutes les mesures de taille ont été réalisées par spectroscopie de corrélation de photons (diffusion de la lumière dynamique) et couplées à des observations en microscopie électronique (figure 13, ci-dessous) [51, 52]. En spectroscopie de corrélation de photons, le PDI mesure l'écart de la distribution des tailles à la log-normalité. Une valeur inférieure à 0,3 indique une monodispersité de l'échantillon et confirme l'homogénéité en taille des nanocapsules.

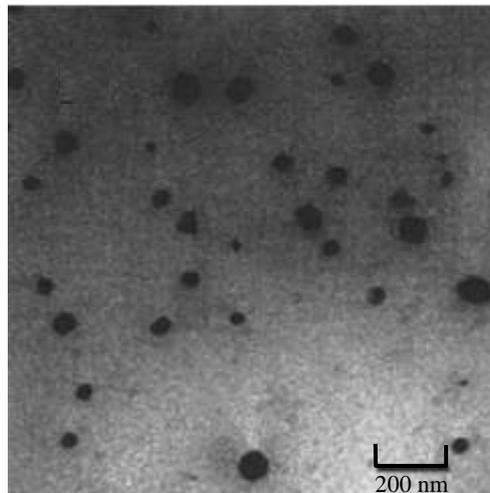


Figure 13 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : image obtenue en microscopie électronique à transmission après coloration négative à l'acide phosphotungstique. D'après Heurtault et coll. [52].

Les quantités de chlorure de sodium et de phospholipides n'influencent pas la taille des objets obtenus, les phospholipides jouant cependant un rôle majeur dans la stabilisation de la surface des nanocapsules. Le tensioactif polyéthoxylé est le composé agissant le plus sur la taille des LNC. Classiquement, les proportions utilisées permettent de préparer des nanocapsules de 20, 50 ou 100 nm de diamètre avec un PDI inférieur à 0,1 (tableau I, ci-dessous) [59].

Le comportement du Solutol[®] à une interface eau / triglycérides a été modélisé, expliquant la capacité du procédé à former des objets de très petite taille et monodisperses [60].

3.1.2 Potentiel zêta

Quelque soit leur taille, les LNC présentent un potentiel zêta faiblement négatif, compris entre -12 mV et -7 mV (tableau I, ci-dessous) [59].

Ce potentiel zêta moyen correspond en fait à deux pics, l'un proche de la neutralité et l'autre proche de -25 mV. Ces deux pics sont rapportés à deux sous-populations de nanocapsules, l'une comprenant du Lipoïd[®] et ayant un potentiel zêta nettement négatif ; l'autre, moins stable, sans molécules de Lipoïd[®], présentant un potentiel zêta faiblement positif (figure 14, page 38) [61].

taille théorique	20 nm	50 nm	100 nm
<i>formulations (quantités en mg)</i>			
Solutol [®]	1 934	846	484
Lipoïd [®]	75	75	75
chlorure de sodium	89	89	89
Labrafac [®]	846	1 028	1 209
eau désionisée	2 055	2 962	3 143
eau désionisée (dilution brutale)	12 500	12 500	12 500
<i>caractéristiques physico-chimiques</i>			
taille moyenne (nm)	22 +/- 2	48 +/- 5	98 +/- 10
PDI	0,03	0,05	0,07
potentiel zêta (mV)	-7,3 +/- 0,1	-10,7 +/- 0,2	-12,4 +/- 0,4

Tableau I : caractéristiques des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : formulation, taille moyenne, polydispersité (PDI) et potentiel zêta moyen des LNC les plus fréquemment préparées. D'après Vonarbourg et coll. [59].

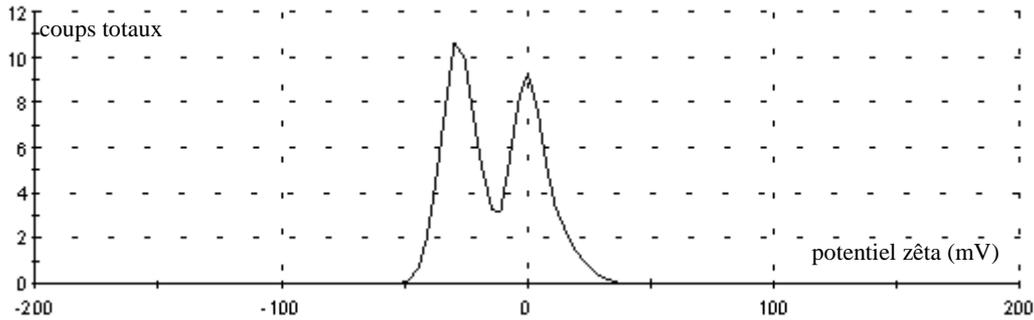


Figure 14 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : représentation graphique du potentiel zêta de LNC de 49 nm de diamètre : -13,3 mV avec deux pics, respectivement -26,8 mV (58%) et 5 mV (42%).

3.2 Structure

Les nanocapsules obtenues par ce procédé d'inversion de phase possèdent un cœur liquide huileux constitué de triglycérides, entouré d'une interface tensioactive cohésive de phospholipides et d'hydroxystéarate de PEG (figure 15, ci-dessous) [52, 54, 55].

Le terme « capsule » est justifié par la distinction entre un cœur liquide et une enveloppe rigide, et les LNC apparaissent donc comme des hybrides entre les liposomes et les nanoparticules polymériques [52, 54].

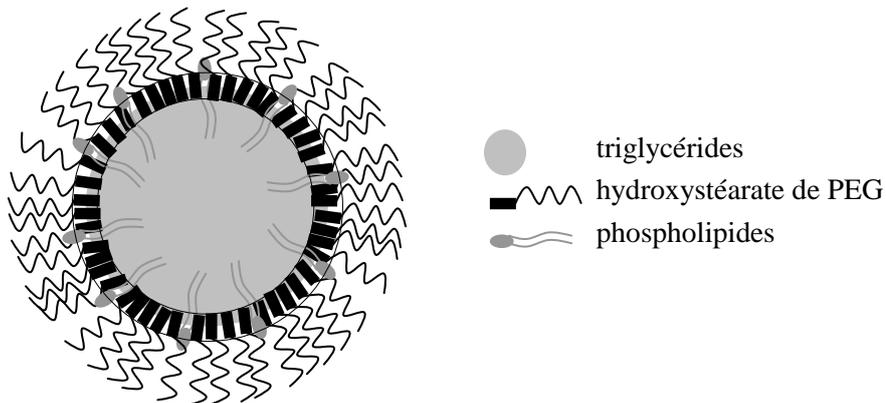


Figure 15 : caractéristiques des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : structure schématique. L'enveloppe tensioactive associe phospholipides (Lipoïd®) et hydroxystéarate de polyéthylène glycol (Solutol®). Le cœur liquide est constitué de triglycérides à chaîne moyenne (Labrafac®). D'après Heurtault et coll. [52] et Vonarbourg et coll. [59].

3.3 Stabilité

La stabilité des LNC a été démontrée durant 18 mois à +4°C [52]. Une étude de faisabilité a également mis en évidence la possibilité de les lyophiliser. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant le tréhalose comme cryoprotecteur [52]. Cette capacité des LNC à être lyophilisées est un argument en faveur d'une paroi externe rigide, et non fluide, comme dans le cas d'une nano-émulsion.

3.4 Furtivité

La furtivité des LNC, c'est-à-dire leur capacité à échapper au système immunitaire, a été étudiée sur les nanocapsules natives et sur des nanocapsules ayant subi différentes modifications structurales.

3.4.1 Nanocapsules lipidiques non modifiées

3.4.1.1 Etudes in vitro

L'évaluation *in vitro* des LNC natives a été réalisée en étudiant l'activation du complément, système le plus impliqué dans l'opsonisation des particules dans le flux sanguin, ainsi que par la capture des LNC par des macrophages murins.

Une très faible activation du système du complément a été mise en évidence, inférieure à 25% pour des LNC de 20 à 100 nm de diamètre et des surfaces étudiées atteignant 3 500 cm². L'activation augmente légèrement avec la taille des nanocapsules. Ces résultats sont vraisemblablement liés à la très forte densité des chaînes de PEG, capable de compenser leur faible longueur [59]. La capture macrophagique des LNC augmente *in vitro* en parallèle à l'augmentation de la taille des nanocapsules. L'effet protecteur conféré par le PEG vis-à-vis de l'opsonisation par les protéines du complément est donc réduit quand la taille des particules augmente [25, 59].

3.4.1.2 *Etudes in vivo*

Des LNC natives ont été évaluées *in vivo* chez le rat lors d'une étude préliminaire. Après administration intraveineuse, leur demi-vie est de 45 min environ, déterminée par un double radiomarquage (coque et cœur) (tableau II, page 41) [62].

Une autre étude a évalué cette demi-vie à 22 min environ chez le rat, avec une accumulation hépatique et splénique, pour des LNC encapsulant différents complexes radiomarqués (tableau II, page 41) [63]. Le marquage utilisé dans cette seconde étude s'est révélé plus stable que celui utilisé dans l'étude préliminaire, expliquant les différences observées.

3.4.2 *Nanocapsules lipidiques modifiées*

Pour améliorer les caractéristiques de furtivité des LNC, la possibilité de leur ajouter des chaînes pégylées plus longues a été évaluée.

Une première technique a consisté à leur adjoindre un conjugué DSPE-PEG (distéaroyl-glycéro-phosphatidyléthanolamine-polyéthylèneglycol), c'est-à-dire du PEG couplé à une chaîne lipidique. L'ajout du conjugué au cours de la formulation interfère avec le processus d'inversion de phase et ne permet pas d'obtenir des LNC. Par contre, une méthode par post-insertion consistant à incuber les LNC préformées en présence du conjugué a permis d'obtenir des nanocapsules de taille contrôlée présentant une densité satisfaisante de chaînes de PEG en surface [64, 65]. Selon la longueur des chaînes de PEG et les quantités de conjugué utilisées (10% de DSPE-PEG 2 000 ou 6% de DSPE-PEG 5 000), des demi-vies de 7 à 8 h environ ont été obtenues après injection intraveineuse des nanocapsules radiomarquées chez le rat (tableau II, page 41). Il faut cependant noter que le phospholipide utilisé était de la phosphatidylcholine hydrogénée de soja pure, et non une lécithine de soja (Lipoid®) [64, 65].

Une autre formulation modifiée a également été évaluée, utilisant directement un PEG 1 500 dans la formulation et non plus un PEG 660 comme tensioactif polyéthoxylé. La demi-vie de ces nanocapsules radiomarquées (5,5 h environ) est nettement supérieure à celle des LNC natives mais inférieure à celles mesurées après ajout de DSPE-PEG par post-insertion (tableau II, ci-dessous). Dans ce cas, la conjugaison d'une très petite taille (26 nm de diamètre), d'une forte densité de PEG et d'une longueur plus importante des chaînes de PEG confère une bonne furtivité au système. Cependant, la structure de ces particules est légèrement différente de celle des LNC classiques. En effet, le suivi conductimétrique de la première étape de la formulation a mis en évidence le passage d'une émulsion H/E à une émulsion triple E/H/E et non à une émulsion E/H [53].

L'ensemble de ces données est récapitulé dans le tableau II ci-dessous.

nature des LNC	technique de marquage	diamètre (nm)	demi-vie plasmatique	référence
LNC natives	double marquage ^{99m}Tc -oxine (a) et ^{125}I (b)	65 +/- 20	(a) : 47 +/- 6 min (b) : 41 +/- 11 min problème de relargage des traceurs	[62]
	complexes lipophiles du ^{188}Re (c) ou du ^{99m}Tc (d)	(c) : 45 +/- 1 (d) : 49 +/- 1	(c) : 21 +/- 1 min (d) : 22 +/- 2 min pas de relargage des traceurs	[63]
LNC avec DSPE-PEG phosphatidylcholine hydrogénée et non Lipoid® [10% de DSPE-PEG 2 000 (e) ou 6% de DSPE-PEG 5 000 (f)]	^3H -cholestéryl-hexadecyl	(e) : 82 +/- 11 (f) : 93 +/- 12	(e) : 7,8 +/- 0,7 h (f) : 6,4 +/- 1,6 h	[64]
LNC avec PEG 1 500	complexe lipophile du ^{99m}Tc	26 environ	5,5 h environ	[53]

Tableau II : caractéristiques des nanocapsules lipidiques obtenues par inversion de phase : demi-vies plasmatiques déterminées chez le rat pour différentes formulations [53, 62, 63, 64].

4 Intérêt et applications

4.1 Généralités

4.1.1 Développement initial

Au cours du développement initial des LNC, des actifs lipophiles tels que la progestérone ou le rouge soudan III ont été encapsulés sans modification de la taille par rapport aux LNC non chargées. Ces composés ont été ajoutés dès le début de la formulation par mélange avec les autres constituants [51].

Les molécules de HS-PEG, apportées par le Solutol[®] et constituant l'enveloppe des LNC ont démontré leur capacité à être relargués après administration et à inhiber la P-glycoprotéine (PgP), une pompe d'efflux associée aux mécanismes MDR (*multi drug resistance*) [66].

Depuis ces formulations initiales en 2000, de nombreux essais d'encapsulation ont été réalisés, assortis d'une évaluation approfondie chez l'animal. Ils ont montré la robustesse du procédé de préparation par inversion de phase, qui conduit rapidement à des nanocapsules lipidiques capables d'encapsuler de nombreuses molécules hydrophobes et amphiphiles, en particulier divers anticancéreux. Toutes les molécules ont conservé leur activité malgré les étapes de chauffage inhérentes au procédé de préparation. La taille des LNC est contrôlée et reste le plus souvent monodisperse même lorsqu'un principe actif est encapsulé [67].

4.1.2 Premières applications

Une molécule amphiphile, l'amiodarone, a été encapsulée dans des LNC de trois tailles (25, 55 et 100 nm environ) après dissolution dans la phase huileuse. L'évaluation *in vitro* a révélé des profils de libération très proches, avec un effet de burst initial très faible et une libération prolongée [68].

Une étude d'encapsulation d'ibuprofène a également confirmé la monodispersité des LNC. Après dissolution du principe actif dans le Labrafac[®], des nanocapsules de 45 à 60 nm de diamètre ont été obtenues, la taille variant en fonction de la concentration en ibuprofène. L'évaluation a été réalisée par voie orale et par voie intraveineuse chez le rat. Les nanocapsules ont présenté dans les deux cas un temps de présence dans le plasma et une efficacité prolongés par rapport aux solutions d'ibuprofène [69].

L'inhibition de la PgP par le Solutol[®] a été mise à profit pour augmenter la capture tissulaire de l'indinavir. Chez des souris non déficientes en PgP, l'administration de LNC contenant de l'indinavir a montré une accumulation de la drogue au niveau du cerveau, des testicules, du cœur, du foie et du rein équivalente à celle observée chez les animaux déficients en PgP. Cependant, l'étape d'encapsulation nécessite l'emploi de solvants organiques avec des rendements d'encapsulation de l'ordre de 50% seulement [70].

4.2 Vectorisation d'anticancéreux

Plusieurs études ont concerné l'encapsulation du paclitaxel. Des mesures de pharmacocinétique et d'efficacité ont été réalisées sur un modèle de carcinome hépatocellulaire chez le rat. Le paclitaxel a été dissous dans le Labrafac[®] et encapsulé dans le cœur lipidique de particules de 50 nm de diamètre environ. Ces LNC ont présenté une efficacité supérieure à celle des formulations commerciales du principe actif et ont évité l'utilisation d'huile de ricin (Crémophor[®]), excipient allergisant présent dans ces formes commercialisées [71]. Une autre étude a été réalisée dans un modèle de gliome chez le rat. Le paclitaxel a été préalablement dissous dans un solvant organique (éthanol et dichlorométhane) avant ajout aux constituants des LNC. Les particules monodisperses obtenues ont mesuré environ 50 nm de diamètre avec un rendement d'encapsulation de 93% environ. Ces LNC ont présenté *in vivo* plusieurs avantages : une délivrance prolongée du paclitaxel, l'absence de Crémophor[®] et le ciblage du compartiment intracellulaire. L'activité du paclitaxel s'est révélée être renforcée par l'inhibition de la PgP. La pénétration intracellulaire des LNC via des microdomaines riches en cholestérol a été mise en évidence [72].

L'activité de l'étoposide encapsulé dans des LNC de 25, 50 et 100 nm de diamètre a également été évaluée *in vitro* sur des cellules de gliome. La synergie entre la libération intracellulaire de la drogue et l'inhibition de la PgP a été mise en évidence, conduisant à une augmentation de la toxicité de l'étoposide dans les cellules malignes [73].

Plus récemment, un anticancéreux de la famille des tripentones (agents anti-tubulines) a été encapsulé. Cette molécule présente une forte activité *in vitro* sur des cellules de cancer de l'ovaire, mais est inefficace *in vivo* du fait de son absence de stabilité dans le flux sanguin. L'encapsulation a été réalisée avec un rendement de 95% environ et a conduit à des LNC monodisperses de 50 nm de diamètre conservant la même activité anticancéreuse *in vitro* que la molécule native. La tripentone se localise dans le cœur liquide de la nanocapsule et dans l'enveloppe, où elle augmente la cohésion de l'interface. Ce résultat offre une nouvelle possibilité d'administration de cette molécule [74].

Enfin, un dérivé organométallique du tamoxifène (ferrocényl diphénol tamoxifène) a été encapsulé dans des LNC de 44 à 52 nm de diamètre et évalué *in vitro* sur des cellules de gliome puis *in vivo* sur un modèle de gliome chez le rat. Ces LNC ont présenté une capacité d'encapsulation supérieure à celle de micelles en raison de leur cœur lipidique. Elles ont été internalisées par les cellules cancéreuses et ont exercé une activité cytostatique sans toxicité sur les cellules saines. *In vivo*, un traitement par voie intratumorale a permis de réduire la taille des tumeurs. Ces résultats constituent la première mise en évidence d'un effet thérapeutique chez l'animal de cette nouvelle classe de drogues [75].

4.3 Applications à la radiothérapie

La vectorisation de complexes lipophiles radiomarqués à but radiothérapeutique, incorporés dans le cœur ou en surface des nanocapsules, a été évaluée. L'étude a porté sur des LNC natives et a confirmé l'encapsulation sans modification de taille ainsi que l'absence de relargage des complexes permettant d'envisager un ciblage cellulaire par internalisation [63].

Une autre étude [76] a utilisé la formulation modifiée avec post-insertion de PEG développée par Hoarau *et coll.* [64]. Des complexes lipophiles (dérivés des dithio- et trithio-toluène) ont été incorporés dans le cœur des nanocapsules, et des systèmes hydrophiles (DSPE-PEG portant un groupe fonctionnel dérivé de l'acide penta-acétique) introduits dans la coque des LNC. Ces LNC sont donc utilisables comme vecteurs de radionucléides dans le contexte de la radio-immunothérapie avec un rendement d'encapsulation et une pureté radiochimique satisfaisants [76].

Sur la base de ce travail, des complexes lipophiles de rhénium 188 ont été inclus dans des LNC, avec un diamètre final de 55 nm environ. Ces formulations ont été évaluées chez le rat dans un modèle de gliosarcome après implantation intracérébrale de cellules 9L. Le traitement par des LNC encapsulant le ^{188}Re administrées par voie intratumorale pour délivrer

une dose de 8 Gy s'est révélé le plus efficace, avec une augmentation statistiquement significative de la survie médiane de 80% par rapport au groupe non traité, sans toxicité particulière. Cette formulation a été éliminée beaucoup plus lentement qu'une solution témoin de ^{188}Re (perrhéate $^{188}\text{ReO}_4^-$), garantissant un effet thérapeutique prolongé. Par ailleurs, des doses plus élevées de LNC encapsulant le ^{188}Re (12 Gy) se sont révélées toxiques, et des doses plus faibles (3 Gy) inefficaces (figure 16, ci-dessous) [77].

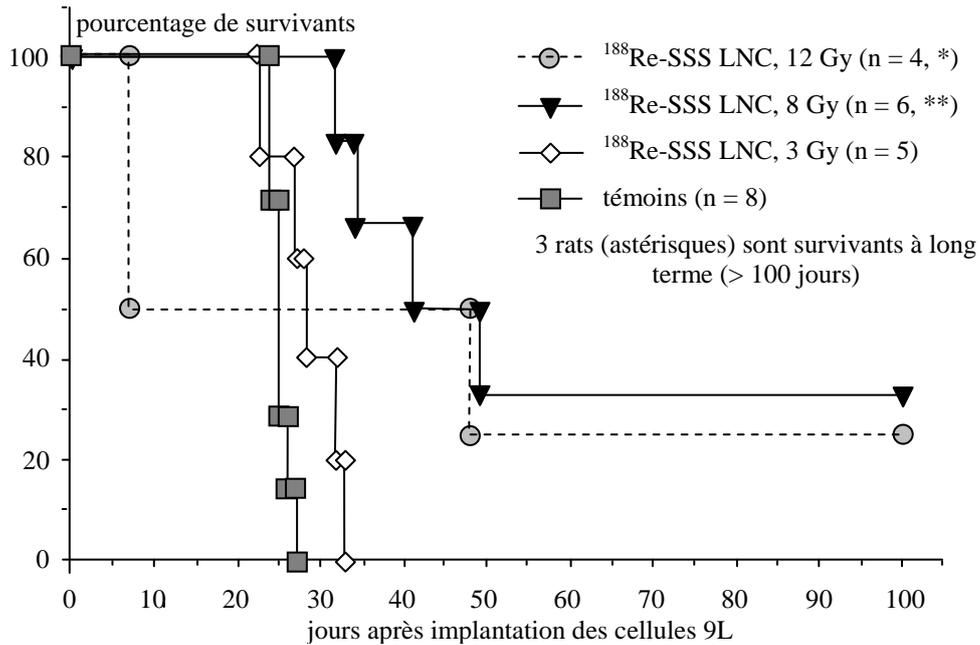


Figure 16 : application des nanocapsules lipidiques préparées par inversion de phase : courbes de survie (modèle de Kaplan-Meier) de rats portant un gliome 9L et traités à J6 par une injection intratumorale de LNC encapsulant des complexes lipophiles de ^{188}Re (^{188}Re -SSS LNC). Résultats pour 4 groupes, adaptés d'après Allard et coll. [77].

4.4 Autres applications

4.4.1 Immunonanocapsules

Pour permettre la conjugaison de ligands aux LNC, celles-ci ont été fonctionnalisées par post-insertion d'un dérivé DSPE-PEG 2 000 présentant une fonction réactive maléimide libre. Des anticorps monoclonaux ou des fragments Fab' thiolés ont alors été greffés sur les LNC via la formation de pont thioéther avec les groupes maléimides. En excluant les résultats obtenus avec les plus grandes quantités d'anticorps (échantillons polydisperses), les LNC obtenues ont mesuré 150 nm de diamètre environ, avec des rendements de couplage de 20 à 30% environ. La capacité des liaisons des anticorps et des fragments Fab' au récepteur à la transferrine a été conservée après fixation aux LNC [78]. Par la suite, ce procédé de fonctionnalisation a été appliqué à des LNC encapsulant des complexes lipophiles de ^{188}Re . Une étude de biodistribution, réalisée chez le rat après injection intraveineuse, a mis en évidence une accumulation cérébrale significative de ces immunonanocapsules par rapport aux LNC classiques. Ce ciblage est apparu plus important avec les anticorps complets qu'avec les fragments Fab', malgré un temps de demi-vie plus court [79].

4.4.2 Encapsulation de complexes d'ADN

Une étude récente a montré la possibilité d'encapsuler des lipoplexes d'ADN dans des LNC modifiées. L'ADN est préalablement complexé par une association entre un lipide cationique (dioléoyloxypropyl-triméthylammonium, DOTAP) et un lipide neutre (dioléoyl-phosphatidyléthanolamine, DOPE) afin de former des lipoplexes présentant un rapport de charges de 5 (+) pour 1 (-). Ces lipoplexes mesurent 400 +/- 100 nm de diamètre et présentent un potentiel zêta de 50 mV environ. Ils sont dispersés dans la phase aqueuse lors du mélange des différents constituants des LNC, qui sont formulées selon la technique habituelle par inversion de phase. Les modifications consistent à remplacer le Lipoïd[®] par du Plurol[®] (polyglycéryl dioléate) et à adapter les proportions afin d'obtenir une ZIP entre 40°C et 60°C. Les nanocapsules obtenues mesurent 110 +/- 55 nm de diamètre pour un potentiel zêta de 5 mV environ. L'encapsulation des lipoplexes dans le cœur des LNC a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage. L'efficacité des ces nanocapsules pour transférer des cellules a été confirmée *in vitro* [25, 80].

SYSTEMES GELIFIANTS A BASE D'ALGINATE

1 Introduction

L'acide alginique est un polysaccharide naturel de la paroi des algues brunes. Ce copolymère linéaire polyanionique est constitué d'acide guluronique et d'acide mannuronique s'organisant en blocs. Les propriétés viscosogènes des solutions de sels d'alginate ont été largement utilisées dans les domaines agro-alimentaires et pharmaceutiques [81, 82].

L'acide alginique peut également former à température ambiante des gels très résistants en présence de cations divalents, notamment le calcium. Cette dernière propriété a été mise à profit pour immobiliser du matériel biologique, en particulier des cellules vivantes, dans le domaine des biotechnologies [83]. Pour assurer la production industrielle de billes de gel, de nombreuses techniques ont été développées : la gélification externe permet d'obtenir des billes de grande taille [84] tandis que la gélification interne conduit à des microsphères [85]. Plus récemment, des systèmes nanoparticulaires ont été préparés à partir de gels d'alginate afin de vectoriser des molécules pharmacologiquement actives.

2 Acide alginique et alginates

2.1 Origine

L'acide alginique est un polysaccharide naturel présent dans la phase matricielle des algues brunes de la famille des *Phaeophyceae*. Avec les fucanes et les ascophyllanes, il constitue la zone amorphe de la paroi des algues, c'est-à-dire la matrice formée de sucres hydrosolubles entourant les cellules. Cette paroi comporte également des sucres insolubles, celluloses et mannanes, constituant la phase squelettique (figure 17, ci-dessous) [81, 82].

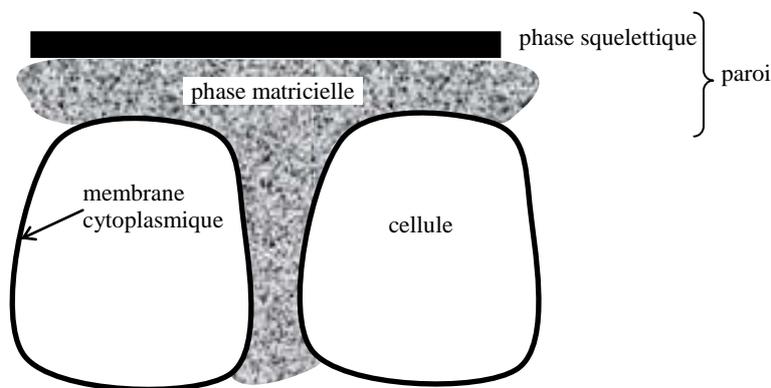


Figure 17 : origine de l'acide alginique : représentation schématique des phases squelettiques et matricielles de la paroi des algues brunes. D'après Ranarivelo [81].

L'acide alginique a été découvert par Standford en 1883 dans un extrait obtenu à partir d'une laminaire, *Laminaria digitata*. A l'exception des nombreuses espèces d'algues brunes (*Laminaria*, *Macrocystis*, *Fucus*, *Ascophyllum*, ...), il n'est présent dans aucun autre tissu végétal. Il apparaît cependant sous forme acétylé dans certaines espèces bactériennes [81, 82].

L'acide alginique représente 10% à 50% en masse de la matière sèche des algues brunes, avec des variations selon les espèces, les origines des algues et les cycles végétatifs [81].

2.2 Structure

L'acide alginique est un polyuronide, c'est-à-dire un copolymère linéaire comportant 5 à 100 000 résidus de deux acides uroniques, l'acide β -D-mannuronique et l'acide β -L-guluronique. Ces monomères sont reliés par des liaisons glycosidiques de type β -(1 \rightarrow 4). Le rapport acide mannuronique / acide guluronique est compris entre 0,25 et 2,25. Il varie d'une algue à l'autre, mais également en fonction de la saison, de l'âge et de la portion de l'algue considérée [81, 82].

A l'état naturel, chaque monomère est hydraté, et la formule brute de l'acide alginique est donc $(C_6H_8O_6)_n (H_2O)_n$. Les deux résidus sont associés sur les mêmes chaînes, formant des enchaînements dénommés blocs ou séquences. Les blocs sont constitués d'un même acide uronique, permettant de distinguer les blocs M, riches en acide mannuronique, et les blocs G, riches en acide guluronique. Les séquences sont formées par l'association alternée des deux monomères et sont parfois nommées blocs MG ou blocs GM [81, 82].

Les blocs G s'organisent en une double hélice lâche, laissant les radicaux carboxyles facilement accessibles. Au contraire, les blocs M forment des doubles hélices très serrées, masquant un grand nombre de groupements actifs. Les liaisons glycosidiques établies entre deux monomères d'acide mannuronique sont diéquatoriales, avec une période de translation de 10,3 Å tandis que les liaisons entre deux monomères d'acide guluronique sont diaxiales avec une période de 8,7 Å (figure 18, page 51). Les blocs M et les blocs G, bien ordonnés, résistent beaucoup mieux à l'hydrolyse que les séquences [81, 82].

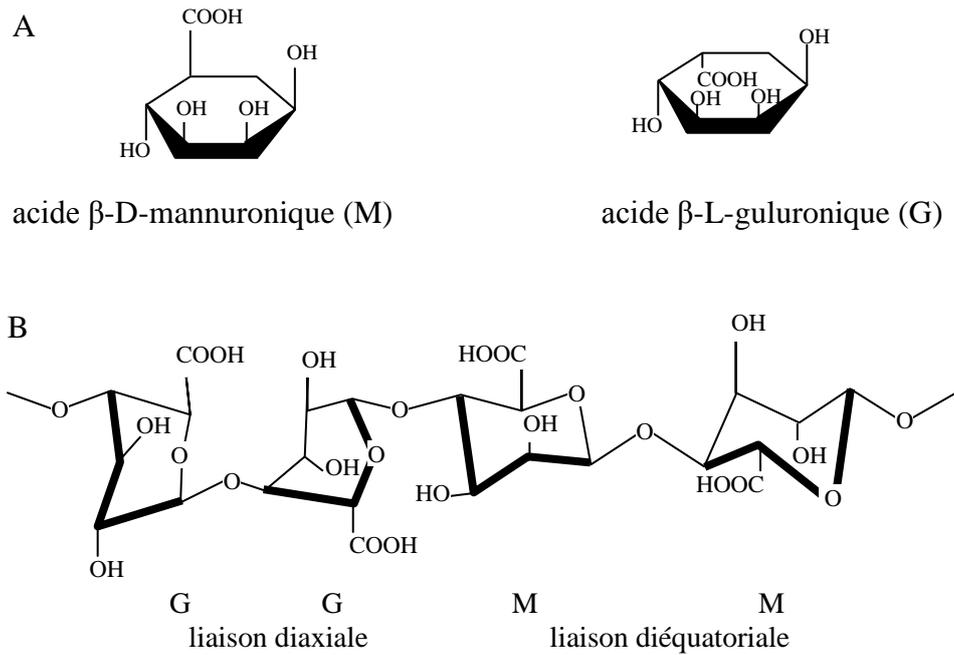


Figure 18 : structure de l'acide alginique : structure chimique des acides β -D-mannuronique et β -L-guluronique (A) ; structure schématique de l'acide alginique (B). D'après Draget et coll. [86].

2.3 Propriétés physico-chimiques

L'acide alginique pur est insoluble dans l'eau. Il est cependant capable de gonfler en milieu aqueux, en absorbant 200 à 300 fois son poids en eau. De nombreux sels de l'acide alginique sont hydrosolubles et conduisent à des solutions plus ou moins visqueuses. L'alginate de sodium donne des solutions beaucoup plus visqueuses que celles obtenues avec l'alginate d'ammonium ou l'alginate de potassium. Outre la nature du sel, la présence de blocs M est favorable aux propriétés viscosogènes des alginates [81, 82].

En présence de calcium, on observe la formation d'un gel insoluble. Ce gel d'alginate de calcium se forme par diffusion du cation au sein de la structure du polysaccharide puis rétention des cations par coordination au sein des blocs G. L'agrégation de ces blocs conduit à des structures caractéristiques, dénommées « boîtes à œufs », formées par l'assemblage de chaînes parallèles. Dans les blocs M, la position relative des acides carboxyliques les uns par rapport aux autres ne permet pas cet assemblage (figure 19, page 52). La formation de ce gel est indépendante de la température et n'est pas réversible lors des changements de température (thermo-indépendance et thermo-irréversibilité). Par contre, elle est iono-réversible, c'est-à-dire que le gel peut être détruit par ajout d'ions sodium ou potassium [81, 82].

Les gels formés avec d'autres cations divalents présentent des propriétés variées : les gels d'alginate de magnésium sont peu résistants et parfaitement solubles, tandis que les gels formés avec le zinc, le strontium ou le baryum sont plus résistants que les gels d'alginate de calcium [83].

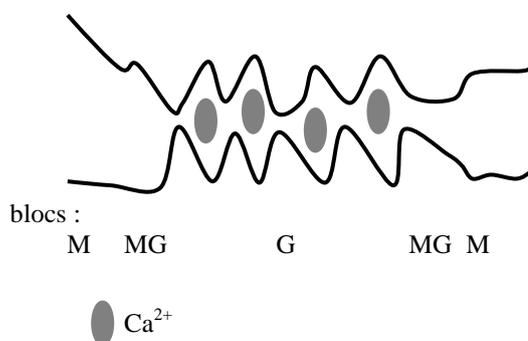


Figure 19 : propriétés physico-chimiques de l'acide alginique : organisation en « boîte à œufs » du gel d'alginate de calcium, au niveau des blocs G du polysaccharide. D'après Thu et coll. [87].

2.4 Domaines d'application

L'acide alginique et différents alginates sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour leurs propriétés viscosogènes, gélifiantes et comme stabilisant d'émulsion. Ils appartiennent aux additifs de la famille « émulsifiants, gélifiants, stabilisants » (tableau III, ci-dessous) [81].

dérivé de l'acide alginique	code de l'additif alimentaire
acide alginique	E400
alginate de sodium	E401
alginate de potassium	E402
alginate d'ammonium	E403
alginate de calcium	E404
alginate de propylèneglycol	E405

Tableau III : dérivés de l'acide alginique et additifs alimentaires. D'après Ranarivelo [81].

Dans l'industrie pharmaceutique, l'acide alginique et les alginates constituent les principes actifs de différentes spécialités indiquées dans le reflux gastro-oesophagien et dans le traitement des plaies cutanées. Ils sont également utilisés comme excipients, pour favoriser le délitement des comprimés (acide alginique), comme agent épaississant ou gonflant (alginate de sodium), ou comme agent gélifiant (alginate de calcium) (tableau IV, page 54). Leur emploi en radiodécontamination digestive a également été proposé, du fait de la capacité de l'acide alginique à capter le strontium et à empêcher sa résorption [81, 82].

Enfin, les capacités de gélification de l'alginate en présence de calcium ont été utilisées pour l'encapsulation de matériel vivant et pour la vectorisation de principes actifs.

dérivé de l'acide alginique	principe actif ou excipient	indication ou rôle	nom commercial de la spécialité pharmaceutique
acide alginique	principe actif	reflux gastro-oesophagien	TOPAAL [®] , TOPALKAN [®]
	excipient	agent délitant agent visqueux	comprimés AVLOCARDYL [®] COMBANTRIN [®] PREVISCAN [®] TERCIAN [®] FASIGYNE [®] collyre à libération prolongée CARTEOL [®]
alginate de calcium	principe actif	hémostatique (voie cutanée)	plus aucune spécialité commercialisée
	excipient	agent gélifiant	divers pansements (statut de dispositif médical)
alginate de calcium et d'ammonium	excipient	agent épaississant	LARIAM [®]
alginate de magnésium	excipient	agent visqueux	TOPAAL [®] , TOPALKAN [®]
alginate de propylène glycol	excipient	agent émulsifiant	BREVOXYL [®] [voie cutanée] QUESTRAN [®]
alginate de sodium	principe actif	reflux gastro-oesophagien	GAVISCON [®] et génériques PSEUDOPHAGE [®]
	excipient	agent gonflant (matrice hydrophile pour les formes à libération prolongée)	par voie locale ALOPLASTINE [®] ARTHRODONT [®] comprimés à libération prolongée ISOPTINE [®] , TARKA [®] et génériques

Tableau IV : spécialités pharmaceutiques contenant des dérivés de l'acide alginique en tant que principe actif ou comme excipient [88].

3 Vectorisation et alginate de calcium

Différents systèmes gélifiants ont été proposés pour immobiliser du matériel vivant, en particulier dans le domaine des biotechnologies. L'association de l'alginate de sodium et d'un sel de calcium s'est rapidement imposée comme une technique de choix. En effet, l'alginate de sodium est peu coûteux, répond aux exigences de qualité des industries alimentaires et pharmaceutiques et est biocompatible. De même, les sels de calcium sont facilement accessibles, peu coûteux et cliniquement acceptables. Enfin, les gels d'alginate de calcium peuvent être formés à température ambiante et sont très résistants. A l'inverse, les systèmes gélifiants à base d'autres polysaccharides présentent différents inconvénients : les gels de carraghénanes nécessitent des concentrations élevées en potassium, peu compatibles avec l'usage clinique ; les gels d'agarose sont formés après une étape de chauffage susceptible de dégrader le matériel à encapsuler [83].

Les premières techniques proposées pour préparer des billes d'alginate de calcium consistent à mettre en contact extemporanément deux phases contenant respectivement le sel d'alginate et le sel de calcium : on parle alors de gélification externe. Dans un second temps, des méthodes par gélification interne ont été développées, consistant à relarguer le calcium initialement insoluble dans la solution d'alginate [83]. Enfin, diverses méthodes permettent de former des nanoparticules, le plus souvent par l'intermédiaire d'un état « pré-gel » de l'alginate de calcium.

3.1 Gélification externe

Les méthodes par gélification externe se sont imposées comme des techniques rapides et simples d'immobilisation de matériel biologique, permettant de procéder à température ambiante et sans solvants organiques [84].

3.1.1 *Technique par chute de goutte*

3.1.1.1 Description

La technique classique par chute de goutte présente deux variantes : chute de la solution d'alginate dans la solution de calcium, ou inversement.

Dans les deux cas, la récupération des billes est aisée et aucune étape ultérieure de purification n'est nécessaire [84].

Dans le premier cas, le matériel à encapsuler est mis en suspension dans une solution d'alginate de sodium, dont les gouttes tombent ensuite dans un bain de chlorure de calcium. A condition de maintenir une agitation suffisante pour éviter l'agrégation [83], les billes ainsi formées sont homogènes et de qualité reproductible [89]. Comme la diffusion du calcium dans l'alginate est plus rapide que la fuite de l'alginate hors de la goutte, le processus de gélification commence par l'extérieur de la goutte et enferme le matériel à encapsuler. Cependant, cette formation du gel à l'extérieur de la goutte complique la poursuite de la diffusion du calcium vers l'intérieur de la goutte. Par conséquent, la force du gel formé varie selon la profondeur, conduisant à des systèmes intégralement gélifiés mais possédant une coque plus rigide que le cœur [90].

La seconde possibilité consiste à introduire une solution contenant le calcium et le matériel à encapsuler dans un bain d'alginate. L'alginate gélifie dès sa diffusion dans la goutte contenant le calcium et conduit à des billes formées d'une coque rigide gélifiée et d'un cœur pas ou peu gélifié [89].

3.1.1.2 Applications

Depuis le début des années 1980, ces techniques de gélification externe par chute de goutte ont été utilisées avec succès pour immobiliser des cellules de plantes et de mammifères, ainsi que des levures et des bactéries, permettant de réaliser des fermentations contrôlées. De l'insuline, de l'encre, de la magnétite et des huiles alimentaires ont également été encapsulées [91]. Une autre application importante a consisté à encapsuler des îlots pancréatiques au sein d'une membrane semi-perméable d'alginate de calcium pour assurer la production d'insuline en traitement du diabète de type I [86, 89]. Enfin, l'alginate de calcium ainsi produit a été employé comme milieu de culture solide en alternative à l'agar afin notamment de réduire les coûts de préparation des milieux [86].

3.1.1.3 *Limites*

Les billes obtenues mesurent de 2 à 5 mm de diamètre, en fonction du diamètre des aiguilles employées et de la viscosité de la solution contenant l'alginate [91]. Ces deux paramètres sont les éléments limitant la réduction de la taille des billes, qui est importante pour améliorer les performances de fermentation et réduire les risques de rupture des billes par accumulation de gaz [91]. En outre, la technique par chute de goutte ne permet pas de produire à l'échelle industrielle des objets de moins de 3 mm de diamètre : le nombre d'aiguilles nécessaire est en effet trop important pour assurer des débits de production satisfaisants [91].

3.1.2 *Autres techniques de gélification externe*

Diverses alternatives ont été proposées pour réduire la taille des billes ou améliorer les débits de production : association de systèmes à jet d'air aux aiguilles, utilisation de pulsations électrostatiques ou d'aiguilles vibrantes [91]. En parallèle, des techniques de spray-drying (séchage par nébulisation) ont été développées pour encapsuler des principes actifs dans l'alginate de calcium. Les billes obtenues mesurent de 200 à 500 μm de diamètre mais sont très polydisperses [92].

Sur la base de ces méthodes par gélification externe, des microcapsules plus complexes ont été formées. La bille de gel est recouverte d'une couche de poly-L-lysine afin de former une membrane semi-perméable, puis un second recouvrement est effectué par une couche d'alginate. Les objets finaux présentent un diamètre de 600 à 700 μm environ et ont été largement utilisés pour encapsuler des cellules, en particulier pour prévenir la réaction immunitaire après greffe cellulaire en l'absence de traitement immunosuppresseur [93].

Même si les procédés par gélification externe sont moins étudiés aujourd'hui, une équipe portugaise les a utilisés en 2004 pour préparer des microsphères composites alginate – céramique. Ces microsphères sont destinées à servir de substitut osseux et ont également été évaluées comme vecteurs d'enzyme. La solution d'alginate contenant les céramiques est extrudée dans un bain de chlorure de calcium. La taille des billes est contrôlée par régulation du débit d'extrusion et du débit du flux d'air coaxial entraînant la rupture des gouttes. Les particules obtenues mesurent 1 000 μm de diamètre environ, réduit à 400 à 600 μm après séchage. La structure des céramiques n'est pas modifiée au cours du procédé de préparation [84].

3.2 Gélification interne

Dans le cas des techniques par gélification interne, le calcium présent sous forme insoluble dans la solution d'alginate y est secondairement solubilisé pour entraîner la gélification [83]. Ces techniques ont été développées en raison de la difficulté de produire en milieu industriel des particules d'alginate de calcium à l'échelle micrométrique.

3.2.1 Techniques pionnières de gélification interne

Les premières méthodes de gélification *in situ* ont utilisé une solution d'alginate de sodium contenant un complexe de calcium et d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) en suspension. Le relargage du calcium survient lors de l'abaissement progressif du pH à la suite de l'hydrolyse lente d'une gluconolactone. Les gels ainsi préparés ont notamment été utilisés pour immobiliser des levures [83].

Dans le même temps, d'autres équipes ont tenté de développer des techniques de gélification au sein d'une émulsion pour réduire la taille des objets formés. Ces méthodes ont rencontré de nombreuses difficultés : le chlorure de calcium s'est révélé insoluble dans les phases huileuses, la taille des particules n'a pas pu être contrôlée et des phénomènes de coagulation ont été observés [91].

Enfin, une autre alternative a consisté à mettre un sel insoluble de calcium en suspension dans la solution d'alginate puis à extruder cette suspension dans un milieu acide afin de relarguer le calcium et de provoquer la gélification. Cette méthode a conduit à des billes de 2 à 3 mm de diamètre. Cependant, elle a nécessité des pH inférieurs à 6 pour déclencher la gélification, ce qui n'a pas permis de l'appliquer à l'immobilisation cellulaire. En tout état de cause, cette technique a préfiguré le développement de l'association émulsification / gélification interne [85].

3.2.2 Emulsification couplée à la gélification interne

3.2.2.1 Description de la technique

Au début des années 1990, Poncelet *et coll.* ont mis au point une méthode combinant émulsification et gélification interne pour produire des billes de petite taille [85, 91, 92, 94]. Schématiquement, une émulsion E/H est formée à partir d'une phase aqueuse contenant l'alginate de sodium dissous et un sel de calcium insoluble en suspension, la phase huileuse étant pour sa part constituée d'une huile végétale (étapes a et b, figure 20, page 60). Une réduction brutale du pH lors de l'ajout d'un acide organique soluble dans la phase huileuse permet de relarguer le calcium de son sel insoluble et entraîne la gélification de billes d'alginate (étape c, figure 20, page 60) [85]. Une dernière étape consiste à diluer l'émulsion dans un grand volume de chlorure de calcium pour permettre une gélification externe des billes lors de la coalescence entre les gouttelettes contenant l'alginate pré-gélifié et celle contenant le chlorure de calcium (étape d, figure 20, page 60). Après ajout d'un certain volume de cette solution de chlorure de calcium, on observe une inversion de phase de l'émulsion puis finalement une séparation des phases huileuses et aqueuses permettant de récupérer les billes de gel (étape e, figure 20, page 60) [85, 92].

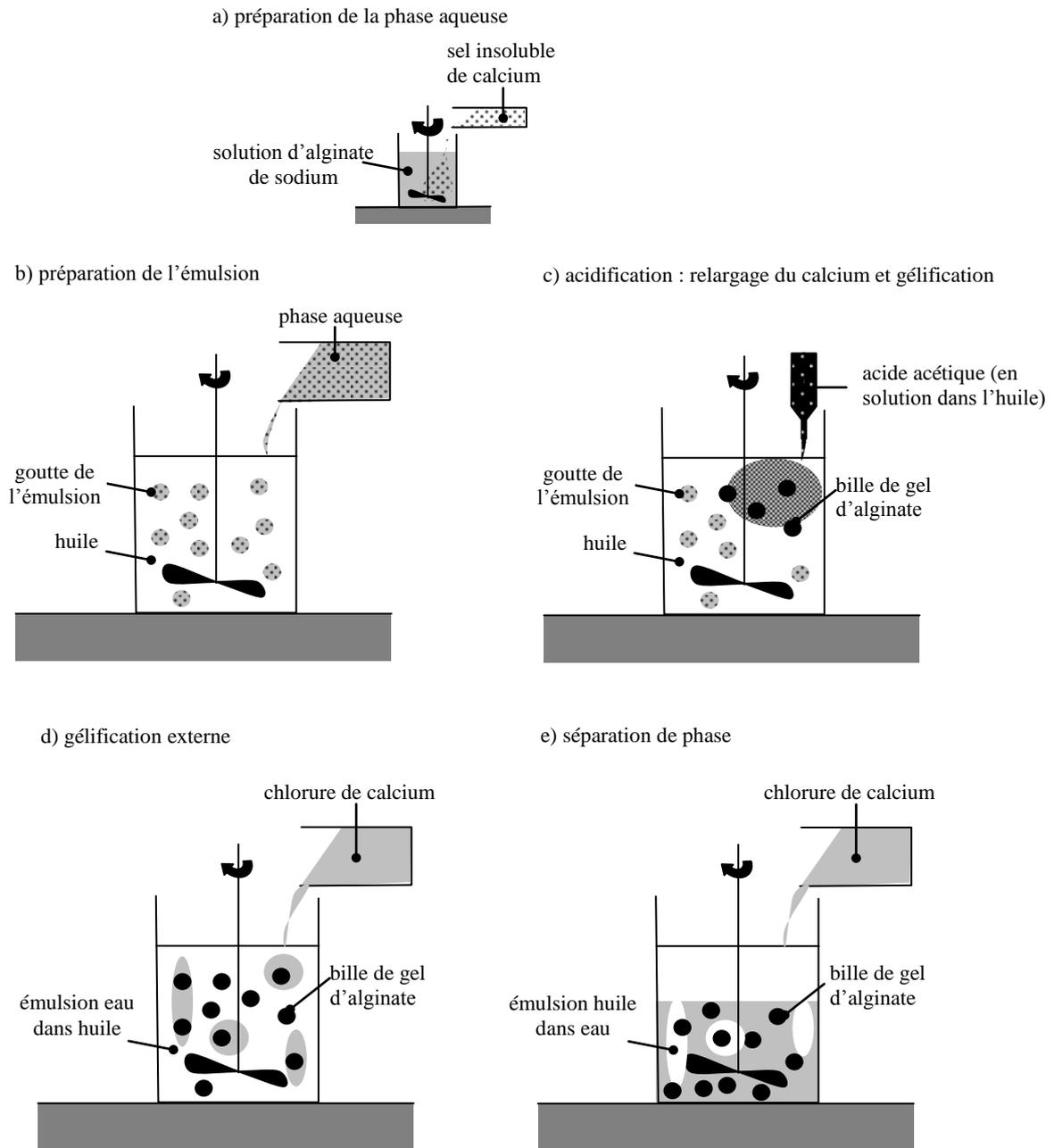


Figure 20 : émulsification couplée à la gélification interne : description du procédé. D'après Poncelet et coll. [92].

Lors de la description initiale de la technique, du citrate de calcium a été utilisé. Des billes de 200 à 1 000 μm de diamètre environ ont été obtenues, avec une distribution polymodale présentant deux pics principaux. La phase huileuse était constituée d'huile de colza. L'ajout d'acide acétique a permis de modifier le pH pour entraîner la gélification. La principale limite de ce procédé est la distribution polymodale, même si celle-ci a également été observée en utilisant une technique par extrusion (gélification externe). Dans les deux cas, les petites billes sont supposées provenir de la cassure des plus grosses [91].

Par la suite, une étude systématique de différents réactifs et conditions opératoires a permis d'optimiser le procédé et d'en améliorer la compréhension [85, 94].

3.2.2.2 Choix du sel de calcium

Concernant le choix du sel insoluble du calcium, le carbonate, le citrate, le monohydrogénophosphate, l'oxalate et le tartrate ont été évalués. Cette étude comparative a permis de retenir le carbonate de calcium comme réactif optimal, en raison de sa capacité à fournir des distributions monomodales et à permettre d'opérer à un pH proche de la neutralité, ce qui permet d'envisager l'immobilisation cellulaire [85, 94].

Avec ce sel, on observe la formation de billes sphériques, de distribution le plus souvent monomodale (le mode varie de 300 à 700 μm) avec une polydispersité acceptable. Il est cependant indispensable de réduire la taille des grains de poudre par sonication ou broyage afin d'assurer une dispersion plus homogène du sel de calcium au sein de la solution d'alginate. Ce pré-traitement permet d'obtenir des billes plus résistantes, plus sphériques et présentant moins de grains. Dans ces conditions optimisées, la gélification est instantanée [85].

Le carbonate est le sel libérant le moins de calcium au pH initial (pH 7,5) et entraînant la gélification la plus rapide au pH final (pH \leq 6,5), conduisant à des billes résistantes. La résistance et la sphéricité des billes augmentent lors de l'augmentation de la quantité d'acide acétique ajoutée, sans pour autant réduire le pH de façon trop marquée : l'emploi d'un tampon acétate permet de maîtriser ces conditions opératoires [85, 94].

3.2.2.3 Autres paramètres opératoires

Si l'huile de colza et l'acide acétique ont été conservés, plusieurs types d'alginate de sodium ont été comparés. Le contrôle des propriétés de ces polysaccharides est indispensable, en raison de variations observées selon les laboratoires fournisseurs : la viscosité et la teneur en acide guluronique modifient les caractéristiques des billes formées [94]. Ainsi, les distributions les plus étroites sont obtenues en associant au carbonate de calcium un alginate de faible viscosité et contenant peu d'acide guluronique. Cette faible teneur en acide guluronique permet de réduire les interactions entre l'alginate et le calcium et donc de limiter la gélification précoce, c'est-à-dire avant réduction du pH [85].

Seul l'acide guluronique se lie au calcium, et un rapport calcium / monomère d'alginate de $\frac{1}{4}$ est apparu suffisant pour assurer la formation du gel. Dans ces conditions optimisées, le pic principal des distributions en taille des billes représente 90% du volume total, avec cependant un écart-type de l'ordre de 30% [85].

Il est par ailleurs possible d'obtenir une bille possédant une taille inférieure à la taille de la goutte de l'émulsion. En effet, la source interne de calcium évite la formation d'une coque de gel à l'extérieur de la goutte, qui compliquerait la diffusion du calcium au sein de la goutte [85]. De plus, par rapport à des billes obtenues par gélification externe, les billes obtenues par gélification interne sont plus homogènes et moins perméables [85].

La viscosité de l'huile et l'ajout d'un tensioactif lors de la formation de l'émulsion sont deux autres paramètres permettant de contrôler la taille des gouttes de l'émulsion et donc des billes de gel [83].

3.2.2.4 Applications

Cette technique par gélification interne au sein d'une émulsion a été utilisée pour développer un vecteur d'administration de l'insuline par voie orale. Différents protocoles de purification des microparticules ont été évalués, incluant des centrifugations et des cycles de lavage. Des variations importantes ont été observées entre les différentes particules, en termes de diamètre moyen (de 6 à 70 μm environ), de sphéricité, de régularité de surface et de rendement d'encapsulation de l'insuline. La méthode optimale pour obtenir des particules de petite taille (mais de morphologie altérée) avec un rendement d'encapsulation satisfaisant associe centrifugation à 12 500 g et lavage par un mélange tamponné de solvants organiques (hexane, acétone et isopropanol) [95].

Cette méthode a également permis d'encapsuler les bactéries *Lactobacillus lactis* dans des microsphères de 50 µm de diamètre recouvertes de poly-L-lysine pendant un procédé de préparation des yaourts [83].

Ces billes ont par ailleurs été utilisées pour encapsuler de l'ADN en vue d'une administration par voie orale. Par rapport à la gélification externe, la technique par émulsification et gélification interne a permis d'obtenir des gels plus homogènes, assurant une meilleure stabilité de la bille en milieu gastro-intestinal simulé. Le rendement d'encapsulation est cependant plus faible que par gélification externe [96].

3.2.3 Autres techniques de gélification interne

De légères modifications de la technique par émulsification et gélification interne ont permis de l'appliquer à l'encapsulation de composés lipophiles. Le composé lipophile est mis en solution dans une phase huileuse, elle-même émulsionnée dans la solution contenant l'alginate et le calcium. Une émulsion triple H/E/H est enfin formée lors de l'ajout de la phase huileuse externe. La gélification est déclenchée par l'acidification de l'émulsion, conduisant à des gouttes d'huile encapsulées dans le gel d'alginate. Ces billes sont secondairement recouvertes par une membrane de chitosan afin d'en diminuer la porosité et d'en augmenter la stabilité en milieu gastro-intestinal. Lors de l'immersion des billes dans une solution de chitosan, des interactions électrolytiques entre les groupes carboxyles de l'alginate et les amines polycationiques du chitosan permettent d'obtenir le recouvrement. Les microsphères finalement obtenues ont un diamètre variant de 500 à 800 µm selon les conditions opératoires, avec une distribution monomodale. Les rendements d'encapsulation sont de l'ordre de 80%. La présence de chitosan permet d'assurer une stabilité des billes en milieu acide (estomac), avant libération du contenu en milieu intestinal [97].

Plus récemment, une autre technique par gélification interne a été présentée, permettant d'améliorer le contrôle de la taille des billes. Le mode opératoire combine la source interne de calcium (sous forme de carbonate) et l'électrodispersion. La phase aqueuse contenant l'alginate et le carbonate de calcium est atomisée par électrodispersion dans un second liquide contenant un acide organique pour provoquer au cours d'une même étape la formation des billes et de l'émulsion. Selon le voltage appliqué, la taille moyenne des billes varie de 40 à 400 µm environ, avec une diminution de la taille quand le voltage augmente. Les objets obtenus présentent une structure sphérique avec un cœur liquide et une coque gélifiée [90].

3.3 Autres techniques

3.3.1 Etat « pré-gel » de l'alginate de calcium

Dès 1992, une technique permettant de préparer des nanoparticules à base d'alginate de calcium a été décrite. Le procédé consiste à former un système « pré-gel » d'alginate de calcium, puis à le faire interagir avec de la poly-L-lysine. L'état « pré-gel » est obtenu en mélangeant une solution d'alginate de sodium très diluée et une solution de chlorure de calcium également très diluée. Dans un second temps, l'ajout de poly-L-lysine permet la formation de complexes polyélectrolytiques avec les résidus mannuroniques de l'alginate du « pré-gel » et conduit à la formation de nanoparticules. Le diamètre moyen de celles-ci varie de 300 à 750 nm, augmentant lorsque la concentration en alginate augmente. Les capacités d'encapsulation de ces nanoparticules ont été évaluées avec de la doxorubicine, conduisant à une augmentation de la taille des billes (1 000 à 3 000 nm) avec des rendements d'encapsulation proches de 100% [98].

A la suite de ce travail, plusieurs équipes ont exploité cet état « pré-gel » en remplaçant la poly-L-lysine par du chitosan pour améliorer la stabilité des nanoparticules dans les fluides digestifs.

L'une de ces équipes parle de mécanisme de « gélification contrôlée de l'alginate induite par les cations », avant de former le complexe polyélectrolytique par ajout du chitosan. Les nanoparticules formées, mesurant en moyenne 230 nm mais très polydisperses (PdI = 0,44) ont été utilisées pour encapsuler divers antituberculeux. Les rendements d'encapsulation varient de 70 à 95% selon les molécules. Des études de pharmacocinétique et d'efficacité ont été conduites *in vivo* chez la souris après administration per os. Ces vecteurs ont permis de maintenir des taux plasmatiques efficaces pendant 5 à 11 jours au lieu de 24 heures pour les dérivés azolés non encapsulés [99, 100].

Une autre équipe, utilisant la même technique, parle de « pré-gélification ionotropique » suivie de la formation d'un complexe polyélectrolytique avec le chitosan. Les nanoparticules ainsi préparées, mesurant environ 750 nm de diamètre, ont été utilisées pour encapsuler de l'insuline avant administration par voie orale chez le rat [101, 102].

3.3.2 Interaction directe alginate – chitosan

Enfin, des nanoparticules peuvent être formées par interaction polyélectrolytique directe entre l'alginate et le chitosan. Les nanoparticules obtenues mesurent entre 200 et 500 nm de diamètre environ, et sont observées comme sphériques et denses en microscopie électronique à transmission. Elles ont permis d'encapsuler un antibiotique du groupe des fluoroquinolones (gatifloxacine) avec des rendements d'encapsulation variant de 60 à 80% selon les conditions expérimentales [103].

CONCLUSION

Les siRNA sont les molécules effectrices assurant la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ils présentent un intérêt majeur en thérapeutique, à condition d'être vectorisés afin d'atteindre les cellules cibles. De très nombreux vecteurs ont été proposés, le plus souvent sur le modèle de la thérapie génique. Ces stratégies sont fréquemment associées à des modifications chimiques des siRNA afin d'optimiser l'activité thérapeutique et d'augmenter sa stabilité physico-chimique.

Parmi les nombreux vecteurs disponibles, des nanocapsules lipidiques (LNC) sont préparées par inversion de phase, procédé permettant de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques et ne nécessitant qu'un faible apport énergétique. Ces LNC ont été largement étudiées dans plusieurs modèles *in vivo*, notamment dans le traitement du gliome chez le rat. Elles ont récemment démontré leur capacité à encapsuler un complexe lipophile d'ADN.

Les systèmes gélifiants à base de polysaccharides, en particulier les gels d'alginate de calcium, ont été largement utilisés pour vectoriser des molécules actives et immobiliser des cellules vivantes. Ces gels sont susceptibles d'interagir avec les siRNA et d'être incorporés aux LNC. Leur utilisation est donc envisageable pour adapter la formulation des nanocapsules lipidiques à l'encapsulation des siRNA.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 McManus MT.**
Small RNAs and immunity.
Immunity, décembre 2004 ; 21 (6) : 747-56.
- 2 Akhtar S, Benter I.**
Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi : potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity.
Advanced drug delivery reviews, 30 mars 2007 ; 59 (2-3) : 164-82.
- 3 Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.**
Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans.
The plant cell, avril 1990 ; 2 (4) : 279-289 ; d'après [6].
- 4 Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR.**
Flavonoid genes in *petunia* : addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression.
The plant cell, avril 1990 ; 2 (4) : 291-9 ; d'après [6].
- 5 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.**
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.
Nature, 19 février 1998 ; 391 (6669) : 806-11 ; d'après [6].
- 6 Kim VN.**
Small RNAs : classification, biogenesis, and function.
Molecules and cells, 28 février 2005 ; 19 (1) : 1-15.
- 7 Hammond SM.**
MicroRNA therapeutics : a new niche for antisense nucleic acids.
Trends in molecular medicine, mars 2006 ; 12 (3) : 99-101.
- 8 Lu PY, Woodle MC.**
Delivering small interfering RNA for novel therapeutics.
Methods in molecular biology, 2008 ; 437 : 93-107.
- 9 Tang G.**
siRNA and miRNA : an insight into RISCs.
Trends in biochemical sciences, février 2005 ; 30 (2) : 106-14.
- 10 Aagaard L, Rossi JJ.**
RNAi therapeutics : principles, prospects and challenges.
Advanced drug delivery reviews, 30 mars 2007 ; 59 (2-3) : 75-86.
- 11 Liu X, Fortin K, Mourelatos Z.**
MicroRNAs: biogenesis and molecular functions.
Brain pathology, janvier 2008 ; 18 (1) : 113-21.

- 12 Aigner A.**
Applications of RNA interference : current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo.
Applied microbiology and biotechnology, août 2007 ; 76 (1) : 9-21.
- 13 Saydam O, Glauser DL, Heid I, Turkeri G, Hilbe M, Jacobs AH, Ackermann M, Fraefel C.**
Herpes simplex virus 1 amplicon vector-mediated siRNA targeting epidermal growth factor receptor inhibits growth of human glioma cells in vivo.
Molecular therapy, novembre 2005 ; 12 (5) : 803-12.
- 14 Saydam O, Saydam N, Glauser DL, Pruschy M, Dinh-Van V, Hilbe M, Jacobs AH, Ackermann M, Fraefel C.**
HSV-1 amplicon-mediated post-transcriptional inhibition of Rad51 sensitizes human glioma cells to ionizing radiation.
Gene therapy, août 2007 ; 14 (15) : 1143-51.
- 15 Gary DJ, Puri N, Won YY.**
Polymer-based siRNA delivery : perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery.
Journal of controlled release, 16 août 2007 ; 121 (1-2) : 64-73.
- 16 Kawakami S, Hashida M.**
Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration.
Drug metabolism and pharmacokinetics, juin 2007 ; 22(3) : 142-51.
- 17 Amarzguioui M, Prydz H.**
An algorithm for selection of functional siRNA sequences.
Biochemical and biophysical research communications, 16 avril 2004 ; 316 (4) : 1050-8.
- 18 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A.**
Rational siRNA design for RNA interference.
Nature biotechnology, mars 2004 ; 22 (3) : 326-30.
- 19 Patzel V, Rutz S, Dietrich I, Köberle C, Scheffold A, Kaufmann SH.**
Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency.
Nature biotechnology, novembre 2005 ; 23 (11) : 1440-4.
- 20 Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H.**
Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA.
Nucleic acid research, 15 janvier 2003 ; 31 (2) : 589-95.
- 21 Behlke MA.**
Progress towards in vivo use of siRNAs.
Molecular therapy, avril 2006 ; 13 (4) : 644-70.
- 22 Toub N, Malvy C, Fattal E, Couvreur P.**
Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA.
Biomedicine and pharmacotherapy, novembre 2006 ; 60 (9) : 607-20.

- 23 Kinoshita M, Hynynen K.**
Key factors that affect sonoporation efficiency in in vitro settings : the importance of standing wave in sonoporation.
Biochemical and biophysical research communications, 10 août 2007 ; 359 (4) : 860-5.
- 24 Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP.**
Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer.
Biomaterials, août - septembre 2008 ; 29 (24-25) : 3477-96.
- 25 Vonarbourg A, sous la direction de Benoit JP.**
Caractérisation de nanocapsules lipidiques pégylées : application à l'encapsulation de complexes d'ADN.
Thèse de doctorat en pharmacologie expérimentale et clinique, Angers, 2006, soutenue le 20 avril 2006.
- 26 Hanai K, Takeshita F, Honma K, Nagahara S, Maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T.**
Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines.
Annals of the New York academy of sciences, octobre 2006 ; 1082 : 9-17.
- 27 Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T.**
Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo.
Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 23 août 2005 ; 102 (34) : 12177-82.
- 28 Katas H, Alpar HO.**
Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery.
Journal of controlled release, 10 octobre 2006 ; 115 (2) : 216-25.
- 29 Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J.**
Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference.
Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 8 juin 2004 ; 101 (23) : 8676-81.
- 30 Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A.**
RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo.
Gene therapy 2005 Mar ; 12 (5) : 461-6.
- 31 Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC.**
Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle.
Nucleic acid research, 1^{er} novembre 2004 ; 32 (19) : e149.

- 32 **Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG.**
PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy.
Journal of controlled release, 28 novembre 2006 ; 116 (2) : 123-9.
- 33 **Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK.**
Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery.
Cancer Research, 1^{er} août 2005 ; 65 (15) : 6910-8.
- 34 **Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Kotliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I.**
RNAi-mediated gene silencing in non-human primates.
Nature, 4 mai 2006 ; 441 (7089) : 111-4.
- 35 **Hassan A, Tian Y, Zheng W, Ji H, Sandberg K, Verbalis JG.**
Small interfering RNA-mediated functional silencing of vasopressin V2 receptors in the mouse kidney.
Physiological genomics, 11 mai 2005 ; 21 (3) : 382-8.
- 36 **Sørensen DR, Leirdal M, Sioud M.**
Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice.
Journal of molecular biology, 4 avril 2003 ; 327 (4) : 761-6.
- 37 **Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T.**
Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer.
Clinical cancer research, 15 novembre 2004 ; 10 (22) : 7721-6.
- 38 **Sato A, Takagi M, Shimamoto A, Kawakami S, Hashida M.**
Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice.
Biomaterials, mars 2007 ; 28 (7) : 1434-42.
- 39 **Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J.**
A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium.
Gene therapy, août 2006 ; 13 (16) : 1222-34.
- 40 **Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Durieux B, Löffler K, Fechtner M, Röhl T, Fisch G, Dames S, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J.**
RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy.
Gene therapy, septembre 2006 ; 13 (18) : 1360-70.

- 41 **Cardoso AL, Simões S, de Almeida LP, Pelisek J, Culmsee C, Wagner E, Pedroso de Lima MC.**
siRNA delivery by a transferrin-associated lipid-based vector : a non-viral strategy to mediate gene silencing.
The journal of gene medicine, mars 2007 ; 9 (3) :170-83.
- 42 **Desigaux L, Sainlos M, Lambert O, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Vigneron JP, Lehn P, Lehn JM, Pitard B.**
Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference.
Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 16 octobre 2007 ; 104 (42) : 16534-9.
- 43 **Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP.**
Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs.
Nature, 11 novembre 2004 ; 432 (7014) : 173-8.
- 44 **McNamara JO 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH.**
Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras.
Nature biotechnology, août 2006 ; 24 (8) : 1005-15.
- 45 **Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ.**
Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma.
Cancer Research, 1^{er} octobre 2005 ; 65 (19) : 8984-92.
- 46 **Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhamesh H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P.**
Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma.
Pharmaceutical research, mai 2006 ; 23 (5) : 892-900.
- 47 **Crombez L, Charnet A, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Heitz F, Divita G.**
A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery.
Biochemical society transactions, février 2007 ; 35 (Pt 1) : 44-6.
- 48 **Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J.**
Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors.
Nature biotechnology, juin 2005 ; 23 (6) : 709-17.
- 49 **Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP.**
Physico-chemical stability of colloidal lipid particles.
Biomaterials, octobre 2003 ; 24 (23) : 4283-300.

- 50 Igartua M, Saulnier P, Heurtault B, Pech B, Proust JE, Pedraz JL, Benoit JP.**
Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite.
International journal of pharmaceutics, 21 février 2002 ; 233 (1-2) : 149-57.
- 51 Heurtault B, Saulnier P, Benoit JP, Proust JE, Pech B, Richard J.**
Lipid nanocapsules, preparation method and use as medicine.
Brevet n°PCT/FR01/00621, 2 mars 2001.
- 52 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP.**
A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers.
Pharmaceutical research, juin 2002 ; 19 (6) : 875-80.
- 53 Béduneau A, Saulnier P, Anton N, Hindré F, Passirani C, Rajerison H, Noiret N, Benoit JP.**
Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method : evaluation of their stealth properties.
Pharmaceutical research, septembre 2006 ; 23 (9) : 2190-9.
- 54 Anton N, Gayet P, Benoit JP, Saulnier P.**
Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method : an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion.
International journal of pharmaceutics, 1^{er} novembre 2007 ; 344 (1-2) : 44-52.
- 55 Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C, Benoit JP.**
Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules : influence of the dipolar distribution at the interface.
Electrophoresis, juin 2005 ; 26 (11) : 2066-75.
- 56 Anton N, Benoit JP, Saulnier P.**
Particular conductive behaviors of emulsion phase inverting.
Journal of drug delivery science and technology, mars 2008 ; 18 (2) : 95-99.
- 57 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, Benoît JP.**
The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution.
European journal of pharmaceutical sciences, janvier 2003 ; 18 (1) : 55-61.
- 58 Anton N, Saulnier P, Béduneau A, Benoit JP.**
Salting-out effect induced by temperature cycling on a water/nonionic surfactant/oil system.
The journal of physical chemistry. B, 12 avril 2007 ; 111 (14) : 3651-7.
- 59 Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP.**
Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake.
Journal of biomedical materials research. Part A, 1^{er} septembre 2006 ; 78 (3) : 620-8.
- 60 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoît JP.**
Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface.
International journal of pharmaceutics, 21 août 2002 ; 242 (1-2) : 167-70.

- 61 Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P.**
Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface. I. Kinetics of surface film formation.
Colloids and surfaces. B, biointerfaces, septembre 2005 ; 45 (1) : 14-23.
- 62 Cahouet A, Denizot B, Hindré F, Passirani C, Heurtault B, Moreau M, Le Jeune J, Benoit J.P.**
Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using scintigraphy and gamma counting.
International journal of pharmaceutics, 21 août 2002 ; 242 (1-2) : 367-71.
- 63 Ballot S, Noiret N, Hindré F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, Benoit JP.**
^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy : formulation and biodistribution.
European journal of nuclear medicine and molecular imaging, mai 2006 ; 33 (5) : 602-7.
- 64 Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC.**
Novel long-circulating lipid nanocapsules.
Pharmaceutical research, octobre 2004 ; 21 (10) : 1783-9.
- 65 Hoarau D, Delmas P, Leroux JC.**
Stealth lipid nanocapsules, method for the preparation thereof and use thereof as a carrier for actives principles.
Brevet n° PCT/IB/O3/03213, 11 juin 2003.
- 66 Benoit JP, Lamprecht A.**
Use of P-glycoprotein inhibitor surfactants at the interface of a colloidal carrier.
Brevet n°PCT/IB03/00977, 12 février 2003.
- 67 Saulnier P, Anton N, Heurtault B, Benoit JP.**
Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers.
Comptes Rendus Chimie, mars 2008 ; 11 (3) ; 221-228.
- 68 Lamprecht A, Bouligand Y, Benoit JP.**
New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone.
Journal of controlled release, 7 novembre 2002 ; 84 (1-2) : 59-68.
- 69 Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP.**
Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment.
International journal of pharmaceutics, 8 juillet 2004 ; 278 (2) : 407-14.
- 70 Pereira de Oliveira M, Garcion E, Venisse N, Benoit JP, Couet W, Olivier JC.**
Tissue distribution of indinavir administered as solid lipid nanocapsule formulation in mdr1a (+/+) and mdr1a (-/-) CF-1 mice.
Pharmaceutical research, novembre 2005 ; 22 (11) : 1898-1905.
- 71 Lacoeyille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, Cales P, Le Jeune JJ, Lamprecht A, Benoit JP.**
In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel.
International journal of pharmaceutics, 1^{er} novembre 2007 ; 344 (1-2) : 143-9.

- 72 Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoît JP.**
A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats.
Molecular cancer therapeutics, juillet 2006 ; 5 (7) : 1710-22.
- 73 Lamprecht A, Benoit JP.**
Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition.
Journal of controlled release, 15 mai 2006 ; 112 (2) : 208-13.
- 74 Malzert-Fréon A, Vrignaud S, Saulnier P, Lisowski V, Benoît JP, Rault S.**
Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent.
International journal of pharmaceutics, 31 août 2006 ; 320 (1-2) : 157-64.
- 75 Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessières A, Jaouen G, Benoit JP.**
Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas.
Journal of controlled release, 10 septembre 2008 ; 130(2) : 146-53.
- 76 Justin E, Mouglin-Degraef M, Faivre-Chauvet A, Remaud-Le Saëc P, Hindre F, Benoit JP, Chatal JF, Barbet J, Gestin JF.**
Radiolabeling and targeting of lipidic nanocapsules for applications in radioimmunotherapy.
The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging, mars 2007 ; 51 (1) : 51-60.
- 77 Allard E, Hindre F, Passirani C, Lemaire L, Lepareur N, Noiret N, Menei P, Benoit JP.**
¹⁸⁸Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas.
European journal of nuclear medicine and molecular imaging, octobre 2008 ; 35 (10) : 1838-46.
- 78 Béduneau A, Saulnier P, Hindré F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP.**
Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments.
Biomaterials, novembre 2007 ; 28 (33) : 4978-4990.
- 79 Béduneau A, Hindré F, Clavreul A, Leroux JC, Saulnier P, Benoit JP.**
Brain targeting using novel lipid nanovectors.
Journal of controlled release, 18 février 2008 ; 126 (1) : 44-9.
- 80 Saulnier P, Benoît JP, Passirani C, Vonarbourg A, Lambert O, Pitard B.**
Nanocapsules of lipophilic complexes of nucleic acids.
brevet n°PCT/IB2008/050431, 6 février 2008.

- 81 Ranarivelo Y, Rasamoelisendra R, Aralambomanan D, Randriamialinoro F.**
Module 6, polysaccharides des algues in "Cours de discipline universitaire à distance : chimie des produits naturels".
Mise à jour du 30 janvier 2002, consultation le 20 juillet 2008 à l'adresse <http://www.refer.mg/cours/wcl/index.htm> (Faculté des Sciences d'Antananarivo, Madagascar).
- 82 Perez R.**
Ecologie, croissance et régénération. Teneurs en acide alginique de *Laminaria digitata* sur les côtes françaises de la Manche.
Revue des travaux de l'institut scientifique des pêches maritimes, 1971 ; 35 (3), 287-346.
- 83 Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F.**
Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles.
Journal of microencapsulation, mai 2006 ; 23 (3) : 245-57.
- 84 Ribeiro CC, Barrias CC, Barbosa MA.**
Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices.
Biomaterials, août 2004 ; 25 (18) : 4363-73.
- 85 Poncelet D.**
Production of alginate beads by emulsification/internal gelation.
Annals of the New York academy of sciences, novembre 2001 ; 944 :74-82.
- 86 Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O.**
Alginate based new materials.
International journal of biological macromolecules, août 1997 ; 21 (1-2) : 47-55.
- 87 Thu B, Gåserød O, Paus D, Mikkelsen A, Skjåk-Braek G, Toffanin R, Vittur F, Rizzo R.**
Inhomogeneous alginate gel spheres : an assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced X-ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling.
Biopolymers, janvier 2000 ; 53 (1) : 60-71.
- 88 Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM).**
Banque de données sur le médicament « Thériaque ».
Accessible à l'adresse www.theriaque.org, consultation le 22 juillet 2008.
- 89 Villani S, Marazzi M, Bucco M, Faustini M, Klinger M, Gaetani P, Crovato F, Vigo D, Caviglioli F, Torre ML.**
Statistical approach in alginate membrane formulation for cell encapsulation in a GMP-based cell factory.
Acta Biomaterialia, juillet 2008 ; 4 (4) : 943-9.
- 90 Zhao Y, Carvajal MT, Won YY, Harris MT.**
Preparation of calcium alginate microgel beads in an electrodispersion reactor using an internal source of calcium carbonate nanoparticles.
Langmuir, 4 décembre 2007 ; 23 (25) : 12489-96.

- 91 Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, Halle JP, Neufeld RJ, Fournier A.**
Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology.
Applied microbiology and biotechnology, octobre 1992 ; 38 (1) : 39-45.
- 92 Poncelet D, Babak V, Dulieu C, Picot A.**
A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation.
Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, septembre 1999 ; 155 (2-3) : 171-176.
- 93 de Vos P, de Haan BJ, Kamps JA, Faas MM, Kitano T.**
Zeta-potentials of alginate-PLL capsules : a predictive measure for biocompatibility ?
Journal of biomedical materials research. Part A, 15 mars 2007 ; 80 (4) : 813-9.
- 94 Poncelet D, Poncelet de Smet B, Beaulieu C, Huguet ML, Fournier A, Neufeld RJ.**
Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry.
Applied microbiology and biotechnology, septembre 1995 ; 43 (4) : 644-650.
- 95 Reis CP, Ribeiro AJ, Neufeld RJ, Veiga F.**
Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery.
Biotechnology and bioengineering, 1^{er} avril 2007 ; 96 (5) : 977-89.
- 96 Quong D, Neufeld RJ, Skjåk-Braek G, Poncelet D.**
External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation.
Biotechnology and bioengineering, 20 février 1998 ; 57 (4) : 438-46.
- 97 Ribeiro AJ, Neufeld RJ, Arnaud P, Chaumeil JC.**
Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres.
International journal of pharmaceutics, septembre 1999 ; 187 (1) : 115-23.
- 98 Rajaonarivony M, Vauthier C, Couarraze G, Puisieux F, Couvreur P.**
Development of a new drug carrier made from alginate.
Journal of pharmaceutical sciences, septembre 1993 ; 82 (9) : 912-7.
- 99 Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK.**
Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses.
International journal of antimicrobial agents, mai 2006 ; 27 (5) : 409-16.
- 100 Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK.**
Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis.
Nanomedicine, septembre 2007 ; 3 (3) : 239-43.
- 101 Sarmiento B, Ribeiro AJ, Veiga F, Ferreira DC, Neufeld RJ.**
Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation.
Journal of nanoscience and nanotechnology, août 2007 ; 7 (8) : 2833-41.

- 102 Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D.**
Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery.
Pharmaceutical research, décembre 2007 ; 24 (12) : 2198-206.
- 103 Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK.**
Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular
delivery : formulation, optimisation and in vitro characterisation.
European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, mars 2008 ;
68 (3) : 513-25.

Nom – Prénoms : TIPHINE Thomas

Titre du mémoire-thèse : Formulation de nanocapsules lipidiques de siRNA

Résumé du mémoire-thèse

Les siRNA assurent la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes et présentent un intérêt majeur en thérapeutique. Ils doivent cependant être vectorisés afin d'atteindre les cellules cibles. Cette stratégie est fréquemment associée à des modifications chimiques du siRNA destinées à la fois à assurer sa stabilité et à optimiser son activité thérapeutique. Parmi les nombreux vecteurs disponibles, des nanocapsules lipidiques (LNC) préparées par inversion de phase ont été largement étudiées. Ce procédé de fabrication ne nécessite ni solvant organique, ni apport énergétique important. Après avoir été évaluées dans de nombreux modèles animaux, elles ont récemment été utilisées pour vectoriser des complexes lipophiles d'ADN. Les systèmes gélifiants à base d'alginate de calcium ont été utilisés pour immobiliser des cellules vivantes et vectoriser diverses molécules, via diverses techniques de gélification contrôlée. Ce type de gel pourrait à la fois interagir avec les siRNA et être incorporé aux nanocapsules lipidiques afin d'en assurer l'encapsulation.

MOTS-CLES

NANOCAPSULES LIPIDIQUES (LNC) ; ALGINATE ; siRNA ; GEL ; ENCAPSULATION

JURY

PRESIDENT : M. Christian MERLE, Docteur en Pharmacie,
Professeur de Pharmacie Galénique
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Jean-Pierre BENOIT, Docteur en Pharmacie,
Professeur de Pharmacie Galénique, Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie et Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers

Mme Catherine PASSIRANI, Docteur en Pharmacie,
Maître de Conférences de Pharmacie Galénique
Faculté de Pharmacie d'Angers

M. Jean-Christophe FREVILLE, Docteur en Pharmacie,
Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Départemental de La Roche Sur Yon

Mme Dominique NAVAS, Docteur en Pharmacie,
Praticien Hospitalier
Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes

Adresse de l'auteur : 16 rue de la Sirène
44300 Nantes